

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA ODONTOLÓGICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
CURSO DE ODONTOLOGIA

**Impacto da laserterapia de baixa potência em modelo de carcinogênese
oral induzido por 4-nitroquinolina-n-óxido (4-NQO) na língua de
camundongos**

José Ronildo Lins do Carmo Filho

Fortaleza
2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA ODONTOLÓGICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
CURSO DE ODONTOLOGIA

**Impacto da laserterapia de baixa potência em modelo de carcinogênese
oral induzido por 4-nitroquinolina-n-óxido (4-NQO) na língua de
camundongos**

Tese desenvolvida como um dos
pré-requisitos para conclusão de
Doutorado em Clínica Odontológica
do Programa de Pós-graduação em
Odontologia do Departamento de
Farmácia, Odontologia e
Enfermagem da Universidade
Federal do Ceará.

Área temática: Estomatopatologia

Orientador: Prof. Dr. Mário Rogério
Lima Mota.

Fortaleza
2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

D66i do Carmo Filho, José Ronildo Lins.
Impacto da laserterapia de baixa potência em modelo de carcinogênese oral induzido por 4-nitroquinolina-n-óxido (4-NQO) na língua de camundongos / José Ronildo Lins do Carmo Filho. – 2023.
77 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Fortaleza, 2023.

Orientação: Prof. Dr. Mário Rogério Lima Mota.

1. : laserterapia. 2. carcinoma de células escamosas. 3. 4-nitroquinolina-n-óxido. I. Título.

CDD 617.6

José Ronildo Lins do Carmo Filho

Impacto da laserterapia de baixa potência em modelo de carcinogênese oral induzido por 4-nitroquinolina-n-óxido (4-NQO) na língua de camundongos

Tese desenvolvida como um dos pré-requisitos para conclusão de Doutorado em Clínica Odontológica do Programa de Pós-graduação em Odontologia do Departamento de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará.

Defesa em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Mário Rogério Lima Mota (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof.^a Dra. Ana Paula Negreiros Nunes Alves
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Fabricio Bitu Sousa
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof.^a Dra. Thinali Sousa Dantas
Universidade Christus (UniChristus)

Prof.^a Dra. Carolina Rodrigues Teófilo
Universidade Christus (UniChristus)

Agradecimentos

Os sonhos, quando realizados sozinho, não fazem sentido. Por serem devidos, aqui vão rápidos e não esgotáveis agradecimentos a alguns daqueles que contribuíram, decisivamente, para a realização dessa etapa.

Inicialmente, agradeço a **Deus** por toda a infinita generosidade e misericórdia que tem tocado minha vida. Muitos milagres aconteceram para que o hoje fosse real. Todos os demais agradecimentos decorrerão deste primeiro.

Aos meus pais, **Simony e Ronildo**, por toda a paciência, zelo, amor e cuidado devotados a minha criação. Sei que os passos de hoje decorrem bastante dos primeiros, e foram vocês quem me ensinaram a andar. Eu nunca vou poder agradecer, de todo, o sacrifício de vocês por mim. Terei o exemplo de vocês para sempre na minha memória.

Aos meus irmãos, **Kélvio e Maria Clara**, por acreditarem nas diferenças que nos tornam um. Obrigado por compartilharem comigo o bem mais precioso de ser família.

Ao meu orientador **Prof. Mário Rogério Lima Mota**, pela oportunidade de conviver ao lado de um ser humano impecavelmente inteligente, simples e acessível, não medindo esforços para transmitir toda a sua sabedoria. Sou imensamente grato pela sua capacidade de compreender cada etapa minha ao longo desses anos e por direcionar o meu crescimento acadêmico da melhor forma possível.

À **Profa. Ana Paula Negreiros Nunes Alves**, exemplo de comprometimento, dedicação e competência em tudo o que se propõe a fazer. Agradeço imensamente pela atenção, cuidado, conselhos e conhecimentos compartilhados durante todo esse período. A senhora é um grande exemplo de ser humano em quem tenho orgulho de me espelhar.

Ao **Prof. Paulo Goberlânio**, exemplo de humildade e empatia. Obrigado por ter facilitado minha vida acadêmica de muitas maneiras. Serei sempre grato ao que você fez por mim.

Ao **Prof. Fabricio Bitu** e à **Profa. Karuza Maria Alves Pereira**, pelos ensinamentos acadêmicos, pela convivência leve, pela contribuição na

minha formação profissional e por transmitir tão grandiosamente o valor da docência e da pesquisa.

À todos os meus amigos do Laboratório de Patologia Bucodental, em especial **Thâmara, Sthefane, Farah e Elisa**, pela amizade sincera e por toda a ajuda e companheirismo ao longo de todas as fases dessa construção. Pessoas salvam pessoas. Vocês me salvaram inúmeras vezes.

Agradeço também ao **Pedro Henrique, Imaculada, Cássia, Amanda Freitas, Dayrine, João Eudes, Khalil, Juliana Mara, Iury e Marcela**, por termos compartilhado juntos esses anos de rotina intensa, pela amizade e experiências divididas.

Aos alunos de iniciação científica e monitoria, em especial **Vitória e Douglas**. Obrigado por acreditarem que eu conseguiria.

Ao **Núcleo de Estudos em Pacientes Especiais (NEPE)**, por, desde a graduação, semear em mim uma visão mais humana e inclusiva da Odontologia. Foi aqui que essa história começou.

À todos os funcionários da UFC, por serem essenciais ao funcionamento dos serviços da Universidade. Especialmente à **Sônia Loiola (Soninha)** (*in memoriam*). Pagaria um preço alto para dar boas risadas contigo novamente.

Ao **Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM)**, pela estrutura de excelência com a qual pude contar durante todo o período da minha pós-graduação.

Ao **Laboratório de Fisiofarmacologia da Inflamação**, da Universidade Estadual do Ceará. Em especial, à **Profa. Ana Maria** e a aluna de doutorado **Iásly**. Obrigado por terem aberto as portas e me ajudado de forma tão singela nessa etapa final.

À minhas amigas de graduação **Paula, Valquíria e Suzana**. Com vocês por perto, as dificuldades foram mais leves. Obrigado por não soltarem a minha mão.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**), pela concessão da bolsa de estudos.

Enfim, a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para que tudo isso fosse possível.

*“Estou certo de que verei, ainda
nesta vida, o Senhor Deus mostrar
sua bondade.” (Sl 27, 13)*

E tenho visto.

RESUMO

O carcinoma espinocelular de boca (CEC) é a neoplasia maligna mais comum da cavidade oral, correspondendo a aproximadamente 94% dos casos dessa região. O laser de baixa intensidade demonstra efeitos básicos anti-inflamatório, analgésico e de biomodulação, porém não é consenso na literatura seu papel em lesões malignas e desordens potencialmente malignas orais, bem como no microambiente tumoral. O objetivo desse trabalho foi avaliar a influência da laserterapia de baixa intensidade (LTBI) em modelo de carcinogênese oral induzida por 4-nitroquinolina-n-óxido (4-NQO). Para isso, 96 camundongos da linhagem swiss foram submetidos à aplicação tópica de 1% de 4-NQO em superfície do dorso lingual, diariamente, durante 20 semanas. Os animais foram divididos em oito grupos: um grupo controle negativo (GCN) que recebeu o diluente do 4-NQO (DMSO), um grupo controle positivo (GCP) com administração de 4-NQO 1%, e seis grupos experimentais (GT) submetidos à aplicação de 4-NQO 1% e tratados com LTBI [laser vermelho (LV) e infravermelho (LIV)]: começando na semana zero (GT1 com LV e GT4 com LIV), na décima segunda semana (GT2 com LV e GT5 com LIV) e na décima sexta semana (GT3 com LV e GT6 com LIV). Os animais foram eutanasiados ao fim das 20 semanas e as línguas foram removidas para processamento e confecção de lâminas histológicas para análise da presença e severidade das alterações celulares e arquiteturais das lesões (displásicas e neoplásicas), reações de imuno-histoquímica (Ciclina D1 e Ki-67), dosagens de mieloperoxidase (MPO), n-acetil- β -d-glicosaminidase (n-AG), malondialdeído (MDA), glutathiona reduzida (GSH), proteínas totais, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina 1 β (IL-1 β) e interleucina 6 (IL-6). Para todas as análises foi utilizado o software estatístico GraphPad Prism 5.0®, com nível de significância $p < 0,05$. O grupo que recebeu apenas 4-NQO apresentou aumento significativo da frequência de carcinoma ($p < 0,001$), aumento da expressão nuclear positiva para Ciclina D1 e Ki-67 ($p < 0,005$), além de aumento dos níveis de TNF- α , IL-1 β , IL-6, MPO, n-AG, MDA e proteínas totais ($p < 0,001$) quando comparados ao GCN; e todos os grupos tratados com laser, independente se vermelho ou infravermelho, apresentaram redução significativa desses parâmetros. Por fim, viu-se aumento dos níveis de glutathiona reduzida apenas nos grupos tratados com LIV quando comparados ao grupo 4-NQO ($p < 0,001$). Estes resultados evidenciam que a laserterapia de baixa potência (com laser vermelho e infravermelho) reduziu o desenvolvimento de tumores em modelo de carcinogênese oral induzido por 4-NQO na língua de camundongos, e este efeito foi acompanhado de uma redução da expressão de marcadores associados à proliferação e agressividade tumoral, redução de influxo de células inflamatórias, de citocinas associadas aos mecanismos de inflamação e carcinogênese (TNF- α , IL-1 β , IL-6), além de uma melhora no equilíbrio redox tecidual.

Palavras chave: laserterapia, carcinoma de células escamosas, 4-nitroquinolina-n-óxido.

ABSTRACT

Oral squamous cell carcinoma (CEC) is the most common malignant neoplasm of the oral cavity, corresponding to approximately 94% of cases in this region. Low-intensity laser demonstrates basic anti-inflammatory, analgesic and biomodulation effects, but there is no consensus in the literature regarding its role in oral malignant lesions and potentially malignant disorders, as well as in the tumor microenvironment. The objective of this work was to evaluate the influence of low-level laser therapy (LTBI) in a model of oral carcinogenesis induced by 4-nitroquinoline-n-oxide (4-NQO). For this, 96 Swiss mice were subjected to topical application of 1% 4-NQO on the surface of the lingual dorsum, daily, for 20 weeks. The animals were divided into eight groups: a negative control group (GCN) treated with 4-NQO diluent (DMSO), a positive control group (GCP) treated with 1% 4-NQO, and six experimental groups (GT) treated with 4-NQO 1% and co-treated with LTBI [red laser (LV) and infrared laser (LIV)]: starting at week zero (GT1 with LV and GT4 with LIV), at the twelfth week (GT2 with LV and GT5 with LIV) and in the sixteenth week (GT3 with LV and GT6 with LIV). The animals were euthanized after 20 weeks and the tongues were removed for processing and making histological slides for analysis of the presence and severity of cellular and architectural alterations of the lesions (dysplastic and neoplastic), immunohistochemical reactions (Ciclin D1 and Ki-67), myeloperoxidase (MPO), n-acetyl- β -d-glucosaminidase (n-AG), malondialdehyde (MDA), reduced glutathione (GSH), total proteins, tumor necrosis factor alpha (TNF- α), interleukin 1 β (IL-1 β) and interleukin 6 (IL-6). For all analyses, the statistical software GraphPad Prism 5.0® was used, with a significance level of $p < 0.05$. The group that received only 4-NQO showed a significant increase in the frequency of carcinoma ($p < 0.001$), an increase in the frequency (%) of positive expression for Cyclin D1 and Ki-67 ($p < 0.005$), in addition to increased levels of TNF- α , IL-1 β , IL-6, MPO, n-AG, MDA and total proteins ($p < 0.001$) when compared to GCN; and all groups treated with laser, regardless of whether red or infrared, showed a significant reduction in these parameters. Finally, there was an increase in reduced glutathione levels only in the groups treated with LIV when compared to the 4-NQO group ($p < 0.001$). These results show that low level laser therapy (with red and infrared laser) reduced the development of tumors in a model of oral carcinogenesis induced by 4-NQO in the tongue of mice, and this effect was accompanied by a reduction in the expression of markers associated with tumor proliferation and aggressiveness, reduced influx of inflammatory cells, cytokines associated with mechanisms of inflammation and carcinogenesis (TNF- α , IL-1 β , IL-6), in addition to an improvement in tissue redox balance.

Keywords: laser therapy, squamous cell carcinoma, 4-nitroquinoline-n-oxide (4-NQO).

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Esquema com grupos do estudo que receberam tratamento com laserterapia.....	33
Figura 2: Ilustração representativa do ponto de aplicação do 4-NQO na língua de camundongo.....	33
Figuras 3: Fotomicrografias do perfil celular e arquitetural do epitélio de dorso de língua de camundongos Swiss submetidos a modelo de carcinogênese por aplicação tópica de DMSO e 4-NQO.....	44
Figura 4: Fotomicrografias do perfil celular e arquitetural do epitélio de dorso de língua de camundongos Swiss submetidos a modelo de carcinogênese por aplicação tópica de 4-NQO e tratados com laser vermelho durante 20, 8 e 4 semanas.....	45
Figura 5: Fotomicrografias do perfil celular e arquitetural do epitélio de dorso de língua de camundongos Swiss submetidos a modelo de carcinogênese por aplicação tópica de 4-NQO e tratados com laser infravermelho durante 20, 8 e 4 semanas.....	46
Figura 6: Expressão imuno-histoquímica dos anticorpos Ciclina D1 (A) e Ki-67 (B) em amostras de língua submetidas a modelo de carcinogênese por 4-NQO e tratados por 4, 8 ou 20 semanas com laserterapia de baixa intensidade em comprimentos de onda vermelho e infravermelho.....	47
Figura 7: Fotomicrografias de reação por imuno-histoquímica para Ciclina D1 do epitélio de dorso de língua de camundongos Swiss submetidos à modelo de carcinogênese por aplicação tópica de 4-NQO e tratados com laser vermelho ou infravermelho durante 20, 8 e 4 semanas.....	48
Figura 8: Fotomicrografias de reação por imuno-histoquímica para Ki-67 do epitélio de dorso de língua de camundongos Swiss submetidos à modelo de carcinogênese por aplicação tópica de 4-NQO e tratados com laser vermelho ou infravermelho durante 20, 8 e 4 semanas.....	49
Figura 9: Níveis teciduais de MPO em amostras de língua submetidas a modelo de carcinogênese por 4-QNO e tratados por 4, 8 ou 20 semanas com laserterapia de baixa intensidade em comprimentos de onda vermelho e infravermelho.....	50

Figura 10: Níveis teciduais de n-AG em amostras de língua submetidas a modelo de carcinogênese por 4-QNO e tratados por 4, 8 ou 20 semanas com laserterapia de baixa intensidade em comprimentos de onda vermelho e infravermelho.....	51
Figura 11: Níveis teciduais de TNF- α em amostras de língua submetidas a modelo de carcinogênese por 4-QNO e tratados por 4, 8 ou 20 semanas com laserterapia de baixa intensidade em comprimentos de onda vermelho e infravermelho.....	52
Figura 12: Níveis teciduais de IL-1 β em amostras de língua submetidas a modelo de carcinogênese por 4-QNO e tratados por 4, 8 ou 20 semanas com laserterapia de baixa intensidade em comprimentos de onda vermelho e infravermelho.....	52
Figura 13: Níveis teciduais de IL-6 em amostras de língua submetidas a modelo de carcinogênese por 4-QNO e tratados por 4, 8 ou 20 semanas com laserterapia de baixa intensidade em comprimentos de onda vermelho e infravermelho.....	53
Figura 14: Níveis teciduais de Malondialdeído (MDA) em amostras de língua submetidas a modelo de carcinogênese por 4-QNO e tratados por 4, 8 ou 20 semanas com laserterapia de baixa intensidade em comprimentos de onda vermelho e infravermelho.....	54
Figura 15: Níveis teciduais de Glutathiona Reduzida (GSH) em amostras de língua submetidas a modelo de carcinogênese por 4-QNO e tratados por 4, 8 ou 20 semanas com laserterapia de baixa intensidade em comprimentos de onda vermelho e infravermelho.....	54
Figura 16: Níveis teciduais de Proteínas Totais em amostras de língua submetidas a modelo de carcinogênese por 4-QNO e tratados por 4, 8 ou 20 semanas com laserterapia de baixa intensidade em comprimentos de onda vermelho e infravermelho.....	55

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Critérios de arquitetura e citologia utilizados para classificação da displasia epitelial conforme a classificação da OMS 2005.....35

Quadro 2: Tipificação das alterações microscópicas das lesões em dorso de língua.....36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Avaliação histológica de língua submetidas a modelo de carcinogênese por 4-QNO e tratados por 4, 8 ou 20 semanas com laserterapia de baixa intensidade em comprimentos de onda vermelho e infravermelho.....42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4 – NQO	4 – Nitroquinolina – N - Óxido
4- HAQO	4- hidroxiaminoquinolina 1-óxido
ANOVA	Analysis of variance (análise de variância)
CCP	Neoplasias de cabeça e pescoço
CEC	Carcinoma de Células Escamosas Oral
CEUA	Comissão Ética no Uso de Animais
COX	Citocromo c-oxidase
DAB	5,5 diaminobenzidina tetrahidroclorada
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Etileno-Diamino Tetracético
ELISA	Elisa enzyme linked immunosorbent assays
EPM	Erro Padrão da Média
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FGF-2	Fator de Crescimento de Fibroblasto 2
FGFR-2	Receptor 2 do Fator de Crescimento de Fibroblastos
FGFR-3	Receptor 3 do Fator de Crescimento de Fibroblastos
Foxp3	Forkhead Box P3
GCN	Grupo Controle Negativo
GCP	Grupo Controle Positivo
GSH	Glutathione (glutathione reduzida)
GT1	Grupo Teste 1
GT2	Grupo Teste 2
GT3	Grupo Teste 3
GT4	Grupo Teste 4
GT5	Grupo Teste 5
GT6	Grupo Teste 6
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HE:	Hematoxylin eosin (hematoxilina-eosina)
HPV	Papiloma Vírus Humano
HTAB	Hexadecyltrimethylammonium (hexadeciltrimetilamonio)
IARC	Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer
IL – 1	Interleucina – 1
IL – 1 β	Interleucina – 1beta
IL – 2	Interleucina – 2
IL – 4	Interleucina – 4
IL – 6	Interleucina – 6
IL – 10	Interleucina – 10
INF – γ	Interferon – gama
LTBI	Laserterapia de baixa intensidade
LTs	Linfócitos T
MASCC	Multinational Association of Supportive Care in Cancer
MDA	Malondialdehyde (malanoaldeído)
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade

MMP-2	Matriz Metaloproteinase-2
MO	Mucosite oral
MPO	Mieloperoxidase
MT	Microambiente Tumoral
N-AG	N-acetil-beta-d-glicosaminidase
NF- κ B	Fator Nuclear Kappa B
NPDM	Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos
NO	Óxido Nítrico
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBM	Fotobiomodulação
PBS	Phosphate buffered saline (solução tampão de fosfato)
RPM	Rotações por minuto
SCC	Linhagens de células de câncer oral
TGF- β	Fator de Transformação do Crescimento Beta
TNF – α	Fator de Necrose Tumoral – alfa
UFC	Universidade Federal do Ceará

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1. Câncer de boca, carcinogênese oral e microambiente tumoral	16
2.2. Laser de baixa intensidade	21
2.3. Efeitos da laserterapia de baixa potência no câncer oral	24
3. JUSTIFICATIVA	29
4. OBJETIVOS E METAS	30
4.1. Objetivo geral	30
4.2. Objetivos específicos	30
5. METODOLOGIA	31
5.1. Animais, princípios éticos e cálculo amostral	31
5.2. Grupos de estudo	31
5.3. Protocolo de carcinogênese oral	33
5.4. Aplicação do laser de baixa intensidade	34
5.5. Análise microscópica das amostras	34
5.6. Confeção de bloco de Tissue Micro Array (TMA) e reações de imuno- histoquímica	36
5.7. Ensaio de quantificação de mieloperoxidase (MPO)	38
5.8. Ensaio de n-acetil-β-d-glicosaminidase (n-AG)	38
5.9. Dosagem de citocinas do sobrenadante do macerado das línguas – Ensaio de Imunoabsorção enzimática (ELISA)	39
5.10. Ensaio de Malondialdeído (MDA)	40
5.11. Ensaio de Glutathione Reduzida (GSH)	40
5.12. Determinação de Proteínas Totais	41
5.13. Análise estatística	41
6. RESULTADOS	42
6.1. Laserterapia de baixa intensidade (com laser vermelho e infravermelho) diminui a frequência de carcinoma de células escamosas em modelo de carcinogênese oral com 4- NQO	42
6.2. Laserterapia de baixa intensidade (com laser vermelho e infravermelho) diminui o percentual de marcação de células epiteliais para Ciclina D1 e Ki-67	47
6.3. Laserterapia de baixa intensidade (com laser vermelho e infravermelho) diminui os níveis de células inflamatórias em lesões malignas/potencialmente malignas em modelo de carcinogênese oral com 4-NQO	50
6.4. Laserterapia de baixa intensidade (com laser vermelho e infravermelho) diminui os níveis de citocinas inflamatórias em lesões malignas/potencialmente malignas em modelo de carcinogênese oral com 4-NQO	51
6.5. Laserterapia de baixa intensidade (com laser vermelho e infravermelho) altera os níveis de atividade antioxidante em lesões malignas/potencialmente malignas em modelo de carcinogênese oral cm 4-NQO	53
6.6. Laserterapia de baixa intensidade (com laser vermelho e infravermelho) diminui os níveis de proteínas totais em lesões malignas/potencialmente malignas em modelo de carcinogênese oral com 4-NQO	55
7. DISCUSSÃO	56
8. CONCLUSÃO	64
9. REFERÊNCIAS	65

1. INTRODUÇÃO

O carcinoma espinocelular (CEC) é a neoplasia maligna mais frequente da cavidade oral, com altas taxas de incidência, morbidade e mortalidade na população mundial ao longo dos anos (CHAMOLI et al., 2021). Essa neoplasia é causada por fatores extrínsecos, como tabaco, produtos químicos, radiação, e organismos infecciosos; e fatores intrínsecos, como mutações genéticas, alterações epigenéticas, desordem de hormônios e condições imunes. Esses fatores podem agir em conjunto ou em sequência para iniciar e promover as etapas da carcinogênese (SILVEIRA et al., 2019).

O tratamento do CEC é baseado principalmente em cirurgia, quimioterapia e radioterapia em diferentes combinações - tratamentos que produzem, ao mesmo tempo, efeitos colaterais graves que têm um impacto negativo na qualidade de vida dos pacientes (SILVEIRA et al., 2019).

Tornou-se amplamente evidente que terapias adjuntas para gerenciar as consequências dos protocolos terapêuticos para esses pacientes não são mais adiáveis e, portanto, muitos autores sugerem a possibilidade de investigar os potenciais efeitos benéficos da fotobiomodulação (PBM) em pacientes com carcinoma de células escamosas (ZECHA et al., 2016).

Fotobiomodulação é a aplicação de luz vermelha ou infravermelha com o intuito de restaurar e estimular processos fisiológicos e reparar danos causados por lesões ou doenças. A energia luminosa interage com o tecido e promove efeitos analgésicos, anti-inflamatórios e biomoduladores teciduais que podem auxiliar no processo de reparação tecidual. Além disso, é considerada uma terapia não invasiva, sem efeitos citotóxicos ou interação medicamentosa, possui fácil aplicação e boa aceitação pelos pacientes na prática clínica (ZADIK et al., 2019).

A “janela óptica” na qual a penetração efetiva da luz nos tecidos é maximizada está entre aproximadamente 600nm e 1200nm. A luz do laser de baixa energia produz efeitos fotoquímicos pelos quais penetra na mucosa sem superaquecer ou produzir efeitos colaterais. Os fótons emitidos atingem a membrana mitocondrial interna e a luz atua sobre a citocromo c-oxidase (COX) com a consequente produção de trifosfato de adenosina (ATP), espécies

reativas de oxigênio (EROs) e liberação de óxido nítrico (NO) (REZK-ALLAH et al., 2019).

Nos últimos anos tem havido um aumento no uso de fotobiomodulação com laser para o gerenciamento de efeitos adversos decorrentes dos tratamentos antineoplásicos, em especial a mucosite oral (MO). Com base em seus efeitos positivos já demonstrados na literatura, a *Multinational Association of Supportive Care in Cancer* (MASCC) e a *International Society of Oral Oncology* (ISOO) indicam o uso clínico da PBM para o manejo da MO. No entanto, devido ao número limitado de estudos clínicos que comprovam a segurança da aplicação em células tumorais, recomendam seu uso com cautela e longe dessas áreas (HANNA et al., 2020)

Pouco se sabe sobre a ação da laserterapia de baixa potência (LTBI) em células displásicas e neoplásicas. Estudos *in vitro* mostram resultados controversos, enquanto alguns demonstram efeitos inibitórios nas células tumorais, outros mostram efeitos estimuladores na progressão do tumor. No entanto, esses modelos revelam pouca semelhança com as condições fisiopatológicas de um organismo, além de interações celulares limitadas (GOMES HENRIQUES et al., 2014).

Até agora, apenas três estudos *in vivo* analisaram o efeito da LTBI em um modelo de carcinogênese oral. Os resultados obtidos foram divergentes, tendo um dos estudos mostrando aumento no grau de diferenciação tumoral (MONTEIRO et al., 2011), enquanto outro mostrou redução na incidência de carcinomas *in situ* e invasivos (OTTAVIANI et al., 2016), ao passo que um terceiro estudo mais recente não mostrou piora clínica e histológica de tumores irradiados (NECULQUEO et al., 2022). Como foram desenvolvidos em diferentes modelos experimentais, com diferentes parâmetros químicos cancerígenos e de irradiação, não é possível realizar uma comparação efetiva entre eles (HAMBLIN et al., 2011).

Portanto, considerando os benefícios da PBM no manejo da MO em pacientes com câncer de cabeça e pescoço e os resultados inconclusivos sobre os efeitos dessa terapia na displasia epitelial oral ou em células tumorais, este estudo teve como objetivo avaliar o efeito da LTBI com laser vermelho e infravermelho em um modelo de carcinogênese oral induzida por 4-NQO em camundongos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Câncer de boca, carcinogênese oral e microambiente tumoral

As estimativas mundiais a respeito dos cânceres de lábio e de cavidade oral reportam cerca de 15.100 novos casos por ano, correspondendo a um risco estimado de 10,30 casos novos a cada 100 mil homens e 3,83 a cada 100 mil mulheres (INCA, 2023). Dentre os tipos de neoplasias malignas que afetam a cavidade oral, o carcinoma espinocelular oral (CEC) constitui mais de 90% dos casos, apresentando altas taxas de morbimortalidade (TEIXEIRA et al., 2009). Vale destacar que a incidência do mesmo na América Latina foi de 19.898 novos casos em 2018 e 7.874 óbitos, configurando um grave problema de saúde no cenário global (FERLAY et al., 2018).

O CEC é uma neoplasia maligna caracterizada por proliferação incontrolada e disseminação de células anormais, que pode ser causada por fatores extrínsecos, como tabaco, produtos químicos, radiação, e organismos infecciosos; e fatores intrínsecos, como condições imunes e mutações genéticas. Trabalhos publicados previamente já demonstraram o álcool e o tabaco como os principais fatores de risco para o câncer de boca, e estes parecem ser os principais responsáveis pela desproporção entre a incidência do sexo masculino em relação ao sexo feminino. Além destes, a exposição solar excessiva sem a devida proteção ao longo dos anos constitui-se um considerável fator de risco para o câncer de boca, especialmente o de lábio (MONTERO et al., 2015).

Outros fatores etiológicos relacionados ao CECs são o HPV (*Human Papilloma Virus*), deficiências nutricionais, imunossupressão, exposição a riscos ocupacionais e certas condições hereditárias (CHI; NEVILLE, 2015). Estes fatores são descritos na literatura como tendo relação também com o desenvolvimento do CEC em pacientes jovens (menos de 45 anos de idade) que não se expuseram significativamente ao tabaco e/ou álcool (LIU et al., 2016).

No que diz respeito à terapêutica, essa neoplasia pode ser tratada por cirurgia, radiação, quimioterapia e imunoterapia, as quais podem ser realizadas individualmente ou em associação, dependendo da localização e do estágio clínico do tumor (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2015).

A carcinogênese é o processo de formação de uma neoplasia maligna, onde os estudos têm mostrado que ocorre em três estágios: iniciação, promoção e progressão. Durante esses estágios há um acúmulo de mutações no ácido desoxirribonucléico (DNA) celular, principalmente em genes que garantem a ordem dos eventos do ciclo de divisão celular, nos que reparam eventuais erros na replicação do material genético ou nos que promovem e mantêm o estado de diferenciação celular (BELIZÁRIO, 2002).

No processo de carcinogênese, alterações celulares e moleculares são as primeiras a ocorrer, como alterações no material genético que não são detectáveis por histopatologia convencional. O acúmulo dessas mudanças moleculares ao longo do tempo causa alterações celulares individuais que subsequentemente será massivo e poderá ser detectado histologicamente e, em seguida, quando o número de células alteradas é significativo, é possível observar alterações macroscópicas em áreas afetadas (RIVERA, 2012).

Já o microambiente tumoral (MAT) é definido como um ambiente complexo formado não só pelas células tumorais, mas também pelas células estromais, como macrófagos, linfócitos, células endoteliais, pericitos e fibroblastos, as quais são atraídas para este local e estão em constante interação entre si e com as células tumorais, através da liberação de citocinas. Somado a isso, temos ainda a presença da matriz extracelular, a qual pode interagir de diferentes maneiras com os componentes do MAT, dependendo da sua composição e das integrinas que essas células possuem. Além disso, durante a progressão tumoral, essa matriz vai sendo modificada e degradada, liberando outras citocinas que interagem diretamente no MAT (RAMOS et al., 2016).

Desde o início da formação do tumor, a partir das primeiras células alteradas e formação de desordens potencialmente malignas, passando pelo rompimento da membrana basal e invasão do tecido conjuntivo subjacente, entrada nos vasos sanguíneos e formação dos êmbolos tumorais, até o

preparo do nicho metastático e a presença de macrometástases, temos a participação das células estromais (ZADIK et al., 2019).

No CEC, assim como em outros tumores sólidos, no primeiro momento as células do estroma atuam impedindo o crescimento do tumor, induzindo essas células com pequenas alterações no DNA à apoptose. Entretanto, conforme as células tumorais vão adquirindo novas mutações e habilidade, as células estromais vão sendo ativadas de modo favorável ao tumor. No caso específico do CEC, conforme a desordem potencialmente maligna evolui, há um aumento na atividade angiogênica, produção de metaloproteinases da matriz e uma mudança no perfil das células inflamatórias, diminuindo a quantidade de células dendríticas, apoptose de linfócitos T CD8, e aumento de macrófagos e linfócitos T CD4 reguladores (CURRY et al., 2016).

Dentre as células imunes presentes no MAT, podemos destacar: os macrófagos e suas polarizações em M1 e M2; os linfócitos T (CD8, CD4 auxiliar e CD4 regulador), B e NK (natural killer); células supressoras de origem mielóide (MDSCs); neutrófilos e suas polarizações em N1 e N2. Já dentre as citocinas inflamatórias, temos, principalmente: TNF- α , IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, TGF- β . As citocinas inflamatórias liberadas pelas células presentes no MAT são extremamente importantes para a manutenção da intensa rede de comunicação celular do MAT e, conseqüentemente, as diferentes atividades do tumor (BALKWILL et al., 2012).

Em CEC, tanto as células tumorais quanto as células do estroma liberam inúmeras citocinas inflamatórias e aumentam a expressão de seus fatores de transcrição: STAT3 para a IL-6 e NFkB para IL-1 e TNF- α (FELLER et al., 2013). Alguns estudos têm revelado que IL-6 induz angiogênese e linfangiogênese, transição epitélio-mesênquima e resistência à quimioterapia (SILVEIRA et al., 2019) enquanto IL-1 promoveu *in vitro* transformação maligna de queratinócitos orais displásicos e estimulou células de CEC a secretar IL-6, IL-8 e a quimiocina CXCL1 (LEE et al., 2012); e TNF- α aumentou *in vitro* a união entre as células endoteliais e linhagens de células de CEC, provavelmente aumentando o potencial metastático deste tumor (SONG et al., 2012). TNF- α também está relacionado com angiogênese, crescimento e o fenótipo de células-tronco tumorais (LAI et al., 2016).

Pesquisas recentes têm mostrado que as células inflamatórias e suas citocinas afetam o comportamento migratório das células tumorais, levando alguns autores a acreditar que sejam as grandes responsáveis pelo início do processo de transição epitélio-mesênquima, através da ativação de diferentes fatores de transcrição, como o NFkB e STAT-3 (SMITH et al., 2013). Segundo Lai et al. (2016), os fatores de crescimento e as citocinas presentes no MAT se ligam aos seus receptores nas células tumorais e levam a ativação de fatores de transcrição que estão relacionados com os eventos migratórios das células. Sendo assim, os fatores de crescimento e as citocinas irão modular a dinâmica e o tipo de migração celular.

Existem diversos marcadores associados à progressão e agressividade tumoral, como Ki-67 e Ciclina D1 (SOBECKI et al., 2017). O primeiro é uma proteína nuclear importante na sinalização de divisão celular, estando associada à transcrição do RNA ribossomal, com propriedades importantes para a regulação do ciclo celular, sendo considerado um importante marcador para identificação de proliferação celular. É altamente expresso em diversos tipos de câncer e tem sido associado a marcador de caráter prognóstico, podendo ser indicativo para avaliação de proliferação de células tumorais e invasão (SOBECKI et al., 2017). Já a Ciclina D1 desempenha um papel crítico na transição entre as fases G1 e S do ciclo celular. A superexpressão da proteína e amplificação do gene da Ciclina D1 foram relatados em vários tumores humanos, incluindo CEC. A expressão aumentada dessa proteína é sinal de iminente transformação maligna (MANSY et al., 2020).

Quanto ao metabolismo celular, as células do câncer, quando expostas a condições adversas como hipóxia e limitação de nutrientes, necessitam adaptar-se por meio de mudanças moleculares que impactam na glicólise e funções mitocondriais (MARTINEZ-OUTSCHOORN et al., 2016). Dentro deste contexto, o estresse oxidativo – o desequilíbrio entre a produção e eliminação de espécies reativas - participa no controle da reprogramação metabólica das células do câncer e das demais células presentes no microambiente tumoral e essas vias metabólicas reprogramadas podem também alterar o equilíbrio redox (KIM, 2016).

O metabolismo energético celular alterado no câncer foi originalmente descrito por Otto Warburg, que observou que essas células optam por realizar a glicólise aeróbica mesmo na presença de oxigênio, enquanto as células normais oxidam a glicose total disponível nas mitocôndrias (GAUDE & FREZZA, 2016). Nesse processo, as células cancerígenas sofrem modificações para manter suas necessidades biossintéticas - aumento na produção de ATP e macromoléculas, bem como manutenção redox (NATH; CHAN, 2016). Alterações no metabolismo energético do tumor têm sido associadas à metástase, resistência ao tratamento e diminuição de sobrevida do paciente (DONG et al., 2017; SUN et al., 2017).

Pacientes com câncer bucal apresentam aumento da oxidação de DNA/proteínas e redução de antioxidantes na saliva (BAHAR et al., 2007), indicando um desequilíbrio na homeostase redox. Diversos marcadores de atividade antioxidante foram reduzidos no CCP (SUBAPRIYA et al., 2002; BANERJEE et al., 2017). Vários estudos indicam um aumento do estresse oxidativo em amostras de CCP e desordens potencialmente malignas (KORDE et al., 2011; BAI, 2014; BANERJEE et al., 2017).

O malondialdeído (MDA) é uma substância reativa ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), produto da peroxidação lipídica. O aumento desse processo indica elevação da produção de radicais livres, que podem desnaturar proteínas, alterar a estrutura de nucleotídeos e causar doenças inflamatórias. A produção excessiva de MDA contribui para o aumento da resposta inflamatória por ativação de citocinas pró-inflamatórias (LORENTE et al., 2013). Já a Glutathione reduzida (GSH) é um tripeptídeo presente nas células, que em sua forma reduzida age como antioxidante, mantendo os grupamentos tiólicos nas proteínas em estado reduzido. Seu aumento está comumente associado à recuperação do equilíbrio redox (LORENTE et al., 2013).

Apesar dos avanços, o entendimento do papel da resposta inflamatória sobre o prognóstico e o comportamento invasivo de células do CEC ainda é limitado. Estudos têm procurado compreender o processo de indução e progressão do câncer de boca em modelos animais. Existem diversos modelos experimentais de carcinogênese e o modelo químico de indução parece ser o mais próximo da realidade clínica, sendo o da aplicação de 4-nitroquinolina-n-óxido (4-NQO) o mais utilizado. Os modelos de

carcinogênese por administração do 4-NQO demonstram uma evolução clínica e histopatológica semelhante às fases observadas nos carcinomas de células escamosas em humanos, desde a fase de carcinoma *in situ* até o estágio bem diferenciado, seguindo a gradação histopatológica da Organização Mundial de Saúde (OMS) para o carcinoma de células escamosas (BARCESSAT et al., 2014).

O 4-NQO é uma quinolina que possui uma estrutura aromática heterocíclica de fórmula C_9H_7N que pode ser encontrada naturalmente no ambiente, mas é tipicamente fabricado para fins de pesquisa. O 4-NQO tem sua degradação no metabólito reduzido 4-hidroxi-aminoquinolina 1-óxido (4HAQO), e esse metabólito se liga covalentemente a macromoléculas celulares, como ácidos nucleicos e proteínas, causando dano ao material genético através da produção de espécies reativas de oxigênio (KANOJIA et al., 2006).

O modelo de indução com o 4-NQO costuma ser realizado com a administração da solução diluída em água ou através da fricção da solução na mucosa oral (TANG et al., 2004). Acredita-se que a administração através da fricção possa causar menos efeitos sistêmicos tóxicos indesejados em outras regiões do organismo, visto que a quantidade ingerida se torna menor. Além disso, é possível delimitar e prever as áreas afetadas pelo agente carcinógeno (BARCESSAT et al., 2014).

O tratamento do câncer de boca está associado a várias complicações: dermatite, xerostomia, ageusia, disfagia, odinofagia, edema em tecidos moles, cárie de radiação, trismo, osteorradionecrose e alterações inflamatórias da cavidade oral denominadas de mucosite, bem como outras. Uma das formas de tratamento para essa condição ulcerativa da mucosa oral é a aplicação local do laser de baixa intensidade, que atua promovendo um reparo tecidual por meio de um efeito bioestimulador (ZECHA et al., 2018).

2.2. Laserterapia de baixa intensidade

A laserterapia de baixa intensidade (LTBI, do inglês, *Low Level Laser Therapy*) é utilizada no intuito de promover alterações fotoquímicas nos

tecidos-alvo sem que ocorra perda estrutural (FREITAS et al., 2015). Essas alterações ocorrem devido à absorção pelo tecido alvo da luz emitida pela LTBI. As propriedades do laser como comprimento de onda, densidade de força (ou irradiância), densidade de energia ou fluência e potência determinam o quanto de luz poderá ser absorvida pelo tecido. Por outro lado, características da região como anatomia, fisiologia, patologia e óptica tecidual, bem como a idade e estado de saúde do paciente, são capazes de alterar a taxa de absorção da luz durante a terapia. Portanto, todos esses fatores citados anteriormente são cruciais na determinação da dose de energia a ser aplicada (BRANDÃO et al., 2018).

O laser é uma forma de radiação não-ionizante, altamente concentrada, que em contato com os diferentes tecidos resulta em efeitos térmicos, fotoquímicos e não-lineares. As diferenças em efeitos são resultantes da diferença dos meio-ativos, os quais determinam o comprimento de onda da radiação emitida. A radiação à laser é não invasiva e muito bem tolerada pelos tecidos (BOLTONG et al., 2015). Quando utilizada nos tecidos e nas células, a mesma não é baseada em aquecimento, ou seja, a energia dos fótons absorvidos não é transformada em calor, mas em efeitos fotoquímicos, fotofísicos e/ou fotobiológicos (FREITAS et al., 2015).

Os lasers de baixa potência utilizam o comprimento de onda entre 480nm a 780nm, sendo o intervalo 600-690nm correspondente ao vermelho (LV) e 780-830nm ao infravermelho (LIV). Quanto à energia da emissão laser, o LV é mais energético, por possuir menor comprimento de onda, por isso penetra menos no tecido, agindo mais superficialmente; enquanto LIV é menos energético, por possuir maior comprimento de onda, contudo penetra mais no tecido, agindo em profundidade (SILVEIRA et al., 2019).

Quando a luz interage com as células e tecidos na dose adequada, certas funções celulares podem ser estimuladas, como a ativação de linfócitos e mastócitos, o aumento na produção de ATP mitocondrial e a proliferação de vários tipos de células, promovendo, assim, efeitos anti-inflamatórios (PAGLIONI et al., 2019).

Quando aplicado, sabe-se que o laser inicia um processo que envolve a ativação de cromóforos endógenos provocando eventos fotofísicos e fotoquímicos com consequentes desfechos terapêuticos, os quais podem

incluir a modulação do processo inflamatório (alívio da dor, diminuição do edema e vermelhidão tecidual) e a aceleração do reparo de diferentes tecidos (aumento da proliferação e da migração celulares e da síntese de colágeno) (ZANIN et al., 2010).

Sugere-se que a irradiação do laser seja absorvida pelo citocromo-C oxidase na mitocôndria, fotoexcitando este cromóforo e gerando, conseqüentemente, um aumento na produção de adenosina trifosfato (ATP) (ZECHA et al., 2018). A luz é absorvida por moléculas do tecido alvo (cromóforos ou fotorreceptores) que possuam afinidade por determinado comprimento de onda e a absorção luminosa ocorre em âmbito atômico, onde os elétrons captam essa energia luminosa e partem para um estado excitado de energia. Esta energia é utilizada pelas células nas suas funções metabólicas e a energia luminosa é transformada em outro tipo de energia, a qual a célula é capaz de reconhecer e responder. Após as reações primárias de fotorrecepção, é desencadeada uma cascata de reações secundárias que ocorrem na ausência de luz e possuem papel amplificador das reações primárias (ZANIN et al., 2010).

Nesse contexto, estudos mostram que a fotobiomodulação com LTBI acelera a migração de queratinócitos e estimula a síntese de diferentes proteínas, acelerando o processo de reparo tecidual e qualificando propriedades biomecânicas teciduais (SOUZA et al., 2011). Também tem sido demonstrado que o LTBI é capaz de biomodular a expressão de cicloxigenase-2 (COX-2), fatores de necrose tumoral alfa (TNF- α), prostaglandina E2 (PG2) e interleucina 1-beta (IL-1 β), portanto afetando a resposta inflamatória em modelos animais (OLIVEIRA et al., 2017). Além disso, a LTBI está relacionada a efeitos positivos no manejo da mucosite oral ao promover o reparo tecidual e desencadear efeitos anti-inflamatórios (SILVEIRA et al., 2019)

Na prática clínica odontológica, a laserterapia de baixa intensidade já vem sendo bastante utilizada, apresentando efeitos positivos na cicatrização de feridas cirúrgicas, melhora de cicatrização em pacientes com osteonecrose dos maxilares, progresso no tratamento de parestesias do nervo alveolar inferior, dentre outros. Entretanto, os protocolos existentes na literatura ainda não são bem definidos e acabam divergindo no que diz

respeito à potência selecionada, quantidade de pontos escolhidos para aplicação, e tempo de utilização do laser (BRANDÃO et al., 2018).

Em pacientes oncológicos que estão sob regime de quimioterapia e/ou radioterapia, a laserterapia tem conhecida habilidade de melhorar significativamente a cicatrização de mucosites decorrentes do tratamento antineoplásico (DE OLIVEIRA et al., 2015).

A Associação Multinacional de Suporte ao Câncer recomenda o uso da terapia com laser de baixa intensidade (comprimento de onda até 660nm, potência de 40mW e uma energia tecidual de 2J/cm²) na prevenção da mucosite oral em pacientes que efetuaram transplante de células hematopoiéticas após condicionamento com quimioterapia de altas doses, com ou sem irradiação corporal total, e comprimento de onda até 820nm, potência de 60mW e uma energia tecidual de 4J/cm² nos casos de mucosite já instalada.

Apesar dos seus inúmeros efeitos biológicos positivos, ainda não é bem descrito na literatura a influência e segurança da LTBI em lesões malignas, desordens potencialmente malignas ou em áreas adjacentes, e de que maneira o laser de baixa intensidade pode influenciar e modificar o microambiente tumoral.

2.3. Efeitos da laserterapia de baixa potência no câncer oral

2.3.1. Estudos in vitro com impactos positivos da terapia com LTBI em linhagens de células de câncer oral (SCC).

Shaffer et al. (1997) e Sroka et al. (1999) analisaram os efeitos da terapia com LTBI em SCC humanas da mucosa gengival (ZMK e ZMK1). Com base nos resultados da coloração BrdU, ambos os estudos não observaram nenhuma alteração significativa no índice mitótico de células tumorais quando tratados com LTBI (lasers de 630nm, 635nm e 805 nm; 50–150 mW cm²; 20J cm²) em comparação com controles não tratados.

Schartinger et al. (2012) investigaram os efeitos da LTBI de 660nm na proliferação, distribuição do ciclo celular e apoptose em linhagens de células de carcinoma oral humano (SCC25), uma linhagem celular epitelial brônquica

não maligna e fibroblastos normais derivados do periodonto. Este estudo observou que os tratamentos com LTBI em irradiação de 0,39 a 63,7 mW cm² por 15 minutos resultou em proliferação de fibroblastos, mas reduziu a viabilidade celular de células epiteliais e SCC, observado com o ensaio MTT. Examinando o ciclo celular com análises de iodeto de propídio, os autores relataram uma porcentagem aumentada de células SCC em fase S que também demonstraram aumento da apoptose com coloração de anexina V.

Sperândio et al. (2013) examinaram separadamente os efeitos da terapia com LTBI de 660nm e 780nm em três linhagens de células, especificamente queratinócitos orais displásicos, SCC9 e SCC25. Os resultados mostraram diminuição da viabilidade celular em todas as três linhagens. Além disso, também foi observado que as expressões de Akt, HSP70, S6 e ciclina D1 foram significativamente moduladas por tratamentos com LTBI e correlacionadas com aumento da apoptose de células tumorais.

Outro estudo de Liang et al. (2015) examinou os efeitos de fotobiomodulação (810 nm) em uma linhagem celular de câncer oral humano (OC2) e células fibroblásticas gengivais humanas normais. A terapia com LTBI foi realizada em fluências variáveis de 0 a 60J cm² e observou-se que as células tumorais têm viabilidade reduzida, juntamente com uma contagem aumentada de células no grupo G1 e fases sub-G1 do ciclo celular. Além disso, a produção de EROs, redução da metaloproteinase da matriz (MMP) e aumento da apoptose mediada por caspase-3 foram evidentes em células OC2 tratadas com LTBI.

Em estudos subsequentes de Schalch et al. (2016) efeitos semelhantes foram observados com tratamentos de LTBI de 660nm e 780nm em células SCC9 a 4J cm², demonstrando a existência de viabilidade reduzida de células tumorais, aumento da apoptose e redução da migração celular.

2.3.2. Estudos in vitro com impactos negativos da terapia com LTBI em SCC.

Dois estudos de Pinheiro et al. (2002) e um de Werneck et al. (2005) utilizaram a linhagem celular HEp-2 e analisaram a proliferação celular usando o ensaio MTT. Esses estudos relataram a ocorrência de um aumento

significativo na proliferação celular após tratamentos com 635nm, 670nm, 685nm e 830nm em comparação com controles não tratados.

Uma resposta semelhante foi relatada por Kreisler et al. (2003) que usaram a LTBI com tratamentos de 809nm em células de carcinoma de laringe humano e avaliaram a proliferação usando o ensaio Alamar Blue.

Curiosamente, Castro et al. (2005) avaliaram a proliferação de células de carcinoma oral de linhagem KB tratadas com 685nm e 830nm e observaram aumento da proliferação de células tumorais com o ensaio MTT.

Finalmente, Henriques et al. (2014) usaram a LTBI com aplicação de 660nm de energia em uma linhagem celular de língua (SCC25) e observaram um aumento da proliferação de células tumorais. Eles realizaram análises do ciclo celular onde uma subpopulação celular predominante nas fases S e G2/M foi observada. Isso se correlacionou com achados de aumento de ciclina D1 e β -catenina e diminuição da expressão de MMP-9 que se correlacionou com um aumento do potencial invasivo dessas células tumorais.

2.3.3. Estudos *in vivo* utilizando LTBI em modelos de carcinogênese.

Três estudos *in vivo* (modelos animais) examinaram os efeitos da terapia com LTBI em tumores orais. Monteiro et al. (2011) avaliou o efeito da LTBI de 660nm no câncer induzido quimicamente [9,10-dimetil-1,2-benzantraceno/DMBA três vezes por semana durante oito semanas] da mucosa oral de hamsters sírios. Os animais foram tratados com LTBI (424 mW cm² por 133 segundos em dias alternados por quatro semanas, com um valor total de fluência de 56,4J cm² por sessão de tratamento. Enquanto os grupos tratados com LTBI demonstraram 40% de CEC bem diferenciado, 20% de CEC moderadamente diferenciado e 40% CEC indiferenciado, o grupo não tratado com LTBI demonstrou 80% de CEC bem diferenciado e 20% moderadamente diferenciados, com diferença estatisticamente significativa. Com base nessas observações, os autores concluíram que a terapia com LTBI pode promover uma progressão da gravidade do CEC *in vivo*.

Em contraste, Ottaviani et al. (2016) exploraram os efeitos da terapia com LTBI em várias células cultivadas e modelos *in vivo* de câncer. Entre eles,

um de seus estudos envolveu um modelo de CEC induzido por 4-NQO (16 semanas em água potável) em camundongos fêmeas C57BL/6. Um grupo desses animais foi tratado com LTBI (970 nm; 200 mW, por 30 segundos quatro vezes por semana durante quatro semanas; 6J cm²). O exame histopatológico demonstrou que a terapia com LTBI reduziu significativamente a incidência de lesões displásicas, bem como o número e a porcentagem de CECs *in situ* e invasivos nesses animais em comparação com os controles não tratados. Análises imuno-histoquímicas de amostras de tumor usando coloração de CD31 observaram padrões de vascularização tumoral mais regulares e estruturados. Com base nessas observações, os autores concluíram que a terapia com LTBI inibe a progressão do tumor.

Por fim, Neculqueo et al. (2022) avaliou os efeitos da LTBI em camundongos fêmeas C57BI/6 em modelo quimicamente induzido com 4-NQO diluído na água por 16 semanas. Na 18^a e 19^a semanas, laser de diodo com comprimento de onda de 660nm foi aplicado na língua dos animais por sete sessões (um grupo recebeu 1,5J de energia e outro grupo recebeu 9J de energia, ambos com potência de 100 mW). Os resultados evidenciaram que a LTBI, em ambos os parâmetros utilizados, não influencia nas características clínicas e histológicas de lesões de leucoplasia oral e CEC.

2.3.4. Estudos clínicos utilizando LTBI em pacientes com neoplasias de cabeça e pescoço (CCP).

A literatura relata apenas dois estudos clínicos que analisaram o impacto da terapia com LTBI utilizada para a prevenção de mucosite oral (MO) em pacientes com câncer de cabeça e pescoço.

Antunes et al. (2017) avaliaram retrospectivamente a sobrevida global, livre de doença e sem progressão de 94 pacientes com CCP submetidos à terapia com LTBI (660nm, 100 mW, 1J - 4J cm²) para prevenir MO. Seu estudo demonstrou que os pacientes que receberam fotobiomodulação tiveram uma resposta estatisticamente melhor ao tratamento, exibiram aumento na sobrevida livre de progressão e uma tendência de melhor sobrevida global quando comparados ao grupo placebo.

Brandão et al. (2018) examinaram os resultados da terapia do câncer e a incidência de recorrência do tumor em pacientes com CCP localmente avançado tratados com LTBI (660nm, 40 mW, 0,4J - 10J cm²) para MO. Os autores concluíram que o laser profilático não afetou os resultados do tratamento do câncer primário, recorrência, novos tumores primários ou sobrevida dos pacientes.

Nota-se que ainda existe uma importante preocupação em relação à segurança do uso de LTBI em tecidos moles pós-operatórios que podem conter células tumorais residuais. Isso é particularmente verdadeiro se levarmos em consideração o impacto fisiológico de proliferação celular causada por LTBI sobre as células não tumorais.

Dessa forma, temos que os achados acerca dos efeitos da LTBI no câncer oral (a partir de estudos *in vitro* e *in vivo*) são incongruentes, carecendo de mais estudos envolvendo a real resposta do laser na evolução dessas desordens e seus respectivos mecanismos de ação.

3. JUSTIFICATIVA

A laserterapia de baixa intensidade (LTBI) é uma modalidade terapêutica local, não invasiva, que possui ação analgésica e anti-inflamatória.

Existem poucos relatos científicos acerca dos efeitos da LTBI no processo de tumorigênese, e esses relatos são extremamente conflitantes. Somado a isso, os trabalhos pouco abordam as fases iniciais da carcinogênese e desordens potencialmente malignas, bem como não avaliam citocinas e mediadores inflamatórios envolvidos nessas etapas. Esses trabalhos também não costumam realizar diferenciação quanto ao tipo de laser aplicado, se vermelho ou infravermelho, dificultando a padronização dos resultados.

Portanto, permanece indefinido na literatura se a utilização da LTBI é um procedimento seguro para ser realizado em pacientes com efeitos adversos aos tratamentos das neoplasias de cabeça e pescoço. Em vista disso, propõe-se com esse trabalho investigar o efeito do laser de baixa intensidade no modelo de carcinogênese oral induzido pelo 4-NQO, com o objetivo de esclarecer o impacto da utilização da LTBI em regiões próximas ao tumor, e o seu comportamento em desordens potencialmente malignas e no microambiente tumoral.

4. PROPOSIÇÃO

4.1. Geral

4.1.1. Avaliar a influência da laserterapia de baixa potência em diferentes fases do modelo de carcinogênese oral induzida por 4-nitroquinolina-n-óxido (4-NQO) na língua de camundongos.

4.2. Específicos

4.2.1. Avaliar as alterações microscópicas em dorso lingual de camundongos submetidos ao modelo de carcinogênese por 4-NQO e tratados com laser vermelho/infravermelho durante iniciação, progressão tumoral e logo após estabelecimento do tumor.

4.2.2. Avaliar taxas de proliferação celular e agressividade (por meio de imuno-histoquímica com os marcadores Ciclina D1 e Ki-67) no epitélio de dorso lingual de camundongos submetidos ao modelo de carcinogênese por 4-NQO e tratados com laser vermelho e infravermelho durante iniciação, progressão tumoral e logo após estabelecimento do tumor.

4.2.3. Avaliar o perfil imuno-inflamatório por meio de dosagens de marcadores associados ao influxo de células inflamatórias (MPO e n-AG) e citocinas/ELISA (TNF- α , IL-6, IL-1 β) em dorso lingual de camundongos submetidos ao modelo de carcinogênese por 4-NQO e tratados com laser vermelho e infravermelho durante iniciação, progressão tumoral e logo após estabelecimento do tumor.

4.2.4. Avaliar o perfil oxidativo por meio de ensaio redox (MDA e GSH) em dorso lingual de camundongos submetidos ao modelo de carcinogênese por 4-NQO e tratados com laser vermelho e infravermelho durante iniciação, progressão tumoral e logo após estabelecimento do tumor.

4.2.5. Quantificar proteínas totais em dorso lingual de camundongos submetidos ao modelo de carcinogênese por 4-NQO e tratados com laser vermelho e infravermelho durante iniciação, progressão tumoral e logo após estabelecimento do tumor.

5. METODOLOGIA

5.1. Animais, princípios éticos e cálculo amostral

O presente estudo foi submetido e aceito (nº 25070622-0) na Comissão Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Ceará, estando de acordo com a Lei Federal nº 11.794 (2008) e o decreto número 6.689 (2009) que regulamentam a experimentação animal no país.

Fundamentado no princípio dos 3R (*reduction, replacement and refinement*) que norteiam as condutas éticas em animais e baseado no modelo de carcinogênese orofaríngea com 4-NQO de Tang et al. que em 2004 observou que animais tratados com solução 100µg/ml apresentaram maior frequência de tumores que animais tratados com uma subdose de 20µg/ml (100% versus 33%), estimou-se necessários 12 animais por grupo de estudo a fim de obter uma amostra que representasse 80% de poder e 95% de confiança (Método de Fleiss com correção de continuidade).

Um total de 96 camundongos Swiss (*Mus musculus*) machos com seis a oito semanas foram acondicionados no biotério de experimentação do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM) da referida universidade em temperatura média de 24°C, com ciclos de 12 horas de luz-escuro e acesso irrestrito a água e alimento. Os animais foram aleatorizados (comando aleatório - Microsoft Excel) em oito grupos de estudo conforme protocolo descrito adiante.

5.2. Grupos de estudo

Foram realizados oito grupos de estudo, cada um com 12 camundongos, distribuídos aleatoriamente em:

Grupo Controle Negativo (GCN): O GCN foi submetido ao modelo de carcinogênese oral utilizando apenas o veículo do 4-NQO (DMSO).

Grupo Controle Positivo (GCP): O GCP foi submetido ao modelo de carcinogênese oral por meio de aplicação tópica do 4-NQO a 1% diluído em DMSO, sem aplicação de laser.

Grupo Teste 1 (GT1): O GT1 foi submetido ao modelo de carcinogênese oral por meio de aplicação tópica do 4-NQO a 1% diluído em DMSO com aplicação de Laser Vermelho a partir da semana 0, a fim de avaliar sua influência durante o processo de iniciação.

Grupo Teste 2 (GT2): O GT2 foi submetido ao modelo de carcinogênese oral por meio de aplicação tópica do 4-NQO a 1% diluído em DMSO com aplicação de Laser Vermelho a partir da semana 12 do início do protocolo, com a finalidade de avaliar sua influência na progressão de lesões já iniciadas.

Grupo Teste 3 (GT3): O GT3 foi submetido ao modelo de carcinogênese oral por meio de aplicação tópica do 4-NQO a 1% diluído em DMSO com aplicação de Laser Vermelho a partir da semana 16 do início do protocolo de carcinogênese, com a finalidade de avaliar sua influência em lesões já iniciadas e tumores estabelecidos.

Grupo Teste 4 (GT4): O GT4 foi submetido ao modelo de carcinogênese oral por meio de aplicação tópica do 4-NQO a 1% diluído em DMSO com aplicação de Laser Infravermelho a partir da semana 0, a fim de avaliar sua influência durante o processo de iniciação.

Grupo Teste 5 (GT5): O GT5 foi submetido ao modelo de carcinogênese oral por meio de aplicação tópica do 4-NQO a 1% diluído em DMSO com aplicação de Laser Infravermelho a partir da semana 12 do início do protocolo, com a finalidade de avaliar sua influência na progressão de lesões já iniciadas.

Grupo Teste 6 (GT6): O GT6 foi submetido ao modelo de carcinogênese oral por meio de aplicação tópica do 4-NQO a 1% diluído em DMSO com aplicação de Laser Infravermelho a partir da semana 16 do início do protocolo de carcinogênese, com a finalidade de avaliar sua influência em lesões já iniciadas e tumores estabelecidos.

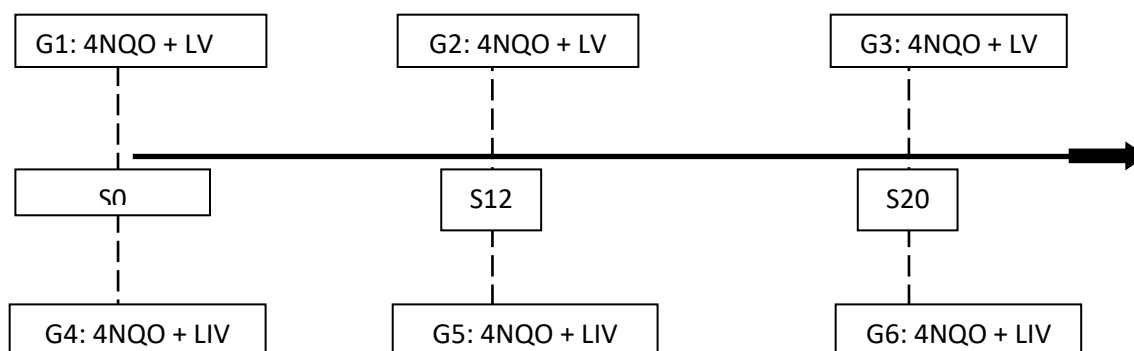


Figura 1: Esquema com grupos do estudo que receberam tratamento com laserterapia (S0 = semana zero; S12 = semana 12; S16 = semana 16; LV = Laser vermelho; LIV = Laser infravermelho).

5.3. Protocolo de carcinogênese oral

Uma solução 1% de 4NQO (GANNOT et al., 2004) dissolvida em propilenoglicol e DMSO a 4% (KAPLAN et al., 2002) foi aplicada topicamente no dorso lingual. A aplicação ocorreu diariamente, durante 20 semanas, conforme protocolos previamente descritos (BARCESSAT et al., 2014).

Os camundongos foram imobilizados a fim de obter a cavidade bucal aberta, e assim realizar a administração do 4-NQO por meio de microbrushes que foram pincelados levemente durante 10 segundos. Com a finalidade de padronização da região a ser pincelada, a parte central do terço médio da língua foi selecionada para receber a fricção com 4-NQO (figura 2).

Após 20 semanas, os camundongos foram eutanasiados com sobredose de anestésicos - xilazina (30mg/kg) e quetamina (300mg/kg) – por via endovenosa, para remoção das línguas e estruturas adjacentes.



Figura 2: Ilustração representativa do ponto de aplicação do 4-NQO na língua do camundongo. Fonte: elaborada pelo autor.

5.4. Aplicação do Laser de Baixa Intensidade

Um laser modelo Therapy XT (DMC, São Carlos, SP, Brasil) com 100 mW de potência de saída de luz, comprimento de onda contínuo de $660 \pm 10\text{nm}$ (vermelho) e $820 \pm 10\text{nm}$ (infravermelho) foi utilizado. O aparelho apresenta uma ponteira comum com área de $0,28\text{ mm}^2$, a qual, durante as aplicações do protocolo, foi mantida em contato leve com a área tratada. Os animais foram tratados diariamente, com intervalo de 4 horas após aplicação diária do 4-NQO. Foi utilizado 2J de luz vermelha e 4J de luz infravermelha (em 1 ponto), protocolo utilizado para regeneração tecidual durante quimioterapia (ZANIN et al., 2010). O laser foi aplicado diretamente no mesmo local que recebeu o pincelamento com 4-NQO. O tempo de tratamento por ponto foi ajustado de acordo com potência do laser para 20 segundos de aplicação de laser vermelho e 40 segundos de aplicação do laser infravermelho (protocolo utilizado para regeneração tecidual de mucosites em pacientes que fazem quimioterapia) (ZANIN et al., 2010).

5.5. Análise microscópica das amostras

Após eutanásia, as línguas dos animais e tecidos adjacentes foram excisados e fixados em formol 10% tamponado para avaliação microscópica. As línguas de metade dos animais de cada grupo ($n=6$) foram hemisseccionadas longitudinalmente, os fragmentos acomodados em cassetes histológicos para processamento através da desidratação (solução crescente de álcool) e diafanização (xilol) em processador automático (Luptec®). Posteriormente, os fragmentos foram emblocados em parafina fundida a $58-60^\circ\text{C}$. Após isso, os blocos de parafina foram submetidos a cortes de $3\mu\text{m}$, dispostos em lâminas de vidro com ponta fosca, as quais foram desparafinizadas em estufa (60°C) por uma hora, imersas em banhos de xilol, reidratadas (solução alcoólica decrescente), coradas com hematoxilina-eosina, desidratadas, diafanizadas e montadas com Enthellan®.

A partir daí, todas as lesões foram submetidas a diferentes métodos de avaliação histológica com o intuito de obter uma maior sensibilidade na avaliação. A análise das lesões foi realizada através da

classificação da Organização Mundial da Saúde, 2005, que verifica a presença de mudanças arquiteturais e citológicas no epitélio do dorso de língua (Quadro 1). Além disso, foi também adotado o sistema binário de classificação para displasias (KUJAN et al., 2006) sendo classificado em alto risco quando ocorreram 4 ou mais alterações arquiteturais e 5 ou mais alterações citológicas e baixo risco quando ocorreram menos de 4 alterações arquiteturais e menos de 5 alterações citológicas. Logo após, foi realizado o somatório das alterações histopatológicas, através da média encontrada dentro de cada grupo experimental.

Quadro 1: Critérios de arquitetura e citologia utilizados para classificação da displasia epitelial conforme a classificação da OMS 2005.

Alterações Arquiteturais	Alterações Celulares
Estratificação Epitelial Irregular	Anisonucleose de variação anormal
Perda de Polaridade das Células Basais	Pleomorfismo Nuclear
Cristas em forma de gota	Variação anormal na anisocitose
Aumento do número de figuras mitóticas	Razão citoplasmática nuclear aumentada
Figuras mitóticas anormalmente superficiais	Aumento do tamanho nuclear
Disceratose	Figuras mitóticas atípicas
Pérolas de Queratina	Aumento no número e tamanho dos nucléolos
	Hipercromasia

Fonte: Kujan et al., 2006.

Adicionalmente, as amostras dos tecidos das línguas foram avaliadas através da classificação adaptada por Anneroth; Hansen; Silverman, (1986) com intuito de mensurar a intensidade dos achados histopatológicos nos grupos:

Quadro 2: Tipificação das alterações microscópicas das lesões em dorso de língua

Alteração microscópica	Escore 0	Escore 1	Escore 2	Escore 3
Queratinização	Ausência de alteração	< 20%	20 e 50%	> 50
Pleomorfismo nuclear	Ausência de alteração	=25%	50%	>50%
Estágio de invasão	Ausência de alteração	Invasão questionável da lâmina própria	Micro invasão da lâmina própria	Invasão extensiva de tecidos adjacentes
Infiltrado inflamatório histiolinfoplasmocitário	Ausência de alteração	Leve	Moderada	Intenso

Fonte: Adaptado de ANNEROTH; HANSEN; SILVERMAN, 1986.

5.6. Confeção de bloco de Tissue Micro Array (TMA) e reações de imuno-histoquímica

Após a análise histológica e histomorfométrica, um microcampo de 4mm representativo da área de interesse (com maior gradação de tumor ou displasia) foi selecionado e marcado nas lâminas histológicas para posterior pareamento com o bloco e remoção da amostra usando o dispositivo Tissue Micro Arrayer®. Após isso, um bloco receptor contendo 15 poços de mesmo diâmetro e 3mm de profundidade recebeu as amostras de tecido parafinado, organizadas e mapeadas.

Após a colocação de todas as amostras no bloco receptor, o mesmo foi incubado por três minutos sobre uma lâmina de vidro em estufa a 65° e retirada em movimento rotacional com a finalidade de unir as amostras de tecido ao bloco receptor. Após resfriamento do bloco receptor em temperatura

ambiente, cortes de 3µm foram realizados e dispostos em lâminas silanizadas para reação de imuno-histoquímica (ANDRADE et al., 2007).

As lâminas silanizadas foram desparafinizadas em estufa por uma hora a 65°C, imersas em xilol, reidratadas em solução decrescente de álcool, lavadas em água corrente e submetidas à recuperação antigênica com solução 0,1M de citrato pH 6,0 em banho maria a 95°C por 40 minutos. Após resfriamento à temperatura ambiente os cortes foram lavados em solução tampão de fosfato 0,1M pH 7,3 (PBS) em dois banhos de cinco minutos cada e será realizado o bloqueio da peroxidase endógena com solução 3% de H₂O₂ (peróxido de hidrogênio) diluída em PBS por 30 minutos.

Após dois banhos de cinco minutos em PBS as lâminas foram incubadas com solução 1% de albumina para bloqueio de proteínas inespecíficas por uma hora. Após duas lavagens de cinco minutos em PBS as lâminas foram incubadas overnight com os seguintes anticorpos: anti-Ki-67 (MIB-1 - Dako®, 1:100) e anti-Ciclina D1(Dako®, 1:20).

No dia seguinte, após resfriamento em temperatura ambiente, os cortes foram lavados com dois banhos de cinco minutos de PBS, incubados com polímero anti-coelho/anti-rato Dako Envision Dual Link System HRP (Dako®) por uma hora. Após nova lavagem com dois banhos de cinco minutos de PBS, as lâminas foram incubadas com 3,3-diamino-benzidina (DAB) por 5 minutos. A reação foi parada com água destilada.

As lâminas foram contra-coradas com hematoxilina de Harris 7% por 10 segundos, lavadas em água corrente, desidratadas, diafanizadas e montadas com Enthellam® (HSU et al., 1981).

Após as reações, cinco microcampos da área tumoral ou displásica de cada lâmina foram selecionados em aumento de 400x. Para cada microcampo, foram contadas as células com imunomarcagem nuclear positiva para cada anticorpo utilizado. Através da soma da contagem dos 5 microcampos foi obtida uma média para cada lâmina (KIM et al., 2012).

5.7. Ensaio de quantificação de Mieloperoxidase (MPO)

Com a finalidade de avaliar o perfil neutrofílico, as línguas da outra metade dos animais de cada grupo (n=6) foram removidas e utilizadas para ensaio de MPO. Para a realização das dosagens, a fim de padronização das amostras, foi feita uma seleção do tecido da área específica que recebeu o pincelamento com 4-NQO e tratamento com laserterapia. A região central do terço médio da língua dos animais foi demarcada com punch dermatológico circular com 8mm de diâmetro e 2mm de profundidade (Rhosse®, ABC instrumentos cirúrgicos, Brasil). O tecido remanescente foi excisado utilizando lâmina nº 15 em cabo de bisturi de Bard Parker convencional (PETRELLIS et al., 2017).

As amostras foram acrescidas de 250µL de solução NaPO₄ 0,2M (ph = 4,7) para maceração em nitrogênio líquido. Depois da maceração, as amostras foram centrifugadas a 3000rpm por 15 minutos e o sobrenadante foi separado e imediatamente congelado em freezer -80°C. Aos pallets foi adicionado 1 ml de solução lisante (NaCl 0,2%) e mantida no agitador por 30 segundos. Posteriormente, as amostras foram novamente centrifugadas (3000rpm, 15minutos) e o sobrenadante foi descartado (LIMA JUNIOR et al., 2011). Adicionou-se 250µL de brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB) aos pallets e o homogenato foi macerado por 30 segundos a 4°C. Após a última maceração, a suspensão foi centrifugada a 10.000 rpm por 15 minutos para o plaqueamento.

Placas de 96 poços foram incubadas em duplicata com 25µL do homogenato e 25µL de diluente (3,3',5,5'-tetrametil-benzidina, H₂O₂, PBS) e a reação foi interrompida 5 minutos depois com ácido sulfúrico. As placas foram lidas em leitor de ELISA (450nm) e alterações de absorbância foram plotadas em uma curva padrão de neutrófilos e expressas em forma de neutrófilos/mg de tecido (WIMALAWANSA, S. J., 2010).

5.8. Ensaio de n-acetil-β-d-glicosaminidase (n-AG)

Para avaliar a quantificação de macrófagos, o conteúdo do macerado das línguas também foi utilizado para ensaio de n-AG. As amostras

foram acrescidas de 200µL de solução tampão de citrato 100 mM, 0.02% (m/v), albumina (pH 4.25, 1M NaOH, 25°C). Após a homogeneização a enzima n-AG foi adicionada a uma solução contendo p-nitrofenil-N-acetil-β-D-glicosaminida (Beta NAG ®) dissolvido em solução tampão de citrato de sódio 0,2mol/l (pH 4,4). A mistura resultante foi incubada a 37°C por 15 minutos para a hidrólise enzimática do substrato com liberação do íon p-nitrofenilato. A ação enzimática foi interrompida com a adição de solução tampão de Kolthoff 0,5mol/l (pH 10,25). As placas foram lidas em leitor de ELISA (405nm) e alterações de absorbância foram plotadas em uma curva padrão de macrófagos e expressos em pg/mg, conforme recomendação do fabricante (GONÇALVES et al., 2008) (Abcam, USA, 2018).

5.9. Dosagem de citocinas do sobrenadante do macerado das línguas – Ensaio de Imunoabsorção enzimática (ELISA)

Após análise dos dados do ensaio de mieloperoxidase e n-AG, o sobrenadante obtido da maceração das línguas foi utilizado para dosagem de mediadores inflamatórios associados à migração de células inflamatórias e processos carcinogênicos.

As concentrações de TNF-α, IL-1β e IL-6 foram determinadas por ELISA. As placas de microtitulação foram revestidas durante a noite a 4° C com os seguintes anticorpos de camundongo: anti-TNF-α, anti-IL-1β e anti-IL-6 (Dako®, 1: 1000, albumina de soro bovino) BSA 1%). Após lavagem (três vezes) e bloqueio das placas (BSA a 1%, 2h), as amostras (obtidas a partir do sobrenadante do ensaio de MPO e n-AG) foram incubadas à temperatura ambiente durante 1h. As placas foram lavadas três vezes com tampão, seguida de adição do anticorpo secundário policlonal (Sigma® 1: 1.000, BSA 1%).

Após incubação adicional à temperatura ambiente por 1h, as placas foram lavadas e 50 µl de avidina-HRP (Abcam®, 1: 5.000) foram adicionados. O reagente de cor o-fenilenodiamina (OPD; Biosystems®, 50 µl) foi adicionado 15 min depois, e as placas foram incubadas no escuro a 37°C por 45 min para o TNF-α e 20 min para IL-1β e IL-6. A reação enzimática foi terminada com H₂SO₄ e a absorvância foi medida a 490 nm. Os resultados são expressos em

pg/mg de tecido e são relatados como média $\pm$ EP em uma curva padrão de cada citocina avaliada (LIMA JÚNIOR et al., 2011).

5.10. Ensaio de Malondialdeído (MDA)

O macerado das línguas de metade dos animais (n=6/grupo) foi ainda utilizado para um ensaio de atividade de estresse oxidativo. O mesmo foi homogeneizado em tampão KCl (1,15%) (100mg de tecido/1ml). Em seguida, as amostras foram centrifugadas (4.500 rpm, 15 minutos). Adicionou-se 100 μ L de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 7% aos tubos Eppendorf e os tubos foram incubados em banho-maria (37°C, 30min).

Adicionou-se ácido tiobarbitúrico 0,6% (200 μ L) e as amostras foram colocadas em banho-maria a 100°C por 50min. Após resfriamento em gelo (5min), foi adicionado 100 μ L de n-butanol, agitado no vórtex (30s) e centrifugado por 20 min (5.000 rpm, 4°C).

O sobrenadante das amostras (200 μ L) foi pipetado em placas de microtitulação, e a absorbância foi medida a 535 nm. Os resultados foram expressos como nmol/mg de tecido e reportados como média $\pm$ EP (MARTINS et al., 2016).

5.11. Ensaio de Glutathiona Reduzida (GSH)

O mesmo macerado foi também utilizado para realização de um ensaio de glutathiona. As amostras foram homogeneizadas em tampão EDTA 0,02M (100mg de tecido/ml). Em seguida, foram transferidos 100 μ L do homogeneizado para diferentes tubos Eppendorf, adicionado 80 μ L de H₂O e 20 μ L de ácido tricloroacético a 50% e agitado no vórtex (30s). A amostra foi centrifugada (3.000 rpm, 15 minutos) e 100 μ L de sobrenadante foram transferidos para outros tubos Eppendorf juntamente com 10 μ L de 0,4 M Tris-EDTA (pH = 8,9) e 10 μ L de 0,01 M DTNB (ácido 5',5'-ditio-bis (ácido 2-nitrobenzóico)) e agitado em vórtex (40s).

A mistura (200 μ L) foi pipetada em placas de microtitulação e a absorbância foi medida a 412nm. Os resultados são expressos em pg de GSH/g de tecido e são relatados como a média $\pm$ EP (MARTINS et al., 2016).

5.12. Determinação de Proteínas Totais

A determinação de proteínas totais foi mensurada diretamente do sobrenadante dos homogenatos de tecidos (n=6/grupo). Para a análise o protocolo descrito por Bradford foi adaptado para ser executado em cubetas de vidro e posteriormente a leitura foi realizada em espectrofotômetro.

Foram colocados 2 μ L de amostra (obtidas a partir da extração de proteínas) juntos de 38 μ L de tampão fosfato de sódio (pH 7,4). Após esse procedimento, foi adicionado a cada cubeta 200 μ L da solução diluída do corante Comassie Brilliant Blue G250 (1:4 de água destilada). Após adição do corante, as amostras reagiram durante 5 minutos e foi medida a absorbância através de leitura em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 595 nm. As absorbâncias foram gravadas e os dados expressos em μ g/ml. A curva padrão foi estabelecida através do uso de Albumina Bovina (Concentração de 0,8%; 8mg/40ml) (BRADFORD, 1976).

5.13. Análise estatística

As dosagens foram expressas em forma de média e erro padrão da média, submetidas ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk e comparados por meio do teste ANOVA/Bonferroni (dados paramétricos) e os dados histológicos foram expressos em forma de frequência percentual e comparados por meio dos testes exato de Fisher ou qui-quadrado de Pearson. Todas as análises foram realizadas no GraphPad Prism 5.0 adotando uma confiança de 95%.

6. RESULTADOS

6.1. *Laserterapia de baixa intensidade (com laser vermelho e infravermelho) diminui a frequência de carcinoma de células escamosas em modelo de carcinogênese oral com 4-NQO*

O grupo que recebeu administração de 4-NQO apresentou aumento significativo da frequência de carcinoma (67%) ($p < 0,001$) e todos os grupos tratados com laser, independente se vermelho ou infravermelho, apresentaram redução significativa desse parâmetro (0-33%), apresentando maior frequência de displasia moderada (50-83%) ou de baixo risco (50-83%), respectivamente.

Com relação à classificação de Anneroth o grupo tratado com 4-NQO apresentou aumento significativo da frequência de ceratinização intensa (67%) ($p = 0,008$), pleomorfismo nuclear moderado (67%) ($p < 0,001$) e infiltrado inflamatório moderado (83%) ($p < 0,001$). Todos os grupos tratados com laser, independente se vermelho ou infravermelho, apresentaram redução significativa desses parâmetros com menor frequência de ceratinização intensa (0-17%), pleomorfismo nuclear leve (50-83%) e infiltrado inflamatório leve (83-100%). Não houve diferença significativa nos padrões de invasão entre os grupos ($p = 0,129$) (tabela 1).

Tabela 1: Avaliação histológica de língua submetidas a modelo de carcinogênese por 4-QNO e tratados por 4, 8 ou 20 semanas com laserterapia de baixa intensidade em comprimentos de onda vermelho e infravermelho.

		4NQO							
			Red	Infrared	Red	Infrared	Red	Infrared	
		No	Light	Light	Light	Light	Light	Light	
	DMSO	light	(4w)	(4w)	(8w)	(8w)	(20w)	(20w)	p-Valor
Classificação OMS									
Sem alterações	100%*	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	<0,001
Displasia moderada	0%	0%	50%*	67%*	50%*	50%*	83%*	67%*	
Displasia severa	0%	33%	17%	17%	50%	17%	17%	17%	
Carcinoma in situ	0%	0%	0%	17%	0%	17%	0%	0%	
Carcinoma	0%	67%*	33%	0%	0%	17%	0%	17%	

Classificação binário

Sem alterações	100%*	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	<0,001
Displasia baixo risco	0%	0%	50%*	67%*	67%*	50%*	83%*	83%*	
Displasia alto risco	0%	33%	17%	17%	33%	17%	17%	0%	
Carcinoma in situ	0%	0%	0%	17%	0%	17%	0%	0%	
Carcinoma	0%	67%*	33%	0%	0%	17%	0%	17%	

Anneroth**Grau ceratinização**

Ausente	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0,008
Leve	100%*	0%	67%*	67%*	67%*	50%*	67%*	67%*	
Moderado	0%	33%	33%	33%	33%	33%	33%	33%	
Intenso	0%	67%*	0%	0%	0%	17%	0%	0%	

Pleomorfismo nuclear

Ausente	100%*	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	<0,001
Leve	0%	0%	50%*	67%*	67%*	50%*	83%*	67%*	
Moderado	0%	67%*	50%	33%	33%	33%	17%	33%	
Intenso	0%	33%	0%	0%	0%	17%	0%	0%	

Padrão invasão

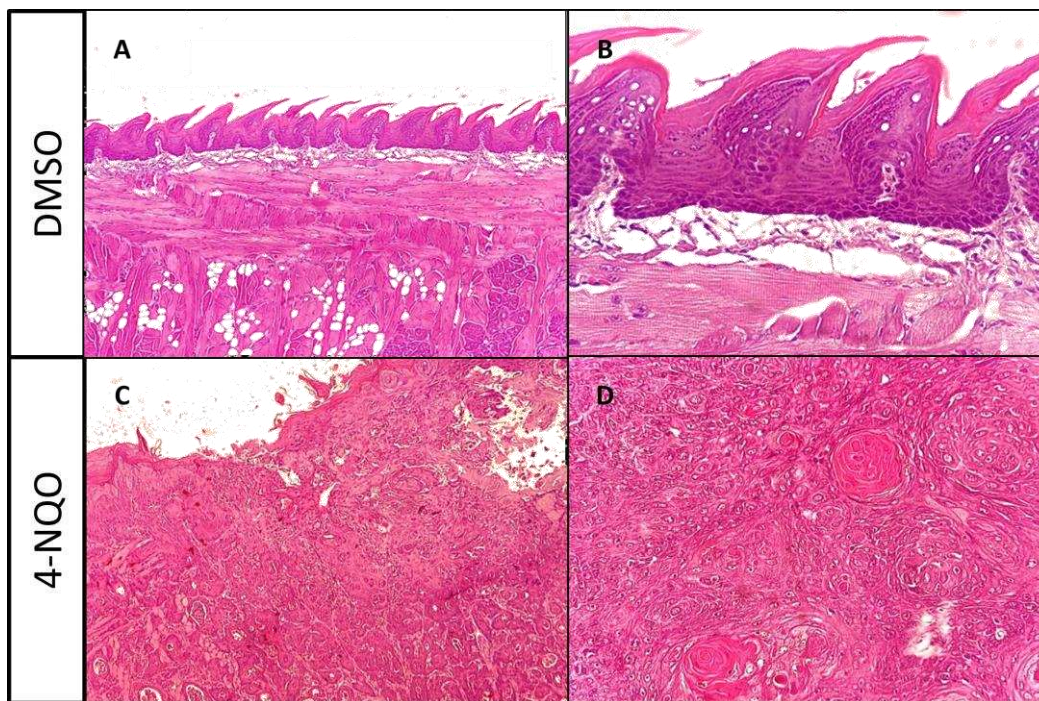
Ausente	100%	33%	67%	100%	100%	67%	100%	83%	0,129
Leve	0%	50%	33%	0%	0%	33%	0%	17%	
Intenso	0%	17%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	

Infiltrado inflamatório

Ausente	83%*	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	<0,001
Leve	17%	0%	83%*	100%*	100%*	83%*	100%*	100%*	
Moderado	0%	83%*	17%	0%	0%	17%	0%	0%	
Intenso	0%	17%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	

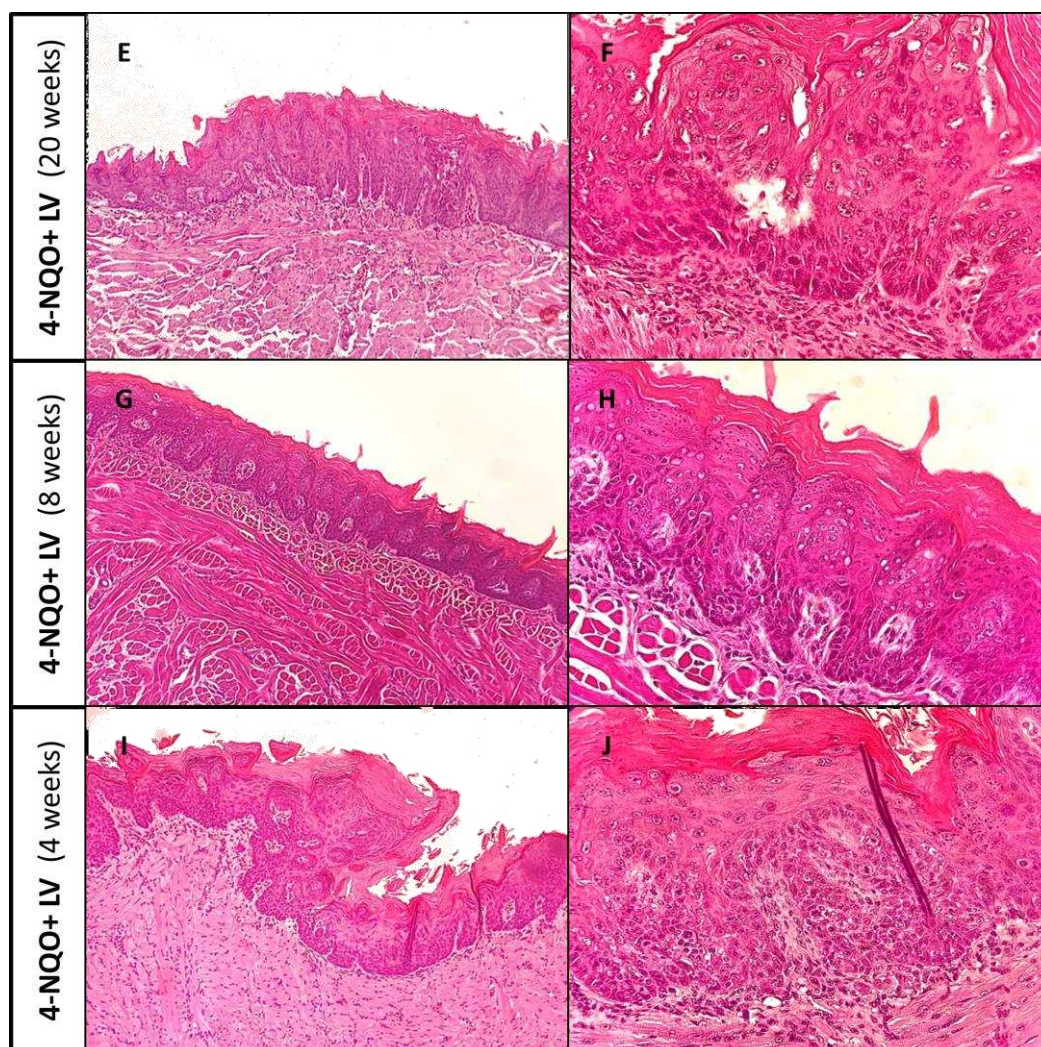
*p<0,05, teste exato de Fisher ou qui-quadrado de Pearson (n, %).

Figura 3: Fotomicrografias do perfil celular e arquitetural do epitélio de dorso de língua de camundongos Swiss submetidos à modelo de carcinogênese por aplicação tópica de DMSO e 4-NQO.



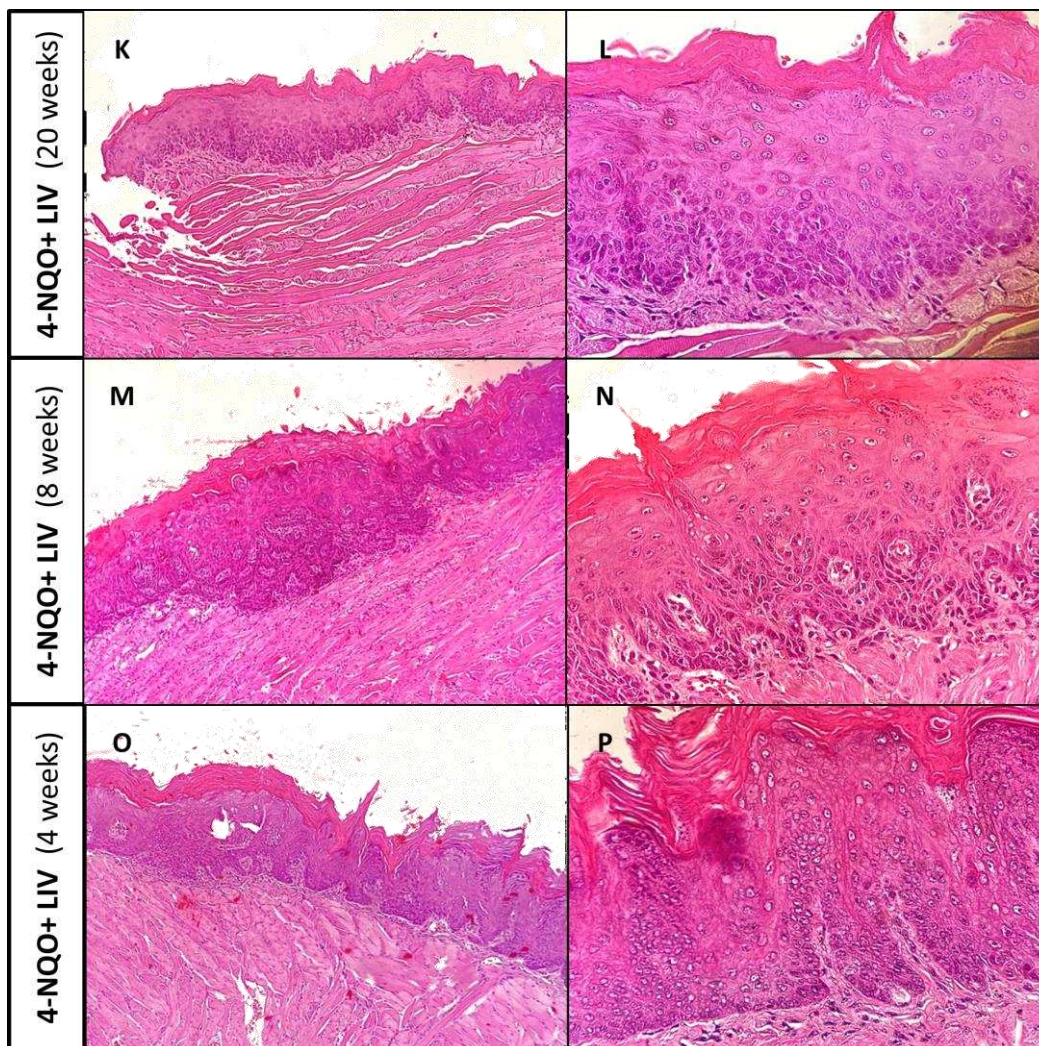
(A-B) GCN = grupo controle negativo; (C-D) GCP = grupo controle positivo 4-NQO; (200x e 400x, HematoxilinaEosina). Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 4: Fotomicrografias do perfil celular e arquitetural do epitélio de dorso de língua de camundongos Swiss submetidos à modelo de carcinogênese por aplicação tópica de 4-NQO e tratados com laser vermelho durante 20, 8 e 4 semanas.



(E-F) 4-NQO + Laser Vermelho por 20 semanas; (G-H) 4-NQO + Laser Vermelho por 8 semanas; (I-J) 4-NQO + Laser Vermelho por 4 semanas. (200x e 400x, HematoxilinaEosina).
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 5: Fotomicrografias do perfil celular e arquitetural do epitélio de dorso de língua de camundongos Swiss submetidos à modelo de carcinogênese por aplicação tópica de 4-NQO e tratados com laser infravermelho durante 20, 8 e 4 semanas.



(K-L) 4-NQO + Laser Infravermelho por 20 semanas; (M-N) 4-NQO + Laser Infravermelho por 08 semanas; (O-P) 4-NQO + Laser Infravermelho por 04 semanas. (200x e 400x, HematoxilinaEosina). Fonte: Elaborada pelo autor.

6.2. *Laserterapia de baixa intensidade (com laser vermelho e infravermelho) diminui o percentual de marcação de células epiteliais para Ciclina D1 e Ki-67.*

O grupo que recebeu administração de 4-NQO apresentou aumento significativo da imunoposição positiva de células epiteliais para Ciclina D1 ($90,33 \pm 10,88$) ($p < 0,005$) e todos os grupos tratados com laser, independente se vermelho ou infravermelho, apresentaram redução dessa imunomarcacão em relação ao grupo 4-NQO. Além disso, os grupos que receberam tratamento com LV ($55,83 \pm 6,01$) e LIV ($58,33 \pm 4,07$) por 20 semanas apresentaram uma redução maior da imunoposição de Ciclina D1 em relação aos demais grupos tratados com laser ($p < 0,005$) (figura 6).

Quando avaliado positividade para Ki-67, o grupo que recebeu administração de 4-NQO apresentou aumento significativo da imunoposição positiva de células epiteliais para Ki-67 ($10,83 \pm 4,51$) ($p < 0,005$) e todos os grupos tratados com laser, independente se vermelho ou infravermelho, apresentaram redução dessa imunomarcacão. Além disso, os grupos que receberam tratamento com LV e LIV por 20 ($4,11 \pm 2,12/4,18 \pm 2,75$) e 8 ($4,39 \pm 2,90/4,50 \pm 2,81$) semanas apresentaram uma redução maior da imunoposição de Ki-67 em relação aos grupos tratados por apenas 4 semanas ($6,38 \pm 3,22/6,51 \pm 3,89$) ($p < 0,005$) (figura 6).

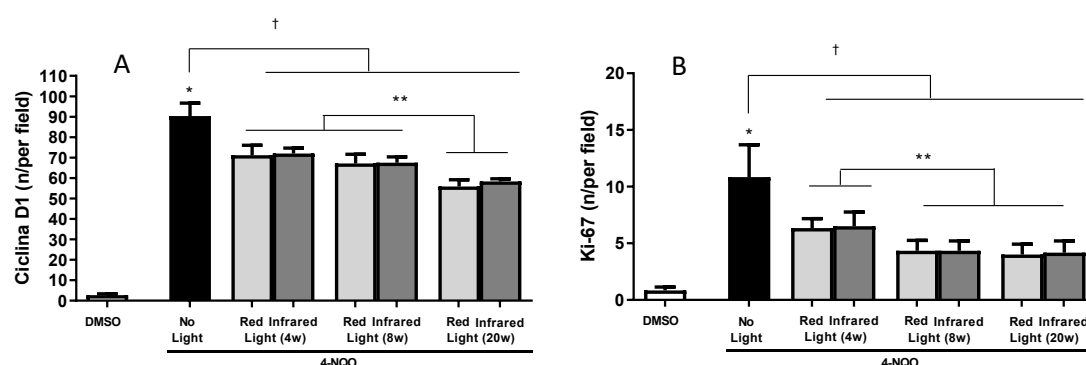
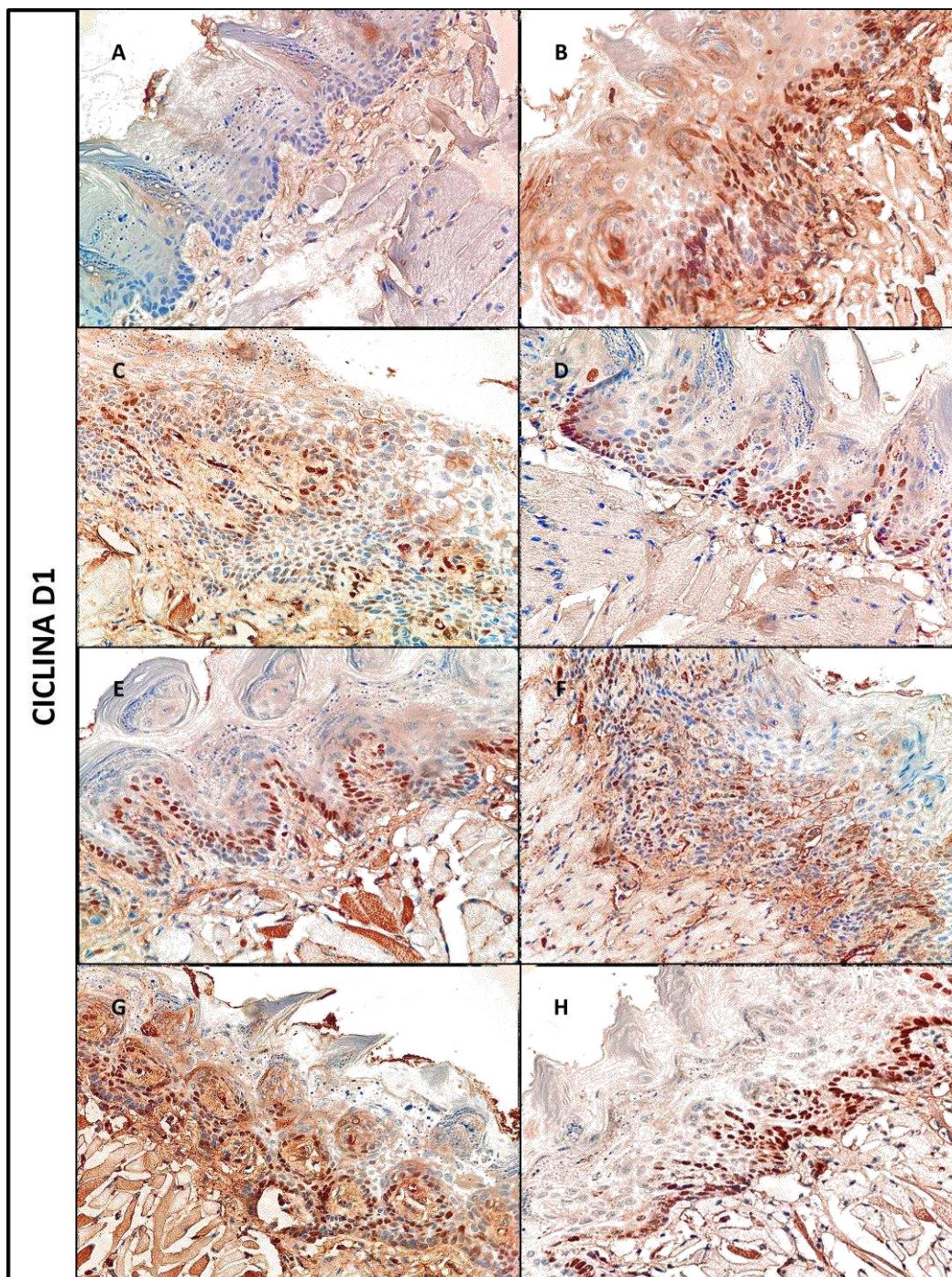


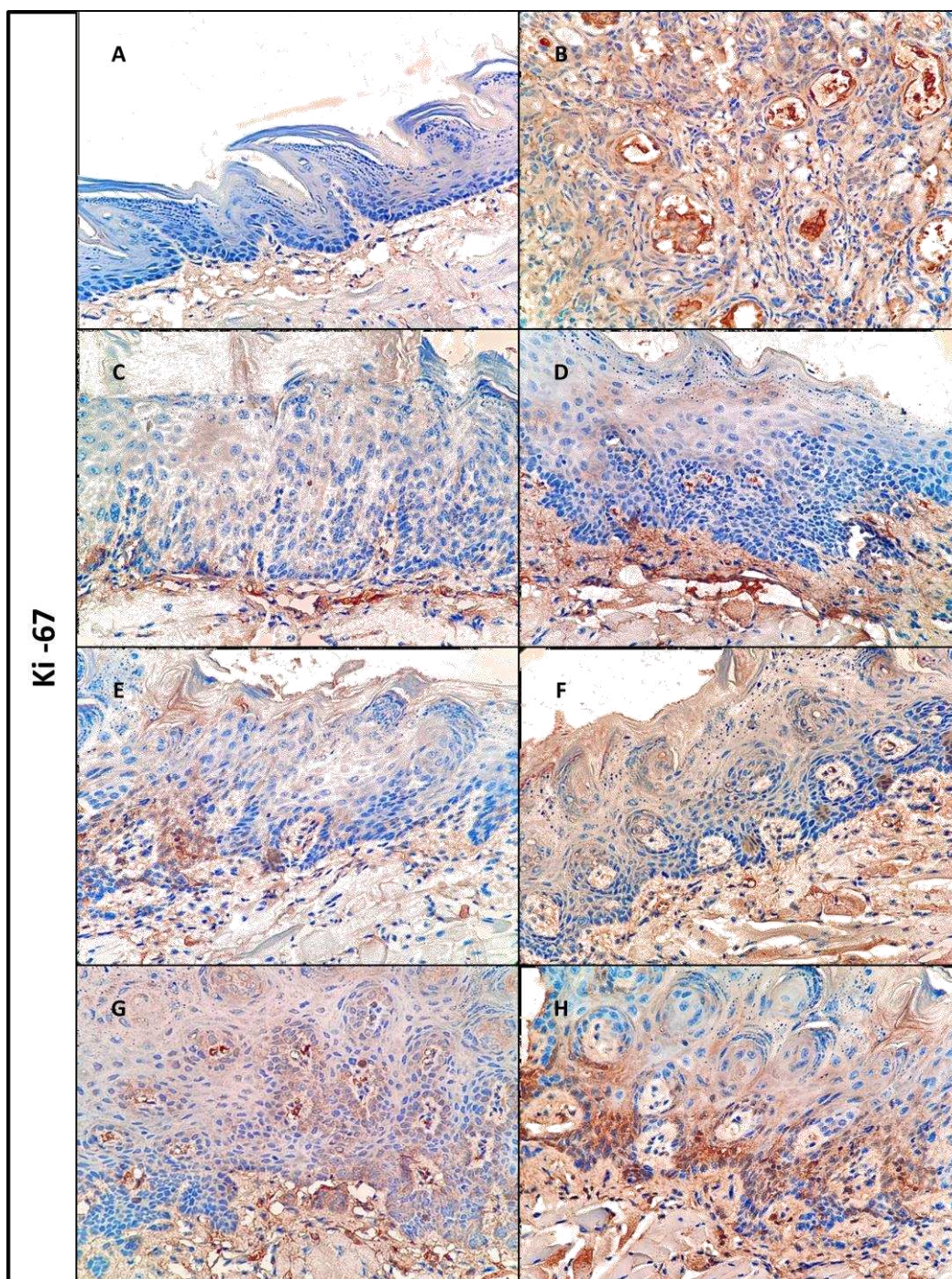
Figura 6: Expressão imuno-histoquímica dos anticorpos Ciclina D1 (A) e Ki-67 (B) em amostras de língua submetidas a modelo de carcinogênese por 4-NQO e tratados por 4, 8 ou 20 semanas com laserterapia de baixa intensidade em comprimentos de onda vermelho e infravermelho. * $p < 0,05$ versus DMSO; † $p < 0,05$ versus 4-NQO; ** $p < 0,05$ entre grupos tratados com laser. Teste ANOVA/Bonferroni (média $\pm$ EPM)

Figura 7: Fotomicrografias de reação por imuno-histoquímica para Ciclina D1 do epitélio de dorso de língua de camundongos Swiss submetidos à modelo de carcinogênese por aplicação tópica de 4-NQO e tratados com laser vermelho ou infravermelho durante 20, 8 e 4 semanas.



(A) GCN = grupo controle negativo; (B) GCP = grupo controle positivo 4-NQO; (C) 4-NQO + LV por 20 semanas; (D) 4-NQO + LIV por 20 semanas; (E) 4-NQO + LV por 8 semanas; (F) 4-NQO + LIV por 8 semanas; (G) 4-NQO + LV por 4 semanas; (H) 4-NQO + LIV por 4 semanas (400x, Imuno-histoquímica). Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 8: Fotomicrografias de reação por imuno-histoquímica para Ki-67 do epitélio de dorso de língua de camundongos Swiss submetidos à modelo de carcinogênese por aplicação tópica de 4-NQO e tratados com laser vermelho ou infravermelho durante 20, 8 e 4 semanas.



(A) GCN = grupo controle negativo; (B) GCP = grupo controle positivo 4-NQO; (C) 4-NQO + LV por 20 semanas; (D) 4-NQO + LIV por 20 semanas; (E) 4-NQO + LV por 8 semanas; (F) 4-NQO + LIV por 8 semanas; (G) 4-NQO + LV por 4 semanas; (H) 4-NQO + LIV por 4 semanas (400x, Imuno-histoquímica). Fonte: Elaborada pelo autor.

6.3. Laserterapia de baixa intensidade (com laser vermelho e infravermelho) diminui os níveis de células inflamatórias em lesões malignas/potencialmente malignas em modelo de carcinogênese oral com 4-NQO

No ensaio de mieloperoxidase (MPO) o grupo que recebeu administração de 4-NQO apresentou aumento dos níveis de MPO ($14,00 \pm 1,03$) e todos os grupos tratados com laser, independente se vermelho ou infravermelho, apresentaram menores níveis de MPO comparados com o 4-NQO apenas ($p < 0,001$). Os grupos que receberam tratamento com laser vermelho/infravermelho por 4 ($7,31 \pm 0,75$ / $7,69 \pm 0,26$), 8 ($7,21 \pm 0,32$ / $7,50 \pm 0,56$) e 20 ($5,93 \pm 0,40$ / $6,10 \pm 0,49$) semanas não apresentaram diferença estatística entre si (figura 6).

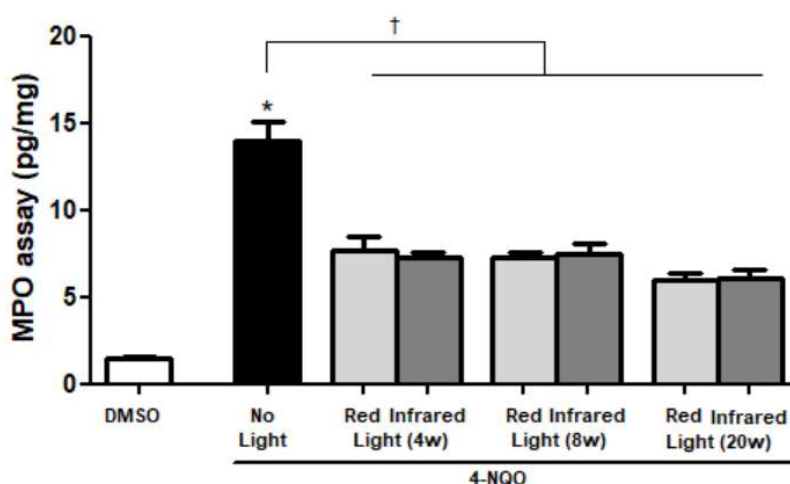


Figura 9: Níveis teciduais de MPO em amostras de língua submetidas a modelo de carcinogênese por 4-NQO e tratados por 4, 8 ou 20 semanas com laserterapia de baixa intensidade em comprimentos de onda vermelho e infravermelho.

* $p < 0,05$ versus DMSO; † $p < 0,05$ versus 4-NQO; Teste ANOVA/Bonferroni (média $\pm$ EPM)

No ensaio n-acetil- β -d-glicosaminidase (n-AG), o grupo submetido à administração de 4-NQO apresentou aumento dos níveis de n-AG ($12,10 \pm 0,93$) e todos os grupos tratados com laser, independente se vermelho ou infravermelho, apresentaram menores níveis de n-AG comparados com o 4-

NQO apenas ($p<0,001$). Os grupos que receberam tratamento com laser vermelho/infravermelho por 4 ($6,97\pm1,03/ 7,18\pm0,29$), 8 ($7,09\pm0,36/ 7,16\pm0,67$) e 20 ($6,90\pm0,29/ 6,95\pm0,62$) semanas não apresentaram diferença estatística entre si (figura 7).

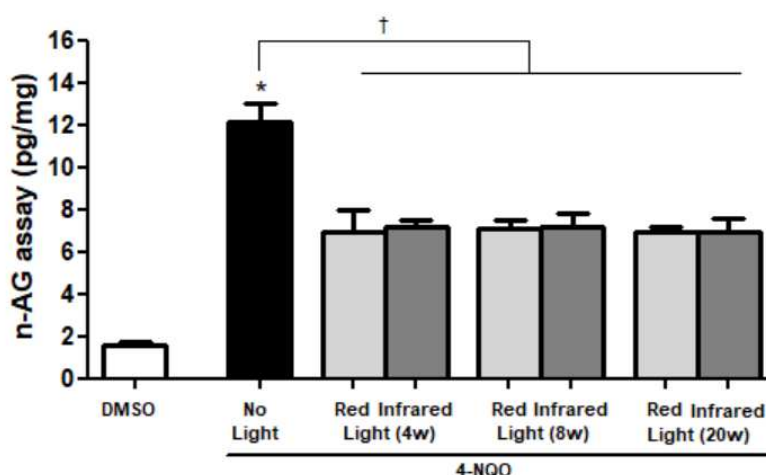


Figura 10: Níveis teciduais de n-AG em amostras de língua submetidas a modelo de carcinogênese por 4-NQO e tratados por 4, 8 ou 20 semanas com laserterapia de baixa intensidade em comprimentos de onda vermelho e infravermelho.

* $p<0,05$ versus DMSO; † $p<0,05$ versus 4-NQO; Teste ANOVA/Bonferroni (média $\pm$ EPM)

6.4. Laserterapia de baixa intensidade (com laser vermelho e infravermelho) diminui os níveis de citocinas em modelo de carcinogênese oral com 4-NQO

Quando avaliado o perfil imuno-inflamatório por meio de dosagens de citocinas/ELISA, o grupo que recebeu administração de 4-NQO apresentou aumento dos níveis de TNF- α ($166,10\pm10,24$) e todos os grupos tratados com laser, independente se vermelho ou infravermelho, apresentaram menores níveis de TNF- α comparados com o 4-NQO apenas ($p<0,001$). Os grupos que receberam tratamento com laser vermelho/infravermelho por 4 ($50,47\pm6,58/ 50,60\pm1,95$), 8 ($51,92\pm2,69/ 55,83\pm5,78$) e 20 ($68,27\pm2,09/ 70,13\pm3,61$) semanas não apresentaram diferença estatística entre si (figura 8).

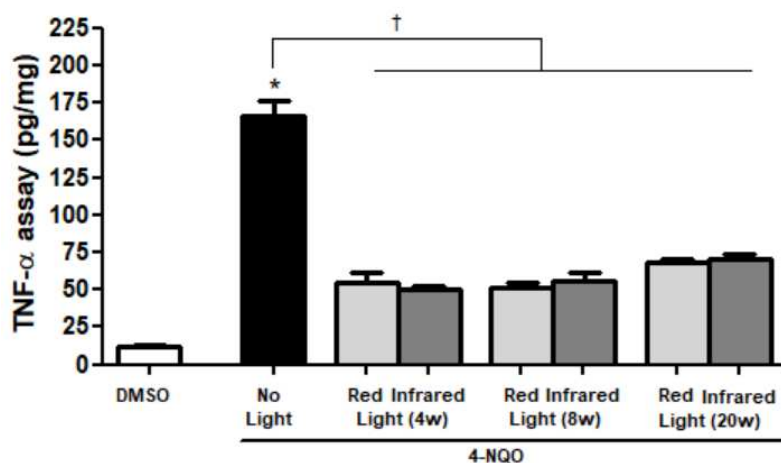


Figura 11: Níveis teciduais de TNF- α em amostras de língua submetidas a modelo de carcinogênese por 4-NQO e tratados por 4, 8 ou 20 semanas com laserterapia de baixa intensidade em comprimentos de onda vermelho e infravermelho.

* $p < 0,05$ versus DMSO; † $p < 0,05$ versus 4-NQO; Teste ANOVA/Bonferroni (média $\pm$ EPM)

O grupo submetido à administração de 4-NQO apresentou ainda aumento dos níveis de IL-1 β (124,90 $\pm$ 7,73) e todos os grupos tratados com laser, independente se vermelho ou infravermelho, apresentaram menores níveis de IL-1 β comparados com o 4-NQO apenas ($p < 0,001$). Os grupos que receberam tratamento com laser vermelho/infravermelho por 4 (52,52 $\pm$ 4,42/ 48,17 $\pm$ 1,80), 8 (48,47 $\pm$ 1,37/ 49,82 $\pm$ 3,34) e 20 (60,15 $\pm$ 1,53/ 61,13 $\pm$ 2,92) semanas também não apresentaram diferença estatística entre si (figura 9).

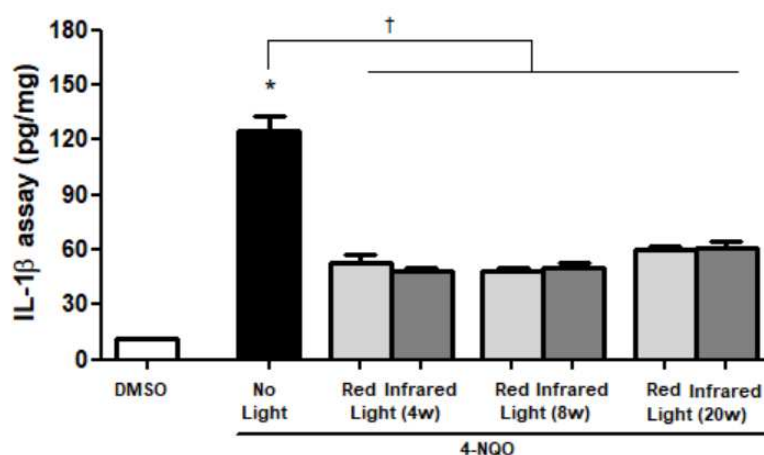


Figura 12: Níveis teciduais de IL-1 β em amostras de língua submetidas a modelo de carcinogênese por 4-NQO e tratados por 4, 8 ou 20 semanas com laserterapia de baixa intensidade em comprimentos de onda vermelho e infravermelho.

* $p < 0,05$ versus DMSO; † $p < 0,05$ versus 4-NQO; Teste ANOVA/Bonferroni (média $\pm$ EPM)

Além disso, o grupo 4-NQO também apresentou aumento dos níveis de IL-6 ($78,10 \pm 4,29$) e todos os grupos tratados com laser, independente se vermelho ou infravermelho, apresentaram menores níveis de IL-6 comparados com o 4-NQO apenas ($p < 0,001$). Assim como nas dosagens anteriormente demonstradas, os grupos que receberam tratamento com laser vermelho/infravermelho por 4 ($41,40 \pm 2,01 / 42,13 \pm 1,58$), 8 ($42,37 \pm 1,72 / 44,17 \pm 3,56$) e 20 ($39,98 \pm 1,24 / 40,48 \pm 2,63$) semanas não apresentaram diferença estatística entre si (figura 10).

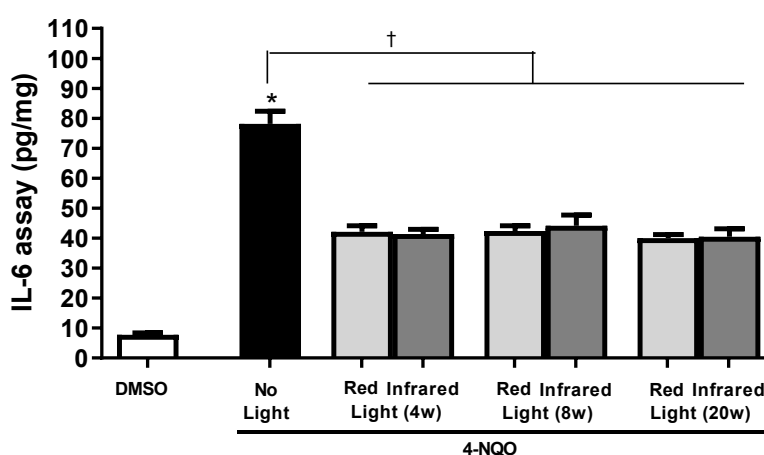


Figura 13: Níveis teciduais de IL-6 em amostras de língua submetidas a modelo de carcinogênese por 4-NQO e tratados por 4, 8 ou 20 semanas com laserterapia de baixa intensidade em comprimentos de onda vermelho e infravermelho.

* $p < 0,05$ versus DMSO; † $p < 0,05$ versus 4-NQO; Teste ANOVA/Bonferroni (média $\pm$ EPM)

6.5. Laserterapia de baixa intensidade (com laser vermelho e infravermelho) melhora o equilíbrio redox em modelo de carcinogênese oral com 4-NQO

Através da determinação da produção de substâncias ácidas reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), esse ensaio avaliou o produto final malondialdeído (MDA) formado pela peroxidação lipídica da membrana. O grupo 4-NQO apresentou aumento dos níveis de MDA ($9,96 \pm 0,97$) e todos os grupos tratados com laser, independente se vermelho ou infravermelho, apresentaram menores níveis de MDA comparados com o 4-NQO apenas ($p < 0,001$). Os grupos que receberam tratamento com laser

vermelho/infravermelho por 4 ($7,87 \pm 1,01$ / $6,73 \pm 1,28$), 8 ($7,73 \pm 0,72$ / $6,67 \pm 0,96$) e 20 ($7,54 \pm 0,84$ / $6,43 \pm 0,83$) semanas não apresentaram diferença estatística entre si (figura 11).

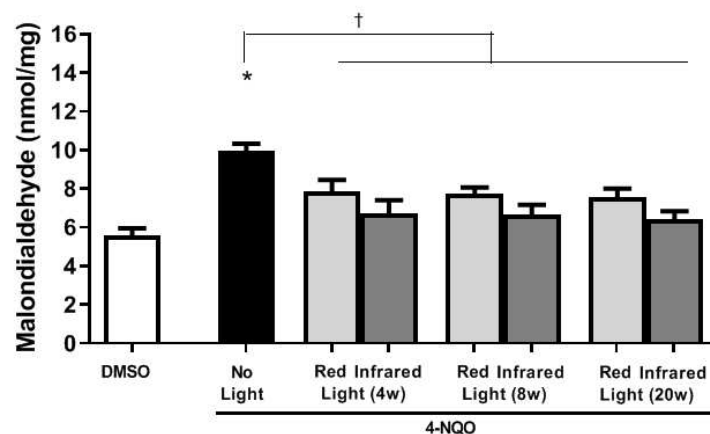


Figura 14: Níveis teciduais de Malondialdeído (MDA) em amostras de língua submetidas a modelo de carcinogênese por 4-NQO e tratados por 4, 8 ou 20 semanas com laserterapia de baixa intensidade em comprimentos de onda vermelho e infravermelho.

* $p < 0,05$ versus DMSO; † $p < 0,05$ versus 4-NQO; Teste ANOVA/Bonferroni (média $\pm$ EPM)

Realizou-se ainda um ensaio de glutathiona reduzida (GSH) com a finalidade de avaliar estresse oxidativo nessas amostras. Os grupos tratados com laserterapia de baixa potência com laser infravermelho durante 4, 8 e 20 semanas ($309,64 \pm 5,54$; $315,67 \pm 7,43$; $303,03 \pm 15,67$), independente da quantidade de semanas do tratamento, apresentaram aumento significativo de glutathiona reduzida quando comparados ao grupo que recebeu apenas 4-NQO ($256,25 \pm 13,17$) ($p < 0,001$). Essa diferença não foi vista nos grupos que receberam laserterapia com laser vermelho (figura 12).

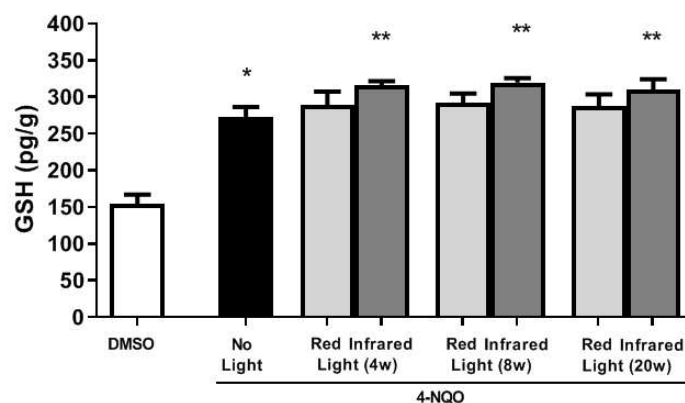


Figura 15: Níveis teciduais de Glutathiona Reduzida em amostras de língua submetidas a modelo de carcinogênese por 4-NQO e tratados por 4, 8 ou 20 semanas com laserterapia de baixa intensidade em comprimentos de onda vermelho e infravermelho.

*p<0,05 versus DMSO; **p<0,05 versus 4-NQO; Teste ANOVA/Bonferroni (média±EPM)

6.6. Laserterapia de baixa intensidade (com laser vermelho e infravermelho) reduz a dosagem de proteínas totais em modelo de carcinogênese oral com 4-NQO

Por fim, as mesmas amostras foram ainda utilizadas para a quantificação de proteínas totais em lesões. O grupo submetido à administração de 4-NQO apresentou aumento dos níveis de proteínas totais ($202,91 \pm 22,54$) e todos os grupos tratados com laser, independente se vermelho ou infravermelho, apresentaram menores níveis de proteínas totais comparados com o 4-NQO apenas ($p < 0,001$). Os grupos que receberam tratamento com laser vermelho/infravermelho por 4 ($155,50 \pm 10,01 / 165,67 \pm 25,14$), 8 ($158,58 \pm 24,72 / 164,70 \pm 20,96$) e 20 ($153,81 \pm 18,84 / 159,64 \pm 15,83$) semanas não apresentaram diferença estatística entre si (figura 13).

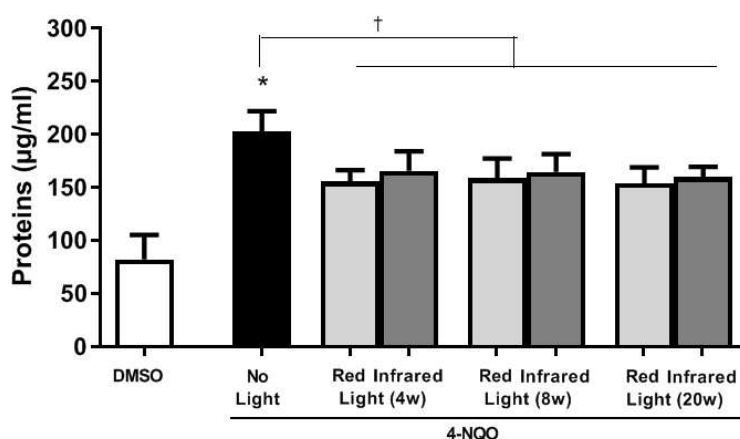


Figura 16: Níveis teciduais de Proteínas Totais em amostras de língua submetidas a modelo de carcinogênese por 4-NQO e tratados por 4, 8 ou 20 semanas com laserterapia de baixa intensidade em comprimentos de onda vermelho e infravermelho.

*p<0,05 versus DMSO; †p<0,05 versus 4-NQO; Teste ANOVA/Bonferroni (média±EPM)

7. DISCUSSÃO

O ensaio da carcinogênese em língua de animais com 4-NQO tem se mostrado um modelo fiel e confiável na realização desses estudos. Este carcinógeno exerce potente estresse oxidativo intracelular e os produtos metabólicos que se ligam ao DNA são predominantemente resíduos de guanina. Essas injúrias parecem ser semelhantes ao dano imposto por outros carcinógenos presentes no tabaco, o qual é um importante fator de risco para o câncer oral (VERED et al., 2008). Exposições ao 4-NQO apresentam alterações moleculares e histológicas extremamente semelhantes à carcinogênese oral humana, com o aparecimento de hiperplasias e displasias epiteliais leve e moderada após 12 semanas de indução e displasias severas e CECs sendo observadas após 16 semanas de indução (FRACALOSSO et al., 2010).

O presente estudo avaliou os efeitos do laser de baixa potência em distúrbios potencialmente malignos e nos carcinomas espinocelulares orais em um modelo de carcinogênese induzida por 4-NQO. O laser com ambos os parâmetros de energia, 2J e 4J, influenciou positivamente na diminuição da frequência de tumores detectáveis histologicamente e redução de pleomorfismo celular ao final do experimento.

Os dados deste estudo são promissores e os estudos *in vivo* mais recentes de laserterapia em modelo de carcinogênese fornecem suporte para os nossos achados. Zacchinga et al. (2015) testaram fotobiomodulação a 660nm (3J/cm²) e 970nm (180J/cm²) em modelo de camundongos com tumores de melanoma. Todos os experimentos mostraram efeitos benéficos nos tecidos tumorais consistindo em menor disseminação e infiltração do câncer nos animais tratados. Ottaviani et al. (2016) estudaram os efeitos de três protocolos de LTBI (660nm, 3J/cm²; 800nm, 6J/cm²; e 970nm, 6J/cm²) em modelos de camundongos com câncer oral e melanoma. Os autores relatam a diminuição do crescimento do tumor em todos os animais expostos ao laser em comparação com os grupos controles. Os parâmetros de LTBI utilizados foram

semelhantes aos que usamos no presente estudo, e os resultados corroboram entre si.

Neculqueo et al. (2022) também constataram que a LTBI é um procedimento seguro em lesões displásicas e neoplásicas, visto que não observaram alterações clínicas/histológicas significativas em desordens potencialmente malignas e malignas quando realizaram protocolos de LTBI (1,5J e 9J).

Em contraste, Monteiro et al. (2011) observaram aumento do grau histológico do carcinoma de células escamosas com LTBI. No entanto, em seu estudo, carcinomas orais foram induzidos na bolsa jugal de hamsters sírios dourados em modelo experimental com 9,10-dimetil 1,2- benzantraceno (DMBA). O laser foi aplicado por 133s, com energia de 4J, durante quatro semanas, em dias alternados. Este modelo carcinogênico, induzido em bolsa bucal de hamster, não representa as influências ambientais ocorridas na cavidade oral. O epitélio dessa região anatômica é mais fino quando comparado ao epitélio da cavidade oral em humanos, o que pode justificar os resultados contrastantes. Além disso, o 4-NQO apresenta vantagens sobre outros produtos químicos como o DMBA, por ser hidrossolúvel, permitindo a administração por pincelamento ou na água de bebida, causando menos estresse ao animal durante o experimento (OTTAVIANI et al., 2016).

Em muitos estudos como os de Thomson et al. (2008), Humayun e Prasad (2011) e Kumar, Kane e Rathod (2012), a expressão aumentada do Ki-67 foi relacionada com alto índice de proliferação celular ou aumento do grau de displasia. Freudlsperger et al. (2012) citam que tumores com alta proliferação tem maior índice de marcação de Ki-67. Já Wangsa et al. (2008) relacionaram a alta expressão de Ki-67 com alta atividade proliferativa e aumento do risco de recorrência loco-regional. Turatti et al. (2005) relatam alta expressão da Ciclina D1 nos carcinomas relacionados a maior grau de alteração do epitélio. Em lesões cancerizáveis, Kovesi e Szende (2006) e Vieira et al. (2012) relacionaram um aumento na expressão de Ciclina D1 em lesões com displasia quando comparado às lesões sem displasia e quanto maior o grau de displasia, maior foi a expressão da Ciclina D1 encontrada. Tal como

Marsit et al. (2008) que encontraram relação da Ciclina D1 com pobres prognósticos especialmente em tumores T3 e T4 quando comparados com T1 e T2 e Fujii et al. (2001) que consideraram a expressão da Ciclina D1 como um fator chave na agressividade dos tumores de língua.

O presente estudo identificou aumento da marcação nuclear positiva para estes dois marcadores (Ciclina D1 e Ki-67) no grupo 4-NQO, acompanhado de uma redução concomitante da expressão destes marcadores nos grupos tratados com LTBI, em relação ao grupo 4-NQO. Além disso, quando comparados entre si, os grupos tratados com LV e LIV durante 20 semanas apresentaram redução maior de Ciclina D1 em relação aos grupos tratados por 4 e 8 semanas; e os grupos tratados com LV e LIV durante 20 e 8 semanas apresentaram maior redução da expressão de Ki-67 que os grupos tratados apenas por 4 semanas. Sendo assim, o laser de baixa potência, tanto vermelho como infravermelho, parece atuar no processo de iniciação e progressão de desordens potencialmente malignas, reduzindo o desenvolvimento dos tumores. Em relação aos marcadores de proliferação celular, a quantidade de semanas de tratamento com laserterapia parece ser um fator dose-tempo resposta de influência na imunoexpressão positiva, tanto para Ciclina D1 como para Ki-67.

Este estudo também demonstrou redução significativa de células inflamatórias polimorfonucleares e macrófagos, além de menor expressão de citocinas e interleucinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β e IL-6) em modelo de carcinogênese oral induzido por 4-NQO e tratado com laserterapia de baixa intensidade.

Embora existam divergências quanto ao papel da inflamação na carcinogênese oral, é sabido que o infiltrado inflamatório está presente nas desordens potencialmente malignas e nos CECs. Segundo Agarwal (2006), a ação intermitente ou descontrolada de citocinas que participam do processo inflamatório são capazes, não só de transformar, como de induzir à progressão, invasão e metástase das células neoplásicas. Estudos na literatura tentam demonstrar que a inflamação pode desempenhar papéis diferenciados nas etapas da carcinogênese, atuando como fator protetor nos estágios iniciais

(PIVA et al., 2011), mas assumindo caráter inverso e favorecendo a progressão tumoral e metástases com o avanço da lesão (ALLAVENA et al., 2011; BALKWILL et al., 2005; PARK et al., 2014). Entretanto, ressalta-se que neste estudo não foi realizada a avaliação de lesões em estágio avançado.

Sica et al. (2008) fizeram um levantamento de vários estudos que tentaram ligar o câncer à inflamação e afirmaram que existem duas vias que promovem essa conexão: a via intrínseca e a via extrínseca. A via intrínseca é ativada por eventos genéticos que causam neoplasias. Estes eventos incluem a ativação de oncogenes, mutação, rearranjo cromossômico ou de amplificação e a inativação de genes supressores tumorais. As células que são transformadas desta forma produzem mediadores inflamatórios, gerando assim um microambiente inflamatório em tumores para os quais não existe qualquer condição inflamatória subjacente. Por contraste, na via extrínseca, condições inflamatórias ou infecciosas aumentam o risco de desenvolvimento de câncer em determinados locais anatômicos. As duas vias convergem, resultando na ativação de fatores de transcrição (NF- κ B) e fator de transcrição 3 (STAT3). Estes fatores coordenam a produção de mediadores inflamatórios, incluindo citocinas e quimiocinas, bem como a produção de cicloxigenase 2 (COX-2), além de participar do recrutamento e ativação de vários leucócitos. As citocinas ativam os mesmos fatores de transcrição em células inflamatórias, células do estroma e células tumorais, resultando na produção de mais mediadores inflamatórios e um ambiente relacionado ao câncer. Com isso, uma inflamação persistente poderia levar à progressão do tumor.

As citocinas inflamatórias têm um papel significativo na patogênese e na regulação fisiológica do crescimento tumoral e progressão de CEC. O fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e numerosas interleucinas, como a IL-1 β e a IL-6 estão associadas à ativação do ciclo celular, levando à progressão tumoral e ao desenvolvimento de metástases, além do aumento do influxo de células inflamatórias no microambiente tumoral (EIRÓ et al., 2012).

Jinno et al. (2015) avaliaram biópsia tecidual e imuno-histoquímica de 78 pacientes com diagnóstico confirmado de CEC e observaram que níveis elevados de IL-6 estavam relacionados com pior prognóstico, além do aumento

da expressão de IL-6 nas células cancerosas estar significativamente associado a uma resposta fraca à quimiorradioterapia pré-operatória.

Segundo Fang et al. (2017) e Leon et al. (2015), o aumento dos níveis de TNF- α e IL-1 β está associado ao crescimento tumoral por meio de mecanismos como o aumento da proliferação celular dependente da ativação do NF- κ B; redução de genes supressores de tumor, indução de metástase e angiogênese; além de aumento das taxas de crescimento tumoral resultando em um maior estadiamento do tumor que está ligado a pior prognóstico e maior mortalidade.

Grivennikov et al. (2010), concluíram que a inflamação crônica aumenta o risco de câncer; vários tipos de células imunitárias e inflamatórias são frequentemente encontradas dentro dos tumores; a inflamação pode agir em todas as fases da carcinogênese; e a ativação do NF- κ B em células imunes induz a produção de citocinas que ativam o NF- κ B em células cancerosas para induzir a produção de quimiocinas que, por sua vez, atraem as células inflamatórias para o interior do tumor.

Um dos mecanismos que envolvem a atuação da terapia com laser de baixa potência é a inibição de mediadores inflamatórios como prostaglandinas E2 (LARAIA et al., 2012). A COX-2, ao ser ativada, pode levar a produção de outros mediadores inflamatórios como as lipoxinas, as quais são importantes na evolução do processo inflamatório. Num estudo de laserterapia em modelo animal foi demonstrada a redução de edema através da diminuição da expressão do mRNA da COX-2. Adicionalmente, outros autores concluíram que a laserterapia reduziu de 30 a 40% a expressão gênica de mediadores inflamatórios (IL-2, TNF- α , IL-6, mRNA) em modelo de edema de pata de ratos por carragenina (ALBERTINI et al., 2007; XU et al., 2010). Segundo Laraia et al. (2012), a laserterapia possui um efeito de modulação significativa nos mediadores inflamatórios, causando uma redução nas citocinas pró-inflamatórias bem como um aumento no nível de citocinas anti-inflamatórias.

Durante a análise histológica das amostras, o infiltrado inflamatório esteve presente em todos os grupos. É possível associar a quantidade deste com o número ou tipo de lesões encontradas, visto que o grupo 4-NQO sem

laser (com maior quantidade de carcinomas) estava associado majoritariamente a um infiltrado inflamatório moderado (83%), enquanto os grupos que receberam laserterapia (com maior quantidade de displasias) apresentaram um infiltrado inflamatório predominantemente leve (83%-100%). Dessa forma, esse estudo corrobora a trabalhos anteriores, evidenciando a participação e influência do infiltrado inflamatório no processo de carcinogênese, dados estes que foram confirmados pela dosagem de MPO e n-AG. Infere-se, portanto, que a LTBI promova uma possível modulação do infiltrado inflamatório supostamente associada à redução da frequência do desenvolvimento de tumores.

Pacientes com câncer bucal apresentam aumento da oxidação de DNA/proteínas e redução de antioxidantes na saliva (BAHAR et al., 2007), indicando um desequilíbrio na homeostase redox. Diversos marcadores de atividade antioxidante foram reduzidos no CCP (SUBAPRIYA et al., 2002; BANERJEE et al., 2017). Vários estudos indicam um aumento do estresse oxidativo em amostras de CCP e desordens potencialmente malignas (KORDE et al., 2011; ISHIKAWA, 2016; BANERJEE et al., 2017).

O malondialdeído é um dos produtos secundários da peroxidação lipídica mais utilizados como indicador de injúria da membrana celular (SALMON et al., 2010). O MDA tem sido medido através de sua reação com o ácido tiobarbitúrico, o qual produz o complexo MDA-TBA₂, detectado por espectrofotometria, método conhecido como substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). A produção excessiva de MDA contribui para a reação inflamatória por ativação de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α e a IL-1, entre outras (LORENTE et al., 2013). Já a Glutathiona Reduzida (GSH) é um tripeptídeo antioxidante presente nas células com ação de proteção e recuperação celular, auxiliando na manutenção do equilíbrio redox. Em contrapartida, a redução dos seus níveis promove o envelhecimento celular (LORENTE et al., 2013).

No presente estudo, o laser de baixa potência vermelho e infravermelho reduziu os níveis de malondialdeído enquanto que o laser infravermelho elevou os níveis de glutathiona reduzida. Acredita-se que o

aumento de GSH visto apenas com laser infravermelho esteja relacionado à sua maior densidade de energia e ao maior poder de penetração do LIV nos tecidos (PAGLIONI et al., 2019), sugerindo-se que possivelmente exista uma dose mínima de energia necessária capaz de ativar essa moeda de potencial redox. Dessa forma, sugere-se que a laserterapia de baixa potência promova uma redução da oxidação tecidual, enquanto o laser infravermelho parece elevar os níveis de moléculas antioxidantes. Com a presença de enzimas antioxidantes ativadas têm-se menor estresse tecidual, bem como modulação do processo inflamatório (VLADIMIROV et al, 2004).

É descrito que a LTBI produz um deslocamento no potencial redox celular total na direção de maior oxidação (STORZ, 2007). Lubart et al. (2005) mostraram que a iluminação com luz vermelha aumentou a produção de EROs e também da atividade redox celular (homeostase redox). A ação do laser de baixa potência promove, em curto prazo, aumento das medidas de EROs, porém, seguido por diminuição à medida que moléculas antioxidantes são induzidas (EICHLER, 2007). Esta redução nos espécimes reativos de oxigênio final, provavelmente reduz o estresse oxidativo, explicando o efeito antioxidante global da laserterapia de baixa potência, o qual pode modular a cascata inflamatória (GARCEZ et al., 2012).

Ademais, observou-se ainda, após aplicação de LTBI, uma redução da quantificação de proteínas totais em distúrbios potencialmente malignos e tumores no modelo de câncer oral com 4-NQO. A quantidade de proteínas totais possui relação direta com o metabolismo celular, a proliferação celular e a infiltração de células inflamatórias. Quanto mais desenvolvido um tumor, maior sua quantidade de mitoses e maior sua realização de síntese proteica (FREITAS, 2019). Acredita-se que a redução desses valores tenha sido uma consequência direta dos demais achados já discutidos, onde a redução do desenvolvimento dos tumores juntamente com a diminuição do influxo de células inflamatórias causadas pela LTBI teriam uma possível influência na redução dos valores de proteínas totais dessas amostras.

Por fim, é importante ressaltar que este estudo não avaliou tumores estabelecidos em estágio avançado, e que uma proposição futura com

extensão do protocolo para além de 20 semanas seria interessante. Além disso, apenas uma densidade de energia foi utilizada em cada tipo de laser. A não variação dessas doses torna-se uma limitação. Nossos achados reforçam a necessidade de mais estudos pré-clínicos e clínicos que avaliem o uso desta terapia como parte da abordagem multidisciplinar de pacientes com câncer oral, uma vez que estes dados, somados a outras literaturas, sugerem que LTBI parece ter impacto positivo no desenvolvimento da carcinogênese oral.

8. CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo evidenciam que a laserterapia de baixa potência (com laser vermelho e infravermelho) reduziu o desenvolvimento de tumores em modelo de carcinogênese oral induzido por 4-NQO na língua de camundongos, e este efeito foi acompanhado por uma diminuição da expressão positiva de marcadores associados à taxas de proliferação e agressividade (Ciclina D1 e Ki-67), além de redução de influxo de células inflamatórias, de citocinas associadas aos mecanismos de inflamação e carcinogênese (TNF- α , IL-1 β , IL-6), acompanhados de uma melhora no equilíbrio redox tecidual.

9. REFERÊNCIAS

AGGARWAL, B. B.; SHISHODIA, S.; SANDUR, S. K.; PANDEY, M. K.; SETHI, G. Inflammation and cancer: how hot is the link? **Biochemical pharmacology**, v. 72, p. 1605-1621, 2006.

AKHTER, M. et al. A study on histological grading of oral squamous cell carcinoma and its co-relationship with regional metastasis. **Journal of Oral and Maxillofacial Pathology**, v. 15, n. 2, p. 168, 2011.

ALBERTINI, R. et al. Anti-inflammatory effects of low-level laser therapy (LLLT) with two different red wavelengths (660 nm and 684 nm) in carrageenan-induced rat paw edema. **Journal of photochemistry and photobiology**, v. 89, p. 50-55, 2007.

ALLAVENA, P.; GERMANO, G.; MARCHESI, F.; MANTOVANI, A. Chemokines in cancer related inflammation. **Experimental cell research**, v. 317, p. 664-673, 2011.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Global Cancer Facts & Figures**. 3rd Edition. Atlanta: American Cancer Society, 2015.

ANDRADE, V. P. O arranjo em matriz de amostras teciduais (tissue microarray): larga escala e baixo custo ao alcance do patologista. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 1, p. 55-60, fev. 2007.

ANNEROTH, G.; HANSEN, L. S.; SILVERMAN, S. Malignancy grading in oral squamous cell carcinoma. Squamous cell carcinoma of the tongue and floor of mouth: histologic grading in the clinical evaluation. **Journal of Oral Pathology**, v. 15, n. 3, p. 162-8, mar. 1986.

ANTUNES, H. S. et al. Long-term survival of a randomized phase III trial of head and neck cancer patients receiving concurrent chemoradiation therapy with or without low-level laser therapy (LLLT) to prevent oral mucositis. **Oral Oncology**, v. 71, p. 11-15, 2017.

BAHAR, G. et al. Salivary analysis in oral cancer patients: DNA and protein oxidation, reactive nitrogen species, and antioxidant profile. **Cancer**, p. 54-59. 2007.

BALKWILL, F.; CHARLES, K. A.; MANTOVANI, A. Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. **Cancer cell**, v. 7, p. 211-217, 2005.

BALKWILL, F. R.; MANTOVANI, A. Cancer-related inflammation: common themes and therapeutic opportunities. **Seminars in cancer biology**, v. 22, p. 33-40, 2012.

BANERJEE, S. et al. Microbial Signatures Associated with Oropharyngeal and Oral Squamous Cell Carcinomas. **Nature**, p. 1-20. 2017.

BARCESSAT, A. R. R. et al. Systemic toxic effects during early phases of topical 4-NQO-induced oral carcinogenesis in rats. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 43, n. 10, p. 770–777, nov. 2014.

BELIZÁRIO, J. E. O próximo desafio reverter o câncer. **Ciência Hoje**, São Paulo, v. 31, n. 184, p. 50-57, jul. 2002.

BOLTONG, A.; KEAST, R. Chemosensory science in the context of cancer treatment: implications for patient care. **Chemosens Perception**, n. 8, v.3, p.117–125, 2015.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, n.2, p.248-254, 1976.

BRANDÃO, T. B. et al. “Locally Advanced Oral Squamous Cell Carcinoma Patients Treated with Photobiomodulation for Prevention of Oral Mucositis: Retrospective Outcomes and Safety Analyses”. **Supportive Care in Cancer**, v. 26, n.7, p. 2417–2423, 2018.

CASTRO, J. L.; PINHEIRO, A. L.; WERNECK, C. E.; SOARES, C. P. The effect of laser therapy on the proliferation of oral KB carcinoma cells: an in vitro study. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 23, p. 586-589, 2005.

CHAMOLI, A. S.; GOSAVI, U. P.; SHIRWADKAR, K. V.; WANGDALE, S. K.; BEHERA, N. K.; KURREY, K.; KALIA, A. Overview of oral cavity squamous cell carcinoma: risk factors, mechanisms, and diagnostics. **Oral Oncology**, p. 121, 2021.

CHI, A. C.; DAY, T. A.; NEVILLE, B. W. Oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma - an update. **Cancer Journal for Clinicians**, v. 65, n.5, p.401-21, 2015.

CURRY, J. M.; SPRANDIO, J.; COGNETTI, D.; LUGINBUHL, A.; BAR-AD, V.; PRIBITKIN, E. Tumor microenvironment in head and neck squamous cell carcinoma. **Seminars in oncology**, v. 41, p. 217-34, 2014.

DE OLIVEIRA, R. F.; SILVA, A.C.; SIMÕES, A.; YOUSSEF, M. N.; DE FREITAS, P. M. Laserterapia no tratamento da parestesia: um estudo retrospectivo de 125 casos clínicos. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 33, n. 8, p. 415-423, 2015.

EICHLER, M. et al. Red light-induced redox reactions in cells observed with TEMPO. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 25, p. 170-174, 2007.

EIRÓ, N. et al. Relationship between the inflammatory molecular profile of breast carcinomas and distant metastasis development. **PLoS Currents**, v. 11, 2012.

FANG, J. et al. Prognostic significance of tumor infiltrating immune cells in oral squamous cell carcinoma. **BMC Cancer**, v. 17, p. 375-384, 2017.

FERLAY, J. et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. **International Journal of Cancer**, p.1941-1953, dez. 2018.

FRACALOSS, A. C.; MIRANDA, S. R.; OSHIMA, C. T.; FRANCO, M.; RIBEIRO, D. A. The role of matrix metalloproteinases 2 and 9 during rat tongue carcinogenesis induced by 4- nitroquinoline 1-oxide. **Journal of molecular histology**, v. 41, p. 19-25, 2010.

FREITAS P. M.; SIMÕES A. "Lasers in dentistry: guideline for clinical practice" **Wiley Beckwell**, p. 27-33, 2015.

FREITAS, V. M. Componentes do microambiente tumoral influenciando células tumorais e não tumorais. 2019. Tese (Livre Docência) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019. Acesso em: 10 jul. 2023.

FREUDLSPERGER, C. et al. Ki-67 expression predicts radiosensitivity in oral squamous cell carcinoma. **International Journal of Oral & Maxillofacial Surgery**, v. 41, n. 8, p. 965-9, aug. 2012.

FUJII, M. et al. Cyclin D1 amplification correlates with early recurrence of squamous cell carcinoma of the tongue. **Cancer Lett**, v. 172, n. 2, p. 187-92, oct. 2001.

GANNOT, G.; BUCHNER, A.; KEISARI, Y. Interaction between the immune system and tongue squamous cell carcinoma induced by 4-nitroquinoline N-oxide in mice. **Oral Oncology**, v. 40, n. 3, p. 287–297, mar. 2004.

GARCEZ, A. S. et al. LASER de baixa potência – Princípios básicos e aplicação clínica, Ed. **Elsevier**, 2012.

GOMES HENRIQUES, A.C. et al. Low-level laser therapy promotes proliferation and invasion of oral squamous cell carcinoma cells. **Lasers in Medical Science**, v. 29, p. 1385–1395, 2014.

GRIVENNIKOV, S. I.; Greten F. R.; Kari, M. Immunity, inflammation, and cancer. **Cell**, v. 140, p. 883-899, 2010.

HAMBLIN, M. R.; HUANG Y. Y.; SHARMA, S. K.; CARROLL, J. Biphasic dose response in low level light therapy - an update. **Dose-Response**, v. 9, p. 602–618, 2011.

HANNA, R.; DALVI, S.; BENEDICENTI, S.; AMAROLI, A.; SALAGEAN, T.; TODEA, D.; BORDEA, I. R.; Photobiomodulation therapy in oral mucositis and potentially malignant oral lesions: a therapy towards the future. **Cancers (Basel)**, v. 12, p. 1–14, 2020.

HENRIQUES A. C. G. et al. Low-level laser therapy promotes proliferation and invasion of oral squamous cell carcinoma cells. **Lasers in Medical Science**, v. 29, p. 1385-1395, 2014.

HOUGHTON, A. N.; UCHI, H.; WOLCHOK, J. D. The role of the immune system in early epithelial carcinogenesis: B-ware the double-edged sword. **Cancer Cell**, v. 7, n. 5, p. 403–405, may. 2005.

HSU, S.; RAINE, L.; FANGER, H. The use of antiavidin antibody and avidin biotin peroxidase complex in immunoperoxidase technics. **American journal of clinical pathology**, v. 75, n. 6, p. 816-821, 1981.

HUMAYUN, S.; PRASAD, V. R. Expression of p63 protein and ki-67 antigen in oral premalignant lesions and oral squamous cell carcinomas: An immunohistochemical study. **National Journal of Maxillofacial Surgery**, v. 2, n. 1, p. 38-46, jan. 2011.

ISHIKAWA, S. et al. Identification of salivary metabolomic biomarkers for oral cancer screening. **Nature**, p. 1-7. 2016.

JINNO, T. et al. Increased expression of interleukin-6 predicts poor response to chemoradiotherapy and unfavorable prognosis in oral squamous cell carcinoma. **Oncology Reports**, v. 33, n. 5, p. 2161–2168, 2015.

KANOJIA, D.; VAIDYA, M. M. 4-nitroquinoline-1-oxide induced experimental oral carcinogenesis. **Oral Oncology**, v. 42, n. 7, p. 655–667, aug. 2006.

KAPLAN, I.; HOCHSTADT, T.; DAYAN, D. PCNA in palate and tongue mucosal dysplastic lesions induced by topically applied 4NQO in desalivated rat. **Medicina Oral: Organo Oficial De La Sociedad Espanola De Medicina Oral Y De La Academia Iberoamericana De Patologia Y Medicina Bucal**, v. 7, n. 5, p. 336–343, dec. 2002.

KIM, Y. S.; SEO, H. W. Reactive oxygen species promote heat shock protein 90-mediated HBV capsid assembly. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 457, p. 328-333, 2015.

KORDE, S. D. et al. Enhanced nitrosative and oxidative stress with decreased total antioxidant capacity in patients with oral precancer and oral squamous cell carcinoma. **Oncology**, p. 382-389. 2011.

KOVESI, G.; SZENDE, B. Prognostic value of cyclin D1, p27, and p63 in oral leukoplakia. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 35, n. 5, p. 274-7, may. 2006.

KREISLER, M. et al. Low-level 809 nm GaAlAs laser irradiation increases the proliferation rate of human laryngeal carcinoma cells in vitro. **Lasers in Medical Science**, v. 18, p. 100-103, 2003.

KUJAN, O. et al. Evaluation of a new binary system of grading oral epithelial dysplasia for prediction of malignant transformation. **Oral Oncology**, v. 42, n. 10, p. 987–993, nov. 2006.

KUMAR, P.; KANE, S.; RATHOD, G. P. Coexpression of p53 and Ki 67 and lack of c-erbB2 expression in oral leukoplakias in India. **Brazilian Oral Research**, v. 26, n. 3, p. 228-234, 2012.

LAI, K. C.; LIU, C. J.; LIN, T. J.; MAR, A. C.; WANG, H. H.; CHEN, C. W. Blocking TNF- α inhibits angiogenesis and growth of IFIT2-depleted metastatic oral squamous cell carcinoma cells. **Cancer letters**, v. 370, p. 207-15, 2016.

LARAIA, E. M. et al. Effect of low-level laser therapy (660 nm) on acute inflammation induced by tenotomy of Achilles tendon in rats. **Photochemistry and photobiology**, v. 88, p. 1546-155, 2012.

LEE, S. H.; HONG, H. S.; LIU, Z. X.; KIM, R. H.; KANG, M. K.; PARK, N. H. TNF α enhances cancer stem cell-like phenotype via Notch-Hes1 activation in oral squamous cell carcinoma cells. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 424, p. 58-64, 2012.

LEON, X. et al. Expression of IL-1 α correlates with distant metastasis in patients with head and neck squamous cell carcinoma. **Oncotarget**, v. 35, p. 37398-37409, 2015.

LIANG, W.Z. et al. Selective Cytotoxic Effects of Low-Power Laser Irradiation on Human Oral Cancer Cells. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 47, p. 756-764, 2015.

LIMA JUNIOR, R. et al. Involvement of nitric oxide on the pathogenesis of irinotecan-induced intestinal mucositis: role of cytokines on inducible nitric oxide synthase activation. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 69, p. 931-942, 2012.

LIU, X. et al. The etiologic spectrum of head and neck squamous cell carcinoma in young patients. **Oncotarget**, v. 7, n. 40, p. 66226-38, 2016.

LORENTE, L. et al. Sustained high serum malondialdehyde levels are associated with severity and mortality in septic patients. **Critical Care**, v. 17, 2013.

LUBART, R.; EICHLER, M.; LAVI, R.; FRIEDMAN, H.; SHAINBERG, A. Low-energy laser irradiation promotes cellular redox activity. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 23, p. 3–9, 2005.

MARTINS, C. S. et al. Topical HPMC/S Nitroso glutathione Solution Decreases Inflammation and Bone Resorption in Experimental Periodontal Disease in Rats. **PLoS One**, 26:e0153716, 2016.

MARSIT, C. J. et al. A Genotype-Phenotype Examination of Cyclin D1 on Risk and Outcome of Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck. **Clinical Cancer Research**, v. 14, n. 8, p. 2371-2377, apr. 2008.

MONTEIRO, J. S. C.; PINHEIRO, A. L. B.; OLIVEIRA, S. C. P. S.; ACIOLE, G. T. S.; SOUSA, J. A. C. Influence of Laser Phototherapy (λ 660 Nm) on the Outcome of Oral Chemical Carcinogenesis on the Hamster Cheek Pouch Model: Histological Study. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 29, p. 741-745, 2011.

MONTERO, P.; SNEHAL, G. Cancer of the Oral Cavity. **Surgical Oncology Clinics of North America**, v. 24, n. 3, p.491-508, jul. 2015.

NECULQUEO, G. W.; ESTRAZULAS, M.; CHERUBINI, K.; KOTH, V. S.; SALUM, F. G. Laser photobiomodulation does not alter clinical and histological characteristics of 4-NQO-induced oral carcinomas and leukoplakia in mice. **Journal of Photochemistry & Photobiology**, p. 237-244, 2022.

NEVILLE, B. W. et al. **Patologia Oral e Maxilofacial**. 4. ed. São Paulo: Elsevier, p. 912, 2016.

OLIVEIRA, M. C. et al. HPV e carcinogênese oral: revisão bibliográfica. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 69, n. 4, p. 553-59, 2003.

OTTAVIANI, G. et al. Laser therapy inhibits tumor growth in mice by promoting immune surveillance and vessel normalization. **BioMedicine**, v.11, p. 165–172, 2016.

PAGLIONI, M. P. et al. “Tumor Safety and Side Effects of Photobiomodulation Therapy Used for Prevention and Management of Cancer Treatment Toxicities. A Systematic Review”. **Oral Oncology**, v. 93, n.1, p. 21–28, 2019.

PARK, S. Y.; JIN, M. L.; KIM, Y. H.; LEE, S. J.; PARK, G. Sanguinarine inhibits invasiveness and the MMP-9 and COX-2 expression in TPA-induced breast cancer cells by inducing HO-1 expression. **Oncology reports**, v. 31, p. 497-504, 2014.

PETRELLIS, M.C. et al. Laser photo-biomodulation of pro-inflammatory mediators on Walker Tumor 256 induced rats. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v. 177, p. 69–75, 2017.

PINHEIRO, A. L.; CARNEIRO, N. S.; VIEIRA, A. L.; BRUGNERA, A. J. R.; ZANIN, F. A.; BARROS, R. A.; SILVA, P. S. Effects of low-level laser therapy on malignant cells: in vitro study. **Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery**, v. 20, p. 23-26, 2002.

PIVA, M. R.; MARTINS-FILHO, P. R.; SOARES, R. C. Role of inflammation in oral carcinogenesis (Part I): Histological grading of malignancy using a binary system. **Oncology letters**, v. 2, p. 1225-1231, 2011.

RAMOS, G. D. E. O.; BERNARDI, L.; LAUXEN, I.; SANT'ANA FILHO, M.; HORWITZ, A. R.; LAMERS, M. L. Fibronectin Modulates Cell Adhesion and Signaling to Promote Single Cell Migration of Highly Invasive Oral Squamous Cell Carcinoma. **PloS one**, v. 11, e0151338, 2016.

REZK-ALLAH, S. S.; ELSHAFI, H. M. A.; FARID, R. J.; HASSAN, M. A. E.; ALSIRAFY, S. A. Effect of low-level laser therapy in treatment of chemotherapy induced oral mucositis. **Journal of Lasers in Medical Sciences**, v. 10, p. 125–130, 2019.

RIVERA, M. C. A. 4NQO carcinogenesis: a model of oral squamous cell carcinoma. **International Journal of Morphology**, v. 30, p. 309-314, 2012.

SALMON, A. B. et al. Update on the oxidative stress theory of aging: Does oxidative stress play a role in aging or healthy aging? **Free Radical Biology & Medicine**, v.48, n.1, p.642–655, 2010.

SAWYER A. J.; TIAN, W.; SAUCIER-SAWYER, J. K.; RIZK, P. J.; SALTZMAN W. M.; BELLAMKONDA, R. V. The effect of inflammatory cell-derived MCP-1 loss on neuronal survival during chronic neuroinflammation. **Biomaterials**, v. 35, p. 6698–6706, 2014.

SCHAFFER, M. et al. Biomodulative effects induced by 805nm laser light irradiation of normal and tumor cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v. 40, p. 253–257, 1997.

SCHALCH, T. D.; FERNANDES, K. P. S.; COSTA-RODRIGUES, J.; GARCIA, M. P.; AGNELLI, R.; BUSSADORI, S. K. Photomodulation of the osteoclastogenic potential of oral squamous carcinoma cells. **Journal of Biophotonics**, v. 9(11-12), p. 1136-1147, 2016.

SCHARTINGER, V. H.; GALVAN, O.; RIECHELMANN, H.; DUDAS, J. Differential responses of fibroblasts, non-neoplastic epithelial cells, and oral carcinoma cells to low-level laser therapy. **Supportive Care in Cancer**, v. 20, p. 523–529, 2012.

SICA, A.; ALLAVENA, P.; MANTOVANI, A. Cancer related inflammation: the macrophage connection. **Cancer letters**, v. 267, p. 204-215, 2008.

SILVEIRA, F. M.; PAGLIONI, M. D. P.; MARQUES, M. M.; SANTOS-SILVA, A. R.; MIGLIORATI, C. A.; ARANY P.; MARTINS, M. D. Examining tumor modulating effects of photobiomodulation therapy on head and neck squamous cell carcinomas. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 18, p. 1621–1637, 2019.

SMITH, H. A.; KANG, Y. The metastasis-promoting roles of tumor-associated immune cells. **Journal of molecular medicine**, v. 91, p. 411-29, 2013.

SONG, K.; ZHU, F.; ZHANG, H. Z.; SHANG, Z. J. Tumor necrosis factor- α enhanced fusions between oral squamous cell carcinoma cells and endothelial cells via VCAM-1/VLA-4 pathway. **Experimental cell research**, v. 318, p. 1707-1715, 2012.

SOUZA, A. W. S. et al. Sistema imunitário: parte III. O delicado equilíbrio do sistema imunológico entre os pólos de tolerância e autoimunidade. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, n. 6, p. 665–679, dez. 2010.

SPERANDIO, F. F. et al. Low-level laser therapy can produce increased aggressiveness of dysplastic and oral cancer cell lines by modulation of Akt/mTOR signaling pathway. **Journal of Biophotonics**, v.6, p.839-847, 2013.

SROKA, R.; SCHAFFER, M.; FUCHS, C.; PONGRATZ, T.; SCHRADER-REICHARD, U.; BUSCH, M. Effects on the mitosis of normal and tumor cells induced by light treatment of different wavelengths. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 25, p. 263–271, 1999.

STORZ, P. Mitochondrial ROS–radical detoxification, mediated by protein kinase D. **Trends in Cell Biology**, v. 17, p. 13-18, 2007.

SUBAPRIYA, R. et al. Oxidant-antioxidant status in patients with oral squamous cell carcinomas at different intraoral sites. **Clinical Biochemistry**, p. 489-493. 2002.

TANG, X. H. Oral Cavity and Esophageal Carcinogenesis Modeled in Carcinogen-Treated Mice. **Clinical Cancer Research**, v. 10, n. 1, p. 301–313, jan. 2004.

TEIXEIRA, A. K. M.; ALMEIDA, M. E. L.; DE HOLANDA, M. E.; SOUSA, F. B. Carcinoma espinocelular da cavidade bucal: um estudo epidemiológico na Santa Casa de Misericórdia de Fortaleza. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 55, p. 229–236, 2009.

THOMSON, P. J. et al. Predicting recurrence after oral precancer treatment: use of cell cycle analysis. **British Journal of Oral Maxillofacial Surgery**, v. 46, n. 5, p. 370-5, jul. 2008.

TURATTI, E. et al. Assessment of c-Jun, c-Fos and cyclin D1 in premalignant and malignant oral lesions. **Journal of Oral Science**, v. 47, n. 2, p. 71-6, jun. 2005.

VERED, M.; POLAK-CHARCON, S.; BABUSHKIN, T.; DAYAN, D. 4NQO-induced rat tongue carcinoma: an ultrastructural study. **Ultrastructural pathology**, v. 32, p. 199-205, 2008.

VLADIMIROV, A. et al. Molecular and cellular mechanisms of the low intensity laser radiation effect. **Biofizika**, v. 49, p. 339-350, 2004.

XU, Z. Z. et al. Resolvins RvE1 and RvD1 attenuate inflammatory pain via central and peripheral actions. **Nature medicine**, v.16, p. 592-597, 2010.

WANGSA, D. et al. Ki-67 expression predicts locoregional recurrence in stage I oral tongue carcinoma. **British Journal of Cancer**, v. 99, n. 7, p. 1121-8, oct. 2008.

WERNECK, C. E.; PINHEIRO, A. L.; PACHECO, M. T.; SOARES, C. P.; DE CASTRO, J. L. Laser light is capable of inducing proliferation of carcinoma cells in culture: a spectroscopic in vitro study. **Photomed Laser Surg**, v. 23, p. 300-303, 2005.

WIMALAWANSA, S. J. Nitric oxide and bone. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1192, p. 391-403, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Pathology & Genetics Head and Neck Tumours**. 5^a ed, Geneva, International Agency for Research on Cancer, p.165, 2017.

WONG, P. N.; WILSON, D. F. 4 Nitroquinoline 1-oxide-induced carcinogenesis in the rat palate. **Journal of Oral Pathology**, v. 12, n. 5, p. 375–384, oct. 1983.

ZADIK, Y. et al. Systematic review of photobiomodulation for the management of oral mucositis in cancer patients and clinical practice guidelines. **Support Care Cancer**, v. 27, p. 3969–3983, 2019.

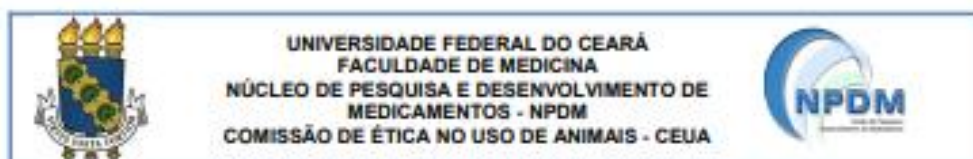
ZANIN, T.; ZANIN, F.; CARVALHOSA, A. A.; SOUZA DE CASTRO, P. H.; PACHECO, M. T.; ZANIN, I. C.J.; BRUGNERA, A. Uso de Laser de Diodo de 660 nm na Prevenção e Tratamento da Mucosite Oral Humana Induzida por Radioterapia e Quimioterapia. **Photomedicine and Laser Surgery**, v.28, n.2, p. 233- 237, 2010.

ZACCHIGNA, S. et al. Is laser biostimulation safe even when performed in neoplastic fields? **Journal of Clinical Oncology**, v. 33, 2015.

ZECHA, J. A. E. M. et al. Low-Level Laser Therapy/photobiomodulation in the Management of Side Effects of Chemoradiation Therapy in Head and Neck Cancer: Proposed Applications and Treatment Protocols. **Supportive Care in Cancer**, v. 24, n. 6, p. 2793–2805, 2018.

ZECHA, J. A. E. M. et al. Low-level laser therapy/ photobiomodulation in the management of side effects of chemoradiation therapy in head and neck cancer: part 2: proposed applications and treatment protocols. **Supportive Care in Cancer**, v. 24, p. 2793–2805, 2016.

ANEXOS



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **"AVALIAÇÃO DA FOTOBIMODULAÇÃO EM MODELO DE CARCINOGENESE ORAL INDUZIDA POR 4-NITROQUINOLINA-N-ÓXIDO (4-NQO) EM CAMUNDONGOS SWISS."** registrada com o protocolo **25070622-0**, sob a responsabilidade **Ana Paula Negreiros Nunes Alves e José Ronaldo Lins do Carmo Filho** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM) da Universidade Federal do Ceará, na reunião de 23 / 06 / 2022.

We hereby certify that the project entitled **"EVALUATION OF PHOTOBIMODULATION IN A MODEL OF ORAL CARCINOGENESIS INDUCED BY 4-NITROQUINOLINE-N-OXIDE (4-NQO) IN SWISS MICE."** identified by the protocol number **25070622-0**, and conducted by **Ana Paula Negreiros Nunes Alves and José Ronaldo Lins do Carmo Filho** which involves the production, maintenance or use of animals belonging to the filo Chordata, sub-vertebrate Vertebrata (except humans), for the purpose of scientific research - is in accordance with the provisions of the Law number 11,794, from October 8th, 2008, of Decree number 6,899, from July 15th, 2009, and with the regulations issued by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA), was **APPROVED** by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA) from the Center for Research and Development of Medicines (NPDM) of the Federal University of Ceará, in the meeting of 06 / 23 / 2022.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início: AGOSTO/2022 Fim: DEZEMBRO/2022
Espécie	Camundongo heterogêneo
Linagem	Swiss
Nº de animais autorizados	96
Peso	30 gramas
Idade	6 a 8 semanas
Sexo	Macho
Origem (fornecedor)	Biotério do NPDM
Local do experimento	Biotério do NPDM

Documento assinado eletronicamente

 LUIS LAZARON BRAGA DE OLIVEIRA
 E-mail: luis@npdm.ufce.br
 Assinatura eletrônica: /assinatura.ufce.br

Fortaleza, Ceará, 24 de junho de 2022

Coordenação da Comissão de Ética e Uso de Animais
 Núcleo de Pesquisas e Desenvolvimento de Medicamentos
 Universidade Federal do Ceará

Rua Coronel Nunes de Melo, 1000, Rodolfo Teófilo - Fortaleza/CE - CEP 60430-275 - Tel: 55 (85) 3366-8338
 Horário de atendimento: Segunda a Sexta, das 9h às 12h e das 13h30 às 18h. E-mail: ceua-npdm@ufce.br