



**UNESP - Universidade Estadual Paulista**  
**“Júlio de Mesquita Filho”**  
**Faculdade de Odontologia de Araraquara**



**Larissa Natiele Miotto**

**Avaliação do efeito combinado da fotobiomodulação e da naringenina na  
atividade de metaloproteinase da matriz por fibroblastos gengivais**

**Araraquara**

**2022**



**UNESP - Universidade Estadual Paulista**  
**“Júlio de Mesquita Filho”**  
**Faculdade de Odontologia de Araraquara**



**Larissa Natiele Miotto**

**Avaliação do efeito combinado da fotobiomodulação e da naringenina na  
atividade de metaloproteinase da matriz por fibroblastos gengivais**

Tese apresentada à Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara para obtenção do título de Doutora em Reabilitação Oral, na Área de Prótese

**Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Fernanda Gonçalves Basso**

**Araraquara**

**2022**

M669a

Miotto, Larissa Natiele

Avaliação do efeito combinado da fotobiomodulação e da naringenina na atividade de metaloproteinase da matriz por fibroblastos gengivais / Larissa Natiele Miotto. -- Araraquara, 2022

98 p. : il., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara

Orientadora: Fernanda Gonçalves Basso

1. Técnicas de cultura de células. 2. Metaloproteinase da matriz. 3. Inibidores teciduais de metaloproteinases. 4. Terapia com luz de baixa intensidade. 5. Flavanonas. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Odontologia, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

**Larissa Natiele Miotto**

**Avaliação do efeito combinado da fotobiomodulação e da naringenina na atividade de metaloproteinase da matriz por fibroblastos gengivais**

**Comissão julgadora**

**Tese para obtenção do grau de doutora em reabilitação oral**

Presidente e orientadora: Profa. Dra. Fernanda Gonçalves Basso

2ª Examinadora: Profa. Dra. Carla Raquel Fontana Mendonça

3ª Examinadora: Profa. Dra. Ana Paula Silveira Turrioni Hidalgo

4ª Examinador: Prof. Dr. Paulo Sérgio da Silva Santos

Araraquara, 12 de Agosto de 2022.

## **DADOS CURRICULARES**

**Larissa Natiele Miotto**

NASCIMENTO: 03/10/1991 – Monte Alto – SP

FILIAÇÃO: Josilene Marcussi Miotto  
Paulo Cesar Miotto

2010/2014 – Graduação em Odontologia – Área de Prótese – Faculdade de Odontologia de Araraquara, UNESP.

2015/2017 – Mestrado em Reabilitação Oral, Área de Prótese – Faculdade de Odontologia de Araraquara, UNESP.

2017/2018 – Especialização em Estomatologia, registrada no CFO – Faculdade de Odontologia de Araraquara, UNESP.

2021 – Habilitação em Laserterapia – Faculdade São Leopoldo Mandic.

2018/2022 – Doutorado em Reabilitação Oral, Área de Prótese – Faculdade de Odontologia de Araraquara, UNESP.

Dedico este trabalho a todos que me ajudaram nessa jornada.  
Em especial a Deus, à minha família, ao meu namorado, aos meus amigos  
e a todos que de alguma forma me apoiaram nos momentos difíceis.  
O apoio e suporte de todos foram fundamentais.

## AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À **Deus**, por sempre guiar meus passos, me iluminando e me conduzindo para o melhor caminho. Agradeço por se fazer sempre presente em inúmeras situações, se mostrando das mais variáveis formas, permitindo que eu vivencie seu amor infinito, e fazendo com que minha fé aumente a cada dia. Sinto uma profunda gratidão por todo o aprendizado profissional e pessoal destes últimos anos. Não posso dizer que foi um caminho fácil, mas ele me levou a uma transformação muito grande e foi na minha fé que encontrei força para continuar lutando e transformando cada dificuldade em um aprendizado.

Aos meus pais, **Josilene** e **Paulo** por serem meu suporte em todos os momentos, proporcionando um apoio incondicional. Agradeço por sempre torcerem por mim, vibrando comigo as minhas vitórias e por estarem tão presente nas dificuldades. Sou muito grata pelo que fazem por mim e por sermos tão amigos e unidos. Esta conquista foi batalhada junto com vocês, e com certeza ela não é só minha, é nossa.

À minha irmã, **Lais** por ser uma grande amiga, confidente e companheira. Que permaneçamos sempre unidas em nosso caminho e saiba que estarei sempre disposta a te ajudar e apoiar.

Ao meu **namorado**, Breno, por todo companheirismo, amor, paciência, compreensão, carinho, apoio e por me inspirar a ser uma pessoa melhor, e por estar comigo em todos os momentos me fazendo muito feliz.

A toda minha **família**, por fazerem parte da minha vida e me apoiarem. Agradeço a todos, pois cada um tem uma participação especial nessa conquista.

À República **Colgatas**, que além de moradia durante minha estadia em Araraquara, foi um local de amizade e companheirismo, onde desfrutei momentos felizes e inesquecíveis.

E a todos os **amigos** que compartilharam de perto toda minha trajetória e que em diversos momentos deram suporte e apoio, me incentivaram e torceram por mim. Além de tornarem a caminhada muito mais divertida e valiosa. Agradeço a amizade e companheirismo que adquirimos e a torcida de cada um. Vocês são muito especiais e contem comigo sempre que precisarem.

## AGRADECIMENTOS

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** pelo apoio e financiamento à esta pesquisa através da concessão da bolsa de doutorado (142574/2018-0-GD) e pelos auxílios concedidos à orientadora #302108/2019-0–PQ2 e 303599/2014-6 (PQ1A).

À minha orientadora **Profa. Dra. Fernanda Gonçalves Basso**, dedico um agradecimento especial por todos os ensinamentos, além de ser uma inspiração como pessoa. Obrigada por todo o apoio intelectual. E obrigada principalmente por ter confiado em mim e aceitado o desafio de ser minha orientadora mesmo eu não tendo experiência com cultura de células. Sempre admirei seu talento científico e sempre me inspirei na sua competência. E com certeza toda a vivência do doutorado valeu a pena e obrigada por ser a responsável por grande parte do meu amadurecimento profissional e pessoal.

Ao **Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa**, por além de ser um exemplo a se admirar na carreira acadêmica, ser um professor sempre disposto a apoiar os seus alunos. Obrigada pelo suporte para a execução do trabalho e pelas condições oferecidas para a realização desta pesquisa.

À **Lais Medeiros Cardoso**, pela grande parceria que sem a qual seria impossível a execução desse trabalho. Obrigada pela disponibilidade, paciência, experimentos, ensinamentos, e acima de tudo pela disposição em sempre me ajudar durante todos esses anos. O seu auxílio foi fundamental para a realização do meu doutorado.

À **Taisa Nogueira Pansani**, pela amizade e por todo o suporte intelectual para a execução desta pesquisa. Seu apoio foi fundamental em todo o processo.

A todos os **amigos da pós-graduação** e **aos amigos do Laboratório** de Patologia Experimental e Biomateriais (LPEB), que dividiram comigo momentos de grande aprendizado e por terem participado de meu crescimento pessoal e profissional. Obrigada pela amizade e apoio.

À **Profa. Dra. Daniela de Godoi Gonçalves**, responsável por supervisionar todo meu estágio docência durante o doutorado. Obrigada pela oportunidade de aprender ao lado de uma grande mestre como exercer a docência na sua excelência.

À **Faculdade** de Odontologia de Araraquara (UNESP), na pessoa de seu Diretor, Prof. Dr. Edson de Arruda Campos e da Vice-Diretora, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Profa. Dra. Patrícia Petromilli Nordi Sasso Garcia pelas condições oferecidas para a realização desta pesquisa.

À **Coordenação do Programa** de Pós-Graduação em Reabilitação Oral da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, pelo suporte para a execução do trabalho.

Aos **Professores** do Programa de Reabilitação Oral da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP, pelos ensinamentos e experiências vividas. Serei eternamente grato a todos vocês.

A todos os **funcionários** da Faculdade de Odontologia de Araraquara, pelo carinho empregado na manutenção dessa instituição.

Aos **Professores membros da banca de qualificação e defesa**, pelas excelentes contribuições que engrandeceram este estudo.

À todos que de alguma forma contribuíram para a conquista dessa etapa, a minha gratidão! Muito obrigada!

*Entrega o teu caminho ao Senhor;  
confia nele, e ele o fará.  
Salmos 37:5\**

Miotto LN. Avaliação do efeito combinado da fotobiomodulação e da naringenina na atividade de metaloproteinase da matriz por fibroblastos gengivais [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2022.

## RESUMO

A mucosite oral (MO) é uma das principais complicações agudas da quimioterapia ou da radioterapia de cabeça e pescoço podendo ocasionar interrupções e atrasos no tratamento oncológico impactando a qualidade de vida e sobrevida destes pacientes. Seu tratamento ainda é controverso e baseado principalmente em terapias paliativas que apenas reduzem a sintomatologia dolorosa, baseado nisso, torna-se fundamental a avaliação de novas estratégias terapêuticas que atuem prevenindo ou tratando de forma efetiva as lesões. Levando em conta que estudos preliminares sugerem que a aplicação isolada da FBM e dos compostos de NA sobre fibroblastos gengivais resultaram em redução da expressão e síntese de metaloproteinase da matriz (MMP), é esperado que a combinação de ambas as propostas terapêuticas possa resultar em um efeito sinérgico, acelerando o processo de reparo da MO. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi determinar a dose da FBM com LBI necessária para modular a síntese de MMP-2 (estudo 1) e avaliar o efeito combinado da aplicação da NA e da FBM na modulação da síntese e atividade de MMP-2, IL-6 e TIMP-1 por fibroblastos gengivais humanos (HGF), bem como sobre funções celulares relacionadas ao processo de reparo tecidual (estudo 2). Foram utilizadas culturas primárias de HGF que foram obtidas de uma doadora voluntária de acordo com o Comitê de Ética em Pesquisas em Humanos. O fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) foi utilizado como controle positivo, por induzir a síntese de MMPs em HGF. Para a irradiação com LBI utilizou-se o dispositivo LASERTable (InGaAsP; 780 nm; 0,025 W; estudo 1: 0,5, 2 e 4 J/cm<sup>2</sup>; estudo 2: 4 J/cm<sup>2</sup>). Para o estudo 1, a análise da viabilidade celular foi realizada por meio do ensaio colorimétrico de metiltetrazolium (MTT) e avaliação da síntese de MMP-2 foi realizada por meio do imunoenensaio ELISA. Para o estudo 2, utilizou-se a NA sintética, na concentração de 10 $\mu$ g/mL, baseado em estudos anteriores. O efeito da combinação da NA e da FBM na proliferação de HGF foi realizado por meio do ensaio PrestoBlue, na migração por meio do ensaio de cicatrização in vitro, na síntese de MMP-2, IL-6 e TIMP-1 por HGF por meio de imunoenensaio ELISA e na atividade gelatinolítica de HGF por meio de zimografia in situ. Os dados foram submetidos à análise de normalidade e homocedasticidade para seleção dos testes estatísticos adequados (ANOVA, Tukey). Os dados da atividade gelatinolítica foram avaliados qualitativamente e apresentados de forma descritiva. Todas as inferências estatísticas foram feitas considerando o nível de significância de 5%. Os experimentos foram realizados em duplicatas, com N=6. De acordo com os resultados obtidos do estudo 1, a terapia com FBM 4 J/cm<sup>2</sup> aumentou significativamente a viabilidade dos HFG na presença ou ausência de TNF- $\alpha$  em relação ao controle negativo ( $p < 0,05$ ) e os grupos tratados com FBM 2 J/cm<sup>2</sup> e 4 J/cm<sup>2</sup> associada ou não ao TNF- $\alpha$  apresentaram diminuição significativa da síntese de MMP-2 em relação ao controle negativo ( $p < 0,05$ ). Sendo assim, a densidade de 4 J/cm<sup>2</sup> foi selecionada para o estudo 2. E no estudo 2, a combinação de FBM+NA aumentou a proliferação e a migração dos HFG na presença ou ausência de TNF- $\alpha$  ( $p < 0,05$ ) e promoveu síntese de MMP-2 similar ao controle negativo ( $p > 0,05$ ). Para a síntese de IL-6, FBM+NA foram estatisticamente semelhantes ao controle negativo ( $p > 0,05$ ) e para FBM+NA na presença de TNF- $\alpha$  apresentaram redução significativa da síntese de IL-6 em relação ao controle positivo (TNF- $\alpha$ ) ( $p > 0,05$ ). O tratamento de FBM+NA apresentou síntese de TIMP-1 estatisticamente semelhante ao controle negativo

( $p > 0,05$ ). A FBM+NA na presença de TNF- $\alpha$ , promoveu menor intensidade de fluorescência, indicando modulação da atividade gelatinolítica induzida por essas terapias. Dessa forma, a FBM com 4 J/cm<sup>2</sup> associado a NA apresenta um potencial sinérgico in vitro resultando em aumento da proliferação e migração celular dos fibroblastos gengivais humanos e menores níveis de síntese de MMP-2 e IL-6, sem alterar a síntese de TIMP-1. E a associação dessas terapias na presença de TNF- $\alpha$  indicou a modulação da atividade gelatinolítica, favorecendo estas funções celulares que estão relacionadas a aceleração do reparo tecidual.

**Palavras – chave:** Técnicas de cultura de células. Metaloproteinase da matriz. Inibidores teciduais de metaloproteinases. Terapia com luz de baixa intensidade. Flavanonas.

Miotto LN. Evaluation of the combined effect of photobiomodulation and naringenin on matrix metalloproteinase activity by gingival fibroblasts [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2022.

## **ABSTRACT**

Oral mucositis is one of the main acute complications of chemotherapy or radiotherapy of head and neck, causing interruptions and delays in the oncological treatment, impacting the quality of life and survival of these patients. Its treatment is still controversial and based mainly on palliative therapies that only reduce the pain symptomatology, based on this, it becomes fundamental to evaluate new therapeutic strategies to prevent or treat lesions effectively. Considering that preliminary studies suggest that the isolated application of PBM and NA compounds on gingival fibroblasts resulted in reduced expression and synthesis of MMPs, it is expected that the combination of both therapeutic proposals may result in a synergistic effect, accelerating the process of oral tissue repair. Thus, the objective of this work was to evaluate the dose of FBM with LLLT necessary to modulate a synthesis of MMP-2 (study 1) and to evaluate the combined effect of the application of NA and PBM in the modulation of MMP-2, IL-6 and TIMP-1 synthesis and activity by human gingival fibroblasts (HGF), as well as on cellular functions related to the tissue repair process (study 2). Primary cultures of HGF were obtained from a voluntary donor according to the Ethics Committee on Human Research. Tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) was used as a positive control, by inducing the synthesis of MMPs in HGF. For LLLT irradiation, the LASERTable device was used (InGaAsP; 780 nm; 25 mW; study 1: 0.5, 2 and 4 J/cm<sup>2</sup>; study 2: 4 J/cm<sup>2</sup>). For study 1, cell viability analysis was performed using the methyltetrazolium (MTT) colorimetric assay and the evaluation of MMP-2 synthesis was performed using the ELISA immunoassay. For study 2, synthetic NA was used at a concentration of 10  $\mu$ g/mL, based on previous studies. The effect of the combination of NA and PBM on the proliferation of HGF was performed by PrestoBlue assay, in the migration through the in vitro healing assay, in the synthesis of MMP-2, IL-6 and TIMP-1 by HGF by ELISA immunoassay and in the activity gelatinolytic activity of HGF by in situ zymography. The data were submitted to analysis of normality and homoscedasticity to select the appropriate statistical tests (ANOVA, Tukey). The gelatinolytic activity data was evaluated qualitatively and presented in a descriptive way. All statistical inferences were made considering the significance level of 5%. The experiments were performed in duplicates, with N=6. According to the results obtained from study 1, therapy with PBM 4 J/cm<sup>2</sup> significantly increased the viability of HFG in the presence or absence of TNF- $\alpha$  in relation to the negative control ( $p < 0.05$ ) and the groups treated with PBM 2 J/cm<sup>2</sup> and 4 J/cm<sup>2</sup> associated or not with TNF- $\alpha$  showed a significant decrease in MMP-2 synthesis compared to the negative control ( $p < 0.05$ ). Therefore, a density of 4 J/cm<sup>2</sup> was selected for study 2. And in study 2, the combination of PBM+NA increased proliferation and migration of HFG in the presence or absence of TNF- $\alpha$  ( $p < 0.05$ ) and promoted synthesis of MMP-2 similar to the negative control ( $p > 0.05$ ). For IL-6 synthesis, PBM+NA were statistically similar to the negative control ( $p > 0.05$ ) and for PBM+ NA in the presence of TNF- $\alpha$ , there was a significant reduction in IL-6 synthesis in relation to the positive control (TNF- $\alpha$ ) ( $p > 0.05$ ). The PBM+NA treatment showed TIMP-1 synthesis compared to the negative control ( $p > 0.05$ ). PBM+NA in the presence of TNF- $\alpha$ , promoted lower fluorescence intensity, indicating modulation of gelatinolytic activity induced by these therapies. Thus, PBM with 4 J/cm<sup>2</sup> associated with NA has a synergistic potential in vitro resulting in increased proliferation and cell migration of human gingival fibroblasts and lower

levels of synthesis of MMP-2 and IL-6, without altering TIMP-1 synthesis. And the association of these therapies in the presence of TNF- $\alpha$  indicated the modulation of gelatinolytic activity, favoring these cellular functions that are related to the acceleration of tissue repair.

**Keywords:** Cell culture techniques. Matrix metalloproteinase. Tissue inhibitor of metalloproteinases. Low-level light therapy. Flavonones.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> - Imagens representativas de parte da obtenção de culturas primárias de HGF .....	<b>50</b>
<b>Figura 2</b> - Esquema representativo do delineamento experimental do estudo 1.....	<b>51</b>
<b>Figura 3</b> - Dispositivo LaserTABLE em vista lateral (a), superior (b) e frontal (c) .....	<b>51</b>
<b>Figura 4</b> - Esquema representativo da análise da viabilidade celular realizada por meio do ensaio de MTT .....	<b>53</b>
<b>Figura 5</b> - Esquema representativo do imunoenensaio ELISA .....	<b>55</b>
<b>Figura 6</b> - Esquema representativo do delineamento experimental do estudo 2 .....	<b>56</b>
<b>Figura 7</b> - Esquema representativo da análise da proliferação celular realizada por meio do ensaio de PrestoBlue .....	<b>57</b>
<b>Figura 8</b> - Esquema representativo da análise da migração celular realizada por meio do ensaio de cicatrização in vitro .....	<b>58</b>
<b>Figura 9</b> - Mensuração da área da ferida .....	<b>58</b>
<b>Figura 10</b> - Esquema representativo da análise atividade gelatinolítica realizada por meio da técnica de zimografia in situ .....	<b>60</b>
<b>Figura 11</b> - Viabilidade dos HGF expostos ao TNF-alfa, associado ou não a FBM, em diferentes doses de energia .....	<b>61</b>
<b>Figura 12</b> - Síntese de MMP-2 por HGF expostos ao TNF-alfa, associado ou não a FBM, em diferentes doses de energia .....	<b>62</b>

<b>Figura 13</b> - Proliferação celular de HGF expostos ou não ao TNF- $\alpha$ , associado ou não a FBM (4 J/cm <sup>2</sup> ) e NA .....	<b>63</b>
<b>Figura 14</b> - Análise quantitativa da migração celular de HGF expostos ou não ao TNF- $\alpha$ , associado ou não a FBM (4 J/cm <sup>2</sup> ) e NA .....	<b>64</b>
<b>Figura 15</b> - Análise qualitativa da migração celular de HGF expostos ou não ao TNF- $\alpha$ , associado ou não a FBM (4 J/cm <sup>2</sup> ) e NA .....	<b>65</b>
<b>Figura 16</b> - Síntese de MMP-2 por HGF expostos ou não ao TNF-alfa, associado ou não a FBM (4 J/cm <sup>2</sup> ) e NA .....	<b>66</b>
<b>Figura 17</b> - Síntese de IL-6 por HGF expostos ou não ao TNF-alfa, associado ou não a FBM (4 J/cm <sup>2</sup> ) e NA .....	<b>67</b>
<b>Figura 18</b> - Síntese de TIMP-1 por HGF expostos ou não ao TNF- $\alpha$ , associado ou não a FBM (4 J/cm <sup>2</sup> ) e NA .....	<b>68</b>
<b>Figura 19</b> - Atividade gelatinolítica dos HGF em aumento de 10X .....	<b>69</b>
<b>Figura 20</b> - Atividade gelatinolítica dos HGF em aumento de 20X .....	<b>70</b>

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Parâmetros da FBM estabelecidos para o estudo 1..... **52**

**Tabela 2.** Definição dos grupos experimentais do estudo 1 ..... **53**

**Tabela 3.** Definição dos grupos experimentais do estudo 2 ..... **56**

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANS	Agência Nacional de Saúde
BSA	Albumina de soro bovino
ANOVA	Análise de variância
InGaAsP	Arseneto de índio gálio e fosfato
MASCC	Associação multinacional de cuidados de suporte em câncer
CaCl <sub>2</sub>	Cloreto de cálcio
HCl	Cloreto de hidrogênio
NaCl	Cloreto de sódio
CEP	Comitê de Ética em Pesquisas em Humanos
CFO	Conselho Federal de Odontologia
C-	Controle negativo
C+	Controle positivo
DE	Densidade de energia
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
NF $\kappa$ B	Fator nuclear Kappa B
HGF	Fibroblastos de Gengiva Humana
FBM	Fotobiomodulação
He-Ne	Hélio-Neônio
TIMP	Inibidor tecidual de metaloproteinase
INCA	Instituto Nacional de Câncer
IL	Interleucina
LBI	Laser de baixa intensidade
DMEM	Meio Eagle modificado por Dulbecco
MMP	Metaloproteinase da matriz
MTT	Metil-tiazolil-tetrazólio
MO	Mucosite oral
NA	Naringenina
OMS	Organização Mundial de Saúde
PA	Proantocianidina
RN	Resolução normativa
SUS	Sistema Único de Saúde
ISOO	Sociedade Internacional de Oncologia Oral
SFB	Soro fetal bovino
TPP	Techno Plastic Products
TMO	Transplante de medula óssea
Tris-HCl	Tris (Hidroximetilaminometano)
TNM	Tumor linfonodo metástase
HPV	Vírus do papiloma humano

## LISTA DE SÍMBOLOS

cm	centímetro
cm <sup>2</sup>	centímetro quadrado
°C	grau Célsius
Gy	gray
h	hora
J	joule
J/cm <sup>2</sup>	joule por centímetro quadrado
>	maior
<	menor
µg/mL	micrograma por mililitro
µL	microlitro
mg/mL	miligrama por mililitro
mL	mililitro
mM	milimolar
mW	miliwatt
min	minuto
nm	nanômetro
nM	nanomolar
N	normal
%	porcentagem
pH	potencial hidrogeniônico
rpm	rotações por minuto
s	segundo
W	watt
10 <sup>5</sup>	10 elevado a 5ª potência = 100.000

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>22</b>
<b>2 PROPOSIÇÃO .....</b>	<b>25</b>
<b>2.1 Objetivos Específicos .....</b>	<b>25</b>
<b>2.1.1 Estudo 1 .....</b>	<b>25</b>
<b>2.1.2 Estudo 2 .....</b>	<b>25</b>
<b>3 REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>26</b>
<b>3.1 Câncer Bucal .....</b>	<b>26</b>
<b>3.2 Mucosite Oral.....</b>	<b>29</b>
<b>3.3 Fotobiomodulação .....</b>	<b>35</b>
<b>3.4 Bioflavonóides .....</b>	<b>43</b>
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>49</b>
<b>4.1 Isolamento e Cultura de Fibroblastos Gengivais.....</b>	<b>49</b>
<b>4.2 Estudo 1 .....</b>	<b>50</b>
<b>4.2.1 Delineamento experimental.....</b>	<b>50</b>
<b>4.2.2 Avaliação da viabilidade celular (MTT) .....</b>	<b>53</b>
<b>4.2.3 Avaliação da síntese de MMP-2 .....</b>	<b>54</b>
<b>4.3 Estudo 2 .....</b>	<b>55</b>
<b>4.3.1 Delineamento experimental.....</b>	<b>55</b>
<b>4.3.2 Avaliação da proliferação celular .....</b>	<b>57</b>
<b>4.3.3 Avaliação da migração celular.....</b>	<b>57</b>
<b>4.3.4 Avaliação da síntese de MMP-2, IL-6 e TIMP-1 .....</b>	<b>59</b>
<b>4.3.5 Análise da atividade gelatinolítica (zimografia in situ).....</b>	<b>59</b>
<b>4.4 Análise dos Dados .....</b>	<b>60</b>
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>61</b>
<b>5.1 Estudo 1 .....</b>	<b>61</b>
<b>5.1.1 Avaliação da viabilidade celular (MTT) .....</b>	<b>61</b>
<b>5.1.2 Avaliação da síntese de MMP-2 .....</b>	<b>62</b>
<b>5.2 Estudo 2 .....</b>	<b>63</b>

<b>5.2.1 Análise da proliferação celular .....</b>	<b>63</b>
<b>5.2.2 Análise da migração celular .....</b>	<b>64</b>
<b>5.2.3 Análise da síntese de MMP-2 .....</b>	<b>66</b>
<b>5.2.4 Análise da síntese de IL-6 .....</b>	<b>67</b>
<b>5.2.5 Análise da síntese de TIMP-1 .....</b>	<b>68</b>
<b>5.2.6 Análise da atividade gelatinolítica .....</b>	<b>69</b>
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>71</b>
<b>7 CONCLUSÃO .....</b>	<b>77</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>78</b>
<b>ANEXO A – CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA .....</b>	<b>100</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A mucosite oral (MO) é uma das principais complicações agudas da radioterapia do câncer de cabeça e pescoço e da quimioterapia<sup>1,2</sup>, acometendo praticamente a totalidade dos pacientes que são submetidos ao tratamento oncológico<sup>3</sup>. Clinicamente, a mucosite oral é caracterizada como uma lesão que pode variar desde uma mucosa normal, eritema até ulceração e necrose tecidual. Além disso, pode causar sintomatologia dolorosa, disfagia e inclusive evoluir para incapacidade de alimentação por via oral<sup>4</sup>. Levando em conta todo o comprometimento ocasionado pela mucosite podem ocorrer interrupções e atrasos no tratamento oncológico, afetando além da qualidade de vida a sobrevida desses pacientes<sup>5,6</sup>.

O desenvolvimento da mucosite está associado à presença de maiores concentrações de fatores pró-inflamatórios, como citocinas e espécies reativas de oxigênio, que, por sua vez, estão relacionados à ativação e amplificação de vias de sinalização envolvidas na resposta inflamatória e também na síntese e liberação de neurotransmissores, resultando em maior sintomatologia dolorosa<sup>7-13</sup>. Além disso, o desenvolvimento e a gravidade das lesões de mucosite oral também têm sido relacionados à atividade de metaloproteinases da matriz (MMPs)<sup>14-16</sup>, sendo frequentemente descritas as MMP-2, -3 e -9<sup>14-16</sup>. Estas enzimas são responsáveis pela degradação da matriz extracelular, principalmente do colágeno, e remodelação dos tecidos durante sua formação e manutenção da homeostasia tecidual, assim como durante o processo de reparo<sup>17</sup>. Um mecanismo importante para a regulação da atividade das MMPs é através da ligação a uma família de proteínas homólogas denominadas inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMP-1 a TIMP-4)<sup>18</sup>. E durante o desenvolvimento da mucosite, o aumento de MMPs tem sido relacionado a uma maior atividade proteolítica do tecido conjuntivo da lâmina própria e também à desorganização do tecido epitelial, por meio da perda da expressão de moléculas de adesão<sup>15</sup>.

O tratamento da mucosite oral ainda é controverso e baseado em terapias paliativas, cujo objetivo principal é reduzir a sintomatologia dolorosa, utilizando bochechos com agentes analgésicos, antiinflamatórios, antibióticos tópicos ou sistêmicos e crioterapia<sup>6</sup>. A fotobiomodulação (FBM) com laser de baixa intensidade (LBI) tem sido incluída no manejo terapêutico da mucosite oral e também pode ser

utilizada como um tratamento preventivo eficaz quando associada aos cuidados orais padrões<sup>19-22</sup>. Além disso, a FBM pode reduzir tanto a ocorrência quanto a severidade das lesões<sup>6</sup>, reduzir a prescrição de analgésicos<sup>23</sup>, melhorar a dermatite por radiação, o linfodema, reduzir a fibrose e ajudar na regeneração dos nervos<sup>24</sup>. Estudos *in vitro* também demonstraram que a FBM promoveu estímulo da proliferação das células da mucosa oral bem como a modulação da expressão e síntese de mediadores inflamatórios<sup>25,26</sup>. Estudos clínicos também sinalizam resultados promissores, como uma menor incidência de mucosite oral, redução de gastrostomias, tubos nasogástricos e opióides, melhor resposta ao tratamento, aumento na sobrevida livre de progressão de doença em relação ao grupo placebo e tendência para uma melhor sobrevida global<sup>27</sup>.

Outras propostas para prevenção ou tratamento da mucosite oral incluem a utilização de alguns compostos naturais<sup>28</sup>, que podem inclusive promover efeitos significativos, como menor incidência e gravidade das lesões, bem como redução da sintomatologia para os pacientes em tratamento radio/quimioterápico<sup>28</sup>. E uma das opções naturais pode ser a utilização dos polifenóis<sup>29</sup> que modo geral, possuem ação antioxidante<sup>30,31</sup> e um papel como modulador na sinalização celular<sup>31</sup>. A naringenina (NA) é um polifenól encontrado na alimentação humana principalmente em frutas cítricas<sup>32</sup>. Estudos demonstraram que a NA apresenta efeitos protetores sobre a saúde como efeito antioxidante<sup>33,34</sup>, anti-hiperglicêmico<sup>35</sup>, anticarcinogênico<sup>36</sup>, antidepressivo<sup>37</sup> e anti-inflamatório<sup>38</sup>. E a NA demonstrou ser efetiva na modulação da resposta inflamatória e na regulação da atividade de MMPs<sup>39,40</sup>. Entretanto, devido à fonte natural, os polifenóis podem apresentar diferentes formulações, dependendo da fonte, condição de cultivo, clima e forma de extração<sup>41</sup> e essas variações em sua composição podem dificultar a sua aplicação terapêutica. Desta forma, a seleção de um derivado similar bioativo sintético deste composto natural biofenólico pode oferecer resultados mais representativos<sup>42</sup>, embora mais estudos são necessários para avaliar se esses compostos sintéticos apresentam os mesmo efeitos que os compostos naturais.

Considerando que o tratamento da mucosite oral ainda é controverso e baseado em terapias paliativas torna-se fundamental a avaliação de novas estratégias terapêuticas que atuem prevenindo ou tratando de forma efetiva as lesões. Levando em conta que estudos preliminares sugerem que a aplicação isolada da FBM e dos compostos de NA sobre fibroblastos gengivais resultaram em redução da expressão

e síntese de MMPs, é esperado que a combinação de ambas as propostas terapêuticas possa resultar em um efeito sinérgico, acelerando o processo de reparo dos tecidos orais. Desta forma, a aplicação destes compostos sobre lesões de mucosite oral poderia reduzir a resposta inflamatória local, resultando em diminuição da sintomatologia dolorosa, bem como da síntese e atividade de metaloproteinases, reduzindo a degradação tecidual e acelerando o processo de reparo. Com isso o impacto será uma melhor qualidade de vida e maior sobrevivência desses pacientes, sem prejuízo para o tratamento oncológico.

## **2 PROPOSIÇÃO**

Avaliar o potencial sinérgico da FBM com LBI e da NA sintética na modulação da síntese e atividade mediadores inflamatórios por HGF, bem como sobre funções celulares relacionadas ao processo de reparo tecidual.

### **2.1 Objetivos Específicos**

Para a realização do objetivo foi necessário executar dois estudos com o objetivo de:

#### **2.1.1 Estudo 1**

Determinar o efeito da FBM com LBI na viabilidade celular e na modulação de metaloproteinase-2, por meio das análises:

- Viabilidade celular, por meio do ensaio MTT;
- Síntese de MMP-2 por meio de imunoensaio ELISA.

#### **2.1.2 Estudo 2**

Determinar o efeito da combinação das terapias, FBM com LBI e naringenina sintética sobre os HGF, por meio das análises:

- Proliferação celular, por meio do ensaio PrestoBlue;
- Migração celular, por meio do ensaio de cicatrização in vitro (wound healing);
- Síntese de MMP-2, IL-6 e TIMP-1 por meio de imunoensaio ELISA;
- Atividade gelatinolítica, por meio de zimografia in situ.

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

Uma revisão da literatura foi realizada com o objetivo de embasar a pesquisa e foi dividida em tópicos, de acordo com os assuntos abordados.

#### 3.1 Câncer Bucal

As nossas células estão constantemente se multiplicando sobre o controle do organismo. Quando o tecido apresenta uma proliferação anormal, que foge ao controle do organismo e tende à autonomia e à perpetuação temos a formação de uma neoplasia. Estas neoplasias podem desenvolver-se por diversos locais do corpo, podendo ser benigna ou maligna. As neoplasias benignas também podem ser chamadas de tumores benignos, e elas apresentam um crescimento organizado, geralmente lento e expansivo, e apresentam limites bem nítidos. E apesar de não apresentarem a capacidade de invasão tecidual, podem comprimir os órgãos e os tecidos adjacentes<sup>43</sup>.

Mas as neoplasias também podem ser malignas, que neste caso podem ser chamados de tumores malignos ou câncer e representam um aglomerado com mais de 100 doenças<sup>43</sup>. As neoplasias malignas agrupam uma gama de doenças que podem afetar qualquer parte do corpo, derivada de alterações na proliferação e fenótipo celulares, resultando em um crescimento celular atípico e autônomo, ou seja, um crescimento celular desordenado, originando massas tumorais, com maior autonomia, e são capazes de invadir tecidos vizinhos, assim como gerar tumores à distância, provocando metástases<sup>44</sup>. O processo de desenvolvimento do câncer é chamado de oncogênese ou carcinogênese, e de forma simplificada ocorre em três estágios descritos como estágio de iniciação, promoção e progressão, variando com a intensidade e presença de estímulos dos agentes carcinógenos ou cancerígenos, o tipo de câncer e a localização primária<sup>43</sup>.

O câncer é um problema de saúde pública em todo o mundo, classificado como a segunda principal causa de morte globalmente, e apresentando um aumento constante dos casos<sup>45</sup>. Também se caracteriza como a segunda causa de morte mais comum entre crianças de 1 a 14 anos nos Estados Unidos, ultrapassadas apenas por acidentes<sup>45</sup>. A última estimativa da incidência de câncer no Brasil realizada pelo

Instituto Nacional de Câncer (INCA), prevê que o Brasil terá 625 mil novos casos de câncer a cada ano do triênio 2020-2022<sup>43</sup>.

O câncer bucal e de orofaringe agrupados são o sexto câncer mais comum no mundo<sup>46</sup>. No Brasil também é um dos tipos de cânceres mais comuns. Segundo as estimativas do INCA<sup>43</sup>, o número de casos novos de câncer da cavidade oral esperados para o Brasil, para cada ano do triênio 2020-2022, será de 11.200 casos em homens e de 4.010 em mulheres. Esses valores correspondem a um risco estimado de 10,70 casos novos a cada 100 mil homens, ocupando a quinta posição. E a previsão do número de mortes será 6.605 casos sendo 5.120 homens e 1.485 mulheres<sup>43</sup>.

A prevalência do câncer bucal tende a acometer mais o sexo masculino e 70% dos casos são diagnósticos em indivíduos com idade superior a 50 anos<sup>47</sup>. E os principais fatores de risco para esta neoplasia maligna são principalmente o tabagismo (fumar ou mascar tabaco) e o etilismo. O risco de câncer parece permanecer elevado mesmo muitos anos (pelo menos 10) após a cessação do tabagismo<sup>48</sup>. E a associação de tabagismo ao etilismo intensifica a predisposição<sup>43</sup>, sendo que o consumo de tabaco e álcool está associado a aproximadamente 75% dos cânceres do trato aerodigestivo superior<sup>49</sup>. Outros agentes cancerígenos mais comuns, são as infecções pelo HPV (principalmente os tipos 16 e 18) e a radiação solar relacionada ao câncer de lábio. E a exposição continuada a esses fatores aumenta além da chance de desenvolvimento de um tumor, a chance desse tumor persistir, ou de aparecer um segundo tumor primário e também de recidiva tumoral<sup>50</sup>.

O câncer bucal e de orofaringe abrange as neoplasias de grande variedade de sítios anatômicos, incluindo a pele da região peri-oral, cavidade oral, orofaringe, nasofaringe, hipofaringe, laringe, seios paranasais e glândulas salivares<sup>51</sup>. As neoplasias malignas de cabeça e pescoço apresentam uma alta incidência, prevalência e mortalidade e as taxas de sobrevida em 5 anos são aproximadamente 50%<sup>46</sup>, sendo que a maioria desses pacientes sobrevivem pouco tempo após o diagnóstico<sup>52</sup>, pois a maioria dos tumores é identificada tardiamente, comprometendo o tratamento, o prognóstico e a sobrevida dos pacientes<sup>53</sup>. Dessa forma o diagnóstico precoce e o encaminhamento imediato dessas pacientes ao tratamento são essenciais para a redução dos danos causados por essa patologia<sup>54</sup>.

O tratamento padrão das neoplasias de cabeça e pescoço é a realização da ressecção cirúrgica primária com ou sem terapia adjuvante pós-operatória<sup>55</sup>. Porém o

tratamento cirúrgico por si só pode acabar sendo mutilador e resultar em alterações físicas, funcionais, emocionais e sociais importantes. Além de poder comprometer a fonação, mastigação, deglutição, respiração e ocasionar alterações estéticas, gerando uma redução na qualidade de vida desses pacientes<sup>56</sup>.

Entretanto o comportamento agressivo dessa patologia torna o tratamento complexo e geralmente exige, na maioria dos casos, uma abordagem de tratamento multimodal que consiste na associação da cirurgia com radioterapia e/ou quimioterapia<sup>57</sup>, sendo que o sequenciamento e a combinação dessas terapias se baseiam na localização tumoral, experiência dos médicos da equipe, preferência do paciente e principalmente no estadiamento<sup>58</sup>. O sistema de estadiamento TNM é utilizado para descrever a extensão anatômica do tumor e considera o tamanho do tumor primário (T), a ausência ou presença de metástases em linfonodos regionais (N) e a ausência ou presença de metástases à distância (M). E são adicionados números demonstrando a extensão desses itens e quanto maior o estágio, pior o prognóstico do paciente<sup>59</sup>. Mas para os tumores de cabeça e pescoço, a cirurgia e a radioterapia são os tratamentos mais efetivos e a quimioterapia e a imunoterapia normalmente são utilizadas como terapias adjuvantes<sup>60</sup>.

Os resultados do tratamento para pacientes com câncer melhoraram consideravelmente nas últimas décadas devido às melhorias na reconstrução e no tratamento adjuvante<sup>55</sup>, além disso, os avanços no tratamento conduziram às mudanças na incidência, na natureza, e na severidade de complicações orais, entretanto apesar dessa redução em algumas das toxicidades orais agudas, elas permanecem inevitáveis<sup>61</sup>.

As complicações orais resultantes do câncer e do seu tratamento causam toxicidades agudas e tardias que são subrelatadas, subreconhecidas e subtratadas<sup>61</sup>. As complicações orais agudas incluem mucosite, dor, disfagia, alterações na saliva e no paladar, aumento de infecções por cândida, herpes e outros, limitação de movimento, exacerbação aguda de infecção crônica dental e periodontal, resultando em função oral limitada<sup>61</sup>. Enquanto que as complicações tardias incluem alterações na viscosidade e quantidade de saliva, alteração e perda do paladar, halitose, dificuldade para deglutição, trismo, neuropatia e atrofia da mucosa, limitação de movimentos, aumento da desmineralização e cárie, aumento de problemas periodontais e aumento do risco para necrose óssea, além do impacto estético e social como retraimento social, baixa qualidade de vida e depressão<sup>61</sup>. E o câncer bucal e

de orofaringe possuem as maiores taxas de suicídio entre todos os tipos de câncer<sup>62,63</sup>. Considerando tudo isso, o resultado de todas essas complicações é um impacto negativo significativo na qualidade de vida dos pacientes oncológicos, sendo de extrema importância o manejo adequado das toxicidades orais para garantir uma ótima saúde bucal tanto a curto quanto a longo prazo e o bem-estar geral<sup>61</sup>.

Outro fator que se faz necessário estar atento é o impacto a curto e a longo prazo causado pela pandemia do novo coronavírus SARS-CoV-2 no diagnóstico e no tratamento do câncer<sup>64</sup>. Desde o início da pandemia, sociedades da área de oncologia formularam protocolos para buscarem minimizar os impactos da pandemia no tratamento oncológico e garantirem a segurança dos pacientes<sup>65</sup>. Porém em 2020, diversos diagnósticos que seriam realizados foram atrasados e também ocorreram atrasos no tratamento do câncer devido a todo o cenário de dificuldades que foram impostas pela pandemia do novo Coronavírus<sup>64</sup>. Dentre essas dificuldades estavam o acesso reduzido aos cuidados de saúde devido ao fechamento de estabelecimentos de saúde, resultando em atrasos no diagnóstico e tratamento que podem levar a uma queda de curto prazo na incidência câncer, mas não por uma redução verdadeira, mas pelo atraso no diagnóstico<sup>64</sup>.

E os números podem a curto e a longo prazo revelar um aumento na doença em estágio avançado e, finalmente, aumento da mortalidade, como resultado desse atraso no diagnóstico e consequentemente no tratamento. E infelizmente esta consequência secundária da pandemia poderá impactar a longo prazo esses pacientes e as futuras estimativas devem ser examinadas com cautela<sup>64</sup>. Com isso, devemos nos preparar para um aumento dos casos graves e aumento da necessidade de tratamentos mais radicais, resultando em uma maior toxicidade e maiores efeitos colaterais, sendo importante que o dentista esteja atento a esse cenário e maneje da melhor forma esses pacientes.

### **3.2 Mucosite Oral**

E ao considerar as complicações agudas da quimioterapia ou da radioterapia é importante destacar a ocorrência da mucosite oral (MO)<sup>1,2</sup> que estará presente praticamente em todos os pacientes submetidos ao tratamento oncológico<sup>3,66</sup>. Clinicamente, a mucosite é caracterizada como uma lesão erosiva ou ulcerativa da mucosa e histologicamente pode apresentar-se como uma redução da espessura do

epitélio (atrofia), ou ainda como áreas de descontinuidade deste tecido<sup>21</sup>. A mucosite pode resultar em dor, sangramento, dificuldade para comer, engolir e falar, necessitando, em casos mais graves, de nutrição enteral ou parenteral e internação do paciente<sup>7</sup>. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), a mucosite é classificada quanto à sua severidade de acordo com os seguintes critérios: presença de eritema, ulceração, dor e capacidade de alimentação. Desta forma, a presença e intensidade destes fatores permite a classificação da mucosite em pontuações/ graus: 0 (mucosa normal), 1 (presença de eritema), 2 (sintomatologia dolorosa), 3 (ulceração, sintomatologia dolorosa e disfagia) e 4 (presença de necrose tecidual e incapacidade de alimentação por via oral)<sup>4</sup>.

A mucosite oral causada pela quimioterapia ocorre dentro de 3 a 5 dias e atinge um pico em 7 a 14 dias após o início da quimioterapia<sup>1,2</sup>, enquanto a mucosite oral induzida por radiação que afeta pacientes com câncer de cabeça e pescoço ocorre entre 2 a 6 semanas após o início do tratamento<sup>1,67</sup>. Entretanto, esta condição não ocorre apenas na mucosa oral, podendo afetar todas as mucosas inclusive acometendo a mucosa gastrointestinal com uma alta frequência e impactando de forma significativa a qualidade de vida e morbidade destes pacientes<sup>3,66</sup>. Além disso, estudos recentes demonstraram que as lesões de mucosite oral são frequentemente colonizadas por bactérias e fungos, especialmente *Porphyromonas sp*, *Staphylococcus sp*, *Candida sp* e *Fusobacterium*<sup>68,69</sup>, existindo uma relação entre a intensidade das lesões de mucosite e um maior risco de infecções secundárias<sup>6,8,10</sup>. E a presença dessas infecções secundárias também é um fator que afeta a severidade das lesões de mucosite oral, bem como a morbidade e a mortalidade dos pacientes<sup>68,69</sup>. Levando em conta todo o comprometimento ocasionado pela mucosite podem ocorrer interrupções e atrasos no tratamento oncológico, afetando além da qualidade de vida a sobrevida desses pacientes<sup>5,6</sup>.

A etiopatogenia da mucosite apresenta complexidades biológicas, relacionadas a eventos de sinalização secundária, como estresse oxidativo, resposta imune inata e citocinas pró-inflamatórias<sup>70</sup>. E a sua etiopatogenia pode ser dividida em 5 fases: a fase de iniciação, caracterizada por danos celulares diretos causados pelos agentes quimioterápicos; a fase de sinalização, durante a qual ocorre a ativação de vias intracelulares, responsáveis por diversos processos, como a via do Fator nuclear Kappa B (NFkB), que é responsável pela transcrição de mais de 200 genes, induzindo dano tecidual em toda a mucosa, não se limitando apenas ao epitélio. Além disso,

ocorre a estimulação da produção de fatores de crescimento e citocinas, como fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interleucina (IL)-1 $\beta$  e IL-6, além da estimulação de fatores relacionados à apoptose; a fase de amplificação, durante a qual essa sinalização é exacerbada, causando a ativação adicional de NF- $\kappa$ B e de outros mediadores pró-inflamatórios<sup>9,71,72</sup>. E o decorrer da cascata inflamatória estimula também a síntese de MMPs, que irão desempenhar uma função importante no dano tecidual local<sup>9,10,71,72</sup>; a fase de ulceração, a partir da qual a lesão pode ser clinicamente detectada e durante a qual pode ocorrer maior colonização por microrganismos, aumentando a inflamação local; e a fase de reparo, que geralmente é espontâneo após o fim do tratamento oncológico<sup>9,71,72</sup>.

O desenvolvimento e a gravidade das lesões de mucosite oral têm sido relacionados ao aumento das metaloproteinases (MMPs)<sup>14-16</sup>, podendo inclusive estar envolvidas em diferentes aspectos do modelo de 5 fases da etiopatogenia da MO, incluindo iniciação, resposta à lesão tecidual, recrutamento de mediadores da MO e fases de cicatrização<sup>16</sup>. E o aumento das MMPs pode resultar no aumento da atividade proteolítica do tecido conjuntivo da lâmina própria e também na desorganização do tecido epitelial, por meio da perda da expressão de moléculas de adesão<sup>15</sup>. No entanto, as MMPs estão relacionadas com diversas funções celulares, como proliferação, migração e sobrevivência celular<sup>17</sup>. Estas enzimas são responsáveis pela degradação e remodelação dos tecidos durante sua formação e manutenção da homeostasia tecidual, assim como durante o processo de reparo<sup>17</sup>. Sua principal função é a degradação de moléculas da matriz extracelular, como o colágeno, estando estas enzimas classificadas de acordo com o substrato a ser degradado (colagenases, gelatinases, elastases)<sup>17</sup>, regulando a síntese e a degradação da matriz extracelular em condições fisiológicas<sup>73</sup>. Porém a superexpressão dessas enzimas proteolíticas tem sido relacionada à etiopatogenia de várias condições inflamatórias orais por desempenhar um importante papel no dano tecidual local<sup>9,10,18,71,72</sup>. Além da degradação do colágeno, as MMPs também participam da cascata inflamatória. A expressão de MMPs é potencializada por citocinas pró-inflamatórias e as próprias MMPs também podem estimular a síntese de citocinas pró-inflamatórias, agindo como um mediador inflamatório, levando a um feedback positivo na resposta inflamatória local<sup>73</sup>.

A família das MMPs é composta por uma grande quantidade de proteínas (MMP-1 a MMP-24) e na cavidade oral as mais frequentemente descritas como

associadas à mucosite são MMP-2, -3 e -9<sup>14-16</sup>. A MMP-2 e a MMP-9 são expressas pelos fibroblastos gengivais, classificadas como gelatinases, e são importantes para o reparo tecidual<sup>74</sup>. Elas possuem um papel importante na degradação do colágeno, acelerando a desorganização tecidual local, além disso, possuem uma função essencial na ativação de mediadores inflamatórios, vias de sinalização e no recrutamento de diferentes células inflamatórias<sup>74-75</sup>. Porém a superexpressão dessas MMPs na cavidade oral, desencadeada por mediadores inflamatórios da MO, pode acelerar a desorganização tecidual, resultando em dano tecidual<sup>74</sup>.

Um mecanismo importante para a regulação da atividade das MMPs é através da ligação a uma família de proteínas homólogas denominadas inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs), apresentando 4 subtipos (TIMP-1 a TIMP-4)<sup>18</sup>. As TIMPs são produzidas pelos mesmos tipos celulares que produzem as MMPs<sup>76</sup> e demonstraram possuir várias funções bioquímicas e fisiológicas/biológicas, incluindo a inibição de MMPs ativas, ativação pró-MMP, promoção de crescimento celular, ligação de matriz, inibição de angiogênese, indução de apoptose<sup>18</sup>, diferenciação e migração celular<sup>77,78</sup>. Além disso, numerosos estudos indicaram que as TIMPs inibem também a invasão celular, tumorigênese e metástase. Sendo essas funções parcialmente atribuídas à inibição das MMPs, mas as TIMPs exibem uma variedade de atividades celulares<sup>18</sup>, porém muitas atividades independem da sua ação inibitória sobre as MMPs<sup>77,78</sup>.

E assim como as MMPs a expressão de TIMPs no tecido também é controlada durante a remodelação tecidual em condições fisiológicas para manter o equilíbrio no metabolismo da matriz extracelular. E a ruptura desse equilíbrio pode resultar em doenças associadas à renovação descontrolada da matriz<sup>18,78</sup>. As TIMPs podem neutralizar a ação das MMPs por as modularem negativamente, resultando no controle da proteólise da matriz extracelular ao inibir a sua degradação<sup>73,76</sup>. A razão MMP/TIMP geralmente determina a extensão da degradação da proteína da matriz extracelular e a remodelação do tecido<sup>73</sup>. Dessa forma, o equilíbrio entre a ativação das MMPs e TIMPs controlam a extensão da remodelação da matriz extracelular e uma interrupção nesse equilíbrio pode resultar em um processo patológico<sup>78,79,80</sup>.

As TIMPs apresentam pouca especificidade para uma determinada MMP, e cada TIMP pode inibir várias MMPs com diferentes eficácias<sup>73,77,78</sup>. E as TIMPs-1 e -2 inibem a atividade de uma ampla gama de MMPs<sup>81</sup>, entretanto a TIMP-1 possui maior afinidade pela MMP-9 e a TIMP-2 pela MMP-2<sup>77,78</sup>. Em 2010, Al-Dasooqi e

colaboradores<sup>14</sup> demonstraram o potencial das MMPs e TIMPs no desenvolvimento da mucosite do trato gastrointestinal. As TIMPs-1 e -2 apresentaram níveis significativamente alterados no jejuno e, além disso, os autores verificaram que alterações na expressão de MMPs e TIMPs estavam correlacionadas com as alterações histopatológicas observadas<sup>14</sup>. No entanto, a compreensão das TIMPs ainda é superficial em muitos aspectos e novas informações são necessárias<sup>18</sup>.

Além disso, o desenvolvimento e a severidade da mucosite oral também está relacionada as citocinas pró-inflamatórias<sup>10,14,75</sup>, resultando em um aumento da sintomatologia dolorosa, por estar relacionado à ativação e amplificação de vias de sinalização da resposta inflamatória e com a síntese e liberação de neurotransmissores, e esse processo é mediado pela presença de maiores concentrações de fatores pró-inflamatórios, como citocinas e espécies reativas de oxigênio<sup>7-11</sup>. O aumento da expressão de citocinas está diretamente relacionado ao curso de desenvolvimento da mucosite<sup>10,11,82</sup>. Esta participação também vem sendo confirmada pela avaliação de terapias alvo, que são capazes de regular a expressão destas citocinas e diminuir a extensão das lesões de mucosite<sup>10,66,83</sup>. Estudos recentes confirmaram os efeitos das citocinas inflamatórias na redução da capacidade proliferativa de células da mucosa oral, bem como um efeito pro-inflamatório, que pode gerar um feedback positivo na reação inflamatória da cavidade oral, atrasando o processo de reparo<sup>12,13</sup>.

O TNF- $\alpha$  é uma citocina pró-inflamatória que regula múltiplos processos biológicos<sup>84</sup>. O TNF- $\alpha$  está envolvido na regulação do equilíbrio entre a síntese e a degradação do colágeno e outras proteínas da matriz extracelular, resultando na manutenção da homeostase tecidual<sup>85</sup>. Em relação ao processo de cicatrização de feridas da mucosa oral, foi sugerido também que o TNF- $\alpha$  está relacionado nas fases iniciais do processo, realizando uma estimulação de curto período na proliferação e migração celular. Entretanto se o estímulo inflamatório for mantido por períodos prolongados, pode ocorrer um prejuízo na cicatrização da ferida<sup>86</sup>. Além disso, o TNF- $\alpha$  é um mediador essencial na patogênese da MO<sup>87</sup>, envolvido com o desenvolvimento e gravidade da MO<sup>7,10,13,72</sup>. Ele foi descrito como um potente regulador de MMPs<sup>10,71,74</sup>, ativando a via NF- $\kappa$ B<sup>10,71</sup>, podendo potencializar a síntese e a atividade local de MMPs e outras enzimas colagenolíticas, acelerando a desorganização da matriz extracelular<sup>75</sup>. Entretanto, o envolvimento completo do TNF- $\alpha$  permanece desconhecido<sup>10,88</sup>.

A IL-6 é uma citocina pro-inflamatória, que assim como o TNF- $\alpha$ , atua como mediador essencial na patogênese da MO<sup>9,10,26,71,74</sup>. Seus níveis aumentam antes mesmo do aparecimento das lesões ulcerativas<sup>9,10,71</sup>. A IL-6 é descrita também como um potente regulador de MMPs, criando um feedback positivo sobre a reação inflamatória local e exacerbando o desequilíbrio da matriz extracelular, causando destruição tecidual na evolução da MO<sup>74</sup> e podendo atrasar o reparo das lesões<sup>26</sup>. Porém, assim como o TNF- $\alpha$ , seu envolvimento completo na patogênese ainda permanece desconhecido<sup>10,88</sup>. Sendo assim, apesar do envolvimento demonstrado das MMPs e das citocinas pró-inflamatórias na etiopatogênese da MO, o seu papel específico permanece não esclarecido e não completamente entendido, faltando ainda dados sobre os mecanismos e fatores de risco envolvidos no estabelecimento da MO<sup>88</sup>.

E todo esse processo para o desenvolvimento de uma ferida desencadeará também outros efeitos citopáticos nas células da mucosa oral, como a diminuição da proliferação e da migração celular, que poderão contribuir com o atraso do reparo tecidual<sup>89</sup>. Dessa forma, o objetivo principal do processo de reparo é a regeneração tecidual para restabelecer o tecido e as células epiteliais possuem um papel fundamental nesse processo<sup>90,91</sup>. Os fibroblastos também participam do reparo através de sua capacidade de proliferação, migração e preenchimento da ferida, além de sintetizar fatores de crescimento e moléculas da matriz extracelular<sup>92</sup>. Para ocorrer o reparo tecidual, após a injúria tecidual, precisa ocorrer as fases de hemostasia, resposta inflamatória, proliferação e migração celular e remodelação tecidual<sup>91,93</sup>. E assim como o processo inflamatório local exacerbado ou prolongado pode atrasar o processo de cicatrização necessitando da modulação da reação inflamatória tecidual para acelerar a cicatrização<sup>86</sup>, alterações na proliferação e na migração celular também podem atrasar o reparo tecidual<sup>93</sup> e terapias que estimulem esse processo podem acelerar a cicatrização tecidual<sup>90</sup>.

Em relação ao manejo da mucosite oral, o seu tratamento ainda é controverso e baseado em terapias paliativas, baseado principalmente na utilização de bochechos com agentes analgésicos, antiinflamatórios, antibióticos e crioterapia<sup>6</sup>. Porém, estes tratamentos, apesar de serem inclusive recomendados pela Associação multinacional de cuidados de suporte em câncer (MASCC), a maioria deles apenas atuam de maneira a reduzir a sintomatologia dolorosa. Além disso, alguns destes medicamentos podem produzir efeitos adversos<sup>6</sup>, e variações intrínsecas dos indivíduos frente aos

diferentes tratamentos podem afetar o resultado clínico. Sendo assim, nenhuma terapia única é suficiente para promover de forma efetiva a MO ou para a resolução total das lesões<sup>21,94,95</sup>. Dessa forma, apesar das tentativas atuais de padronização de diversos protocolos para o manejo da mucosite oral, ainda não há um consenso e novas pesquisas ainda são necessárias<sup>95,96</sup>.

Portanto a identificação de mediadores específicos relacionados à etiopatogenia da MO pode oferecer oportunidades para novas abordagens. E considerando que as MMPs podem ser consideradas potenciais biomarcadores diagnósticos por estarem relacionadas com o desenvolvimento de MO, os tratamentos que modulem estas enzimas e a expressão de citocinas pró-inflamatórias podem ser promissores para o manejo da MO, sendo uma estratégia adequada e eficaz resultando em melhoria das estratégias terapêuticas atuais<sup>97</sup>.

### **3.3 Fotobiomodulação**

A utilização da fotobiomodulação com o laser de baixa intensidade para tratamento da mucosite oral começou na década de 90. Desde então começaram as publicações dos estudos nessa área, buscando a melhor forma de conseguir tanto tratar quanto prevenir a mucosite oral, diminuindo a dor, a intensidade e a duração das lesões<sup>98</sup>.

Em 1992 Ciais et al.<sup>99</sup> realizaram um estudo preliminar retrospectivo não-randomizado sobre o efeito do tratamento com laser vermelho de baixa intensidade de Hélio-Neônio (He-Ne) na mucosite em pacientes com câncer recebendo quimioterapia combinada, incluindo 5-fluorouracil. Os autores destacaram que até aquele momento não existia um antídoto eficaz ou uma profilaxia preventiva para as lesões de mucosite oral e que os pacientes que desenvolviam essa toxicidade oral durante o primeiro curso de tratamento, quase com certeza apresentariam esses efeitos colaterais durante todo o tratamento, a menos que os medicamentos fossem alterados ou tivessem a dosagem reduzida. Os autores observaram a presença de mucosite oral em 43% dos 53 ciclos de quimioterapia na população caso-controle. A terapia com o laser foi realizada de forma curativa e preventiva. A terapia curativa reduziu o tempo de reparo das lesões e a taxa de modificações terapêuticas. E a terapia preventiva reduziu a incidência de complicações orais para 6% durante 101

ciclos de quimioterapia. E todos os pacientes encerraram seu tratamento oncológico conforme programado originalmente<sup>99</sup>.

Em 1995, Barasch et al.<sup>100</sup> utilizaram laser de He-Ne em pacientes que realizaram transplante de medula óssea (TMO), relatando diminuição da severidade da mucosite, porém sem diminuir a sua incidência. Neste estudo foi utilizado o laser com o objetivo de prevenção da mucosite, com comprimento de onda de 632,8 nm, densidade de energia de 1 J/cm<sup>2</sup> e 25 mW de potência. Utilizaram uma amostra com 20 pacientes adultos e em um lado da mucosa aplicaram o laser e no outro lado realizou-se a aplicação de placebo para controle. A aplicação foi iniciada no último dia de condicionamento e mantida por cinco dias consecutivos. Ocorrendo então redução da dor e da severidade na mucosite no lado que recebeu o tratamento<sup>100</sup>.

Cowen et al.<sup>101</sup>, 1997 utilizaram também laser de He-Ne para prevenção da mucosite oral em pacientes de TMO submetidos à quimioterapia, tendo verificado decréscimo na intensidade e na severidade. Os autores realizaram um ensaio clínico randomizado, duplo cego, com comprimento de onda de 632,8 nM, densidade de energia de 1,5 J/cm<sup>2</sup> e 60 mW de potência. Utilizaram uma amostra de 30 pacientes adultos e a aplicação foi realizada do dia menos cinco até o dia menos um do condicionamento. E a mucosite foi avaliada do dia zero até o dia 20 pós transplante. Os autores observaram que ao comparar com o controle, o grupo que recebeu a laserterapia teve um maior número de dias sem mucosite ou com grau I e um menor número de dias com mucosite grau III<sup>101</sup>.

O primeiro estudo que avaliou a eficácia da realização da laserterapia para a prevenção da mucosite oral induzida por radioterapia em pacientes com câncer de cabeça e pescoço foi realizado por Bensadoun et al.<sup>102</sup>, em 1999 e esse estudo demonstrou que o laser pode ser utilizado como prevenção e tratamento da mucosite, retardando o início de aparecimento das lesões, atenuando o pico de severidade e diminuindo sua duração, além de reduzir a dor e melhorar a capacidade de deglutição. Este estudo randomizado foi realizado com 30 pacientes irradiados convencionalmente com dose total de 65 Gy. Foi utilizado laser He-Ne, com comprimento de onda de 632,8 nM, densidade de energia de 2 J/cm<sup>2</sup> e 60 mW de potência, comparado a uma luz placebo, aplicados uma vez ao dia, cinco dias da semana desde o início da radioterapia, durante as sete semanas de tratamento radioterápico, aplicado antes da sessão de radioterapia. Como resultado, os autores observaram a presença de dor severa em 20% dos pacientes que receberam luz

placebo e somente em 2% dos pacientes tratados com laser. Também foi verificado uma redução da média do grau de mucosite nos pacientes submetidos à laserterapia e também da frequência, sendo que apenas 8% dos pacientes tratados que desenvolveram mucosite grau III contra 35% dos pacientes tratados com luz placebo. Sendo assim, foi demonstrado que o laser foi capaz de reduzir a duração e gravidade das lesões de mucosite<sup>102</sup>.

E desde então diversos estudos clínicos foram realizados avaliando o tratamento da mucosite oral com laser de baixa intensidade, usualmente comparado a uma luz placebo<sup>19,94,103-108</sup>. Esses estudos mostraram que o laser aumentou a qualidade de vida<sup>104,106</sup>, que foi bem tolerado, apresentou efeito benéfico e sem efeito adverso<sup>19,104</sup> sendo efetivo e seguro para prevenir ou tratar a MO após quimioterapia<sup>108</sup> e devido ao seu uso fácil proporciona alta aceitação pelo paciente e pelos resultados positivos alcançados, essa terapia se torna viável para a prevenção e tratamento da OM inclusive em pacientes jovens<sup>94</sup>. Além disso, a FBM quando aplicada profilaticamente pode reduzir a incidência e a severidade da MO após quimioterapia<sup>103</sup>, após a radioterapia<sup>107</sup> e de pacientes que receberam transplante medula óssea<sup>105</sup>, além de reduzir a severidade da dor<sup>19,107</sup> e o comprometimento funcional<sup>107</sup>. Ou seja, esses estudos mostraram que o laser pode retardar o aparecimento das lesões, reduzir a dor e a gravidade da mucosite.

Atualmente existem diversas diretrizes baseadas em evidência científica que orientam o manejo da mucosite oral. A principal diretriz que aborda a prevenção e o tratamento da mucosite oral é publicada pelo grupo de Estudo sobre Mucosite da MASCC/ISOO, que é uma parceria da Associação Multinacional de Cuidados de Suporte em Câncer (MASCC) e da Sociedade Internacional de Oncologia Oral (ISOO)<sup>109</sup>. Desde 1998 a MASCC/ISOO criou a Seção de Estudo de Mucosite com o objetivo de reunir diversos especialistas para abordar questões importantes no tratamento e pesquisa da mucosite. E a primeira diretriz de prática clínica baseadas em evidências para mucosite foi publicada em 2004 e os autores encorajaram a realização de pesquisas para assegurar o manejo da mucosite oral<sup>110</sup>. E essa diretriz foi posteriormente atualizada em 2007 e desde então o grupo publica periodicamente atualizações dessas diretrizes<sup>111</sup>.

Em 2008, O Conselho Federal de Odontologia<sup>112</sup> aprovou a Resolução CFO-82, de 25 de setembro de 2008, que reconheceu e regulamentou o uso pelo cirurgião-dentista de práticas integrativas e complementares à saúde bucal, dentre elas a

laserterapia. A habilitação em laserterapia tem como objetivo capacitar os cirurgiões-dentistas de maneira a assegurar a prática profissional da laserterapia de forma ampla e segura, desde que respeitando o limite de atuação do campo profissional do cirurgião-dentista<sup>112</sup>.

Ao longo dos anos, mais pesquisas nessa área foram sendo publicadas. E os estudos foram confirmando que a FBM reduz a incidência, severidade e a duração da MO para pacientes submetidos ao transplante de medula óssea e que acabam recebendo altas doses de quimioterapia e/ou radioterapia<sup>113,114</sup>, assim como para os casos de MO causada pela associação de radioterapia à quimioterapia<sup>115,116</sup>, e por quimioterapia exclusiva também<sup>117</sup> ou com radioterapia exclusiva<sup>102,107</sup>. Além disso, a FBM aumenta a qualidade de vida<sup>115,118</sup> e reduz a dor associada, a disfagia e o uso de analgésicos opióides<sup>116</sup>. Reforçando que a FBM pode ser utilizada tanto como prevenção quanto como tratamento da MO<sup>115,116,118,119</sup>.

Na diretriz de 2013 a MASCC/ISOO recomendou a laserterapia na prevenção da mucosite oral nos pacientes submetidos a transplante de células hematopoiéticas, após tratamento quimioterápico de altas doses, com ou sem radioterapia. Também foi sugerido a realização da laserterapia para os pacientes submetidos à radioterapia para tratamento de tumores em cabeça e pescoço, sem realização de quimioterapia. Sendo ambas recomendações para prevenção e não tratamento da mucosite. E os parâmetros sugeridos foram a utilização do laser de baixa intensidade com comprimento de onda até 650 nm, potência de 0,04 W ou 40 mW e 2 J/cm<sup>2</sup> de densidade de energia<sup>120</sup>.

De 2013 a 2014 foram publicados diversos artigos sobre a mucosite oral e a MASCC/ISOO publicou uma revisão das recomendações em 2014. E até aquele momento, as recomendações indicavam a utilização do laser de He-Ne. E as evidências encontradas reforçaram em manter as recomendações da diretriz anterior para a utilização da laserterapia de baixa intensidade para a prevenção da mucosite oral<sup>109</sup>. Os autores destacaram que embora houvesse diversos estudos demonstrando os benefícios da laserterapia para outras aplicações, elas não foram incluídas na diretriz pois muitos estudos apresentavam qualidade variável e uma ampla variação nos parâmetros do laser usados, o que acabou complicando a avaliação das evidências<sup>109,120</sup>.

Em consonância com os protocolos da MASCC/ISOO, o Ministério da Saúde sob a portaria de nº 516/2015 aprovou as Diretrizes Diagnósticas e Terapêuticas do

Câncer de Cabeça e Pescoço e nela ficou estabelecido o tratamento precoce da mucosite oral com o laser de baixa intensidade, com o objetivo de atenuar os riscos e as lesões<sup>121</sup>.

Em 2015, a Agência Nacional de Saúde<sup>122</sup> (ANS) incluiu a laserterapia na atualização do Rol de Procedimentos e Eventos em Saúde, que constitui a referência básica para cobertura assistencial mínima nos planos privados de assistência à saúde, através da resolução normativa RN n° 387/2015. Ficou estabelecido a cobertura obrigatória de laserterapia de baixa intensidade para prevenção e tratamento de mucosite oral em pacientes com diagnóstico de câncer em região de cabeça e pescoço, com diagnóstico de câncer hematopoiético quando a proposta terapêutica for o transplante de medula óssea e com diagnóstico de câncer hematopoiético<sup>122</sup>. Atualmente foi realizada uma atualização da normativa, através da resolução RN N° 465, de 24 de fevereiro de 2021 e se manteve essa orientação<sup>123</sup>.

Já para o Sistema Único de Saúde (SUS), foi apenas em 2020 que a laserterapia foi incluída como terapia preventiva para tratamento da mucosite oral, através da portaria N° 526, de 24 de junho de 2020. Esta portaria atualizou a Tabela de Procedimentos, Medicamentos, Órteses, Próteses e Materiais Especiais do Sistema Único de Saúde, conhecida como Tabela de Procedimentos do SUS e incluiu, alterou e excluiu alguns procedimentos. E ficou determinado a inclusão da laserterapia para tratamento de lesões da mucosa bucal. E destaca que o tratamento deve ser individual e deve se atentar para as características da lesão<sup>124</sup>.

Porém mesmo com os protocolos estabelecidos, o tratamento deve ser individualizado de acordo com a necessidade de cada paciente e conduta do profissional. Recentemente foi publicada uma nova diretriz da MASCC/ISOO, sendo essa atualização de 2019/2020 um documento de referência na evolução das diretrizes da prática clínica da mucosite<sup>95</sup>. Os autores recomendam a utilização da fotobiomodulação (FBM) intraoral utilizando a laserterapia de baixa intensidade para a prevenção da mucosite oral em pacientes adultos submetidos ao TMO, que irão receber de alta dose de quimioterápicos, com ou sem irradiação, também para os pacientes que irão receber radioterapia para câncer de cabeça e pescoço, com ou sem quimioterapia. E novamente nenhuma diretriz foi possível para o tratamento mucosite oral relacionada exclusivamente à quimioterapia e para pacientes pediátricos, pois os protocolos clínicos foram extremamente variáveis, limitando a integração desses dados. E para todos os protocolos de FBM, foi recomendado que

os parâmetros padronizados fossem seguidos para uma terapia ideal. O comprimento de onda deve ser de 632,8 a 660 nm. A densidade de energia deve variar de 1 a 2 J/cm<sup>2</sup> para TMO, 3 J/cm<sup>2</sup> para radioterapia e de 4,2 a 6,2 J/cm<sup>2</sup> para radioterapia com quimioterapia<sup>95</sup>.

Um dos protocolos terapêuticos que é utilizado recomenda a FBM com laser de baixa potência, utilizando um laser de diodo com comprimento de onda de 660 nm, que fica na faixa de laser vermelho, associado ou não ao comprimento de onda 808 nm, que fica na faixa de laser infravermelho. E as aplicações devem ser iniciadas na primeira sessão de tratamento oncológico e deve terminar quando quaisquer sinais de mucosite oral foram extintos<sup>125</sup>. E o modo de irradiação deve ser pontual a uma distância de 1 cm<sup>2</sup> cada ponto e em contato, perpendicular a mucosa bucal. As irradiações devem ser realizadas intra-oralmente, em toda a mucosa bucal, exceto na localização do tumor, abrangendo a mucosa jugal direita e esquerda, a parte labial superior e inferior, o palato duro e o palato mole, toda a extensão da língua, incluindo o dorso e a borda lateral bilateralmente, o assoalho da boca e a comissura labial bilateralmente<sup>125</sup>. Entretanto Moraes et al.<sup>126</sup> (2009) indicam que nos casos em que as lesões de MO estão extensas e há dificuldade de abertura bucal limitando a aplicação intraoral, pode-se realizar a aplicação extrabucal com laser infravermelho com a dose de 2 J pontual, promovendo conforto e mantendo os benefícios da FBM<sup>126</sup>.

Outro protocolo clínico da MASCC/ISOO que foi atualizado em 2019/2020 foi o manejo da mucosite com agentes naturais e diversos e a revisão sistemática da literatura indica que pesquisas adicionais são necessárias para esclarecer o potencial de outras intervenções<sup>127,128</sup>. E dentro da área de manejo da mucosite, o maior avanço na busca por uma terapia eficaz foi na área da fotobiomodulação<sup>129</sup>. As diretrizes atuais são baseadas em evidências mais fortes, abordam mais configurações clínicas e oferecem mais protocolos de fotobiomodulação<sup>95</sup>. Entretanto apesar das tentativas de padronização dos protocolos, ainda não há um consenso nos parâmetros utilizados nas pesquisas, e seria ideal que houvesse uma padronização dos parâmetros utilizados<sup>96</sup>. E novas pesquisas avaliando todos os parâmetros dos protocolos e a sua calibração, resultará em protocolos mais eficazes<sup>95</sup>.

Apesar das evidências demonstrando que a fotobiomodulação com laser de baixa potência é eficaz contra MO, esse tratamento também apresenta algumas barreiras para a sua aceitação. O custo é uma delas, pois além do custo do procedimento há o custo do equipamento. Além disso, se faz necessário uma

intensidade de trabalho, pois muitos protocolos envolvem o tratamento diário dos pacientes. E para uma melhor efetividade, a laserterapia deve ser aplicada em contato direto o que dificulta o manejo dos casos de mucosite que envolvem a mucosa faríngea, laríngea ou esofágica pela dificuldade de acesso<sup>109</sup>.

Um outro grande obstáculo para a aceitação da técnica é se há ou não potencial para a luz estimular células tumorais residuais que escaparam ao tratamento oncológico, aumentando o risco de recorrências tumorais e desenvolvimento de um segundo tumor primário e desde 2003 foram publicados estudos que avaliaram esse risco<sup>130</sup>. Os estudos de Sonis et al.<sup>131</sup> (2016) e de Zadik et al.<sup>129</sup> (2019) sugerem que a FBM pode ter efeitos carcinogênicos a longo prazo. Entretanto os estudos de acompanhamento a longo prazo em pacientes tratados com FBM para a prevenção de MO de Antunes et al.<sup>27</sup> (2017) e Brandão et al.<sup>132</sup> (2018) não mostraram aumento na recorrência dos tumores, mas destacando que a análise desses dados é desafiadora. Em 2019 foi publicada a primeira revisão sistemática a analisar a segurança do uso da FBM para o gerenciamento de toxicidades relacionadas ao câncer. Um total de 27 artigos atenderam aos critérios de pesquisa e a maioria dos estudos mostrou que nenhum efeito colateral foi observado. Dessa forma, os autores concluíram que o uso de FBM não resulta em problemas de segurança do tumor<sup>130</sup>. Entretanto, devido a essas evidências conflitantes, até os dias atuais é preconizado que não se realize a FBM na área tumoral ou em lesões sem diagnósticos.

Com o avanço da utilização da FBM, também surgiram preocupações sobre o impacto deste procedimento na sobrevivência dos pacientes oncológicos. Em 2017, Antunes et al.<sup>27</sup> realizaram um acompanhamento médio de 41,3 meses para avaliar a sobrevida livre de progressão da doença em 94 pacientes. Os autores concluíram que este foi o primeiro estudo a sugerir que a FBM pode melhorar a sobrevida do câncer de cabeça e pescoço para os pacientes tratados com quimiorradioterapia. Mas novos estudos, com amostra maior, são necessários para confirmar essa descoberta<sup>27</sup>.

E para esta terapia funcionar a nível celular, inicialmente deve ocorrer a absorção da luz em um comprimento de onda específico pelos fotorreceptores da célula, que irá converter a energia luminosa em efeitos bioquímicos como aumento da síntese do ATP, do metabolismo celular e da expressão gênica de proteínas<sup>133</sup>. E essa interação do laser com o tecido irá depender das propriedades da luz, como comprimento de onda, densidade de energia e tempo de ativação da luz e, também irá depender das características do tecido, como a presença e tipo dos cromóforos<sup>134</sup>.

Entretanto, apesar dos efeitos biológicos dessa interação estar diretamente relacionado com os parâmetros, ainda não há uma determinação de qual o parâmetro ideal<sup>135</sup>.

E diversos estudos in vitro e in vivo tem demonstrado que a FBM pode ser utilizada para acelerar o reparo de lesões teciduais de diversas patologias<sup>136-140</sup>. E os efeitos biomoduladores foram demonstrados in vitro em estudos usando diferentes tipos de células, como fibroblastos, queratinócitos, osteoblastos e odontoblastos<sup>136,141</sup>. Nos fibroblastos, a FBM com LBI pode estimular o aumento da síntese de fatores de crescimento<sup>141,142</sup> e do colágeno tipo 1<sup>143,144</sup> e de outras moléculas relacionadas com o reparo<sup>142</sup>. A FBM também pode reduzir a expressão de citocinas inflamatórias<sup>138,142,145</sup>.

Além disso, a LBI pode estimular a migração<sup>136</sup> e a proliferação celular, que são funções extremamente importantes para o reparo tecidual<sup>136,142,144,146-148</sup>. Adicionalmente, alguns estudos vêm demonstrando que em algumas patologias, a FBM com LBI pode atuar na modulação de MMP-2<sup>149-152</sup> e de MMP-9, podendo colaborar com a remodelação tecidual, facilitando o reparo<sup>149-151</sup>.

Estudos prévios in vitro do grupo de pesquisa também vêm demonstrando diversos benefícios da FBM com LBI<sup>13,25,153-169</sup>. Dentre os resultados obtidos, a FBM demonstrou promover um efeito biomodulador benéfico sobre a expressão de citocinas inflamatórias relacionadas à mucosite oral por fibroblastos gengivais humanos<sup>154</sup>, especialmente na redução da expressão de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-8<sup>13,154</sup>. Outro estudo avaliou o efeito da FBM após a exposição dos fibroblastos às citocinas inflamatórias. A FBM estimulou a expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), mesmo após desafio com IL-6 e reduziu a síntese de TNF- $\alpha$  e estimulou os fibroblastos<sup>159</sup>. E outro trabalho verificou que a FBM aumentou a expressão gênica de VEGF nos fibroblastos jovens e idosos tratados com LBI e estimulou a migração celular<sup>155</sup>. E a irradiação com 1,5 e 3 J/cm<sup>2</sup> aumentou a migração de células epiteliais em outro estudo<sup>156</sup>.

Em outros estudos do grupo, a irradiação com LBI aumentou a proliferação celular e a expressão gênica de queratinócitos<sup>157</sup>. Além disso, a irradiação com LBI em fibroblastos, com doses de energia de 0,5 e 3 J/cm<sup>2</sup> resultou em aumento significativo no metabolismo celular e com as doses de energia de 0,5, 1,5, 3, 5 e 7 J/cm<sup>2</sup> promoveram um aumento no número de células, bem como na migração celular, promovendo a bioestimulação de fibroblastos in vitro<sup>153</sup>. Além disso, em outro estudo,

com LBI a 3 J/cm<sup>2</sup> ocorreu um aumento da viabilidade dos fibroblastos gengivais<sup>25</sup> e o estudo de Rech et al.<sup>160</sup> (2021) mostrou que a FBM afeta positivamente a viabilidade celular após 3 irradiações, resultando em 9 J/cm<sup>2</sup> e com intervalo de 24 h<sup>160</sup>. E o trabalho de Pansani et al.<sup>158</sup> (2018) demonstrou que a FBM aumentou a proliferação e a viabilidade dos fibroblastos gengivais e das células epiteliais, expostas ou não a endotoxina com lipopolissacarídeo, de uma maneira dependente do tempo (24, 48, 72 h). E que a FBM provocou biomodulação, podendo diminuir a resposta inflamatória do tecido e acelerar a cicatrização de feridas da mucosa oral<sup>158</sup>.

Entretanto apesar de se observar que esta terapia pode desempenhar resultados satisfatórios, o complexo mecanismo biológico da laserterapia ainda não foi completamente elucidado<sup>161</sup>. Com isso torna-se fundamental a maior compreensão do mecanismo biológico envolvido, pois com essa elucidação poderia ser estabelecido o melhor protocolo terapêutico para esta patologia.

### 3.4 Bioflavonóides

O tratamento e a prevenção da mucosite oral utilizando agentes naturais tem sido cada vez mais investigado por apresentarem um mecanismo de ação que pode reduzir o estresse oxidativo, a inflamação e infecções<sup>162</sup>. Alguns produtos naturais podem promover efeitos significativos, como menor incidência e gravidade das lesões, bem como redução da sintomatologia para os pacientes em tratamento radio/quimioterápico<sup>28</sup>.

E esses agentes naturais podem ser originários de extratos brutos, frações enriquecidas com componentes bioativos ou de compostos puros que derivam de ervas<sup>163</sup>. E os seguintes produtos naturais são os mais descritos como possíveis auxiliares nos tratamentos da MO: mel e derivados, camomila, própolis, aloe vera, extrato de folha de oliveira, *glycyrrhiza glabra*, *achillea millefolium*, *glicerina payayor*, extratos de raiz indigowood, extrato de *zataria multiflora*, cravo da Índia, melão de amoreira, extrato aquoso de glycyrrhiza, cúrcuma, pólen de tamareira e quercetina. Sendo o mais utilizado o mel, seguido de camomila e depois a própolis<sup>164</sup>.

Uma revisão sistemática da literatura foi realizada pelo grupo de estudos de mucosite da MASCC/ISOO e foi realizado uma atualização dos protocolos clínicos referentes ao uso de agentes naturais e diversos para a prevenção e/ou tratamento da mucosite oral, e foi abordado o uso de vitaminas, minerais e nutrientes

suplementos, mel, compostos de ervas, estimulante salivar, probióticos e agentes diversos<sup>127,128</sup>. Essa atualização da diretriz MASCC/ISOO sugeriu a aplicação de mel, combinado topicamente e sistemicamente, para a prevenção de MO em pacientes com câncer de cabeça e pescoço, tratados com radioterapia exclusiva ou associada a quimioterapia<sup>127,128</sup>. Os autores encontraram numerosos produtos naturais e fitoterápicos que estão sendo estudados para o manejo da MO, entretanto eles destacam que ainda é necessário a realização de pesquisas adicionais para esclarecer o seu potencial e com isso nova atualização no futuro do protocolo utilizado atualmente<sup>127,128</sup>.

E novas propostas terapêuticas naturais estão sendo avaliadas para serem incluídas no manejo da MO, incluindo a utilização de polifenóis<sup>29</sup>. Os Polifenóis são abundantes micronutrientes em nossa dieta e compreendem uma variedade de compostos bioativos presentes em vegetais, frutas, grãos e outros alimentos<sup>30,165</sup>. São divididos em diferuloilmetano, ácidos fenólicos (ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinâmicos), estilbenos, flavonóides (flavanois, flavonas, flavonois, flavanonas, isoflavonas e antocianidinas) e taninos (hidrolisáveis e condensados, as protoantocianidinas)<sup>31</sup>. Entre os efeitos terapêuticos benéficos já demonstrados dos polifenóis, de modo geral, estão a sua ação antioxidante<sup>30,31</sup> e seu papel modulador na sinalização celular<sup>31</sup>.

As proantocianidinas (PA) são os principais polifenóis nas uvas, localizadas principalmente em peles e sementes<sup>30</sup>. Olaku et al.<sup>29</sup> (2015) realizaram uma revisão de literatura e verificaram que a aplicação da PA isolada da semente de uva forneceu resultados positivos em estudos pré-clínicos, sobre lesões de mucosite rádio e quimioinduzidas. E que a melhora dos efeitos citotóxicos induzidos pelo tratamento oncológico pode ter sido mediada pela ação antioxidante da PA. Porém, segundo os próprios autores, estudos controlados são necessários para determinar o real efeito e aplicabilidade desta proposta terapêutica<sup>29</sup>.

Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que estes compostos de PA apresentam atividade antioxidante, anti-inflamatória como importante inibidor de metaloproteinasas e antibacteriana, além de atividade anti-apoptótica, resultando em maior sobrevivência celular<sup>165-167</sup>. Recentemente, um estudo demonstrou que a aplicação dos compostos de PA sobre os fibroblastos gengivais resultou em redução da expressão e síntese de MMPs e que é capaz de modular a resposta oxidativa e inflamatória<sup>168</sup>.

Além disso, a PA também apresenta um efeito bactericida<sup>169,170</sup> atuando sinergisticamente com a redução da resposta inflamatória e modulação da atividade colagenolítica e também poderia acelerar o reparo da mucosite, cujo desenvolvimento e progressão está frequentemente associado às infecções secundárias, bacterianas e fúngicas<sup>68</sup>.

Outro composto natural que está sendo investigado é a naringenina (NA). A NA é um polifenól da classe dos flavonoides, subclasse flavanona. As flavanonas são encontradas na alimentação humana em tomates e certas plantas aromáticas como a hortelã, mas estão presentes em altas concentrações apenas em frutas cítricas, sendo a hesperetina em laranjas, o eriodictiol em limões e a naringenina está mais presente nas uvas<sup>32</sup>. As flavanonas apresentam os mesmos efeitos benéficos à saúde dos polifenóis, tais como a ação antioxidante<sup>33,34</sup> e efeito neuroprotetor por atravessar a barreira hematoencefálica e reduzir o estresse oxidativo e a inflamação através da inibição da ativação do fator nuclear NFkB<sup>171</sup>.

E devido a suas diversas propriedades biológicas, a NA tem sido investigada como um possível tratamento para o novo coronavírus<sup>172</sup>. A atual pandemia do coronavírus é um dos maiores desafios da medicina e da saúde pública e o gerenciamento desses pacientes é sobrecarregado pela falta de medicamentos que dificultam a replicação do SARS-CoV-2 sem efeitos colaterais, principalmente nos estágios iniciais da infecção<sup>173</sup>. Tutunchi et al.<sup>172</sup> (2020) realizaram uma revisão de literatura para avaliar os efeitos promissores e os possíveis mecanismos de ação da NA contra o novo coronavírus. Os autores sugeriram que a NA pode exercer efeitos terapêuticos nesta patologia através da inibição da principal protease envolvida e da redução da atividade dos receptores da enzima conversora de angiotensina, além de possuir ação anti-inflamatória e antiviral<sup>172</sup>.

Adicionalmente, a NA pode atuar por outras vias contra o novo coronavírus. Em estudos anteriores<sup>174-176</sup> foi demonstrado que durante o processo de infecção, a replicação do SARS-CoV-2 ocorre em compartimentos celulares específicos envolvidos por membranas, ocultos da imunidade inata, e que eventos de fusão de membrana são de importância central para a replicação do vírus. E que o tráfico de vírions para os compartimentos lisossômicos e o processamento da proteína S por proteases lisossômicas são necessários para que ocorra a entrada produtiva. Sendo assim, ao inibir os canais de dois poros endolisossomais, que são criticamente importantes para

a entrada de SARS-CoV-2 nas células, pode ocorrer o bloqueio da via intracelular do vírus, limitando a replicação viral<sup>173</sup>.

Clementi et al.<sup>173</sup> (2021) demonstraram que a atividade dos canais de dois poros endolisossomais pode ser inibida pela NA, promovendo uma ação antiviral para o coronavírus. Além disso, por possuir atividade anti-inflamatória, a NA pode aumentar sinergicamente seu efeito antiviral in vivo, pois além de combater a infecção viral ela poderia controlar a liberação de citocinas que é tão presente na tempestade de citocinas ocasionada pelo novo coronavírus. Os autores sugerem que a NA pode estar envolvida em uma nova estratégia farmacológica anti-CoV, altamente promissora para profilaxia e como terapia eficiente e segura<sup>173</sup>. Apesar dos estudos demonstrando que a NA pode ser uma estratégia de tratamento promissora contra o coronavírus, no entanto, os efeitos benéficos da NA ainda precisam ser confirmados em ensaios clínicos<sup>172</sup>. Contudo, esses estudos recentes estão reforçando o potencial de utilização da NA como tratamento em diversas patologias.

E além de seu poder antiviral, a NA apresenta atividade anti-inflamatória em diversas patologias<sup>38,177,178</sup>. Essa ação pode ocorrer pela capacidade da NA de suprimir a produção de citocinas inflamatórias através de mecanismos transcricionais e pós-transcricionais (regulando a função dos lisossomos), resultando na inibição da secreção de TNF- $\alpha$  e IL-6 por macrófagos e células T<sup>177,178</sup>. Sendo assim, estudos demonstraram que a naringenina apresenta efeitos protetores sobre a saúde como antioxidante<sup>33,34</sup>, anti-hiperglicêmico<sup>35</sup>, anticarcinogênico<sup>36</sup> e antidepressivo<sup>37</sup>.

A NA também demonstrou ser efetiva na regulação da atividade de MMPs<sup>39,40</sup>. E esse mecanismo de atuação foi observado em diversas patologias. No estudo de Kapoor et al.<sup>179</sup> (2019) a NA inibiu a invasão de células endometriais, reduzindo a expressão de MMP-2 e MMP-9 em cultura primária in vitro<sup>179</sup>. Singh et al.<sup>180</sup> (2020) avaliaram o impacto do tratamento com NA na neuropática diabética em ratos, considerando os mediadores envolvidos na etiopatogênese desta condição. E observaram que a NA foi capaz de modular a MMP-9<sup>180</sup>. Chen et al.<sup>181</sup> (2019) avaliaram se a NA pode atuar na inibição da migração do glioblastoma para bexiga e pulmão via modulação das atividades de MMP-2 e/ou MMP-9. E eles verificaram que a MMP-2 e a MMP-9 foram reguladas negativamente após o tratamento<sup>181</sup>. E outros estudos verificaram que a NA pode reduzir a expressão de MMP-2<sup>182-184</sup> e MMP-9<sup>183,184</sup>. Porém no estudo de Hernández-Aquino et al.<sup>185</sup> (2017), a administração de NA foi associada com atividade normal de MMP-2 e MMP-9 e foi sugerido que os

efeitos anti-inflamatórios, antinecróticos e antifibróticos da NA estão relacionados com a sua capacidade de prevenir a ativação do NF- $\kappa$ B<sup>185</sup>. Todavia, mais estudos são necessários para avaliar esta nova terapêutica e seu mecanismo de ação nas MMPs.

E embora atualmente haja vários trabalhos relatando diversos efeitos da NA em diversas patologias, a maioria desses estudos são *in vitro*. A NA já foi aprovada para ser utilizada nos ensaios clínicos como um novo medicamento de primeira classe inclusive pela China Food and Drug Administration, devido à sua eficácia e baixa toxicidade. E a NA se demonstrou uma candidata promissora para as aplicações clínicas<sup>186</sup>. E já foi relatado que em humanos saudáveis, a ingestão de doses de 150 a 900 mg de NA é segura em adultos saudáveis, e as concentrações séricas são proporcionais à dose administrada, sem toxicidade relevante e com efeito fisiológico<sup>187</sup>.

Salehi et al.<sup>188</sup> (2019) realizaram uma revisão de literatura sobre o potencial terapêutico da NA em ensaios clínicos. Os autores destacaram que ainda existem poucos estudos sobre o uso da NA como molécula terapêutica. Além disso, foi destacado que os poucos dados existentes devem ser urgentemente expandidos para melhor compreender o mecanismo de ação da NA em situações patológicas ou fisiológicas. E que o número escasso de estudos clínicos realizado até o momento compromete a sua exploração comercial<sup>188</sup>.

Entretanto, esses compostos podem apresentar diferentes formulações, dependendo da fonte, condição de cultivo, clima e forma de extração<sup>41</sup> e essas variações em sua composição podem dificultar a sua aplicação terapêutica. Desta forma, a seleção de um derivado bioativo sintético presente neste composto natural pode oferecer resultados mais representativos<sup>42</sup>.

Assim, dada a importância da rápida resolução das lesões de mucosite para a qualidade de vida dos pacientes oncológicos ou ainda da inibição destes eventos, a avaliação de novas estratégias terapêuticas, utilizando substâncias sintéticas derivadas de compostos naturais poderá resultar em novas estratégias terapêuticas, sem prejuízo para o tratamento oncológico e afetando positivamente a qualidade de vida dos pacientes. Desta forma, a aplicação destes compostos sobre lesões de mucosite oral poderia reduzir a resposta inflamatória local, que poderia também resultar em diminuição da sintomatologia dolorosa, bem como a síntese e atividade de metaloproteinases, reduzindo a degradação tecidual e acelerando o processo de reparo.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

As etapas para a execução desta pesquisa estão descritas a seguir:

### 4.1 Isolamento e Cultura de Fibroblastos Gengivais

Cultura primária de fibroblastos gengivais humanos (HGF) foi obtida de uma amostra de tecido gengival de uma doadora voluntária saudável, de 24 anos de idade, do gênero feminino, que não era fumante, ausente de doença periodontal e de doenças sistêmicas e tampouco usuária de medicamentos que poderiam interferir nos resultados da pesquisa, como anti-convulsivantes e anti-hipertensivos. Estas informações foram obtidas através de cuidadosa anamnese e avaliação clínica.

A coleta do tecido foi realizada durante procedimento de extração de terceiros molares inclusos<sup>159</sup>, a partir da aprovação do protocolo de pesquisa pelo Comitê de Ética em Pesquisas em Humanos (CEP) da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP (CAAE: 74823317.0.0000.5416; ANEXO A) e com prévio consentimento da paciente, por meio da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

O fragmento gengival removido foi colocado em tubo Falcon de 15 mL (TPP - Techno Plastic Products, Trasadingen, Suíça), previamente identificado, contendo meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium; Gibco, Carlsbad, CA, EUA) sem soro fetal bovino (SFB), contendo solução antibiótica/antimicótica (10.000 unidades/mL de penicillina, 10.000 µg/mL de estreptomicina, e 25 µg/mL de Fungizone® - Gibco) e foi manipulado em ambiente estéril, dentro de uma capela de fluxo laminar vertical<sup>189</sup>.

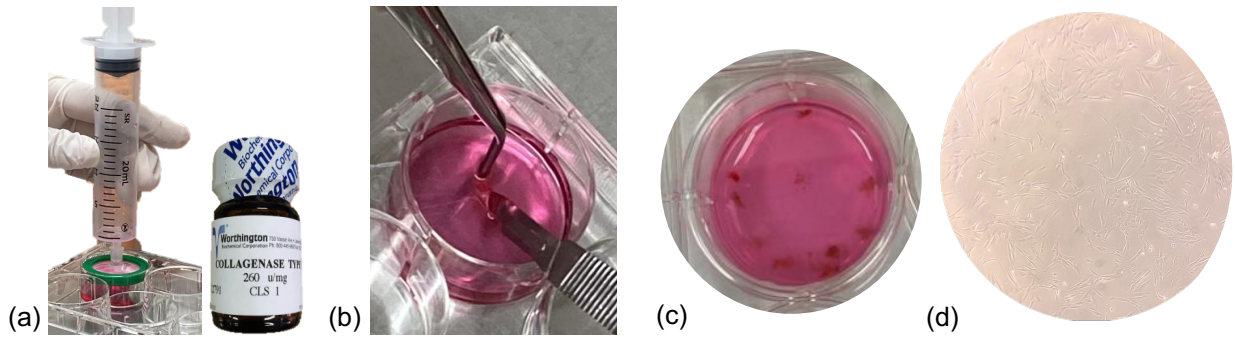
O tecido foi fragmentado com uma lâmina de bisturi esterilizada e os fragmentos foram colocados em uma placa de cultura de 6 compartimentos (TPP) com DMEM e as células foram isoladas por digestão enzimática (Figura 1). Para o isolamento dos HGF foi utilizada colagenase tipo I (Worthington Biochemical Corp, Lakewood, NJ, EUA) após filtragem, na concentração de 3 mg/mL em 3 mL de DMEM sem SFB, por 24 horas em incubadora a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub> (Isotemp Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, EUA)<sup>13,154</sup>.

Após este período, os fragmentos de tecido e células isoladas foram transferidos para um tubo falcon de 15 mL (TPP), centrifugados por 2 minutos (4.000 rpm,

Centrífuga Baby Fanem – Guarulhos, SP, Brasil) e o pellet celular formado foi resuspendido em DMEM (1 mL) contendo 10% de SFB e transferido para um frasco de cultura celular de 75 cm<sup>2</sup> (TPP).

As culturas foram mantidas em incubadora até que as células atingissem confluência de 80%, com trocas de meio a cada 3 dias e o crescimento celular avaliado a cada 24 h. Após confluência, as células foram subcultivadas utilizando Tripsina 0,25% (Gibco) e foram utilizadas células entre as passagens #3 e #7.

**Figura 1** - Imagens representativas de parte da obtenção da cultura primária de HGF



Realização da filtragem da enzima colagenase tipo I para a execução do isolamento por digestão enzimática (Figura 1a). O tecido gengival removido foi fragmentado com uma lâmina de bisturi esterilizada (Figura 1b) e os fragmentos foram colocados em uma placa de cultura com DMEM (Figura 1c). HGF aderidos ao frasco de cultura após o período de incubação (microscópio de luz invertido – 10X) (Figura 1d).

Fonte: Arquivo pessoal.

## 4.2 Estudo 1

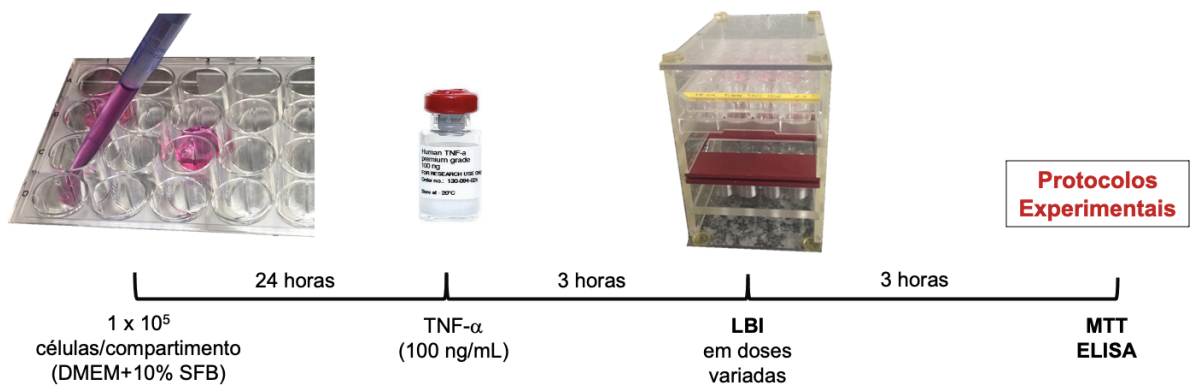
Foi realizado um estudo preliminar para selecionar os parâmetros da FBM a serem aplicados sobre as células capazes de modular a resposta dos fibroblastos quanto à síntese da MMP-2 e a viabilidade celular.

### 4.2.1 Delineamento experimental

As células foram cultivadas em placas de 24 compartimentos (TPP), na densidade de 10<sup>5</sup> células por compartimento, em meio de cultura DMEM, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) por 24 horas.

O fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) foi utilizado como controle positivo para indução da síntese de MMPs por HGF. Após 3 h da aplicação de solução de TNF- $\alpha$  (100 ng/mL) foi realizada a FBM. E após 3 h da aplicação da LBI o extrato foi coletado para análise da síntese de MMP-2 (Figura 2). Os períodos selecionados para a exposição e coleta dos resultados foram selecionados a partir de estudo prévio<sup>159</sup>.

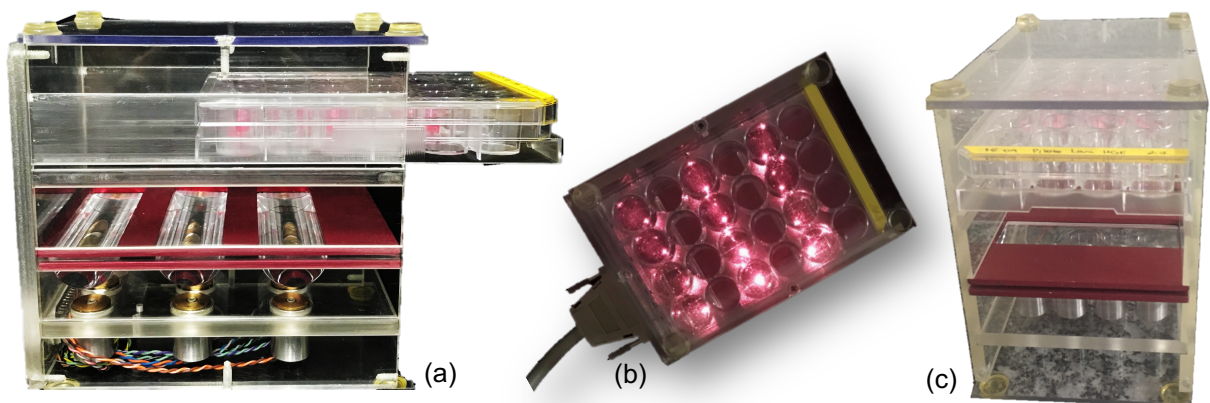
**Figura 2** - Esquema representativo do delineamento experimental do estudo 1



Fonte: Elaboração própria.

A FBM com LBI foi realizada utilizando o dispositivo LaserTABLE (Figura 3).

**Figura 3** - Dispositivo LaserTABLE em vista lateral (a), superior (b) e frontal (c)



Fonte: Arquivo pessoal.

Essa ferramenta foi desenvolvida pelo Grupo de Óptica do Centro de Pesquisa em Óptica e Fotônica, do Instituto de Física de São Carlos, da Universidade de São Paulo, sob orientação do Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato para padronização dos parâmetros de irradiação com LBI em estudos *in vitro*<sup>190</sup>.

São utilizados 12 lasers de diodo do tipo InGaAsP (arseneto de índio gálio e fosfato) no comprimento de onda infravermelho de 780 nm, posicionados na LASERTable de maneira a irradiar homogeneamente e de maneira individual, um total de 12 dos 24 compartimentos da placa de cultura celular (TPP). Esta disposição dos diodos evita a sobreposição da irradiação para outros compartimentos<sup>190</sup>.

Cada irradiação foi feita a uma distância padronizada das células em cultura (2,5 cm), sendo que lentes específicas direcionaram o feixe de luz de tal maneira a irradiar toda base de cada compartimento onde as células foram cultivadas. Assim, a área irradiada corresponde à área de cada compartimento da placa de 24 compartimentos (2,0 cm<sup>2</sup>), o que permite reduzir o tempo gasto para irradiar as células por irradiar todo o poço da placa simultaneamente, além da garantia de padronização dos resultados<sup>190</sup>.

Os parâmetros utilizados foram 780 nm, 0,025 W, variando o tempo para se obter densidades de energia diferentes (40 s para 0,5 J/cm<sup>2</sup>; 160 s para 2 J/cm<sup>2</sup>; 320 s para 4 J/cm<sup>2</sup>) de acordo com a tabela 1.

**Tabela 1** - Parâmetros da FBM estabelecidos para o estudo 1

Potência (W)	Comprimento de onda (nm)	Densidade de Energia (DE) (J/cm <sup>2</sup> )	Distância (cm)	Área de Irradiação (cm <sup>2</sup> )	Tempo de acordo com DE (s)
0,025	780	-	2,5	2,0	-
0,025	780	0,5 J/cm <sup>2</sup>	2,5	2,0	40 s
0,025	780	2 J/cm <sup>2</sup>	2,5	2,0	160 s
0,025	780	4 J/cm <sup>2</sup>	2,5	2,0	320 s

Fonte: Elaboração própria.

As terapias propostas foram executadas de acordo com os grupos experimentais (N=6 em duplicata) demonstrados na Tabela 2.

**Tabela 2** - Definição dos grupos experimentais do estudo 1

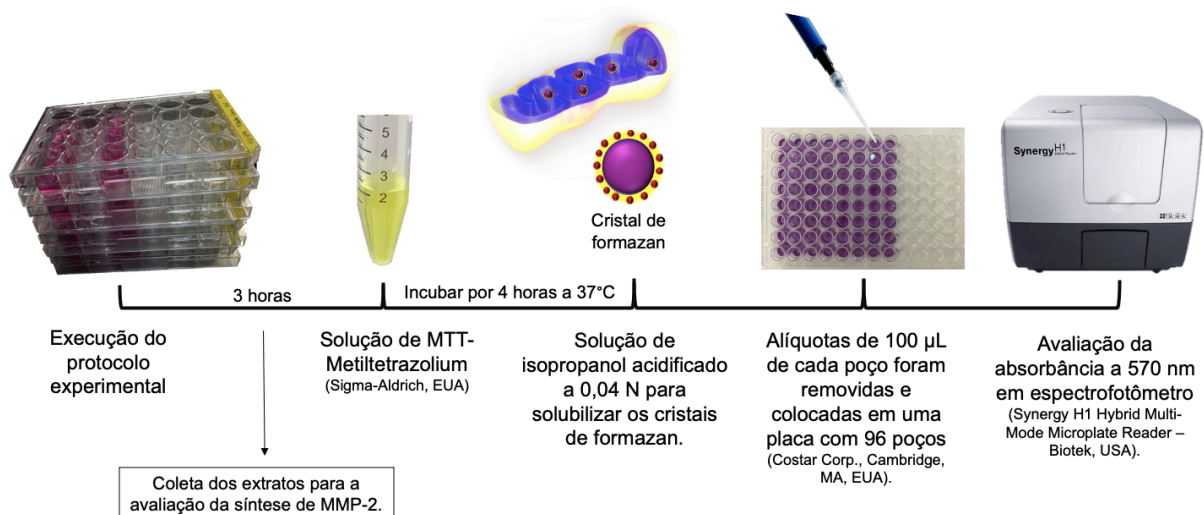
Grupos	TNF	LBI
Controle negativo	-	-
Controle positivo	+	-
FBM 0,5 J/cm <sup>2</sup>	-	+
FBM 0,5 J/cm <sup>2</sup> + TNF	+	+
FBM 2 J/cm <sup>2</sup>	-	+
FBM 2 J/cm <sup>2</sup> + TNF	+	+
FBM 4 J/cm <sup>2</sup>	-	+
FBM 4 J/cm <sup>2</sup> + TNF	+	+

Fonte: Elaboração própria.

#### 4.2.2 Avaliação da viabilidade celular (MTT)

A análise da viabilidade celular foi realizada por meio do ensaio colorimétrico de metiltetrazolium (MTT) (Figura 4)<sup>153,191</sup>. Este método determina a atividade respiratória das células em cultura por meio da clivagem do sal de MTT (3-(4,5-dimetiltriazol-2yl)-2,5 difenil brometo de tetrazolina – Sigma-Aldrich), pela enzima desidrogenase succínica. Esta clivagem, por sua vez, dá origem ao cristal de formazan. A quantidade de cristais de formazan determina a atividade respiratória das células, a qual corresponde à taxa de viabilidade celular.

**Figura 4** - Esquema representativo da análise da viabilidade celular realizada por meio do ensaio de MTT



Fonte: Elaboração própria.

Após 3 h da irradiação com o laser, o extrato foi separado e congelado para a realização do ELISA. E sobre os poços foi aplicada 500 µL de solução de MTT-

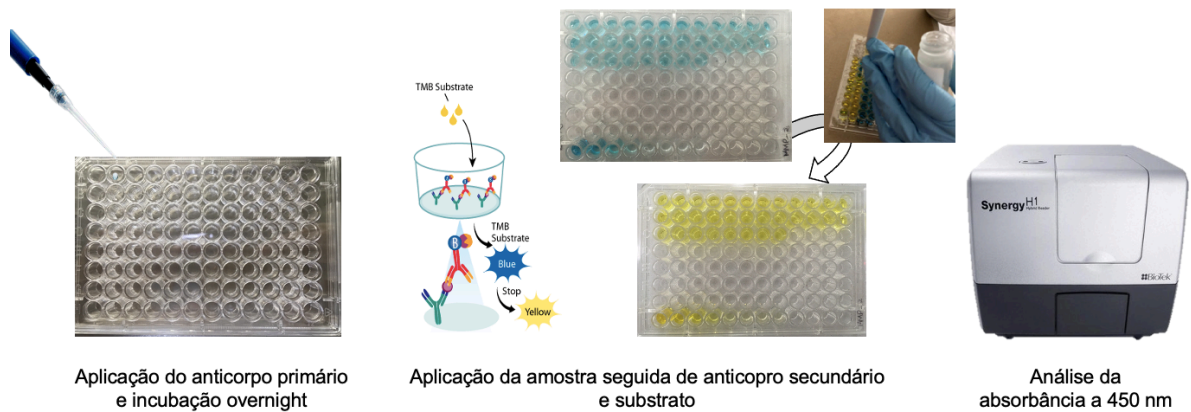
Metiltetrazolium (Sigma-Aldrich, EUA). As células imersas nesta solução foram incubadas por 4 horas a 37 °C. Durante esse período observou-se a formação dos cristais de formazan. Em seguida, o meio com a solução de MTT foi aspirado, e cada compartimento recebeu 500 µL de solução de isopropanol acidificado a 0,04 N para solubilizar os cristais formados, gerando uma solução homogênea. Em seguida alíquotas de 100 µL de cada compartimento foram removidas e colocadas em uma placa de 96 poços (Costar Corp., Cambridge, MA, EUA). A viabilidade celular foi determinada por meio da avaliação da absorbância a 570 nm em espectrofotômetro (Synergy H1 Hybrid Multi-Mode Microplate Reader – Biotek, EUA). E os valores foram expressos em porcentagem, considerando o grupo controle como 100%.

#### **4.2.3 Avaliação da síntese de MMP-2**

A avaliação da síntese de MMP-2 foi realizada por meio do imunoenensaio ELISA (Enzyme linked Immunosorbent Assay), baseado em reação antígeno-anticorpo, a qual foi realizada seguindo as recomendações do fabricante (R&D Systems, EUA, Minneapolis MN, EUA). Após 3 h da aplicação da LBI o extrato foi coletado para análise da síntese de MMP-2.

Em uma placa de 96 poços (Costar Corp., Cambridge, MA, EUA) foi realizada a incubação do anticorpo primário por 8 horas e em temperatura ambiente. Decorrido este período, a placa foi submetida a lavagens, bloqueio com Albumina de soro bovino (BSA), seguido de incubação por 1 hora, adição das amostras e incubação por 2 horas. Após este período, foi adicionado o anticorpo secundário, que tem por objetivo identificar a ligação da proteína alvo com o anticorpo primário específico para a proteína alvo. Em seguida, a reação foi detectada por meio de solução de estreptavidina/peroxidase e a expressão proteica foi determinada pela análise da absorbância das amostras a 450 nm, em espectrofotômetro (Synergy H1, Biotek) (Figura 5). A concentração de MMP-2 foi calculada através de uma curva padrão, contendo concentrações pré-determinadas da mesma.

**Figura 5** - Esquema representativo do imunoensaio ELISA



Fonte: Elaboração própria.

### 4.3 Estudo 2

Um segundo estudo foi realizado para avaliar o potencial sinérgico da FBM com LBI e da NA na modulação da síntese de mediadores inflamatórios por HGF, bem como sobre funções celulares relacionadas ao processo de reparo tecidual.

#### 4.3.1 Delineamento experimental

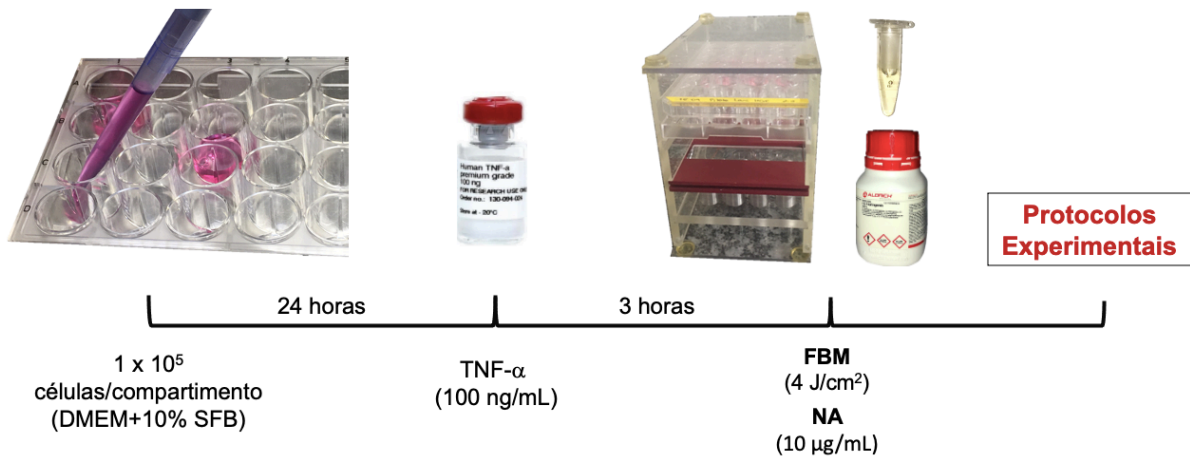
As células foram cultivadas em placas de 24 compartimentos (TPP), na densidade de  $10^5$  células por compartimento, em meio de cultura DMEM, suplementado com 10% de SFB por 24 horas.

Em seguida, foram expostas ao  $TNF-\alpha$  (100 ng/mL), controle positivo para produção de MMPs e IL-6, por 3 h, seguido da aplicação da FBM com LBI e/ou aplicação da NA, na concentração de 10  $\mu$ g/mL (Figura 6).

Essa concentração de NA foi selecionada a partir de dados preliminares do grupo, que resultaram em citocompatibilidade e regulação da síntese de IL-6 e MMPs por HGF<sup>159</sup>, sendo que a NA utilizada foi sintética (95% naringenina, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA, lote #BCBR3619). Por não ser facilmente dissolvida em meio de cultura, a NA foi inicialmente dissolvida em dimetilsulfóxido – DMSO (Sigma-Aldrich, lote #SHBB3758V). A partir da solução estoque de NA a 5% (massa/volume) ou 50.000  $\mu$ g/mL foi realizada uma diluição utilizando meio de cultura DMEM sem SFB para chegar na concentração de 0,001% (massa/volume) ou 10  $\mu$ g/mL.

A aplicação da NA foi realizada antes da fotobiomodulação e a NA permaneceu em contato com as células até a realização dos testes. Após a realização destes tratamentos, foram executados os protocolos experimentais.

**Figura 6** - Esquema representativo do delineamento experimental do estudo 2



Fonte: Elaboração própria.

A FBM com LBI foi realizada utilizando o dispositivo LaserTABLE (Figura 3). Os parâmetros utilizados foram 780 nm, 25 mW, e a densidade de energia utilizada foi 4 J/cm<sup>2</sup> e 320 s, que foi definido no estudo 1.

As terapias propostas foram executadas de acordo com os grupos experimentais (N=6, em duplicata) demonstrados na Tabela 3.

**Tabela 3** - Definição dos grupos experimentais do estudo 2

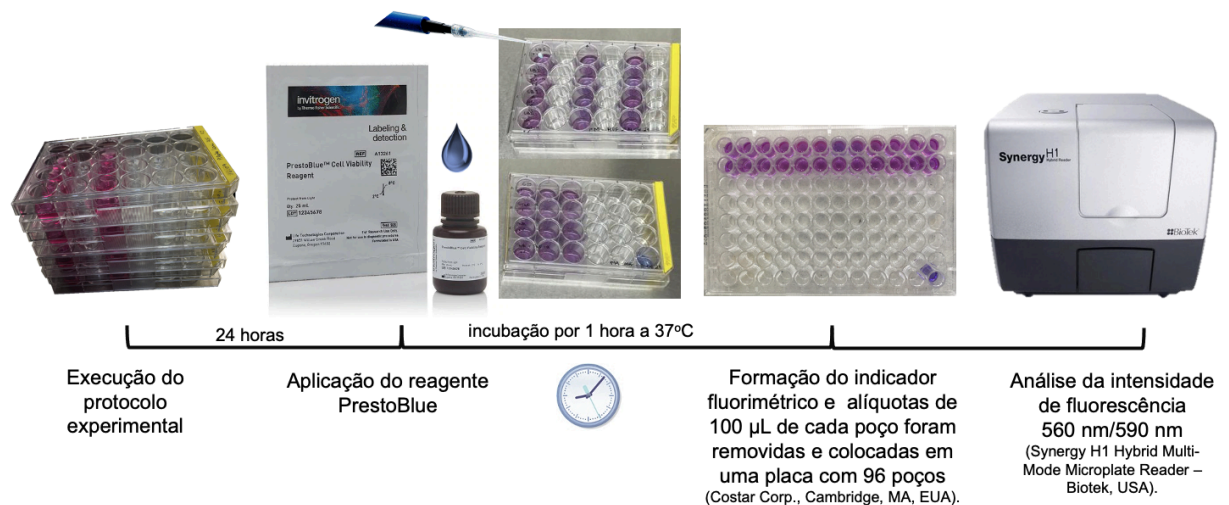
Grupos	TNF	FBM	NA
Controle negativo	-	-	-
Controle positivo	+	-	-
FBM	-	+	-
FBM/TNF	+	+	-
NA	-	-	+
NA/TNF	+	-	+
FBM/NA	-	+	+
FBM/NA/TNF	+	+	+

Fonte: Elaboração própria.

### 4.3.2 Avaliação da proliferação celular

Após 24 horas dos diferentes tratamentos, uma solução de 10% de PrestoBlue (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) em DMEM livre de SFB foi adicionada sobre as células seguido de incubação por 1 h 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após a formação do indicador fluorimétrico, alíquotas de 100 µL de cada poço foram removidas e colocadas em uma placa com 96 poços (TPP). Foi realizada a determinação da intensidade de fluorescência da solução, por meio de fluorímetro (Synergy H1 Hybrid Multi-mode Microplate Reader, Biotek, EUA), nos comprimentos de onda de 560/590 nm (Figura 7). E os valores foram expressos em porcentagem, considerando o grupo controle como 100%.

**Figura 7** - Esquema representativo da análise da proliferação celular realizada por meio do ensaio de PrestoBlue



Fonte: Elaboração própria.

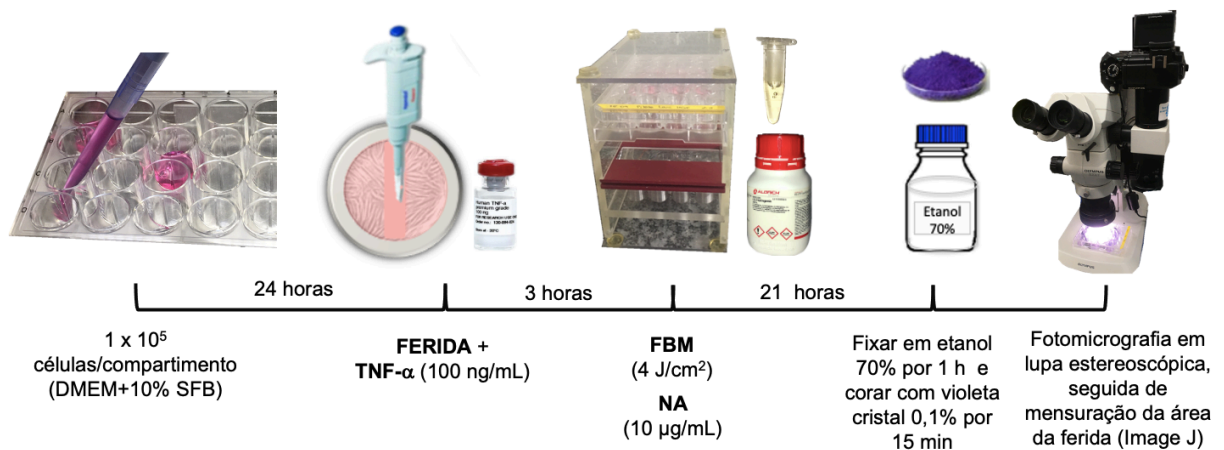
E o ensaio de PrestoBlue avalia a proliferação celular por meio da conversão do reagente resazurina em resorufina, que resulta em uma mudança de cor pronunciada, diretamente proporcional ao metabolismo mitocondrial.

### 4.3.3 Avaliação da migração celular

A migração celular foi determinada por meio do ensaio de cicatrização in vitro, que consiste na avaliação do repovoamento de uma ferida criada sobre as células cultivadas.

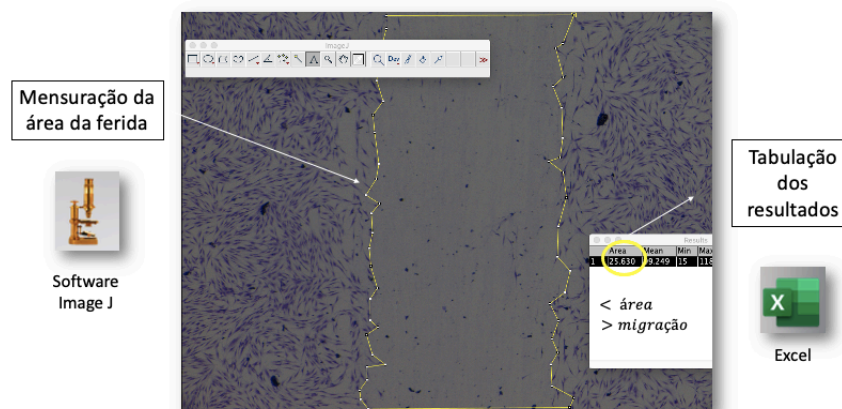
Após o cultivo celular, foi confeccionada uma “ferida” na área central do compartimento, utilizando uma ponteira de 5 mL. Em seguida, foram aplicados os tratamentos propostos para cada grupo experimental. Para avaliação da migração, após 21 h, as amostras foram fixadas em etanol 70% por 1 hora e coradas com violeta cristal, 0,1% por 15 min. Foram realizadas fotomicrografias em lupa estereoscópica (50x) (Olympus BX51, Miami, FL, EUA) equipada com câmera (Olympus C5060, Miami, FL, EUA) (Figura 8), seguidas de mensuração dessas imagens (Figura 9) através do Software Image J (Wayne Rasband, National Institute of Mental Health, NIH, Bethesda, MD, EUA) e tabulação dos resultados. A migração foi determinada por meio da análise da área da ferida, que foi menor para aqueles grupos que apresentaram maior migração central, em comparação com o grupo controle negativo.

**Figura 8** - Esquema representativo da análise da migração celular realizada por meio do ensaio de cicatrização in vitro



Fonte: Elaboração própria.

**Figura 9** - Mensuração da área da ferida



Fonte: Elaboração própria.

#### 4.3.4 Avaliação da síntese de MMP-2, IL-6 e TIMP-1

A avaliação da síntese de MMP-2, IL-6 e TIMP-1 foi realizada por meio de imunoenensaio ELISA (Enzyme linked Immunosorbent Assay), baseado em reação antígeno-anticorpo, seguindo as recomendações do fabricante (R&D Systems, EUA, Minneapolis MN, EUA) (Figura 5).

Após os diferentes tratamentos, a síntese de MMP-2 e IL-6 foi avaliada respectivamente após 6, 12 horas da exposição ao TNF- $\alpha$  e a síntese de TIMP-1, após 24 horas da exposição ao TNF- $\alpha$ . Estes períodos de avaliação foram definidos com base em estudo anterior<sup>97,192</sup>.

#### 4.3.5 Análise da atividade gelatinolítica (zimografia in situ)

A técnica de zimografia in situ foi realizada utilizando o kit EnzCheck® gelatinase/colagenase Assay Kit (Molecular Probes, Eugene, OR, EUA). Esse protocolo envolve a dissolução de uma matriz gelatinosa por enzimas produzidas pelas células semeadas. Após os tratamentos experimentais, um substrato gelatinoso foi aplicado em cada amostra e a enzima protease presente nas amostras realiza a hidrólise da gelatina, promovendo a liberação da fluoresceína, um corante fluorescente verde, que é detectada por um microscópio de fluorescência<sup>193</sup>.

Para este experimento, as células foram semeadas sobre lamínulas, descontaminadas em álcool 70% por 24 h (Figura 10), que foram posicionadas individualmente dentro de cada poço da placa de 24 compartimentos (TPP). Após 21 h da realização dos tratamentos propostos para cada grupo experimental, o protocolo de zimografia in situ foi realizado.

O substrato gelatinoso (EnzChek) foi diluído em tampão de diluição 1:8 (NaCl 150 nM, CaCl<sub>2</sub> 5 mM, Tris-HCl 50 nM, pH 8). A solução de gelatina foi preparada por meio da mistura de 10  $\mu$ L da solução estoque de gelatina, 80  $\mu$ L de tampão de diluição e 10  $\mu$ L de anti-fade.

Em seguida, 100  $\mu$ L da solução gelatinosa contendo fluoresceína foram aplicados sobre as células previamente cultivadas e expostas aos tratamentos propostos, que foram armazenados em estufa a 37 °C em 100% de umidade, na ausência de luz.

Após o período de 1 hora, as amostras foram marcadas com um intercalante de DNA (Hoechst - Invitrogen) para identificação nuclear. Para essa marcação, a sonda fluorescente foi preparada na concentração de 1:5000 em PBS 1X e então adicionada às amostras.

Em seguida, as amostras foram avaliadas em microscópio de fluorescência (498 nm e 530 nm) (Leica DM6000, Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha) e fotomicrografias de cada amostra foram obtidas e analisadas para possibilitar a determinação da degradação da gelatina, ao promover a liberação de fluoresceína e indicando a atividade de enzimas gelatinolíticas/colagenolíticas.

**Figura 10** - Esquema representativo da análise atividade gelatinolítica realizada por meio da técnica de zimografia in situ



Fonte: Elaboração própria.

#### 4.4 Análise dos Dados

Os dados foram submetidos a análise de normalidade e homocedasticidade (Shapiro-Wilk; Levene) para seleção dos testes estatísticos adequados. Sendo observada distribuição normal e homocedasticidade, estes foram analisados por meio de testes paramétricos ANOVA (Análise de variância) a um critério fixo complementado por Tukey. Os resultados da atividade gelatinolítica foram avaliados qualitativamente e apresentados de forma descritiva. Todas as inferências estatísticas foram feitas considerando nível de significância de 5%.

## 5 RESULTADOS

Nesta sessão encontram-se os resultados obtidos nesta pesquisa.

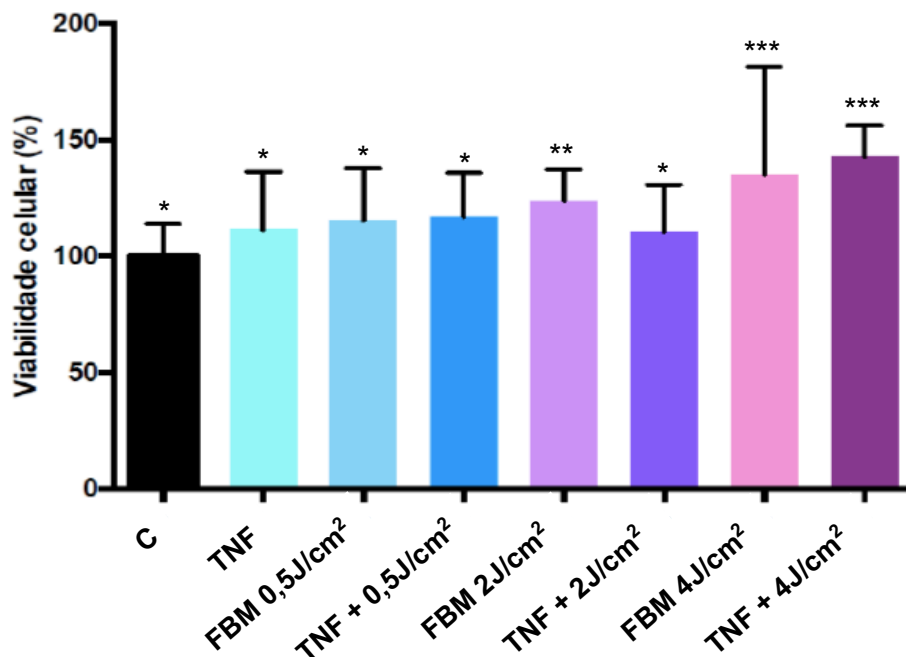
### 5.1 Estudo 1

Os resultados do estudo 1 que objetivou determinar a dose da FBM com LBI necessária para modular a síntese de MMP-2 estão dispostos a seguir:

#### 5.1.1 Avaliação da viabilidade celular (MTT)

Os resultados obtidos a partir da avaliação da viabilidade celular dos HGF submetidos ao protocolo experimental, através do ensaio de MTT, estão apresentados na Figura 11.

**Figura 11** - Viabilidade dos HGF expostos ao TNF- $\alpha$ , associado ou não a FBM, em diferentes doses de energia



Grupos identificados com símbolos distintos são estatisticamente diferentes (Tukey,  $p < 0,05$ ).  
Fonte: Elaboração própria.

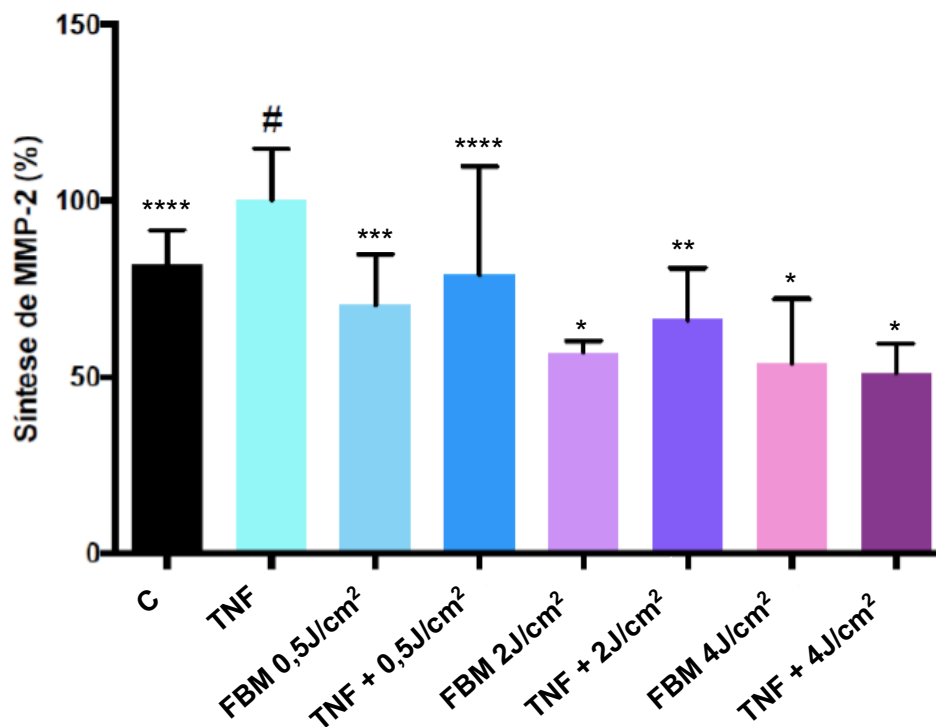
De acordo com os resultados obtidos, a exposição dos HFG ao TNF- $\alpha$  não afetou a viabilidade destas células em cultura ( $p > 0,05$ ). A terapia com FBM 0,5 J/cm<sup>2</sup> associada ou não ao TNF- $\alpha$  e com FBM 2 J/cm<sup>2</sup> associada ao TNF- $\alpha$  não afetou a viabilidade celular ( $p > 0,05$ ). Já a terapia com FBM 2 J/cm<sup>2</sup> aumentou a viabilidade dos

HFG em relação ao controle negativo ( $p < 0,05$ ). A terapia com FBM 4 J/cm<sup>2</sup> aumentou significativamente a viabilidade dos HFG na presença ou ausência de TNF- $\alpha$  em relação ao controle negativo ( $p < 0,05$ ).

### 5.1.2 Análise da síntese de MMP-2

Os resultados obtidos a partir da análise da síntese de MMP-2 dos HGF submetidos ao protocolo experimental, através do ensaio de ELISA, estão apresentados na Figura 12.

**Figura 12** - Síntese de MMP-2 por HGF expostos ao TNF- $\alpha$ , associado ou não a FBM, em diferentes doses de energia



Grupos identificados com símbolos distintos são estatisticamente diferentes (Tukey,  $p < 0,05$ ).  
Fonte: Elaboração própria.

De acordo com os resultados obtidos, a exposição dos HGF ao TNF- $\alpha$  promoveu aumento significativo da síntese de MMP-2 em relação ao controle negativo ( $p < 0,05$ ). Os grupos tratados com FBM 0,5 J/cm<sup>2</sup> associada ou não ao TNF- $\alpha$  apresentaram síntese de MMP-2 estatisticamente semelhante ao controle negativo ( $p > 0,05$ ). Os grupos tratados com FBM 2 J/cm<sup>2</sup> e 4 J/cm<sup>2</sup> associada ou não ao TNF- $\alpha$

apresentaram diminuição significativa da síntese de MMP-2 em relação ao controle negativo ( $p < 0,05$ ).

Sendo assim, após a realização do estudo 1, a densidade de 4 J/cm<sup>2</sup> foi selecionada para avaliação do seu potencial de modulação da resposta das células da mucosa oral, associada ou não a naringenina.

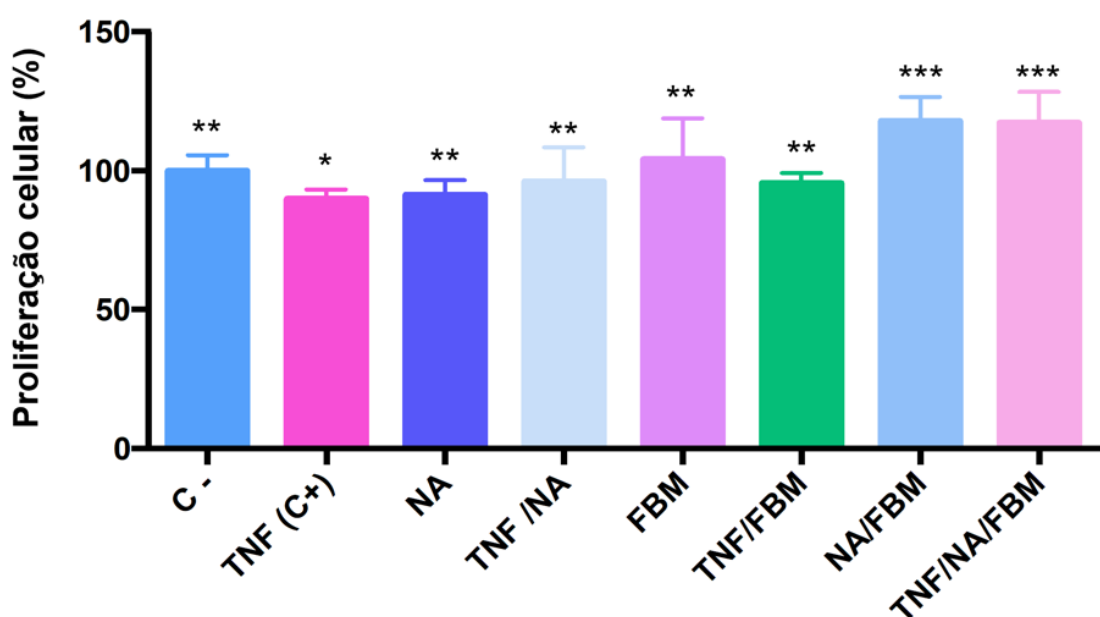
## 5.2 Estudo 2

Os resultados do estudo 2 que objetivou avaliar o potencial sinérgico da FBM com LBI e da NA na modulação da síntese e atividade de MMPS por HGF, bem como sobre funções celulares relacionadas ao processo de reparo tecidual estão dispostos a seguir:

### 5.2.1 Análise da proliferação celular

Os resultados obtidos a partir da análise da proliferação celular dos HGF submetidos ao protocolo experimental, através do ensaio de PrestoBlue, estão apresentados na Figura 13.

**Figura 13** - Proliferação celular de HGF expostos ou não ao TNF- $\alpha$ , associado ou não a FBM (4 J/cm<sup>2</sup>) e NA



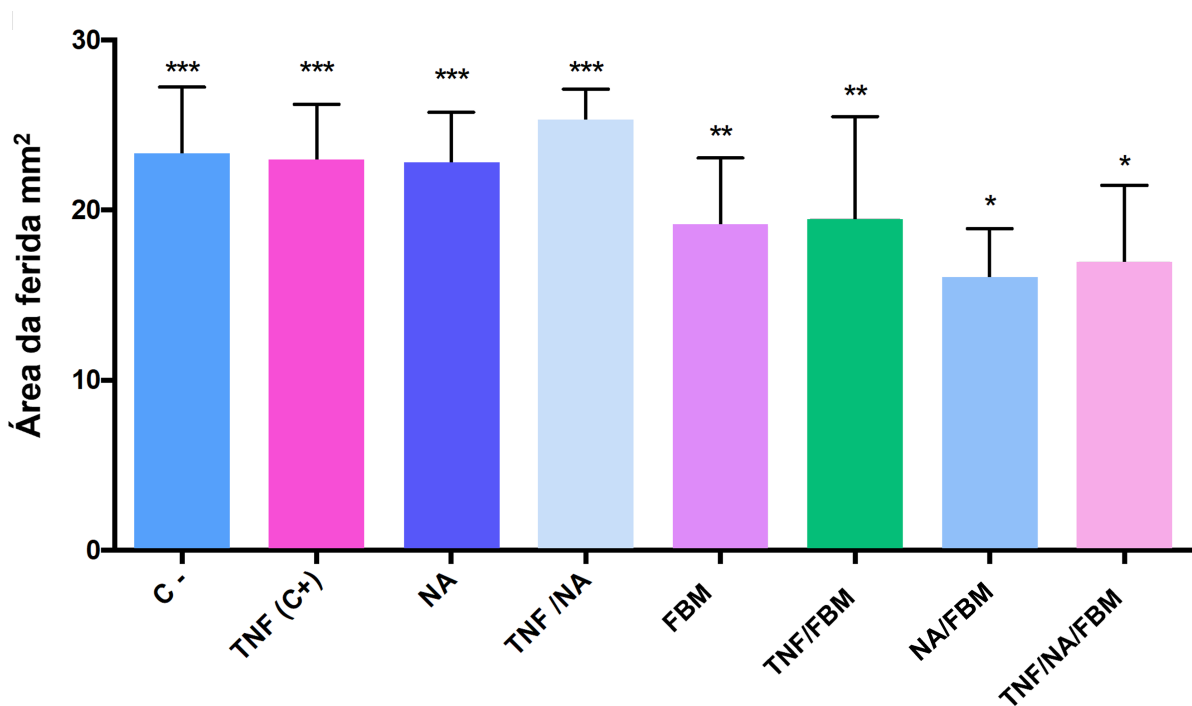
Grupos identificados com símbolos distintos são estatisticamente diferentes (Tukey,  $p < 0,05$ ).  
Fonte: Elaboração própria.

De acordo com os resultados obtidos, a exposição dos HFG ao TNF- $\alpha$  reduziu significativamente a proliferação destas células em cultura ( $p < 0,05$ ). A terapia com FBM não afetou a proliferação celular ( $p > 0,05$ ) e o uso isolado da NA também não influenciou a proliferação celular ( $p > 0,05$ ). A combinação de FBM+NA aumentou a proliferação dos HFG na presença ou ausência de TNF- $\alpha$  ( $p < 0,05$ ).

### 5.2.2 Análise da migração celular

Os resultados obtidos a partir da análise quantitativa da migração celular dos HGF submetidos ao protocolo experimental, através do ensaio de cicatrização in vitro, estão apresentados na Figura 14.

**Figura 14** - Análise quantitativa da migração celular de HGF expostos ou não ao TNF- $\alpha$ , associado ou não a FBM (4 J/cm<sup>2</sup>) e NA



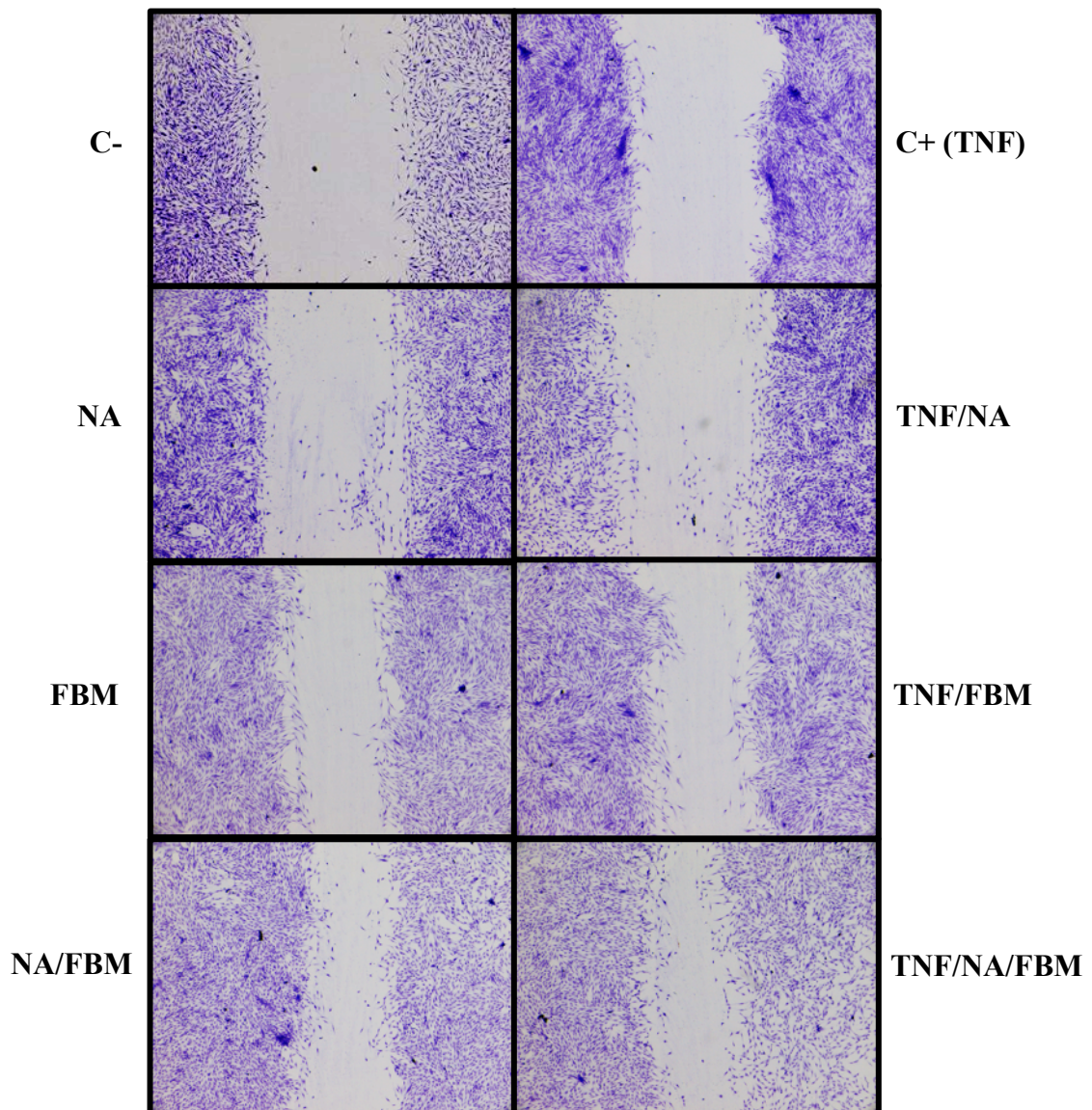
Grupos identificados com símbolos distintos são estatisticamente diferentes (Tukey,  $p < 0,05$ ).  
Fonte: Elaboração própria.

De acordo com os resultados obtidos, as células expostas ao TNF- $\alpha$  e à NA de forma isolada ou associada apresentaram área da ferida estatisticamente semelhante ao controle negativo ( $p > 0,05$ ), portanto, esses tratamentos não afetaram a migração destas células em cultura. A FBM e a associação da FBM+NA ambas na ausência ou

na presença de TNF- $\alpha$  promoveram aumento da migração dos HFG, pois promoveram diminuição significativa da área da ferida em relação ao controle negativo ( $p < 0,05$ ), porém a FBM+NA com ou sem TNF- $\alpha$  promoveu um resultado mais efetivo.

Os resultados obtidos a partir da análise qualitativa da migração celular dos HGF submetidos ao protocolo experimental, através do ensaio de cicatrização *in vitro*, estão apresentados na Figura 15. E as imagens corroboram os dados quantitativos obtidos.

**Figura 15** - Análise qualitativa da migração celular de HGF expostos ou não ao TNF- $\alpha$ , associado ou não a FBM (4 J/cm<sup>2</sup>) e NA

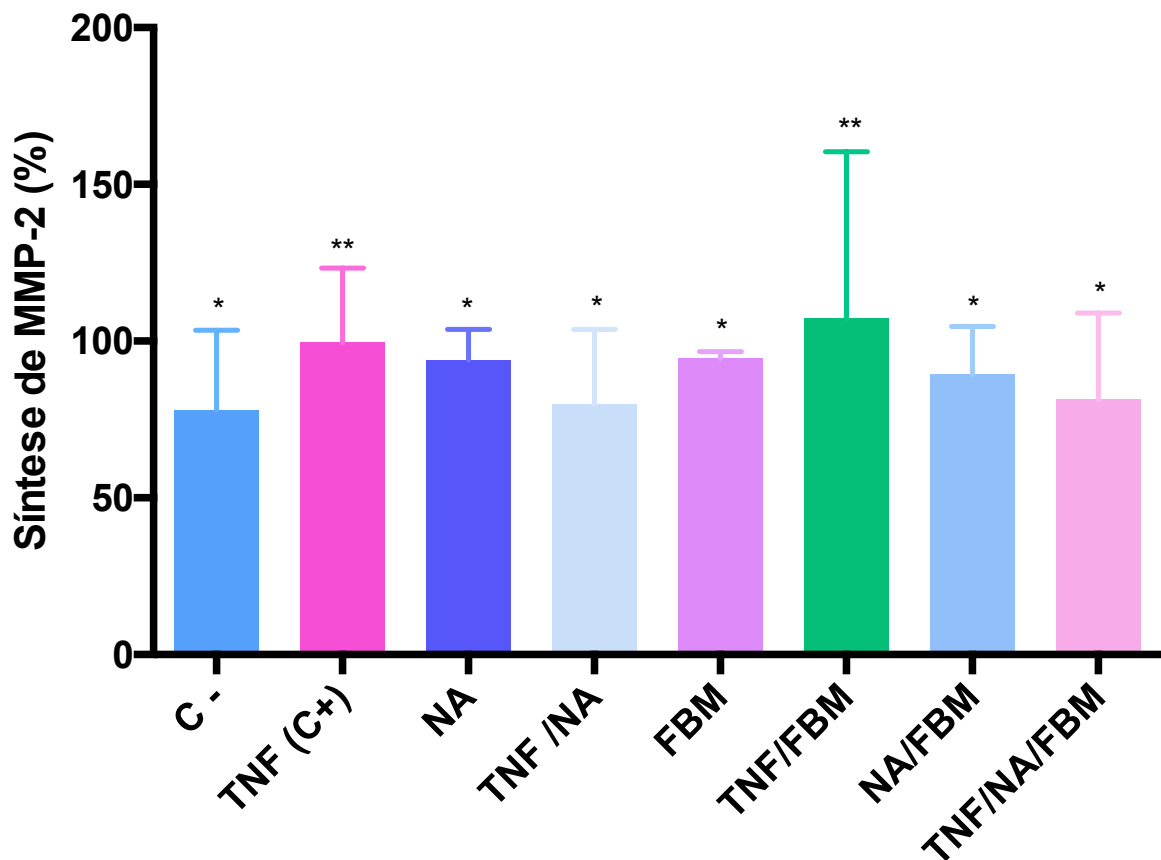


Fonte: Elaboração própria.

### 5.2.3 Análise da síntese de MMP-2

Os resultados obtidos a partir da análise da síntese de MMP-2 dos HGF submetidos ao protocolo experimental, através do ensaio de ELISA, estão apresentados na Figura 16.

**Figura 16** - Síntese de MMP-2 por HGF expostos ou não ao TNF- $\alpha$ , associado ou não a FBM (4 J/cm<sup>2</sup>) e NA



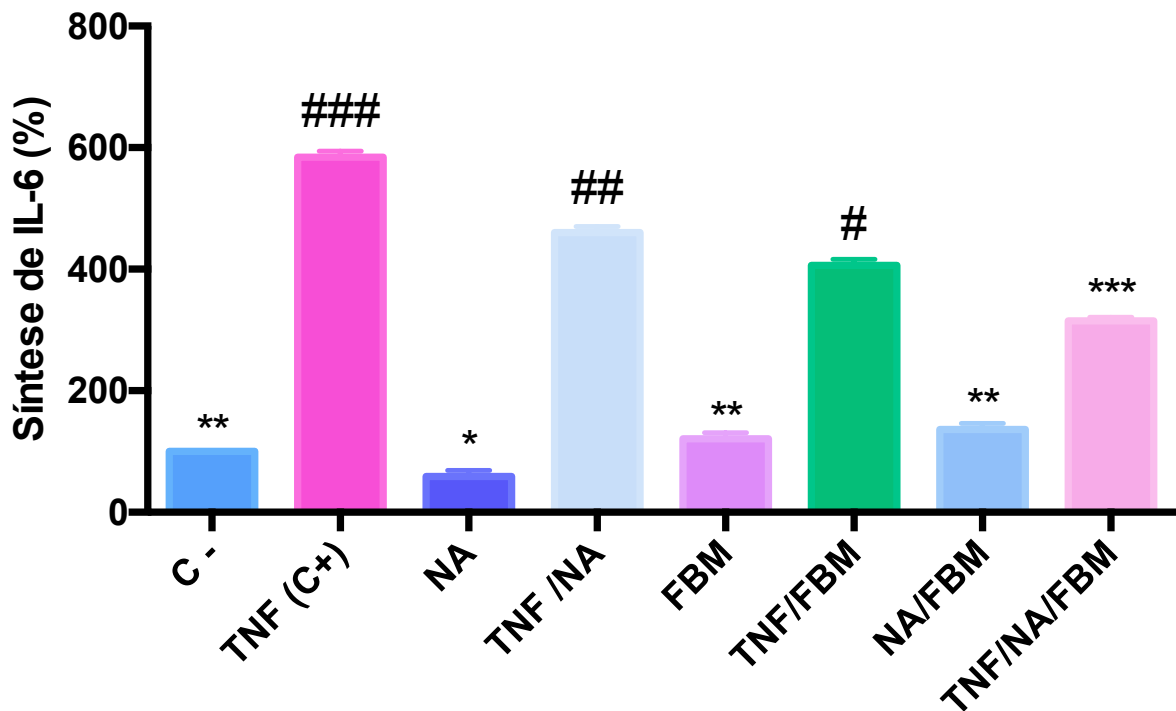
Grupos identificados com símbolos distintos são estatisticamente diferentes (Tukey,  $p < 0,05$ ).  
Fonte: Elaboração própria.

De acordo com os resultados obtidos, o tratamento com TNF- $\alpha$  aumentou significativamente a síntese de MMP-2 isoladamente ou na presença da terapia com FBM ( $p < 0,05$ ). A terapia com FBM ou NA promoveu síntese de MMP-2 similar ao controle negativo ( $p > 0,05$ ). E a associação de FBM+NA na presença ou ausência de TNF- $\alpha$  promoveu síntese de MMP-2 também similar ao controle negativo ( $p > 0,05$ ).

### 5.2.4 Análise da síntese de IL-6

Os resultados obtidos a partir da análise da síntese de IL-6 dos HGF submetidos ao protocolo experimental, através do ensaio de ELISA, estão apresentados na Figura 17.

**Figura 17** - Síntese de IL-6 por HGF expostos ou não ao TNF- $\alpha$ , associado ou não a FBM (4 J/cm<sup>2</sup>) e NA



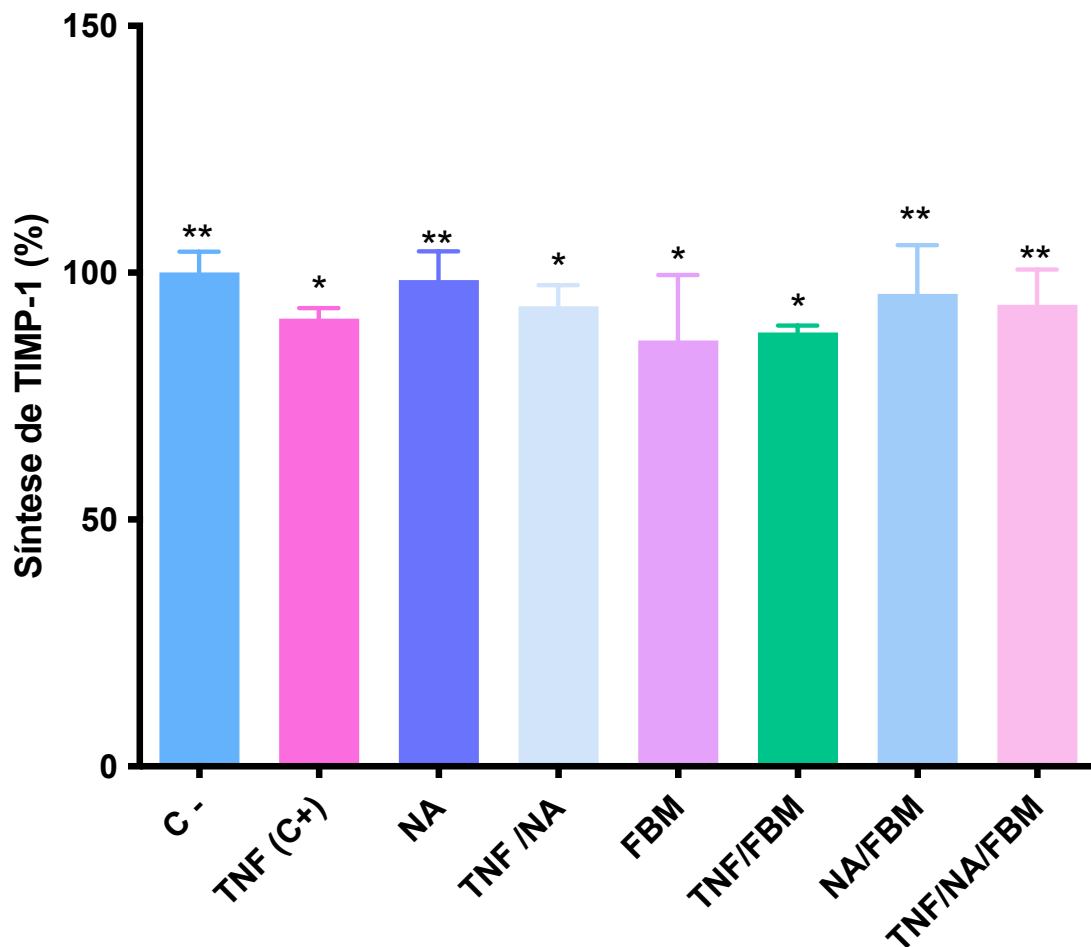
Grupos identificados com símbolos distintos são estatisticamente diferentes (Tukey,  $p < 0,05$ ).  
Fonte: Elaboração própria.

De acordo com os resultados obtidos, o tratamento com TNF- $\alpha$  aumentou significativamente a síntese de IL-6 em relação ao controle negativo ( $p < 0,05$ ). A terapia com NA promoveu redução significativa da síntese de IL-6 em relação ao controle negativo ( $p < 0,05$ ). Os grupos tratados com FBM e NA+FBM apresentaram síntese de IL-6 estatisticamente semelhante ao controle negativo ( $p > 0,05$ ). Os grupos tratados com NA, FBM e NA+FBM na presença ou ausência de TNF- $\alpha$  apresentaram redução significativa da síntese de IL-6 em relação ao controle positivo (TNF- $\alpha$ ) ( $p > 0,05$ ).

### 5.2.5 Análise da síntese de TIMP-1

Os resultados obtidos a partir da análise da síntese de TIMP-1 dos HGF submetidos ao protocolo experimental, através do ensaio de ELISA, estão apresentados na Figura 18.

**Figura 18** - Síntese de TIMP-1 por HGF expostos ou não ao TNF- $\alpha$ , associado ou não a FBM (4 J/cm<sup>2</sup>) e NA



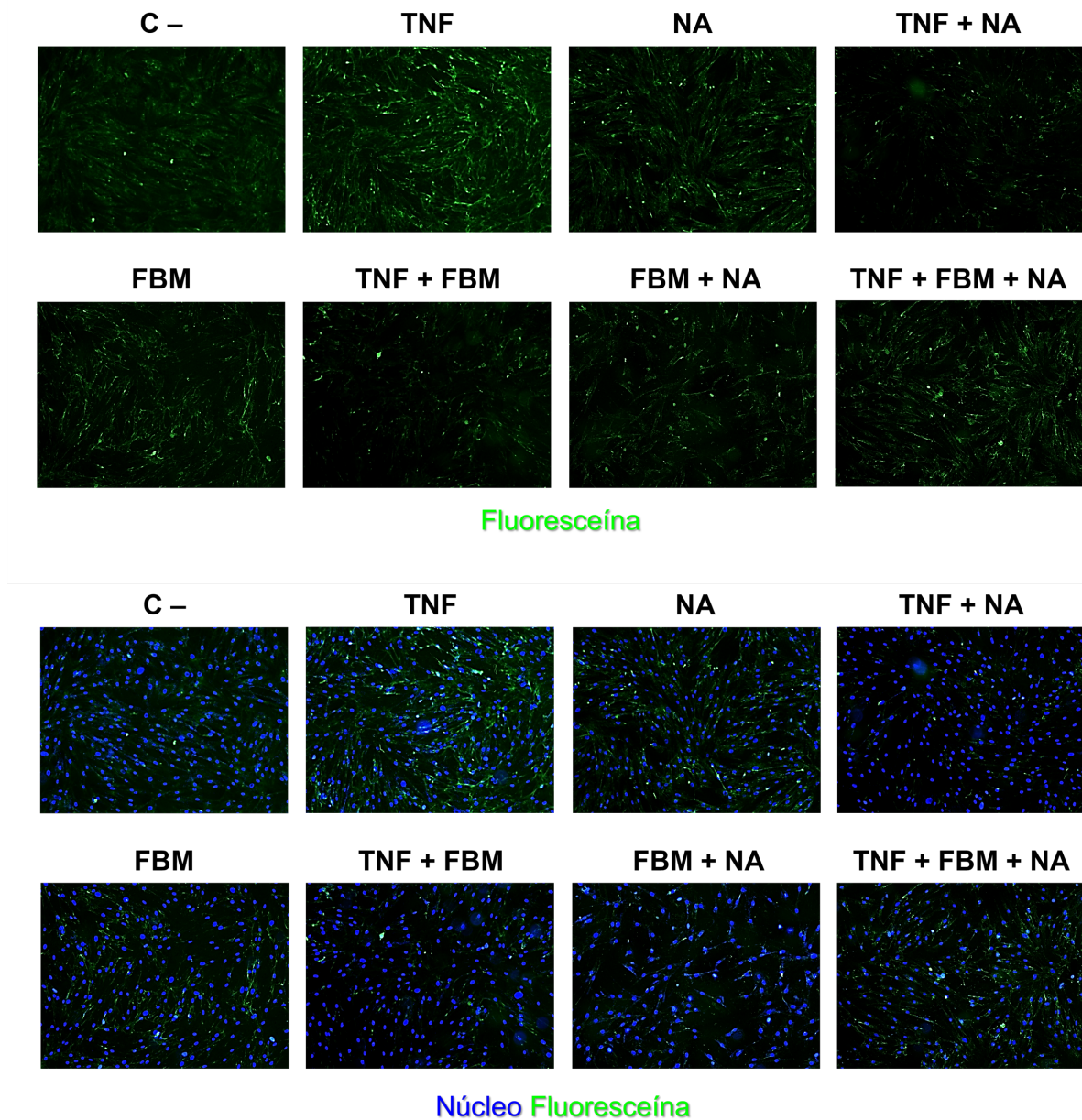
Grupos identificados com símbolos distintos são estatisticamente diferentes (Tukey,  $p < 0,05$ ).  
Fonte: Elaboração própria.

De acordo com os resultados obtidos, o tratamento com TNF- $\alpha$  reduziu a síntese de TIMP-1 em relação ao controle negativo ( $p < 0,05$ ). Os grupos tratados com NA, NA+FBM e TNF+NA+FBM apresentaram síntese de TIMP-1 estatisticamente semelhante ao controle negativo ( $p > 0,05$ ). As terapias com NA+TNF, FBM e FBM+TNF promoveram redução da síntese de TIMP-1 em relação ao controle negativo ( $p < 0,05$ ).

### 5.2.6 Análise da atividade gelatinolítica

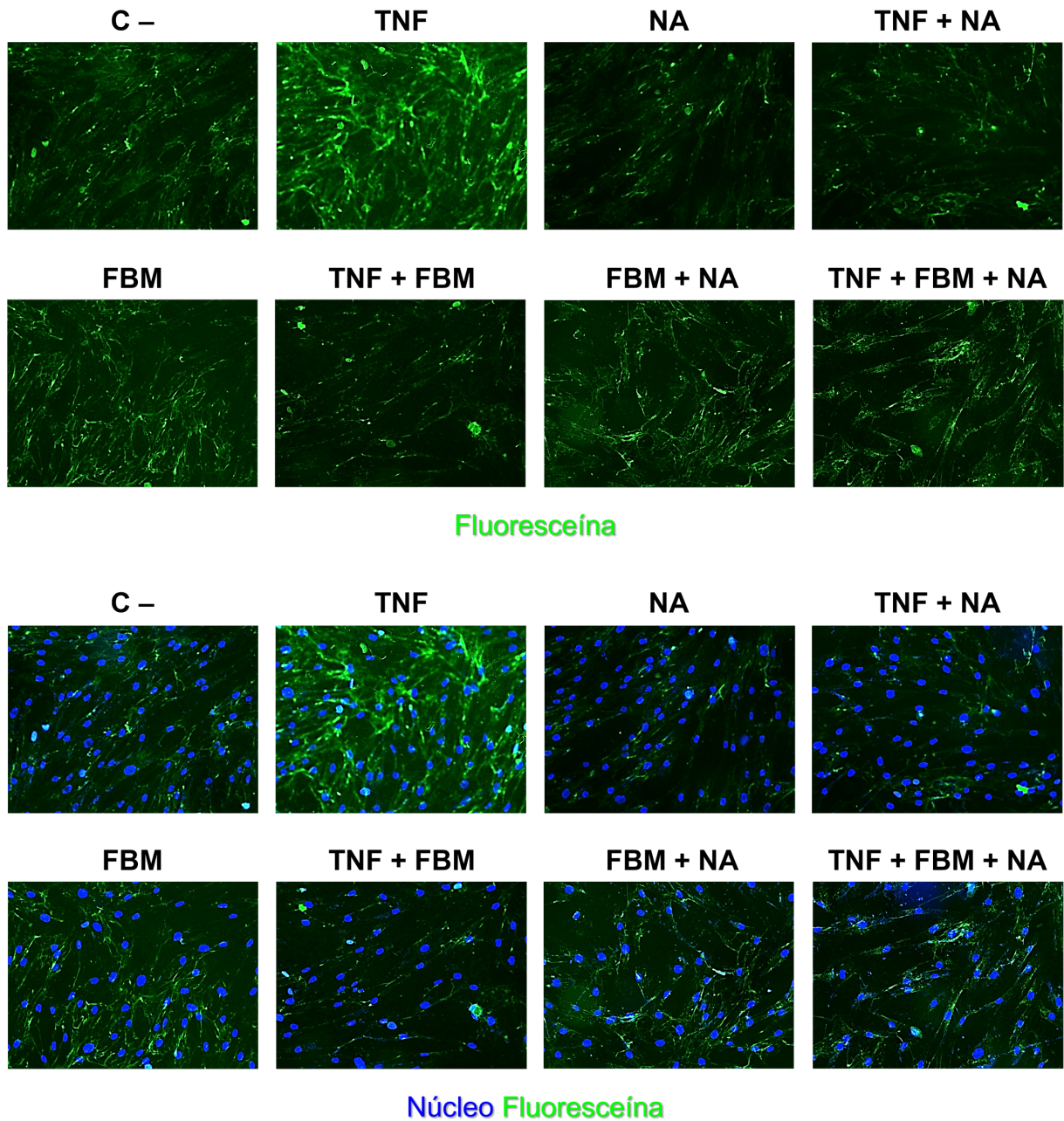
Os resultados obtidos a partir da análise da atividade gelatinolítica dos HGF submetidos ao protocolo experimental, através do ensaio de zimografia *in situ*, estão apresentados na Figura 19 em aumento de 10X e na Figura 20 em aumento de 20X.

**Figura 19** - Atividade gelatinolítica dos HGF em aumento de 10X



Fonte: Elaboração própria.

**Figura 20** - Atividade gelatinolítica dos HGF em aumento de 20X



Fonte: Elaboração própria.

De acordo com os resultados obtidos, o tratamento com TNF- $\alpha$  promoveu a maior intensidade de fluorescência entre todos os grupos, indicando maior atividade de enzimas gelatinolíticas produzidas pelos HGF.

A FBM ou NA isolada ou associada (FBM+NA) na presença ou ausência de TNF- $\alpha$ , promoveu menor intensidade de fluorescência, indicando modulação da atividade gelatinolítica induzida por essas terapias.

## 6 DISCUSSÃO

A mucosite oral é uma das principais complicações agudas da quimioterapia ou da radioterapia de cabeça e pescoço, cuja incidência e severidade podem resultar em interrupções e atrasos no tratamento oncológico, impactando a qualidade de vida e sobrevida destes pacientes<sup>1-3,5,6</sup>. Apesar dos protocolos atualmente propostos, o tratamento desta condição ainda não está bem estabelecido, sendo fundamental a avaliação de novas estratégias terapêuticas que acelerem o processo de reparo dos tecidos orais.

Um grande número de estudos já comprovou os efeitos positivos da FBM com laser de baixa intensidade na proliferação e migração celulares, bem como na modulação negativa de mediadores inflamatórios relacionados à etiopatogenese da mucosite oral<sup>136,142,144,146-152,154,158-160</sup>. Estes efeitos também foram demonstrados em estudos em modelo animal e clínicos<sup>136-140</sup>. Visando apresentar novas propostas terapêuticas, que possam auxiliar no reparo dos tecidos orais, os bioflavonóides têm apresentado efeitos positivos na proliferação de células da mucosa oral, bem como na modulação de mediadores inflamatórios e MMPs<sup>38-40,171,177-184</sup>.

A partir destes achados, este estudo avaliou o potencial sinérgico da FBM com LBI e da naringenina na modulação da síntese e atividade mediadores inflamatórios por HGF, bem como sobre funções celulares relacionadas ao processo de reparo tecidual. A hipótese de que a associação dessas terapias na presença de TNF- $\alpha$  pode favorecer a aceleração do reparo tecidual foi aceita.

Considerando que diversos autores já evidenciaram os efeitos da FBM e outros protocolos propostos para o tratamento e controle das lesões de mucosite oral, este projeto visou evidenciar a regulação das terapias propostas sobre a síntese de metaloproteinases da matriz, sendo que o aumento da concentração local de MMPs já foi relatado em lesões de mucosite oral<sup>14-16</sup> e também está diretamente relacionado à manutenção da fase inflamatória e ao atraso do processo de reparo tecidual<sup>9,10,17,18,71-74</sup>.

Os resultados do primeiro estudo, cujo objetivo foi determinado em selecionar uma densidade de energia de FBM que fosse capaz de modular a síntese de MMP-2, demonstrou que a FBM, na densidade de energia de 4 J/cm<sup>2</sup>, associada ou não ao TNF- $\alpha$ , foi efetiva nesta modulação (Figura 12). A aplicação da FBM sobre os fibroblastos nesta densidade também resultou em aumento significativo da viabilidade

celular (Figura 11). O aumento da viabilidade de fibroblastos gengivais pela FBM já foi demonstrado nos estudos de Basso et al.<sup>25</sup> em 2016, Pansani et al.<sup>158</sup> em 2018 e Rech et al.<sup>160</sup> em 2021. Sendo esta uma resposta importante a ser avaliada quando se almeja a biomodulação tecidual<sup>158</sup>. Assim, este parâmetro foi selecionado para as análises subsequentes.

O processo de reparo tecidual é composto por fases distintas, iniciadas a partir da injúria tecidual, que são descritas como fases de hemostasia, inflamatória, de proliferação e migração celular e remodelação tecidual<sup>91,93</sup>. Portanto, ao considerar o estímulo do reparo das lesões de mucosite oral, além da importância da modulação da resposta inflamatória, também é necessário avaliar as funções de proliferação e migração celular, pois eventos que resultem na reativação da fase inflamatória, como ocorre nas lesões de mucosite, podem reduzir a capacidade proliferativa e migratória, contribuindo também com o atraso do reparo tecidual<sup>89,93</sup>. Por outro lado, terapias que associem a modulação negativa da fase inflamatória e a estimulação da proliferação e migração celular podem acelerar a cicatrização tecidual<sup>90</sup>.

Neste trabalho, a análise da proliferação celular dos HGF submetidos ao protocolo experimental, através do ensaio de PrestoBlue, demonstrou que a combinação de FBM+NA aumentou a proliferação dos HFG na presença ou ausência de TNF- $\alpha$  ( $p < 0,05$ ). A avaliação da migração destas células após os tratamentos de associação propostos, também evidenciou um aumento da migração dos HGF na ausência ou na presença de TNF- $\alpha$ , pois promoveram diminuição significativa da área da ferida em relação ao controle negativo ( $p < 0,05$ ).

Estudos anteriores demonstraram que a FBM pode estimular a migração<sup>136,153,156</sup> e a proliferação de fibroblastos gengivais<sup>25,26,134,136,142,144,146-148,158</sup> e também a proliferação celular e a expressão gênica de queratinócitos<sup>157</sup>. Os efeitos positivos da naringenina e outros bioflavonóides sobre a migração e a proliferação celular também já foram apresentados<sup>179,181</sup>.

O desenvolvimento e a severidade da mucosite oral também está relacionada com o aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8 e IL-6<sup>10,11,14,75,82</sup>. Dentre elas, a IL-6 atua como mediador essencial na patogênese da mucosite oral<sup>9,10,26,71,74</sup>, criando um feedback positivo sobre a reação inflamatória local e exacerbando o desequilíbrio da matriz extracelular, causando destruição tecidual na evolução da mucosite oral<sup>74</sup> e podendo atrasar o reparo das lesões<sup>26</sup>. Porém, assim

como o TNF- $\alpha$ , seu envolvimento completo na patogênese ainda permanece desconhecido<sup>10,88</sup>.

Estudos anteriores demonstraram que a FBM promoveu um efeito biomodulador benéfico sobre a expressão de citocinas inflamatórias relacionadas à mucosite oral por fibroblastos gengivais humanos, inclusive na redução da expressão de IL-6<sup>13,154,159</sup>. Além disso, os efeitos da naringenina na modulação de citocinas inflamatórias também já foi demonstrado, resultando na inibição da secreção de TNF- $\alpha$  e IL-6<sup>177,178</sup>. A análise da síntese de IL-6 deste estudo foi realizada através do ensaio de ELISA. De acordo com os resultados obtidos, foi possível observar a redução significativa da síntese de IL-6 em relação ao controle positivo ao realizar a associação das terapias, na presença ou ausência de TNF- $\alpha$  (Figura 17).

As MMPs desempenham um papel fundamental na fisiologia normal do tecido conjuntivo durante o desenvolvimento, morfogênese e cicatrização de feridas, mas sua atividade desregulada tem sido implicada em vários processos patológicos<sup>9,10,18,71,72</sup>. Essa atuação ocorre pela degradação do colágeno, acelerando a desorganização tecidual local, além disso, possuem uma função essencial na ativação de mediadores inflamatórios, vias de sinalização e no recrutamento de diferentes células inflamatórias<sup>74,75</sup>. A superexpressão de MMPs na cavidade oral, desencadeada por mediadores inflamatórios da mucosite oral, pode acelerar a desorganização tecidual, resultando em dano tecidual<sup>74</sup>. Neste contexto, a MMP-2 é umas das principais MMPs associadas a mucosite oral na cavidade oral, tendo um papel importante no reparo tecidual<sup>14-16,74</sup>.

Alguns estudos vêm demonstrando que em algumas patologias, a FBM com LBI pode atuar na modulação de MMP-2, podendo colaborar com a remodelação tecidual, facilitando o reparo<sup>149-152</sup>. De forma semelhante, a naringenina também demonstrou ser efetiva na regulação da atividade de MMPs<sup>39,40</sup>, reduzindo a expressão de MMP-2 em diversas patologias<sup>179,181-184</sup>. Porém, no estudo de Hernández-Aquino et al.<sup>185</sup> (2017), a administração de NA foi associada com atividade normal de MMP-2 e foi sugerido que os efeitos anti-inflamatórios, antinecróticos e antifibróticos da NA estão relacionados com a sua capacidade de prevenir a ativação do NF- $\kappa$ B<sup>185</sup>. Todavia, mais estudos são necessários para avaliar esta nova terapêutica e seu mecanismo de ação nas MMPs.

Em nosso estudo realizamos a avaliação da síntese de MMP-2 por meio do imunoensaio ELISA. No primeiro estudo, observamos que nos grupos tratados com

LBI em 2 J/cm<sup>2</sup> e 4 J/cm<sup>2</sup> associada ou não ao TNF- $\alpha$  ocorreu uma diminuição significativa da síntese de MMP-2 em relação ao controle negativo ( $p < 0,05$ ). No segundo estudo, observamos que o grupo submetido à associação de FBM+NA na presença ou ausência de TNF- $\alpha$  apresentou síntese de MMP-2 similar ao controle negativo ( $p > 0,05$ ).

Considerando que as MMPs são produzidas geralmente em formas latentes, é importante determinar também a taxa de atividade dessas enzimas<sup>194</sup>. Essa avaliação pode ser realizada através do ensaio de zimografia *in situ*, que possibilita a determinação da degradação do substrato de gelatina, ao promover a liberação de fluoresceína, e indicando a atividade de enzimas gelatinolíticas<sup>193,194</sup>. Neste trabalho, observamos que o tratamento com TNF- $\alpha$  promoveu a maior intensidade de fluorescência entre todos os grupos, indicando maior atividade de enzimas gelatinolíticas produzidas pelos HGF. Além disso, a FBM ou NA isoladas ou associadas (FBM+NA), na presença de TNF- $\alpha$ , promoveram menor intensidade de fluorescência, indicando modulação da atividade gelatinolítica induzida por essas terapias (Figuras 19 e 20).

As TIMPs atuam na regulação da atividade das MMPs<sup>18</sup>, por meio de inibição direta do sítio ativo ou ainda por meio de controle pós-transcricional, controlando a extensão da remodelação da matriz extracelular<sup>73,76,78-80</sup>. Em 2010, Al-Dasooqi e colaboradores<sup>14</sup> demonstraram o potencial das MMPs e TIMPs no desenvolvimento da mucosite do trato gastrointestinal, demonstrando uma perda do equilíbrio na síntese destas proteínas. Além disso, os autores verificaram que alterações na expressão de MMPs e TIMPs estavam correlacionadas com as alterações histopatológicas observadas<sup>14</sup>. No entanto, a compreensão das TIMPs ainda é superficial em muitos aspectos e novas informações são necessárias<sup>18</sup>. Neste estudo, foi realizada a análise da síntese de TIMP-1 por HGF por meio do ensaio ELISA. De acordo com os resultados obtidos, a associação de FBM+NA, na presença ou ausência de TNF- $\alpha$ , demonstrou síntese de TIMP-1 estatisticamente semelhante ao controle negativo ( $p > 0,05$ ), enquanto os grupos NA+TNF, FBM e FBM+TNF apresentaram redução da síntese de TIMP-1 em relação ao controle negativo ( $p < 0,05$ ).

Esta regulação pode estar associada à ativação de vias de sinalização intracelulares, como a via do Fator nuclear Kappa B (NF $\kappa$ B), que é responsável pela transcrição de diversos genes relacionados a proliferação e sobrevivência

celular<sup>9,10,71,72</sup>. Esta via de sinalização também está relacionada a expressão de MMPs e de outros mediadores inflamatórios como IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$ <sup>195-197</sup>.

Em relação a execução desta investigação, um aspecto positivo é a utilização da LASERTable durante os protocolos de FBM, que proporciona uma padronização da irradiação da FBM com LBI. A configuração do equipamento, além de evitar a sobreposição da irradiação para os outros compartimentos, padroniza a distância de irradiação e permite a irradiação simultânea e homogênea de toda base de cada compartimento onde as células foram cultivadas, além de reduzir o tempo gasto para irradiar as células, resultando em garantia de padronização dos resultados de FBM<sup>190</sup>. Outro fator a ser considerado é que os polifenóis naturais podem apresentar diferentes formulações, dependendo da fonte, condição de cultivo, clima e forma de extração<sup>41</sup> e essas variações em sua composição podem dificultar a sua aplicação terapêutica<sup>42</sup>. Visando reduzir este viés, para o presente estudo foi utilizada a NA sintética, que pode oferecer resultados mais representativos e de maior reprodutibilidade<sup>42</sup>.

Entretanto, ao considerar os resultados obtidos é importante levar em conta as limitações do presente estudo, por se tratar de uma investigação realizada utilizando um modelo *in vitro* de cultura de células em monocamada. Os modelos *in vivo* são mais preditivos para estudar a cicatrização, permitindo uma representação mais realista<sup>198</sup>. Porém, os estudos pré-clínicos em cultura de células, apesar de apresentarem menor representatividade, são essenciais para a avaliação da efetividade de diferentes parâmetros e contribuem com resultados preliminares para investigações posteriores. E apesar de que os dados dos estudos *in vitro* não poderem serem extrapolados diretamente para as situações clínicas<sup>199</sup>, é possível com o modelo *in vitro* isolar respostas celulares específicas a diferentes estímulos, levando a uma melhor compreensão de como várias condições influenciaram diferentes resultados<sup>97</sup>. Além disso, considerando os modelos de estudo *in vitro*, a cultura de células 2D representa a metodologia de cultivo mais empregada ainda atualmente, desempenhando um papel vital nas pesquisas; no entanto, possuem algumas limitações<sup>200</sup>, como menor representatividade morfológica e fenotípica, quando comparada aos modelos de cultura de células tridimensionais<sup>200,201</sup>.

Dessa forma, os dados apresentados demonstram que a associação entre a FBM+NA pode potencializar os efeitos observados para estas terapias isoladas (efeito sinérgico) na modulação de diversas funções celulares, que podem resultar na aceleração do reparo tecidual e parece ser uma proposta promissora para o

tratamento da MO. Contudo, estudos futuros em modelo de cultura 3D e animais podem contribuir ainda mais para a elucidação dos efeitos das terapias com FBM e NA na regulação de eventos celulares e moleculares envolvidos no processo de patogênese da MO.

## 7 CONCLUSÃO

A fotobiomodulação com laser de baixa intensidade ( $4 \text{ J/cm}^2$ , 780 nm, 0,025 W) associado a naringenina apresenta um potencial sinérgico *in vitro* resultando em aumento da proliferação e migração celular dos fibroblastos gengivais humanos e menores níveis de síntese de MMP-2 e IL-6, sem alterar a síntese de TIMP-1. E a associação dessas terapias na presença de TNF- $\alpha$  indicou a modulação da atividade gelatinolítica, favorecendo estas funções celulares que estão relacionadas a aceleração do reparo tecidual.

## REFERÊNCIAS\*

1. Kuo CC, Wang RH, Wang HH, Li CH. Meta-analysis of randomized controlled trials of the efficacy of propolis mouthwash in cancer therapy-induced oral mucositis. *Support Care Cancer*. 2018; 26(12): 4001-9.
2. Al Ibraheemi AA, Shamoun S. Incidence and risk factors of oral mucositis in patients with breast cancer who receiving chemotherapy in al-bashir hospital. *Int J Hematol Oncol Stem Cell Res*. 2016; 10(4): 217-23.
3. Murphy BA. Clinical and economic consequences of mucositis induced by chemotherapy and/or radiation therapy. *J Support Oncol*. 2007; 5(9 Suppl 4): 13-21.
4. Parulekar W, Mackenzie R, Bjarnason G, Jordan RC. Scoring oral mucositis. *Oral Oncol*. 1998; 34(1):63-71.
5. Elting LS, Cooksley C, Chambers M, Cantor SB, Manzullo E, Rubenstein EB. The burdens of cancer therapy. Clinical and economic outcomes of chemotherapy-induced mucositis. *Cancer*. 2003; 98(7): 1531-9.
6. Silva GB, Mendonça EF, Bariani C, Antunes HS, Silva MA. The prevention of induced oral mucositis with low-level laser therapy in bone marrow transplantation patients: a randomized clinical trial. *Photomed Laser Surg*. 2011; 29(1): 27-31.
7. Scully C, Epstein J, Sonis S. Oral mucositis: a challenging complication of radiotherapy, chemotherapy, and radiochemotherapy: part 1, pathogenesis and prophylaxis of mucositis. *Head Neck*. 2003; 25(12): 1057-70.
8. Wong PC, Dodd MJ, Miaskowski C, Paul SM, Bank KA, Shiba GH, et al. Mucositis pain induced by radiation therapy: prevalence, severity, and use of self-care behaviors. *J Pain Symptom Manage*. 2006; 32(1): 27-37.
9. Sonis ST. Pathobiology of oral mucositis: novel insights and opportunities. *J Support Oncol*. 2007; 5(9 Suppl 4): 3-11.
10. Logan RM, Stringer AM, Bowen JM, Yeoh AS, Gibson RJ, Sonis ST, et al. The role of pro-inflammatory cytokines in cancer treatment-induced alimentary tract mucositis: pathobiology, animal models and cytotoxic drugs. *Cancer Treat Rev*. 2007; 33(5): 448-60.
11. Meirovitz A, Kuten M, Billan S, Abdah-Bortnyak R, Sharon A, Peretz T, et al. Cytokines levels, severity of acute mucositis and the need of PEG tube installation during chemo-radiation for head and neck cancer--a prospective pilot study. *Radiat Oncol*. 2010; 5: 16.

---

\* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacao-atualizado.pdf>

12. Basso FG, Turrioni AP, Soares DIG, Bagnato VS, Hebling J, de Souza Costa CA. Low-level laser therapy for osteonecrotic lesions: effects on osteoblasts treated with zoledronic acid. *Support Care Cancer*. 2014; 22(10): 2741-8.
13. Basso FG, Soares DG, Pansani TN, Cardoso LM, Scheffel DL, de Souza Costa CA, et al. Proliferation, migration, and expression of oral-mucosal-healing-related genes by oral fibroblasts receiving low-level laser therapy after inflammatory cytokines challenge. *Lasers Surg Med*. 2016; 48(10): 1006-14.
14. Al-Dasooqi N, Gibson RJ, Bowen JM, Logan RM, Stringer AM, Keefe DM. Matrix metalloproteinases are possible mediators for the development of alimentary tract mucositis in the dark agouti rat. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2010; 235(10): 1244-56.
15. Al-Dasooqi N. Matrix metalloproteinases and gut toxicity following cytotoxic cancer therapy. *Curr Opin Support Palliat Care*. 2014; 8(2): 164-9.
16. Al-Azri AR, Gibson RJ, Bowen JM, Stringer AM, Keefe DM, Logan RM. Involvement of matrix metalloproteinases (MMP-3 and MMP-9) in the pathogenesis of irinotecan-induced oral mucositis. *J Oral Pathol Med*. 2015; 44(6): 459-67.
17. Malemud CJ. Matrix metalloproteinases (MMPs) in health and disease: an overview. *Front Biosci*. 2006; 11: 1696-701.
18. Brew K, Dinakarpanian D, Nagase H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta*. 2000; 1477(1-2): 267-83.
19. Schubert MM, Eduardo FP, Guthrie KA, Franquin JC, Bensadoun RJ, Migliorati CA, et al. A phase III randomized double-blind placebo-controlled clinical trial to determine the efficacy of low level laser therapy for the prevention of oral mucositis in patients undergoing hematopoietic cell transplantation. *Support Care Cancer*. 2007; 15(10): 1145-54.
20. Bjordal JM, Bensadoun RJ, Tuner J, Frigo L, Gjerde K, Lopes-Martins RA. A systematic review with meta-analysis of the effect of low-level laser therapy (LLLT) in cancer therapy-induced oral mucositis. *Support Care Cancer*. 2011; 19(8): 1069-77.
21. Lino MD, Carvalho FB, Oliveira LR, Magalhães EB, Pinheiro AL, Ramalho LM. Laser phototherapy as a treatment for radiotherapy-induced oral mucositis. *Braz Dent J*. 2011; 22(2): 162-5.
22. Peng H, Chen BB, Chen L, Chen YP, Liu X, Tang LL, et al. A network meta-analysis in comparing prophylactic treatments of radiotherapy-induced oral mucositis for patients with head and neck cancers receiving radiotherapy. *Oral Oncol*. 2017; 75: 89-94.

23. Soares RG, Farias LC, da Silva Menezes AS, de Oliveira E Silva CS, Tabosa ATL, Chagas PVF, et al. Treatment of mucositis with combined 660- and 808-nm-wavelength low-level laser therapy reduced mucositis grade, pain, and use of analgesics: a parallel, single-blind, two-arm controlled study. *Lasers Med Sci*. 2018; 33(8): 1813-9.
24. Bensadoun RJ. Photobiomodulation or low-level laser therapy in the management of cancer therapy-induced mucositis, dermatitis and lymphedema. *Curr Opin Oncol*. 2018; 30(4): 226-32.
25. Basso FG, Soares DG, de Souza Costa CA, Hebling J. Low-level laser therapy in 3D cell culture model using gingival fibroblasts. *Lasers Med Sci*. 2016; 31(5): 973-8.
26. Basso FG, Pansani TN, Turrioni AP, Soares DG, de Souza Costa CA, Hebling J. Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  and Interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-6, and IL-8 impair in vitro migration and induce apoptosis of gingival fibroblasts and epithelial cells, delaying wound healing. *J Periodontol*. 2016; 87(8): 990-6.
27. Antunes HS, Herchenhorn D, Small IA, Araújo CMM, Viégas CMP, de Assis Ramos G, 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 (LLLTL) to prevent oral mucositis. *Oral Oncol*. 2017; 71: 11-5.
28. Yarom N, Ariyawardana A, Hovan A, Barasch A, Jarvis V, Jensen SB, et al. Systematic review of natural agents for the management of oral mucositis in cancer patients. *Support Care Cancer*. 2013; 21(11): 3209-21.
29. Olaku OO, Ojukwu MO, Zia FZ, White JD. The role of grape seed extract in the treatment of chemo/radiotherapy induced toxicity: a systematic review of preclinical studies. *Nutr Cancer*. 2015; 67(5): 730-40.
30. Gharras HE. Polyphenols: food sources, properties and applications – a review. *Int J Food Sci Technol*. 2009; 44: 2512–8.
31. Pandareesh MD, Mythri RB, Srinivas Bharath MM. Bioavailability of dietary polyphenols: factors contributing to their clinical application in CNS diseases. *Neurochem Int*. 2015; 89: 198-208.
32. Dou W, Zhang J, Sun A, Zhang E, Ding L, Mukherjee S, et al. Protective effect of naringenin against experimental colitis via suppression of Toll-like receptor 4/NF- $\kappa$ B signalling. *Br J Nutr*. 2013; 110(4): 599-608.
33. Wang J, Yang Z, Lin L, Zhao Z, Liu Z, Liu X. Protective effect of naringenin against lead-induced oxidative stress in rats. *Biol Trace Elem Res*. 2012; 146(3): 354-9.

34. Khan MB, Khan MM, Khan A, Ahmed ME, Ishrat T, Tabassum R, et al. Naringenin ameliorates Alzheimer's disease (AD)-type neurodegeneration with cognitive impairment (AD-TNDC1) caused by the intracerebroventricular-streptozotocin in rat model. *Neurochem Int.* 2012; 61(7): 1081-93.
35. Annadurai T, Muralidharan AR, Joseph T, Hsu MJ, Thomas PA, Geraldine P. Antihyperglycemic and antioxidant effects of a flavanone, naringenin, in streptozotocin-nicotinamide-induced experimental diabetic rats. *J Physiol Biochem.* 2012; 68(3): 307-18.
36. Arul D, Subramanian P. Naringenin (citrus flavonone) induces growth inhibition, cell cycle arrest and apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells. *Pathol Oncol Res.* 2013; 19(4): 763-70.
37. Yi LT, Liu BB, Li J, Luo L, Liu Q, Geng D, et al. BDNF signaling is necessary for the antidepressant-like effect of naringenin. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2014; 48: 135-41.
38. Alberca RW, Teixeira FME, Beserra DR, de Oliveira EA, Andrade MMS, Pietrobon AJ, et al. Perspective: the potential effects of naringenin in COVID-19. *Front Immunol.* 2020; 11: 570919.
39. Chang HL, Chang YM, Lai SC, Chen KM, Wang KC, Chiu TT, et al. Naringenin inhibits migration of lung cancer cells via the inhibition of matrix metalloproteinases-2 and -9. *Exp Ther Med.* 2017; 13(2): 739-44.
40. Fan R, Pan T, Zhu AL, Zhang MH. Anti-inflammatory and anti-arthritic properties of naringenin via attenuation of NF- $\kappa$ B and activation of the heme oxygenase (HO)-1/related factor 2 pathway. *Pharmacol Rep.* 2017; 69(5): 1021-9.
41. Oroian M, Escriche I. Antioxidants: characterization, natural sources, extraction and analysis. *Food Res Int.* 2015; 74: 10-36.
42. Bankova V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *J Ethnopharmacol.* 2005; 100(1-2): 114-7.
43. Brasil. Instituto Nacional de Câncer (INCA). ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer [acesso em 2021 nov 25]. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/livro-abc-6-edicao-2020.pdf>.
44. Doll R, Peto R. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J Natl Cancer Inst.* 1981; 66(6): 1191-308.
45. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2017. *CA Cancer J Clin.* 2017; 67(1): 7-30.
46. Warnakulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncol.* 2009; 45(4-5): 309-16.

47. Brasil. Ministério da Saúde. Cadernos de atenção básica: saúde bucal. Brasília: O Ministério; 2006. (n. 17).
48. Bosetti C, Gallus S, Garavello W, La Vecchia C. Smoking cessation and the risk of oesophageal cancer: an overview of published studies. *Oral Oncol.* 2006; 42(10): 957-64.
49. Petti S, Scully C. Oral cancer: the association between nation-based alcohol-drinking profiles and oral cancer mortality. *Oral Oncol.* 2005; 41(8): 828-34.
50. Van der Waal I, de Bree R. Second primary tumours in oral cancer. *Oral Oncol.* 2010; 46(6): 426-8.
51. Cohen N, Fedewa S, Chen AY. Epidemiology and demographics of the head and neck cancer population. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am.* 2018; 30(4): 381-95.
52. Epstein JB, Gorsky M, Cabay RJ, Day T, Gonsalves W. Screening for and diagnosis of oral premalignant lesions and oropharyngeal squamous cell carcinoma: role of primary care physicians. *Can Fam Physician.* 2008; 54(6): 870-5.
53. Warnakulasuriya S. Living with oral cancer: epidemiology with particular reference to prevalence and life-style changes that influence survival. *Oral Oncol.* 2010; 46(6): 407-10.
54. Costa EG, Migliorati CA. Cancer bucal: avaliação do tempo decorrente entre a detecção da lesão e o início do tratamento. *Rev Bras Cancerol.* 2001; 47(3): 283-9.
55. Montero PH, Patel SG. Cancer of the oral cavity. *Surg Oncol Clin N Am.* 2015; 24(3): 491-508.
56. Silveira A, Marques A, Pavão M, Monteiro E, Pereira G, Gonçalves J, et al. Oral cancer: health promotion and visual screening—a study report. *J Cancer Ther.* 2013; 4(8): 1313-20.
57. Lau A, Li KY, Yang WF, Su YX. Induction chemotherapy for squamous cell carcinomas of the oral cavity: A cumulative meta-analysis. *Oral Oncol.* 2016; 61: 104-14.
58. Cohen EE, LaMonte SJ, Erb NL, Beckman KL, Sadeghi N, Hutcheson KA, et al. American Cancer Society Head and Neck Cancer Survivorship Care Guideline. *CA Cancer J Clin.* 2016; 66(3):203-39.
59. Neville BW, Day TA. Oral cancer and precancerous lesions. *CA Cancer J Clin.* 2002; 52(4): 195-215.

60. Cardoso MFA, Novikoff S, Tresso A, Segreto RA, Cervantes O. Prevenção e controle das sequelas bucais em pacientes irradiados por tumores de cabeça e pescoço. *Radiol Bras.* 2005; 38(2): 107-15.
61. Epstein JB, Thariat J, Bensadoun RJ, Barasch A, Murphy BA, Kolnick L, et al. Oral complications of cancer and cancer therapy: from cancer treatment to survivorship. *CA Cancer J Clin.* 2012; 62(6): 400-22.
62. Zeller JL. High suicide risk found for patients with head and neck cancer. *JAMA.* 2006; 296(14): 1716-7.
63. Misono S, Weiss NS, Fann JR, Redman M, Yueh B. Incidence of suicide in persons with cancer. *J Clin Oncol.* 2008; 26(29): 4731-8.
64. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer statistics, 2021. *CA Cancer J Clin.* 2021; 71(1): 7-33.
65. Burki TK. Cancer guidelines during the COVID-19 pandemic. *Lancet Oncol.* 2020; 21(5): 629-30.
66. Haagen J, Krohn H, Röllig S, Schmidt M, Wolfram K, Dörr W. Effect of selective inhibitors of inflammation on oral mucositis: preclinical studies. *Radiother Oncol.* 2009; 92(3): 472-6.
67. Mallick S, Benson R, Rath GK. Radiation induced oral mucositis: a review of current literature on prevention and management. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2016; 273(9): 2285-93.
68. Vanhoecke B, De Ryck T, Stringer A, Van de Wiele T, Keefe D. Microbiota and their role in the pathogenesis of oral mucositis. *Oral Dis.* 2015; 21(1): 17-30.
69. Vasconcelos RM, Sanfilippo N, Paster BJ, Kerr AR, Li Y, Ramalho L, et al. Host-microbiome cross-talk in oral mucositis. *J Dent Res.* 2016; 95(7): 725-33.
70. Sonis ST. Treatment for oral mucositis-current options and an update of small molecules under development. *Curr Treat Options Oncol.* 2021; 22(3): 25.
71. Sonis ST, Elting LS, Keefe D, Peterson DE, Schubert M, Hauer-Jensen M, et al. Perspectives on cancer therapy-induced mucosal injury: pathogenesis, measurement, epidemiology, and consequences for patients. *Cancer.* 2004; 100(9 Suppl): 1995-2025.
72. Sonis ST. Oral mucositis. *Anticancer Drugs.* 2011; 22(7): 607-12.
73. Cui N, Hu M, Khalil RA. Biochemical and biological attributes of matrix metalloproteinases. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2017; 147: 1-73.
74. Franco C, Patricia HR, Timo S, Claudia B, Marcela H. Matrix metalloproteinases as regulators of periodontal inflammation. *Int J Mol Sci.* 2017; 18(2): 440.

75. Al-Azri AR, Gibson RJ, Keefe DM, Logan RM. Matrix metalloproteinases: do they play a role in mucosal pathology of the oral cavity? *Oral Dis*. 2013; 19(4): 347-59.
76. Pender SL, MacDonald TT. Matrix metalloproteinases and the gut - new roles for old enzymes. *Curr Opin Pharmacol*. 2004; 4(6): 546-50.
77. Kandasamy AD, Chow AK, Ali MA, Schulz R. Matrix metalloproteinase-2 and myocardial oxidative stress injury: beyond the matrix. *Cardiovasc Res*. 2010; 85(3): 413-23.
78. Vanhoutte D, Heymans S. TIMPs and cardiac remodeling: 'Embracing the MMP-independent-side of the family'. *J Mol Cell Cardiol*. 2010; 48(3): 445-53.
79. Ejeil AL, Igondjo-Tchen S, Ghomrasseni S, Pellat B, Godeau G, Gogly B. Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) in healthy and diseased human gingiva. *J Periodontol*. 2003; 74(2): 188-95.
80. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res*. 2003; 92(8): 827-39.
81. Stamenkovic I. Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases. *J Pathol*. 2003; 200(4): 448-64.
82. Sonis ST, Costa JW Jr, Evitts SM, Lindquist LE, Nicolson M. Effect of epidermal growth factor on ulcerative mucositis in hamsters that receive cancer chemotherapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1992; 74(6): 749-55.
83. Potting CM, Blijlevens NA, Donnelly JP, Feuth T, Van Achterberg T. A scoring system for the assessment of oral mucositis in daily nursing practice. *Eur J Cancer Care (Engl)*. 2006; 15(3): 228-34.
84. Yucel-Lindberg T, Båge T. Inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontitis. *Expert Rev Mol Med*. 2013; 15: e7.
85. Nazar Majeed Z, Philip K, Alabsi AM, Pushparajan S, Swaminathan D. Identification of gingival crevicular fluid sampling, analytical methods, and oral biomarkers for the diagnosis and monitoring of periodontal diseases: a systematic review. *Dis Markers*. 2016; 2016: 1804727.
86. Guo S, Dipietro LA. Factors affecting wound healing. *J Dent Res*. 2010; 89(3): 219-29.
87. Lima V, Brito GA, Cunha FQ, Rebouças CG, Falcão BA, Augusto RF, et al. Effects of the tumour necrosis factor-alpha inhibitors pentoxifylline and thalidomide in short-term experimental oral mucositis in hamsters. *Eur J Oral Sci*. 2005; 113(3): 210-7.

88. Riley P, Glenny AM, Worthington HV, Littlewood A, Fernandez Mauleffinch LM, Clarkson JE, et al. Interventions for preventing oral mucositis in patients with cancer receiving treatment: cytokines and growth factors. *Cochrane Database Syst Rev.* 2017; 11(11): CD011990.
89. Werner S, Krieg T, Smola H. Keratinocyte-fibroblast interactions in wound healing. *J Invest Dermatol.* 2007; 127(5): 998-1008.
90. Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen.* 2008; 16(5): 585-601.
91. Glim JE, van Egmond M, Niessen FB, Everts V, Beelen RH. Detrimental dermal wound healing: what can we learn from the oral mucosa? *Wound Repair Regen.* 2013; 21(5): 648-60.
92. Häkkinen L, Uitto VJ, Larjava H. Cell biology of gingival wound healing. *Periodontol 2000.* 2000; 24: 127-52.
93. Li J, Chen J, Kirsner R. Pathophysiology of acute wound healing. *Clin Dermatol.* 2007; 25(1): 9-18.
94. Abramoff MM, Lopes NN, Lopes LA, Dib LL, Guilherme A, Caran EM, et al. Low-level laser therapy in the prevention and treatment of chemotherapy-induced oral mucositis in young patients. *Photomed Laser Surg.* 2008; 26(4): 393-400.
95. Elad S, Cheng KKF, Lalla RV, Yarom N, Hong C, Logan RM, et al. MASCC/ISOO clinical practice guidelines for the management of mucositis secondary to cancer therapy. *Cancer.* 2020; 126(19): 4423-31.
96. Elad S, Arany P, Bensadoun RJ, Epstein JB, Barasch A, Raber-Durlacher J. Photobiomodulation therapy in the management of oral mucositis: search for the optimal clinical treatment parameters. *Support Care Cancer.* 2018; 26(10): 3319-21.
97. Cardoso LM, Pansani TN, Hebling J, de Souza Costa CA, Basso FG. Chemotherapy drugs and inflammatory cytokines enhance matrix metalloproteinases expression by oral mucosa cells. *Arch Oral Biol.* 2021; 127: 105159.
98. Bensadoun RJ, Nair RG. Low-level laser therapy in the prevention and treatment of cancer therapy-induced mucositis: 2012 state of the art based on literature review and meta-analysis. *Curr Opin Oncol.* 2012; 24(4): 363-70.
99. Ciais G, Namer M, Schneider M, Demard F, Pourreau-Schneider N, Martin PM, et al. La laserthérapie dans la prévention et le traitement des mucites liées à la chimiothérapie anticancéreuse. *Bull Cancer.* 1992; 79(2): 183-91.

100. Barasch A, Peterson DE, Tanzer JM, D'Ambrosio JA, Nuki K, Schubert MM, et al. Helium-neon laser effects on conditioning-induced oral mucositis in bone marrow transplantation patients. *Cancer*. 1995; 76(12): 2550-6.
101. Cowen D, Tardieu C, Schubert M, Peterson D, Resbeut M, Faucher C, et al. Low energy Helium-Neon laser in the prevention of oral mucositis in patients undergoing bone marrow transplant: results of a double blind randomized trial. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1997; 38(4): 697-703.
102. Bensadoun RJ, Franquin JC, Ciais G, Darcourt V, Schubert MM, Viot M, et al. Low-energy He/Ne laser in the prevention of radiation-induced mucositis. A multicenter phase III randomized study in patients with head and neck cancer. *Support Care Cancer*. 1999; 7(4): 244-52.
103. Wong SF, Wilder-Smith P. Pilot study of laser effects on oral mucositis in patients receiving chemotherapy. *Cancer J*. 2002; 8(3): 247-54.
104. Sandoval RL, Koga DH, Buloto LS, Suzuki R, Dib LL. Management of chemo- and radiotherapy induced oral mucositis with low-energy laser: initial results of A.C. Camargo Hospital. *J Appl Oral Sci*. 2003; 11(4): 337-41.
105. Antunes HS, de Azevedo AM, da Silva Bouzas LF, Adão CA, Pinheiro CT, Mayhe R, et al. Low-power laser in the prevention of induced oral mucositis in bone marrow transplantation patients: a randomized trial. *Blood*. 2007; 109(5): 2250-5.
106. Jaguar GC, Prado JD, Nishimoto IN, Pinheiro MC, de Castro DO Jr, da Cruz Perez DE, et al. Low-energy laser therapy for prevention of oral mucositis in hematopoietic stem cell transplantation. *Oral Dis*. 2007; 13(6): 538-43.
107. Arora H, Pai KM, Maiya A, Vidyasagar MS, Rajeev A. Efficacy of He-Ne Laser in the prevention and treatment of radiotherapy-induced oral mucositis in oral cancer patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2008; 105(2): 180-6, 186.e1.
108. Genot-Klastersky MT, Klastersky J, Awada F, Awada A, Crombez P, Martinez MD, et al. The use of low-energy laser (LEL) for the prevention of chemotherapy- and/or radiotherapy-induced oral mucositis in cancer patients: results from two prospective studies. *Support Care Cancer*. 2008; 16(12): 1381-7.
109. Lalla RV, Bowen J, Barasch A, Elting L, Epstein J, Keefe DM, et al. MASCC/ISOO clinical practice guidelines for the management of mucositis secondary to cancer therapy. *Cancer*. 2014; 120(10): 1453-61.
110. Rubenstein EB, Peterson DE, Schubert M, Keefe D, McGuire D, Epstein J, et al. Clinical practice guidelines for the prevention and treatment of cancer therapy-induced oral and gastrointestinal mucositis. *Cancer*. 2004; 100(9 Suppl): 2026-46.

111. Keefe DM, Schubert MM, Elting LS, Sonis ST, Epstein JB, Raber-Durlacher JE, et al. Updated clinical practice guidelines for the prevention and treatment of mucositis. *Cancer*. 2007; 109(5):820-31.
112. Brasil. Conselho Federal de Odontologia (CFO). Resolução CFO-82, de 25 de setembro de 2008. [acesso em 2021 nov 25]. Disponível em: <https://sistemas.cfo.org.br/visualizar/atos/RESOLUÇÃO/SEC/2008/82>.
113. Eduardo FP, Bezinelli L, Luiz AC, Correa L, Vogel C, Eduardo CP. Severity of oral mucositis in patients undergoing hematopoietic cell transplantation and an oral laser phototherapy protocol: a survey of 30 patients. *Photomed Laser Surg*. 2009; 27(1): 137-44.
114. Khouri VY, Stracieri AB, Rodrigues MC, Moraes DA, Pieroni F, Simões BP, et al. Use of therapeutic laser for prevention and treatment of oral mucositis. *Braz Dent J*. 2009; 20(3): 215-20.
115. Zanin T, Zanin F, Carvalhosa AA, Castro PH, Pacheco MT, Zanin IC, et al. Use of 660-nm diode laser in the prevention and treatment of human oral mucositis induced by radiotherapy and chemotherapy. *Photomed Laser Surg*. 2010; 28(2): 233-7.
116. Gautam AP, Fernandes DJ, Vidyasagar MS, Maiya AG, Vadhiraaja BM. Low level laser therapy for concurrent chemoradiotherapy induced oral mucositis in head and neck cancer patients - a triple blinded randomized controlled trial. *Radiother Oncol*. 2012; 104(3): 349-54.
117. Kuhn A, Porto FA, Miraglia P, Brunetto AL. Low-level infrared laser therapy in chemotherapy-induced oral mucositis: a randomized placebo-controlled trial in children. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2009; 31(1): 33-7.
118. Antunes HS, Herchenhorn D, Small IA, Araújo CM, Viégas CM, Cabral E, et al. Phase III trial of low-level laser therapy to prevent oral mucositis in head and neck cancer patients treated with concurrent chemoradiation. *Radiother Oncol*. 2013; 109(2): 297-302.
119. Carvalho PA, Jaguar GC, Pellizzon AC, Prado JD, Lopes RN, Alves FA. Evaluation of low-level laser therapy in the prevention and treatment of radiation-induced mucositis: a double-blind randomized study in head and neck cancer patients. *Oral Oncol*. 2011; 47(12): 1176-81.
120. Migliorati C, Hewson I, Lalla RV, Antunes HS, Estilo CL, Hodgson B, et al. Systematic review of laser and other light therapy for the management of oral mucositis in cancer patients. *Support Care Cancer*. 2013; 21(1): 333-41.
121. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria N° 516, de 17 de junho de 2015. [acesso em 2021 nov 23]. Disponível em: [https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/sas/2015/prt0516\\_17\\_06\\_2015.html](https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/sas/2015/prt0516_17_06_2015.html).

122. Brasil. Agência Nacional de Saúde Suplementar (ANS). Rol de procedimentos e eventos em saúde 2015 [recurso eletrônico]. Agência Nacional de Saúde Suplementar. – Rio de Janeiro: ANS, 2015 [acesso em 2021 nov 23]. Disponível em: [https://www.in.gov.br/materia//asset\\_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/33295504/do1-2015-10-29-resolucao-normativa-rn-n-387-de-28-de-outubro-de-2015-33295485](https://www.in.gov.br/materia//asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/33295504/do1-2015-10-29-resolucao-normativa-rn-n-387-de-28-de-outubro-de-2015-33295485).
123. Brasil. Agência Nacional de Saúde Suplementar (ANS). Rol de procedimentos e eventos em saúde 2021 [recurso eletrônico]. Agência Nacional de Saúde Suplementar. – Rio de Janeiro: ANS, 2021. [acesso em 2021 nov 23] Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/resolucao-normativa-rn-n-465-de-24-de-fevereiro-de-2021-306209339>.
124. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria Nº 526, de 24 de junho de 2020. [acesso em 2021 nov 23]. Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/portaria-n-526-de-24-de-junho-de-2020-264666631>.
125. Simões A, Eduardo FP, Luiz AC, Campos L, Sá PH, Cristóforo M, et al. Laser phototherapy as topical prophylaxis against head and neck cancer radiotherapy-induced oral mucositis: comparison between low and high/low power lasers. *Lasers Surg Med*. 2009; 41(4): 264-70.
126. Moraes JJC, Queiroga AS, De Biase RCCG, Leite EP, Cabral Junior CR, Limeira Junior FA. The effect of low level laser therapy in different wavelengths in the treatment of oral mucositis— proposal for extra-oral implementation. *Laser Phys*. 2009; 19: 1–8.
127. Yarom N, Hovan A, Bossi P, Ariyawardana A, Jensen SB, Gobbo M, et al. Systematic review of natural and miscellaneous agents for the management of oral mucositis in cancer patients and clinical practice guidelines-part 1: vitamins, minerals, and nutritional supplements. *Support Care Cancer*. 2019; 27(10): 3997-4010.
128. Yarom N, Hovan A, Bossi P, Ariyawardana A, Jensen SB, Gobbo M, et al. Systematic review of natural and miscellaneous agents, for the management of oral mucositis in cancer patients and clinical practice guidelines - part 2: honey, herbal compounds, saliva stimulants, probiotics, and miscellaneous agents. *Support Care Cancer*. 2020; 28(5): 2457-72.
129. Zadik Y, Arany PR, Fregnani ER, Bossi P, Antunes HS, Bensadoun RJ, et al. Systematic review of photobiomodulation for the management of oral mucositis in cancer patients and clinical practice guidelines. *Support Care Cancer*. 2019; 27(10): 3969-83.
130. de Pauli Paglioni M, Araújo ALD, Arboleda LPA, Palmier NR, Fonsêca JM, Gomes-Silva W, et al. Tumor safety and side effects of photobiomodulation therapy used for prevention and management of cancer treatment toxicities. A systematic review. *Oral Oncol*. 2019; 93: 21-8.

131. Sonis ST, Hashemi S, Epstein JB, Nair RG, Raber-Durlacher JE. Could the biological robustness of low level laser therapy (Photobiomodulation) impact its use in the management of mucositis in head and neck cancer patients. *Oral Oncol.* 2016; 54: 7-14.
132. Brandão TB, Morais-Faria K, Ribeiro ACP, Rivera C, Salvajoli JV, Lopes MA, et al. Locally advanced oral squamous cell carcinoma patients treated with photobiomodulation for prevention of oral mucositis: retrospective outcomes and safety analyses. *Support Care Cancer.* 2018; 26(7): 2417-23.
133. Hamblin MR. Mechanisms and mitochondrial redox signaling in photobiomodulation. *Photochem Photobiol.* 2018; 94(2): 199-212.
134. Karu TI. Mitochondrial signaling in mammalian cells activated by red and near-IR radiation. *Photochem Photobiol.* 2008; 84(5): 1091-9.
135. Sommer AP, Pinheiro AL, Mester AR, Franke RP, Whelan HT. Biostimulatory windows in low-intensity laser activation: lasers, scanners, and NASA's light-emitting diode array system. *J Clin Laser Med Surg.* 2001; 19(1): 29-33.
136. Hawkins DH, Abrahamse H. The role of laser fluence in cell viability, proliferation, and membrane integrity of wounded human skin fibroblasts following helium-neon laser irradiation. *Lasers Surg Med.* 2006; 38(1): 74-83.
137. Ankri R, Lubart R, Taitelbaum H. Estimation of the optimal wavelengths for laser-induced wound healing. *Lasers Surg Med.* 2010; 42(8): 760-4.
138. Houreld NN, Sekhejane PR, Abrahamse H. Irradiation at 830 nm stimulates nitric oxide production and inhibits pro-inflammatory cytokines in diabetic wounded fibroblast cells. *Lasers Surg Med.* 2010; 42(6): 494-502.
139. Wagner VP, Meurer L, Martins MA, Danilevicz CK, Magnusson AS, Marques MM, et al. Influence of different energy densities of laser phototherapy on oral wound healing. *J Biomed Opt.* 2013; 18(12): 128002.
140. Kuffler DP. Photobiomodulation in promoting wound healing: a review. *Regen Med.* 2016; 11(1): 107-22.
141. Damante CA, De Micheli G, Miyagi SP, Feist IS, Marques MM. Effect of laser phototherapy on the release of fibroblast growth factors by human gingival fibroblasts. *Lasers Med Sci.* 2009; 24(6): 885-91.
142. Gao X, Xing D. Molecular mechanisms of cell proliferation induced by low power laser irradiation. *J Biomed Sci.* 2009; 16(1): 4.
143. Marques MM, Pereira AN, Fujihara NA, Nogueira FN, Eduardo CP. Effect of low-power laser irradiation on protein synthesis and ultrastructure of human gingival fibroblasts. *Lasers Surg Med.* 2004; 34(3): 260-5.

144. Posten W, Wrone DA, Dover JS, Arndt KA, Silapunt S, Alam M. Low-level laser therapy for wound healing: mechanism and efficacy. *Dermatol Surg.* 2005; 31(3): 334-40.
145. Gavish L, Perez LS, Reissman P, Gertz SD. Irradiation with 780 nm diode laser attenuates inflammatory cytokines but upregulates nitric oxide in lipopolysaccharide-stimulated macrophages: implications for the prevention of aneurysm progression. *Lasers Surg Med.* 2008; 40(5): 371-8.
146. Kreisler M, Christoffers AB, Al-Haj H, Willershausen B, d'Hoedt B. Low level 809-nm diode laser-induced in vitro stimulation of the proliferation of human gingival fibroblasts. *Lasers Surg Med.* 2002; 30(5): 365-9.
147. Frigo L, Fávero GM, Lima HJ, Maria DA, Bjordal JM, Joensen J, et al. Low-level laser irradiation (InGaAlP-660 nm) increases fibroblast cell proliferation and reduces cell death in a dose-dependent manner. *Photomed Laser Surg.* 2010; 28 Suppl 1: S151-6.
148. AlGhamdi KM, Kumar A, Moussa NA. Low-level laser therapy: a useful technique for enhancing the proliferation of various cultured cells. *Lasers Med Sci.* 2012; 27(1): 237-49.
149. Aparecida Da Silva A, Leal-Junior EC, Alves AC, Rambo CS, Dos Santos SA, Vieira RP, et al. Wound-healing effects of low-level laser therapy in diabetic rats involve the modulation of MMP-2 and MMP-9 and the redistribution of collagen types I and III. *J Cosmet Laser Ther.* 2013; 15(4): 210-6.
150. Alves AC, Albertini R, dos Santos SA, Leal-Junior EC, Santana E, Serra AJ, et al. Effect of low-level laser therapy on metalloproteinase MMP-2 and MMP-9 production and percentage of collagen types I and III in a papain cartilage injury model. *Lasers Med Sci.* 2014; 29(3): 911-9.
151. Lemos GA, Rissi R, de Souza Pires IL, de Oliveira LP, de Aro AA, Pimentel ER, et al. Low-level laser therapy stimulates tissue repair and reduces the extracellular matrix degradation in rats with induced arthritis in the temporomandibular joint. *Lasers Med Sci.* 2016; 31(6): 1051-9.
152. de Medeiros ML, Araújo-Filho I, da Silva EM, de Sousa Queiroz WS, Soares CD, de Carvalho MG, et al. Effect of low-level laser therapy on angiogenesis and matrix metalloproteinase-2 immunoexpression in wound repair. *Lasers Med Sci.* 2017; 32(1): 35-43.
153. Basso FG, Pansani TN, Turrioni AP, Bagnato VS, Hebling J, de Souza Costa CA. In vitro wound healing improvement by low-level laser therapy application in cultured gingival fibroblasts. *Int J Dent.* 2012; 2012: 719452.
154. Basso FG, Pansani TN, Soares DG, Scheffel DL, Bagnato VS, de Souza Costa CA, et al. Biomodulation of inflammatory cytokines related to oral mucositis by low-level laser therapy. *Photochem Photobiol.* 2015; 91(4): 952-6.

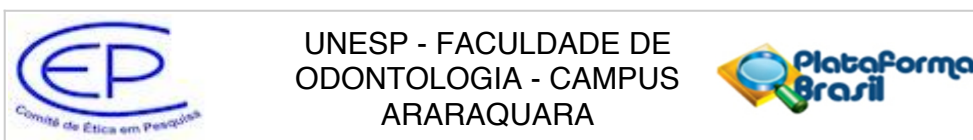
155. Pansani TN, Basso FG, Turrioni AP, Soares DG, Hebling J, de Souza Costa CA. Effects of low-level laser therapy and epidermal growth factor on the activities of gingival fibroblasts obtained from young or elderly individuals. *Lasers Med Sci.* 2017; 32(1): 45-52.
156. Basso FG, Pansani TN, Cardoso LM, Citta M, Soares DG, Scheffel DS, et al. Epithelial cell-enhanced metabolism by low-level laser therapy and epidermal growth factor. *Lasers Med Sci.* 2018; 33(2): 445-9.
157. Basso FG, Pansani TN, Soares DG, Hebling J, de Souza Costa CA. LLLT effects on oral keratinocytes in an organotypic 3D model. *Photochem Photobiol.* 2018; 94(1): 190-4.
158. Pansani TN, Basso FG, Soares DG, Turrioni APDS, Hebling J, de Souza Costa CA. Photobiomodulation in the metabolism of lipopolysaccharides-exposed epithelial cells and gingival fibroblasts. *Photochem Photobiol.* 2018; 94(3): 598-603.
159. Cardoso LM, Pansani TN, Hebling J, de Souza Costa CA, Basso FG. Photobiomodulation of inflammatory-cytokine-related effects in a 3-D culture model with gingival fibroblasts. *Lasers Med Sci.* 2020; 35(5): 1205-12.
160. Rech CA, Pansani TN, Cardoso LM, Ribeiro IM, Silva-Sousa YTC, de Souza Costa CA, et al. Photobiomodulation using LLLT and LED of cells involved in osseointegration and peri-implant soft tissue healing. *Lasers Med Sci.* 2022; 37(1): 573-80.
161. El Mobadder M, Farhat F, El Mobadder W, Nammour S. Photobiomodulation therapy in the treatment of oral mucositis, dysphagia, oral dryness, taste alteration, and burning mouth sensation due to cancer therapy: a case series. *Int J Environ Res Public Health.* 2019; 16(22): 4505.
162. Zhang QY, Wang FX, Jia KK, Kong LD. Natural product interventions for chemotherapy and radiotherapy-induced side effects. *Front Pharmacol.* 2018; 9: 1253.
163. Sanders K, Moran Z, Shi Z, Paul R, Greenlee H. Natural products for cancer prevention: clinical update 2016. *Semin Oncol Nurs.* 2016; 32(3): 215-40.
164. Souza Almeida JC, Melazzo MM. Produtos naturais no tratamento da mucosite oral: revisão narrativa da literatura [Trabalho de Conclusão de Curso de Odontologia]. Uberaba: Uniube; 2021. Disponível em: <http://dspace.uniube.br:8080/jspui/handle/123456789/1490>.
165. Bagchi D, Bagchi M, Stohs Sj, Ray SD, Sen CK, Preuss HG. Cellular protection with proanthocyanidins derived from grape seeds. *Ann N Y Acad Sci.* 2002; 957: 260-70.

166. Bagchi D, Bagchi M, Stohs SJ, Das DK, Ray SD, Kuszynski CA, et al. Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention. *Toxicology*. 2000; 148(2-3): 187-97.
167. Bagchi D, Sen CK, Ray SD, Das DK, Bagchi M, Preuss HG, et al. Molecular mechanisms of cardioprotection by a novel grape seed proanthocyanidin extract. *Mutat Res*. 2003; 523-524: 87-97.
168. Villas Boas SB, Sousa LS, Cardoso LM, Tavella-Silva NC, de Souza Costa CA, Basso FG. Grape seed extract down-modulates oxidative and inflammatory responses of oral mucosa cells. *J Int Acad Periodontol*. 2021; 23(3): 301–7.
169. Olaitan PB, Adeleke OE, Ola IO. Honey: a reservoir for microorganisms and an inhibitory agent for microbes. *Afr Health Sci*. 2007; 7(3): 159-65.
170. de la Iglesia R, Milagro FI, Campión J, Boqué N, Martínez JA. Healthy properties of proanthocyanidins. *Biofactors*. 2010; 36(3): 159-68.
171. Raza SS, Khan MM, Ahmad A, Ashafaq M, Islam F, Wagner AP, et al. Neuroprotective effect of naringenin is mediated through suppression of NF- $\kappa$ B signaling pathway in experimental stroke. *Neuroscience*. 2013; 230: 157-71.
172. Tutunchi H, Naeini F, Ostadrahimi A, Hosseinzadeh-Attar MJ. Naringenin, a flavanone with antiviral and anti-inflammatory effects: a promising treatment strategy against COVID-19. *Phytother Res*. 2020; 34(12): 3137-47.
173. Clementi N, Scagnolari C, D'Amore A, Palombi F, Criscuolo E, Frasca F, et al. Naringenin is a powerful inhibitor of SARS-CoV-2 infection in vitro. *Pharmacol Res*. 2021; 163: 105255.
174. Grimm C, Tang R. Could an endo-lysosomal ion channel be the Achilles heel of SARS-CoV2? *Cell Calcium*. 2020; 88: 102212.
175. Ou X, Liu Y, Lei X, Li P, Mi D, Ren L, et al. Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV. *Nat Commun*. 2020; 11(1): 1620.
176. Vassileva K, Marsh M, Patel S. Two-pore channels as master regulators of membrane trafficking and endocytic well-being. *Curr Opin Physiol*. 2020; 17: 163-8.
177. Jin L, Zeng W, Zhang F, Zhang C, Liang W. Naringenin ameliorates acute inflammation by regulating intracellular cytokine degradation. *J Immunol*. 2017; 199(10): 3466-77.
178. Zeng W, Jin L, Zhang F, Zhang C, Liang W. Naringenin as a potential immunomodulator in therapeutics. *Pharmacol Res*. 2018; 135: 122-6.

179. Kapoor R, Sirohi VK, Gupta K, Dwivedi A. Naringenin ameliorates progression of endometriosis by modulating Nrf2/Keap1/HO1 axis and inducing apoptosis in rats. *J Nutr Biochem*. 2019; 70: 215-26.
180. Singh P, Bansal S, Kuhad A, Kumar A, Chopra K. Naringenin ameliorates diabetic neuropathic pain by modulation of oxidative-nitrosative stress, cytokines and MMP-9 levels. *Food Funct*. 2020; 11(5): 4548-60.
181. Chen YY, Chang YM, Wang KY, Chen PN, Hseu YC, Chen KM, et al. Naringenin inhibited migration and invasion of glioblastoma cells through multiple mechanisms. *Environ Toxicol*. 2019; 34(3): 233-9.
182. Liao AC, Kuo CC, Huang YC, Yeh CW, Hseu YC, Liu JY, et al. Naringenin inhibits migration of bladder cancer cells through downregulation of AKT and MMP-2. *Mol Med Rep*. 2014; 10(3): 1531-6.
183. Xu Z, Huang B, Liu J, Wu X, Luo N, Wang X, et al. Combinatorial anti-proliferative effects of tamoxifen and naringenin: the role of four estrogen receptor subtypes. *Toxicology*. 2018; 410: 231-46.
184. Shi X, Luo X, Chen T, Guo W, Liang C, Tang S, et al. Naringenin inhibits migration, invasion, induces apoptosis in human lung cancer cells and arrests tumour progression in vitro. *J Cell Mol Med*. 2021; 25(5): 2563-71.
185. Hernández-Aquino E, Zarco N, Casas-Grajales S, Ramos-Tovar E, Flores-Beltrán RE, Arauz J, et al. Naringenin prevents experimental liver fibrosis by blocking TGF $\beta$ -Smad3 and JNK-Smad3 pathways. *World J Gastroenterol*. 2017; 23(24): 4354-68.
186. Bai Y, Peng W, Yang C, Zou W, Liu M, Wu H, et al. Pharmacokinetics and metabolism of naringin and active metabolite naringenin in rats, dogs, humans, and the differences between species. *Front Pharmacol*. 2020; 11: 364.
187. Rebello CJ, Beyl RA, Lertora JLL, Greenway FL, Ravussin E, Ribnicky DM, et al. Safety and pharmacokinetics of naringenin: a randomized, controlled, single-ascending-dose clinical trial. *Diabetes Obes Metab*. 2020; 22(1): 91-8.
188. Salehi B, Fokou PVT, Sharifi-Rad M, Zucca P, Pezzani R, Martins N, et al. The therapeutic potential of naringenin: a review of clinical trials. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2019; 12(1): 11.
189. Freshney RI. *Culture of animal cells: a manual of basic technique*. 6th ed. New York: Wiley-Blackwell; 2010.
190. Lins EC, Oliveira CF, Guimarães OC, Costa CA, Kurachi C, Bagnato VS. A novel 785-nm laser diode-based system for standardization of cell culture irradiation. *Photomed Laser Surg*. 2013; 31(10): 466-73.

191. Basso FG, Pansani TN, de Oliveira CF, Turrioni AP, Soares DG, Hebling J, et al. Cytotoxic effects of zoledronic acid on human epithelial cells and gingival fibroblasts. *Braz Dent J.* 2013; 24(6): 551-8.
192. Cardoso LM, Pansani TN, de Souza Costa CA, Basso FG. Regulation of interleukin-6 and matrix metalloproteinases syntheses by bioflavonoids and photobiomodulation in human gingival fibroblasts. *Lasers Med Sci.* 2022; May 25. doi: 10.1007/s10103-022-03579-z. Epub ahead of print. PMID: 35612681.
193. Basso FG, Cardoso LM, Ribeiro IM, Rizzi E, Pansani TN, Hebling J, et al. Influence of bisphosphonates on oral implantology: sodium alendronate and zoledronic acid enhance the synthesis and activity of matrix metalloproteinases by gingival fibroblasts seeded on titanium. *Arch Oral Biol.* 2021; 127: 105134.
194. Sorsa T, Tjäderhane L, Salo T. Matrix metalloproteinases (MMPs) in oral diseases. *Oral Dis.* 2004; 10(6): 311-8.
195. Mengshol JA, Vincenti MP, Coon CI, Barchowsky A, Brinckerhoff CE. Interleukin-1 induction of collagenase 3 (matrix metalloproteinase 13) gene expression in chondrocytes requires p38, c-Jun N-terminal kinase, and nuclear factor kappaB: differential regulation of collagenase 1 and collagenase 3. *Arthritis Rheum.* 2000; 43(4): 801-11.
196. Tak PP, Firestein GS. NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest.* 2001; 107(1): 7-11.
197. Vincenti MP, Brinckerhoff CE. Transcriptional regulation of collagenase (MMP-1, MMP-13) genes in arthritis: integration of complex signaling pathways for the recruitment of gene-specific transcription factors. *Arthritis Res.* 2002; 4(3): 157-64.
198. Masson-Meyers DS, Andrade TAM, Caetano GF, Guimaraes FR, Leite MN, Leite SN, et al. Experimental models and methods for cutaneous wound healing assessment. *Int J Exp Pathol.* 2020; 101(1-2): 21-37.
199. de Souza Costa CA, Hebling J, Scheffel DL, Soares DG, Basso FG, Ribeiro AP. Methods to evaluate and strategies to improve the biocompatibility of dental materials and operative techniques. *Dent Mater.* 2014; 30(7): 769-84.
200. Jensen C, Teng Y. Is it time to start transitioning from 2D to 3D cell culture? *Front Mol Biosci.* 2020; 7: 33.
201. Moharamzadeh K, Colley H, Murdoch C, Hearnden V, Chai WL, Brook IM, et al. Tissue-engineered oral mucosa. *J Dent Res.* 2012; 91(7): 642-50.

## ANEXO A – CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DA EMENDA

**Título da Pesquisa:** MUCOSITE ORAL: PARTICIPAÇÃO DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS E METALOPROTEINASES NA ETIOPATOGENESE E MODULAÇÃO POR SOLUÇÕES DE PROANTOCIANIDINA E NARINGENINA E LASERTERAPIA DE BAIXA

**Pesquisador:** Carlos Alberto de Souza Costa

**Área Temática:**

**Versão:** 8

**CAAE:** 74823317.0.0000.5416

**Instituição Proponente:** Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 5.462.156

#### Apresentação do Projeto:

Trata-se da apresentação de emenda acompanhada de relatório parcial cujo resumo inicial constava: "A mucosite é um dos principais efeitos adversos do tratamento oncológico e apresenta influência significativa na morbidade e qualidade de vida dos pacientes submetidos a este tipo de tratamento. A etiopatogenia desta condição vem sendo relacionada não só a toxicidade direta dos quimioterápicos e radiação ionizante, mas também a uma ativação exacerbada da resposta inflamatória dos tecidos. Recentemente, o desenvolvimento e a severidade da mucosite oral também tem sido relacionada a expressão exacerbada de metaloproteinases da matriz (MMPs), as quais desorganizam os tecidos epitelial e conjuntivo, resultando em atraso do processo de reparo. O manejo da mucosite oral tem sido baseado na utilização de agentes analgésicos tópicos, antibióticos e antifúngicos, bem como na aplicação da laserterapia de baixa intensidade (LBI). A LBI apresenta resultados positivos sobre as lesões de mucosite oral, porém, esta modalidade terapêutica requer a utilização de um equipamento de custo moderado e deve ser feito sob supervisão. Desta forma, novas estratégias preventivas e terapêuticas, que possam atuar na modulação da resposta inflamatória e da expressão de MMPs para diminuir a incidência e a severidade das lesões de mucosite oral e também acelerar o processo de reparo tem sido propostas. Estudos recentes demonstraram a efetividade de compostos naturais, como as antocianinas, na redução da incidência e severidade destas lesões. Desta maneira, o objetivo desta

**Endereço:** HUMAITA 1680, SALA 512

**Bairro:** CENTRO

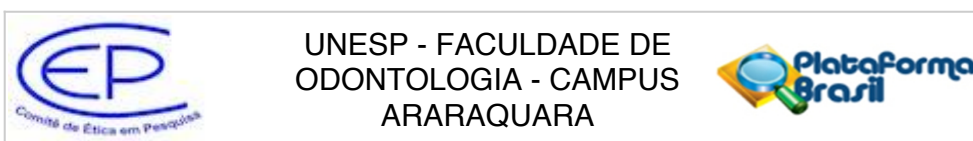
**CEP:** 14.801-903

**UF:** SP

**Município:** ARARAQUARA

**Telefone:** (16)3301-6459

**E-mail:** cep@foar.unesp.br



Continuação do Parecer: 5.462.156

pesquisa in vitro é avaliar comparativamente os efeitos da proantocianidina (PA) extraída de sementes de uva e da LBI como agentes antioxidantes e moduladores da síntese de citocinas inflamatórias e de MMPs. Serão utilizadas células da mucosa oral obtidas de 1 indivíduo jovem e saudável, por meio de dissociação enzimática. Na primeira etapa do projeto, estas células serão cultivadas em meio de cultura completo por 24 horas, seguido da aplicação dos quimioterápicos e citocinas inflamatórias. Após os períodos de 3, 6, 12 e 24 horas serão avaliadas a expressão e síntese de citocinas e MMPs por meio de PCR em Tempo Real e ELISA, respectivamente. Na segunda etapa serão avaliadas a cito e genotoxicidade das soluções contendo PA sobre as células da mucosa oral, por meio do ensaio de MTT e Cometa, respectivamente. Após a seleção das concentrações não cito/genotóxicas, estas serão avaliadas quanto a sua atividade antioxidante, antiinflamatória e inibitória sobre MMPs, por meio da detecção de espécies reativas de oxigênio, PCR e ELISA. Os dados serão avaliados estatisticamente por meio de testes paramétricos ou não-paramétricos, selecionados a partir da análise da distribuição normal destes dados. Após esta primeira etapa, os fibroblastos serão submetidos a uma associação das terapias com PA e também com a naringenina (NA), um inibidor de MMPs de origem sintética, e à LBI, para determinar os efeitos sinérgicos destas terapias. Para tanto, as mesmas células isoladas para o objetivo primário serão cultivadas em placas de 24 compartimentos e submetidas ao estímulo com TNF-alfa. A seguir, serão aplicadas as soluções de NA e PA, seguido da aplicação da LBI. Após 24 horas, serão determinadas a síntese e atividade de MMPs."

#### **Objetivo da Pesquisa:**

##### **Objetivo Primário:**

Avaliar a participação das metaloproteinases no desenvolvimento e gravidade da mucosite oral, utilizando para isto modelos de estudo in vitro. Determinar o efeito da proantocianidina (PA) e da naringenina (NA) e também da laserterapia de baixa intensidade (LBI) como reguladores da resposta inflamatória de células da mucosa oral, e como inibidores da atividade de metaloproteinases diretamente envolvidas no desenvolvimento das lesões de mucosite oral. Avaliar o potencial sinérgico da aplicação da LBI e da naringenina na modulação da síntese e atividade de metaloproteinases da matriz por fibroblastos gengivais, bem como sobre funções celulares relacionadas ao processo de reparo tecidual.

##### **Objetivo Secundário:**

Subprojeto 1. Estabelecimento de modelo in vitro para avaliação do efeito de quimioterápicos e citocinas inflamatórias sobre a expressão, síntese e atividade de metaloproteinases por fibroblastos de gengiva e queratinócitos orais; Avaliar, in vitro, a citotoxicidade e genotoxicidade

**Endereço:** HUMAITA 1680, SALA 512

**Bairro:** CENTRO

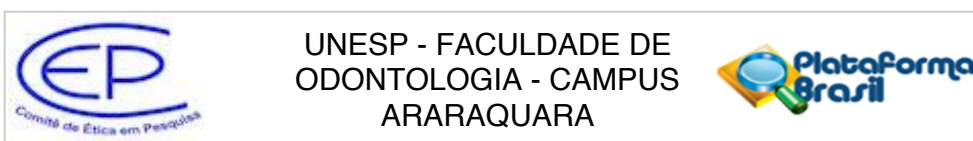
**UF:** SP

**Município:** ARARAQUARA

**Telefone:** (16)3301-6459

**CEP:** 14.801-903

**E-mail:** cep@foar.unesp.br



Continuação do Parecer: 5.462.156

de diferentes concentrações de PA sobre fibroblastos de gengiva e queratinócitos orais; Analisar comparativamente o efeito da PA em concentrações não citotóxicas e não genotóxicas, e da LBI em parâmetros específicos, como agentes antioxidantes, moduladores da resposta inflamatória e inibidores da expressão, síntese e atividade de MMPs.

Subprojeto 2. Determinar o efeito da combinação das terapias, LBI e naringenina, na viabilidade de fibroblastos gengivais, por meio do ensaio alamarBlue; Determinar o efeito da combinação da LBI e naringenina na migração de fibroblastos gengivais, por meio do ensaio de cicatrização in vitro (wound healing); Determinar o efeito da combinação da LBI e naringenina na síntese de MMP-2 por fibroblastos gengivais, por meio de imunoensaio ELISA; Determinar o efeito da combinação da LBI e naringenina na atividade gelatinolítica de fibroblastos gengivais, por meio de zimografia in situ.

#### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

##### **Riscos:**

Os riscos da coleta do tecido gengival serão os mesmos aos que o paciente será submetido durante o procedimento de exodontia, ou seja, não haverá riscos adicionais. Todos os procedimentos para coleta e isolamento das células, bem como para os protocolos experimentais serão realizados de acordo com o Protocolo de Biossegurança da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP. Os quimioterápicos serão manipulados por operador experiente, equipado com todos os equipamentos de proteção individual, em capela de fluxo laminar.

##### **Benefícios:**

A partir deste estudo, será possível desenvolver formulações de proantocianidina para testes in vivo e clínico, com o objetivo de reduzir a o desenvolvimento e a gravidade das lesões de mucosite oral. Até o momento, não houve fatores que interferiram negativamente na execução do projeto e, o desenvolvimento do projeto não resultou em quaisquer danos para o participante.

#### **Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Estudo nacional, unicêntrico, de caráter acadêmico a ser realizado para obtenção de título de Doutor.

Patrocinador: Financiamento Próprio

Número de participantes incluídos no Brasil: 01.

Não houve armazenamento de amostras em banco de material biológico no Brasil.

Estudo já iniciou e tem previsão de encerramento em 31/03/2023.

Não houve uso de fontes secundárias de dados (prontuários, dados demográficos, etc)

- Critério de Inclusão: Pacientes saudáveis, não fumantes, sem co-morbidades e com indicação

**Endereço:** HUMAITA 1680, SALA 512

**Bairro:** CENTRO

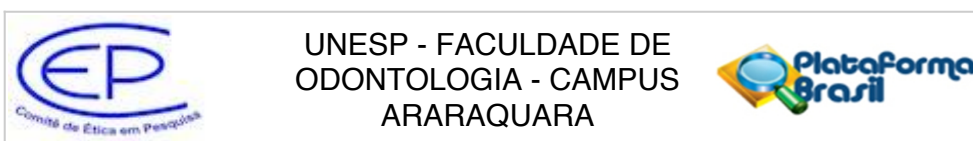
**UF:** SP

**Município:** ARARAQUARA

**Telefone:** (16)3301-6459

**CEP:** 14.801-903

**E-mail:** cep@foar.unesp.br



Continuação do Parecer: 5.462.156

prévia de exodontia de terceiros molares.

- Justificativa da emenda: inclusão de membro de equipe, que por um equívoco não foi incluído anteriormente.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Foram apresentados os seguintes documentos: PB Informações Básicas, Relatório Parcial com solicitação de Emenda.

**Recomendações:**

Vide campo Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Sugere-se a aprovação da emenda acompanhada de relatório parcial.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Emenda APROVADA em reunião de 10 de junho de 2022.

O pesquisador deverá encaminhar relatório parcial no meio do período da pesquisa até o prazo final da pesquisa, quando deverá encaminhar o relatório final.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1928399_E2.pdf	27/05/2022 16:50:30		Aceito
Outros	RC_CEP_Larissa_atualizado_27_05_22.pdf	27/05/2022 16:50:12	Carlos Alberto de Souza Costa	Aceito
Outros	Carta_Resposta_Projeto_Mucosite_agosto_2021.docx	23/08/2021 14:28:31	Carlos Alberto de Souza Costa	Aceito
Cronograma	Cronograma.pdf	23/08/2021 14:28:13	Carlos Alberto de Souza Costa	Aceito
Outros	Relatorio_Parcial_Com_Emenda.docx	05/07/2021 10:27:28	Carlos Alberto de Souza Costa	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_LAIS_CEP_Alterado_2021.docx	05/07/2021 10:27:05	Carlos Alberto de Souza Costa	Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRosto_2021.pdf	03/05/2021 11:36:14	Carlos Alberto de Souza Costa	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_FINAL_06_10_17.docx	06/10/2017 10:15:23	Carlos Alberto de Souza Costa	Aceito
Orçamento	Orcamento_detalhado_CEP.pdf	29/08/2017	Carlos Alberto de	Aceito

**Endereço:** HUMAITA 1680, SALA 512

**Bairro:** CENTRO

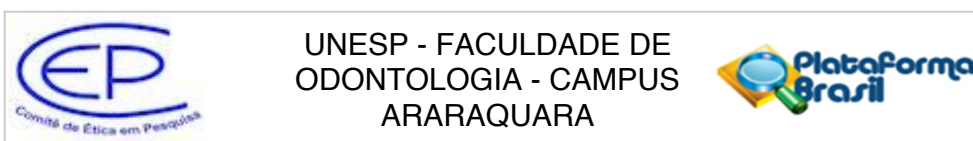
**CEP:** 14.801-903

**UF:** SP

**Município:** ARARAQUARA

**Telefone:** (16)3301-6459

**E-mail:** cep@foar.unesp.br



Continuação do Parecer: 5.462.156

Orçamento	Orcamento_detalhado_CEP.pdf	15:07:36	Souza Costa	Aceito
Outros	Cumprimento_normas_14_08_17.docx	14/08/2017 20:56:29	Carlos Alberto de Souza Costa	Aceito
Outros	Ressarcimento_de_gastos_13_06_2017.pdf	13/06/2017 09:27:23	Carlos Alberto de Souza Costa	Aceito
Outros	autorizacao_lab.pdf	13/06/2017 09:22:56	Carlos Alberto de Souza Costa	Aceito
Outros	Autorizacao_CEP_clinica.pdf	13/06/2017 09:22:27	Carlos Alberto de Souza Costa	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

ARARAQUARA, 10 de Junho de 2022

---

**Assinado por:**  
**Andréa Gonçalves**  
**(Coordenador(a))**

**Endereço:** HUMAITA 1680, SALA 512

**Bairro:** CENTRO

**CEP:** 14.801-903

**UF:** SP

**Município:** ARARAQUARA

**Telefone:** (16)3301-6459

**E-mail:** cep@foar.unesp.br

**Não autorizo a publicação deste trabalho pelo  
prazo de 2 anos após a data de defesa**

**(Direitos de publicação reservado ao autor)**

**Araraquara, 12 de Agosto de 2022.**

**Larissa Natiele Miotto**