

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

**ATUAÇÃO DO LASER DE BAIXA POTÊNCIA NA
CARCINOGENESE ORAL: ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS**

Aracaju/Fevereiro

2014

CAROLINE FARIAS LEMOS

**ATUAÇÃO DO LASER DE BAIXA POTÊNCIA NA
CARCINOGENESE ORAL: ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pósgraduação em Odontologia, da Universidade Federal de Sergipe, para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientador: Profa. Dr^a. Marta Rabello Piva

Co-orientadora : Prof^a. Dr^a. Rosilene Calazans Soares

Aracaju/Fevereiro

2014

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

L557a Lemos, Caroline Farias
Atuação do laser de baixa potência na carcinogênese oral :
estudo experimental em ratos / Caroline Farias Lemos, orientador,
Marta Rabello Piva, co-orientadora Rosilene Calazans Soares. --
Aracaju, 2014.
00 f. : il.

Dissertação (Mestrado em odontologia) - Programa de Pós-
Graduação em Odontologia, Pró-Reitoria de Pós-Graduação e
Pesquisa, Universidade Federal de Sergipe, 2014.

1. Câncer. 2. Tumores odontogênicos. 3. Boca - Tumores. 4.
Dentes - Tumores. 5. Inflamação. 6. Lasers em odontologia. 7.
Tratamento dentário. 8. Odontologia. 9. Oncologia. I. Piva, Marta
Rabello, orient. II. Soares, Rosilene Calazans, co-orient. III. Título.

CDU 616.31-006.6

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

A comissão julgadora dos trabalhos de defesa de Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em 28 de 02 de 2014, considerou a candidate Caroline Farias Lemos aprovada.

1. Profa. Dra. Marta Rabello Piva _____
2. Profa. Dra. Graziella Chagas Jaguar _____
3. Prof. Dr. Paulo Ricardo Saquete Martins - Filho _____

DEDICATÓRIA

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a minha família,
Que SEMPRE está ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

Para mim este é um momento crucial. Me sinto particularmente privilegiada por poder concretizar mais um sonho profissional na faculdade onde minha vida acadêmica começou e junto dos professores e familiares que me viram crescer e amadurecer.

Começo meu agradecimento falando do meu alicerce, meu modelo meu amor...minha mãe. Palavras me faltam nesse momento para expressar o que seria de mim sem sua força, suas palavras, seus ensinamentos e principalmente, seus exemplos pois desde cedo me falou que a única herança que me deixaria e que ninguém jamais me tiraria era o saber. Mãe, esse pequeno parágrafo que te dedico não é suficiente para descrever o significado de ser sua filha. Te amo.

Não menos importante neste momento está o meu pai pois tenho certeza de que do seu jeito torce para que eu consiga tudo que desejo e me ama incondicionalmente. Meu exemplo de honestidade e caráter. Muito obrigada Pai...também te amo

Sempre disse que tive a felicidade de ter avós e sentir todo amor que só eles são capazes de dar. Com relação ao meu avô José foi dobrado pois ele além de ser avô, incontáveis vezes foi meu pai também me contava histórias e ajudou muito na minha formação. Minha avó Bernô me deu todo carinho que uma neta pode receber. Sinto a presença deles a todo momento. Espero vê-los novamente um dia.

Aos meus irmãos Alcino, Cristiane, Carla e Carina sempre meus espelhos. Amo voçes.

À Silvia, minha amiga de todas as horas. Muito obrigada

A minha orientadora Marta, saiba que tenho profundo respeito pela pessoa e mestre que és para mim. Obrigada!!

A Nayane, Renatinha, Andressa, Daiane e Carlos pelos vários dias de indução no laboratório. Sem voçes esse trabalho não teria acontecido.

A Prof.Rosilene por ter facilitado todo o andamento da pesquisa. Muito obrigada!!!

A todos os professores do mestrado: André, Fabiano, Fátima, Bernardo, Luiz Carlos, Cleverson, Adriano, Waldecy, Amália e Liane.

Agradeço ao meu cunhado Heli por ter me alertado desde a graduação sobre a importância do envolvimento científico.Valeu!!!

A Débrora por ter se disponibilizado a ajudar num momento critico da pesquisa. Ainda colheremos esse fruto!!!!!!

Por último e não menos importante agradeço a Deus por TUDO que tenho e conquistei na minha vida e carreira. Sei que em todos os momentos bons e ruim sempre lembro de como é importante ter fé e acreditar que se é capaz de conseguir concretizar o que se deseja.

ΕΠΪΓΡΑΦΕ

EPÍGRAFE

“Ontem passado. Amanhã futuro. Hoje agora.
Ontem foi. Amanhã será. Hoje é. Ontem
experiência adquirida. Amanhã lutas novas. Hoje,
porém, é a nossa hora de fazer e de construir”

Chico Xavier

RESUMO

RESUMO

A inflamação crônica vem sendo associada às diversas etapas da carcinogênese e para o estudo das mesmas, modelos animais vêm sendo utilizados. O laser de baixa potência também tem sido analisado devido ao seu potencial anti-inflamatório e proliferativo. Com o objetivo de relacionar a intensidade do infiltrado inflamatório com as alterações celulares ocorridas nessas etapas, bem como o potencial anti-inflamatório e proliferativo da laserterapia na indução e progressão tumoral, foram utilizados 48 ratos Wistar, divididos em 8 grupos, 4 controles e 4 testes, onde 6 grupos foram submetidos à aplicação do carcinógeno 4NQO durante 12 e 16 semanas, em língua, associada ou não à laserterapia. Após eutanásia dos animais, as línguas foram removidas, analisadas macroscopicamente e preparadas para estudo histomorfológico, com coloração em HE. Como resultado, só foram observadas lesões clinicamente visíveis, nos grupos G6 e G7 mas, histologicamente, pôde-se observar Carcinomas de Células Escamosas Orais (CCEOs) após 16 semanas de indução, em 66,66% do grupo G4, onde não foi aplicado o laser. No grupo G5, onde foi utilizada a laserterapia, após suspensão do 4NQO, as lesões permaneceram como Displasias, sendo 33,33% DM (Displasia Moderada) e 66,66% DS (Displasia Severa). Após 20 semanas de indução, todos os casos apresentaram CCEOs e a laserterapia contribuiu com a formação de lesões hiperplásicas; Já a intensidade do infiltrado inflamatório, necessário para desencadear o processo carcinogênico, não esteve relacionada com quantidade ou tipo de alteração celular encontrada, nem com a laserterapia, quando comparada com os grupos controles. Assim, a ausência de lesões malignas no grupo G5, permite concluir que a laserterapia na metodologia estudada é capaz de inibir o avanço da carcinogênese nas fases iniciais, desde que eliminado o fator de risco, como também, ativar o potencial proliferativo do CCEO já instalado, mas não se pode afirmar que contribua para a agressividade desses carcinomas.

Palavras-chaves: Carcinoma; Inflamação; laser

ABSTRACT

ABSTRACT

Chronic inflammation has been associated with various stages of carcinogenesis, which have hitherto been studied with the aid of animal models. Low-power laser has also been investigated for its anti-inflammatory and proliferative potential. In order to establish a correlation between the intensity of inflammatory infiltrate and cellular changes taking place during those stages as well as the anti-inflammatory and proliferative potential of laser therapy in tumor induction and progression 48 rats were divided into 8 groups, namely, 4 control groups and 4 experimental groups. Six rats in each group were administered carcinogen 4NQO on the tongue during 12 and 16 weeks, in combination - or not - with laser therapy. After euthanasia, their tongues were removed, examined macroscopically and prepared for histomorphological study with hematoxylin and eosin (HE) stain. As a result, clinically visible lesions were only observed in groups G6 and G7. Nevertheless, from a histological standpoint, Oral Squamous Cell Carcinomas (OSCCs) were observed after 16 weeks of induction in 66.66% of group G4, which had received no laser application. In group G5, where laser therapy was used after 4NQO had been discontinued, the lesions remained as dysplasias, 33.33% of which were moderate (MD) and 66.66% Severe (SD). After 20 weeks of induction all cases exhibited OSCCs and laser therapy contributed to the formation of hyperplastic lesions. Inflammatory infiltrate intensity, however, which was necessary to trigger the carcinogenic process, was not related to the amount or type of cell changes found, nor was it linked to the laser therapy, when compared with the control groups. Thus, the absence of malignant lesions in group G5 shows that laser therapy effectively inhibits the advancement of early-stage carcinogenesis, provided that the risk factor is eliminated. Furthermore, laser therapy was also efficacious in further activating the proliferative potential of already-installed OSCCs, but can not be held responsible for the aggressivity of it

Keywords: Carcinoma, inflammation, laser

SUMÁRIO

SUMÁRIO

RESUMO	xiii
ABSTRACT	xv
1 - INTRODUÇÃO	19
2 - REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1 <i>CARCINOGENÊSE</i>	22
2.2 <i>INFLUÊNCIA DA INFLAMAÇÃO NA CARCINOGENÊSE</i>	26
2.3 <i>LASER</i>	30
2.3.1 <i>EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DO LASER</i>	33
2.3.2 <i>DOSIMENTRIA</i>	34
3- PROPOSIÇÃO	37
4- METODOLOGIA	39
4.1 <i>DESENHO DO ESTUDO</i>	39
4.2 <i>ANIMAIS</i>	39
4.2.1 <i>IMPLICAÇÕES ÉTICAS:</i>	39
4.3 <i>ESTUDO LABORATORIAL</i>	39
4.3.1 <i>APLICAÇÃO DO CARCINÓGENO</i>	40
4.3.2 <i>LASERTERAPIA</i>	42
4.3.3 <i>APLICAÇÃO E DOSIMETRIA</i>	43
4.3.4 <i>PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO E PREPARO DAS LÂMINAS</i>	45
4.4.1 <i>ANÁLISE MACROSCÓPICA DAS PEÇAS</i>	45
4.4.2 <i>ANÁLISE HISTOMORFOLÓGICA</i>	45
4.4.4 <i>ANÁLISE ESTATÍSTICA</i>	47
4.4.4.1 <i>ANÁLISE DESCRITIVA</i>	47
5- RESULTADOS	49
5.1 <i>ESTUDO MACROSCÓPICO</i>	49
5.2 <i>ESTUDO HISTOMORFOLÓGICO</i>	50
5.3 <i>ANÁLISE ESTATÍSTICA</i>	58
6- DISCUSSÃO	60
7 - CONCLUSÃO	68
REFERÊNCIAS	70
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	79
ANEXOS	80

INTRODUÇÃO

1 - INTRODUÇÃO

O processo de formação do câncer oral é o resultado de várias mutações adicionais que podem gerar lesões potencialmente malignas (LPM) na cavidade oral, até que ocorra a invasão dos ceratinócitos alterados na lâmina própria, gerando o carcinoma de células escamosas oral (CCEO). A aparência das LPM e do CCEO é muito diversificada e de evolução imprevisível, dificultando a identificação das fases da carcinogênese, que diferenciam uma LPM do CCEO.

Embora existam divergências quanto ao papel da inflamação na carcinogênese oral, é sabido que o infiltrado inflamatório está presente, em quantidade variada, nas LPM e nos CCEO. Para 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 recentes tentam demonstrar que a inflamação pode desempenhar papéis diferenciados nas etapas da carcinogênese, como por exemplo, atuando como fator protetor nos estágios iniciais (PIVA *et al.*, 2011(a)). Porém, é possível que favoreça a progressão tumoral, pois após a fase de iniciação as alterações celulares são irreversíveis e as citocinas inflamatórias podem favorecer a invasão e metástase.

Atualmente, atenção especial tem sido dada ao uso do laser de baixa potência devido à sua ação anti-inflamatória, analgésica e biomoduladora. A inibição da ciclooxigenase (COX), diminuindo as substâncias pró-inflamatórias locais, pode representar um dos mecanismos pelos quais a laserterapia, possivelmente atuaria como uma importante ferramenta para o controle do processo inflamatório, sem produzir efeitos adversos (ALMEIDA & PAGNONCELLI, 2004).

Existem muitos estudos sobre a ação da terapia fotodinâmica (TFD) em LPM e vários tipos de câncer (JERJES *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2012) embora ainda seja muito discutida. No entanto, não existem publicados na literatura estudos sobre o potencial terapêutico do laser de baixa potência em LPM, embora seu efeito proliferativo tenha sido questionado para o tratamento das neoplasias malignas, onde alguns estudos indicam progressão do CCEO (MONTEIRO *et al.*, 2011).

Modelos animais vêm sendo utilizados para avaliar as diversas fases da carcinogênese, visto que não seria possível tal avaliação em humanos. Carcinógenos químicos são apresentados ao longo dos anos como uma alternativa para esses

estudos, no entanto notou-se que o 4NQO (4-nitroquinoline1-oxide) é a substância mais utilizada por diferenciar melhor as fases da carcinogênese e desenvolver lesões que mais se assemelham às encontradas em humanos (KANOJIA & VAIDYA, 2006).

Portanto, tornou-se objetivo deste estudo, avaliar a ação do laser de baixa potência nas diversas fases da carcinogênese através de um modelo experimental induzido pelo 4NQO, na tentativa de verificar seu papel inibidor ou promotor de LPM e cancerosas. Para tanto, faz-se necessário comparar a intensidade do infiltrado inflamatório com as alterações morfológicas encontradas, visto que alguns estudos demonstram *in vitro* efeitos proliferativos em células cancerosas (CASTRO *et al.*, 2005; WERNECK *et al.*, 2005).

REVISÃO DE LITERATURA

2 - REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CARCINOGENESE

O corpo humano é formado por células que se organizam em tecidos. Essas células sofrem duplicação, amadurecimento e morte renovando-se a cada ciclo. O processo pelo qual o organismo perde a capacidade de controle do ciclo celular com alterações a nível molecular e posterior desenvolvimento de neoplasia maligna é chamado de carcinogênese. Essas alterações levam à ativação de oncogenes ou inativação dos genes supressores de tumor que coordenam funções essenciais na célula como proliferação, diferenciação e morte por apoptose (PITOT & DRAGAN, 1991; PITOT, 1993).

A formação do câncer ou carcinogênese, em geral ocorre lentamente, podendo levar vários anos para que uma célula cancerosa origine um tumor visível. Logo, esse processo pode ser dividido didaticamente em três estágios: Iniciação, promoção e progressão (YOKOTA & SUGIMURA, 1993).

A iniciação é o resultado da exposição das células a uma dose apropriada de agente carcinogênico (iniciador). Uma vez iniciada a célula torna-se propensa a originar um tumor. Apesar da iniciação da célula não ser suficiente para a formação de tumor, ela provoca lesão permanente no DNA (mutação), rápida e irreversível, a qual possui memória (PITOT & DRAGAN, 1991; PITOT, 1993; YOKOTA & SUGIMURA, 1993 MARTÍNEZ, 2012).

Ao contrário do que ocorre na iniciação, os agentes promotores são reversíveis e não são mutagênicos mas são capazes de induzir tumores nas células iniciadas. Um exemplo desta substância é o 12-*O*-Tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA), um potente promotor tumoral que atua como ativador da proteinoquinase C, enzima que fosforila vários substratos envolvidos nas vias de transdução de sinais. O infiltrado inflamatório também pode atuar como agente promotor visto que vários trabalhos ligam a sua presença com a evolução da carcinogênese (CONTRAN *et al.*, 2010; KAMP *et al.*, 2011; MANTOVANI *et al.*, 2008; PARK *et al.*, 2013; PARK *et al.*, 2014; SICA *et al.*, 2008).

Caso o processo evolua, pode chegar no estágio final da carcinogênese, o qual é chamado de progressão e possui caráter irreversível. Caracteriza-se pelo desenvolvimento de neoplasia maligna instalada. O organismo não é mais capaz de controlar o crescimento celular, há uma invasão de tecidos adjacentes e, caso haja desprendimento de células neoplásicas, metástase (PITOT, 1993).

Para o tecido epitelial de revestimento, o processo neoplásico pode evoluir em múltiplas etapas, as quais incluem hiperqueratose, hiperplasia, displasias em diversos graus, carcinoma in situ e por fim, o surgimento de Carcinoma de Células Escamosas Orais (CCEO) (KANOJIA & VAIDYA, 2006; KUJAN *et al.*, 2007).

O conhecimento a respeito de carcinogênese química se deve principalmente a Sir Percival Pott, o qual relatou a incidência aumentada de câncer de pele escrotal em limpadores de chaminés expostos cronicamente à fuligem. A partir daí, vários agentes químicos foram descobertos, desde material extraído de fosséis, com combustão incompleta, a substâncias produzidas em laboratórios (CONTRAN *et al.*, 2010).

As alterações celulares ocorridas na carcinogênese química foram estudadas por Vered (2008) o qual concluiu que as mudanças mais significativas foram observadas nas células do front de invasão e incluiu modificações únicas na lâmina basal, presença de vesículas e surgimento de microfilamentos citoplasmáticos apresentando um arranjo paralelo.

Os carcinógenos químicos podem formar adutos no DNA da célula ou induzir modificações como rearranjos cromossômicos ou deleções de pares de base e, caso essas alterações não sejam reparadas, irão ocorrer alterações na sequência do DNA da célula após replicação do mesmo (SINGH & FARMER, 2006).

Uma variedade dessas substâncias foi testada, entretanto, muitos falharam devido à pequena incidência na formação de neoplasia maligna. Dentre as que são eficientes quanto a formação de lesões malignas estão o 7,12-Dimetilhlbenz(a)anthracene (DMBA) e o 4-nitroquinolina-1-óxido (4NQO) (DAYAN *et al.*, 1997; BASKARAN *et al.*, 2010; DE VISSCHER *et al.*, 2013; MACHADO *et al.*, 2010; SCHIOPPA *et al.*, 2011; SUWAKI *et al.*, 2010).

O DMBA é um carcinógeno de órgão e sítio específico que requer ativação metabólica no fígado para se tornar cancerígeno. O epóxido dihidrodiol e outras espécies reativas de oxigênio tóxicos formados durante sua ativação metabólica podem causar lesões cromossômicas por ligação com resíduos de DNA contribuindo para a carcinogênese. É solúvel em óleo mineral e a concentração mais utilizada para indução de CCEO é 0,5% com uma frequência de 3 vezes por semana e aplicação tópica. A severidade das lesões vão acompanhar a quantidade de semanas de indução pois com 5 a 8 semanas são encontradas lesões displásicas, 12 semanas, displasias severas e carcinomas e com 14 semanas, apenas lesões malignas (BASKARAN *et al.*, 2010; MACHADO *et al.*, 2010; MAHAKIAN, *et al.*, 2013; MANOHARAN, *et al.*, 2010).

O uso do 4NQO foi originalmente descrito por Wallenius e Lekholm (1973). Desde então vários estudos vêm utilizando esse carcinógeno com o objetivo de induzir LPM e malignas em animais. É um composto solúvel em água e por isso pode ser utilizado tanto na água de beber dos animais, com diferentes concentrações (25ppm e 50ppm), quanto como aplicação tópica (0,1% e 0,5%) (AGUIAR *et al.*, 2006; FRACALOSSO, *et al.*, 2010; MINICUCCI *et al.*, 2011; NAUTA *et al.*, 1996; SUWA *et al.*, 2014; VERED *et al.*, 2007).

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 carcinogêneos presentes no tabaco, o qual é um importante fator de risco para o câncer oral. Exposições ao 4NQO apresentam alterações moleculares e histológicas semelhantes à carcinogênese oral humana. Outra ação carcinogênica do 4NQO é a redução enzimática do seu grupo nitro o qual passa a ser 4-Hidroxi-aminoquinolina-1 óxido (4HAQO) e os quatro elétrons produtos dessa redução seriam metabólitos carcinogênicos os quais proporcionariam a formação de adutos de DNA (KANOJIA & VAIDYA, 2006; VERED *et al.*, 2008).

A carcinogênese é um processo muito complexo e pode evoluir em fases. Para que novos tratamentos sejam descobertos e para que esse processo possa ser interrompido antes do surgimento de lesões irreversíveis e/ou metástases, os modelos

animais vêm sendo utilizados em larga escala em pesquisas com indução da câncer visto que é impossível tais estudos em seres humanos, devido a impossibilidade de realização de biopsias em todas as fases (FUJIWARA *et al.*, 2012; MOGNETTI *et al.*, 2006; PITOT, 1993).

O ensaio da carcinogênese em língua de rato é um modelo útil para o estudo, fase por fase do Carcinoma de Células Escamosas Orais (CCEO) pois, além das camadas que compõem o epitélio serem semelhantes, as lesões provocadas pela indução com o 4NQO nesses animais se assemelham com as encontradas em humanos (MOGNETTI *et al.*, 2006; PITOT, 1993; TANAKA *et al.*, 2011).

A indução da carcinogênese inclui todas as fases da mesma (iniciação, promoção e progressão) tem início com a aplicação periódica e continuada do carcinógeno, até as células estarem irreversivelmente alteradas, que varia entre 2 e 4 semanas, segundo alguns estudos (NAUTA *et al.*, 1996; STEIDLER & READE, 1986). Alguns trabalhos mostram que, os epitélios dos grupos controle, bem como aqueles induzidos com 4NQO por 4 semanas, não sofreram alterações histológicas. Após 12 semanas de indução, foram observadas hiperplasias e displasias epiteliais leves e moderadas. Displasias moderadas, severas e CCEO, na maioria dos casos, são observados após 20 semanas de indução (FRACALLOSSI *et al.*, 2010; MINICUCCI *et al.*, 2011; KAPLAN *et al.*, 2002).

Henriques *et al.* (2011) desenvolveu trabalho com ratos wistar distribuídos em dois grupos: 15 animais no grupo experimental e 5 no controle. No grupo experimental, os animais foram subdivididos em três grupos de 5 ratos cada, os quais receberam a aplicação de cancerígeno 4NQO diluído a 0,5% em propilenoglicol, com auxílio de pincel, quatro vezes por semana durante 2, 3 e 4 meses. Os animais foram privados de água por 5 horas após a aplicação. Os resultados mostraram que o tempo de exposição de 4 meses provocou alterações clínicas mais acentuadas. O estudo concluiu que o 4NQO é capaz de produzir todas as fases da carcinogênese e que o modelo animal utilizado mostrou-se bastante eficiente.

Aguiar *et al.* (2006) realizou um estudo com a aplicação tópica do 4NQO com concentração de 0,5% , diluído em propilenoglicol, 3 vezes por semana durante 8, 16,

20 e 24 semanas e encontrou aumento da atividade mitótica e hiperplasia da camada basal nos grupos induzidos comparados ao controle porém não achou lesões macroscópicas nem histológicas de CCEO nesses períodos estudados. Com a mesma metodologia, Rich & Reade (2001) estudou a carcinogênese durante 2, 4, 8, 12, 16 e 20 semanas e encontraram displasia leve a partir da 4ª semana de indução; displasia moderada a partir da 12ª semana; e severa com 16 semanas de indução. Com 20 semanas encontrou apenas displasia severa sem o aparecimento de CCEO.

2.2 INFLUÊNCIA DA INFLAMAÇÃO NA CARCINOGENESE

O sistema imunológico é responsável pelas respostas do organismo a um estímulo externo ou interno. As células do sistema imunitário são capazes de distinguir as moléculas que são próprias do corpo das moléculas estranhas, quer sejam elas parte de um vírus, bactéria ou célula maligna, já que esta possui proteínas diferentes das células normais. Os anticorpos ou imunoglobulinas, fazem parte deste sistema de defesa sendo eles produzidos em grande quantidade quando entram em contato com antígenos, agindo especificamente contra os mesmos (O'SULLIVAN *et al.*, 2012; YAMADA, 1998).

Num estudo realizado por Koebel *et al.* (2007) doses baixas do cancerígeno 3-methylcholanthrene (MCA) foram injetadas por via subcutânea em ratos do tipo selvagem. O desenvolvimento do tumor foi monitorado por 200 a 230 dias. Os ratos que desenvolveram tumor foram separados e o restante foi tratado com imunoglobulinas e anticorpos monoclonais, os quais bloqueiam componentes imunológicos específicos. Esses ratos foram observados por mais 100 dias e células tumorais foram transplantadas para ratos imunodeficientes. Nestes animais, o desenvolvimento do tumor foi mais evidente do que nos imunocompetentes. Portanto, o estudo concluiu que o sistema imunológico pode destruir ou controlar a doença por longo período, deixando o processo em equilíbrio e tornando o câncer uma doença crônica.

Alguns autores usaram a quantidade de infiltrado como um dos parâmetros para suas gradações histológicas, por considerarem que a ausência de inflamação,

assim como a queda do sistema imunológico por algum motivo externo à doença, estavam relacionados à progressão tumoral, enquanto outros questionavam o papel da mesma, sugerindo que as citocinas, mediadoras da inflamação, criariam um microambiente favorável para o desenvolvimento do câncer, podendo ter papel diferenciado em cada fase da carcinogênese (ANNEROTH *et al.*, 1987; BRYNE *et al.*, 1989; PIVA *et al.*, 2013).

Quando um tecido sofre algum dano, físico, químico ou biológico, o sistema imunológico é imediatamente ativado. Uma complexa reação no tecido conjuntivo vascularizado se inicia com o objetivo de reparar a lesão. Essa reação é chamada de inflamação e, apesar de estar ligada ao processo de reparação, pode ser potencialmente lesiva caso não seja interrompida pelo próprio sistema imunológico ou por drogas externas. A inflamação é mediada por citocinas e quimiocinas como: interleucinas, TGF β e TNF α as quais regulam as funções dos linfócitos e estão envolvidas na imunidade natural (ALLAVENA *et al.*, 2011; CONTRAN *et al.*, 2010).

As citocinas são produzidas durante a resposta inflamatória principalmente por macrófagos e linfócitos, mas também por células do tecido epitelial. Seus efeitos muitas vezes são redundantes e podem influenciar a síntese ou ação de outras citocinas. Dentre as que regulam a ação dos leucócitos estão a IL-2 e IL-4 as quais favorecem o crescimento dos linfócitos enquanto a IL-10 e TGF β são reguladores negativos da resposta imune, sendo este último, responsável pelo controle do crescimento epitelial. O TNF α está envolvido na imunidade natural e fase aguda da inflamação (ALBERTINI *et al.*, 2008; GERMANO *et al.*, 2008; ALLAVENA *et al.*, 2011; CONTRAN *et al.*, 2010; PIVA *et al.*, 2013).

A ideia de que a inflamação pode influenciar negativamente a evolução do câncer, surgiu no século XIX e ficou por muitos anos esquecida mas, atualmente, muitos trabalhos vêm sendo publicados com o intuito de entender o papel da inflamação na carcinogênese com o propósito de interceptar o processo de evolução do câncer, visto que esses autores acreditam que em um determinado momento, o processo inflamatório não mais desempenha um papel protetor e sim estimulador da progressão de massas tumorais (ALLAVENA *et al.*, 2011; BALKWILL &

MANTOVANI 2001; BALKWILL *et al.*, 2005; MANTOVANI *et al.*, 2001 e 2008; PARK *et al.*, 2014; PIVA *et al.*, 2011 e 2013; SICA *et al.*, 2008).

Sica *et al.* (2008) fizeram um levantamento de vários estudos que tentaram ligar o câncer à inflamação e afirmaram que existem dois caminhos que conectam a inflamação ao câncer, a via intrínseca e a via extrínseca. A via intrínseca é ativada por eventos genéticos que causam neoplasias. Estes eventos incluem a ativação de vários tipos de oncogenes, por 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 (tumores da mama). Por contraste, na via extrínseca, condições inflamatórias ou infecciosas aumentam o risco de desenvolvimento de câncer em determinados locais anatômicos (côlon, próstata e pâncreas). As duas vias convergem, resultando na ativação de fatores de transcrição (NF- κ B) e fator de transcrição 3 (STAT3). Estes fatores de transcrição 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 numa massa tumoral pode levar à progressão do tumor.

Outros autores também relacionaram o microambiente tumoral a evolução da carcinogênese. Eles acreditam que na maioria dos cânceres humanos, células inflamatórias sustentam a progressão da lesão, proporcionando um ambiente favorável (BALKWILL & MANTOVANI, 2001).

Com o objetivo de avaliar as concentrações de FoxP3⁺, CD4⁺ e CD25⁺, e relacioná-las com o desenvolvimento de câncer, Zhao *et al.* (2013) utilizou uma concentração de 25ppm do 4NQO na água de beber dos animais durante 16 e 20 semanas e manteve uma temperatura de 22 a 26° C com períodos de claro e escuro de 12 horas. Encontrou uma maior concentração dessas citocinas inflamatórias em região

do tumor e concluiu que o aumento de células Tregs nos nódulos linfáticos das lesões malignas está relacionado com o desenvolvimento das mesmas.

Um modelo de rato transgênico foi utilizado em um estudo de Schioppa *et al.* (2011) o qual induziu câncer em pele de ratos com DMBA e comprovou que células B e/ou T e seus mediadores têm importante papel na indução do papiloma, e na progressão tumoral. O autor provou que animais que não possuíam células B capazes de produzir TNF α não desenvolviam câncer ao passo que o aumento na concentração dessas células atuava diretamente na concentração de TNF α e conseqüentemente, na progressão tumoral.

Piva *et al.* (2013) avaliaram a inflamação em 20 casos de DEO e 40 casos de CCEO e concluíram que a reação antitumoral exercida pelos linfócitos TCD8 é mais efetiva na DEO porém, nos casos de CCEO é inversamente proporcional à invasão. Já uma grande quantidade de NF- κ B e TNF α no CCEO predispõe à progressão do câncer.

As lesões potencialmente malignas são em sua maioria de origem inflamatória. Uma das principais lesões com potencial de se transformar em CEO é a queilite actínica, a qual demonstrou, através de um levantamento epidemiológico, ter altas taxas de prevalências em trabalhadores rurais expostos ao sol. (MARTINS-FILHO *et al.*, 2011). Alguns autores relatam que a malignização desta lesão sofre influência direta de células do infiltrado inflamatório (PAIVA, 2012).

Segundo Paiva (2012), a intensidade do infiltrado inflamatório na queilite actínica interfere na desorganização da arquitetura epitelial, característica da displasia epitelial, e contribui para o agravamento da lesão. A autora realizou um estudo no qual analisou o processo inflamatório utilizando um método visual subjetivo para determinar a área de inflamação, que seria avaliada objetivamente por contagem de células. Um escore foi utilizado para classificar a intensidade do infiltrado.

Numa recente revisão de literatura, 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; 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 mais para dentro do tumor.

2.3 LASER

A palavra LASER é o acrônimo de Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation (Amplificação da Luz por Emissão Estimulada de Radiação). É uma forma de energia que se transforma em energia luminosa, visível ou não, dependendo da matéria que produza esse tipo de radiação. A luz LASER possui propriedades exclusivas que a diferenciam de outras fontes luminosas, são elas: monocromaticidade, coerência e colimação/direcionalidade. (GARCEZ *et al.*, 2012)

A monocromaticidade é a capacidade que a luz laser tem de não se decompor em várias cores e sim em apenas uma, sendo com isso uma luz pura. Esta característica é importante porque o tecido humano possui uma absorção seletiva. A coerência é devida a emissão estimulada que gera fótons coerentes cujas energias se somam e viajam na mesma direção. Já a colimação permite que o raio laser sofra uma divergência angular muito pequena proporcionando uma concentração de energia precisa num ponto focal. (EDUARDO *et al.*, 2010)

Nos tecidos biológicos o comportamento da luz laser se apresenta através de quatro processos: Reflexão, difusão, absorção e transmissão (Figura 1). Várias são as aplicabilidades da terapia com laser de baixa potência e um dos primeiros relatos da sua utilização foi em 1966 quando Endre Mester realizou experimentos *in vitro* para observar o comportamento celular após irradiação com potências reduzidas. A sua ação antiinflamatória e analgésica vem sendo utilizada como importante ferramenta para várias enfermidades (KARU, 1988).

PINHEIRO *et al.*, 2002; RENNO *et al.*, 2007; SCHARTINGER *et al.*, 2012; WERNECK *et al.*, 2005).

Monteiro *et al.* (2009) estudaram o efeito da terapia com laser de baixa potência (TLBP), com os comprimentos de onda de $\lambda 660\text{nm}$ e $\lambda 790\text{nm}$, na evolução de lesões de displasias epiteliais orais (DEO) químico-induzidas com DMBA, 0,5% diluído em óleo mineral. 16 ratos hamsters foram divididos em grupo controle, laser $\lambda 660\text{nm}$ e laser $\lambda 790\text{nm}$. No grupo experimental o carcinógeno foi aplicado 3 vezes por semana durante 6 semanas e a laserterapia durante 2 semanas com intervalo de 48h e uma dose de 4 J/cm^2 . Os autores concluíram que o uso de ambos os comprimentos de onda com a dose de 4J/cm^2 pode aumentar a severidade da DEO.

Segundo Monteiro *et al.* (2011), a terapia com laser de baixa potência causa uma significativa progressão na severidade de CCEO, apesar de não ser mutagênico, na cavidade oral de hamsters. Neste estudo o grupo no qual houve a aplicação do laser com uma dose de $56,4\text{J/cm}^2$ durante 4 semanas após 8 de aplicação de DMBA foi comparado com o que ficou parado durante as mesmas 4 semanas. Os resultados mostraram que com 8 semanas de aplicação do DMBA o grupo controle (G1) apresentou 100% de CCEO bem diferenciado. Após 12 semanas, os animais que receberam terapia com laser de baixa potência durante 4 semanas (G3) apresentaram 40% de tumor bem diferenciado e 40% pouco diferenciado enquanto o que não recebeu a terapia com laser de baixa potência (G2) nessas mesmas 4 semanas apresentou 80% de CCEO bem diferenciado e 20% moderadamente diferenciado. Utilizando os mesmos parâmetros do estudo anterior apenas aumentando a dose para 95J/cm^2 , Monteiro *et al.* (2013) chegou a mesma conclusão com relação ao agravamento do CCEO e o uso de terapia com laser de baixa potência.

Dortbudak *et al.* (2000) estudaram *in vitro* o comportamento de osteoblastos derivados de células mesenquimais irradiados por laser de diodo. 30 culturas foram irradiadas três vezes com intervalos de dois dias entre as irradiações. Outras 30 culturas foram usadas como controle. O método de fluorescência antibiótica por tetraciclina foi empregado para comparar o crescimento ósseo após um período de 8, 12 e 16 dias. As culturas irradiadas apresentaram maior quantidade de depósitos ósseos fluorescentes ao serem comparadas com as culturas não irradiadas. Concluíram

que o laser de diodo de baixa potência teve um efeito bioestimulatório significativo sobre a produção de matriz óssea.

Khadra *et al.* (2005) e Schartinger *et al.* (2012), investigaram o efeito da terapia com laser de baixa potência na proliferação célula e aumento no número de fibroblastos gengivais humanos (FG). O método consistiu no cultivo de células fibroblásticas com grupo controle sem irradiação e grupo experimental com diferentes doses de aplicação. Ambos os autores observaram um aumento no número de mitoses no grupo de células irradiadas assim como um aumento na quantidade de fibroblastos quando comparado com o grupo controle.

2.3.1 EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DO LASER

O principal fator que faz da laserterapia uma importante ferramenta anti-inflamatória é a ausência dos efeitos colaterais provocados pelas drogas anti-inflamatórias como as esteroidais (AIEs) e não esteroidais (AINEs) as quais provocam ulcera gástrica, sangramentos e toxicidade hepática. Além disso, diminuem a dor, auxiliam o processo de reparo tecidual e melhoram a qualidade do tecido neoformado (XU *et al.*, 2010).

Os mecanismos que envolvem a atuação da terapia com laser de baixa potência são: aumento da microcirculação local, angiogênese, vasodilatação e inibição de mediadores inflamatórios como prostaglandinas E_2 . Estas por sua vez são produzidas pela COX a qual se subdivide em COX₁ e COX₂. A segunda é considerada essencialmente inflamatória (ALBERTINI *et al.*, 2007; LARAIA *et al.*, 2012; XIE *et al.*, 1991).

A COX₂ ao ser ativada pode levar a produção de outros mediadores inflamatórios como as lipoxinas as quais são importantes na evolução da inflamação. Num estudo em modelo animal foi demonstrada a redução de edema através da diminuição da expressão do mRNA da COX₂. Foi induzida lesão inflamatória por carragenina em pata de rato pelos mesmos autores do estudo anterior e eles chegaram

a conclusão que a laserterapia reduziu de 30 a 40% a expressão gênica de medidores inflamatórios (IL-2, TNF α , IL-6, mRNA) (ALBERTINI *et al.*, 2007; XU *et al.*, 2010).

Segundo Laraia *et al.* (2012), a laserterapia possui um efeito de modulação significativa nos mediadores inflamatórios durante a cicatrização das incisões do tendão em ratos, causando uma redução nas citocinas pró-inflamatórias (IL-1b e IL-6), bem como um aumento no nível de citocinas anti-inflamatórias (IL-10). Makhlof *et al.* (2012) estudou o efeito da laserterapia combinada com raspagem radicular em pacientes com periodontite e avaliou a IL-1b. Concluiu que não houve diferença estatística entre os grupos controle e laser com relação ao decréscimo desta interleucina.

2.3.2 DOSIMENTRIA

A dose é definida como quantidade de energia depositada por área a ser tratada, não é cumulativa e geralmente é medida em J/cm² e varia com a intensidade e tempo de exposição. Para o cálculo da dose é necessário saber a potência média do laser, tempo de exposição e área a ser irradiada. A dose pode ser calculada pela fórmula abaixo (EDUARDO *et al.*, 2010).

$$\text{DOSE} = \frac{\text{TEMPO(S)} \cdot \text{POTÊNCIA(W)}}{\text{ÁREA(cm}^2\text{)}}$$

Sabendo-se que o sucesso com terapia com laser de baixa potência depende dos parâmetros utilizados na aplicação (dose, tempo de aplicação) a depender do objetivo da terapia, a WALT (World Association for Laser Therapy) sugere que sejam colocadas todas as informações possíveis na metodologia dos trabalhos como: energia (J); densidade de energia (J/cm²); tempo de irradiação, área da ponteira do laser, área a ser irradiada e método de irradiação (pontual ou varredura).

Com o intuito de avaliar o efeito anti-inflamatório do laser e compará-lo com a luz LED e com a dexametasona, Morais *et al.* (2010), utilizou o laser semiconductor

GaAs com comprimento de onda de 685 ou 830nm, energia de 2J e 20 mW de potência. O tempo de exposição à luz foi de 100 segundos. Os resultados deste estudo indicaram que a terapia com laser de baixa potência reduz sinais inflamatórios de forma mais eficaz do que a irradiação LED, utilizando os mesmos parâmetros de aplicação e não houve diferença significativa quando comparada com a dexametasona além disso, os efeitos anti-inflamatórios da terapia com laser de baixa potência não dependem do comprimento de onda utilizado.

Carvalho *et al.* (2011) avaliaram diferentes doses e comprimentos de onda em processo inflamatório induzido em articulação temporomandibular (ATM) de ratos e concluiu que o uso do laser de baixa potência reduziu o processo inflamatório especialmente quando utilizado o comprimento de onda de 780nm e dose de 275 J/cm². Para o controle da dor e diminuição de edema na ATM, Piva *et al.* (2011(b)) utilizou uma dose de 80J/cm² e concluíram que a terapia com laser de baixa potência promove uma diminuição na sintomatologia dolorosa.

A dose utilizada por Monteiro *et al.* (2011) em lesões cancerosas *in vivo* foi 56,4 J/cm² e concluiu que a TLBI causou uma progressão significativa da gravidade da CCEO em hamsters. Num segundo estudo os autores utilizaram uma dose de 95J/cm² confirmaram o agravamento das lesões de CCEO quando irradiadas.

PROPOSIÇÃO

3- PROPOSIÇÃO

Avaliar a ação do laser de baixa potência nas diversas fases da carcinogênese, como inibidor ou promotor das alterações celulares ocorridas nas LPMs e CCEOs, e relacionar a intensidade do infiltrado inflamatório com as alterações morfológicas presentes nas lesões de língua induzidas pelo 4NQO, utilizando modelo animal do tipo rato Wistar.

METODOLOGIA

4- METODOLOGIA

4.1 DESENHO DO ESTUDO

Foi realizado um estudo experimental, controlado e randomizado, para avaliação da efetividade do laser de baixa potência nas diversas fases da carcinogênese oral induzida pelo 4NQO em ratos Wistar.

4.2 ANIMAIS

Foram utilizados 48 ratos Wistar, fêmeas, provenientes do Biotério da Universidade Federal de Sergipe, com massa corporal aproximadamente 280±30g (idade média de 100 dias). Os animais ficaram alojados em gaiolas plásticas coletivas, medindo 40 x 33 x 17 cm, com tampa de grade metálica, por onde a água e ração balanceada, da marca Purina Labina, foram fornecidas *ad libitum*. As gaiolas eram forradas com maravalha as quais eram trocadas 3 vezes por semana. A temperatura era mantida em 22° C e período de claro e escuro de 12 horas (conforme orientação do biotério).

4.2.1 IMPLICAÇÕES ÉTICAS:

O estudo teve início após aprovação pelo comitê de ética em pesquisa com animais da Universidade Federal de Sergipe, sob protocolo de número 51/2012 (Anexo I).

4.3 ESTUDO LABORATORIAL

Os ratos foram divididos aleatoriamente em 8 grupos (G0 a G7), cada grupo com 6 animais, constituindo-se 4 grupos controle, sem aplicação do laser e 4 grupos teste, com laserterapia (Tabela 01). O grupo G1, apesar de fazer parte do grupo teste por ter sido submetido à aplicação do laser de baixa potência, também foi utilizado como grupo controle para o 4NQO, pois nesse grupo não foi realizada a aplicação da substância.

O grupo controle G0 foi constituído por 6 ratos, sendo que em 3 deles foi aplicado o propilenoglicol na língua e nos outros 3 não foi realizada qualquer intervenção. O propilenoglicol foi o veículo oleoso usado na diluição do 4NQO. Nos grupos (G4 e G6) houve um período de 4 semanas após a interrupção da aplicação do 4NQO sem qualquer tipo de intervenção até a eutanásia do animal, a fim de se avaliar também o poder de ação residual da substância

Tabela 1 - Definição dos grupos controle e teste, quanto ao tempo de indução.

GRUPO (Nº DE RATOS)	4NQO	LASER	EUTANÁSIA
G0 (6*)	NA	NA	12 semanas
G1 (6)	NA	12 semanas	12 semanas
G2 (6)	12 semanas	NA	12 semanas
G3 (6)	12 semanas ¹	12 semanas ¹	12 semanas
G4 (6)	12 semanas	NA	16 semanas
G5 (6)	12 semanas	4 semanas	16 semanas
G6 (6)	16 semanas	NA	20 semanas
G7 (6)	16 semanas	4 semanas	20 semanas

NA= não foi aplicado; (*) Em 3 ratos foi aplicado o propilenoglicol;

(¹) Simultaneamente.

4.3.1 APLICAÇÃO DO CARCINÓGENO

O carcinógeno utilizado foi o 4NQO (Sigma USA) diluído em propilenoglicol (veículo oleoso) numa concentração de 0,7% (JIANG *et al.*, 1993; MONTEIRO *et al.*, 2011). Após preparado, o recipiente da substância foi envolvido com papel alumínio, identificado e acondicionado em geladeira a 4^o C (Figura 2).



Figura 2 - Acondicionamento e transporte do carcinógeno.

O material era retirado da geladeira e transportado num isopor com gelo para que a temperatura fosse mantida (Figura 2). O procedimento de aplicação do carcinógeno seguiu os seguintes passos:

- Agito do frasco para homogeneizar a substância;
- Imobilização do animal;
- Abertura da boca com pinça;
- Secagem da região com cotonete;
- Aplicação de 100 μ l da substância com pincel 3-0 (um para cada grupo), os quais eram lavados com álcool a 70° c e água, entre as aplicações ;

A aplicação era feita 3 vezes por semana, em dias alternados, permanecendo os ratos 5 horas sem beber água, para que houvesse maior contato do carcinógeno com a língua (Figura 3).



Figura 3 - Abertura da boca no animal e aplicação do carcinógeno com pincel.

4.3.2 LASERTERAPIA

Foi utilizado o laser terapêutico flash lase III (D.M.C. Equipamentos®) constituído por dois lasers de diodo os quais emitem dois comprimentos de onda: vermelho (660nm) e infravermelho (810nm), com potência de 100 mW; área da secção de $0,002827\text{cm}^2$ sendo a área de irradiação de $0,028\text{cm}^2$ com o afastamento de 2mm do tecido alvo. A calibração foi realizada através do aparelho lasercheck (MMO®) (Figura 4).



Figura 4 - Flash laser III (D.M.C equipamentos) e lasercheck (MMO®) respectivamente.

4.3.3 APLICAÇÃO E DOSIMETRIA

O laser foi administrado com efeito anti-inflamatório nos grupos determinados pela pesquisa para o grupo experimental. A técnica utilizada foi a pontual (perpendicularmente ao tecido) e a aplicação foi realizada em dois pontos da região dorsal da língua (um anterior e um posterior) três vezes por semana, com Energia de 2J por ponto (MORAIS *et al.*, 2010) (Figura 5). A laserterapia foi realizada após imobilização do animal e sem anestesia.

CÁLCULO DA DOSE

$$\text{DOSE} = \text{POTÊNCIA} \times \text{TEMPO} / \text{ÁREA}$$

$$\text{DOSE} = 2 / 0,028$$

$$\text{DOSE} = 71,43 \text{ J/cm}^2$$

CÁLCULO DO TEMPO DE EXPOSIÇÃO

$$71,43 = T \cdot 0,1 / 0,028$$

$$T = 20s$$



Figura 5 - Imobilização do animal e aplicação do LASER.



Figura 6 – Medida das línguas com paquímetro digital (a) e secção (b).

4.3.4 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO E PREPARO DAS LÂMINAS

Ao final do experimento, os animais foram eutanasiados pela técnica combinada de administração de anestésico pentobarbital sódico (50 mg/kg) por via intraperitoneal seguida de deslocamento cervical (AVMA, 2013; MOGNETTI *et al.*, 2006).

As línguas foram removidas com o auxílio de pinça e bisturi, examinadas sob iluminação natural, fotografadas e medidas com paquímetro digital (Figura 6a). Em seguida foram colocadas em recipientes, devidamente identificados, contendo formol à 10%. Após 48 horas as línguas foram seccionadas (Figura 6b), e emblocadas em parafina para serem utilizadas no preparo das lâminas coradas com Hematoxilina e Eosina (HE).

4.4 ANÁLISE DOS RESULTADOS

4.4.1 ANÁLISE MACROSCÓPICA DAS PEÇAS

As peças foram analisadas macroscopicamente para observar a existência de qualquer tipo de lesão clinicamente visível.

4.4.2 ANÁLISE HISTOMORFOLÓGICA

As lâminas confeccionadas foram analisadas por dois patologistas calibrados, sem conhecimento da classificação das amostras por grupos, para detecção de alterações patológicas. Nos casos em que houve discordância dos resultados, os dois patologistas reuniram-se para discussão e definição do diagnóstico. A classificação dos casos de displasias foi feita com base nos critérios propostos por Smith & Pindborg (1969).

CLASSIFICAÇÃO DAS HIPERPLASIAS E DISPLASIAS

(SMITH & PINDBORG, 1969) (Tabelas 2 e 3)

Tabela 2 - Critérios utilizados para avaliação das alterações morfológicas.

ALTERAÇÕES	AUMENTO	ESCORES
1-Projeções em gota	10x	0/2/4
2-Estratificação irregular		
3-Queratinização abaixo da camada de queratina	10x	0/2/5
4-Hiperplasia da camada basal	10x	0/1/3
5-Perda de adesão intercelular	10x	0/1/4
6-Perda de polaridade	10x	0/2/6
7-Hipercromatismo nuclear	10x	0/2/5
8-Relação núcleo/citoplasma alterada	40x	0/2/6
9-Anisocitose e anisocariose	40x	0/2/6
10-Pleomorfismo celular e nuclear	40x	0/2/6
11-Atividade mitótica	40x	0/1/5
12-Nível de atividade mitótica (localização)	40x	0/3/10
13-Mitoses atípicas	40x	0/6/10

Tabela 3 - Cálculo do Índice de Displasia Epitelial (IDE).

ESCORES	GRAUS
0 – 10	Hiperplasias
11 – 25	Displasia Leve
26 – 45	Displasia Moderada
46 – 75	Displasia Severa ou Ca <i>in situ</i>

Os casos em que houve rompimento da camada basal foram classificados como carcinoma de células escamosas oral (CCEO). Todos os CCEOs foram classificados como tipo microinvasivos.

O infiltrado inflamatório foi classificado subjetivamente como leve, moderado e severo, para tentar relacionar às alterações morfológicas a fim de se estabelecer relação com as alterações histomorfológicas.

4.4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi utilizado o teste de normalidade de Lilliefors, para que fosse aplicado o teste-t pareado, com nível de significância de 5%, afim de avaliar a influência do laser entre os graus de displasias com 12 semanas e 16 semanas de indução (G2 x G3L e G4 x G5L), como também a evolução das displasias entre 12 e 16 semanas, nos grupos controle e teste (G2 x G4 e G3L x G5L).

4.4.4.1 ANÁLISE DESCRITIVA

Os resultados foram tabelados conforme a metodologia e após comparação entre os grupos estudados, os dados encontrados foram descritos.

RESULTADOS

5- RESULTADOS

Dos 48 ratos utilizados na pesquisa, apenas 5 foram excluídos do estudo após morte natural (Tabela 4).

5.1 ESTUDO MACROSCÓPICO

Não foram detectadas lesões visíveis clinicamente nos grupos G0, G1, G2, G3, G4 e G5 (Figura 7), porém, em todos os ratos dos grupos G6 e G7 foram detectadas lesões, de um ou mais tipos. As lesões de dorso, geralmente eram placas brancas, algumas verrucosas, poucas se apresentavam em forma de placa eritematosa. A borda lateral e ventre lingual, geralmente foram afetados por placas eritematosas, apesar de um animal do grupo G6 (R1) apresentar lesão verrucosa no ventre lingual (Figura 8).



Figura 7 - Línguas de ratos dos grupos G0 e G1 exibindo ausência de lesões clínicas.



Figura 8 – Línguas de ratos dos grupos G6 e G7 com lesões verrucosa e eritematosa, respectivamente.

5.2 ESTUDO HISTOMORFOLÓGICO

Os grupos controle G0 e G1 não apresentaram nenhum caso de DEO ou CCEO, porém, os 3 animais do grupo G0 que foram submetidos à aplicação do propilenoglicol e 5 animais do grupo G1 submetidos à aplicação do laser apresentaram áreas de hiperplasia. Além disso, no grupo G1 também observou-se um número aumentado de mitoses (Figura 9, Tabela 4, Gráfico 1).

Na classificação das displasias, conforme Smith & Pindborg (1969), com 12 e 16 semanas de indução obtivemos escores de 31 à 65, variando em displasia moderada, displasia severa ou carcinoma (Tabela 5, Gráfico 1).

Com relação ao tempo de exposição ao 4NQO, os resultados sugerem que a indução por 12 semanas seguida de eutanásia dos animais, referente aos grupos G2 (sem laser) e G3 (com laser), não foi suficiente para o desenvolvimento do CCEO. No entanto esses grupos G2 e G3 apresentaram DEO, a maioria DM (90%) e, apenas um rato do grupo G2 apresentou DS (10%) (Figura 10, Tabela 4, Gráfico 1).

Todavia, 12 semanas de exposição ao carcinógeno foi suficiente para o surgimento de micro invasões em 33% dos animais dos grupos G4 (sem laser) e G5 (com laser). O grupo G4 exibiu 66,66% de casos de CCEO e 33,33% de DS. No grupo G5 foram observados DS (66,66%) e DM (33,33%) (Figura 11, Tabela 4, Gráfico 1).

Nos ratos submetidos a aplicação do 4NQO por 16 semanas, pertencentes aos grupos G6 (sem laser) e G7 (com laser 4 semanas após a aplicação do carcinógeno) foram encontradas áreas de invasão do epitélio em todos os animais (Figura 12, Tabela 4, Gráfico 1).

Tabela 4 - Resultado da avaliação histológica (IDE).

4NQO	GRUPOS	R1	R2	R3	R4	R5	R6
NÃO	G0	N	N	-	H	H	H
NÃO	G1 (laser)	H	N	H	H	H	H
12 S	G2	DM	DM	-	DM	DS	DM
12 S	G3 (laser)	-	DM	DM	DM	DM	DM
16 S	G4	CA	DS	CA	CA	CA	DS
16 S	G5 (laser)	DS	DS	DM	DM	DS	DS
20 S	G6	CA	CA	CA	CA	-	CA
20 S	G7 (laser)	CA	CA	CA	CA	CA	-

S: semanas; N: normal; H: hiperplasia; DM: displasia moderada; DS: displasia severa; CA: carcinoma; (-): animal excluído da pesquisa.

Tabela 5 - Escores das displasias com 12 e 16 semanas de indução, conforme classificação de Smith & Pindborg, 1969.

4NQO	GRUPOS	R1	R2	R3	R4	R5	R6
12 S	G2	42	37	-	37	46	43
12 S	G3 L	-	31	38	41	43	39
16 S	G4	65	50	52	56	65	51
16 S	G5 L	51	47	40	42	56	48

O infiltrado inflamatório esteve presente em todos os cortes avaliados, sendo que nos grupos controle, ele se manifestava de forma que variava entre leve e moderado; após as 12 primeiras semanas de indução, o infiltrado inflamatório (II) encontrava-se mais homogêneo e variava entre moderado e intenso, nos grupos G2 e G3. Nos demais grupos

(G4, G5, G6 e G7) o infiltrado inflamatório variava entre leve e moderado e só era possível observar infiltrado inflamatório intenso nas áreas ulceradas.

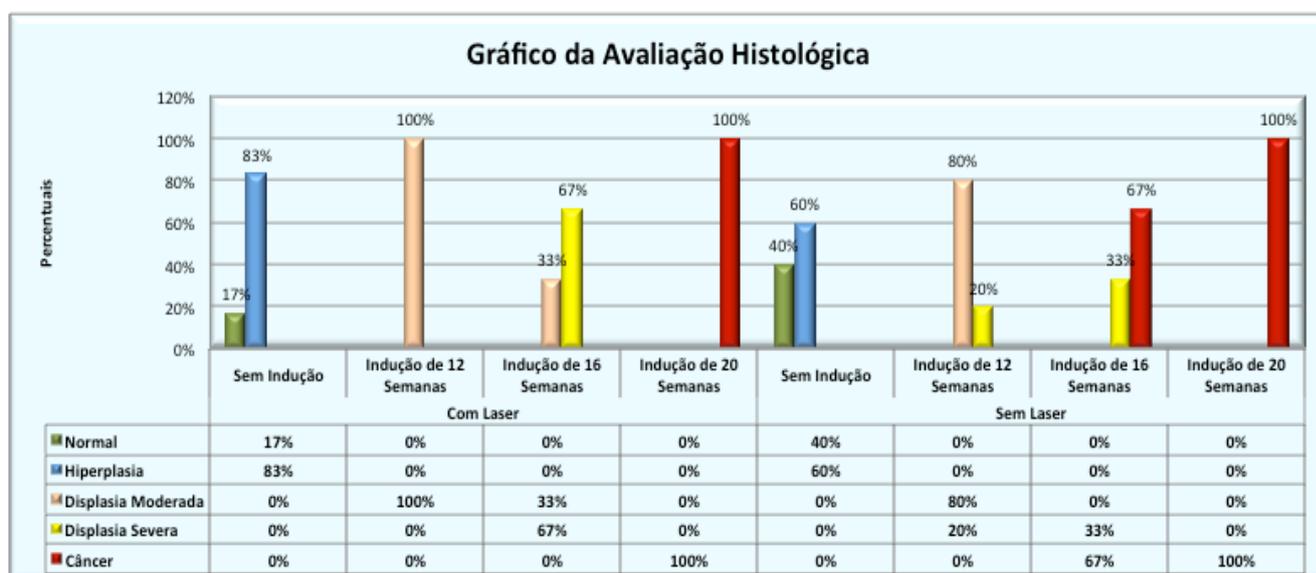


Gráfico 1- Relação do tipo de lesão encontrada com as semanas de indução e uso do laser.

Não foi encontrada relação entre a quantidade de infiltrado inflamatório e as alterações celulares encontradas, visto que, existiam áreas com intenso infiltrado inflamatório associado a todo tipo de alteração (Hiperplasias, Displasias e CCEO). No entanto também existiam áreas de CCEO com infiltrado inflamatório leve. (Figura 13)

A intensidade do infiltrado inflamatório não mostrou diferença entre o grupo controle (sem laser) e o grupo teste (com laser) (Figuras 10, 11 e 12).

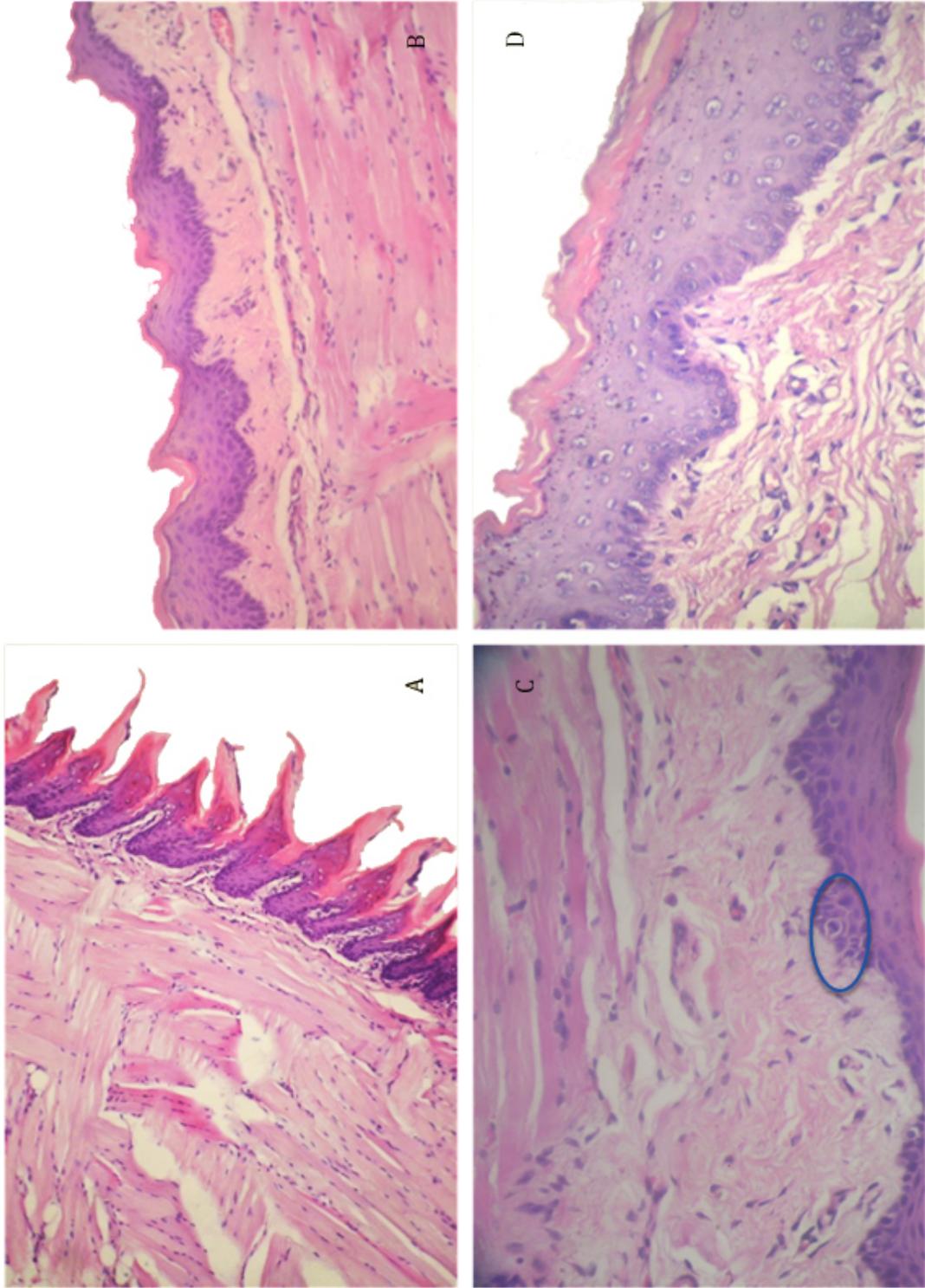


Figura 9 -- A- Normal (G0), HE (200x); B- Hiperplasia (G1), HE (200x); C- Mitose (G1),HE (200x); D- Hiperplasia (G1), HE (400x), II leve.

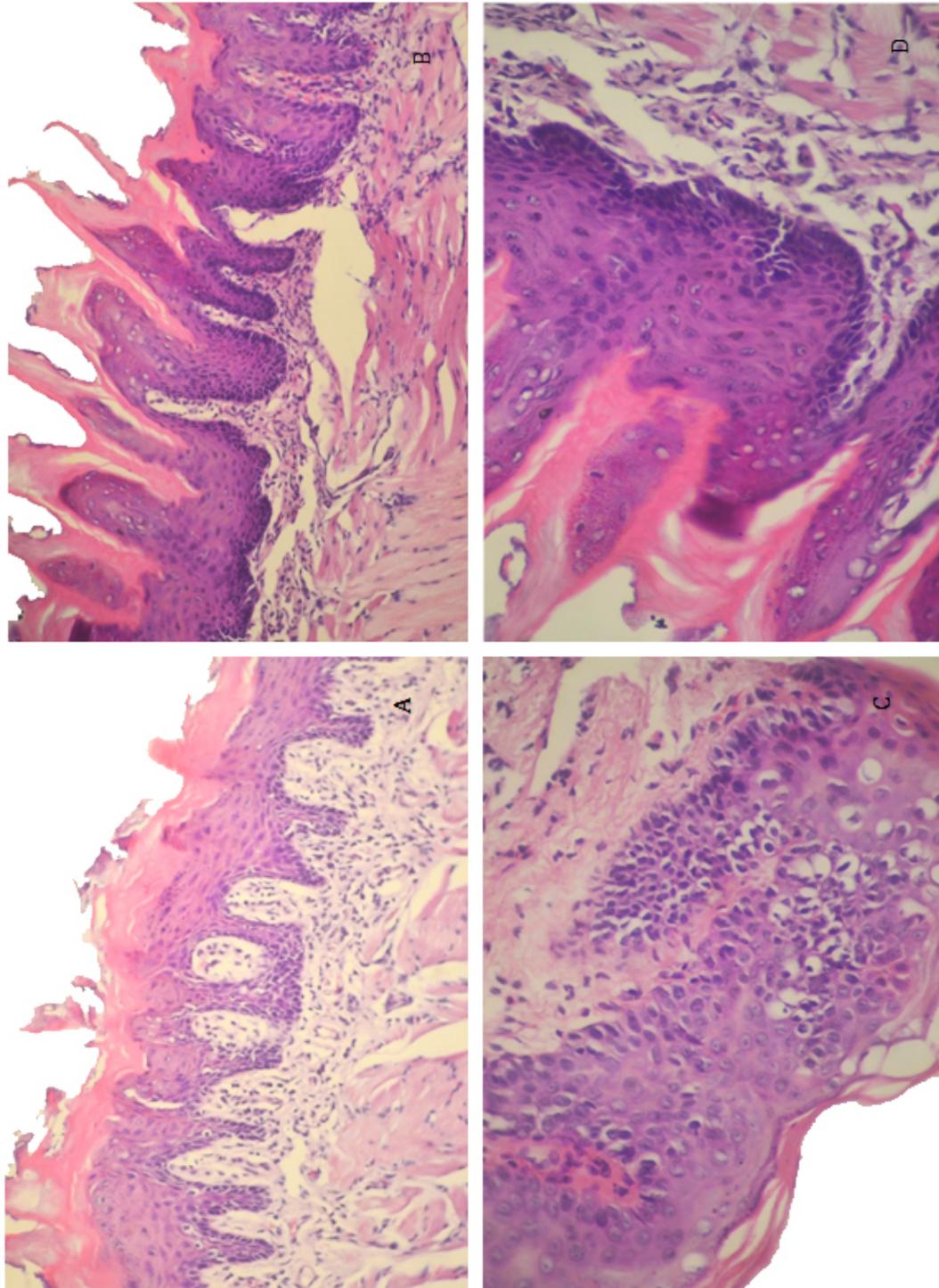


Figura 10 - A- DM (G2), HE (200x), II Intenso; B- DM (G3), HE (200x), II Moderado; C- DS (G3), HE (400x), II Leve; D- DS (G3), HE (400x), II Moderado.

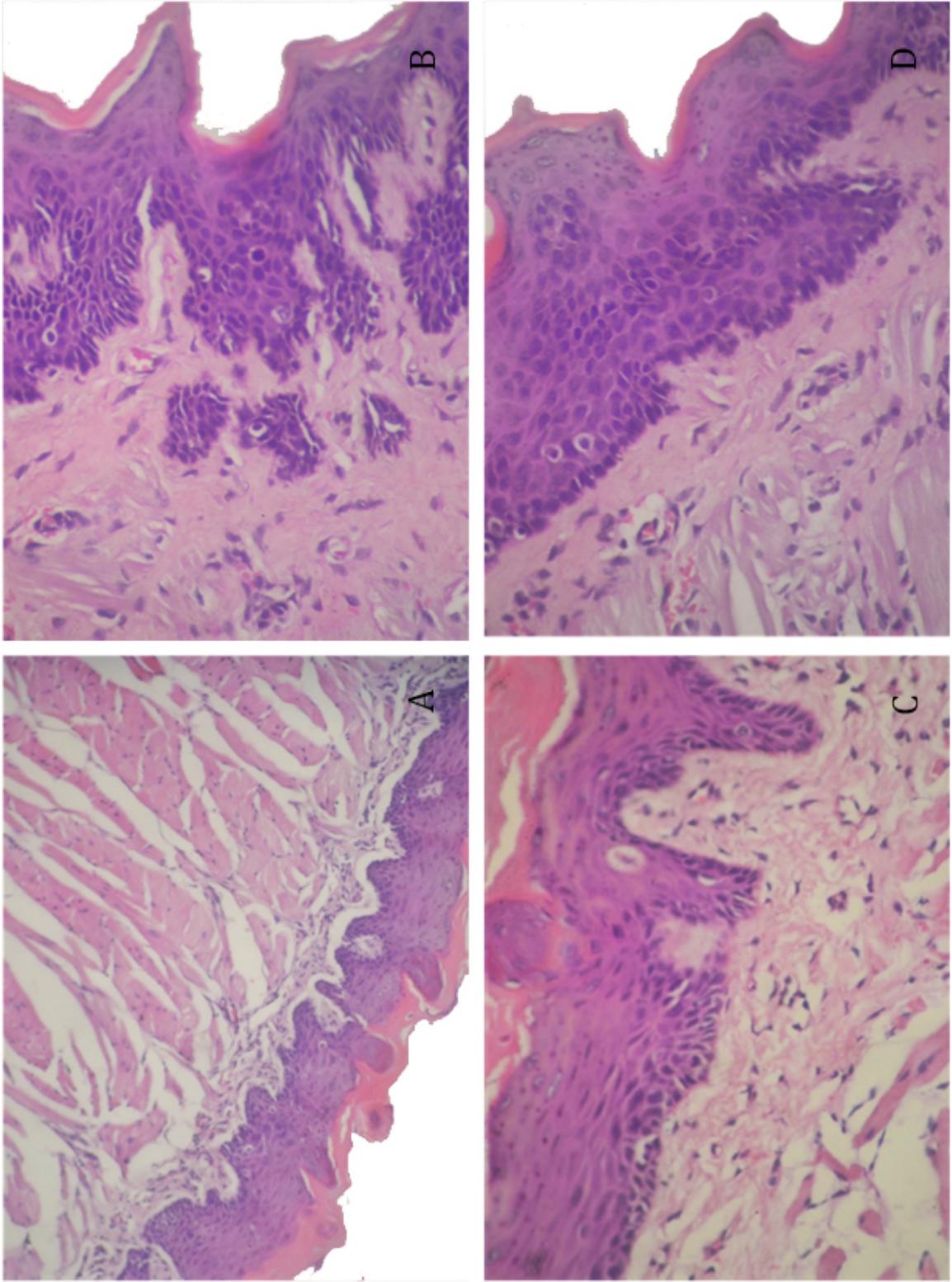


Figura 11 – A- DM (G5), HE (200x), II Leve; B- CCEO (G4), HE (400x), II Leve; C- DM (G5), HE (400x), II Leve; D- CCEO (G4), HE (400x), II Leve.

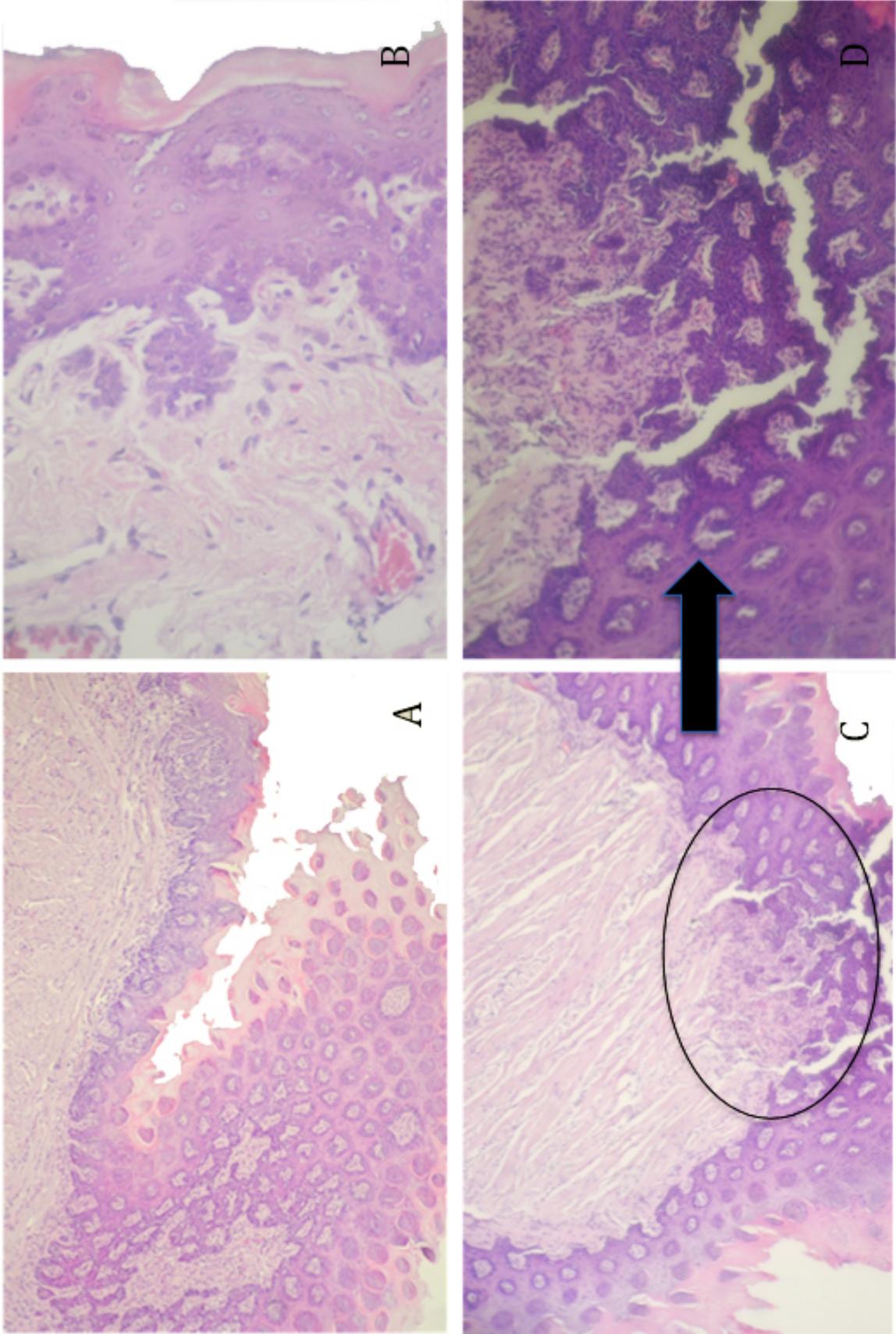


Figura 12- A- CCEO (G7), HE (100x), Lesão hiperplásica; B- CCEO (G7), HE (400x), Invasão, II Leve; C- CCEO (G7), HE (100x), II Moderado; D- CCEO (G7), HE (200x), II Moderado.

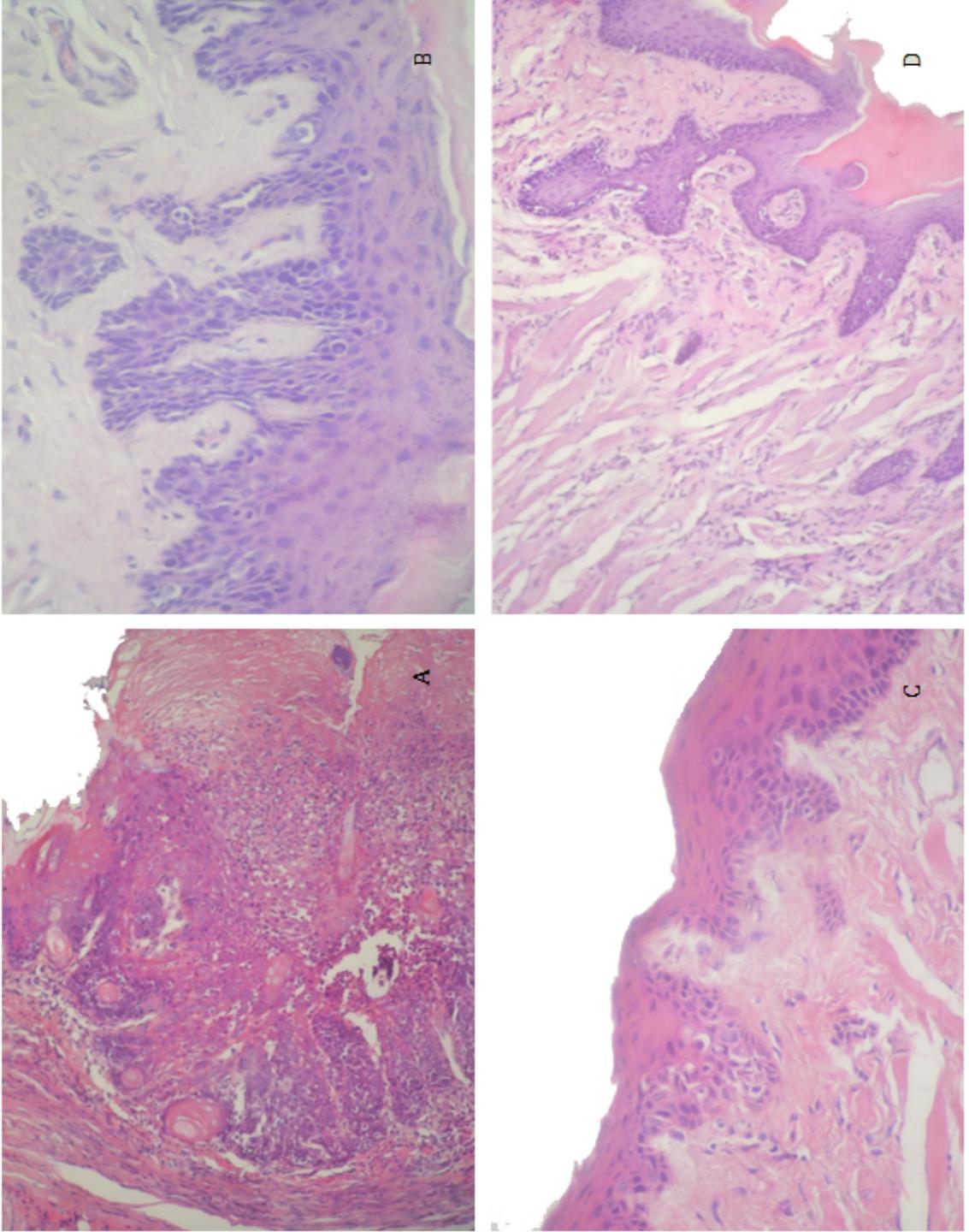


Figura 13- A- DS (G6), HE (100x), II Intenso; B- CCEO (G7), HE (400x), II Leve; C- CCEO (G6), HE (200x), II Leve; D- CCEO (G7), HE (200x), II Moderado.

5.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Após a utilização do teste de normalidade de Lilliefors, aplicou-se o teste t pareado para avaliar as alterações displásicas considerando a aplicação da laserterapia e o tempo de evolução das mesmas, através dos escores encontrados, utilizando o método proposto por Smith & Pindborg (1969) (Tabelas 6 e 7).

Tabela 6 – Teste t pareado entre os grupos controle e teste; com 12 e 16 semanas.

Rato	G2	G3	p-valor	G4	G5	p-valor
R1	42	-		65	51	
R2	37	31		50	47	
R3	-	38		52	40	
R4	37	41	0.377	56	42	0.007*
R5	46	43		65	56	
R6	43	39		51	48	

Tabela 7 – Teste t pareado entre os grupos de 12 e 16 semanas; controle e teste.

Rato	G2	G4	p-valor	G3	G5	p-valor
R1	42	65		-	51	
R2	37	50		31	47	
R3	-	52		38	40	
R4	37	56	0.003*	41	42	0.05
R5	46	65		43	56	
R6	43	51		39	48	

*Valores de “p” menores do que 0,05 foram considerados estatisticamente significantes.

Avaliando a diferença dos graus de displasias entre os grupos controle e teste, pôde-se observar que com 12 semanas, essa diferença não foi significativa $p=0,377$, já com 16 semanas, ela se mostrou altamente significativa $p=0,007$, mostrando que as displasias, no grupo controle, sem ação da laserterapia, tendem a progredir bem mais rápido, chegando a carcinomas micro-invasivos (Tabela 6).

A comparação entre os grupos G2 x G4, sem aplicação da laserterapia, entre 12 e 16 semanas, mostrou que houve um avanço significativo das displasias $p=0,003$, o que não ocorreu entre os grupos G3 x G5, onde foi utilizada a laserterapia $p=0,05$ (Tabela 7).

DISCUSSÃO

6– DISCUSSÃO

No presente estudo o modelo animal, assim como o carcinógeno 4NQO, mostraram ter bons resultados para o modelo proposto. A concentração do carcinógeno de 0,7% utilizada, em contraste com a maioria que utilizou 0,5%, não alterou os resultados (AGUIAR *et al.*, 2006; HENRIQUES *et al.*, 2011).

A aplicação do 4NQO sem o uso de anestésico, com o intuito de diminuir a mortalidade dos animais, obteve bons resultados, pois a perda destes animais foi mínima (10%) em comparação com outros estudos, embora diferente do preconizado por Jiang *et al.* (1993).

Um ponto a ser revisto neste modelo de estudo, são os grupos controles. Tais grupos devem ser isentos de manipulação, como ocorreu no grupo G0A, pois ficou claro que os grupos G0B e G1, utilizados para avaliação do propilenoglicol e do laser, no mesmo período que os demais grupos, teste e controle, sofreram injúrias, não só pela manipulação, como pelo estresse, muitas vezes provocando trauma.

Isso explica as alterações de hiperplasias encontradas nos grupos G0B e G1, embora a hiperplasia mais acentuada do grupo G1, onde pôde-se observar maior número de mitoses que no grupo G0B, está de acordo com estudos *in vitro*, os quais mostram que o laser exerce efeito proliferativo. Portanto sugere-se estudos pilotos preliminares para descartar possíveis efeitos destas substâncias diluentes, já que não funcionarão como controle, podendo influenciar nos resultados estatísticos (DORTBUDAK *et al.*, 2000; KHADRA *et al.*, 2005; SCHARTINGER *et al.*, 2012).

Nos grupos G2 e G3, onde houve indução por 12 semanas, não foram observadas lesões clínicas, concordando com Kaplan *et al.* (2002) e Dayan *et al.* 1997 e discordando de Henriques *et al.* (2011) que encontraram lesões clínicas com 12 semanas. Porém, no exame histopatológico, foram detectadas LPM em todos os casos, concordando com os estudos de Kaplan *et al.* (2002), Fracalossi *et al.* (2010) e Minicucci *et al.* (2011). No entanto, estes estudos detectaram menor gravidade nas lesões, as quais foram classificadas como displasias epiteliais leve e moderada

diferindo do presente estudo, onde as lesões foram diagnosticadas como displasias moderada (DM) e severa (DS). Já Henriques *et al.* (2011) encontraram DS e Ca "*in situ*" na 12^a semana de indução.

A maior gravidade das lesões encontradas no grupo de 12 semanas, no estudo de Henriques *et al.* (2011), provavelmente se deve à maior frequência de aplicação do 4NQO, que foi de 4 vezes por semana, enquanto o presente estudo induziu 3 vezes por semana. Já em relação aos achados de Fracalossi *et al.* (2010) e Minicucci *et al.* (2011), as lesões encontradas neste trabalho foram mais graves, no entanto, esses estudos não utilizaram aplicações tópicas e sim carcinógeno diluído na proporção de 50ppm em água. Portanto, sugere-se que as pequenas variações deve-se à metodologia aplicada.

No entanto, é importante ressaltar que não houve diferença nos resultados histológicos entre os grupos G2 e G3, onde G2 obteve DM em 80% e DS em 20% dos casos e G3 DM em 100% dos casos, demonstrando que a laserterapia não interferiu nessa fase da carcinogênese.

Já nos grupos G4 e G5, com indução de 16 semanas não foram encontradas lesões clínicas aparentes concordando com Dayan *et al.* (1997) e discordando de Henriques *et al.* (2011), que encontraram lesões clínicas a partir de 12 semanas.

Porém, na avaliação histológica do grupo G4, induzido por 16 semanas sem associação com a laserterapia, os resultados demonstraram uma maior gravidade que em outros estudos, ou seja, DS em 33,33% e CCEO em 66,66% dos casos, enquanto Rich & Reade (2001) encontraram 100% de displasias (30% DM e 70% DS) e nenhum caso de CCEO e Henriques *et al.* (2011), encontrou apenas 20% de CCEO.

O resultado encontrado por Henriques *et al.* (2011) tornou-se contrastante, pois apresentou lesões clínicas a partir de 12 semanas, desenvolveu casos de carcinoma com 12 semanas, no entanto, com 16 semanas, apenas 20% dos animais apresentavam CCEO, ficando difícil sugerir algum viés metodológico capaz de causar tal efeito.

O grupo G5 deste estudo, o qual faz parte dos grupos testes, não pode ser comparado com a maioria dos estudos encontrados na literatura, pois apenas no estudo de Monteiro *et al.* (2011; 2013), usando como indutor o DMBA a 0,5% obteve CCEO em 100% dos casos com 8 semanas de indução. No entanto, comparando ao grupo controle G4, ambos com 16 semanas de indução, pôde-se observar grande diferença nos achados, onde G5, associado à laserterapia desenvolveu 33,33% de DM e 66,66% de DS, enquanto o G4, sem associação com a laserterapia, desenvolveu 33,33% de DS e 66,66% de CCEO.

Sendo assim, é possível concluir ser este o achado mais importante desta pesquisa, onde o laser de baixa potência consegue atrasar o processo de transformação tumoral, nessa etapa da carcinogênese.

Devido à grande importância desta etapa para este estudo, foi elaborada uma análise estatística para analisar a evolução da displasia entre a 12^a e 16^a semanas de indução, utilizando os escores obtidos através da classificação de Smith & Pindborg (1969). Foram feitas comparações do grupo teste com o grupo controle, primeiro com 12 semanas ($p= 0,377$) e depois com 16 semanas ($p= 0,007$), mostrando uma atuação significativa do laser, com 16 semanas de indução, ou seja, após 12 semanas de aplicação do 4NQO, suspensão do mesmo e aplicação do laser por 4 semanas.

A comparação entre os grupos G2 x G4, sem aplicação da laserterapia, entre 12 e 16 semanas, mostrou que houve um avanço significativo das displasias ($p= 0,003$), o que não ocorreu entre os grupos G3 x G5, onde foi utilizada a laserterapia ($p= 0,05$). Ficando comprovado que o laser tornou insignificante essa evolução.

Após 20 semanas de indução foram encontradas lesões clínicas nos dois grupos (G6 e G7), notando-se a presença de placas em região posterior e em bordo lateral de língua e lesão verrucosa no ventre. Já na avaliação histológica, com ou sem associação de laserterapia, foram encontrados CCEO em 100% dos animais, com índices maiores que nos estudos de Fracalossi *et al.* (2010) e Minicucci *et al.* (2011), ambos 70%, além de Rich & Reade (2001) e Aguiar *et al.* (2006) que não encontraram casos de CCEO.

Nessa fase da carcinogênese, onde o CCEO já encontra-se instalado, a laserterapia perde o seu papel inibidor da “promoção”, no entanto, o seu estímulo proliferativo, em áreas lesadas, permanece, contribuindo com a progressão tumoral. Apesar do efeito proliferativo, no grupo G7, não é possível afirmar que o mesmo contribuiu com a agressividade da lesão, visto que histologicamente, isso não foi observado, discordando dos trabalhos de Monteiro *et al.* (2011), que afirmam ser o laser, responsável pelo agravamento da lesão, após 12 semanas.

No presente estudo, a promoção foi considerada concluída, a partir de 12 semanas dando início a fase de progressão. Até a 12^a semana, a falta de continuidade ou qualquer intervenção poderia alterar o processo, porém, é necessário lembrar que o efeito do carcinógeno é acumulativo. Portanto, novos estudos para testar doses diferentes do laser antes desse período são necessários.

Nesse sentido, devemos lembrar que em relação ao CCEO, temos a variante menos agressiva que é o carcinoma verrucoso, porém, aparentemente mais volumoso, como encontrado no grupo G7, já que todos os CCEOs eram microinvasivos.

Devido ao seu potencial proliferativo, há uma carência de estudos que avaliem a laserterapia em lesões neoplásicas e/ou pré neoplásicas *in vivo*. No entanto, os resultados deste estudo mostraram que a aplicação do laser de baixa potência por 4 semanas após 12 semanas de indução, foi capaz de impedir o aparecimento do CCEO, enquanto o grupo que ficou sem a laserterapia, 66,66% evoluiu para CCEO.

No grupo induzido por 20 semanas, a laserterapia não teve o mesmo sucesso, mesmo porque, o CCEO, já estava presente, como pôde-se observar no grupo controle. Porém, foi possível notar um crescimento epitelial mais proeminente, com um maior número de mitoses, nos animais irradiados, concordando com os autores que acreditam no potencial proliferativo do laser e discordando com os que acreditam que a laserterapia agrava as lesões malignas (KAHADRA *et al.*, 2005; RENNO *et al.*, 2007; MONTEIRO *et al.*, 2011).

Aumento de volume não é desejável quando se trata de uma lesão maligna, mas também não é possível atribuir uma maior agressividade por isso, mesmo porque,

a célula transformada, torna-se autônoma. Apesar da atividade proliferativa ser muito importante para o crescimento tumoral, não significa que o laser possa tornar essas células mais agressivas pois isso não foi observado neste estudo, nenhuma diferença no que diz respeito ao grau de diferenciação celular ou maior invasividade no grupo teste. No entanto, é sabido que, quanto mais as células proliferam, aumentam as chances de mutações adicionais nas mesmas e conseqüentemente, progressão tumoral.

Em relação aos achados de Monteiro *et al.* (2011), a precocidade dos casos de CCEO pode estar relacionada ao tipo de carcinógeno e local aplicado, no caso, mucosa jugal. Mas a discordância está no fato deste estudo concluir que o laser agravou a lesão no CCEO já instalado e, avaliado 4 semanas após os controles (8 e 12 semanas), ou seja, teve mais tempo de indução em relação ao de 8 semanas. Em relação ao grau de diferenciação entre os grupos com laser e sem laser, ambos com 12 semanas, o estudo sugere que o grupo com laser apresentou casos mais pobremente diferenciados que o controle, no entanto, o grupo sem laser, induzido por 8 semanas, também mostrou casos mais indiferenciados que o controle induzido por 12 semanas, mostrando que tal variação não deve ser atribuída ao laser.

Sabendo-se que a laserterapia tem ação anti-inflamatória, podendo deste modo levar a uma diminuição das citocinas pró-inflamatórias, importantes para o desenvolvimento tumoral, mais estudos são necessários para entender se o laser é capaz de impedir a transformação tumoral ou apenas atrasar a progressão. Ou ainda, em casos de lesões tumorais já instaladas, com lesões ulceradas, ou com necessidade de biópsias incisionais, a laserterapia poderia modular a inflamação impedindo assim uma exacerbação da lesão.

Para tanto, tais estudos teriam que avaliar vários protocolos de laserterapia associados à biologia molecular para observar a ação das células e citocinas inflamatórias, visto que “*in vitro*”, todas as células proliferam e o laser não exibe efeito de promoção tumoral (SCHARTINGER *et al.*, 2012).

Nesse contexto vale ressaltar que a proliferação causada pelo laser apresenta caráter curativo em áreas lesionadas através do aumento na síntese de ATP, regulação de fatores de crescimento, citocinas inflamatórias, angiogênese e outros.

Isso ficou evidente neste estudo, visto que no grupo em que apenas o laser foi aplicado (G1) não houve sinais de crescimento celular desordenado tampouco desenvolvimento de câncer ao passo que quando a laserterapia foi aplicada após o carcinógeno, ele atuou de forma diferente nas diversas fases.

Essa conclusão é condizente com os achados de Piva *et al.* (2011; 2013), que também concluíram que a inflamação tem papel diferente nas várias fases da carcinogênese. Portanto, sabendo-se que a laserterapia tem função anti-inflamatória, embora não tenha sido possível observar variação na quantidade do infiltrado inflamatório, entre os grupos teste e controle, é bem provável que o tipo de citocinas liberadas, bem como de células inflamatórias, sejam diferentes após a irradiação, apontando para uma diferença mais qualitativa que quantitativa. Mostrando mais uma vez a importância de uma avaliação molecular desses casos (MORAIS *et al.*, 2010; CARVALHO *et al.*, 2011 e PIVA *et al.*, 2011).

Vale ressaltar que o intuito de utilizar o laser de baixa potência nessa pesquisa foi devido a sua ação anti-inflamatória visto que acredita-se que o infiltrado inflamatório pode criar um microambiente favorável ao desenvolvimento do câncer. Com os resultados, ficou claro que o laser não representa um risco eminente para tais lesões, muito pelo contrário, pode ser bastante útil no controle do CCEO, mas deve ser utilizado com cautela (BALKWILL & MANTOVANI, 2001; BALKWILL *et al.*, 2005 e MANTOVANI *et al.*, 2008).

A energia utilizada neste estudo para efeito anti-inflamatório foi de 2J por ponto, concordado com Moraes *et al.* (2010) porém, a variável mais importante na utilização da laserterapia é a dose utilizada pois, esta varia de acordo com a área da aplicação do laser. Neste estudo, a área considerada para o cálculo da dose foi a do spot do aparelho e a dose aplicada foi de $\cong 71,5 \text{ J/cm}^2$ por ponto, enquanto outros autores como Carvalho *et al.* (2011) utilizaram, 275 J/cm^2 e Piva *et al.* (2011(b)), 80 J/cm^2 .

O laser foi aplicado em dois pontos, um anterior e um posterior. Para certificar-se de que a terapia atingiu toda a extensão da língua, em toda a amostra, as

línguas foram medidas com paquímetro digital após a excisão, sendo constatado que havia pouca variação no tamanho das mesmas.

Durante a análise histológica dos grupos, o infiltrado inflamatório esteve presente em todos os casos de todos os grupos, exceto o G0A (grupo no qual os animais não foram manipulados). Ficou claro que o infiltrado inflamatório tem participação no processo, embora não tenha sido possível associar a quantidade deste com o número ou tipo de lesões encontradas, visto que alguns casos de CCEOs estavam associados a um leve infiltrado inflamatório, enquanto algumas LPMs, apresentavam um intenso infiltrado inflamatório e vice-versa. Pelo trabalho, realmente a quantidade de infiltrado inflamatório não está associada ao tipo de lesão, mas a falta de análise criteriosa de qualidade do infiltrado inflamatório torna-se um fator limitante no trabalho.

No entanto, é possível que a qualidade do infiltrado inflamatório seja mais importante que a quantidade, já que a depender do tipo celular presente, o tipo de citocina secretada pode variar. Como exemplo, temos a presença de TNF α no infiltrado inflamatório das lesões de CCEOs favorecendo a progressão tumoral, assim como os linfócitos CD8 nas displasias exercendo papel protetor. Uma análise imunohistoquímica dos achados dessa pesquisa precisa ser realizada para que se possa avaliar quais células do infiltrado inflamatório estão presentes nessas lesões encontradas (PIVA *et al.*, 2011;2013).

CONCLUSÃO

7 - CONCLUSÃO

De acordo com os achados, pôde-se concluir que com o protocolo de laserterapia e indução da carcinogênese empregados, o laser de baixa potência é capaz de atrasar o processo de carcinogênese, nas fases iniciais, desde que eliminado o fator de risco, como também ativar o potencial proliferativo do CCEO já instalado, mas não pode ser responsabilizado pela agressividade do mesmo; já a quantidade do infiltrado inflamatório não esteve relacionado com as alterações celulares encontradas entre os grupos avaliados.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

Aggarwal BB, Shishodia S, Sandur SK, Pandey MK, Sethi G. Inflammation and cancer: how hot is the link?. *Biochemical pharmacology*. 2006;72(11):1605-21.

Aguiar MCFd, Reis DGD, Fonseca LMdS, Cardoso SV, Leite JA, Carmo MAVd. Immunohistochemical evaluation of metallothionein in palatal mucosal cells of mice treated with 4NQO. *Oral Medicine and Pathology*. 2006;11: 315-8.

Albertini R, Villaverde AB, Aimbire F, Bjordal J, Brugnera A, Mittmann J, et al. Cytokine mRNA expression is decreased in the subplantar muscle of rat paw subjected to carrageenan-induced inflammation after low-level laser therapy. *Photomedicine and laser surgery*. 2008;26(1):19-24.

Albertini R, Villaverde AB, Aimbire F, Salgado MA, Bjordal JM, Alves LP, 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 B, Biology*. 2007;89(1):50-5.

Allavena P, Germano G, Marchesi F, Mantovani A. Chemokines in cancer related inflammation. *Experimental cell research*. 2011;317(5):664-73.

Almeida MG, Pagnocelli RM. O uso do laser de baixa potência no tratamento das disfunções temporomandibulares: uma revisão. *JBA: J Bras Oclus ATM & Dor orofacial*. 2004.

Anneroth G, Batsakis J, Luna M. Review of the literature and a recommended system of malignancy grading in oral squamous cell carcinomas. *Scandinavian journal of dental research*. 1987;95(3):229-49.

AVMA. Guidelines for the euthanasia of animals. 2013:102.

Balkwill F, Charles KA, Mantovani A. Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer cell*. 2005;7(3):211-7.

Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet*. 2001;357(9255):539-45.

Baskaran N, Manoharan S, Balakrishnan S, Pugalendhi P. Chemopreventive potential of ferulic acid in 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced mammary carcinogenesis in Sprague-Dawley rats. *European journal of pharmacology*. 2010;637(1-3):22-9.

Bryne M, Koppang HS, Lilleng R, Stene T, Bang G, Dabelsteen E. New malignancy grading is a better prognostic indicator than Broders' grading in oral squamous cell carcinomas. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*. 1989;18(8):432-7.

Carvalho CM, Lacerda JA, dos Santos Neto FP, de Castro IC, Ramos TA, de Lima FO, et al. Evaluation of laser phototherapy in the inflammatory process of the rat's TMJ induced by carrageenan. *Photomedicine and laser surgery*. 2011;29(4):245-54.

Contran RS, Kumar V, Collins T. Robbins & Cotran - Patologia - Bases Patológicas das Doenças. Elsevier. 2010(8):1480.

Castro JL, Pinheiro AL, Werneck CE, Soares CP. The effect of laser therapy on the proliferation of oral KB carcinoma cells: an in vitro study. *Photomedicine and laser surgery*. 2005;23(6):586-9.

Dayan D, Hirshberg A, Kaplan I, Rotem N, Bodner L. Experimental tongue cancer in desalivated rats. *Oral oncology*. 1997;33(2):105-9.

Dortbudak O, Haas R, Mallath-Pokorny G. Biostimulation of bone marrow cells with a diode soft laser. *Clinical oral implants research*. 2000;11(6):540-5.

Eduardo CdP, Aranha ACC, Lage-Marques JL, Azevedo LH, Freitas PMd, Gouw-Soares S. lasers em odontologia. *guanabara koogan*. 2010:232.

Fracalossi AC, Miranda SR, Oshima CT, Franco M, Ribeiro DA. The role of matrix metalloproteinases 2 and 9 during rat tongue carcinogenesis induced by 4-nitroquinoline 1-oxide. *Journal of molecular histology*. 2010;41(1):19-25.

Fujiwara S, Fujioka H, Tateno C, Taniguchi K, Ito M, Ohishi H, et al. A novel animal model for in vivo study of liver cancer metastasis. *World journal of gastroenterology : WJG*. 2012;18(29):3875-82.

Garcez AS, Ribeiro MS, Núñez SC. *Laser de Baixa Potência*. Elsevier. 2012:259.

Germano G, Allavena P, Mantovani A. Cytokines as a key component of cancer-related inflammation. *Cytokine*. 2008;43(3):374-9.

Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*. 2010;140(6):883-99.

Henriques ACG. análise morfológica da mucosa oral de ratos submetidos à carcinogênese experimental pelo óxido de nitroquinolina (4NQO). *pesq bras odontoped clin integr*. 2011;11(1):13-20.

Jerjes W, Hamdoon Z, Hopper C. Photodynamic therapy in the management of potentially malignant and malignant oral disorders. *Head & neck oncology*. 2012;4:16.

Jiang DJ, Wilson DF, Wiebkin OW. Ultrastructural features of normal epithelium and 4-nitroquinoline 1-oxide-induced carcinomas of the rat tongue. *Journal of comparative pathology*. 1993;108(4):375-81.

Kamp DW, Shacter E, Weitzman SA. Chronic inflammation and cancer: the role of the mitochondria. *Oncology*. 2011;25(5):400-10, 13.

Kanojia D, Vaidya MM. 4-nitroquinoline-1-oxide induced experimental oral carcinogenesis. *Oral oncology*. 2006;42(7):655-67.

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*. 2002;7(5):336-43.

Karu T, Pyatibrat L, Kalendo G. Irradiation with He-Ne laser increases ATP level in cells cultivated in vitro. *Journal of photochemistry and photobiology B, Biology*. 1995;27(3):219-23.

Karu T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. *Journal of photochemistry and photobiology B, Biology*. 1999;49(1):1-17.

Karu TI. Molecular mechanism of therapeutic effect of low-intensity laser radiation. *Lasers in the life sciences*. 1988;2(1):53-74.

Khadra M, Kasem N, Lyngstadaas SP, Haanaes HR, Mustafa K. Laser therapy accelerates initial attachment and subsequent behaviour of human oral fibroblasts cultured on titanium implant material. A scanning electron microscope and histomorphometric analysis. *Clinical oral implants research*. 2005;16(2):168-75.

Koebel CM, Vermi W, Swann JB, Zerafa N, Rodig SJ, Old LJ, et al. Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature*. 2007;450(7171):9037.

Kujan O, Khattab A, Oliver RJ, Roberts SA, Thakker N, Sloan P. Why oral histopathology suffers inter-observer variability on grading oral epithelial dysplasia: an attempt to understand the sources of variation. *Oral oncology*. 2007;43(3):224-31.

Laraia EM, Silva IS, Pereira DM, dos Reis FA, Albertini R, de Almeida P, et al. Effect of low-level laser therapy (660 nm) on acute inflammation induced by tenotomy of Achilles tendon in rats. *Photochemistry and photobiology*. 2012;88(6):1546-50.

Machado VI, Cabral A, Tavares L, Farinha R, Carvalho R, Cabrita A. Metabolomic evaluation of Wistar rat's liver in experimental administration of 7,12-Dimethylbenz(a)anthracene (DMBA). 2010;24(13):749.

Mahakian LM, Farwell DG, Zhang H, Seo JW, Poirier B, Tinling SP, et al. Comparison of PET Imaging with Cu-Liposomes and F-FDG in the 7,12-Dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)-Induced Hamster Buccal Pouch Model of Oral Dysplasia and Squamous Cell Carcinoma. *Molecular imaging and biology : MIB : the official publication of the Academy of Molecular Imaging*. 2013.

Makhlouf M, Dahaba MM, Tuner J, Eissa SA, Harhash TA. Effect of adjunctive low level laser therapy (LLLT) on nonsurgical treatment of chronic periodontitis. *Photomedicine and laser surgery*. 2012;30(3):160-6.

Manoharan S, Vasanthaselvan M, Silvan S, Baskaran N, Kumar Singh A, Vinoth Kumar V. Carnosic acid: a potent chemopreventive agent against oral carcinogenesis. *Chemico-biological interactions*. 2010;188(3):616-22.

Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature*. 2008;454(7203):436-44.

Mantovani A, Muzio M, Garlanda C, Sozzani S, Allavena P. Macrophage control of inflammation: negative pathways of regulation of inflammatory cytokines. Novartis Foundation symposium. 2001;234:120-31; discussion 31-5.

Martínez CAR. 4NQO Carcinogenesis: A Model of Oral Squamous Cell Carcinoma. *Int J Morphol*. 2012;30(1):309-14.

Martins-Filho PR, Da Silva LC, Piva MR. The prevalence of actinic cheilitis in farmers in a semi-arid northeastern region of Brazil. *International journal of dermatology*. 2011;50(9):1109-14.

Mester E. [The use of the laser beam in therapy]. *Orvosi hetilap*. 1966;107(22):1012-6.

Minicucci EM, Ribeiro DA, da Silva GN, Pardini MI, Montovani JC, Salvadori DM. The role of the TP53 gene during rat tongue carcinogenesis induced by 4-nitroquinoline 1-oxide. *Experimental and toxicologic pathology : official journal of the Gesellschaft fur Toxikologische Pathologie*. 2011;63(5):483-9.

Mognetti B, Di Carlo F, Berta GN. Animal models in oral cancer research. *Oral oncology*. 2006;42(5):448-60.

Monteiro JSdC, Acirole GT, Cangussu MCT, Santos JNd, Pinheiro ALB. Effects of visible or IR laser light on the progression of chemo-induced oral dysplasia: In vivo study on the hamster cheek pouch model. *Proc of SPIE*. 2009;7165(71650D):1-6.

Monteiro JSdC, Pinheiro AN, de Oliveira SC, Acirole GT, Sousa JA, Canguss MC, et al. Influence of laser phototherapy (lambda660 nm) on the outcome of oral chemical carcinogenesis on the hamster cheek pouch model: histological study. *Photomedicine and laser surgery*. 2011;29 (11):741-5.

Monteiro JSdC, Oliveira SCPSd, Júnior JAR, Gurgel CAS, Souza SCOMd, Pinheiro. ALB, et al. Effects of imiquimod and low-intensity laser (lambda660 nm) in chemically induced oral carcinomas in hamster buccal pouch mucosa. *Lasers in medical science*. 2013;28(3):1017-24.

Morais NC, Barbosa AM, Vale ML, Villaverde AB, de Lima CJ, Cogo JC, et al. Anti-inflammatory effect of low-level laser and light-emitting diode in zymosan-induced arthritis. *Photomedicine and laser surgery*. 2010;28(2):227-32.

Nauta JM, Roodenburg JL, Nikkels PG, Witjes MJ, Vermey A. Comparison of epithelial dysplasia--the 4NQO rat palate model and human oral mucosa. *International journal of oral and maxillofacial surgery*. 1995;24(1 Pt 1):53-8.

Nauta JM, Roodenburg JL, Nikkels PG, Witjes MJ, Vermey A. Epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma of the Wistar rat palatal mucosa: 4NQO model. *Head & neck*. 1996;18(5):441-9.

O'Sullivan T, Saddawi-Konefka R, Vermi W, Koebel CM, Arthur C, White JM, et al. Cancer immunoediting by the innate immune system in the absence of adaptive immunity. *The Journal of experimental medicine*. 2012;209(10):1869-82.

Olson JE, Schimmerling W, Tobias CA. Laser action spectrum of reduced excitability in nerve cells. *Brain research*. 1981;204(2):436-40.

Paiva MAEA. Associação entre displasia e inflamação em queilite actínica. *Bras Patol Med Lab*. 2012;48(6):455-8.

Park SY, Jin ML, Kim YH, Lee SJ, 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*. 2014;31(1):497-504.

Park SY, Kim JH, Lee YJ, Lee SJ, Kim Y. Surfactin suppresses TPA-induced breast cancer cell invasion through the inhibition of MMP-9 expression. *International journal of oncology*. 2013;42(1):287-96.

Pinheiro AL, do Nascliento SC, de Vieira AL, Rolim AB, da Silva PS, Brugnera A, Jr. Does LLLT stimulate laryngeal carcinoma cells? An in vitro study. *Brazilian dental journal*. 2002;13(2):109-12.

Pitot HC, Dragan YP. Facts and theories concerning the mechanisms of carcinogenesis. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 1991;5(9):2280-6.

Pitot HC. The molecular biology of carcinogenesis. *Cancer*. 1993;72(3 Suppl):962-70.

Piva MR, LB DES, Martins-Filho PR, Soares RC, T DESS, ES DESA. Role of inflammation in oral carcinogenesis (Part I): Histological grading of malignancy using a binary system. *Oncology letters*. 2011;2(6):1225-31.(a).

Piva MR, Santos TS, Ribeiro MH, Antunes AA, Melo AR, Silva EDO. Lasertherapy efficacy in temporomandibular disorders: control study. *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology*. 2011;76(3).(b).

Piva MR, LB DES, Martins-Filho PR, Nonaka CF, T DESS, ES DESA, et al. Role of inflammation in oral carcinogenesis (Part II): CD8, FOXP3, TNF-alpha, TGF-beta and NF-kappaB expression. *Oncology letters*. 2013;5(6):1909-14.

Renno AC, McDonnell PA, Parizotto NA, Laakso EL. The effects of laser irradiation on osteoblast and osteosarcoma cell proliferation and differentiation in vitro. *Photomedicine and laser surgery*. 2007;25(4):275-80.

Rich AM, Reade PC. Epithelial-mesenchymal interactions in experimental oral mucosal carcinogenesis. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*. 2001;30(7):389-97.

Schartinger VH, 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 : official journal of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer*. 2012;20(3):523-9.

Schioppa T, Moore R, Thompson RG, Rosser EC, Kulbe H, Nedospasov S, et al. B regulatory cells and the tumor-promoting actions of TNF-alpha during squamous carcinogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108(26):10662-7.

Sica A, Allavena P, Mantovani A. Cancer related inflammation: the macrophage connection. *Cancer letters*. 2008;267(2):204-15.

Singh R, Farmer PB. Liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry: the future of DNA adduct detection. *Carcinogenesis*. 2006;27(2):178-96.

Smith C, Pindborg JJ. *Histological Grading of Oral Epithelial Atypia by the Use of Photographic Standards*. WHO Reference Centre for Oral Precancerous Conditions. 1969.

Steidler NE, Reade PC. Initiation and promotion of experimental oral mucosal carcinogenesis in mice. *Journal of oral pathology*. 1986;15(1):43-7.

Suwa H, Hirano M, Kawarada K, Nagayama M, Ehara M, Muraki T, et al. Pthlh, a promising cancer modifier gene in rat tongue carcinogenesis. *Oncology reports*. 2014;31(1):3-12.

Suwaki N, Child ES, Elphick LM, Mann DJ. Dose-dependent changes in cyclin D1 in response to 4-nitroquinoline 1-oxide-induced DNA damage. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2010;497(1-2):55-61.

Tanaka T, Tanaka M, Tanaka T. Oral carcinogenesis and oral cancer chemoprevention: a review. *Pathology research international*. 2011;2011:431246.

Vered M, Allon I, Buchner A, Dayan D. Stromal myofibroblasts and malignant transformation in a 4NQO rat tongue carcinogenesis model. *Oral oncology*. 2007;43(10):999-1006.

Vered M, Polak-Charcon S, Babushkin T, Dayan D. 4NQO-induced rat tongue carcinoma: an ultrastructural study. *Ultrastructural pathology*. 2008;32(5):199-205.

Visscher SA, Witjes MJ, van der Vegt B, de Bruijn HS, van der Ploeg-van den Heuvel A, Amelink A, et al. Localization of liposomal mTHPC formulations within normal epithelium, dysplastic tissue, and carcinoma of oral epithelium in the 4NQO-carcinogenesis rat model. *Lasers in surgery and medicine*. 2013;45(10):668-78

Wallenius K, Lekholm U. Oral cancer in rats induced by the water-soluble carcinogen 4-nitroquinoline N-oxide. *Odontologisk revy*. 1973;24(1):39-48.

Werneck CE, Pinheiro AL, Pacheco MT, Soares CP, de Castro JL. Laser light is capable of inducing proliferation of carcinoma cells in culture: a spectroscopic in vitro study. *Photomedicine and laser surgery*. 2005;23(3):300-3.

Xie WL, Chipman JG, Robertson DL, Erikson RL, Simmons DL. Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1991;88(7):2692-6.

Xu ZZ, Zhang L, Liu T, Park JY, Berta T, Yang R, et al. Resolvins RvE1 and RvD1 attenuate inflammatory pain via central and peripheral actions. *Nature medicine*. 2010;16(5):592-7, 1p following 7.

Yamada A. manual básico: principios e técnicas de inmunocitoquímica. unicamp. 1998:1-39.

Yokota J, Sugimura T. Multiple steps in carcinogenesis involving alterations of multiple tumor suppressor genes. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology. 1993;7(10):920-5.

Zhang X, Chen J, Luo Y, Zhang L, Luo R, Li L. Fluorescence examination and photodynamic therapy of facial squamous cell carcinoma--a case report. Photodiagnosis and photodynamic therapy. 2012;9(1):87-90.

Zhao J, Wang Z, Han J, Qiu X, Pan J, Chen J. Increased frequency of CD4+ CD25+ FOXP3+ cells correlates with the progression of 4-nitroquinoline1-oxide-induced rat tongue carcinogenesis. Clinical oral investigations. 2013.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- 4NQO - 4-nitroquilonine 1-oxide
- AIE – Anti-inflamatório esteroidal
- AINE – Anti-inflamatório não esteroidal
- CCEO – Carcinoma de células escamosas oraia
- COX-2 – Cicloxigenase-2
- DEO – Displasia epitelial oral
- DMBA - Dimetilhylbenz(a)anthracene
- DNA - Do inglês deoxyribonucleic acid”, ácido desoxirribonucleico
- IL-10 -Interleucina-10
- J – Joule (unidade de energia)
- LASER – Do inglês “”ligh amplification by stimulation of energy radiation”
- LPM – Lesão potencialmente maligna
- MCA - 3-methylcholanthrene
- NFk-B – Fator de transcrição nuclear Kappa B
- TGF- β – Do inglês "Transforming growth factor", fator de crescimento transformante
- TLBP – Terapia com laser de baixa potência
- TNF α – Do inglês “Tumor Necrosis Factor”, fator de necrose tumoral alfa
- TPA – Do inglês 12-*O*-Tetradecanoylphorbol-13-acetate
- WALT- Do inglês "World Association of Laser Therapy"
- WHO – Do inglês World Health Organization
- Foxp3 – Proteína de transcrição responsável pela função e diferenciação da célula Treg



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COORDENAÇÃO DE PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM ANIMAIS (CEPA)

DECLARAÇÃO

Declaro, para os devidos fins, que o Projeto de Pesquisa intitulado **“AVALIAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DA ATUAÇÃO DO LASER NA CARCINOGENESE ORAL”**, sob coordenação do Prof^a. Dr^a. **ROSILENE CALAZANS SOARES** (protocolo **CEPA 51/2012**) foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Universidade Federal de Sergipe, em reunião realizada dia 31/08/2012.

São Cristóvão, 31 de agosto de 2012.

Prof^a. Dr^a. Flávia Teixeira Silva
Presidente do CEPA/UFS

Cidade Universitária “Prof. Aloísio de Campos”
Jardim Rosa Elze – São Cristóvão – SE
49100-000
Fones: 3212 6661/6606