

Tânia Mara Pimenta Amaral

Efeito de terapias de estimulação mecânica e elétrica no fluxo salivar, na mucosite oral induzida por quimioterapia e no nível de citocinas na saliva de pacientes submetidos a TCTH

**Faculdade de Odontologia
Universidade Federal de Minas Gerais
Belo Horizonte - MG
2010**

Tânia Mara Pimenta Amaral

Efeito de terapias de estimulação mecânica e elétrica no fluxo salivar, na mucosite oral induzida por quimioterapia e no nível de citocinas na saliva de pacientes submetidos a TCTH

Tese apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Odontologia.

Área de concentração: Estomatologia

Orientadora: Prof^a. Dra. Tarcília Aparecida da Silva

**Universidade Federal de Minas Gerais
Faculdade de Odontologia
Belo Horizonte - MG
2010**



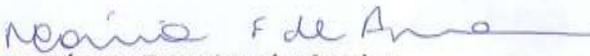
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE DONTOLOGIA
Programa de Pós-Graduação em Odontologia

Tese intitulada "*Impacto da terapia de estimulação mecânica e elétrica no fluxo salivar, na mucosite oral induzida por quimioterapia e no nível de citocinas na saliva*", área de concentração em **Estomatologia**, apresentada por **Tânia Mara Pimenta Amaral**, para obtenção do grau de **Doutor em Odontologia**, **APROVADA** pela Comissão Examinadora constituída pelos seguintes professores:

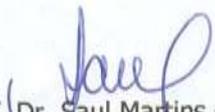

Dra. Tarcília Aparecida da Silva
FO-UFMG - Orientadora


Dra. Aline Carvalho Batista
UFG


Dr. Leandro Napier de Souza
PUC-MG


Dra. Maria Cássia Ferreira de Aguiar
FO-UFMG


Dr. Ricardo Alves de Mesquita
FO-UFMG


Prof. Dr. Saul Martins de Paiva
Coordenador do Colegiado do
Programa de Pós-Graduação em Odontologia

Belo Horizonte, 21 de dezembro de 2010.

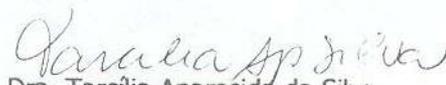


UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Faculdade de Odontologia
Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Odontologia
Av. Pres. Antônio Carlos, 6627 - Pampulha
Belo Horizonte - MG - 31.270-901
Tel: (31) 3409 2470 Fax: (31) 3409 2472
Email: posgrad@odonto.ufmg.br

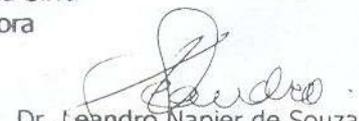


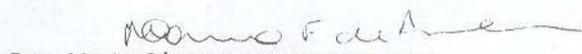
Ata da Comissão Examinadora para julgamento da Tese de Doutorado em Odontologia, área de concentração em **Estomatologia**, da candidata **Tânia Mara Pimenta Amaral**

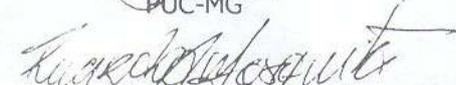
Aos 21 de dezembro de 2010, às 14:00 h, na sala de Pós-Graduação (3403) da Faculdade de Odontologia, reuniu-se a Comissão Examinadora, composta pelos professores Dra. Tarcília Aparecida da Silva, Dra. Aline Carvalho Batista, Dr. Leandro Napier de Souza, Dra. Maria Cássia Ferreira de Aguiar e Dr. Ricardo Alves de Mesquita. A Professora Dra. Tarcília Aparecida da Silva, Orientadora da Tese, na qualidade de Presidente da sessão, apresentou a Comissão Examinadora e declarou abertos os trabalhos. À candidata foi dado o tempo de até 50 (cinquenta) minutos para fazer a exposição oral sobre o seu trabalho **"Impacto da terapia de estimulação mecânica e elétrica no fluxo salivar, na mucosite oral induzida por quimioterapia e no nível de citocinas na saliva"**. Encerrada a exposição, foi iniciada a argüição, dentro do limite de tempo de 30 (trinta) minutos, pelos Professores Dra. Aline Carvalho Batista, Dr. Leandro Napier de Souza, Dra. Maria Cássia Ferreira de Aguiar e Dr. Ricardo Alves de Mesquita, com limite de 30 (trinta) minutos para a resposta. Terminadas as argüições, a Presidente suspendeu os trabalhos por 10 minutos para que os examinadores pudessem decidir pelo resultado a ser dado à candidata. A Comissão Examinadora opta pela*aprovação*..... da candidata. Para constar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada por mim Dra. Tarcília Aparecida da Silva, Presidente e pelos demais membros desta comissão examinadora. Belo Horizonte, 21 de dezembro de 2010.


Dra. Tarcília Aparecida da Silva
FO-UFMG - Orientadora


Dra. Aline Carvalho Batista
UFG


Dr. Leandro Napier de Souza
PUC-MG


Dra. Maria Cássia Ferreira de Aguiar
FO-UFMG


Dr. Ricardo Alves de Mesquita
FO-UFMG

A Deus que me conduziu divinamente em toda a minha caminhada e na concretização de mais um trabalho.

Aos pacientes transplantados e suas respectivas famílias, sinônimo de luta e esperança pela cura. Exemplo de vida. Lição de amor. Sei que alguns de vocês não se encontram neste plano físico. Porém, tenho certeza que sentem a minha gratidão.

Muito obrigada por terem permitido a realização desta pesquisa, não nos mostrando apenas suas bocas, mas abrindo seus corações e nos revelando o real valor da vida.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a *Deus*, por colocar pessoas tão especiais em meu caminho. Obrigada Senhor, pelo seu grande amor e proteção.

Aos meus pais *José Julio* e *Ivone*, por terem abdicado de muitas coisas na vida para darem o melhor deles aos seus filhos. Obrigada, meus queridos, por todo amor que recebo, pelo exemplo de vida.

Ao meu grande companheiro, meu marido *Átila*, que nos meus momentos de estresse, manifestou seu amor com paciência, carinho e zelo pela minha pessoa. Você me complementa!

Aos meus tesouros, meus filhos, *Lucas* e *Tiago*. Obrigada meus amores por compreenderem as ausências e o valor deste trabalho. Com vocês busco constantemente coragem e equilíbrio

A meus irmãos, *Graça*, *Selma*, *Kátia*, *Júlio* e *Jairo*, pois vocês completam meus dias. Vocês sabem o quanto família é importante para mim! Obrigada pelo apoio e carinho!

À minha orientadora Professora Doutora *Tarcília Aparecida da Silva* que me mostrou grande profissionalismo, e o valor de uma grande pesquisadora! As suas orientações foram essenciais para a obtenção dos resultados!

Aos Professores *Mauro Abreu* e *Martinho Horta*, agradeço pelas substanciais colaborações em minha qualificação, que contribuíram de forma consistente nesse trabalho. Obrigada pela grande contribuição!

Ao meu grande colega e amigo do doutorado, *Marco Aurélio Rosa*, pela grande ajuda e momentos compartilhados. Obrigada por todos os trabalhos elaborados e em especial ao prêmio recebido pela IADR.

Às duas acadêmicas *Camila Campos* e *Talita Santos* que não mediram esforços em auxiliar na coleta de saliva e aplicação do TENS. Vocês também me mostraram o grande valor da vida! Muito obrigada também pelos momentos de descontração!

À amiga, Doutora *Vanessa Bernardes* que me ensinou os primeiros passos no processamento da saliva. Muito obrigada pela disponibilidade!

Aos professores do Departamento de Clínica, Patologia e Cirurgia da FO-UFMG, *Ricardo Mesquita*, *Maria Cássia Aguiar*, *Maria Auxiliadora do Carmo* e *Ricardo Gomez* com os quais muito aprendi durante o doutorado. Vocês também são referenciais para mim!

Aos professores da Radiologia, *Evandro Neves Abdo* e *Mara Valadares de Abreu*, que auxiliaram na minha formação profissional, fazendo complemento na área de diagnóstico. Obrigada pelas grandes oportunidades!

Às funcionárias do Colegiado de Pós-graduação da FO-UFMG, *Laís*, *Zuleica* e à *Beth*, pela sempre disponibilidade e gentileza. Obrigada pela ajuda!

Aos funcionários da Biblioteca da FO-UFMG sempre prestativos na busca dos artigos e em muitas vezes facilitaram o meu trabalho. Obrigada pelo auxílio!

Aos colegas e amigos de trabalho *Alexandre Becker*, *Maria Cristina Doche*, *Leonardo Faria* e *Alessandra Jácome*, obrigada por estar sempre presente nos momentos em que eu precisei estar ausente!

À empresa CONEST na pessoa da *Ana Cláudia* pela realização e orientação na análise estatística dos dados. Sempre pronta a me atender!

À *Diretoria do Hospital das Clínicas*, à *Coordenação da Unidade de Transplante de Medula Óssea* e os coordenadores do *Laboratório de Imunofarmacologia ICB-UFMG*, pela possibilidade de realização deste trabalho.

A todos os funcionários, médicos, residentes, enfermeiras e auxiliares da Unidade de Transplante de Medula Óssea do HC-UFMG, muito obrigada por toda a contribuição, carinho e dedicação.

Aos meus eternos amigos e casais da equipe de Nossa Senhora, Padre Vicente, Aleide e Paulo Ricardo, Dilma e Neiva, Márcia e Humberto, Anália e Dirceu, Flávia e Luciano que mensalmente me transmitiam forças e vivenciaram minhas angústias e conquistas. Obrigada pelas orações!

Aos meus amigos e colegas da FO-UFMG, especialmente os da área de Estomatologia e Patologia Bucal, pelos momentos divididos juntos. Gostaria de enumerar cada um de vocês. Porém, posso esquecer alguém, e não gostaria de ser injusta. Assim, cada um de vocês que compartilhou comigo algum momento durante estes três anos e meio, sintam-se abraçados e agradecidos. Abraços!

Enfim, agradeço a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Ninguém cruza o caminho do outro se não tiver uma razão forte de crescimento!

Muito obrigada a TODOS!

*Todos os homens são comuns.
Os extraordinários são aqueles que sabem disso.*

*Gilbert Keith Chesterton
(1874 - 1936)
Escritor inglês*

LISTA DE SÍMBOLOS E SIGLAS

5-FU	5-fluorouracil
C	Grupo controle
COEP-UFMG	Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais
DEPE	Diretoria de Ensino e Pesquisa
EGF	Fator de crescimento epitelial <i>Epidermal growth factor</i>
FO-UFMG	Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais
H	Hiperbolóide
HLA	Antígeno leucocitário humano <i>Human leukocyte antigen</i>
IL-10	Interleucina 10 <i>Interleukin 10</i>
IL-1 β -	Interleucina -1 β <i>Interleukin 1β</i>
IL-6	Interleucina 6 <i>Interleukin 6</i>
ISOO	<i>International Society for Oral Oncology</i>
MASCC	<i>Multinational Association of Supportive Care in Cancer</i>
MMP2/TIMP-2	Metaloproteinase de Matriz 2/Inibidores de metaloproteinases teciduais-2 <i>Matrix metalloproteinase 2 / Tissue inhibitors of metalloproteinases-2</i>
MMP9/TIMP-2	Metaloproteinase de Matriz 9/Inibidores de metaloproteinases teciduais-2 <i>Matrix metalloproteinase 9 / Tissue inhibitors of metalloproteinases-2</i>
NCI	<i>National Cancer Institute</i>

OMAS	<i>Oral Mucositis Assessment Scale</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
ROS	Espécies reativas de oxigênio <i>Reactive oxygen species</i>
TCTH	Transplante alogênico de células tronco hematopoiéticas
TENS	Estimulação elétrica neural transcutânea
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa <i>Tumor necrosis factor alpha</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

RESUMO

Objetivo. Avaliar os efeitos das terapias de estimulação salivar no fluxo salivar, da mucosite oral e nos níveis de citocinas salivares em pacientes que receberam transplante alogênico de células-tronco hematopoiéticas.

Modelo de estudo. Trinta e cinco pacientes foram randomizados em três grupos, classificados pelo tipo de terapia de estimulação salivar submetidos: O grupo do Hiperbolóide, da estimulação elétrica nervosa transcutânea (TENS), o da combinação desses duas terapias; e do grupo controle. Saliva em repouso e estimulada foram coletadas de 7 dias antes, a 14 dias após o transplante. Citocinas salivares foram avaliados pelo método ELISA.

Resultados. Os grupos TENS e TENS + Hiperbolóide foram menos afetados pela redução do fluxo salivar em repouso e também mostraram uma tendência a manter altas taxas de fluxo salivar estimulado em relação ao grupo controle. Os grupos de terapia tiveram menor incidência de mucosite oral em graus 3 e 4. Os grupos TENS e TENS + Hiperbolóide tenderam a apresentar uma redução de MMPs e aumento dos níveis de EGF.

Conclusão. As terapias de estimulação salivar contribuíram para minimizar a redução do fluxo salivar e gravidade da mucosite induzida por quimioterapia oral.

Palavras Chaves: estimulação salivar, mucosite oral, transplante alogênico de células tronco-hematopoiéticas.

ABSTRACT

AMARAL, Tânia Mara Pimenta. **Effect of mechanical and electrical therapies on salivary flow in oral mucositis induced by chemotherapy and cytokine levels in saliva of patients undergoing HSCT.** 2010. 100f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Odontologia, Belo Horizonte, 2010.

Objective. To evaluate the effects of salivary stimulation therapies on salivary flow, oral mucositis and salivary cytokines levels in patients receiving allogeneic hematopoietic stem cell transplantation.

Study Design. Thirty-five patients were randomized into three groups categorized by type of salivary stimulation: Hyperboloid, transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS), combination of these two therapies and control group. Resting and stimulated saliva were collected from 7 days before to 14 days after transplantation. Salivary cytokines were assessed by ELISA.

Results. The TENS and TENS+Hyperboloid groups were less affected by the reduction of resting salivary flow and also showed a tendency to keep higher rates of stimulated salivary flow in relation to the controls. Therapy groups had lower incidences of oral mucositis in grades 3 and 4. The TENS and TENS+Hyperboloid group tended to show a reduction of MMPs and increased of EGF levels.

Conclusion. Salivary stimulation therapies contributed to minimize the reduction of salivary flow and severity of chemotherapy-induced oral mucositis.

Keywords: salivary stimulation, oral mucositis, Allogeneic HSCT, cytokines.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	SÍNTESE BIBLIOGRÁFICA	17
2.1	Transplante de células-tronco hematopoiéticas (TCTH)	17
2.2	Mucosite oral	18
2.3	Mediadores inflamatórios e mucosite oral	21
2.4	Anatomia e fisiologia das glândulas salivares.....	25
2.5	Disfunção do fluxo salivar associada á quimioterapia	27
2.6	Terapias para restabelecimento do fluxo salivar em pacientes sob TCTH	28
2.7	Sialogogo Mecânico (Hiperbolóide)	30
2.8	Estimulação Elétrica Transcutânea (TENS).....	31
3	OBJETIVOS	34
3.1	Objetivo Geral	34
3.2	Objetivos Específicos	34
4	MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1	Pacientes	36
4.2	Avaliação de mucosite	38
4.3	Sialometria	38
4.4	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)</i>	39
4.5	Terapia com sialogogo mecânico- Hiperbolóide	40
4.6	Terapia com sialogogo elétrico	41
4.7	Análise estatística	42
5	RESULTADOS	44
5.1	Artigo	44
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	78
7	CONCLUSÕES	83
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
9	ANEXOS	93
	ANEXO A - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG	94
	ANEXO B - Aprovação da Diretoria de Ensino, Pesquisa e Extensão do Hospital das Clínicas/DEPE/HC.....	95
	ANEXO C - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	96
	ANEXO D - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	97
	ANEXO E - Ficha Clínica.....	98
	ANEXO F - Caracterização dos pacientes considerando-se o grupo de terapia	100

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O transplante alogênico de células-tronco hematopoiéticas (TCTH) é uma modalidade terapêutica importante para doenças malignas e benignas, na qual emprega-se doses extremamente altas de quimioterapia associada ou não a radioterapia. A citotoxicidade destas acarreta transtornos como a mucosite bucal que é uma frequente intercorrência debilitante em pacientes submetidos a altas doses de quimioterapia. A mucosite bucal se caracteriza por uma reação tóxica inflamatória que afeta todo trato alimentar e pode se apresentar como placas brancas seguidas ou não de ulcerações, as quais são sítios potenciais de infecções implicando em aumento da morbidade e mortalidade.

As disfunções das glândulas salivares maiores e menores são consequências também encontradas nos pacientes submetidos ao TCTH e a secreção salivar pode apresentar redução durante o regime de condicionamento. O decréscimo momentâneo do volume salivar que ocorre durante a quimioterapia pode estar associado com a ocorrência de mucosite oral. Desta forma, a estimulação salivar pode contribuir para a redução da incidência e da ocorrência de mucosite oral causada pela quimioterapia. Esta estimulação salivar pode ser feita por estímulos mecânicos, elétricos, gustatórios e farmacológicos. Alguns benefícios da estimulação salivar já foram descritos, porém, até o momento a relação entre fluxo salivar e ocorrência de mucosite ainda não está bem estabelecida na literatura. Este estudo teve como objetivo verificar o efeito da estimulação salivar mecânica e elétrica, no fluxo salivar e na ocorrência de mucosite nos pacientes submetidos ao TCTH. Os níveis de Fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), Interleucina-10 (IL-10), Fator de crescimento epidérmico (EGF), Metaloproteinase de Matriz 2 e 9/ Inibidores de metaloproteinases teciduais-2 (MMP2/TIMP-2) e (MMP9/TIMP-2) respectivamente, foram analisados na saliva em diferentes momentos antes e após o TCTH.

SÍNTESE BIBLIOGRÁFICA

2 SÍNTESE BIBLIOGRÁFICA

2.1 Transplante de células-tronco hematopoiéticas (TCTH)

O TCTH consiste na infusão de células precursoras hematopoiéticas indiferenciadas capazes de reconstituir a medula óssea eliminada após doses mieloablativas de quimioterapia e/ou radioterapia e, conseqüentemente, normalizar a produção dos elementos do sangue (Storb, 1994).

O TCTH pode ser realizado com fontes e tipos de células diferentes. Quando as células-tronco hematopoiéticas provêm do próprio paciente, ele é chamado transplante autólogo. Quando as células são provenientes de outra pessoa que não o próprio receptor, o transplante recebe o nome de alogênico. O transplante alogênico de células-tronco hematopoiéticas pode ser realizado com células obtidas de um doador familiar (TCTH aparentado) ou não (TCTH não-aparentado). Quando o doador é um irmão gêmeo univitelino, o transplante é denominado singênico (Léger *et al.*, 2004).

Em relação à fonte de células-tronco, pode-se utilizar a medula óssea, as células-tronco provenientes do sangue periférico ou do cordão umbilical. Durante mais de 20 anos, a medula óssea foi a única fonte disponível de células-tronco hematopoiéticas. As células-tronco do sangue periférico e cordão umbilical foram introduzidos no final dos anos 80 (Gratwohl *et al.*, 1996; Tse; Laughlin, 2005).

O regime de condicionamento pré-TCTH utiliza altas doses de quimioterapia, associada ou não à radioterapia corporal total. Esse procedimento tem como objetivos: estabelecer um grau de imunossupressão suficiente para que o enxerto não seja destruído pelas células imunocompetentes do receptor; destruir um número máximo de células neoplásicas residuais

do receptor, e criar, dessa forma, um “espaço” onde a nova medula possa proliferar (Storb, 1994).

O TCTH se inicia de sete a 10 dias antes do dia da infusão das células-tronco hematopoiéticas, com o protocolo de condicionamento quimioterápico. São considerados dias negativos antes do dia da realização da infusão (D-7; D-1). O dia da infusão é considerado o dia zero (D-0). A partir do dia da infusão a contagem do tempo, dias pós-transplante é positiva (D+1, D+3, D+7).

O protocolo de condicionamento com as altas doses quimioterápicas causam diminuições transitórias, porém significativas da produção salivar. Essa redução salivar se relaciona com a mucosite oral por várias razões como insuficiência de fatores antimicrobianos, redução dos protetores da mucosa bucal ou aumento da toxicidade dos agentes quimioterápicos nos tecidos bucais (Epstein *et al.*, 2002; Jensen *et al.*, 2003).

2.2 Mucosite oral

Os pacientes receptores de transplante geralmente apresentam alterações bucais em consequência da severa imunossupressão causada pela quimioterapia ou radioterapia (Filicko *et al.*, 2003; Sonis, 2004; Scully *et al.*, 2006; Gandemer *et al.*, 2007). Dentre as complicações bucais durante o TCTH, a mais frequente é a mucosite oral, caracterizada por uma reação tóxica inflamatória que compromete o trato alimentar. Na mucosa bucal esta toxicidade ocorre sobre as células epiteliais, as quais possuem um alto índice de proliferação e se renovam em um período de 7 a 14 dias. Este fato torna estas células vulneráveis ao tratamento quimioterápico, devido à interferência da droga no ciclo celular, impedindo a renovação epitelial (Bensadoun *et al.*, 2001). Como a reposição celular está comprometida, ocorre a exposição do tecido conjuntivo subjacente, desencadeando dor intensa, ulcerações, dificuldade de alimentação e fala (Filicko *et al.*, 2003; Sonis, 2004; Scully *et al.*, 2006;

Gandemer *et al.*, 2007). Estas manifestações bucais podem ser graves e interferir nos resultados da terapêutica, levando a complicações sistêmicas, aumentando o tempo de internação hospitalar, os custos do tratamento e a qualidade de vida do paciente (Raber-Durlacher *et al.*, 2000; Gabriel *et al.*, 2003; Filicko *et al.*, 2003).

A ocorrência de mucosite bucal varia de 40 a 60% em pacientes submetidos a protocolos quimioterápicos em tratamento de neoplasias (Sonis *et al.*, 1999; Sonis *et al.*, 2001; Melkos *et al.*, 2003). Dependendo do regime condicionante, a ocorrência de mucosite pode chegar a 100% (Barasch; Peterson, 2003; Filicko *et al.*, 2003; Sonis *et al.*, 2004; Elad *et al.*, 2006; Fall-Dickson *et al.*, 2007).

Clinicamente a mucosite bucal é caracterizada por uma região eritematosa na mucosa bucal, podendo evoluir para ulceração, resultando em dor intensa, desconforto, disgeusia e disfagia (Elting *et al.*, 2003). As regiões mais acometidas são as áreas da mucosa bucal não queratinizadas: mucosa jugal, labial e superfície ventral da língua (Scully *et al.*, 2006).

A mucosite oral nos pacientes submetidos ao TCTH geralmente ocorre entre os dias D+4 e D+10 (Stiff, 2001; Elad *et al.*, 2006; Scully *et al.*, 2006).

Sonis *et al.* (2004) descreveram a mucosite oral como um processo biológico complexo que pode ocorrer em cinco fases: 1) *Iniciação*: Esta fase ocorre logo após a administração da radioterapia ou quimioterapia causando danos diretos ou não ao DNA, por meio de formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), o que diminui a renovação celular, agredindo tanto as células epiteliais quanto o tecido conjuntivo e afetando, em especial, epitélio e vasos sanguíneos. Nesta fase a mucosa apresenta aspecto normal. 2) *Super regulação*: Nesta fase ocorre a produção de vários mediadores inflamatórios tais como o TNF- α , Interleucina-1 β (IL-1 β) e Interleucina-6 (IL-6) que estimulam enzimas pró-apoptóticas, bloqueando os mecanismos de crescimento e diferenciação celular e dando início aos danos teciduais. 3) *Sinalização e amplificação*: Nesta terceira fase, além dos efeitos sobre o epitélio, endotélio

e fibroblastos, as citocinas pró-inflamatórias exercem uma ação indireta na amplificação do dano tecidual iniciando um ciclo de retroalimentação positivo, ampliando o dano primário.

4) *Ulceração*: É a fase resultante da citotoxicidade nas células primordiais da camada basal levando as alterações atróficas, que resultam em ulceração. É a fase mais sintomática e provavelmente a mais complexa com formação de áreas de erosão cobertas por pseudomembrana. Nesta fase ocorre a colonização de bactérias que irão ativar macrófagos teciduais aumentando a produção de citocinas pró-inflamatórias, as quais aceleram e amplificam os danos teciduais. Em pacientes neutropênicos é nesta fase que pode ocorrer bacteremia e sepse pela invasão de microorganismos através dos vasos da submucosa.

5) *Cicatrização*: Ocorre a proliferação e diferenciação celular, resultando em cicatrização do tecido afetado e restabelecimento da microbiota local.

A ocorrência da mucosite oral pode estar relacionada ao tratamento antineoplásico (tipos, dose e duração do tratamento) e fatores relacionados ao paciente como idade, gênero, leucometria, estado nutricional, higiene bucal e possivelmente volume salivar (McCarthy *et al.*, 1998; Sonis, 1998; Epstein; Schubert, 1999; Epstein *et al.*, 2002; Barasch; Peterson, 2003; Scully *et al.*, 2006; Karolewska *et al.*, 2008; Jensen *et al.*, 2010).

Em um estudo longitudinal, Woo *et al.* (1993) observaram que 77,8% dos pacientes submetidos ao TCTH que receberam condicionamento com Bussufano e Ciclosfosfamida desenvolveram mucosite oral, demonstrando que estas drogas são desencadeadoras importantes de mucosite.

O índice de graduação de mucosite permite ao profissional de saúde avaliar a severidade das lesões em termos de dor e capacidade do paciente manter alimentação adequada. Existem alguns métodos de se avaliar o grau de severidade da mucosite. O sistema de graduação de mucosite mais utilizado atualmente é o da Organização Mundial de Saúde (OMS), no qual são levados em consideração critérios objetivos e subjetivos, que consideram o estado físico geral

e nutricional do paciente, bem como a inspeção da cavidade oral. É uma escala de fácil manipulação, aplicabilidade direta e validada. Para atribuir um determinado grau de mucosite são avaliadas alterações da mucosa bucal como o aparecimento de eritema em combinação com comprometimentos subjetivos e funcionais como dor e capacidade de alimentação (WHO, 1979). O método desenvolvido pelo *National Cancer Institute* (NCI) avalia os sinais objetivos como o tamanho das lesões em uma escala de 0 a 4 (Epstein *et al.*, 2000), enquanto a *Oral Mucositis Assessment Scale* (OMAS) avalia o tamanho das úlceras, a severidade do eritema e a localização das lesões (Sonis *et al.*, 1999).

Considerável progresso em relação às orientações para a conduta e tratamento da mucosite tem sido feito desde quando as diretrizes originais foram publicadas em 2004 pelo *Mucositis Study Group of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer* (MASCC) e pela *International Society for Oral Oncology* (ISOO) (Keefe *et al.*, 2007).

Ao analisar os fatores de risco associados à mucosite em 63 pacientes submetidos à quimioterapia com 5-fluorouracil, McCarthy *et al.* (1998) revelaram por meio da análise de regressão logística que o fluxo salivar reduzido no início do tratamento (OR = 10,0) e nível basal de neutrófilos inferior a 4.000 células/mm³ (OR = 3,9) foram significativos preditores da mucosite oral. Assim, estes autores relataram a importância da mensuração prévia do fluxo salivar antes do início do tratamento.

2.3 Mediadores inflamatórios e mucosite oral

Os estudos da literatura têm focado a participação de citocinas na mucosite oral (Sonis *et al.*, 2004; Fall-Dickson *et al.*, 2007). As citocinas pró-inflamatórias estão presentes em níveis elevados no sangue e soro durante a inflamação enquanto que as citocinas anti-inflamatórias estão em níveis menores (Meirovitz *et al.*, 2010).

O TNF- α é um mediador primário da ativação e da resposta inflamatória e está envolvido na patogênese da mucosite oral e de doenças auto-imunes. O TNF- α é geralmente um dos primeiros mediadores a ser produzido em processos inflamatórios, sendo responsável pelo desencadeamento da cascata de ativação de várias outras citocinas inflamatórias como IL-1, IL-6 e o próprio TNF- α . O TNF- α apresenta também ações regulatórias em vários tipos celulares como ativação de células endoteliais, estimulação de fibroblastos, agregação e adesão de neutrófilos e regulação da função de linfócitos T e B (Makhatadze, 1998; Holler, 2002; Sonis *et al.*, 2004). O TNF- α , juntamente com a IL-1, apresentam papel importante durante a primeira fase da mucosite (Sonis, 1998).

O estudo de Fall-Dickson *et al.* (2007) avaliou a eficácia dos métodos de biologia molecular para mensuração dos níveis de TNF- α na saliva e sua correlação com a intensidade de dor e a ocorrência de mucosite orofaríngea em 13 pacientes submetidos ao TCTH. A severidade de mucosite foi avaliada de acordo com a escala de OMAS. Os resultados mostraram uma alta concentração de TNF- α na saliva no dia D+9 (10,31 pg/ml) e sugeriram que a saliva pode ser um meio útil para detecção de marcadores inflamatórios da mucosite oral. Entretanto não encontraram relação entre dor e nível de TNF- α .

A interleucina-10 (IL-10) é produzida nos linfócitos B e T “*helper*” tipo 2 (Th2) e nos monócitos e possui uma função inibitória da proliferação dos linfócitos T “*helper*” tipo 1 (Th1) e da produção de interferon (IFN)- γ e IL-2, IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12 e TNF- α . A função dos monócitos como células apresentadoras de antígenos, também é inibida pela IL-10 por meio da diminuição da expressão dos antígenos do complexo de histocompatibilidade classe II, da molécula de adesão intercelular tipo 1 e da expressão do CD23. Contrariamente a esta ação antiinflamatória, a IL-10 promove a resposta de células B em parte por funcionar como fator de crescimento destas células e por inibição das células T *helper* (Th1) (Moore *et al.*, 2001).

Min *et al.* (2001) estudaram a relação entre os níveis de citocinas pró e antiinflamatórias no sangue de 52 pacientes submetidos ao TCTH. Os resultados mostraram que os padrões da cinética de produção de IL-6 e IL-10 observados durante a fase inicial do transplante foram diferentes em pacientes apresentando complicações precoces e aqueles pacientes que não apresentaram complicações. Os resultados mostraram diferenças significativas, com altos níveis de IL-10 na quarta semana pós-transplante nos grupos com complicações quando comparados com os grupos sem complicações.

O Fator de Crescimento Epidérmico (EGF) é um polipeptídeo produzido pelas glândulas salivares, importante na indução do crescimento epitelial, na inibição da secreção gástrica e na aceleração da cicatrização (Balicki *et al.*, 2005; Eckley *et al.*, 2007).

A redução dos níveis de EGF foi atribuída principalmente à redução do volume salivar no estudo de Epstein *et al.* (2000) quando avaliaram dezoito pacientes submetidos à radioterapia, correlacionando nível de EGF na saliva e severidade de mucosite oral. A avaliação da mucosite foi realizada durante seis semanas. Na saliva estimulada, na segunda semana, os resultados mostraram uma significativa correlação entre altos níveis de EGF com o menor grau de mucosite. Estes achados também foram observados na terceira e quarta semanas.

Sonis *et al.* (1992) realizaram um estudo para avaliar o efeito do EGF no curso, frequência e cicatrização de mucosite induzida por 5- fluorouracil em animais de laboratório. Foram inseriram cápsulas contendo EGF entre o músculo retrator e o platisma desses animais. Os autores observaram que os animais que receberam o EGF tiveram mucosite mais grave, com a duração de tempo maior e com comprometimento da sobrevida, quando comparada com o grupo controle. Os resultados deste trabalho podem ser explicados pelo fato de que a estimulação da divisão celular induzida por EGF pode ser resultado do aumento da suscetibilidade da mucosa aos efeitos estomatotóxicos da quimioterapia.

As metaloproteinases da matriz (MMPs) constituem uma família de enzimas proteolíticas que exercem papel importante nos processos biológicos como a embriogênese, remodelação, reparação e destruição dos tecidos normais (Watanabe *et al.*, 2005). Além disto, as MMPs atuam diretamente na destruição tecidual no curso de diversos processos inflamatórios (Mäkelä *et al.*, 1994), sendo que os níveis salivares de MMP podem ser utilizados como indicadores de doença inflamatória bucal (Herr *et al.*, 2007).

Ocorrem alterações no mecanismo de *turnover* da matriz extracelular, durante a fisiopatologia dos processos benignos e malignos nos quais as MMPs e os TIMPs estão relacionados. Existe uma falta de evidência para a importância das MMPs nas lesões induzidas por quimioterapia. Os níveis de MMPs têm sido alvos de estudo nos pacientes com câncer, assim como nos processos inflamatórios e degenerativos, incluindo artrite reumatóide, periodontite e asma (Al-Dasooqi *et al.*, 2009).

A relação entre as metaloproteinases MMP-1, 8 e 13 e a severidade de mucosite foi avaliada em 23 pacientes submetidos ao TCTH. Duas amostras de bochecho basal foram obtidas com 3 ml de solução salina estéril por 10 segundos. Não foi observada correlação entre a mucosite oral e os níveis das MMPs avaliadas. Os resultados sugerem que as MMPs podem não necessariamente desempenhar um papel no desenvolvimento da mucosite oral (Shoval *et al.*, 2005).

Na revisão realizada por Al-Dasooqi *et al.* (2009), os autores relataram que os danos da quimioterapia já estão bem estabelecidos no trato alimentar e intestinal como resultado do aumento da regulação da resposta ao estresse e das citocinas pro-inflamatórias. No entanto, um melhor entendimento da participação dos possíveis mediadores da mucosite é ainda requisitado a fim de orientar estratégias de tratamento. As MMPs têm mostrado funcionar em vias bem conhecidas de regulação da mucosite e contribuído para a inflamação e para injúria

tecidual. Os autores afirmam que as MMP podem ser um dos principais mediadores no desenvolvimento da mucosite.

Efeitos de um biopolímero foram descritos por Morvan *et al.* (2004), para verificar a prevenção da mucosite oral induzida por 5-fluorouracil em hamsters. Um aumento dos níveis histológicos de MMP2 e MMP9, acompanhados de redução dos níveis de TIMP-2 e TIMP-1 foi observado nos grupos que não receberam o polímero. Os níveis basais de MMPs e TIMPs foram similares nos animais que receberam o biopolímero, correlacionando a severidade da mucosite oral e proporcionando assim suporte adicional para um papel das MMPs na mucosite.

2.4 Anatomia e fisiologia das glândulas salivares

O complexo de glândulas salivares bucais é composto por três pares de glândulas salivar maiores e numerosas glândulas salivares menores distribuídas na mucosa oral. As glândulas salivares maiores dividem-se em parótida, submandibular e sublingual. A produção diária de saliva em uma pessoa saudável está ao redor de 1.500 ml, onde 75% dessa quantidade são produzidas pelas glândulas submandibulares, 20% pelas parótidas e 5% divide-se entre as glândulas sublinguais e as menores (Malpani *et al.*, 1999).

A inervação das glândulas salivares é feita por nervos parassimpáticos secretomotores. As glândulas parótidas recebem estímulo do nervo aurículo temporal (ramo do nervo glossofaríngeo – IX par) e as submandibulares recebem estímulos do nervo corda do tímpano (nervo intermédio – VII par). As glândulas salivares menores são inervadas por fibras parassimpáticas que percorrem através do nervo facial, lingual e palatino. As células secretoras apresentam dupla inervação – pelo sistema nervoso autônomo parassimpático e pelo sistema nervoso autônomo simpático – podendo ser estimuladas pelo componente simpático ou parassimpático ou por ambos simultaneamente (Schubert; Izutsu, 1987). A ação

do sistema nervoso autônomo parassimpático atua na produção de saliva com baixa concentração de proteína enquanto o sistema nervoso autônomo simpático atua na produção de pequena quantidade de saliva, porém com alta concentração de proteína e íons (Nauntofte *et al.*, 2005).

A saliva é um fluido aquoso, transparente, que é secretado pelas glândulas salivares por meio de seus respectivos ductos diretamente na cavidade bucal. A saliva reveste a mucosa bucal e é responsável pela lubrificação desta facilitando a movimentação da língua e dos lábios no momento da fonação, mastigação e deglutição. Os constituintes salivares auxiliam na manutenção da integridade da mucosa pela aglutinação, hidratação e lubrificação, contribuindo para a manutenção de uma barreira efetiva contra agressões externas aos tecidos bucais (Longman *et al.*, 2000). Os valores ideais de secreção salivar em repouso e estimulada são, respectivamente, acima de 0,4 ml/minuto e 1,5 a 2,5 ml/minuto (Tárzia, 2003; Conceição *et al.*, 2006). A maior parte da composição da saliva é de água (99%) e o restante é formado por componentes orgânicos e sais minerais (Tárzia, 2003; Amerongen; Veerman, 2002).

Fator importante para a secreção salivar é o adequado estado das glândulas, propiciado pelo suprimento sanguíneo durante a atividade secretora. O fluxo e a qualidade da saliva estão constantemente se modificando, de acordo com os estímulos que agem sobre as glândulas salivares, através do Sistema Nervoso Autônomo e principalmente o Sistema Nervoso Parassimpático (Nauntofte *et al.*, 2005). Os núcleos salivatórios são excitados tanto por estímulos gustativos quanto táteis da língua, mucosa jugal e palato mole. Certos estímulos táteis, como a presença de objetos lisos na boca, também causam salivação abundante (Nauntofte *et al.*, 2005).

2.5 Disfunção do fluxo salivar associada á quimioterapia

A hipossalivação pode fazer parte dos sintomas de certas doenças sistêmicas que afetam as glândulas salivares ou pode ser causada por fatores tais como o uso de certos medicamentos, a radioterapia e a quimioterapia (Porter *et al.*, 2004).

Concentrações de drogas quimioterápicas são encontradas na saliva dos pacientes submetidos à quimioterapia, o que resulta em exposição direta da mucosa a estes agentes. As principais alterações observadas são: redução do volume salivar, alteração dos constituintes da saliva, da microbiota bucal, e do nível de imunoglobinas salivares. A redução do volume salivar e as alterações dos constituintes podem afetar a capacidade de proteção e reparo da mucosa e o controle da microbiota bucal, aumentando a ocorrência de infecções (Epstein; Schubert, 1999, Epstein *et al.*, 2002).

As alterações nas glândulas salivares menores produzidas pelo tratamento antineoplásico foram estudadas em 120 amostras de pacientes necropsiados submetidos a diferentes protocolos de quimioterapia, para diversas doenças neoplásicas, cujos óbitos se deram em períodos distintos do tratamento (Lockhart; Sonis, 1981). Os autores demonstraram que os quimioterápicos induziram dilatação ductal em glândulas salivares menores e degeneração acinar em 50% dos pacientes. Segundo os autores, estas alterações foram mais evidentes naqueles pacientes submetidos a um período maior que três semanas de quimioterapia. Em uma revisão feita por Jensen *et al.* (2003), aproximadamente 50% dos pacientes em tratamento antineoplásico apresentaram também dilatação ductal, formação cística no epitélio glandular, degeneração acinar e infiltração inflamatória em amostras de glândulas salivares menores.

O fluxo salivar não estimulado das glândulas salivares menores foi estudado por Blomgren *et al.* (2002). Os autores avaliaram pacientes com neoplasias hematológicas submetidos a vários ciclos de quimioterapia entre uma e oito semanas antes da coleta de saliva

e compararam os resultados com um grupo controle de indivíduos saudáveis. Os resultados demonstraram que no grupo em tratamento quimioterápico, o fluxo salivar não estimulado apresentou-se reduzido quando comparado com o grupo controle. Os autores também observaram que o tempo após a quimioterapia pode ser um fator importante para recuperação dos valores do fluxo salivar.

Chaushu *et al.* (1995) relataram que as disfunções das glândulas salivares são uma das complicações orais que podem permanecer por algum tempo pós TCTH acarretando redução do fluxo salivar. Esta alteração pode ser resultado direto ou indireto da toxicidade do regime condicionante. As manifestações clínicas observadas incluíam parotidite, saliva viscosa e xerostomia.

Coracin *et al.* (2006) estudaram a captação e eliminação do pertecnetato-99m Tc e do gálio-67 nas glândulas salivares maiores. As imagens com gálio mostraram um aumento do infiltrado inflamatório no período pós-TCTH. O fluxo salivar não estimulado não apresentou diferença entre os períodos pré- e pós-TCTH. Os resultados obtidos sugeriram um envolvimento das glândulas salivares maiores após o TCTH, principalmente nas glândulas submandibulares e que o infiltrado inflamatório pode ser o responsável pela queixa de xerostomia.

2.6 Terapias para restabelecimento do fluxo salivar em pacientes sob TCTH

O fluxo salivar é definido como a quantidade de saliva secretada por um determinado tempo que banha a boca e distribui uma infinidade de compostos orgânicos e inorgânicos para o interior da cavidade bucal (Raphael Junior *et al.*, 2005).

As alterações nas glândulas salivares menores causadas pelo tratamento quimioterápico e pelo regime de condicionamento para o TCTH são relativamente conhecidas. Entretanto,

poucos trabalhos relatam o acometimento das glândulas salivares maiores nesses períodos (Coracin *et al.*, 2006).

Os procedimentos geralmente indicados para pacientes submetidos ao TCTH que apresentam redução do fluxo salivar se restringem a terapia de suporte e incluem a utilização de sialogogos farmacológicos que são agonistas colinérgicos como a pilocarpina e cevimelina, os quais aumentam a produção de saliva pela estimulação glandular (Awidi *et al.*, 2001; Couriel *et al.*, 2006). A pilocarpina e, recentemente, a amifostina são as únicas drogas aprovadas pelo *US Food and Drug Administration* para uso como sialogogos farmacológicos (Dib *et al.*, 2000).

Awidi *et al.* (2001) concluíram que o uso de pilocarpina como estimulador salivar, empregando-se 32 pacientes portadores de neoplasia, foi eficaz para a prevenção da mucosite oral. Os autores relatam que a pilocarpina estimula a produção salivar das glândulas menores e que os constituintes salivares: mucina e glicoproteínas exercem um papel protetor e de prevenção na mucosite induzida por quimioterapia.

Por causa de seus efeitos colinérgicos, mesmo em baixas doses, deve-se avaliar com cautela quais os pacientes e em que situações esta droga pode ser utilizada. A pilocarpina não é recomendada a pacientes com asma, úlceras gastrointestinais, hipertensão arterial, problemas cardiovasculares, e pode apresentar como efeitos colaterais, sudorese, rinite, cefaléia, náusea e urina freqüente (Nagler *et al.*, 2003; Brosky, 2007).

Os sialogogos mecânicos utilizam a mastigação como um estímulo efetivo para aumentar o fluxo salivar. É indicado ao paciente que consuma alimentos que exijam uma mastigação vigorosa, que se mantenham objetos na boca ou que se faça uso de materiais que requerem ser mastigados constantemente como a parafina ou gomas de mascar. As gomas de mascar que contenham sorbitol ou xilitol podem proporcionar benefícios imediatos tais como: aumento do fluxo salivar, melhora da capacidade amortecedora da saliva, ajuda na eliminação

de restos alimentares e favorecimento da função remineralizadora da saliva (Santos *et al.*, 2001).

Gandemer *et al.* (2007) realizaram um estudo multicêntrico avaliando a eficácia do uso de goma de mascar no aumento do fluxo salivar em 145 crianças submetidas ao TCTH. Apesar de não encontrarem uma significativa redução da severidade da mucosite, 57% das crianças que utilizaram a goma de mascar se beneficiaram em relação à redução do grau de mucosite quando comparados com o grupo controle. Os autores relatam também uma redução significativa no tempo de nutrição parenteral no grupo das crianças que usaram a goma de mascar e sugeriram que a goma de mascar pode estar associada com a cicatrização da mucosa oral em um menor tempo.

Apesar dos inúmeros relatos na literatura de que a saliva possui um grande número de funções benéficas para a cavidade bucal (Dumbrigue *et al.*, 2000, Longman *et al.*, 2000; Nauntofte *et al.*, 2005; Jensen *et al.*, 2010) existem pouquíssimos trabalhos demonstrando o efeito de terapias de restabelecimento do fluxo salivar nos pacientes submetidos ao TCTH.

Há alguns relatos na literatura sobre a estimulação salivar com o uso de sialogogo elétrico para outras condições que também apresentam redução do fluxo salivar (Hargitai *et al.*, 2005; Strietzel *et al.*, 2007), porém para o paciente submetido ao TCTH, até o momento, este é o primeiro trabalho. Até a data de hoje, não há nenhuma orientação do MAASC e do ISOO para o restabelecimento do fluxo salivar nos pacientes sob TCTH.

2.7 Sialogogo Mecânico (Hiperbolóide)

O Hiperbolóide é um instrumento de mastigação usado como auxiliar na Terapêutica Ortopédica Funcional dos Maxilares. É um composto de silicone SILASTIC, macio, liso, translúcido não peneirado e após ser curarizado, adquire uma dureza de 32 a 36 SHORE A, que permite exercícios mastigatórios não traumatizantes. Possui a forma de uma hipérbole

com ápices arredondados, é ainda atóxico, insípido e inodoro. Em qualquer posição de mastigação, mantém equilíbrio entre mandíbula e maxila, produzindo excitações das glândulas salivares responsáveis pela secreção de um volume de saliva considerável (Cheida, 2004). A vantagem deste método em relação ao uso de goma de mascar é que o Hiperbolóide possui uma dureza padrão semelhante à dureza da mastigação, que produz estímulos neurais, mais eficientes, aumentando o fluxo salivar. Trabalhos preliminares realizados pelo nosso grupo, em que o Hiperbolóide foi utilizado em paciente portador da Síndrome de Ardência Bucal, demonstraram resultados satisfatórios, observando-se aumento da secreção salivar e redução da sensação de queimação (Oliveira *et al.*, 2007).

2.8 Estimulação Elétrica Transcutânea (TENS)

O TENS é um aparelho que através de eletrodos produz corrente elétrica de baixa intensidade que estimula terminações nervosas (Strietzel *et al.*, 2007). Um dos possíveis mecanismos de ação do TENS sobre as glândulas salivares é o aumento da irrigação sanguínea e a estimulação do nervo aurículo-temporal que age no reflexo secreto-motor, principalmente da parótida. Além disto, ocorre estimulação periférica da glândula em resposta aos reflexos do núcleo salivar (Hargitai *et al.*, 2005; Strietzel *et al.*, 2007). Embora existam poucos trabalhos relatando o efeito da eletro-estimulação no fluxo salivar, os estudos disponíveis demonstram que o uso do TENS resulta em aumento do fluxo de saliva estimulada em pacientes com e sem história de alterações salivares (Talal *et al.*, 1992; Hargitai *et al.*, 2005). Resultados prévios sugerem que o efeito do TENS pode ser sinérgico a outros sialogogos, agindo de maneira mais eficiente como acelerador do que como iniciador do fluxo salivar, uma vez que seu efeito é relativo em casos nos quais não existe fluxo salivar basal (Hargitai *et al.*, 2005). Estudos preliminares realizados por nosso grupo demonstram a

eficácia do TENS associado ao Hiperbolóide no restabelecimento do fluxo salivar em pacientes portadores de halitose (Mota *et al.*, 2006).

Um estudo para verificar a eficácia da estimulação elétrica nos músculos da faringe em cinco pacientes com câncer de cabeça e pescoço que apresentaram disfagia, xerostomia e redução do fluxo salivar foi realizado por Pattani *et al.* (2010). Os pacientes receberam três aplicações semanais de TENS durante um ou dois meses após os ciclos de radioterapia. Quatro eletrodos foram colocados ao longo do pescoço anterior sobre os músculos da faringe. O TENS foi aplicado em uma frequência de 30 mA e um intervalo de pulso de 80 a 100 hertz. Todos os cinco pacientes notaram uma melhora significativa na disfagia, bem como aumento na produção de saliva com sintomas de diminuição da ingestão de água durante as refeições, boca mais úmida à noite, conseqüentemente mais horas de sono.

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Verificar o efeito das terapias de estimulação mecânica e elétrica no fluxo salivar, na ocorrência de mucosite e nos níveis de citocinas da saliva em pacientes transplantados de células-tronco hematopoiéticas.

3.2 Objetivos Específicos

1. Verificar a eficácia do método de estimulação salivar mecânica, Hiperbolóide, do método de estimulação salivar elétrica, TENS, e da associação dos dois métodos no restabelecimento do fluxo salivar e ocorrência de mucosite em pacientes submetidos ao TCTH;
2. Avaliar o impacto das terapias de estimulação salivar e da ocorrência de mucosite oral na sobrevida de pacientes submetidos ao TCTH;
3. Avaliar os níveis de TNF- α , IL-10, EGF, MMP2/TIMP-2 e MMP9/TIMP-2 na saliva de pacientes submetidos ao TCTH sob diferentes terapias para estimulação salivar;
4. Avaliar a associação entre os níveis de TNF- α , IL-10, EGF, MMP2/TIMP-2 e MMP9/TIMP-2 na saliva de pacientes submetidos ao TCTH com a ocorrência de mucosite.

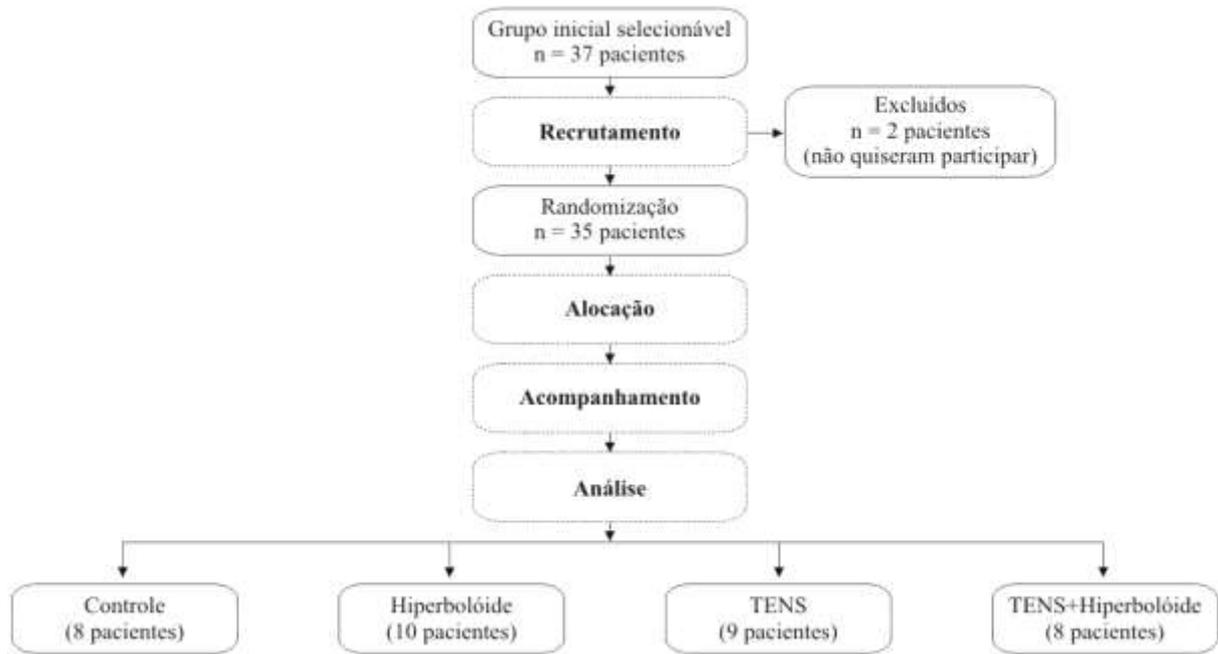
MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Pacientes

Foi incluído na amostra um total de 35 pacientes submetidos ao alo-TCTH atendidos na Unidade de Transplante de Células-Tronco do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (HC-UFGM) no período de fevereiro de 2008 a setembro de 2009. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFGM (COEP-UFGM) sob parecer nº ETIC467/07 (ANEXO A) e pela Diretoria de Ensino, Pesquisa e Extensão do Hospital das Clínicas (DEPE-HC) sob parecer 186/2007 (ANEXO B). Todos os pacientes foram convidados a participar do estudo por meio de assinatura de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXOS C e D). Foi realizado cálculo amostral, considerando a proporção de pacientes com quadro de mucosite em estudos anteriores de 72,7% (Antuniassi, 2005) admitindo um erro de 5%, e nível de confiança de 95% e número de pacientes internados durante o período do estudo de 40 pacientes. Desta forma, o tamanho da amostra foi calculado em 34 pacientes.

Os pacientes foram divididos aleatoriamente em quatro grupos: Grupo Controle (pacientes que não foram submetidos a nenhuma terapia de estimulação salivar); Grupo Hiperbolóide (pacientes que fizeram uso do sialogogo mecânico Hiperbolóide); Grupo TENS (pacientes que foram submetidos à estimulação elétrica transcutânea neural) e Grupo TENS+Hiperbolóide (pacientes que fizeram estimulação salivar com a combinação do TENS+Hiperbolóide). A alocação dos pacientes nos determinados grupos foi feita pela ordem cronológica que eram encaminhados à Unidade de Transplante, de acordo com uma ordem de alocação inicialmente estabelecida no estudo (Fluxograma 1).



Fluxograma 1 - Fluxograma de delineamento do estudo.

Os critérios de inclusão foram: pacientes atendidos no HC-UFMG que foram submetidos ao TCTH previamente submetidos a tratamento odontológico, e que fizeram um condicionamento mieloablativo, idade acima de 16 anos, mucosa bucal intacta no primeiro dia de condicionamento e capacidade de cooperar com o tratamento. Os critérios de exclusão foram: pacientes submetidos ao TCTH sem terapia mieloablativa prévia, casos sem seguimento clínico; pacientes que se recusaram a participar.

O condicionamento para TCTH foi realizado de acordo com os protocolos da Unidade de Transplante de Células-Tronco no HC-UFMG e variaram de acordo com o tipo da doença, o estado da doença e do tratamento prévio, no momento do transplante. O condicionamento quimioterápico mais utilizado foi: Bussulfano/Ciclofosfamida/Mesna e Campath/Fludarabina/Melfalano.

4.2 Avaliação de mucosite

Todos os pacientes passaram por exame clínico no dia D_{-7} com o objetivo de avaliar: a cavidade bucal na sequência proposta: 1) vermelhão do lábio superior, 2) mucosa labial superior, 3) mucosa alveolar superior, 4) borda gengival e alveolar superior, 5) palato duro, 6) palato mole, 7) orofaríngea, 8) dorso da língua, 9) borda lateral de língua, 10) ventre de língua, 11) soalho de boca, 12) borda gengival e alveolar inferior, 13) mucosa alveolar inferior, 14) mucosa jugal direita e esquerda, 15) mucosa labial inferior, 16) vermelhão do lábio inferior, 17) comissuras labiais (WHO, 1997).

A presença e classificação de mucosite foram avaliadas com a escala de gradação de 0 a 4, assim classificado: sem alterações (grau 0); eritema, irritação e dor (grau 1); eritema, úlceras, é possível a ingestão de alimentos sólidos (grau 2); úlceras, somente a ingestão de líquidos é possível (grau 3); ingestão de sólidos e líquidos é impossível (grau 4) (Parulekar *et al.*, 1998). Durante o período de internação, os pacientes foram avaliados para detectar a ocorrência e a severidade da mucosite oral por um examinador, quatro dias por semana do dia D_{-7} até o dia D_{+30} . A avaliação foi realizada no leito do paciente, sob luz artificial, com luvas de procedimento e auxílio de espátulas de madeira. O grau de mucosite foi avaliado por um examinador, em consenso com a equipe médica que discutiam semanalmente as condições gerais dos pacientes internados. Durante todo estudo foi utilizado uma ficha clínica para anotações dos dados dos pacientes, fluxo salivar, ocorrência de mucosite, e outras informações (ANEXO E).

4.3 Sialometria

A sialometria foi empregada para aferição do volume salivar produzido em repouso e sob estímulo. Para coleta de saliva em repouso e de saliva estimulada o paciente permaneceu

cinco minutos sem realizar movimentos de mastigação, deglutição e fala, em posição sentada, com o tronco voltado para frente. Para sialometria em repouso coletou-se toda saliva formada na boca durante cinco minutos em um tubo milimetrado tipo Falcon estéril, capacidade de 50 ml. Para sialometria sob estímulo, os procedimentos foram semelhantes aos descritos para sialometria em repouso excetuando-se que durante a coleta o paciente utilizou o Hiperbolóide durante os cinco minutos. Os pacientes se submeteram a duas sialometrias antes do transplante nos dias (D_{-7} ; D_{-1}) e três após o TCTH (nos dias D_{+3} , D_{+7} e D_{+14}). Utilizou-se uma pipeta graduada para obtenção do volume total da saliva em repouso e sob estímulo, dividindo o total de mililitros de saliva coletada por 5, obtendo o resultado em ml/minuto.

A fórmula $\frac{D_{+14} - D_{-7}}{D_{-7}} \times 100$ foi usada para obter o volume residual salivar em repouso e

estimulado, sendo D_{+14} representa o valor do fluxo salivar da última coleta realizada e D_{-7} o valor do fluxo salivar da primeira coleta realizada. Este cálculo representa a subtração entre o valor observado no final do estudo e o valor observado inicialmente. O resultado desta subtração é comparado de forma proporcional ao valor inicial. Este cálculo torna todos os grupos comparáveis, uma vez que existe variação no fluxo salivar inicial dos diferentes pacientes.

4.4 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

A saliva foi diluída na proporção 1:1 em uma solução de PBS (0,4 mM de NaCl e 10 mM de NaPO_4) contendo inibidores de proteases (0,1 mM de Fluoreto de Fenil metil sulfonil, 0,1 mM de cloreto de benzetônio, 10 mM de EDTA e 0,01 mg/mL de aprotinina A) e 0,05% de Tween-20. A solução foi homogeneizada, distribuída em alíquotas e congelada a -80°C até a análise por ELISA.

As concentrações das citocinas TNF- α , IL-10, EGF, MMP2/TIMP-2 e MMP9/TIMP-2 nas amostras de saliva foram determinadas pela técnica de sanduíche, descrita por Ondrey *et al.* (1999). As reações de ELISA foram realizadas com Kits DuoSet (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) de acordo com as especificações do fabricante. As concentrações foram expressas em mg/ml. A concentração de proteína total foi utilizada para corrigir os valores de citocinas para cada amostra. Os valores corrigidos foram expressos em pg/mg de proteína/min.

4.5 Terapia com sialogogo mecânico- Hiperbolóide

Os pacientes dos grupos 2 e 4 receberam os Hiperbolóides (Figura 1) para a realização de movimentos mastigatórios balanceados, iniciando a terapia no dia D-7 e finalizando no dia D+30. Os pacientes fizeram a terapia com o Hiperbolóide quatro vezes ao dia, sempre após as refeições durante 10 minutos. A vida útil do Hiperbolóide é em média de seis dias. O Hiperbolóide foi prescrito para o paciente por meio de vias de receituários da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais (FO-UFMG) juntamente com todas as informações adequadas, e foram substituídos pela pesquisadora sempre que necessário. O Hiperbolóide foi adquirido em pacotes contendo 10 unidades diretamente com o Dr. Afrânio Cheida.



Figura 1: Sialogogo mecânico: Hiperbolóide.

4.6 Terapia com sialogogo elétrico - TENS

Para a estimulação elétrica salivar foi utilizado TENS com dois canais (QUARK, São Paulo, SP, Brasil) (Figura 2). O grupo de pacientes que se submeteu a terapia de estimulação elétrica neural iniciou as aplicações de TENS no dia D-7 e finalizando no dia D+30. Cada paciente realizou três sessões de estímulo elétrico semanais, com duração de 30 minutos cada, nas glândulas salivares maiores, parótidas, submandibulares e sublinguais. Os eletrodos foram colocados adjacentes a região de localização das glândulas salivares maiores sob a face (Figura 3). Utilizou-se uma frequência de pulso de 50 Hz e duração do pulso de 250 micro/seg, conforme protocolos previamente estabelecidos por Hargitai *et al.* (2005).



Figura 2: Aparelho de estimulação elétrica transcutânea.



Figura 3: Aplicação do TENS: os eletrodos posicionados sob a face nas regiões das glândulas salivares maiores.

4.7 Análise estatística

As mudanças no fluxo salivar foram avaliadas por análise de medidas repetidas de variância, porque cada grupo foi avaliado várias vezes. Teste t de Student, o teste de Kruskal-Wallis, teste exato de Fisher e o teste de Friedman foram utilizados para dentro do grupo e entre grupos de comparação para mucosite oral e os níveis de citocinas. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software SPSS 16.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA). Um valor de $p \leq 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

Os resultados foram apresentados na forma do artigo científico submetido ao periódico *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*. Dados demográficos dos pacientes são apresentados no ANEXO F.

5.1 Artigo

Elsevier Editorial System(tm) for Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral
Radiology and Endodontology
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Effects of salivary stimulation therapies on salivary flow and chemotherapy-induced mucositis: a preliminary study

Article Type: Full Length Article

Section/Category: Oral Medicine

Keywords: salivary stimulation; oral mucositis; Allogeneic HSCT; cytokines

Corresponding Author: Professor Tarcília Aparecida Silva, PhD

Corresponding Author's Institution: Universidade Federal de Minas Gerais

First Author: Tania Amaral, PhD

Order of Authors: Tania Amaral, PhD; Camila Campos, DDS; Talita Santos, DDS; Claudio Leles, PhD; Antonio Teixeira, PhD; Mauro Teixeira, PhD; Henrique Bittencourt, PhD; Tarcília Aparecida Silva, PhD

Abstract: Objective. To evaluate the effects of salivary stimulation therapies on salivary flow, oral mucositis and salivary cytokines levels in patients receiving allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Study Design. Thirty-five patients were randomized into three groups categorized by type of salivary stimulation: Hyperboloid, transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS), combination of these two therapies and control group. Resting and stimulated saliva were collected from 7 days before to 14 days after transplantation. Salivary cytokines were assessed by ELISA. Results. The TENS and TENS+Hyperboloid groups were less affected by the reduction of resting salivary flow and also showed a tendency to keep higher rates of stimulated salivary flow in relation to the controls. Therapy groups had lower incidences of oral mucositis in grades 3 and 4. The TENS and TENS+Hyperboloid group tended to show a reduction of MMPs and increased of EGF levels. Conclusion. Salivary stimulation therapies contributed to minimize the reduction of salivary flow and severity of chemotherapy-induced oral mucositis.

1. Letter of Submission



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
Av Antônio Carlos, 6627 - Pampulha - Belo Horizonte - MG, CEP: 31270-901
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA, PATOLOGIA E CIRURGIA ODONTOLÓGICAS

February 23, 2011.

James R. Hupp
Editor-in-Chief

Dear Dr. Hupp,

We would like to submit the manuscript "**Effects of salivary stimulation therapies on salivary flow and chemotherapy-induced mucositis: a preliminary study**" to the editorial board of *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics*.

We would like to certify that all co-authors are aware of, and in agreement with the submission. We declare no conflict of interests concerning this paper.

Thank you for your attention, and we look forward to hearing from you at your earliest convenience.

Sincerely yours,

Tarcilia Aparecida da Silva
Departamento de Clínica, Patologia e Cirurgia Odontológicas, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos 6627, CEP 31.270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. Phone: 55 31 3409-2478 (voice); 55 31 3499-2430 (Fax). E-mail: tarcilia@ufmg.br

Effects of salivary stimulation therapies on salivary flow and chemotherapy-induced mucositis: a preliminary study

Tânia Mara Pimenta Amaral, PhD¹, Camila Cláudia Campos, DDS¹, Tálita Pollyanna Moreira dos Santos DDS¹, Cláudio Rodrigues Leles, PhD², Antônio Lúcio Teixeira, PhD^{3,4}, Mauro Martins Teixeira, PhD⁴, Henrique Bittencourt, PhD^{3,5}, *Tarcília Aparecida Silva, PhD^{1,4}

1. Department of Oral Pathology, Faculty of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais - Brazil

2. Department of Prevention and Oral Rehabilitation, Dental School, Universidade Federal de Goiás, Goiânia - Brazil

3. Department of Clinical Medicine, Universidade Federal de Minas Gerais - Faculty of Medicine, Belo Horizonte/MG - Brazil

4. Laboratory of Immunopharmacology, Department of Biochemistry and Immunology, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais - Brazil

5. Stem Cell Transplantation Unit, Hematology Service, Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte - Brazil

CONFLICT OF INTEREST: The authors declare that they have no conflict of interest.

*Corresponding author: Tarcília Aparecida da Silva. Mailing address: Departamento de Clínica, Patologia e Cirurgia Odontológicas, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos 6627, CEP 31270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. Phone: 55 31 3409-2478 (voice); 55 31 3499-2430 (Fax). E-mail: tarcilia@ufmg.br

*3. Manuscript

Effects of salivary stimulation therapies on salivary flow and chemotherapy-induced mucositis: a preliminary study

Tânia Mara Pimenta Amaral, PhD¹, Camila Cláudia Campos, DDS¹, Tálita Pollyanna Moreira dos Santos DDS¹, Cláudio Rodrigues Leles, PhD², Antônio Lúcio Teixeira, PhD^{3,4}, Mauro Martins Teixeira, PhD⁴, Henrique Bittencourt, PhD^{3,5}, *Tarcília Aparecida Silva, PhD^{1,4}

1. Department of Oral Pathology, Faculty of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais - Brazil
2. Department of Prevention and Oral Rehabilitation, Dental School, Universidade Federal de Goiás, Goiânia - Brazil
3. Department of Clinical Medicine, Universidade Federal de Minas Gerais - Faculty of Medicine, Belo Horizonte/MG - Brazil
4. Laboratory of Immunopharmacology, Department of Biochemistry and Immunology, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais - Brazil
5. Stem Cell Transplantation Unit, Hematology Service, Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte - Brazil

CONFLICT OF INTEREST: The authors declare that they have no conflict of interest.

- * Corresponding author: Tarcília Aparecida da Silva. Mailing address: Departamento de Clínica, Patologia e Cirurgia Odontológicas, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos 6627, CEP 31270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. Phone: 55 31 3409-2478 (voice); 55 31 3499-2430 (Fax). E-mail: tarcilia@ufmg.br

ABSTRACT

Objective. To evaluate the effects of salivary stimulation therapies on salivary flow, oral mucositis and salivary cytokines levels in patients receiving allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. **Study Design.** Thirty-five patients were randomized into three groups categorized by type of salivary stimulation: Hyperboloid, transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS), combination of these two therapies and control group. Resting and stimulated saliva were collected from 7 days before to 14 days after transplantation. Salivary cytokines were assessed by ELISA.

Results. The TENS and TENS+Hyperboloid groups were less affected by the reduction of resting salivary flow and also showed a tendency to keep higher rates of stimulated salivary flow in relation to the controls. Therapy groups had lower incidences of oral mucositis in grades 3 and 4. The TENS and TENS+Hyperboloid group tended to show a reduction of MMPs and increased of EGF levels.

Conclusion. Salivary stimulation therapies contributed to minimize the reduction of salivary flow and severity of chemotherapy-induced oral mucositis.

Keywords: salivary stimulation; oral mucositis; Allogeneic HSCT; cytokines

INTRODUCTION

Allogenic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT) is the treatment of choice for many malignant and non-malignant hematological diseases.¹ Allo-HSCT is preceded by a conditioning regimen with high doses of chemotherapy to eliminate patient's disease prevent the rejection of the graft and to create a space where the marrow can proliferate.² As a result of this conditioning regimen, the allo-HSCT patients usually have oral ulcerations and a breakdown of mucosal barriers. These oral manifestations may be severe, resulting in systemic complications and significant morbidity and mortality.^{3,4}

Chemotherapy-induced oral mucositis is one of the major complications that affects the gastrointestinal tract and causes difficulty in swallowing and talking.^{3,5,6} The development of mucositis induced by chemotherapy involves several mechanisms, including i) direct damage to epithelial cells and connective tissue, ii) inflammatory response and iii) reduction of cell turnover.^{5,7} Inflammatory mediators such as interleukin-1 (IL-1), tumor necrosis factor- α (TNF- α)^{5,8,9} interleukin-10 (IL-10),⁵ matrix metalloproteinases (MMPs)^{5,10} and growth factors as epidermal growth factor (EGF)¹¹⁻¹³ have been implicated in oral mucositis.

The dysfunction of major salivary glands is also a common consequence of allo-HSCT. Salivary flow and secretion of antimicrobial factors may be significantly reduced during the conditioning regimen.^{12,14-17} This transient decrease in saliva production has been associated with oral mucositis.^{14,18-20} In line with these findings, salivary stimulation flow contributes to reducing the incidence and severity of chemotherapy-induced mucositis.^{20,21}

Salivary stimulation may be done via mechanical stimulation, chewing gum-like sialogogues,^{20,22,23} electrical sialogogues such as transcutaneous electric nerve stimulation (TENS)^{24,25} and pharmacologic sialogogues such as pilocarpine.²¹ Although some authors have described the benefits of salivary stimulation for oral mucositis prevention,^{19,21} the relationship between salivary flow and oral mucositis in allo-HSCT patients has yet to be established.

This paper aims to assess the effectiveness of salivary stimulation therapies on oral mucositis occurrence in patients submitted to allo-HSCT. Moreover, the levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin (IL-10), epidermal growth factor (EGF), matrix metalloproteinases and specific tissue inhibitors (MMP2/TIMP-2, MMP9/TIMP-2) were assessed in the saliva before and after allo-HSCT.

PATIENTS AND METHODS

Patients

This study was approved by the Institutional Ethics Committees of Universidade Federal de Minas Gerais and Hospital das Clínicas (HC-UFMG). A signed informed consent was obtained from all of the participants. This investigation followed the guidelines of Helsinki Declaration. Thirty-five consecutive allo-HSCT patients from HC-UFMG, between February 2008 and September 2009, were included in this prospective study. All patients received allo-HSCT for a direct collection of bone marrow or peripheral blood stem cells. The patients were conditioned for allo-HSCT according to specific protocols from the Stem Cell Transplant Unit at HC-UFMG that varied according to the type and status of the disease. Eligible patients were randomized into four groups: Group 1 - Control Group (received no salivary stimulation therapy); Group 2 - salivary mechanical stimulation using a chewing instrument (mechanical sialogogue—Hyperboloid); Group 3 - salivary stimulation by transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS); Group 4 - salivary stimulation using the TENS combined with Hyperboloid (TENS+Hyperboloid). The patients were under therapy from day seven before allo-HSCT (D-7) until day thirty after allo-HSCT (D+30).

Saliva collection

Saliva samples were obtained at two time points before transplant (D-7 and D-1) and three time points after (D+3, D+7 and D+14). The saliva was collected under two conditions: resting and stimulated. The patients were instructed to wash their mouths with pure water before collection. For collecting both the resting and stimulated saliva, sterile tubes were used where each patient spit out all of the saliva formed in the oral cavity for 5 min. For the collection of stimulated saliva, patients used Hyperboloid for five minutes. The samples were centrifuged at 1.500 rpm for 10 min and the volume was measured with a micropipette. The saliva samples were subsequently diluted (1:1) in a PBS solution containing protease inhibitors (0.1 mM PMSF, 0.1

mM benzethonium chloride, 10 mM EDTA, and 0.01 mg/ml aprotinin A and 0.05% Tween-20) and subsequently frozen at -80°C until analysis.

Calculation of salivary flow and residual salivary volume

The total salivary volume was divided by five to obtain salivary flow expressed in ml min^{-1} . The formula $\frac{D_{-14} - D_{-7}}{D_{-7}} \times 100$ was used to obtain the residual salivary volume for resting and stimulated saliva, with D_{-14} representing the last collected salivary flow rate and D_{-7} representing the first collected salivary flow rate.

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

The salivary levels of cytokines TNF- α , IL-10, MMP2/TIMP-2, MMP9/TIMP-2 and EGF were determined using commercially available quantitative sandwich ELISA kits (DuoSet, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), according to the manufacturer's instructions. The total protein in the saliva samples was measured using the Bradford method and BSA standard (Fermentas Life Sciences, Vilnius, Lithuania). The concentrations were expressed in mg/ml. The total protein concentration was used to correct the saliva cytokines values for each sample. The saliva sample values corrected by total protein and salivary flow were expressed in pg/mg protein/min.

Mucositis Evaluation

The severity of mucositis was scored as grade 0 – no signs or symptoms; grade 1 - painless ulcers, erythema, or mild soreness; grade 2 - painful erythema, edema, or ulceration but the patient can eat; grade 3 - mucosal damage and the patient can ingest only liquids; grade 4 - severe mucosa damage and the patient requires parenteral or enteral support.²⁶ During hospitalization, the patients were evaluated four days a week from D-7 to D+30 to detect the

occurrence and severity of oral mucositis by one examiner. The evaluation was carried out for each patient in a bedside manner, under artificial light with procedure gloves and with the aid of wooden spatulas. The examiner was blinded to the treatment assignment.

Mechanical sialogogue therapy (Hyperboloid)

Patients were instructed to perform balanced masticatory exercises after meals with the use of the Hyperboloid²⁷ (Fig. 1) four times a day for ten minutes each. The Hyperboloids were replaced by the researcher whenever needed.

Electrical sialogogue therapy (TENS)

For electrical salivary stimulation, TENS with two channels was used (QUARK, São Paulo, SP, Brazil). Patients underwent three sessions of electrical stimulation on a weekly basis for 30 minutes each. The electrodes were placed at the regions adjacent to the major salivary glands: parotid, submandibular and sublingual (Fig. 2). A pulse frequency of 50 Hz and pulse duration of 250 micro/sec were used, as previously described.²⁴

Statistical analysis

The changes in the salivary flow were evaluated by repeated measures analysis of variance. Fisher's exact test, Student t-test, the Kruskal-Wallis test and the Friedman test were used for within-group and between-groups comparison of oral mucositis and cytokine levels. Statistical analyses were performed using SPSS 16.0 software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). A *p* value ≤ 0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

Patients

Thirty-five allo-HSCT recipient patients were enrolled in this study. The mean of the patients' ages was 33.56 ± 12.46 years. The age distribution was similar in all groups ($p > 0.05$). The control group was predominantly male (6/8) (75%), as were the TENS (7/9) (77.8%) and TENS+Hyperboloid (5/8) (62.5%) groups, while (5/10) 50% of patients in the Hyperboloid group were female. However, the difference in the gender distribution of the groups was not statistically significant ($p > 0.05$).

The recipient/donor gender division was as follows: (4/34) 11.8% female/female, (14/34) 41.2% male/male, (6/34) 17.6% male/female, (10/34) 29.4% female/male. No significant differences were found ($p > 0.05$) for the gender division. Twenty-six percent of patients (9/35) had non-malignant primary disease while (26/35) 75% had malignant diseases. Fifteen patients (15/35) (42.8%) remained alive at end of follow-up (217 ± 189 days). Of which (4/8) 50%; (3/10) 30.0%; (5/9) 55.6% and (3/8) 37.5% were found in the control, Hyperboloid, TENS and TENS+Hyperboloid groups, respectively.

Effect of therapy on salivary volume

The resting and stimulated salivary flow rates were assessed between days D-7 and D+14. No significant differences were found between the groups. However, a tendency toward a decrease in resting salivary flow was observed in all groups ($p = 0.09$). The TENS and TENS+Hyperboloid groups were less affected by this decrease (Fig. 3, A). In terms of stimulated saliva, TENS and TENS+Hyperboloid groups showed a tendency to keep a higher salivary flow than did the other groups ($p = 0.09$) (Fig. 3, B).

The same analysis was performed comparing the control group with a set of three therapy groups (TENS, Hyperboloid, TENS+Hyperboloid). In the analysis of residual resting saliva, the three

therapy groups showed an increase in salivary flow (22.41%) while the control group showed a decrease (25.06%) ($p > 0.05$).

In the analysis of residual resting saliva, the TENS and TENS+Hyperboloid showed an increase of salivary flow while the Hyperboloid and control groups showed a decrease ($p > 0.05$) (Fig. 3, C). An analysis of the residual stimulated salivary flow showed a declining in all groups, though the control and Hyperboloid had a greater reduction compared to TENS and TENS+Hyperboloid groups ($p > 0.05$) (Fig. 3, D).

Occurrence of mucositis and salivary flow

Sixty-eight point six percent (24/35) of patients had some grade of mucositis, with (6/8) 75.0%; (8/10) 80.0%; (3/9) 33.3% and (7/8) 87.5% of the patients being affected in the control, Hyperboloid, TENS and TENS+Hyperboloid groups, respectively. The most involved sites were the upper and lower lip, buccal mucosa, ventral and lateral tongue, floor of mouth and soft and hard palate. The groups did not differ in the grade of mucositis ($p > 0.05$). The groups who received therapy had a lower incidence of grades 3 and 4 mucositis in comparison with the control group (Fig. 4, A).

No statistically significant differences were observed in patients with or without mucositis in relation to stimulated salivary flow ($p > 0.05$). In the group with mucositis, however, an important decrease was seen on day D+14, which was not observed for groups without mucositis (Fig. 4, B). Similar results were observed for resting salivary flow. In terms of residual stimulated saliva, the group with mucositis also showed a trend in the reduction of flow (33.38%) than the group without mucositis (14.65%) ($p > 0.05$).

Influence of changes in salivary flow and occurrence of mucositis on patients' survival

Although the salivary stimulation therapies had no significant result on patients' survival, the total volume of saliva influenced the survival of patients submitted to allo-HSCT. Higher values

of resting saliva were observed in the survival group on day D+14 ($p = 0.04$) (Fig. 5, A). Similar results were observed for stimulated saliva ($p = 0.05$) (Fig. 5, B). Mucositis also influenced patient's survival; (17/24) 72.6% of patients in the group without mucositis remained alive, whereas (8/11) 70.8% of patients with mucositis were deceased ($p = 0.027$) (Fig. 5, C).

Salivary cytokines levels

TNF- α

The TENS group presented higher levels of TNF- α in the resting saliva on day D+14 ($p = 0.01$). A similar trend was observed for the Hyperboloid group. Otherwise, in the control and TENS+Hyperboloid groups, TNF- α levels had a tendency to decrease over time for both resting and stimulated saliva (Table I). No statistically significant differences were observed in the TNF- α levels in relation to the occurrence (or the lack) of mucositis (data not shown) ($p > 0.05$).

IL-10

The control group showed a significant increase in IL-10 levels at days D+7 and D+14 in the resting ($p = 0.03$) and stimulated saliva ($p = 0.004$). A similar tendency was observed for the TENS+Hyperboloid group in resting and stimulated saliva. Otherwise, all of the other therapy groups tended to decrease IL-10 levels over time for both resting and stimulated saliva, except for stimulated saliva in the Hyperboloid group (Table II). No statistically significant differences were observed in IL-10 levels in relation to the occurrence (or the lack) of mucositis (data not shown) ($p > 0.05$).

MMP2/TIMP-2

Lower levels of MMP2/TIMP-2 in resting saliva were observed in the therapy groups and especially in the TENS group ($p = 0.08$) in relation to the control at day D+7. For stimulated saliva, higher levels of MMP2/TIMP-2 at day D+7 were verified for the Hyperboloid group ($p = 0.03$) (Table 3). Considering the variation for resting and stimulated saliva, MMP2/TIMP-2

values tended to decrease in the TENS and TENS+Hyperboloid groups, while an increasing trend was observed in the control and Hyperboloid groups (Table III).

Patients with mucositis showed significantly higher levels of MMP2/TIMP-2 on day D+14 in stimulated saliva (875.79 ± 893.72) in relation to group without mucositis (136.68 ± 228.16 ; $p = 0.04$).

MMP9/TIMP-2

A tendency of lower levels of MMP9/TIMP-2 in resting saliva were observed in the TENS and TENS+Hyperboloid groups on days D+7 and D+14 in relation to other groups. Also, higher levels of MMP9/TIMP-2 in stimulated saliva were found in the control group on day D+14 in relation to the therapy groups. In the TENS+Hyperboloid group, MMP9/TIMP-2 values of stimulated saliva remained low during the entire period (Table IV).

Patients with mucositis showed a significant increase of MMP9/TIMP2 levels on day D-1 in stimulated saliva (372.31 ± 776.45) in relation to group without mucositis (17.68 ± 32.04 ; $p = 0.04$).

EGF

Increased levels of EGF in resting saliva were observed on day D+7 and D+14 in therapy groups compared with the control group. In stimulated saliva, lower levels of EGF were observed in the control group on days D+3 and D+7 compared with other periods ($p = 0.02$). In the TENS group, EGF levels in stimulated saliva remained unaltered from days -7 to +14. A trend towards higher levels of EGF in stimulated saliva was observed in the TENS+Hyperboloid group on day D+14 in relation to the control and other therapy groups ($p = 0.07$). (Table V).

Patients with mucositis showed a significant increase in EGF levels in resting saliva on day D+3 (657.09 ± 1725.38) in relation to group without mucositis (73.76 ± 73.31 ; $p = 0.02$). In stimulated saliva, a significant augment of EGF levels was observed in the patients with

mucositis on day D+3 (222.31 ± 213.67) in relation to group without mucositis (86.70 ± 122.79 ; $p = 0.03$). The same significant increase of EGF levels in stimulated saliva in the group with mucositis was observed on day D+7 (265.74 ± 179.84) in relation to the group without mucositis (100.97 ± 38.60 ; $p = 0.03$).

DISCUSSION

Saliva has a variety of beneficial effects on the oral mucosa that include lubrication, cleansing, buffering, antimicrobial action and protection.^{15,17} Disturbances in the salivary quality and quantity as observed during allo-HSCT may have deleterious consequences for the oral mucosa.^{14,18-20} In this study, we aimed to determine the effect of salivary stimulation therapies on salivary flow and oral mucositis in patients undergoing chemotherapy. Our major findings were that electrical therapy alone or combined with mechanical salivary stimulatory therapies, minimized the reduction of salivary flow and severity of chemotherapy-induced oral mucositis.

Other studies have reported a temporary reduction of salivary secretion during allo-HSCT.^{14,16,17} This reduction can be related to the action of chemotherapeutic drugs which induce glandular damage.¹⁵ For this reason, patients undergoing chemotherapy should be advised to stimulate their salivary glands to increase their residual secretory capacities.^{19,23} In this setting, the Hyperboloid is a chewing instrument made of silicone, which is soft, smooth and translucent. It acquires a hardness 32-36 Shore A, allowing non-traumatic masticatory exercises.²⁷ It also has the shape of a hyperbola with a rounded apex and is nontoxic, odorless and tasteless. The advantage of this approach over the use of chewing gum is that the Hyperboloid has a standard hardness, which produces neural stimuli effective in increasing salivary flow.²⁷ The TENS electrostimulatory device is a non-invasive, safe and transcutaneous nerve stimulation therapy that has been reported to stimulate salivary flow.^{24,25} One of the possible mechanisms of TENS is the increase in blood supply and the stimulation of the auriculotemporal nerve, especially at the parotid gland.²⁴ These therapies are safe cause no side effects and have been employed with success in treatment of burning mouth syndrome, Sjögren's syndrome and Sialolithiasis.^{27,28,29} In contrast, the parasympathomimetic drugs are associated with a number of uncomfortable side effects including sweating, tachyarrhythmia, rhinitis, dizziness, nausea and increased urinary frequency.³⁰

Among the oral complications reported in the literature during allo-HSCT, the most frequent was oral mucositis.^{5,6,20} The incidence of oral mucositis can reach 100% in patients receiving myeloablative therapy.^{3,8} In this study, 68.5% of patients had some grade of oral mucositis. Mucositis severity was influenced by salivary stimulation therapies, with patients under salivary stimulation showing less severe oral mucositis. Furthermore, none of the patients in the TENS group had severe mucositis. Similar to our results, significant reductions in the incidence and severity of mucositis were observed when salivary stimulation was performed by using pharmacologic^{21,31} and mechanical sialogogues.²⁰ The association between reduced salivary flow and oral mucositis could result from the insufficient production of antimicrobial factors (e.g. lactoperoxidase, lactoferrin and lysozyme) and mucosal protectants (e.g. EGF, glycoproteins and sIgA),¹² as well as prolonged action and cytotoxic effects of chemotherapeutic drugs on the oral mucosa.¹⁵

The reduction in salivary flow, in addition to the severity and duration of oral mucositis in patients undergoing bone marrow transplantation, can have substantial influence on morbidity and mortality.^{4,15,17} Indeed, our results demonstrated significantly higher values of resting and stimulated saliva and lower incidence of mucositis in the survival group. Morbidity and mortality associated with mucositis includes ulceration, severe pain, bleeding and increased risks for local and systemic infections.^{3,7}

Altered salivary levels of cytokines have been found in patients with oral mucositis.^{5,32} Thus, saliva might be useful for the detection of inflammatory markers and to assess oral mucositis severity.⁸ In this study, we did not observe significant association between the TNF- α and IL-10 levels with the occurrence of mucositis. However, other studies demonstrated that absence of complications after HSCT might be related to the IL-10 effects on down-modulation of pro-inflammatory cytokine production such as TNF- α .³³

The TENS therapy resulted in lower levels of MMP2/TIMP2 and MMP9/TIMP2 in resting and stimulated saliva. These results may reflect the decreased incidence of oral mucositis in this

group, as patients with mucositis exhibited a significant increase in salivary levels of these molecules.¹⁰

Increased levels of EGF in resting and stimulated saliva were observed in the groups that underwent salivary stimulation therapy. This finding could reflect the beneficial effects of salivary stimulation on oral mucosa, given that EGF plays an important role in maintaining the anatomic continuity of the oral cavity's mucous membranes.³⁴ We also verified that patients who had oral mucositis showed a significant increase in EGF levels in both resting and stimulated saliva. This result may be associated with an increased healing of the oral mucosa after injury.^{12,34,35} Thus, some previous studies reported a negative correlation between levels of EGF in saliva and mucosal damage.^{12,13,36}

Hyposalivation can significantly compromise mucosal integrity, impair chewing and swallowing and debase the quality of life in patients undergoing chemotherapy.^{3,17,23} The results obtained by mechanical and electrical salivary stimulation contributed to minimize the decrease of salivary flow reduction and the severity of oral mucositis in patients undergoing allo-HSCT. These combined therapies are safe, inexpensive, had no adverse effects and seemed to augment salivary protection, thus reducing the severity of oral mucositis. Furthermore, a reduction of both salivary flow and the incidence mucositis had a negative impact on patients' survival, reinforcing the importance of salivary stimulation in patients receiving chemotherapy.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), Pró-Reitoria de Pesquisa-UFMG and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil.

REFERENCES

1. Schmit-Pokorny K. Expanding indications for stem cell transplantation. *Semin Oncol Nurs* 2009;25:105-14.
2. Storb R. Preparative regimens for patients with leukemias and severe aplastic anemia (overview): biological basis, experimental animal studies and clinical trials at the Fred Hutchinson Cancer Research Center. *Bone Marrow Transplant* 1994;14:1-3.
3. Fillicko J, Lazarus HM, Flomenberg N. Mucosal injury in patients undergoing hematopoietic progenitor cell transplantation: new approaches to prophylaxis and treatment. *Bone Marrow Transplant* 2003;31:1-10.
4. Gabriel DA, Shea T, Olajida O, Serody JS, Comeau T. The effect of oral mucositis on morbidity and mortality in bone marrow transplant. *Semin Oncol* 2003;30:76-83.
5. Sonis ST. The pathobiology of mucositis. *Nat Rev Cancer* 2004;4:277-84.
6. Scully C, Sonis S, Diz PD. Oral mucositis. *Oral Dis* 2006;12:229-41.
7. Barasch A, Peterson DE. Risk factors for ulcerative oral mucositis in cancer patients: unanswered questions. *Oral Oncol* 2003;39:91-100.
8. Fall-Dickson JM, Ramsay ES, Castro K, Woltz P, Sportés C. Oral mucositis-related oropharyngeal pain and correlative tumor necrosis factor-alpha expression in adult oncology patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Ther* 2007;29:2547-61.
9. Logan RM, Gibson RJ, Bowen JM, Stringer AM, Sonis ST, Keefe DM. Characterisation of mucosal changes in the alimentary tract following administration of irinotecan: implications for the pathobiology of mucositis. *Cancer Chemother Pharmacol* 2008;62:33-41.
10. Al-Dasooqi N, Gibson RJ, Bowen JM, Keefe DM. Matrix metalloproteinases: key regulators in the pathogenesis of chemotherapy-induced mucositis? *Cancer Chemother Pharmacol* 2009;64:1-9.

11. Sonis ST, Costa JW Jr, Evitts SM, Lindquist LE, Nicolson M. Effect of epidermal growth factor on ulcerative mucositis in hamsters that receive cancer chemotherapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1992;74:749-55.
12. Epstein JB, Gorsky M, Guglietta A, Le N, Sonis ST. The correlation between epidermal growth factor levels in saliva and the severity of oral mucositis during oropharyngeal radiation therapy. *Cancer* 2000;89:2258-65.
13. Dumbrigue HB, Sandow PL, Nguyen KH, Humphreys-Beher MG. Salivary epidermal growth factor levels decrease in patients receiving radiation therapy to the head and neck. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2000;89:710-6.
14. McCarthy GM, Awde JD, Ghandi H, Vincent M, Kocha WI. Risk factors associated with mucositis in cancer patients receiving 5-fluorouracil. *Oral Oncol* 1998;34:484-90.
15. Jensen SB, Pedersen AM, Reibel J, Nauntofte B. Xerostomia and hypofunction of the salivary glands in cancer therapy. *Support Care Cancer* 2003;11:207-25.
16. Karolewska E, Konopka T, Pupek M, Chybicka A, Mendak M. Antibacterial potential of saliva in children with leukemia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008;105:739-44.
17. Jensen SB, Pedersen AM, Vissink A, Andersen E, Brown CG, Davies AN, et al. A systematic review of salivary gland hypofunction and xerostomia induced by cancer therapies: prevalence, severity and impact on quality of life. *Support Care Cancer* 2010;18:1039-60.
18. Epstein JB, Tsang AH, Warkentin D, Ship JA. The role of salivary function in modulating chemotherapy-induced oropharyngeal mucositis: a review of the literature. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2002;94:39-44.

19. Vissink A, Burlage FR, Spijkervet FK, Veerman EC, Nieuw Amerongen AV. Prevention and treatment of salivary gland hypofunction related to head and neck radiation therapy and chemotherapy. *Support Cancer Ther* 2004;1:111-8.
20. Gandemer V, Le Deley MC, Dollfus C, Auvrignon A, Bonnaure-Mallet M, Duval M, et al. Multicenter randomized trial of chewing gum for preventing oral mucositis in children receiving chemotherapy. *Pediatr Hematol Oncol* 2007;29:86-94.
21. Awidi A, Homsy U, Kakail RI, Mubarak A, Hassan A, Kelta M, et al. Double-blind, placebo-controlled cross-over study of oral pilocarpine for the prevention of chemotherapy-induced oral mucositis in adult patient with cancer. *Eur J Cancer* 2001;37:2010-4.
22. Edgar WM. Sugar substitutes, chewing gum and dental caries: a review. *Br Dent J* 1998;184:29-32.
23. Nieuw Amerongen AV, Veerman EC. Current therapies for xerostomia and salivary gland hypofunction associated with cancer therapies. *Support Care Cancer* 2003;11:226-31.
24. Hargitai IA, Sherman RG, Strother JM. The effects of electrostimulation on parotid saliva flow: a pilot study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2005;99:316-20.
25. Strietzel FP, Martín-Granizo R, Fedele S, Lo Russo L, Mignogna M, Reichart PA, et al. Electrostimulating device in the management of xerostomia. *Oral Dis* 2007;13:206-13.
26. Parulekar W, Mackenzie R, Bjarnason G, Jordan RC. Scoring oral mucositis. *Oral Oncol* 1998;34:63-71.
27. Cheida AP. Hiperbolóide: instrumento de mastigação, um estimulador periomiofuncional. São Paulo: Ícone; 2004; p. 50-6.
28. Talal N, Quinn JH, Daniels TE. The clinical effects of electrostimulation on salivary function of Sjögren's syndrome patients: a placebo controlled study. *Rheumatol Int* 1992;12:43-5.

29. Amaral TMP, Rosa MA, Souza FTAD, Santos TPM, Silva MLV, DA Rosa P, et al. Salivary stimulation in patients with burning mouth syndrome. *J Dent Res* 2010;89(Spec Iss B):1048.
30. Thelin WR, Brennan MT, Lockhart PB, Singh ML, Fox PC, Papas AS, et al. The oral mucosa as a therapeutic target for xerostomia. *Oral Dis* 2008;14:683-9.
31. Lockhart PB, Brennan MT, Kent ML, Packman CH, Norton HJ, Fox PC, et al. Randomized controlled trial of pilocarpine hydrochloride for the moderation of oral mucositis during autologous blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2005;35:713-20.
32. Sonis ST, Elting LS, Keefe D, Peterson DE, Schubert M, Hauer-Jensen M, et al. Perspectives on cancer therapy-induced mucosal injury: pathogenesis, measurement, epidemiology, and consequences for patients. *Cancer* 2004;100:2026-46.
33. Holler E, Roncarolo MG, Hintermeier-Knabe R, Eissner G, Ertl B, Schulz U, et al. Prognostic significance of increased IL-10 production in patients prior to allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2000;25:237-41.
34. Berlanga-Acosta J, Gavilondo-Cowley J, López-Saura P, González-López T, Castro-Santana MD, López-Mola E, et al. Epidermal growth factor in clinical practice - a review of its biological actions, clinical indications and safety implications. *Int Wound J* 2009;6:331-46.
35. Ino M, Ushiro K, Ino C, Yamashita T, Kumazawa T. Kinetics of epidermal growth factor in saliva. *Acta Otolaryngol Suppl* 1993;500:126-30.
36. Girdler NM, McGurk M, Aqual S, Prince M. The effect of epidermal growth factor mouthwash on cytotoxic-induced oral ulceration: a phase I clinical trial. *Am J Clin Oncol* 1993;18:403-6.

FIGURE LEGENDS

Fig. 1 Mechanical sialogogue-Hyperboloid

Fig. 2 Electrical sialogogue. Transcutaneous electric nerve stimulation (TENS) with electrodes placed on the face regions of major salivary glands.

Fig. 3 The time course of resting (A) and stimulated salivary flow (B) in patients undergoing allo-HSCT under different salivary stimulation therapies. The effect of salivary therapies on residual resting (C) and stimulated (D) saliva. The values represent mean±SD. Therapy groups: Control (C), Hyperboloid (H), TENS (T), TENS+ Hyperboloid (T+H).

Fig. 4 The effect of different salivary stimulation therapies on mucositis grades (A) in patients undergoing allo-HSCT. The time course evaluation of stimulated saliva considering the occurrence (or lack) of mucositis (B). The values represent mean±SD.

Figure 5 The time course of evaluation of resting (A) and stimulated (B) saliva for deceased and living patients. The occurrence of mucositis in deceased and living patients (C). * $p \leq 0.05$ comparing the salivary flow of deceased and living patients at the same time point.

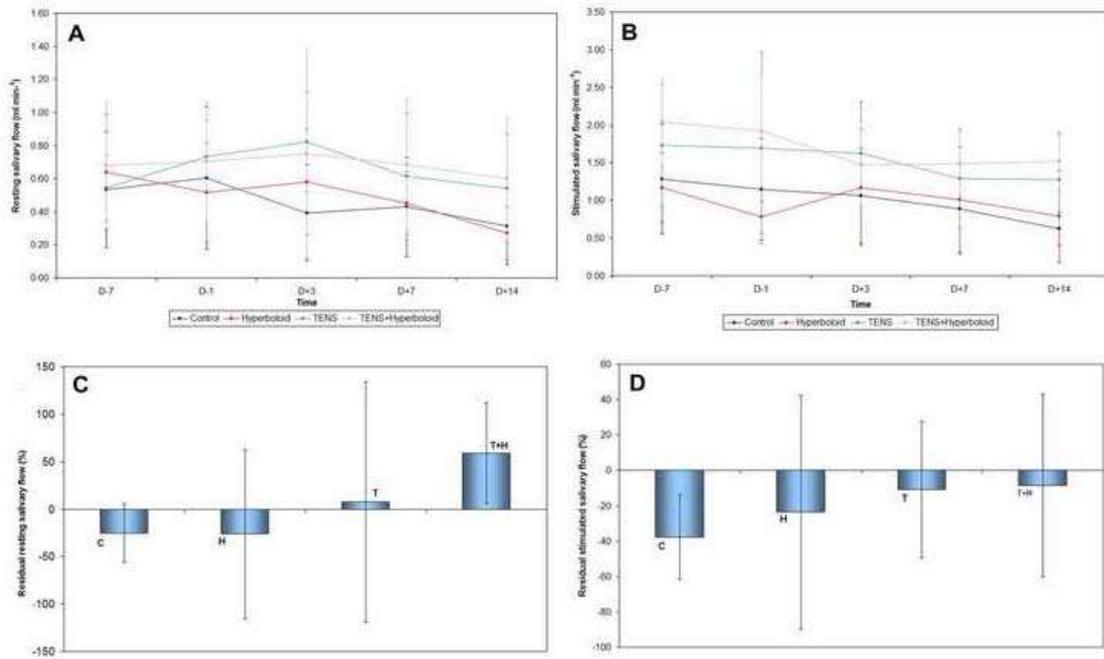
4. Figure
[Click here to download high resolution image](#)



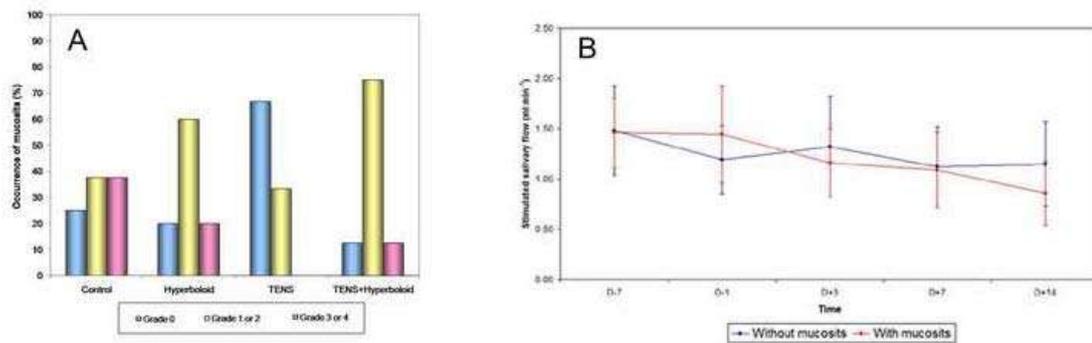
4. Figure
[Click here to download high resolution image](#)



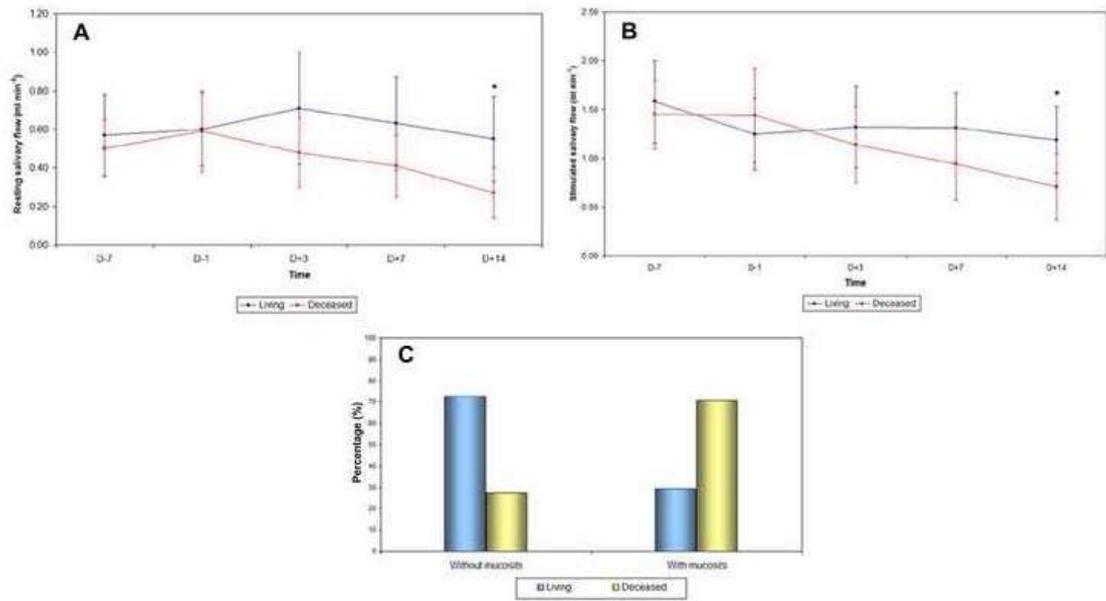
4. Figure
[Click here to download high resolution image](#)



4. Figure
[Click here to download high resolution image](#)



4. Figure
[Click here to download high resolution image](#)



5. Table

Table I -The effects of salivary stimulation therapies on TNF- α levels.

Time	Resting Saliva					Stimulated Saliva				
	C	H	T	T+H	p	C	H	T	T+H	p
D-7	3.51# (0-303.92)	0 (0-29.35)	0 (0-12.30)	6.36 (0-245.34)	0.44	6.03 (0-341.56)	0 (0-68.22)	4.33 (0-135.32)	11.14 (0-513.40)	0.98
D-1	0 (0-12.97)	0 (0-0)	0 (0-25.82)	0 (0-15.14)	0.53	0 (0-22.21)	0 (0-60.69)	0 (0-16.42)	0 (0-10.59)	0.84
D+3	0.66 (0-6.16)	4.82 (0-64.26)	0 (0-48.87)	0 (0-78.12)	0.88	13.90 (0-75.38)	0 (0-131.69)	0 (0-16.98)	5.08 (0-24.66)	0.81
D+7	0 (0-24.19)	1.49 (0-222.06)	0 (0-28.67)	0 (0-47.49)	0.95	0 (0-21.77)	5.43 (0-242.86)	0 (0-52.92)	4.40 (0-55.70)	0.61
D+14	0 (0-18.86)	2.59 (0-7.56)	10.60** (0-33.92)	3.89 (0-132.77)	0.49	4.08 (0-54.10)	4.39 (0-39.53)	21.80 (0-135.27)	0 (0-61.42)	0.93
p	0.29	0.29	0.01	0.41		0.27	0.21	0.16	0.23	

#Values expressed in pg/mgprotein/ ml min⁻¹ represent median followed by minimum and maximum. Control (C); Hyperboloid (H); TENS (T); TENS+Hyperboloid (T+H) groups. **Indicates differences comparing different times of evaluation (Friedman test). Kruskal - Wallis test was used to compare therapies groups.

Table II - The effects of salivary stimulation therapies on IL-10 levels.

Time	Resting Saliva					Stimulated Saliva				
	C	H	T	T+H	p	C	H	T	T+H	p
D-7	2.25# (0-2881.76)	127.22 (0-940.33)	16.11 (0-26942.84)	0.27 (0-81.55)	0.79	9.14 (0-703.82)	0 (0-12341.00)	56.29 (0-40045.78)	1.20 (0-187.37)	0.64
D-1	4.01 (0-82.71)	25.18 (0-24906.32)	223.93 (0-11478.81)	8.80 (0-5815.20)		0.62	0 (0-99.02)	0 (0-19805.41)	20.33 (0-17560.70)	
D+3	0 (0-62.83)	452.25 (0-41004.26)	30.19 (7.39-12607.68)	54.71 (0-1668.99)	0.11	0.92 (0-2650.84)	0 (0-28352.45)	98.64 (0-16417.97)	71.79 (0-4234.05)	0.61
D+7	305.12** (0-1956.22)	21.52 (0-289.16)	0.05 (0-5798.49)	10.12 (0-31614.23)		0.49	478.49** (1.27-6470.18)	10.39 (0-63433.88)	62.03 (0-9748.05)	
D+14	259.20** (0-3611.96)	40.74 (0-112.67)	1.97 (0-17529.88)	771.75 (0-23494.96)	0.52	1621.77** (0-21762.68)	44.32 (0-1131.41)	18.49 (0-7170.75)	105.43 (0-2820.59)	0.37
p	0.03	0.13	0.20	0.71		0.004	0.81	0.31	0.86	

#Values expressed in pg/mgprotein/ ml min⁻¹ represent median followed by minimum and maximum. Control (C), Hyperboloid (H), TENS (T), TENS+Hyperboloid (T+H) groups. **Indicates differences comparing different times of evaluation (Friedman test). Kruskal - Wallis test was used to compare therapies groups.

Table III -The effects of salivary stimulation therapies on MMP2/TIMP-2 levels.

Time	Resting Saliva					Stimulated Saliva				
	C	H	T	T+H	p	C	H	T	T+H	p
D-7	50.95# (6.99-217.42)	0 (0-10.46)	189.07 (0-327.32)	31.64 (4.07-116.23)	0.19	49.79 (0-134.46)	10.31 (0-35.12)	144.74 (0-522.02)	46.98 (0-116.67)	0.31
D-1	25.38 (4.28-110.07)	26.70 (10.40-161.68)	54.15 (0-229.66)	40.53 (0-56.05)	0.94	58.84 (9.30-601.24)	10.33 (0-29.11)	31.26 (0-332.44)	31.67 (0-125.77)	0.59
D+3	84.08 (0-468.71)	29.84 (20.58-261.48)	272.83 (0-1996.89)	12.09 (0-24.65)	0.30	153.48 (33.46-1452.54)	26.77 (0-208.14)	213.49 (0-525.94)	19.94 (0-36.27)	0.16
D+7	148.98 (0-416.40)	57.20 (22.37-628.48)	31.08 (0-507.10)	2.88 (0-14.42)	0.18	63.93 (38.40-159.53)	117.48** (0-789.08)	73.10 (0-929.82)	34.72 (0-94.64)	0.65
p	0.47	0.12	0.09	0.33		0.55	0.03	0.61	0.61	

#Values expressed in pg/mgprotein/ ml min⁻¹ represent median followed by minimum and maximum. Control (C); Hyperboloid (H); TENS (T); TENS+Hyperboloid (T+H) groups. **Indicates differences comparing different times of evaluation (Friedman test). Kruskal - Wallis test was used to compare therapies groups.

Table IV -The effects of salivary stimulation therapies on MMP9/TIMP-2 levels.

Time	Resting Saliva					Stimulated Saliva				
	C	H	T	T+H	p	C	H	T	T+H	p
D-7	0# (0-286.46)	55.84 (0- 128.07)	235.73 (0-1587.07)	25.01 (0-9691.40)	0.57	0 (0-15991.94)	0 (0-321.37)	371.52 (0-5702.67)	0 (0-622.67)	0.39
D-1	0 (0-173.05)	0 (0-0)	5.93 (0-1719.51)	12.63 (0-1417.28)	0.25	0 (0-1430.27)	0 (0-121.61)	0 (0-3497.95)	0 (0-1369.02)	0.99
D+3	0 (0-229.42)	195.32 (0-517.55)	61.22 (0-1195.72)	39.36 (0-719.22)	0.44	5.43 (0-1094.02)	65.38 (0-787.19)	0 (0-1079.73)	0 (0-273.60)	0.75
D+7	4.88 (0-699.90)	137.24 (0-708.35)	0 (0-135.38)	0 (0-681.16)	0.44	1.99 (0-373.34)	34.38 (0-1079.80)	0 (0-0)	0 (0-124.66)	0.21
D+14	4.12 (0-2046.10)	12.22 (0-25.90)	0 (0-349.30)	1.20 (0-240.74)	0.97	267.70 (0-788.09)	0 (0-181.96)	91.31 (0-260.06)	0 (0-406.59)	0.35
p	0.97	0.13	0.12	0.91		0.81	0.89	0.09	0.17	

#Values expressed in pg/mgprotein/ ml min⁻¹ represent median followed by minimum and maximum. Control (C), Hyperboloid (H), TENS (T), TENS+Hyperboloid (T+H) groups. Kruskal - Wallis test was used to compare therapies groups. The Friedman test was used to compare the evolution of time.

Table V -The effects of salivary stimulation therapies on EGF levels.

Time	Resting Saliva					Stimulated Saliva				
	C	H	T	T + H	p	C	H	T	T + H	p
D-7	59.63# (0.15-1312.85)	59.85 (11.61-159.30)	55.52 (4.63-355.09)	326.27 (9.17-6690.82)	0.46	287.22 (87.43-2319.25)	58.46 (0-354.97)	189.69 (2.63-790.44)	512.26 (89.76-10505.04)	0.26
D-1	35.17 (1.14-803.54)	96.09 (16.42-308.01)	124.88 (2.30-420.24)	167.81 (19.36-619.09)	0.57	117.17 (5.29-965.68)	88.99 (29.46-311.68)	148.21 (0-665.54)	176.86 (4.20-1563.93)	0.91
D+3	6.39 (0.26-345.45)	90.34 (2.77-257.38)	176.44 (0.62-380.56)	92.25 (62.25-446.89)	0.26	88.10** (4.11-477.61)	101.28 (0-296.45)	140.73 (4.08-628.61)	307.02 (78.96-552.36)	0.49
D+7	16.74 (3.23-464.30)	246.64 (43.05-299.37)	141.82 (0.95-362.55)	133.74 (67.72-216.05)	0.39	44.65** (1.49-310.66)	136.33 (5.98-581.43)	170.92 (89.69-543.23)	186.86 (172.30-491.06)	0.14
D+14	9.50 (0.31-493.06)	83.23 (35.43-308.25)	79.20 (2.01-443.72)	61.48 (0.77-321.27)	0.45	104.41 (4.32-277.36)	63.10 (1.78-521.33)	180.47 (88.93-495.59)	374.71 (156.86-527.20)	0.07
p	0.45	0.66	0.38	0.50		0.02	0.45	0.90	0.59	

#Values expressed in pg/mgprotein/ ml min⁻¹ represent median followed by minimum and maximum. Control (C); Hyperboloid (H); TENS (T); TENS+Hyperboloid (T+H). **Indicates differences comparing different times of evaluation (Friedman test). Kruskal - Wallis test was used to compare therapies groups.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Alterações na composição e fluxo salivar associados à quimioterapia têm sido apontadas como possível causa de ocorrência de mucosite oral (McCarthy *et al.*, 1998; Epstein *et al.*, 2002).

As glândulas salivares maiores apresentam graus variados de risco de sofrerem alterações decorrentes do tratamento do câncer. O envolvimento das glândulas salivares maiores nos pacientes submetidos à radioterapia na região de cabeça e pescoço já estão mais conhecidas que aquelas provocadas pela quimioterapia (Coracin *et al.*, 2006). Entretanto, mais estudos sobre o assunto são necessários para avanços na abordagem preventiva e terapêutica.

A saliva apresenta importante função na manutenção da saúde oral, seja por sua parte fluida ou pelos componentes específicos nela encontrados. O fluxo salivar pode ser alterado por diferentes motivos, como (1) fatores que alteram a função nervosa responsável pelo estímulo à glândula salivar, (2) com fatores que afetem a função acinar e ductal (Schubert; Izutsu, 1987).

Os métodos de diagnósticos utilizando a saliva avançaram bastante nos últimos anos. A literatura contém mais de 2000 artigos a respeito de testes salivares que são realizados desde 1982, descrevendo o uso de saliva total a fim de monitorar doenças sistêmicas e bucais. Com os avanços tecnológicos, é possível detectar por meio do exame salivar microorganismos bucais, substâncias químicas presentes no organismo, e marcadores imunológicos (Streckfus; Bigler, 2002).

As vantagens principais em se utilizar o fluido salivar para o diagnóstico no lugar do sangue são o acesso fácil e método de coleta não invasivo. A análise da saliva tem duas finalidades: a primeira, identificar indivíduos com doença e a segunda, realizar o acompanhamento do indivíduo afetado, avaliando a efetividade do tratamento empregado

(Moura *et al.*, 2007). A análise da saliva também possibilita avaliar o estado nutricional, metabólico, microbiológico e imunológico dos pacientes (Wong, 2006).

Vários estudos relatam uma correlação importante entre a saliva e a manutenção do epitélio bucal (Lockhart; Sonis, 1981, Chaushu *et al.*, 1995; Epstein *et al.*, 2002). Se as glândulas salivares puderem ser estimuladas deve-se usar esta opção, dada a saliva ser o melhor protetor dos tecidos orais. Alguns autores realizaram pesquisas na linha de estimulação salivar, verificando, a real importância da saliva sobre diversas condições bucais, tais como tratamento quimioterápico, disfagia e xerostomia, obtendo resultados satisfatórios (Talal *et al.*, 1992; Hargitai *et al.*, 2005; Gandemer *et al.*, 2007; Pattani *et al.*, 2010). Desta forma esta linha de pesquisa merece maior investigação.

Quando causada pela quimioterapia, a mucosite oral se manifesta mais frequentemente associada a agentes farmacológicos específicos, tais como o Metotrexato, 5-FU, Bleomicina, Doxorrubicina, Cisplatina, Vinblastina e Vincristina. Essas drogas produzem toxicidade direta por meio de alguns de seus antimetabólicos, e outros agentes sintéticos como hidroxureia e hidrocloreto de procarbazona, que levam à degeneração glandular, alterações no colágeno e à displasia epitelial (Epstein *et al.*, 2002).

A mucosite oral é um efeito colateral importante, decorrente do tratamento antineoplásico, seja por radioterapia ou por quimioterapia. A presença da mucosite, além de interferir nos regimes de tratamento do câncer, predispõe o paciente a outros tipos de complicações, como dores intensas, infecções oportunistas, desnutrição devido à baixa ingestão oral, dificuldade de expressão verbal, hospitalização prolongada, que culminam na queda da sua qualidade de vida (Gabriel *et al.*, 2003; Fillicko *et al.*, 2003; Sonis, 2004; Scully *et al.*, 2006; Gandemer *et al.*, 2007).

A *International Society of Oral Oncology* sugeriu recentemente a adoção do termo mucosite do trato alimentar, com o objetivo de padronização da terminologia e também uma

forma de abordar a mucosite de uma forma global, em todo o trato gastrointestinal (Keefe *et al.*, 2007). Para a avaliação da mucosite em boca, ainda persiste a dificuldade de graduação e opção terapêutica, já que não são incomuns sinais como a odinofagia associados a uma ausência de lesões em mucosa bucal. Portanto, consideramos pertinente a discussão sobre a terminologia da mucosite.

Uma das grandes dificuldades em relação aos avanços das pesquisas sobre mucosite é a dificuldade de comparar resultados entre os estudos já realizados, pois são utilizadas escalas diferentes para a avaliação da severidade da mucosite e ainda, nem sempre a apresentação clínica da mucosite corresponde aos sinais e sintomas preconizados na escala. Além disso, o número de pacientes nestes estudos é reduzido e existem variações nos protocolos quimioterápicos.

Nenhuma estratégia terapêutica ou abordagem provou-se efetiva na prevenção e no tratamento da mucosite bucal até os dias de hoje, apesar de se ter na literatura revisões sistemáticas e ensaios clínicos randomizados recentes com este objetivo (Epstein *et al.*, 2001; Clarkson, 2005; Djuric *et al.*, 2006). O nível das evidências que suportam tais intervenções varia e os benefícios para pacientes com diferentes tipos de câncer são ainda desconhecidos (Barasch; Peterson, 2003), permanecendo a prevenção e o tratamento da mucosite condições ainda não resolvidas, limitando a eficácia da terapia anti-neoplásica e prejudicando a qualidade de vida dos pacientes.

Vários estudos clínicos e laboratoriais têm sido realizados para elucidar a patogênese da mucosite com o objetivo de desenvolver estratégias preventivas e curativas. Estudos têm demonstrado a eficácia da administração de fator de crescimento para queratinócitos-1 (Palifermina) (Clarkson, 2005; Sonis, 2010). Há ainda recomendações para a utilização de crioterapia em pacientes sob regime de condicionamento com altas doses de melfalano (Scully *et al.*, 2006). O uso do laser de baixa potência tem demonstrado resultados

promissores na redução da severidade da mucosite oral (Khouri *et al.*, 2009). Segundo a *Multinational Association of Supportive Care in Cancer* e a *International Society for Oral Oncology*, não é recomendável a utilização de antibióticos tipos lozenges, sulfacrato, fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos e glutamina para prevenção ou tratamento da mucosite oral, uma vez que ainda não existem evidências que suportem sua eficiência (Keefe *et al.*, 2007).

As terapias de estimulação salivar deste trabalho nos pacientes submetidos ao TCTH apresentaram tendências no sentido de minimizar a ocorrência da mucosite bucal nos graus mais severos no grupo do TENS+Hiperbolóide. Após mais investigações, talvez seja possível a inclusão destas terapias como protocolo de prevenção de redução do fluxo salivar nos pacientes submetidos a altas doses de quimioterapia.

O tamanho da amostra foi um fator dificultador para a obtenção dos resultados e para a análise estatística e pode justificar o fato de que os resultados apresentaram tendências, mas não apontaram diferenças significativas entre os grupos de terapias.

Para eliminar o viés de seleção, os pacientes foram aleatorizados pela ordem cronológica que eram encaminhados ao Serviço de Transplante de Medula de Óssea do Hospital das Clínicas e foram alocados em cada grupo de acordo com uma ordem de alocação inicialmente estabelecida no estudo. Assim, acreditamos que este método de aleatorização foi apropriado, pois o “n” dos pacientes submetidos à TCTH por ano é geralmente pequeno.

Os dados deste trabalho podem também auxiliar no tratamento de pacientes com modificações do fluxo salivar, as quais geralmente estão associadas a condições como a Síndrome da Ardência Bucal, Síndrome de Sjgröen e Halitose.

CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

1. Embora não tenham sido observadas diferenças significativas entre os grupos de estimulação salivar e controle, a associação entre Hiperbolóide e TENS e o grupo do TENS, considerando-se principalmente os valores de saliva estimulada, mostraram tendência de manutenção do fluxo salivar nos pacientes submetidos ao TCTH. Além disto, os grupos dos TENS e TENS associado ao Hiperbolóide apresentaram tendência de aumento do fluxo salivar residual em repouso;
2. As terapias de estimulação salivar contribuíram para a não ocorrência de mucosite oral nos graus mais severos;
3. Maiores valores fluxo salivar em repouso e estimulado foram encontrados no grupo de pacientes que sobreviveram em relação ao grupo de pacientes que foram a óbito;
4. A não ocorrência de mucosite mostrou influência positiva na sobrevida dos pacientes;
5. O grupo TENS tendeu a apresentar uma redução dos níveis salivares de MMPs e aumento dos níveis de EGF. Esta tendência pode estar relacionada com a menor ocorrência de mucosite neste grupo de pacientes;
6. Pacientes com mucosite apresentaram um aumento significativo dos níveis de MMPs e EGF na saliva em relação ao grupo sem mucosite.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Al-Dasooqi N, Gibson RJ, Bowen JM, Keefe DM. Matrix metalloproteinases: key regulators in the pathogenesis of chemotherapy-induced mucositis? *Cancer Chemother Pharmacol*. 2009; 64(1):1-9.

Amerongen AV, Veerman EC. Saliva-the defender of the oral cavity. *Oral Dis*. 2002; 8(1):12-22.

Antuniassi AR. Ocorrência e grau de severidade da mucosite bucal em relação ao fluxo salivar de pacientes sob quimioterapia, 2005, 62f. Dissertação (Mestrado em Diagnóstico Bucal). Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, São Paulo.

Awidi A, Homsy U, Kakail RI, Mubarak A, Hassan A, Kelta M, Martinez P, Sulaiti S, Al Qady A, Jamhoury A, Daniel M, Charles C, Ambrose A, El-Aloosy AS. Double-blind, placebo-controlled cross-over study of oral pilocarpine for the prevention of chemotherapy-induced oral mucositis in adult patients with cancer. *Eur J Cancer*. 2001; 37(16):2010-2014.

Balicki R, Grabowska SZ, Citko A. Salivary epidermal growth factor in oral cavity cancer. *Oral Oncol*. 2005; 41(1):48-55.

Barasch A, Peterson DE. Risk factors for ulcerative oral mucositis in cancer patients: unanswered questions. *Oral Oncol*. 2003; 39(2):91-100.

Bensadoun RJ, Magné 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 Nov; 258(9):481-7.

Blomgren J, Jansson S, Rödger S, Birkhed D. Secretion rate from minor salivary glands in patients with malignant haematological diseases receiving chemotherapy-a pilot study. *Swed Dent J*. 2002; 26(2):75-80.

Brosky ME. The role of saliva in oral health: strategies for prevention and management of xerostomia. *J Support Oncol*. 2007; 5(5):215-225.

Chaushu G, Itzkovitz-Chaushu S, Yefenof E, Slavin S, Or R, Garfunkel AA. A longitudinal follow-up of salivary secretion in bone marrow transplant patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1995; 79(2):164-169.

Cheida AP. Hiperbolóide: Instrumento de mastigação, um estimulador periomiofuncional. 1ª edição. São Paulo: Ícone; 2004. 173p.

Clarkson J. Palifermin improves oral mucositis after high dose chemotherapy and radiotherapy plus stem cell transplantation in people with haematological cancers. *Cancer Treat Rev*. 2005; 31(5):413-416.

Conceição MD, Marocchio LS, Fagundes RL. Técnica de Sialometria para uso na prática clínica diária. *Rev. Assoc. Paul. Cir. Dent*. 2006; 60:350-304.

Coracin FL, Pizzigatti Correa ME, Camargo EE, Peterson DE, de Oliveira Santos A, Vigorito AC, Borba Oliveira G, de Brito Eid KA, Zulli R, De Souza CA. Major salivary gland damage in allogeneic hematopoietic progenitor cell transplantation assessed by scintigraphic method. *Bone Marrow Transplant*. 2006; 37(10):955-959.

Couriel D, Carpenter PA, Cutler C, Bolaños-Meade J, Treister NS, Gea-Banacloche J, Shaughnessy P, Hymes S, Kim S, Wayne AS, Chien JW, Neumann J, Mitchell S, Syrjala K, Moravec CK, Abramovitz L, Liebermann J, Berger A, Gerber L, Schubert M, Filipovich AH, Weisdorf D, Schubert MM, Shulman H, Schultz K, Mittelman B, Pavletic S, Vogelsang GB, Martin PJ, Lee SJ, Flowers ME. Ancillary therapy and supportive care of chronic graft-versus-host disease: national institutes of health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic Graft-versus-host disease: V. Ancillary Therapy and Supportive Care Working Group Report. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2006; 12(4):375-396.

Dib LL, Gonçalves RCC, Kowalski LP, Salvajoli JV. Abordagem multidisciplinar das complicações orais da radioterapia. *Revista APCD*. 2000; 54(5): 391-396.

Djuric M, Hillier-Kolarov V, Belic A, Jankovic L. Mucositis prevention by improved dental care in acute leukemia patients. *Support Care Cancer*. 2006; 14(2):137-146.

Dumbrigue HB, Sandow PL, Nguyen KT, Humphreys-Beher MG. Salivary epidermal growth factor levels decrease in patients receiving radiation therapy to the head and neck. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2000; 89(6):710-716.

Eckley CA, Rios LS, Rizzo LV. Estudo comparativo da concentração salivar do fator de crescimento epidérmico em indivíduos com laringite crônica por doença do refluxo gastroesofágica antes e após o tratamento: resultados preliminares. *Rev Bras Otorrinolaringol*. 2007; 73(2):156-160.

Elad S, Ackerstein A, Bitan M, Shapira MY, Resnick I, Gesundheit B, Cohen Y, Diss O, Barak D, Dray L, Or R. A prospective, double-blind phase II study evaluating the safety and efficacy of a topical histamine gel for the prophylaxis of oral mucositis in patients post hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2006; 37(8):757-762.

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(7):1531-1539.

Epstein JB, Gorsky M, Guglietta A, Le N, Sonis ST. The correlation between epidermal growth factor levels in saliva and the severity of oral mucositis during oropharyngeal radiation therapy. *Cancer*. 2000; 89(11):2258-2265.

Epstein JB, Schubert MM. Oral mucositis in myelosuppressive cancer therapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1999; 88(3):273-276.

Epstein JB, Silverman S Jr, Paggiarino DA, Crockett S, Schubert MM, Senzer NN, Lockhart PB, Gallagher MJ, Peterson DE, Leveque FG. Benzylamine HCl for prophylaxis of radiation-induced oral mucositis: results from a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Cancer*. 2001 Aug 15;92(4):875-85.

Epstein JB, Tsang AH, Warkentin D, Ship JA. The role of salivary function in modulating chemotherapy-induced oropharyngeal mucositis: a review of the literature. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2002; 94(1):39-44.

Fall-Dickson JM, Ramsay ES, Castro K, Woltz P, Sportés C. Oral mucositis-related oropharyngeal pain and correlative tumor necrosis factor-alpha expression in adult oncology patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Ther.* 2007; 29 Suppl:2547-2561.

Filicko J, Lazarus HM, Flomenberg N. Mucosal injury in patients undergoing hematopoietic progenitor cell transplantation: new approaches to prophylaxis and treatment. *Bone Marrow Transplant.* 2003; 31(1):1-10.

Gabriel DA, Shea T, Olajida O, Serody JS, Comeau. The effect of oral mucositis on morbidity and mortality in bone marrow transplant. *Semin Oncol.* 2003; 30(6 Suppl 18):76-83.

Gandemer V, Le Deley MC, Dollfus C, Auvrignon A, Bonnaure-Mallet M, Duval M, De Lumley L, Hartmann O, Mechinaud F, Sirvent N, Orbach D, Doireau V, Boutard P, Dalle JH, Reguerre Y, Pautard B, Aubier F, Schneider P, Suc A, Couillaut G, Schmitt C. Pain task force of the SFCE. Multicenter randomized trial of chewing gum for preventing oral mucositis in children receiving chemotherapy. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2007; 29(2):86-94.

Gratwohl A, Hermans J, Baldomero H, Tichelli A, Goldman JM, Gahrton G. Indications for haemopoietic precursor cell transplants in Europe. European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT) *Br J Haematol.* 1996; 92(1):35-43.

Hargitai IA, Sherman RG, Strother JM. The effects of electrostimulation on parotid saliva flow: a pilot study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2005; 99(3):316-320.

Herr AE, Hatch AV, Throckmorton DJ, Tran HM, Brennan JS, Giannobile WV, Singh AK. Microfluidic immunoassays as rapid saliva-based clinical diagnostics. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007; 104(13):5268-5273.

Holler E. Cytokines, viruses, and graft-versus-host disease. *Curr Opin Hematol.* 2002 Nov; 9(6):479-484.

Jensen SB, Pedersen AM, Reibel J, Nauntofte B. Xerostomia and hypofunction of the salivary glands in cancer therapy. *Support Care Cancer.* 2003; 11(4):207-225.

Jensen SB, Pedersen AM, Vissink A, Andersen E, Brown CG, Davies AN, Dutilh J, Fulton JS, Jankovic L, Lopes NN, Mello AL, Muniz LV, Murdoch-Kinch CA, Nair RG, Napeñas JJ, Nogueira-Rodrigues A, Saunders D, Stirling B, von Bültzingslöwen I, Weikel DS, Elting LS, Spijkervet FK, Brennan MT. A systematic review of salivary gland hypofunction and xerostomia induced by cancer therapies: prevalence, severity and impact on quality of life. *Support Care Cancer.* 2010; 18(8):1039-1060.

Karolewska E, Konopka T, Puppek M, Chybicka A, Mendak M. Antibacterial potential of saliva in children with leukemia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008; 105(6):739-744.

Keefe DM, Schubert MM, Elting LS, Sonis ST, Epstein JB, Raber-Durlacher JE, Migliorati CA, McGuire DB, Hutchins RD, Peterson DE. 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*. 2007; 109(5):820-831.

Khouri VY, Stracieri AB, Rodrigues MC, Moraes DA, Pieroni F, Simões BP, Voltarelli JC. Use of therapeutic laser for prevention and treatment of oral mucositis. *Braz Dent J*. 2009; 20(3):215-220.

Léger CS, Nevill TJ. CMAJ Hematopoietic stem cell transplantation: a primer for the primary care physician. 2004; 170(10):1569-1577.

Lockhart PB, Sonis ST. Alterations in the oral mucosa caused by chemotherapeutic agents. A histologic study. *J Dermatol Surg Oncol*. 1981; (12):1019-1025.

Longman LP, McCracken CF, Higham SM, Field EA. The clinical assessment of oral dryness is a significant predictor of salivary gland hypofunction. *Oral Dis*. 2000; 6(6):366-370.

Mäkelä M, Salo T, Uitto VJ, Larjava H. Matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) of the oral cavity: cellular origin and relationship to periodontal status. *J Dent Res*. 1994; 73(8):1397-1406.

Makhatadze NJ. Tumor necrosis factor locus: genetic organisation and biological implications. *Hum Immunol*. 1998; 59(9):571-579.

Malpani BL, Jaiswar RK, Samuel AM. Noninvasive scintigraphic method to quantify unstimulated secretions from individual salivary glands. *Auris Nasus Larynx*. 1999; 26(4):453-456.

McCarthy GM, Awde JD, Ghandi H, Vincent M, Kocha WI. Risk factors associated with mucositis in cancer patients receiving 5-fluorouracil. *Oral Oncol*. 1998; 34(6):484-490.

Meirovitz A, Kuten M, Billan S, Abdah-Bortnyak R, Sharon A, Peretz T, Sela M, Schaffer M, Barak V. Cytokines levels, severity of acute mucositis and the need of PEG tube installation during chemo-radiation for head and neck cancer: a prospective pilot study. *Radiat Oncol*. 2010; 25:5-16.

Melkos AB, Massenkeil G, Arnold R. Dental treatment prior to stem cell transplantation and its influence on the posttransplantation outcome. *Clin Oral Investig*. 2003; 7(2):113-115.

Min CK, Lee WY, Min DJ, Lee DG, Kim YJ, Park YH, Kim HJ, Lee S, Kim DW, Lee JW, Min WS, Kim CC. The kinetics of circulating cytokines including IL-6, TNF-alpha, IL-8 and IL-10 following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2001; 28(10):935-940.

Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol*. 2001; 19:683-765.

Morvan FO, Baroukh B, Ledoux D, Caruelle JP, Barritault D, Godeau G, Saffar JL. An engineered biopolymer prevents mucositis induced by 5-fluorouracil in hamsters. *Am J Pathol*. 2004 Feb; 164(2):739-746.

Mota AS, Souza BML, Rebouças AM, Almeida KC, Amaral TMP. Halitose Real: Resultado de um Hipossaliva Severa. Jornada Mineira de Estomatologia, XIII, Caxambu, Minas Gerais. Anais, 2006 caso clínico nº 24.

Moura SAB, Medeiros AMC, Costa FRH, Moraes PH, Oliveira Neto AS. Valor Diagnóstico da Saliva em Doenças Orais e Sistêmicas: Uma Revisão de Literatura. *Pesq Bras Odontoped Clin Integr.* 2007; 7(2):187-194.

Nagler RM, Nagler A. Sialometrical and sialochemical analysis of patients with chronic graft-versus-host disease-a prolonged study. *Cancer Invest.* 2003; 21(1):34-40.

Nauntofte B, Tenovuo JO, Lagerlöf F. Secreção e composição da saliva. In: Fejerskov O, Kidd E. *Cárie dentária: a doença e o seu tratamento clínico.* São Paulo. Livraria Santos; 2005. 786p.

Oliveira LGM, Freitas RK, Rodrigues AMR, Amaral TMP. Síndrome da Ardência Bucal: Jornada Mineira de Estomatologia, XIV, Uberlândia, Minas Gerais, Anais, 2007; p.10.

Ondrey FG, Dong G, Sunwoo J, Chen Z, Wolf JS, Crowl-Bancroft CV, Mukaida N, Van Waes C. Constitutive activation of transcription factors NF-(kappa)B, AP-1, and NF-IL6 in human head and neck squamous cell carcinoma cell lines that express pro-inflammatory and pro-angiogenic cytokines. *Mol Carcinog.* 1999 Oct; 26(2):119-129.

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

Pattani KM, McDuffie CM, Morgan M, Armstrong C, Nathan CO. Electrical stimulation of post-irradiated head and neck squamous cell carcinoma to improve xerostomia. *J La State Med Soc.* 2010; 162(1):21-25.

Porter SR, Scully C, Hegarty AM. An update of the etiology and management of xerostomia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004; 97(1):28-46.

Raber-Durlacher JE, Weijl NI, Abu Saris M, de Koning B, Zwinderman AH, Osanto S. Oral mucositis in patients treated with chemotherapy for solid tumors: a retrospective analysis of 150 cases. *Support Care Cancer.* 2000 Sep;8(5):366-371.

Raphael Junior A, Bacaltchuck BB, Jacobs ACP. Avaliação do fluxo salivar e da capacidade tampão em pacientes da clínica integrada. *Rev APCD.* 2005; 59(2):108-112.

Santos RB, Figueiredo MAS, Cherubini K, Krapf SMR. Uso de goma de mascar: um método eficiente e seguro para controlar a xerostomia? *Rev Fac Odont Passo Fundo.* 2001; 6(2):53-56.

Schubert MM, Izutsu KT. Iatrogenic causes of salivary gland dysfunction. *J Dent Res.* 1987; 66 Spec No:680-688.

Scully C, Epstein J, Sonis S. V. Oral mucositis: a challenging complication of radiotherapy, chemotherapy, and radiochemotherapy: part 1, pathogenesis and prophylaxis of mucositis. *Head Neck.* 2003; 25(12):1057-1070.

Scully C, Sonis S, Diz PD. Oral mucositis. *Oral Dis.* 2006; 12(3):229-241.

Shoval I, Kushner JA, Sukhu B, Wood R, Kiss T, Lawrence HP, Tenenbaum HC. The relationship between mouthrinse matrix metalloproteinases (MMP-1, 8, 13) and albumin levels with the degree of oral mucositis in allogeneic stem cell transplant patients. *Bone Marrow Transplant*. 2005; 36(1):33-38.

Silverman JRS. Oral cancer: complications of therapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1999; 88(2):122-126.

Sonis ST, Costa JW Jr, Evitts SM, Lindquist LE, Nicolson M. Effect of epidermal growth factor on ulcerative mucositis in hamsters that receive cancer chemotherapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1992; 74(6):749-755.

Sonis ST, Eilers JP, Epstein JB, LeVeque FG, Liggett WH Jr, Mulagha MT, Peterson DE, Rose AH, Schubert MM, Spijkervet FK, Wittes JP. Validation of a new scoring system for the assessment of clinical trial research of oral mucositis induced by radiation or chemotherapy. Mucositis Study Group. *Cancer*. 1999; 85(10):2103-2113.

Sonis ST, Elting LS, Keefe D, Peterson DE, Schubert M, Hauer-Jensen M, Bekele BN, Raber-Durlacher J, Donnelly JP, Rubenstein EB; Perspectives on cancer therapy-induced mucosal injury: pathogenesis, measurement, epidemiology, and consequences for patients. *Cancer*. 2004; 100(9 Suppl):1995-2025.

Sonis ST, Oster G, Fuchs H, Bellm L, Bradford WZ, Edelsberg J, Hayden V, Eilers J, Epstein JB, LeVeque FG, Miller C, Peterson DE, Schubert MM, Spijkervet FK, Horowitz M. Oral mucositis and the clinical and economic outcomes of hematopoietic stem-cell transplantation. *J Clin Oncol*. 2001; 19(8):2201-2205.

Sonis ST. Efficacy of palifermin (keratinocyte growth factor-1) in the amelioration of oral mucositis. *Core Evid*. 2010; 15(4):199-205.

Sonis ST. Mucositis as a biological process: a new hypothesis for the development of chemotherapy-induced stomatotoxicity. *Oral Oncol*. 1998; 34(1):39-43.

Sonis ST. The pathobiology of mucositis. *Nat Rev Cancer*. 2004; 4(4):277-284.

Stiff P. Mucositis associated with stem cell transplantation: current status and innovative approaches to management. *Bone Marrow Transplant*. 2001; 27 Suppl 2:S3-S11.

Storb R. Preparative regimens for patients with leukemias and severe aplastic anemia (overview): biological basis, experimental animal studies and clinical trials at the Fred Hutchinson Cancer Research Center. *Bone Marrow Transplant*. 1994; 14 Suppl 4:S1-S3.

Streckfus CF, Bigler LR. Saliva as a diagnostic fluid. *Oral Dis*. 2002; 8(2):69-76.

Strietzel FP, Martín-Granizo R, Fedele S, Lo Russo L, Mignogna M, Reichart PA, Wolff A. Electrostimulating device in the management of xerostomia. *Oral Dis*. 2007; 13(2):206-213.

Talal N, Quinn JH, Daniels TE. The clinical effects of electrostimulation on salivary function of Sjögren's syndrome patients. A placebo controlled study. *Rheumatol Int*. 1992; 12(2):43-45.

Tárzia O. Halitose: um desafio que tem cura. Rio de Janeiro: Epub; 2003. 240p.

Tse W, Laughlin MJ. Umbilical cord blood transplantation: a new alternative option. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2005:377-383.

Watanabe M, Asatsuma M, Ikui A, Ikeda M, Yamada Y, Nomura S, Igarashi A. Measurements of several metallic elements and matrix metalloproteinases (MMPs) in saliva from patients with taste disorder. *Chem Senses*. 2005; 30(2):121-125.

Wong DT. Salivary diagnostics powered by nanotechnologies, proteomics and genomics. *J Am Dent Assoc*. 2006; 137 (3):313-321.

Woo SB, Sonis ST, Monopoli MM, Sonis AL. A longitudinal study of oral ulcerative mucositis in bone marrow transplant recipients. *Cancer*. 1993 Sep 1; 72(5):1612-1617

World Health Organization. Handbook for reporting results of cancer treatment. Geneva. World Health Organization, 1979, 15-22.

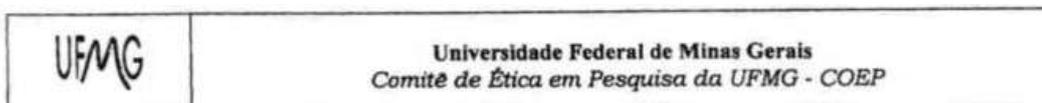
World Health Organization. Oral Health Surveys. Basic Methods, 4th ed. Geneva: World Health Organization, 1997.

ANEXOS

9 ANEXOS

ANEXO A

Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG



Parecer nº. ETIC 467/07

Interessado(a): Profa. Tarcilia Aparecida da Silva
Departamento de Clínica, Patologia e Cirurgia Odontológica
Faculdade de Odontologia-UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 25 de outubro de 2007, após atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado **"Efeitos de sialogogos mecânico e elétrico na estimulação do fluxo e na composição salivar de pacientes transplantados de células tronco hematopoiéticas"** bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.


Profa. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG

ANEXO B

Aprovação da Diretoria de Ensino, Pesquisa e Extensão do Hospital das Clínicas (DEPE)/HC



Universidade Federal de Minas Gerais
Hospital das Clínicas
Diretoria de Ensino, Pesquisa e Extensão - DEPE

UFMG

Belo Horizonte, 19 de dezembro de 2007.

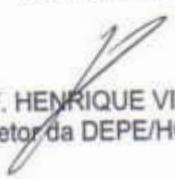
PROCESSO Nº 186/2007

TÍTULO: "EFEITOS DE SIALOGOGOS MECÂNICO E ELETRICO NA ESTIMULAÇÃO DO FLUXO E NA COMPOSIÇÃO SALIVAR DE PACIENTES TRANSPLANTADOS DE CÉLULAS TRONCO HEMATOPOIÉTICAS".

Sr(a) Pesquisador(a):

Reportando-nos ao projeto de pesquisa acima referenciado, considerando a aprovação pelo COEP/UFMG em 25/10/2007, e, seu de acordo no parecer da Comissão de Avaliação Econômico Financeiro de Projetos de Pesquisa/HC, esta Diretoria aprova seu desenvolvimento no âmbito institucional.
Solicitamos enviar à DEPE *relatório* parcial ou final, após um ano.

Atenciosamente,


PROF. HENRIQUE VITOR LEITE
Diretor da DEPE/HC-UFMG

À Sra.
Profa. Tarcília Aparecida da Silva
Depto. Clínica Médica, Patologia e Cirurgia Odontológica
Faculdade de Odontologia/UFMG

ANEXO C

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (para o paciente para TCTH)

Meu nome é Tânia Mara Pimenta Amaral e estou fazendo um estudo que tem o título Efeitos de Sialogogos Mecânico e Elétrico na Estimulação do Fluxo e na Composição Salivar de Pacientes Transplantados de Células Tronco Hematopoiéticas no meu doutorado na Faculdade de Odontologia da UFMG. Estou querendo saber se o tratamento que vou experimentar é bom para recuperar a saliva em pacientes que estão fazendo quimioterapia, antes do transplante de medula. Preciso de sua colaboração para verificar a quantidade de saliva que você tem antes e depois do tratamento que vamos fazer. Este tratamento é feito com uma borrachinha chamada Hiperbolóide, para mastigar 4 vezes ao dia, em qualquer lugar que você estiver.

A medida da saliva é rápida e fácil, não tem incômodo nem dor. Mastigar a borrachinha também não incomoda. Sua colaboração é muito importante. Você não pagará nada por este exame nem pelo tratamento. Você participa se quiser e se quiser, não terá nenhum prejuízo no tratamento que você já faz. Se você assinar concordando em participar e se arrepender, você pode desistir a qualquer momento. É só falar comigo. Seu nome não será identificado em nenhum momento.

Agradeço muito se você puder colaborar.

Se você ainda tiver alguma dúvida, pode procurar o Comitê de Ética da UFMG, Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Clínica, Patologia e Cirurgia Faculdade de Odontologia/UFMG, Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha, Belo Horizonte/MG - CEP - 31270-901, Tel: 55 31 3499-2478, 3241-3831 ou 8828-0321, para esclarecimentos.

Belo Horizonte, _____ de _____ de 200

Tânia Mara Pimenta Amaral

Eu, _____, declaro ter entendido como é e para que é este estudo. Sei que participo se quiser e se não quiser não terei nenhum prejuízo. Sei também que não pagarei nada por isto e posso desistir quando quiser. Sei que os dados coletados serão utilizados no estudo, mas meu nome não será identificado. Sei que a coleta de saliva não tem dor nem incômodo e o tratamento é simples e posso fazer em qualquer lugar. Sei que se tiver alguma dúvida, tenho onde me informar. Por isto, concordo em participar deste estudo.

_____, ____/____/____

Assinatura

(em duas vias, uma para o paciente e uma para o pesquisador)

ANEXO D

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TENS paciente para TCTH)

Meu nome é Tânia Mara Pimenta Amaral e estou fazendo um estudo que tem o título Efeitos de Sialogogos Mecânico e Elétrico na Estimulação do Fluxo e na Composição Salivar de Pacientes Transplantados de Células Tronco Hematopoiéticas no meu doutorado na Faculdade de Odontologia da UFMG. Estou querendo saber se o tratamento que vou experimentar é bom para recuperar a saliva em pacientes que estão fazendo quimioterapia, antes do transplante de medula. Preciso de sua colaboração para verificar a quantidade de saliva que você tem antes e depois do tratamento que vamos fazer. Você só vai precisar se tratar se tiver pouca saliva. Este tratamento é feito com um estimulador elétrico chamado TENS, duas vezes por semana, enquanto você estiver internado.

A medida da saliva é rápida e fácil, não tem incômodo nem dor. Mastigar a borrachinha também não incomoda. Sua colaboração é muito importante. Você não pagará nada por este exame nem pelo tratamento. Você participa se quiser e se quiser, não terá nenhum prejuízo no tratamento que você já faz. Se você assinar concordando em participar e se arrepender, você pode desistir a qualquer momento. É só falar comigo. Seu nome não será identificado em nenhum momento.

Agradeço muito se você puder colaborar.

Se você ainda tiver alguma dúvida, pode procurar o Comitê de Ética da UFMG, Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Clínica, Patologia e Cirurgia Faculdade de Odontologia/UFMG, Av. Antônio Carlos, 6627 - Pampulha, Belo Horizonte/MG - CEP: 31270-901, Tel.: 55 31 3499-2478, 3241-3831 ou 9979-2103, para esclarecimentos.

Belo Horizonte, _____ de _____ de 200

Tânia Mara Pimenta Amaral

Eu, _____, declaro ter entendido como é e para que é este estudo. Sei que participo se quiser e se não quiser não terei nenhum prejuízo. Sei também que não pagarei nada por isto e posso desistir quando quiser. Sei que os dados coletados serão utilizados no estudo, mas meu nome não será identificado. Sei que a coleta de saliva não tem dor nem incômodo e o tratamento é simples e será feito enquanto eu estiver internado. Sei que se tiver alguma dúvida, tenho onde me informar. Por isto, concordo em participar deste estudo.

_____, ____/____/____

Assinatura

(em duas vias, uma para o paciente e uma para o pesquisador)

ANEXO E
Ficha Clínica

Nome:

Data de Nascimento:

Idade:

Estado Civil:

Grau de Instrução:

Endereço:

Telefones de contato:

Doença de base:

Protocolo de TCTH (MEDICAMENTOS):

EXAME CLÍNICO:

GLÂNDULA SALIVAR:

Tamanho:	Normal _____	Aumentada _____
Presença de saliva na palpação:	Sim _____	Não _____
Presença de pus ou sangue na saliva:	Sim _____	Não _____

LÁBIOS:

Secos:	Sim _____	Não _____
Fissurados:	Sim _____	Não _____
Eritematoso:	Sim _____	Não _____
Ressecados:	Sim _____	Não _____

MUCOSA E LÍNGUA

Seca:	Sim: _____	Não _____
Eritematosa:	Sim _____	Não _____
Lobulada:	Sim _____	Não _____
Fissurada:	Sim _____	Não _____

PALATO DURO E MOLE _____

COMISSURA LABIAL E SOALHO DE BOCA _____

AVALIAÇÃO DE MUCOSITE:

Grau 0: ____ Grau 1: ____ Grau 2: ____ Grau 3: ____ Grau 4: ____

Dias:

/Datas:

D-7	D-5	D-3	D-1	D0	D+1	D+3	D+5
D+7	D+7	D+9	D+11	D+13	D+15	D+17	D+19
D+21	D+23	D+25	D+27	D+29	D+31		

SIALOMETRIAS

Sialometria Inicial:

Data:

Hora:

Em repouso:

Em estímulo:

Segunda Sialometria

Data: Hora:

Em repouso:

Em estímulo:

Terceira Sialometria

Data: Hora:

Em repouso:

Em estímulo:

Quarta Sialometria

Data: Hora:

Em repouso:

Em estímulo:

CONTROLE DA APLICAÇÃO DO TENS

Nome:

Data de Nascimento: Idade:

Estado Civil: Grau de Instrução:

Endereço:

Telefones de contato:

Motivo do tratamento quimioterápico:

Tipos de quimioterapia:

A) PRIMEIRA APLICAÇÃO

Data: Hora da aplicação:

B) SEGUNDA APLICAÇÃO

Data: Hora da aplicação:

C) TERCEIRA APLICAÇÃO

Data: Hora da aplicação:

C) QUARTA APLICAÇÃO

Data: Hora da aplicação:

ANEXO F

Caracterização dos pacientes considerando-se o grupo de terapia

Característica	Grupo de terapia			
	Controle n (%)	Hiperbolóide n (%)	TENS n (%)	TENS+Hiperbolóide. n (%)
Sexo				
Feminino	2 (25)	5 (50,0)	2 (22,2)	3 (37,5)
Masculino	6 (75)	5 (50,0)	7 (77,8)	5 (62,5)
Faixa etária				
16 a 39 anos	4 (50)	7 (70,0)	8 (88,9)	4 (50,0)
40 a 58 anos	4 (50)	3 (30,0)	1 (11,1)	4 (50,0)
Óbito				
Não	4 (50)	3 (30,0)	5 (55,6)	3 (37,5)
Sim	4 (50)	7 (70,0)	4 (44,4)	5 (62,5)
Mucosite				
Ausente	2 (25)	2 (20,0)	6 (66,7)	1 (12,5)
Presente	6 (75)	8 (80,0)	3 (33,3)	7 (87,5)
Grau da mucosite				
0	2 (25,0)	2 (20,0)	6 (66,7)	1 (12,5)
1	1 (12,5)	2 (20,0)	2 (22,0)	6 (75,0)
2	2 (25,0)	4 (40,0)	1 (11,1)	0 (0,0)
3	2 (25,0)	1 (10,0)	0 (0,0)	1 (12,5)
4	1 (12,5)	1 (10,0)	0 (0,0)	0 (0,0)