

**ICT-UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE  
MESQUITA FILHO”, INSTITUTO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA – CAMPUS  
DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS**

**O EFEITO DO PLASMA DE BAIXA TEMPERATURA SOB PRESSÃO  
ATMOSFÉRICA ASSOCIADO AO LASER DE BAIXA INTENSIDADE NO  
TRATAMENTO DA MUCOSITE ORAL**

Aline da Graça Sampaio

Orientadora: Profa. Tit. Cristiane Yumi Koga-Ito, Departamento de Engenharia Ambiental, UNESP.

Colaboradores:

Prof. Adj. Konstantin Georgiev Kostov, Departamento de Física e Química, UNESP.

Dra. Noala Vicensoto Moreira Milhan, Doutora em Biopatologia Bucal.

Profa. Dra. Gabriela Moreira Gouvêa Lima, Curso de Odontologia, Universidade de Mogi das Cruzes.

São José dos Campos

2023

## RESUMO

A mucosite oral é uma consequência da toxicidade gerada pela terapia antineoplásica que ocasiona ulcerações de leve a grave, induz dor intensa e afetam a qualidade de vida do paciente, podendo levar a interrupção do tratamento. A prevenção ou tratamento da ocorrência de mucosite oral pode auxiliar no prognóstico e qualidade de vida do indivíduo. A terapia de fotobiomodulação (TFBM) e o plasma de baixa temperatura sob pressão atmosférica (LTAPP) têm apresentado ações positivas na cicatrização de feridas, contudo a aplicação conjunta das terapias ainda não foi estudada. No presente projeto, inicialmente a avaliação *in vitro* de citotoxicidade de queratinócitos (NOK) e fibroblastos (3T3) sob a aplicação subsequente de LTAPP e TFBM no tempo de 5 min e 10 seg, respectivamente será avaliado por ensaio MTT e o limiar de citotoxicidade de 70% será baseado na ISO, 2009. Posteriormente, 108 ratos Wistar (*Ratos norvegicus*) receberão 3 doses intercaladas de quimioterápicos 5 fluororacila (5-FU; 30 mg/kg/dia, via intramuscular), seguido de indução de úlcera oral por ação conjunta com solução de ácido acético 50%, na região do fórnice vestibular. Os animais serão divididos randomicamente em 4 grupos (a- controle (não tratado); b- LTAPP; c- TFBM; d- LTAPP e TFBM) e serão tratados em dois dias consecutivos. Os tratamentos serão realizados em dois dias consecutivos no tempo de 5 min para LTAPP e 10 seg para TFBM e avaliados em 3 tempos diferentes correspondentes a 10, 14 e 18 dias após o tratamento (n = 9/grupo). Para isso, os animais serão eutanasiados por dose excessiva de anestésico e coletado o tecido para análise histológica para avaliar o reparo tecidual e as fibras de colágeno através de técnica de coloração hematoxilina-eosina (HE) e picrossírius red, assim como análise imuno-histoquímica por marcadores de vascularização por anticorpo Fator VIII e avaliação bioquímica por técnica de ELISA para avaliação de fatores pró-inflamatórios (TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ) e hidroxiprolina para quantificação de colágeno. Os dados quantitativos coletados serão avaliados no programa estatístico Graphpad prisma e teste de normalidade, seguido de teste estatístico adequado. O nível de significância de 5% será adotado.

Palavras-chave: mucosite, gases em plasma, terapia de fotobiomodulação

## INTRODUÇÃO

Neoplasia na região de cabeça e pescoço é um complexo problema de saúde pública mundial, dada a sua magnitude de incidência e mortalidade, destacando-se atualmente no *ranking* da sétima mais frequente neoplasia em todo o mundo (Xie et al., 2017; Sung et al., 2021; Johson et al., 2020; Bosetti et al., 2020; Gormley et al., 2022). Ressalta-se que ocorram mais de 600 mil diagnósticos e 300 mil óbitos anualmente no mundo relacionado a este tipo de neoplasia (Sung et al., 2021; Gormley et al., 2022; ASCO et al., 2023). No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) destaca que no triênio de 2023 a 2025 ocorrerão mais de 15 mil novos casos (Santos et al., 2023; INCA et al., 2022). O tabagismo, o consumo de álcool (Gormley et al., 2022), a infecção por vírus Epstein Barr (VEB) (Schache et al., 2016) e o papilomavírus são fatores de risco associados aos diferentes tipos de câncer de cabeça e pescoço (CCP) (Mehanna et al., 2016), sendo frequentemente diagnosticados em estágios avançados podendo comprometer o tratamento e o prognóstico (Creaney et al., 2022). A abordagem de tratamento única ou conjunta através de cirurgia, radioterapia e quimioterapia são comumente utilizados para CPP, objetivando o aumento da sobrevida e a qualidade de vida do paciente (Parmar et al., 2021; Worthington et al., 2023).

As terapias antineoplásicas realizadas por quimioterapia e radioterapia associadas ou não, possuem ação citotóxica para células com alta atividade mitótica, sendo não limitante as células tumorais (Villa e Sonis, 2015; Lalla et al., 2008; Pulito et al., 2020). Como consequência atinge células saudáveis com alta divisão celular, como a mucosa epitelial oral que são comprometidas por alteração na taxa de renovação celular do epitélio e uma resposta inflamatória ocasionada pela citotoxicidade, gerando efeitos adversos dolorosos como a mucosite orofaríngea (Villa e Sonis, 2015; Pulito et al., 2020).

A mucosite orofaríngea é uma condição comum debilitante do efeito citotóxico causado pelo tratamento oncológico que ocasiona eritemas, lesões erosivas e ulcerativas na região da mucosa oral (Keefe et al., 2007; Sonis et al., 2010; Treister e Sonis, 2007) que podem se manifestar após 5-14 dias da administração de quimioterápico, com persistência por dias a semanas (Brown et al., 2020) e durante o manejo da radioterapia, podendo ocorrer na terceira semana do tratamento, com duração entre 7 a 98 dias (Maria et al., 2017). Estudos epidemiológicos destacam uma incidência de 20 a 80% dos pacientes em tratamentos por quimioterapia e até 100% dos tratados por radioterapia associado ou não a quimioterapia, na região de cabeça e pescoço (Kashiwazaki et al., 2012; Lalla et al., 2014b; Panahi et al., 2010; Rubenstein et al., 2004). Além disso, sua ocorrência pode variar em diferentes graus de severidade de leve a grave (Sonis et al., 2004).

A etiopatologia da mucosite oral é um evento multifatorial que se inicia com o dano direto ou não ao DNA da célula, causado pelos radicais livres da terapia que sinalizam a ativação de enzimas e fatores de transcrição que estimulam a produção de citocinas pro-inflamatórias, como TNF- $\alpha$  (Fatores de necrose tumoral – alpha) e interleucinas (IL-1 $\beta$  e IL-6) que resultam em dano tecidual na mucosa e epitélio oral. Consequentemente, a inflamação e os danos gerados ocasionam a úlcera que é colonizada pela microbiota bucal residente que amplifica a produção de citocinas pró-inflamatórias.

O estágio final ocorre com reparo resultante da migração, proliferação e diferenciação celular do epitélio (Georgiou et al., 2012; Yoshino et al., 2013; Peterson et al., 2015).

A ocorrência da mucosite oral é uma complicação preocupante por reduzir a qualidade de vida e o prognóstico do paciente por estar diretamente associada a variados sinais e sintomas (Lalla et al., 2014a; Pereira et al., 2019; Riley et al., 2016; Ruiz-Pérez et al., 2016; De Sanctis et al., 2019), além de aumentar os custos com os cuidados ao indivíduo (Pulito et al., 2020). Sua ocorrência pode ocasionar desconforto, dor, comprometimento das funções orais como fala, mastigação, deglutição, gustação, com consequente perda de peso aliada a incapacidade alimentar, assim como dificultar a higienização oral, aumentando o risco de infecção em pacientes imunocomprometidos/imunossuprimidos pelo aparecimento de lesões, além de ocasionar interrupção do tratamentos, e aumento do tempo de hospitalização, que podem gerar altos impactos econômicos (Lalla et al., 2014; Pereira et al., 2019; Peterson et al., 2015; Riley et al., 2016; Ruiz-Pérez et al., 2016; De Sanctis et al., 2019). O efeito desse quadro clínico reduz significativamente a aderência dos pacientes ao tratamento antineoplásico, impactando na sobrevida do indivíduo (Riley et al., 2016). Cerca de 90% dos indivíduos apontam dificuldade ao ingerir água e alimentos, 85% perdem peso pela dificuldade durante a alimentação e até 1/3 dos indivíduos mencionam a dificuldade na fala (Riley et al., 2016; Yoshino et al., 2013).

Apesar da gravidade, frequência e consequências relacionadas a mucosite oral, a falta de cuidados efetivos tem sido considerada um fator de frustração para os pacientes (Villa e Sonis, 2015), devido à falta de um protocolo de consenso para a profilaxia e tratamento para mucosite oral (Moslemi et al., 2016). Os procedimentos avaliados buscam oferecer o alívio dos sintomas, controlar a ocorrência de infecções e atuar na aceleração do reparo tecidual (Curral et al., 2018).

A terapia de fotobiomodulação (TFBM) também conhecida com o termo terapia a laser de baixa intensidade (TLBI), tem sido empregada em estudos clínicos conjuntamente com tratamentos antimicrobianos fotossensibilizadores ou isoladamente e tem demonstrado ação positiva na prevenção e tratamento da mucosite oral (Daugélaite et al., 2019; Pires et al., 2020). Sua utilização nos cuidados de mucosite oral tem demonstrado ação segura, com benefícios nas fases de inflamação, proliferação e maturação de cicatrização de feridas (Silva et al., 2015), assim como benefício no alívio da dor (Anders et al., 2015). Na atualização de 2020, das Diretrizes da Associação Multinacional de cuidados de Suporte em Câncer e da Sociedade Internacional de Oncologia Oral (Multinational Association of Supportive Care in Cancer e da International Society of Oral Oncology -MASCC/ISOO), na prática clínica de mucosite, a terapia de fotobiomodulação passou de sugestão para recomendação na prevenção de mucosite oral devido a sua eficácia e segurança crescentemente comprovadas (Elad et al., 2020).

A técnica de contato da TFBM proporciona uma irradiação que reduz a reflexão e aumenta a penetração, facilitando à interação com o tecido alvo (Mendez et al., 2004). Contudo, o tipo e a espessura do tecido podem influenciar na atenuação do laser (Barbosa et al., 2020). Além disso, o comprimento de onda pode influenciar na penetração do tecido alvo. Valores na faixa de 390 – 600 nm são indicados para tratar tecidos superficiais,

enquanto para tecidos mais profundos, os comprimentos de onda mais longos, na faixa de 600 – 1100 nm podem ser utilizados (Avci et al., 2013), sendo este o limite recomendado na diretriz de prática clínica para protocolos de terapia de fotobiomodulação de prevenção de mucosite oral. Entretanto, não há um consenso para um protocolo fixo na prevenção e tratamento da mucosite oral, pois dentre os protocolos preventivos específicos, diferentes parâmetros são sugeridos.

O mecanismo de ação da TFBM tem sido associado a absorção de luz vermelha por cromóforos mitocondriais pelo citocromo C oxidase (CCO) na cadeia respiratória da mitocôndria e fotoceptores presentes na membrana plasmática de células. Essa interação ativa uma cascata de eventos moleculares que geram processos bioestimuladores que sinalizam vias intracelulares e alteram fatores de transcrições de proliferação, reparo tecidual e regeneração celular (Avci et al., 2013). Estudos realizados no tratamento para mucosite oral demonstram ações positivas na proliferação de fibroblastos, na produção e organização de colágenos (Lopes et al., 2010), redução de citocinas TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (Gavish et al., 2006; Simunovic et al., 2010), infiltrado inflamatório e aumento na angiogênese (Franca et al., 2009).

Zanin e colaboradores (2010) investigaram o uso do laser diodo de alumínio-gálio (660 nm e 30 mW) em mucosite oral em pacientes sobre tratamento por radioterapia em aplicação pré e pós terapia antineoplásica e observaram melhora na qualidade de vida. Lopes e colaboradores em mesmo comprimento de onda observaram melhora na severidade da mucosite, assim como ação anti-inflamatória com redução no infiltrado neutrofílico, promoção do colágeno e reparo tecidual. Estudo *in vivo* de mucosite oral na mucosa jugal de hamster com terapia laser no comprimento de 660 nm apresentou melhores resultados na aplicação individual em relação a ação concomitante com laser infravermelho. No estudo foi observada a redução na severidade da mucosite, cicatrização acelerada, redução de níveis de TNF- $\alpha$  e aumento na concentração de hidroxiprolina (Cotomacio et al., 2023). Os níveis elevados e prolongados de IL-1 e TNF- $\alpha$  demonstram a ocorrência de inflamação duradoura. (Braun et al., 2002). A presença de aminoácidos como a hidroxiprolina presente na molécula de colágeno é um importante estabilizador das fibras colágenas e biomarcador de má cicatrização de feridas (Srivastava et al., 2016).

Com relação ao efeito antimicrobiano da TFBM, a ineficácia do efeito bactericida, principalmente entre a faixa de luz de 660 nm ou 808 nm quando irradiado por mais de 2 min (Andraus et al., 2015). Além disso, o efeito bioestimulador no crescimento de bactérias foi observado (Jadah et al., 2022). Alternativamente, o uso de soluções fotosensibilizadoras tem sido empregado conjuntamente a irradiação do laser para agir como um catalisador na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) causando efeitos antimicrobianos capaz de causar apoptose, através da desnaturação de proteínas e minerais presentes na membrana celular e citoplasma (Luksiene et al., 2003).

O plasma de baixa temperatura sob pressão atmosférica (Low-Temperature Atmospheric Pressure Plasma – LTAPP) é considerado o quarto estado da matéria, sua composição consiste basicamente em gás ionizado, de elétrons e de partículas neutras provenientes de átomos e/ou moléculas componentes do gás utilizado na sua produção que são gerados após a aplicação conjunta de pulsos elétricos no gás (Reema et al., 2022). Diferentes gases, como argônio, hélio, ar e nitrogênio, podem ser usados para a sua

produção. A interação do gás plasmático com ar é capaz de gerar diferentes espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (Reactive Oxygen and Nitrogen Species - RONS) (Reema et al., 2022), além de não gerarem resíduos tóxicos (Reema et al., 2022).

O LTAPP tem apresentado efeito promissor em aplicações biomédicas no reparo de feridas e inativações microbiana (Dubey et al., 2022; von Woedtke et al., 2019), devido aos seus efeitos anti-inflamatório, antimicrobiano e reparador tecidual. No caso de feridas, as RONS geradas pelo plasma têm sido apontadas por terem ação anti-inflamatória, na angiogênese e na formação de fatores de crescimento, importantes para regular a reepitelização e contração de ferida, enquanto o efeito antimicrobiano tem demonstrado ação sobre a membrana celular microbiana, rompendo a estrutura com consequente extravasamento dos componentes internos e também danos aos DNA (Dubey et al., 2022).

Em estudo *in vivo* em animais e humanos a eficácia na estimulação do reparo tecidual foi observado em feridas crônicas (von Woedtke et al., 2019). Modelo murino em ferida de queimadura infectada demonstrou que o plasma levou a redução as citocinas teciduais pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-6, além de promover colágeno nas feridas sem infecção e indução de macrófagos anti-inflamatórios (Dang et al., 2021). Estudo realizado por Amini e colaboradores (2020) em ferida crônica demonstrou a redução nos níveis de citocinas inflamatórias e fatores de crescimento inflamatórios (IL-1, IL-8, TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$  e INF- $\gamma$ ), assim como na diminuição da carga microbiana, após a aplicação do plasma, acelerando o processo de cicatrização. Alterações da carga microbiana durante o curso da lesão de mucosite oral pode impactar diretamente na progressão, na profundidade, na duração da úlcera (Bruno et al., 2023) e no risco de infecções sistêmicas (Katagiri et al., 2018; Sampaio et al., 2024).

A atividade antimicrobiana promissora do LTAPP tem sido relatada frente a uma ampla variedade de micro-organismos, incluindo os patógenos multirresistentes (von Woedtke et al., 2019) e relacionados a infecções sistêmicas por mucosite oral (Katagiri et al. 2018; Borges et al., 2018). Estudo recente aponta ação benéfica do LTAPP na prevenção de infecção fúngica sistêmica, em tratamento de mucosite oral induzida por quimioterapia associada a candidose (Sampaio et al., 2024)

Considerando que a terapia de fotobiomodulação fornece analgesia e o plasma de baixa temperatura sob pressão atmosférico tem um efeito antimicrobiano, e ambos possuem modulação do processo anti-inflamatório, o presente estudo tem como objetivo avaliar o efeito associativo dessas terapias no tratamento de mucosite oral induzida por quimioterapia em modelo *in vivo*.

## **PROPOSIÇÃO**

O objetivo geral deste projeto é contribuir para a prospecção de uma terapêutica inovadora, avaliando o efeito associativo do plasma de baixa temperatura sob pressão atmosférica e a terapia de fotobiomodulação no tratamento de lesões de mucosite oral induzida por quimioterapia em modelo murino. Norteando o objetivo geral, estabelecemos os seguintes objetivos específicos:

- a) Avaliar a ação associativa entre o plasma de baixa temperatura sob pressão atmosférica e a terapia fotobiomoduladora no tratamento de lesões de mucosite oral induzida por quimioterapia;
- b) Investigar o estado pré e pós lesão, e pós terapêutica, para monitorar o estado de preservação, dano ou recuperação do tecido;
- c) Classificar o grau de severidade das lesões de mucosite oral induzida por quimioterapia;
- d) Examinar a proliferação celular e vascular as lesões de mucosite oral induzidas por quimioterapia;
- e) Analisar a estrutura tecidual das regiões de lesões dos grupos de estudo;
- f) Investigar a expressão de citocinas nos tecidos das lesões de mucosite oral dos grupos de estudo;
- g) Dosar os níveis de colágenos das lesões da região de mucosite oral induzida por quimioterapia.

## MATERIAIS E MÉTODOS

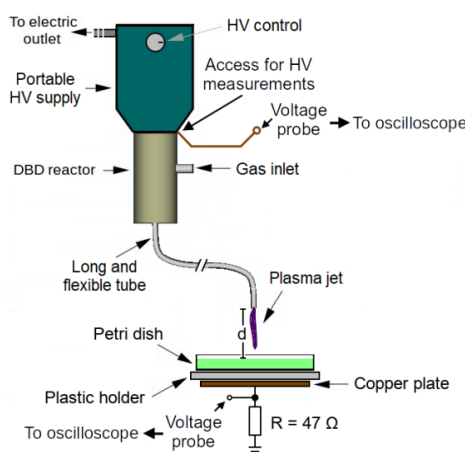
### Aspectos éticos

O presente projeto será encaminhado para o Comitê de ética em experimentação animal local para avaliação e aprovação.

### Jato de plasma de baixa temperatura sob pressão atmosférica

No presente estudo será utilizado o equipamento de plasma de baixa temperatura sob pressão atmosférica (Figura 1), desenvolvido no Brasil, e descrito em Nascimento et al., 2023. O plasma de baixa temperatura será gerado dentro de um cilindro composto por um eletrodo de alta frequência com fonte de voltagem pulsada, contendo um circuito elétrico bivolt. O gás hélio (He) de vazão de 2 L/min regulado por controlador digital será utilizado. A temperatura do jato de plasma estará sempre abaixo de 40 °C.

**Figura 1:** Esquema do aparato para a geração do plasma de baixa temperatura sob pressão atmosférica.



**Legenda:** Esquema do aparelho de plasma com simulação do jato de plasma em placa de Petri (Nascimento et al., 2023).

### Fotobiomodulador - Laser

O tratamento com a terapia fotobiomoduladora será realizado com o equipamento comercial de laser vermelho de baixa intensidade do tipo diodo de Arseneto de Gálio-Alumínio (AsGaAl; TWIN Laser - MM optics), com comprimento de onda de 660 nm, potência de 20 mW/cm<sup>2</sup> e dosagem de 5J/cm<sup>2</sup>.

### Efeito da associação entre o jato de plasma de baixa temperatura sob pressão atmosférica e a terapia fotobiomoduladora na avaliação *in vitro*

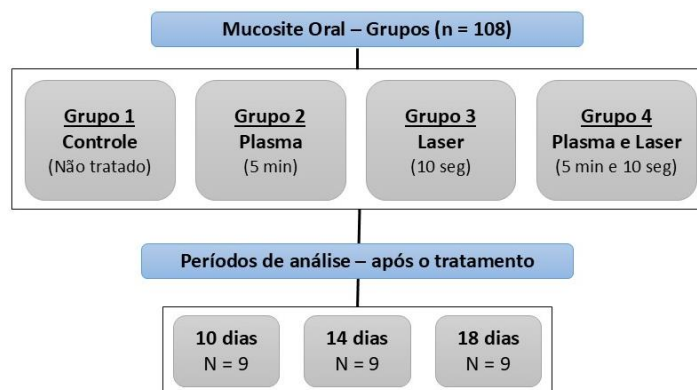
**Citotoxicidade:** A avaliação da citotoxicidade de células de mamíferos será realizada. Queratinócitos orais de humanos (NOK) e fibroblastos (3T3) serão avaliados previamente ao ensaio animal. As células serão cultivadas em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado com antibiótico, com incubação a 37 °C, em estufa com 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, as células serão semeadas em placa de 96 poços, na concentração de 8 x 10<sup>3</sup> cel/ml e incubadas por 24 h em estufa. Posteriormente, as células serão expostas ao tratamento conjunto de plasma de baixa temperatura, por 5 min e laser vermelho, por 10 seg, conforme metodologia previamente avaliada por Borges et al., 2018 e Lima, 2011. Após, as placas serão incubadas por 24 horas a 37 °C. A análise de viabilidade celular por ensaio MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-di-fenil brometo de tetrazolina) será realizada e a densidade óptica será avaliada por espectrofotometria a 570 nm. Grupo controle não tratado será utilizado para normalização dos dados (=100% de viabilidade). O limiar de toxicidade de 70% será baseado na ISO 10993-5.

### **Efeito da associação entre o plasma de baixa temperatura sob pressão atmosférica e a terapia fotobiomoduladora no tratamento de mucosite oral**

O protocolo experimental para indução de mucosite oral, após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEUA), será aplicado conforme a metodologia realizada por Lima et al., 2015.

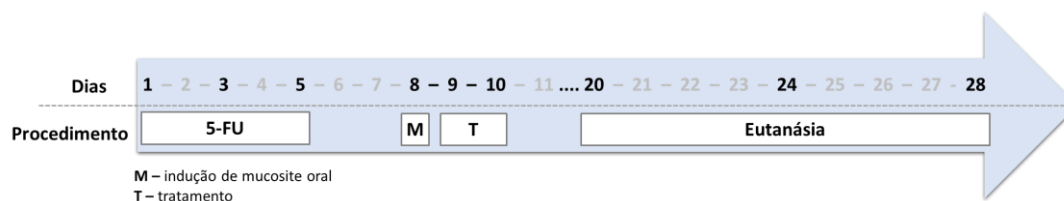
**Delineamento experimental:** Para o ensaio serão utilizados 108 ratos (*Rathus norvegicus*) machos, com idade entre 90 a 10 dias. Os animais serão mantidos em condições usuais de biotério em racks ventilados, com controle de temperatura (20-22 °C), ciclo de luz claro/ escuro (12 h/ cada) e alimentação com ração padrão moída e água à vontade. Previamente ao ensaio, os animais receberão polivitamínico (via oral; 2mL/ L em água) por 15 dias e vermífugo (albendazol, via oral; 1,5 mL) em dose única, para fortalecimento. Os animais serão divididos randomicamente em quatro grupos experimentais (n= 9 /grupo) conforme organograma da figura 2, contendo grupo controle (sem tratamento) e grupos tratado com terapia de LTAPP e terapia fotobiomoduladora e associação das terapias. A análise dos períodos das lesões será realizada nos dias 10, 14 e 18 dias após os tratamentos (Figura 2).

**Figura 2:** Organograma dos tratamentos de mucosite oral e períodos de análise.



A mucosite oral será induzida por quimioterápico 5-fluoruracila (5-FU), por via intramuscular, administrada em 3 doses intercaladas na concentração de 30 mg/kg/dia. Posteriormente, indução da úlcera de mucosite oral será realizada na região do fórnice vestibular próximo aos incisivos inferiores, com auxílio de filtro de papel esterilizado na dimensão de 9 mm<sup>2</sup> embebido em 10 µL de solução de ácido acético glacial (C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>COOH) a 50%, preparado em água deionizada estéril (Figura 3), para delimitação da área de estudo. A aplicação será realizada por 60 seg, seguido de lavagem com swab umedecido com solução salina estéril.

**Figura 3:** Linha do tempo do ensaio de mucosite oral.



**Acompanhamento dos animais durante o experimento:** A região do fórnice vestibular será observada após 3 dias do procedimento de indução da úlcera para o diagnóstico de desenvolvimento da mucosite oral. A lesão será monitorada e fotografada para avaliação da evolução da lesão e avaliação do grau de severidade da mucosite, conforme metodologia empregada por Sonis et al., 2004. A análise clínica da gravidade da mucosite será avaliada variando em normal (sem anormalidades na mucosa), leve, moderado e severo. A avaliação será realizada por um avaliador cego calibrado. O grau de mucosite será determinado pelo valor médio das classificações das mucosas. O peso dos animais será monitorado em dias intercalados durante o experimento para avaliar a saúde global dos animais e o peso corporal médio relativo em gramas será determinado conforme metodologia empregada por Zhang et al., 2013.

**Tratamento:** A terapia individual e conjunta com plasma de baixa temperatura e fotobiomoduladora será aplicada após 24 horas e 48 horas (2 dias de tratamento) do processo de indução da lesão na mucosa. O tratamento será realizado diretamente em ponto central do local de indução da mucosite oral, perpendicular ao tecido lesionado. Para o tratamento os animais serão anestesiados, antes dos procedimentos, com associação de xilazina (10 mg/kg) e ketamina (95 mg/kg). A terapia individual com plasma de baixa temperatura será aplicada pelo período de 5 min (na distância de 1,5 cm), conforme protocolo não citotóxico estabelecido por Borges et al., 2018 e Oliveira et al., 2021. A terapia individual fotobiomoduladora será aplicada durante 10 seg (no modo de contato), conforme metodologia realizada por Lima, 2011 em tratamento de mucosite oral. O tratamento conjunto será realizado com a aplicação inicial de plasma de baixa temperatura (5 min) seguido de laser (10 seg).

**Separação da amostra tecidual e períodos de análise:** Após 10, 14 e 18 dias dos tratamentos, os grupos dos animais (n = 9/cada) serão anestesiados por dose excessiva de

anestésico. Os tecidos da área de mucosite e região adjacente serão removidos, os espécimes divididos em corte sagital e separado para as análises abaixo.

**Procedimentos de análise:** Oito espécimes do quadrante esquerdo (QE) serão destinados a análise histológica e imuno-histoquímica e oitos espécimes do quadrante direito (QD) serão destinados para análise bioquímica, dos tecidos tratados e não tratados do fórnice vestibular.

Análise histológica e imuno-histoquímica: Os tecidos removidos do QE serão fixados em paraformaldeído 4% e desidratados em álcool 70%, por 24 horas. Os espécimes serão processados em xilol e incluídos em Paraplast, seguido de cortes na espessura de 5 µm colocadas sobre lâminas de vidro. Três lâminas serão coradas com hematoxilina-eosina (HE) para avaliação do infiltrado inflamatório. A análise descritiva das estruturas teciduais, presença, tipo e intensidade da inflamação será realizada. Para quantificação das fibras de colágeno, três lâminas serão coradas por Picrossírius red. O percentual das fibras de colágeno será determinado e os cortes fotografados e digitalizados. A área de colágeno, determinada por coloração avermelhada, será selecionada no programa AdobePhotoshop (Adobe Systems Incorporated, versão 7.0.1), seguido de binarização da imagem no programa ImageJ, versão 1.31p e a porcentagem da área calculada.

Para análise imuno-histoquímica, cortes de espessura de 3 µm serão posicionados sobre lâminas de vidro silanizadas. Três lâminas serão utilizadas para identificar e quantificar a expressão dos marcadores de microvasos através do Fator VIII. Anticorpos primários para Fator VIII será aplicado através do método da estreptavidina-biotina.

Análise bioquímica: Os tecidos removidos do QD serão imediatamente congelados em freezer -80 °C até a análise bioquímica de ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay). Posteriormente, a extração da proteína será realizada, através da homogeneização do tecido da mucosa em 1 ml de tampão fosfato de potássio 20 mM (pH 7,2), centrifugada por 1600 g, por 10 min a 4 °C, seguido de coleta do sobrenadante. O material coletado será utilizado para avaliar as concentrações de fator de necrose tumoral-alpha (TNF-α), interleucina-1β (IL-1β) e hidroxiprolina. Kits ELISA específicos (Kit Elisa Quantikine, R&D systems), serão utilizados para avaliações, seguindo as instruções do fabricante. As concentrações de proteína serão determinadas com base na quantidade total de proteína presente em cada amostra avaliada pelo kit QuantiPro (Sigma). A quantificação será realizada através de leituras em espectrofotômetro e absorbância específica recomendada pelo fabricante.

## CRONOGRAMA DE ESTUDO

CRONOGRAMA					
	Lista de atividades	Ano 1		Ano 2	
		1º semestre	2º semestre	1º semestre	2º semestre
1	Teste de citotoxicidade				
2	Teste <i>in vivo</i> - piloto				
3	Ensaio <i>in vivo</i>				
4	Análise histológica (HE e Picrosírius)				
5	Análise imuno-histoquímica (Fator VIII)				
6	Análise bioquímica (ELISA)				
7	Artigo				
8	Relatório final				

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

American Society of Clinical Oncology – ASCO [Internet]. EUA [cited 2023 Sep 10]. Head and neck cancer: Statistics. Available from: <https://www.cancer.net/cancer-types/head-and-neck-cancer/statistics>.

Amini MR, Sheikh Hosseini M, Fatollah S, Mirpour S, Ghoranneviss M, Larijani B, Mohajeri-Tehrani MR, Khorramizadeh MR. Beneficial effects of cold atmospheric plasma on inflammatory phase of diabetic foot ulcers; a randomized clinical trial. *J Diabetes Metab Disord*. 2020 Jul 14;19(2):895-905. doi: 10.1007/s40200-020-00577-2. PMID: 33520811; PMCID: PMC7843664.

Anders JJ, Lanzafame RJ, Arany PR. Low-level light/laser therapy versus photobiomodulation therapy. *Photomed Laser Surg*. 2015 Apr;33(4):183-4. doi: 10.1089/pho.2015.9848. PMID: 25844681; PMCID: PMC4390214.

Andraus RAC, Maia LP, dos Santos JPM, Mesquita AR, Santos TG, Braoios A. et al. Analysis of low level laser therapy in vitro cultures of bacteria and fungi. *Man TherPosturology Rehabil J*. 2015;13:304. doi: 10.17784/mtprehabjournal.2015.13.304Man.

Avci P, Gupta A, Sadasivam M, Vecchio D, Pam Z, Pam N, Hamblin MR. Low-level laser (light) therapy (LLLT) in skin: stimulating, healing, restoring. *Semin Cutan Med Surg*. 2013 Mar;32(1):41-52. PMID: 24049929; PMCID: PMC4126803.

Barbosa RI, Guirro ECO, Bachmann L, Brandino HE, Guirro RRJ. Analysis of low-level laser transmission at wavelengths 660, 830 and 904 nm in biological tissue samples. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2020. 209:111914. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2020.111914.

Borges AC, de Moraes Gouvêa Lima G, Mayumi Castaldelli Nishime T, Vidal Lacerda Gontijo A, Kostov KG, Koga-Ito CY. Amplitude-modulated cold atmospheric pressure plasma jet for treatment of oral candidiasis: In vivo study. *PLoS One*. 2018;13(6):e0199832. doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0199832.

Bosetti C, Carioli G, Santucci C, Bertuccio P, Gallus S, Garavello W, et al. Global trends in oral and pharyngeal cancer incidence and mortality. *Int J Cancer*. 2020;147(4):1040–9. doi: 10.1002/IJC.32871.

Braun S, Hanselmann C, Gassmann MG, auf dem Keller U, Born-Berclaz C, Chan K, et al., Nrf2 transcription factor, a novel target of keratinocytes growth factor action which regulates gene expression and inflammation in the healing skin wound. Doi: 10.1128/mcb.22.15.5492-5505.2022.

Brown TJ, Gupta A. Management of Cancer Therapy-Associated Oral Mucositis. *JCO Oncol Pract*. 2020;16(3):103–9. doi: 10.1200/JOP.19.00652.

Bruno JS, Al-Qadami GH, Laheij AMGA, Bossi P, Fregnani ER, Wardill HR. From Pathogenesis to Intervention: The Importance of the Microbiome in Oral Mucositis. *Int J*

Mol Sci. 2023 May 5;24(9):8274. doi: 10.3390/ijms24098274. PMID: 37175980; PMCID: PMC10179181.

Curra, M.; Soares Junior, L.A.V.; Martins, M.D.; Santos, P.S. da S. Chemotherapy Protocols and Incidence of Oral Mucositis. An Integrative Review. *Einstein (Sao Paulo)* 2018, 16, eRW4007, doi:10.1590/s1679-45082018rw4007.

Creaney G, McMahon AD, Ross AJ, Bhatti LA, Paterson C, Conway DI. Head and neck cancer in the UK: what was the stage before COVID-19? UK cancer registries analysis (2011-2018). *British Dental Journal* 2022;233(9):787-93. doi: 10.1038/s41415-022-5151-4. PMID: 36369569.

Dang, C.P.; Weawseetong, S.; Charoensappakit, A.; Sae-Khow, K.; Thong-Aram, D.; Leelahavanichkul, A. Non-Thermal Atmospheric Pressure Argon-Sourced Plasma Flux Promotes Wound Healing of Burn Wounds and Burn Wounds with Infection in Mice through the Anti-Inflammatory Macrophages. *Appl. Sci.* 2021, 11, 5343. doi.org/10.3390/app11125343

Daugėlaitė, G.; Užkuraiytė, K.; Jagelavičienė, E.; Filipauskas, A. Prevention and Treatment of Chemotherapy and Radiotherapy Induced Oral Mucositis. *Medicina (Kaunas)* 2019, 55, doi:10.3390/medicina55020025.

Dubey SK, Parab S, Alexander A, Agrawal M, Achalla YPK, Pal UN, Pandey MM, Kesharwani P. Cold atmospheric plasma therapy in wound healing. *Process Biochemistry*. 2022. 112: 112-123. Doi: 10.1016/j.procbio.2021.11.017.

Elad S, Cheng KKF, Lalla RV, Yarom N, Hong C, Logan R M., Bowen J, Gibson R, Saunders DP, Zadik Y, Ariyawardana A, Correa ME, Ranna V, Bossi P; for the Mucositis Guidelines Leadership Group of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer and International Society of Oral Oncology (MASCC/ISOO). MASCC/ISOO clinical practice guidelines for the management of mucositis secondary to cancer therapy. *Cancer*. 2020; 126: 4423–4431. <https://doi.org/10.1002/cncr.33100>

Franca CM, Franca CM, Nunez SC, Prates RA, Noborikawa E, Faria MR, et al. Low-intensity red laser on the prevention and treatment of induced-oral mucositis in hamsters. *J Photochem Photobiol B*. 2009;94(1):25-31. Epub 2008/11/04.

Gavish L, Perez L, Gertz SD. Low-level laser irradiation modulates matrix metalloproteinase activity and gene expression in porcine aortic smooth muscle cells. *Lasers Surg Med*. 2006;38(8):779-86. Epub 2006/08/09.

Georgiou M, Patapatiou G, Domoxoudis S, Pistevou-Gompaki K, Papanikolaou A. Oral Mucositis: understanding the pathology and management. *Hippokratia*. 2012 Jul;16(3):215-6. PMID: 23935285; PMCID: PMC3738725.

Gormley M, Creaney G, Schache A, Ingarfield K, Conway DI. Reviewing the epidemiology of head and neck cancer: definitions, trends and risk factors. *Br Dent J*. 2022;233(9):780–6. doi: 10.1038/S41415-022-5166-X.

Instituto Nacional de Câncer - INCA (Brasil). Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro. INCA. 2022.

ISO - ISO 10993-5:2009 - Biological Evaluation of Medical Devices — Part 5: Tests for in Vitro Cytotoxicity Available online: <https://www.iso.org/standard/36406.html> (accessed on 21 September 2022).

Jadah NA, Shamkhi IA, Shamkhi JA. Photobiomodulation and Antimicrobial Photodynamic Influence of a 650 nm Wavelength on Staphylocoagulase and Viability of Staphylococcus aureus. *J Lasers Med Sci*. 2022 Feb 5;13:e5. doi: 10.34172/jlms.2022.05. PMID: 35642239.

Johnson DE, Burtness B, Leemans CR, Lui VWY, Bauman JE, Grandis JR. Head and neck squamous cell carcinoma. *Nat Rev Dis Primers*. 2020a;6(1). doi: 10.1038/S41572-020-00224-3.

Kashiwazaki H, Matsushita T, Sugita J, Shigematsu A, Kasashi K, Yamazaki Y, et al. Professional oral health care reduces oral mucositis and febrile neutropenia in patients treated with allogeneic bone marrow transplantation. *Support Care Cancer*. 2012;20(2):367–73. doi: 10.1007/S00520-011-1116-X.

Katagiri H, Fukui K, Nakamura K, Tanaka A. Systemic hematogenous dissemination of mouse oral candidiasis is induced by oral mucositis. *Odontology*. 2018;106(4):389–97. doi: 10.1007/S10266-018-0366-1.

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. doi: 10.1002/CNCR.22484.

Lalla R V., 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*. 2014a;120(10):1453–61. doi: 10.1002/CNCR.28592.

Lalla R V., Saunders DP, Peterson DE. Chemotherapy or Radiation-Induced Oral Mucositis. *Dent Clin North Am*. 2014b;58(2):341–9. doi: 10.1016/j.cden.2013.12.005.

Lalla R V., Sonis ST, Peterson DE. Management of oral mucositis in patients who have cancer. *Dent Clin North Am*. 2008;52(1):61–77. doi: 10.1016/J.CDEN.2007.10.002.

Lima GDMG [UNESP]. Efeitos da membrana amniótica homogênea associada ao laser arseneto de gálio-alumínio ( $\lambda=660$ ) na reparação de mucosite oral em ratos tratados com 5-fluoruracila: análise histológica e imuno-histoquímica [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia; 2011. doi: 10.17616/R31N39.

Lima, G.D.M.G.; Severo, M.C.; Santana-Melo, G.D.F.; Carvalho, M.A.; Vilela-Goulart, M.D.G.; Salgado, M.A.C.; Gomes, M.F. Amniotic Membrane as a Biological Dressing for 5-Fluorouracil-Induced Oral Mucositis in Rats. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2015, 44, 845–851. doi:10.1016/J.IJOM.2015.01.007.

Lopes NN, Plapler H, Lalla RV, Chavantes MC, Yoshimura EM, da Silva MA, et al. Effects of low-level laser therapy on collagen expression and neutrophil infiltrate in 5-fluorouracil-induced oral mucositis in hamsters. *Lasers in surgery and medicine*. 2010;42(6):546-52. Epub 2010/07/28

Luksiene Z. Photodynamic therapy: mechanism of action and ways to improve the efficiency of treatment. *Medicina (Kaunas)* 2003;39(12):1137–50.

Maria OM, Eliopoulos N, Muanza T. Radiation-Induced Oral Mucositis. *Front Oncol.* 2017;7(MAY). doi: 10.3389/FONC.2017.00089.

Mehanna H, Franklin N, Compton N, Robinson M, Powell N, Biswas-Baldwin N, et al. Geographic variation in human papillomavirus-related oropharyngeal cancer: data from 4 multinational randomized trials. *Head and Neck* 2016;38(1):E1863-69. doi: 10.1002/hed.24336. PMID: 26749143.

Mendez TMTV, Pinheiro ALB, Pacheco MTT, Nascimento PM, Ramalho LMP. Dose and wavelength of laser light have influence on the repair of cutaneous wounds *J. Clin. Laser Med. Surg.*, 22 (2004), pp. 19-25.

Moslemi, D.; Nokhandani, A.M.; Otaghsaraei, M.T.; Moghadamnia, Y.; Kazemi, S.; Moghadamnia, A.A. Management of Chemo/Radiation-Induced Oral Mucositis in Patients with Head and Neck Cancer: A Review of the Current Literature. *Radiotherapy and Oncology* 2016, 120, 13–20, doi:10.1016/j.radonc.2016.04.001.

Nascimento F, Sampaio AG, Milhan NVM, Lacerda AV, Matten P, Gerling T, Robert E, Koga-Ito CY, Kostov KG. A Low Cost, Flexible Atmospheric Pressure Plasma Jet Device With Good Antimicrobial Efficiency. *IEEE Transactions on Radiation and Plasma Medical Sciences.* doi: 10.1109/TRPMS.2023.3342709.

Oliveira MACd, Lima GdMG, Nishime TMC, Gontijo AVL, Menezes BRCd, Caliar MV, Kostov KG, Koga-Ito CY. Inhibitory Effect of Cold Atmospheric Plasma on Chronic Wound-Related Multispecies Biofilms. *Applied Sciences.* 2021; 11(12):5441. <https://doi.org/10.3390/app11125441>.

Panahi Y, Ala S, Saeedi M, Okhovatian A, Bazzaz N, Naghizadeh MM. Allopurinol mouth rinse for prophylaxis of fluorouracil-induced mucositis. *Eur J Cancer Care (Engl).* 2010;19(3):308–12. doi: 10.1111/J.1365-2354.2008.01042.X.

Parmar A, Macluskey M, Mc Goldrick N, Conway DI, Glenny AM, Clarkson JE, Worthington HV, Chan KK. Interventions for the treatment of oral cavity and oropharyngeal cancer: chemotherapy. *Cochrane Database Syst Rev.* 2021 Dec 20;12(12):CD006386. doi: 10.1002/14651858.CD006386.pub4. PMID: 34929047; PMCID: PMC8687638.

Pereira IF, Firmino RT, Meira HC, Vasconcelos BCDE, Noronha VRADS, Santos VR. Radiation-induced Oral Mucositis in Brazilian Patients: Prevalence and Associated Factors. *In Vivo.* 2019;33(2):605–9. doi: 10.21873/INVIVO.11517.

Peterson D, Srivastava R, Lalla R. Oral mucosal injury in oncology patients: perspectives on maturation of a field. *Oral Dis.* 2015;21(2):133–41. doi: 10.1111/ODI.12167.

Pires Marques, E.C.; Piccolo Lopes, F.; Nascimento, I.C.; Morelli, J.; Pereira, M.V.; Machado Meiken, V.M.; Pinheiro, S.L. Photobiomodulation and Photodynamic Therapy for the Treatment of Oral Mucositis in Patients with Cancer. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2020, 29, doi:10.1016/J.PDPDT.2019.101621.

Pulito C, Cristaudo A, Porta C, Zapperi S, Blandino G, Morrone A, Strano S. Oral mucositis: the hidden side of cancer therapy. *J Exp Clin Cancer Res.* 2020 Oct 7;39(1):210. doi: 10.1186/s13046-020-01715-7. PMID: 33028357.

Reema, Khanikar RR, Bailung H, Sankaranarayanan. *Front. Phys.*, 13 September 2022

Sec. Low-Temperature Plasma Physics. 2022. doi.org/10.3389/fphy.2022.942952.

Riley P, McCabe MG, Glennly AM. Oral Cryotherapy for Preventing Oral Mucositis in Patients Receiving Cancer Treatment. *JAMA Oncol.* 2016;2(10):1365–6. doi: 10.1001/JAMAONCOL.2016.2680.

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. doi: 10.1002/CNCR.20163.

Ruiz-Pérez NJ, González-Ávila M, Sánchez-Navarrete J, Toscano-Garibay JD, Moreno-Eutimio MA, Sandoval-Hernández T, et al. Antimycotic Activity and Genotoxic Evaluation of Citrus sinensis and Citrus latifolia Essential Oils. *Sci Rep.* 2016;6. doi: 10.1038/SREP25371.

de Sanctis V, Belgioia L, Cante D, la Porta MR, Caspiani O, Guarnaccia R, et al. Lactobacillus brevis CD2 for Prevention of Oral Mucositis in Patients with Head and Neck Tumors: A multicentric randomized study. *Anticancer Res.* 2019;39(4):1935–42. doi: 10.21873/anticancer.13303.

Santos M de O, Lima FC da S de, Martins LFL, Oliveira JFP, Almeida LM de, Cancela M de C. Estimativa de Incidência de Câncer no Brasil, 2023-2025. *Revista Brasileira de Cancerologia.* 2023;69(1):e-213700. doi: 10.32635/2176-9745.RBC.2023v69n1.3700.

Schache AG, Powell NG, Cuschieri KS, Robinson M, Leary S, Mehanna H, et al. *Pesquisa em Câncer* 2016; 76(22):6598-606. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-0633. PMID: 27569214.

Silva GB, Sacono NT, Othon-Leite AF, Mendonça EF, Arantes AM, Bariani C et al (2015) Effect of low-level laser therapy on inflammatory mediator release during chemotherapy-induced oral mucositis: a randomized preliminary study. *Lasers Med Sci* 30: 117–126.

Simunovic-Soskic M, Pezelj-Ribaric S, Brumini G, Glazar I, Grzic R, Miletic I. Salivary levels of TNF-alpha and IL-6 in patients with denture stomatitis before and after laser phototherapy. *Photomed Laser Surg.* 2010;28(2):189-93. Epub 2009/10/03.

Sonis ST. New thoughts on the initiation of mucositis. *Oral Dis.* 2010;16(7):597–600. doi: 10.1111/J.1601-0825.2010.01681.X.

Sonis, ST. The Pathobiology of Mucositis. *Nat Rev Cancer* 2004, 4, 277–284, doi:10.1038/NRC1318.

Srivastava AK, Khare P, Nagar HK, Raghuwanshi N, Srivastava R. Hydroxyproline: A Potential Biochemical Marker and Its Role in the Pathogenesis of Different Diseases. *Curr Protein Pept Sci.* 2016;17(6):596-602. doi: 10.2174/1389203717666151201192247. PMID: 26916157.

Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(3):209–49. doi: 10.3322/CAAC.21660.

Treister N, Sonis S. Mucositis: Biology and management. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* 2007;15(2):123–9. doi: 10.1097/MOO.0b013e3280523ad6.

Villa A, Sonis ST. Mucositis: pathobiology and management. *Curr Opin Oncol.* 2015;27(3):159–64. doi: 10.1097/CCO.0000000000000180.

Von Woedtke T, Schmidt A, Bekeschus S, Wende K, Weltmann KD. Plasma Medicine: A Field of Applied Redox Biology. *In Vivo.* 2019;33(4):1011–26. doi: 10.21873/INVIVO.11570.

Xie X, O'Neill W, Pan Q. Immunotherapy for head and neck cancer: the future of treatment? *Expert Opin Biol Ther.* 2017;17(6):701–8. doi: 10.1080/14712598.2017.1315100.

Worthington HV, Bulsara VM, Glenny AM, Clarkson JE, Conway DI, Macluskey M. Interventions for the treatment of oral cavity and oropharyngeal cancers: surgical treatment. *Cochrane Database Syst Rev.* 2023 Aug 31;8(8):CD006205. doi: 10.1002/14651858.CD006205.pub5. PMID: 37650478.

Yoshino F, Yoshida A, Nakajima A, Wada-Takahashi S, Takahashi S, Lee MC II. Alteration of the redox state with reactive oxygen species for 5-fluorouracil-induced oral mucositis in hamsters. *PLoS One.* 2013;8(12). doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0082834.

Zanin, T., Zanin, F., Carvalhosa, A. A., de Souza Castro, P. H., Pacheco, M. T., Zanin, I. C. J., & Brugnera, A. (2010). Use of 660-nm Diode Laser in the Prevention and Treatment of Human Oral Mucositis Induced by Radiotherapy and Chemotherapy. *Photomedicine and Laser Surgery*, 28(2), 233–237. doi:10.1089/pho.2008.2242

Zhang Q, Liang Y, Feng H, Ma R, Tian Y, Zhang J, et al. A study of oxidative stress induced by non-thermal plasma-activated water for bacterial damage. *Appl Phys Lett.* 2013 May 20;102(20):203701.