

**EFEITOS DA FOTOBÍOMODULAÇÃO NA
IMUNIDADE DE PACIENTES COM MUCOSITE
ORAL**

ROBERTA CARDIM LESSA

**Tese apresentada à Fundação Antônio Prudente
para a obtenção do título de Doutor em Ciências**

Área de Concentração: Oncologia

Orientador: Prof. Dr. Fábio de Abreu Alves

Co-Orientadora: Dra. Dirce Maria Carraro

São Paulo

2016

FICHA CATALOGRÁFICA
Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Lessa, Roberta Cardim

Efeitos da fotobiomodulação na imunidade de pacientes com mucosite oral / Roberta Cardim Lessa – São Paulo, 2016.

109p.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia.

Orientador: Fábio de Abreu Alves

Descritores: 1. TERAPIA A LASER DE BAIXA INTENSIDADE. 2. SISTEMA IMUNOLÓGICO. 3. NEOPLASIAS DE CABEÇA E PESCOÇO. 4. MUCOSITE ORAL. 5. RADIOTERAPIA. 6. SALIVA.

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina”

Cora Coralina

DEDICATÓRIA

A uma parte pequena de mim, que cresce com meus exemplos e que forma seus conceitos. Que esta produção te mostre que, mesmo perante todas as adversidades, é possível produzir e ser mãe, dona de casa, mulher e uma boa profissional. Para quem todas as manhãs, ternamente me falou “Boa Aula, mãe!”.

AGRADECIMENTOS

Meus primeiros mestres, meus pais, suas histórias e ensinamentos me conduziram até este momento.

Meu Companheiro de Vida, meu sol, obrigada por me incentivar e não me deixar desistir. Da sua maneira, me impulsiona a galgar novos desafios e mudanças.

Aos grandes Professores que fizeram parte da pesquisadora que me formei. Dr. Benedito Alves de Castro Silva, Dra. Ivana Nascimento, Dr. André Carvalho e Dr. André Vettore muito obrigada por dividir comigo o seu conhecimento.

A meu orientador Prof. Dr. Fábio Abreu Alves, muito obrigada por aceitar este desafio e a Dra, Dirce Maria Carraro por depositar sua confiança na condução da pesquisa e pelas valiosas contribuições ao trabalho.

Ao A.C.Camargo Cancer Center, esta grande instituição, que me proporcionou mais uma vez a possibilidade de uma formação de excelência, que acreditou no meu projeto e que forneceu o financiamento, através do Prêmio Ricardo Brentani, para condução da pesquisa.

Ao Dr. Divaldo Prado, titular do Depto de Estomatologia, por ser entusiasta e acreditar que esta pesquisa traria bons frutos.

A Dra. Elisa Napolitano pelo apoio na condução deste trabalho, desde as etapas da bancada até a análise dos dados. Posso dizer que este trabalho foi realizado a quatro mãos.

Pelas grandes amigas conquistadas durante esta jornada, Eloisa Oliviere, Ana Paula Suenaga, Louise Mota, Juliana Verrone, Nathalia Duarte, Anne Galindo, Gustavo Rabelo, Andrea Yagui.

Ao Biobanco por ter abraçado o desafio de realizar a extração do RNA de saliva e por ter conseguido realizar com excelência.

A todos os integrantes do Departamento de Estomatologia e aos titulares Dra Graziella Jaguar, Dr. Rodrigo Nascimento Lopes, Dr. André Caroli.

Aos colegas do Laboratório do Grupo de Genômica e Biologia Molecular, Dra. Adriana Nakahata, Dra. Claudia, Rafael, Kiwi e Isabela.

Aos Integrantes desta instituição de Saúde, Ensino e Pesquisa, A.C.Camargo Cancer Center, Juscelino, Vanessa Pereira, Gilmara.

À Suely e a todos da Biblioteca do A.C.Camargo Cancer Center, pelo apoio e ajuda.

À Ana Kuninari, Luciana, Vanusa e todos da Pós-Graduação do A.C.Camargo Cancer Center, que me receberam mais uma vez.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por seu apoio através da bolsa concedida, que possibilitou a condução do Doutorado.

RESUMO

Lessa RC. **Efeitos da fotobiomodulação na imunidade de pacientes com mucosite oral**. São Paulo; 2016 [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

A mucosite oral é a toxicidade aguda mais comum que acomete os pacientes submetidos à radioterapia em região de cabeça e pescoço. Das diversas formas de controle e tratamento desta lesão, a terapia com laser de baixa intensidade tem demonstrado, clinicamente, ser eficaz no controle da doença. Porém, não há um completo entendimento de como esta modalidade terapêutica atua na estimulação do sistema imunológico destes pacientes. Assim, o objetivo deste estudo foi investigar os mecanismos moleculares envolvidos na ação da laserterapia como tratamento da lesão no que se refere aos aspectos imunológicos. Para isso, foi realizado RT-PCR em tempo real (*TaqMan® Gene Expression Assays*), utilizando um painel de genes relacionados com o sistema imunológico, onde o nível de expressão gênica foi avaliado em 60 amostras de saliva coletadas de 23 pacientes portadores de câncer de boca, orofaringe e nasofaringe tratados por radioterapia exclusiva ou radioterapia associada à quimioterapia. Estes pacientes foram divididos em 3 grupos com diferentes intensidades de laser e modalidades terapêuticas: Grupo A preventivo (Potência de 15 mW e densidade de energia de 3,8 J/ cm²) com 8 pacientes e 23 amostras, Grupo B preventivo (Potência de 25 mW e densidade de energia de 6,3 J/ cm²) com 8 pacientes e 22 amostras e o Grupo C-controle- curativo (Potência de 15 mW e densidade de energia de 3,8 J/ cm²) com 7 pacientes e 15 amostras. Os resultados obtidos, através da análise de 52 genes, demonstraram que 42 genes apresentaram alteração de expressão ao longo da evolução da mucosite oral, sendo possível identificar que os genes *CCL3*, *CCR7*, *SYK* foram relacionados com a instalação e progressão da doença. Além disso, através das diferentes análises de expressão entre diferentes grupos estudados foi possível inferir que a modulação da expressão dos genes *CCL2*, *CCL3*, *IL-1A*, *MIF*, *NFKB2*, *TNF* podem dar respaldo molecular aos melhores resultados clínicos previamente observados na laserterapia preventiva, com potência de 15 mW e densidade de energia de 3,8 J/ cm². Assim, este trabalho gerou dados moleculares iniciais sobre os mecanismos da imunoregulação que estão envolvidos com a instalação e progressão da mucosite e com a fotobiomodulação usada no tratamento das lesões.

SUMMARY

Lessa RC. [Effects of photobiomodulation in the immunity of patients with oral mucositis]. São Paulo; 2016 [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Oral mucositis is the most common acute toxicity affecting patients undergoing radiotherapy in head and neck. Of the different ways of controlling and treating this lesion, low intensity laser therapy has shown clinically effectiveness in controlling the disease. However, it is not fully understood how this therapeutic modality acts in stimulating the immune system of these patients. Therefore, the objective of this study was to investigate the molecular mechanisms involved in the action of laser therapy for the treatment of this lesion regarding the immunological aspects. For this purpose, real time RT-PCR (*TaqMan Gene Expression Assays*) was performed, using a panel of genes related to immune system, in which the level of gene expression was evaluated in 60 saliva samples collected from 23 patients harboring mouth, oropharynx and nasopharynx cancer treated by radiotherapy alone or radiotherapy combined with chemotherapy. These patients were divided into 3 groups with different laser intensities and treatment modalities: Group A preventive (power of 15 mW and energy density of 3.8 J / cm²) with 8 patients and 23 samples, preventive Group B (25 mW Power and energy density of 6.3 J / cm²) with 8 patients and 22 samples and Group C curative (15 mW of power and energy density of 3.8 J / cm²) with 7 patients and 15 samples. The results obtained, through the analysis of the 52 genes, showed that the expression of 42 genes was changed throughout the evolution of oral mucositis. It was possible to identify that the genes *CCL3*, *CCR7*, *SYK* were related to the onset and progression of the disease. Moreover, through different expression analyzes among the different groups studied it was possible to infer that gene expression modulation of *CCL2*, *CCL3*, *IL-1A*, *MIF*, *NFKB2*, *TNF* can give molecular backing to the best clinical results previously observed in preventive laser therapy, with power of 15 mW and energy density of 3.8 J / cm². Thus, this study has generated initial molecular data on the mechanisms of immunoregulation involved in the onset and progression of mucositis and with photobiomodulation being used as treatment for these lesions. the photobiomodulation used in treatment of injuries.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Efeitos biomodulatórios e bioestimulatórios produzidos pela ação do laser de baixa intensidade a nível celular.....	7
Figura 2	O sistema imune pode ser induzido diretamente pelos receptores de reconhecimento de antígenos (PRPs) ou indiretamente pela ativação dos linfócitos T e anticorpos.....	12
Figura 3	Tabela de dados clínicos.....	29
Figura 4	Descrição dos grupos de acordo com a classificação da mucosite....	30
Figura 5	Gel de eletroforese do <i>2100 bioanalyzer Eukaryote Total RNA Nano</i>	39
Figura 6	Curva de amplificação do <i>GAPDH</i> em ensaio TaqMan.....	41
Figura 7	Curva de amplificação do <i>GAPDH</i> em ensaio <i>TaqMan® Array Gene Signature 384-Well Plate</i> , para todas as amostras do estudo, em ensaio único.....	42
Figura 8	Fluxograma de processamento das amostras	44
Figura 9	Disposição seriada de expressão gênica em relação à evolução da mucosite.....	48
Figura 10	Rede de proteínas que interagem, representado pelo nome do gene, gerado pelo <i>STRING</i>	50
Figura 11	Comparação dos grupos de evolução da mucosite para identificação de genes diferencialmente expressos no curso da doença.....	52

Figura 12	Diagrama de Venn para genes diferencialmente expressos entre graus de mucosite.....	54
Figura 13	Comparação entre grupo A (preventivo) e grupo C (curativo), nas amostras onde a mucosa não apresentava lesões de mucosite oral..	57
Figura 14	Comparação entre grupo A (preventivo) e grupo C (curativo), nas amostras onde a mucosa apresentava úlceras decorrentes de mucosite oral.....	59
Figura 15	Comparação entre grupo A (Potência 15mw, comprimento de onda 3,8 j/cm ² -preventivo) e grupo B (Potência 25mw, comprimento de onda 6,3 j/cm ² -preventivo), nas amostras onde a mucosa não apresentava lesões de mucosite oral.....	60
Figura 16	Comparação entre grupo A (Potência 15mw, comprimento de onda 3,8 j/cm ² -preventivo) e grupo B (Potência 25mw, comprimento de onda 6,3 j/cm ² -preventivo) nas amostras onde a mucosa apresentava úlceras decorrentes de mucosite oral.....	62
Figura 17	Comparação entre grupo B (Potência 25mw, comprimento de onda 6,3 j/cm ² -preventivo) e grupo C (Potência 15mw, comprimento de onda 3,8 j/cm ² -curativo), nas amostras onde a mucosa não apresentava lesões de mucosite oral.....	64
Figura 18	Comparação entre grupo B (Potência 25mw, comprimento de onda 6,3 j/cm ² -preventivo) e grupo C (Potência 15mw, comprimento de onda 3,8 j/cm ² -curativo), nas amostras onde a mucosa apresentava úlceras decorrentes de mucosite oral.....	66
Figura 19	Genes diferencialmente expressos entre as comparações.....	68

Figura 20	Diagrama de Venn para genes diferencialmente expressos em mucosa normal entre as comparações dos grupos (AxC, AxB e BxC).....	70
Figura 21	Diagrama de Venn para genes diferencialmente expressos em mucosa ulcerada entre as comparações dos grupos (AxC, AxB e BxC).....	72

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Especificações dos protocolos de aplicação do laser para cada grupo, área do Spot em todos os aparelhos de 4mm ²	26
Quadro 2	Descrição da classificação da mucosite segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) e do National Cancer Institute (NCI).....	26
Quadro 3	Lista dos 52 genes selecionados para avaliação de expressão.....	45
Quadro 4	Genes diferentemente expressos entre os grupos de amostras com diferentes graus de mucosite.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Grau Celsius
3D	Radioterapia Conformada Tridimensional
A.U.C.	<i>Area Under the Curve</i>
AP-1	Ativador de Proteína 1
Ca⁺⁺	Cálcio
cDNA	DNA Complementar
cm	Centímetro
COX2	Citocromo C Oxidase Subunidade II
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados Dntp's
DTT	Ditiotreitol
EGF	Fator de Crescimento Epidermal
FGF	Fator de Crescimento do Fibroblasto
FGF1	Factor de Crescimento de Fibroblastos 1
FGF2	Factor de Crescimento de Fibroblastos 2
GaAlAs	Gálio e Alumínio e Arsenieto
Gy	Gray
Hsp70	Proteínas Protetoras de Choque Térmico70
IFN_c	Interferon-C
IFN_γ	Interferon Gama
IGF	Fatores de Crescimento Semelhantes à Insulina
IL1	Interleucina 1
IL11	Interleucina 11
IL1_β	Interleucina 1 Beta
IL2	Interleucina 2
IL4	Interleucina 4
IL8	Interleucina 8
IMRT	Radioterapia com Intensidade Modulada do Feixe
J/cm²	Joule por Centimetro Quadrado

KGF	Fator de Crescimento de Queratinócitos
M0	Mucosite Grau 0
M1	Mucosite Grau 1
M2 e 3	Mucosite Grau 2 E 3
MCP1	Proteína 1 Quimioatrativa de Monócitos.
mg	Miligramas
mg/m²	Miligramas por Metro Quadrado
MIP1α	Proteína Inflamatória de Macrófago 1 Alfa
ml	Mililitros
MLH1	Mutl Homólogo 1, Câncer de Cólon, sem Polipose Tipo 2
mW	Megawatt
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NCI	<i>National Cancer Institute</i>
NFκB	Fator Nuclear Kappa B
ng	Nanograma
ng/ul	Nanogramas por Microlitro
NGF	Fator de Crescimento Nervoso
NO	Óxido Nítrico
O2	Oxigênio
OMS	Organização Mundial de Saúde
PIGF	Factor de Crescimento Derivado de Placenta
pb	Pares de Base
PDGF	Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas
pmoles	Picomol
PRPs	Receptores de Reconhecimento de Antígenos
RIN	Número de Integridade do RNA
RNA	Ácido Ribonucleico
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
TGFα	Fator de Transformação do Crescimento Alfa
TGFβ1	Fator de Crescimento B1,
TLBP	Terapia com Laser de Baixa Potência

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1.	A Mucosite Oral.....	1
1.2	Fotobiomodulação com Laser de Baixa Potência.....	4
1.3	Modulação do Sistema Imune.....	10
1.4	O Laser de Baixa Potência Modulando a Resposta Imune.....	13
1.4.1	Imunoregulação no Tratamento Oncológico.....	13
1.4.2	Estudos em Cultura de Células.....	14
1.4.3	Estudos em Modelos Animais e Ensaios Clínicos.....	16
2	OBJETIVOS.....	19
2.1	Objetivos Gerais.....	19
2.2	Objetivos Específicos.....	19
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.1	Caracterização do Estudo.....	21
3.2	População e Critérios de Inclusão e Exclusão.....	21
3.3	Terapia Anti-neoplásica.....	24
3.4	Aplicação da Luz do Laser.....	24
3.5	Pontos de Aplicação.....	27
3.6	Coleta da Saliva e Definição dos Grupos.....	28
3.7	Análise Molecular.....	30
3.7.1	Processamento das Amostras e Extração do RNA.....	31
3.7.2	Tratamento com DNase e Síntese do cDNA.....	32
3.8	Quantificação dos Alvos Gênicos.....	33
3.9	Coleta de Dados e Análises Estatísticas.....	35
3.10	Análises dos Dados.....	36
4	RESULTADOS.....	38
4.1	Coleta das Amostras.....	38

4.2	Extração do RNA.....	39
4.3	Síntese do cDNA.....	40
4.4	Quantificação dos Alvos Gênicos.....	41
4.5	Avaliação da Modulação da Expressão Gênica em Grupos de Amostras Representativas da Evolução da Mucosite.....	45
4.6	Identificação de Genes Modulados ao Longo do Desenvolvimento e Evolução da Mucosite oral.....	51
4.7	Avaliação da Diferença de Expressão Gênica entre as Modalidades Terapêuticas Avaliadas no Estudo.....	56
4.7.1	Efeito da Ação do Laser Baixa Potência na Mucosa Normal.....	57
4.7.2	Avaliação da Resposta Imune Frente à Ação Preventiva do Laser em Mucosa Ulcerada.....	58
4.7.3	Papel das Diferentes Potência do Laser na Mucosa Normal.....	60
4.7.4	Papel das Diferentes Potência do Laser no Manejo da Mucosa Ulcerada.....	62
4.7.5	Efeito da Ação do Laser com Potência Elevada em Mucosa Normal.....	64
4.7.6	Resposta Imune Frente à Ação Preventiva do Laser de Potência Elevada em Mucosa Ulcerada.....	65
4.7.7	Correlação das Bases Moleculares do Tratamento de Laserterapia.....	69
5	DISCUSSÃO.....	74
6	CONCLUSÃO.....	96
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	98

ANEXOS

Anexo 1 Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP

Anexo 2 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Anexo 3 Ficha Clínica

Anexo 4 Tabela da casuística dos casos.

- Anexo 5** Genes contidos no RT-qPCR array da via de resposta imune (TaqMan® Array 96-well Human Immune Response Plate – Applied Biosystems).
- Anexo 6** Tabela com a quantificação pelo espectrofotômetro (NANODROP-ND1000) das amostras de RNA extraídas.
- Anexo 7** Tabela de valores de expressão e *p valor* para os genes diferencialmente expressos entre os graus de evolução da mucosite.
- Anexo 8** Tabela de valores de expressão e *p valor* para os genes diferencialmente expressos entre os grupos de tratamento para Mucosite Oral.

1 INTRODUÇÃO

1.1 A MUCOSITE ORAL

A mucosite é a toxicidade não hematológica mais importante relacionada ao tratamento quimioterápico ou radioterápico para o câncer e se caracteriza pelo dano a mucosa oral e da orofaringe. A mucosite oral é observada em 97% dos pacientes submetidos à radioterapia convencional de cabeça e pescoço, 89% dos submetidos à radioterapia de cabeça e pescoço associada à quimioterapia e 100% dos submetidos à radioterapia de cabeça e pescoço com hiperfracionamento de dose. (SONIS 2004b; LOGAN et al. 2007).

Nas manifestações intensas da mucosite oral os pacientes desenvolvem ulcerações, resultando em dor, diminuição na qualidade de vida, aumento do tempo de hospitalização, alto risco de infecções locais e sistêmicas, além de modificações no regime do tratamento anti-neoplásico. Alguns estudos têm demonstrado que existe alto risco para a proliferação das células tumorais quando o tratamento radioterápico é interrompido ou atrasado, representando redução no controle loco-regional do tumor. Alguns autores estimam que para cada dia de tratamento radioterápico interrompido, diminui 1% a taxa de controle local do tumor (RUSSO et al. 2008).

A patogênese da mucosite decorre dos efeitos tóxicos, não específicos do tratamento anti neoplásico sobre as células do epitélio basal da cavidade oral que estão em constante divisão celular. Alguns estudos mostram que os processos biológicos são representados por mudanças no endotélio, no tecido conjuntivo e no

epitélio, a interação destes elementos com a matriz extracelular e com as citocinas pró-inflamatórias, além dos fatores locais, como a microflora oral, a saliva, e o trauma funcional. Sendo assim, estes fatores podem fornecer um ambiente natural que modula a frequência, o curso e a severidade da mucosite (SONIS et al. 2000; SONIS 2002; LOGAN et al. 2007; AL-DASOOQI et al. 2010).

Em 1998, SONIS propôs um modelo que descrevia os estágios que estariam envolvidos no desenvolvimento da mucosite. Dessa forma, a patobiologia da mucosite oral foi descrita em cinco fases sucessivas. Fase de iniciação, fase de resposta ao dano primário ou inflamatória, fase de amplificação de sinal ou epitelial, fase ulcerativa e cicatrização (BLIJLEVENS et al. 2000; SONIS 1998).

Na fase inflamatória, múltiplos eventos, como o dano celular provocado pela quimioterapia e pela radioterapia, a produção do ROS (espécies de oxigênio reativos) e seu dano direto ao DNA celular, ocorrem simultaneamente o que resultaria na injúria a mucosa. Estes fatores levam a ativação de diversos fatores de transcrição, dentre eles, o fator nuclear kappa B (NF κ B) é o mais estudado no desenvolvimento e instalação da mucosite. A ativação desta cascata regula a expressão de diversos genes envolvidos na patogênese da doença, incluindo aqueles que resultam na produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β , IL-6), o que desencadeia o dano ao tecido e a apoptose (SONIS 2007).

Na fase epitelial, o sinal de amplificação da doença, no qual é observado um aumento no quadro inflamatório, ocorre como consequência da ativação das citocinas pró-inflamatórias devido a mecanismos de *feedback* positivo, causando a ativação de fatores de transcrição que, subsequentemente, aumenta a produção de citocinas. Outras vias de sinalização como a MAPK e a c-JUN, são também hiperativadas,

potencializando e amplificando os sinais biológicos, produzindo maiores danos ao tecido (BLIJLEVENS et al. 2000; SONIS et al. 2004a).

A fase ulcerativa, por sua vez, é a mais significativa para a equipe médica e para o paciente, pois, apresenta uma série de fatores que vão culminar nos sinais e sintomas mais significativos da mucosite. As úlceras da mucosite são rapidamente colonizadas por bactérias orais, que por sua vez, impulsionam a produção de citocinas pró-inflamatórias através da estimulação dos macrófagos e pela liberação de maior quantidade de metaloproteinases, tornando o infiltrado inflamatório mais robusto (SONIS 2007).

Prevenir a ulceração da mucosa oral significa minimizar a dor do paciente, diminuir os riscos de infecção, reduzir a utilização de sondas para alimentação, a eliminação da possibilidade de internação hospitalar e o mais importante, diminuir o risco de interromper o tratamento antineoplásico (SONIS 2009).

Estudos mostram que na fase final de cicatrização ocorre uma estimulação do fator de crescimento epidermal (EGF), a interleucina-11(IL-11), fator de transformação do crescimento alfa (TGF- α) e o fator de crescimento do fibroblasto (FGF). Estes agentes parecem promover o reparo e a regeneração do epitélio, mas exercem um papel limitado na cicatrização da mucosa oral. Contudo, os efeitos biológicos que ocorrem nesta fase ainda não são bem determinados. Assim, apesar da mucosa apresentar uma aparência normal, o microambiente se apresenta alterado com uma angiogênese residual, e o paciente, portanto, apresenta um maior risco de desenvolver futuros episódios de mucosite oral e outras complicações da terapia oncológica (BLIJLEVENS et al. 2000; SONIS et al. 2004; LOGAN et al. 2007).

As citocinas são mediadores inflamatórios endógenos pleiotrópicos, ou seja, exercem tanto efeitos regulatórios negativos e como positivos em várias células alvos, podendo levar a processos inflamatórios agudos ou crônicos. Os efeitos inflamatórios produzidos podem levar a formação de edema, aumento do fluxo sanguíneo, aumento da permeabilidade vascular o que resulta em vermelhidão e dor. Sendo assim, estes eventos inflamatórios, que ocorrem durante o desenvolvimento da mucosite, tem sido associado ao desencadeamento da cascata de sinalização de ativação das citocinas. Assim, no processo de desenvolvimento da mucosite, o fator nuclear kappa B (NFkB) representaria um mensageiro secundário, que induziria a expressão gênica de diversas citocinas envolvidas na inflamação da mucosa e na angiogênese (DINARELLO et al. 2000; PAPADAKIS e TARGAN et al. 2000; SONIS et al. 2002; SULTANI et al. 2012).

1.2 FOTOBIMODULAÇÃO COM LASER DE BAIXA POTÊNCIA

Nos últimos anos foram desenvolvidas algumas intervenções terapêuticas que visavam reduzir a morbidade da mucosite oral. Com este propósito, tem se sugerido a avaliação dos pacientes que receberão terapia oncológica quanto aos fatores de risco potenciais para complicações orais. Além disso, estes pacientes necessitam de orientação e esclarecimentos quanto a um melhor controle da higiene oral, uso de agentes antimicrobianos e antissépticos tópicos, agentes anti-inflamatórios, uso de drogas que estimulem a produção de saliva, de citocinas e fatores de crescimento e a aplicação local de métodos não farmacológicos, como a crioterapia e a terapia com

laser de baixa potência (TLBP) (STOKMAN et al. 2006; AL-DASOOQI et. al. 2013).

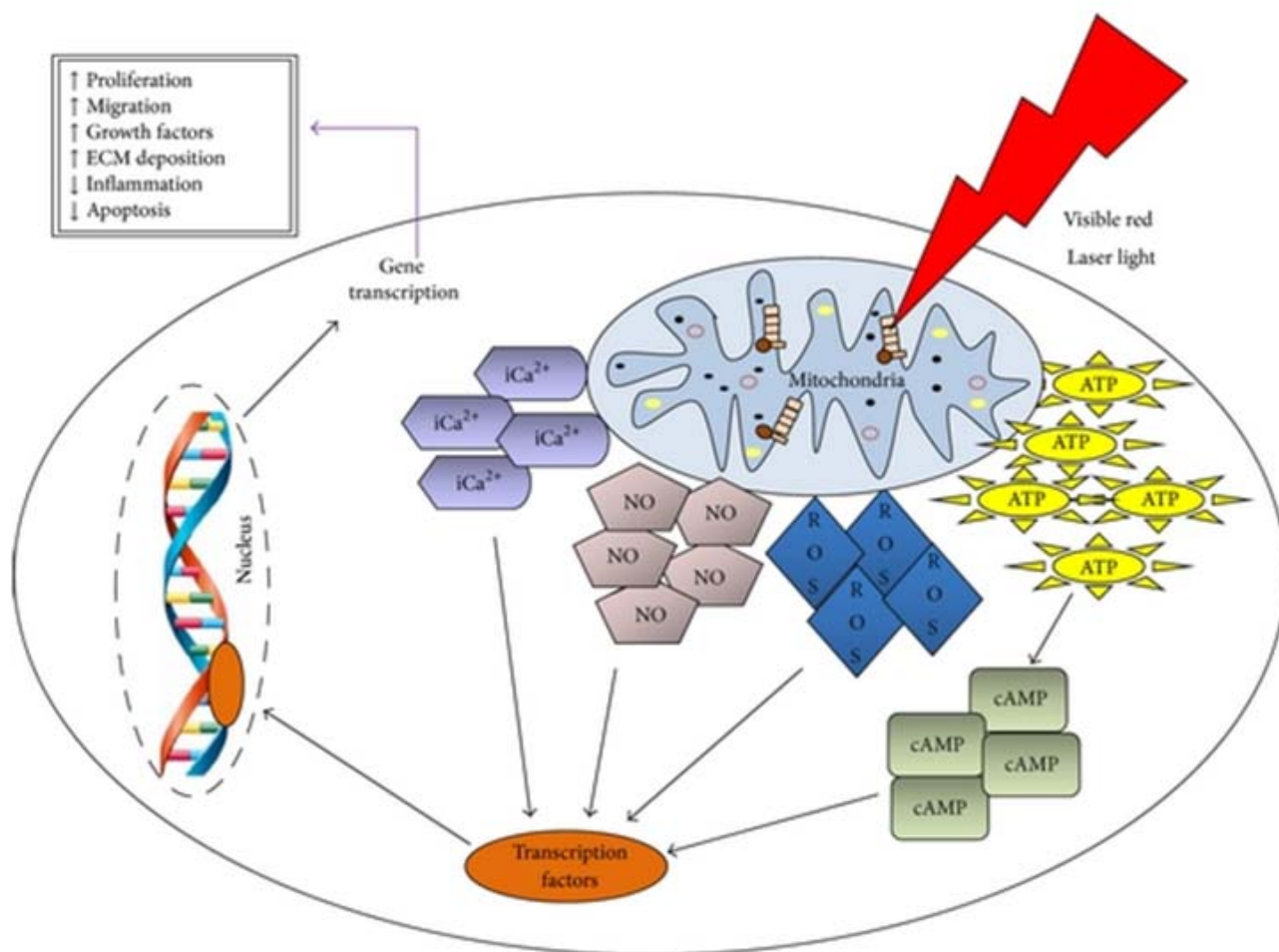
A TLBP tem sido proposta por ter vários efeitos terapêuticos e por ser uma modalidade não invasiva. Esta terapia consiste em uma forma de emissão de luz com potência de saída menor ou igual a 500mW e é, portanto, considerada radiação não térmica para tecidos vivos. Este tipo de laser utiliza dosagens baixas (menor que 35J/cm²), incapaz de produzir aquecimentos detectáveis em tecidos irradiados (CHEN et al. 2014).

A efetividade desta modalidade terapêutica está comprovada quanto ao alívio da dor e ao promover a recuperação de algumas patologias, incluindo tendinopatias, osteoartrites, distúrbios da articulação temporomandibular, cicatrização de feridas e lesões de nervos (CHEN et al. 2014).

A ação do laser sobre os tecidos ocorre através da irradiação das células, levando a ativação de componentes celulares e ao desencadeamento de reações químicas específicas, responsáveis por alterar o metabolismo celular. Portanto, quando ocorre a bioestimulação dos tecidos pelo laser, uma cadeia de eventos moleculares é desencadeada. Estes eventos se iniciam pela absorção da luz pelos componentes da cadeia respiratória (Citocromo c, Flavina desidrogenase) que levam a sua ativação. Esta ativação por sua vez, modifica as reações de redução tanto da mitocôndria como do citoplasma celular. O estímulo destes fatores leva a alteração na concentração de NO (óxido nítrico), alteração na atividade respiratória celular, aumento na produção de oxigênio e conseqüentemente mudanças transcricionais. Todas estas alterações influenciam na permeabilidade e conseqüentemente, no transporte da membrana celular (MORALES-ROJAS et al. 2012). Sendo assim,

ocorre modificação na bomba de sódio e potássio, que influencia a atividade da ATPase, modificação no influxo de Ca^{++} , que influencia os níveis de nucleotídeos cíclicos, que, por sua vez, modulam a síntese de DNA e RNA influenciando a proliferação celular (SMITH 1990; KARU 1999; REDDY 2004). Além disso, Esta cascata de eventos celulares promove o aumento da migração, modula dos níveis de citocinas, fatores de crescimentos e mediadores inflamatórios, e aumenta a oxigenação dos tecidos (Figura 1) (HOURELD 2014).

Todas essas alterações no metabolismo celular levam a redução da dor, da inflamação e do edema, favorecendo a cicatrização das feridas, dos tecidos submucosos e nervos, prevenindo a morte celular e o dano ao tecido.



Fonte: HOURELD (2014)

Figura 1 - Efeitos biomodulatórios e bioestimulatórios produzidos pela ação do laser de baixa potência a nível celular. A ação ocorre com a estimulação da mitocôndria, que através do aumento da produção de ATP (adenosina trifosfato), ROSs (espécies de oxigênio reativo) e NO (óxido nítrico), além da alteração do estado de excitação eletrolítico, promove indução das vias de sinalização celular.

Publicações recentes têm demonstrado que o uso do LBP na prevenção e tratamento da mucosite induzida por quimio e radioterapia é significativamente melhor do que os métodos tradicionais. Este método pode promover a aceleração da cicatrização das lesões, além de reduzir a dor e a inflamação além de agir como agente antimicrobiano (WONG e WILDER-SMITH et al. 2002; JAGUAR et al. 2007; AL-DASOOQI N et al. 2013; ANTUNES et al. 2016; FERREIRA et al. 2016).

Apesar desta terapia ser utilizada por anos, não há uma padronização dos protocolos de utilização do laser. Mesmo com as diferenças observadas nos protocolos utilizados, vários estudos mostraram resultados divergentes quanto ao LBP produz benefícios para reduzir a severidade da mucosite oral radioinduzida e da dor (ARORA et al. 2008; SIMÕES et al. 2009; ZANIN et al. 2010; CARVALHO et al. 2011; GOUVÊA DE LIMA et al. 2012).

As diferenças de energia e potência do LBP utilizados como modalidade terapêutica podem ser a causa dos diversos resultados encontrados, contudo, uma diminuição da progressão da mucosite oral esteve presente em quase todos os estudos. Recentemente, o nosso grupo demonstrou os efeitos clínicos do LBP na prevenção e redução do grau de mucosite oral em pacientes submetidos a radioterapia para tratamento de neoplasias malignas de boca e orofaringe. Os autores avaliaram os pacientes de duas formas: diariamente e semanalmente. A avaliação diária mostrou que os pacientes do grupo 1 tratados com LBP preventivo (660 nm/15 mW/3.8 J/cm² /spot size 4 mm²) demoraram em média 13,5 dias para apresentar mucosite grau II, contra 9,8 dias do grupo 2 preventivo (660 nm/5 mW/ 1.3 J/cm² /spot size 4 mm²). A avaliação semanal também apresentou resultados com significância estatística (CARVALHO et al. 2011).

Outros autores, como GAUTAM et al. (2012), avaliaram o efeito do LBP na prevenção de mucosite oral em pacientes com neoplasia maligna de boca, tratados com quimio e radioterapia. O grupo tratado com laser apresentou, em média, 4,07 dias de mucosite nos graus mais severos, enquanto o grupo tratado com luz placebo apresentou, em média 13,96 dias de mucosite nos seus graus mais severos (GAUTAM et al. 2012).

Muitos estudos mostram evidências de que o LBP é capaz de prevenir a evolução da mucosite oral para graus mais avançados da doença, mas não há evidências que esta modalidade terapêutica seja capaz de modular completamente os mediadores inflamatórios (ALBERTINI et al. 2004; ALBERTINI et al. 2007; ARORA et al. 2008).

No estudo realizado pelo nosso grupo (CARVALHO et al. 2011) ficou demonstrado que o tratamento preventivo da mucosite em pacientes oncológicos de cabeça e pescoço com LBP (660 nm/15 mW/3.8 J/cm² /spot size 4 mm²) é eficaz no manejo das lesões, proporcionando controle na evolução das lesões e redução da dor, o que permite que o paciente não interrompa o tratamento anti-neoplásico e conseqüentemente proporcionando uma melhor qualidade de vida. Diante desta evidência, buscou-se uma melhor compreensão de como a biomodulação celular pelo LBP poderia influenciar os mecanismos imunoregulatórios envolvidos na evolução da doença.

1.3 MODULAÇÃO DO SISTEMA IMUNE

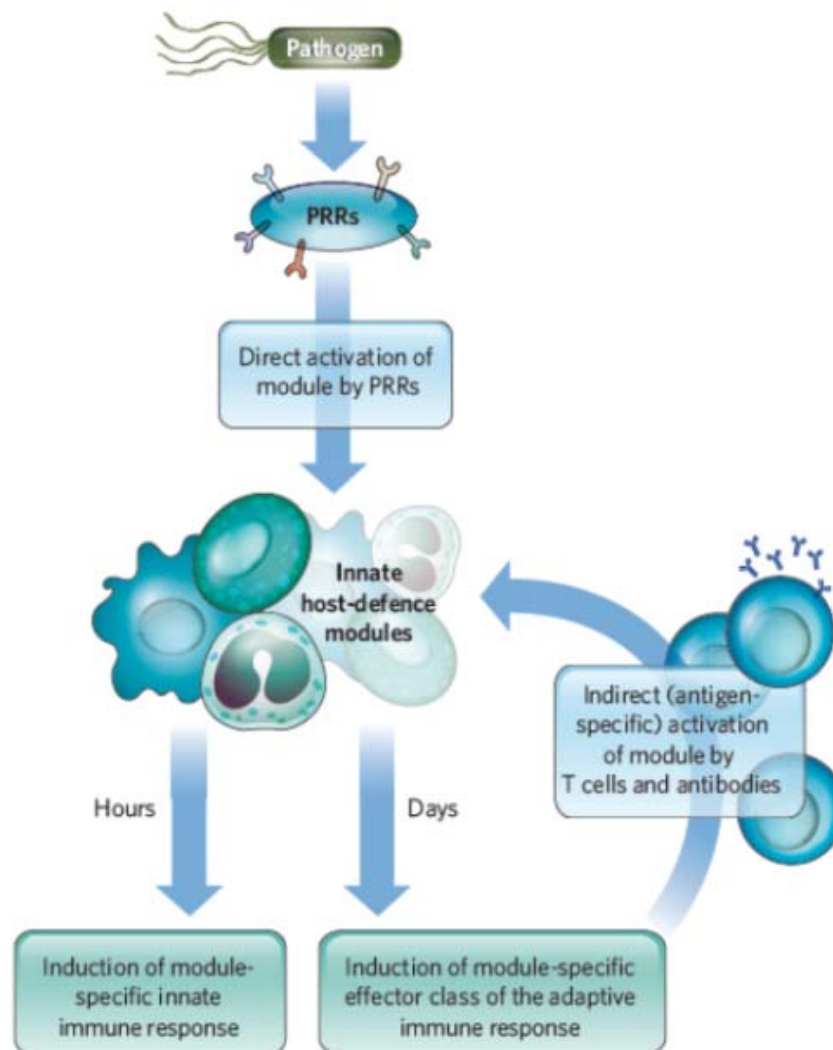
A inflamação é um processo coordenado induzido por infecção microbiana ou lesão do tecido (NATHAN 2002). A função principal da inflamação é reparar o dano tecidual e sanar a infecção, proporcionando uma condição de retorno a homeostase tecidual. Portanto, a resposta inflamatória ideal é rápida e destrutiva, não necessariamente específica e auto limitante. O equilíbrio entre estes pontos pode ser observado em algumas infecções crônicas ou em desordens inflamatórias, como a mucosite, onde a resposta inflamatória causa mais danos ao hospedeiro do que ao microorganismo (NATHAN 2002; BARTON 2008).

O sistema imune pode ser dividido em dois ramos interligados. A imunidade inata proporciona a primeira linha de defesa do hospedeiro contra a infecção bacteriana ou viral e doenças. Suas células e receptores vão detectar e sinalizar ocorrência de infecção microbiana, desencadeando uma cascata inflamatória que irá ajudar a conter a infecção e a ativação da resposta imune adaptativa, a segunda parte do sistema imunológico (MEDZHITOV 2007; MURALIDHARAN AND MANDREKAR 2013) (Figura 2). Esta, por sua vez, irá ativar linfócitos específicos para combater os agentes causadores da infecção. Esta etapa é um processo altamente eficaz e específico, mas que leva dias para se desenvolver plenamente (MIYAKE 2007; BARTON 2008).

Portanto, uma das funções do processo inflamatório é o reconhecimento dos microorganismos pelos receptores do sistema imune, levando a um reconhecimento dos componentes microbianos por receptores de antígeno de linfócitos T e B. Os linfócitos tem a capacidade de reconhecer diversos antígenos bacterianos, como

lipopolisacarídeos e peptidoglicano da parede celular de bactérias, através de seus receptores, o que lhes confere a capacidade de detectar a grande gama de diversidade microbiana (BARTON 2008).

O reconhecimento dos antígenos bacterianos por estes receptores de superfície leva a sinalização de uma cascata gênica, culminando na ativação do NFkB e AP-1, promovendo a expressão genica de citocinas pró-inflamatórias (TNFa, IL-6, e IL-1 β), e quimiocinas, (IL-8, MCP-1 ou CCL2 e MIP-1 α ou CCL3) e ao começo da produção de sinais que dão início a imunidade adaptativa (BARTON 2008; MURALIDHARAN e MANDREKAR 2013). Além destes receptores, os linfócitos possuem uma grande família de “receptores de reconhecimento” citosólicos que participa na detecção de agentes patogênicos que são capazes de entrar nas células hospedeiras levando ao aumento de produção de citocinas, controle da ativação do complexo multiproteico envolvido na ativação de caspase-1, o que leva à secreção de IL-1, uma citocina pró-inflamatória que medeia muitos dos primeiros sinais que estabelecem um estado inflamatório (MARIATHASAN e MONACK 2007; MEDZHITOV 2007). As funções da via destes receptores estão interligadas em múltiplos pontos, reforçando-se mutualmente (BARTON 2008).



Fonte: MEDZHITOV (2007)

Figura 2 - O sistema imune pode ser induzido diretamente pelos receptores de reconhecimento de antígenos (PRPs) ou indiretamente pela ativação dos linfócitos T e anticorpos. Cada sistema é caracterizado por mecanismos distintos de defesa antimicrobiana e pode ativar a resposta imune inata ou a adaptativa.

1.4 O LASER DE BAIXA POTÊNCIA MODULANDO A RESPOSTA IMUNE

A TLBP promove a imunoregulação, tendo influência direta sobre citocinas e fatores do crescimento. Está estabelecido que esta terapia age nas células do sistema imune de diversas maneiras, como por exemplo na estimulação das células irradiadas para um nível maior de atividade (TADAKUMA 1993). Porém, o exato mecanismo de ação do LBP ainda permanece sob investigação. Sabe-se que estes mecanismos estão, provavelmente, relacionados a ação fotoquímica, que afetam a regulação biológica do óxido nítrico e da adenosina trifosfato, podendo alterar o processo inflamatório e a modulação de citocinas, influenciando, portanto, no processo imunológico (CHEN et al. 2014).

1.4.1 Imunoregulação no Tratamento Oncológico

Nos estudos de modulação do sistema imune de pacientes oncológicos, deve-se levar em consideração que, tanto a doença como a terapia anti-neoplásica altera o estado normal de defesa do organismo destes pacientes. Sendo assim, estudos têm avaliado como os efeitos do tratamento anti-neoplásico modulam o sistema imune nestes pacientes.

CITRIN et al. (2012) realizaram um estudo com pacientes que receberam tratamento de quimioterapia e/ou radioterapia em região de cabeça e pescoço com dose de 60 a 65 Gy a fim de mensurar os níveis de citocinas em saliva. Eles demonstraram que os níveis das citocinas salivares IL-4, IL-6, IL-8, EGF, MCP-1 ou CCL2, TNF- α e VEGF eram maiores em regiões que recebiam altas doses quando comparado a regiões de baixa dose. Observaram, ainda, que havia um aumento dos

níveis de algumas citocinas (IL-6, IL-8, MCP-1 ou CCL2 e TNF- α) à medida que havia aumento na dose de radiação (CITIN et al. 2012).

Em 2011 LAMBROS et al. realizaram um estudo em modelo tridimensional de culturas de células orais humanas, composta de queratinócitos e fibroblasto, como um modelo de mucosite oral, a fim de identificar e avaliar o estresse molecular e celular após a irradiação com 2 e 12 Gy. Eles concluíram que a irradiação de 12 Gy afeta significativamente a expressão de diversos genes da via do NFkB e diversas citocinas inflamatórias como a IL-1 β , IL-8, NFkB1 e FOS quando comparado com tecido não irradiado, enquanto que no modelo irradiado com 2Gy não houve alterações significativas (LAMBROS et al. 2011).

Sendo assim, deve-se considerar que o sistema imunológico nos pacientes oncológicos, em tratamento anti-neoplásico, apresenta-se alterado devido as lesões celulares e teciduais causadas pelas terapias de combate a células cancerosas.

1.4.2 Estudos em Cultura de Células

Nos últimos anos tem aumentado o número de pesquisas que tentam elucidar os mecanismos envolvidos na ação do laser em diversos tipos de lesões. Em uma revisão de literatura sobre os efeitos da fotoirradiação a laser sobre a expressão gênica e liberação de fatores de crescimento por cultura de células ficou evidenciado que a liberação de fatores de crescimento e citocinas ocorrem a partir de uma gama muito ampla de diferentes tipos de células, e são dependentes dos parâmetros definidos, como por exemplo: comprimento de onda, densidade de potência, densidade de energia, número de exposições, e o intervalo entre as exposições (PEPLOW et al. 2011).

Estes autores compilaram os dados e observaram que houve a estimulação na libertação de alguns mediadores nas células irradiadas, enquanto a libertação de outros mediadores foi inalterada ou inibida, indicando que há efeitos específicos provocados pela laserterapia (PEPLOW et al. 2011).

O estudo publicado por VLADIMIROV et al. (2004) mostrou que a geração de ROS pela fotossensibilização pelo LBP no citoplasma das células induz a ativação da síntese de proteínas pelos radicais livres, principalmente a produção de NO-sintase e várias citocinas. Além disso, este trabalho estabeleceu a relação entre os mecanismos de estimulação da laserterapia e os efeitos secundários que determinam os efeitos sanativos da terapia no processo de cicatrização (ação bactericida, proliferação celular e melhora da microcirculação). Eles demonstraram que através da estimulação da irradiação, as heme-proteínas (hemoglobina e o citocromo c) podem facilmente dissociar-se para produzir o óxido nítrico livre. Por sua vez, o óxido nítrico liberado pode ser responsável pela vasodilatação dos vasos sanguíneos e a ativação da respiração mitocondrial (VLADIMIROV et al. 2004).

Outro estudo realizado sobre os efeitos do LBP na expressão de citocinas em linhagem celular de monócitos tratados com diferentes parâmetros (660 e 808nm, 0-3j/cm²) mostrou que a laserterapia com comprimento de ondas de 660nm pareceu ser um potencializador na produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas produzidas por monócitos M1. Além disso, os resultados dos ensaios *in vitro* indicaram que a dose ideal para promover uma maior efetividade na resposta imunológica das células M1 seria a de 1J/cm². Este mesmo grupo ainda estudou como a laserterapia sobre células tratadas com o inibidor de histonas acetiltransferase pode suprimir a expressão de TNF- α (CHEN et al. 2014).

Com base na apreciação de todos os artigos, pode-se avaliar que estudos com culturas de células não oferecem um consenso quanto a fotobiomodulação do LBP no sistema imunológico. Além disso, deve-se considerar que, tanto a radioterapia como o TLBP influenciam o padrão de expressão de genes associados a resposta imunológica das células da mucosa oral. Sendo assim, a avaliação pormenorizada da expressão destes genes em diferentes condições de tratamento podem auxiliar na compreensão de um complexo mecanismo molecular que ocorre nas células destas lesões.

1.4.3 Estudos em Modelos Animais e Ensaios Clínicos

Devido ao grande interesse do melhor conhecimento dos efeitos biológicos da radiação emitida pela laserterapia, NOVOSELOVA et al. (2006) estudaram os efeitos dos TLBP na atividade do sistema imune em modelos animais com populações de células T e macrófagos produzindo citocinas, proteínas protetoras, oxigênio ativo, e compostos nítricos em resposta a este estímulo. Este grupo demonstrou que o LBT tem implicações nos efeitos imunomodulatórios efetivo através da estimulação do timo, proporcionando uma diminuição dos níveis da Hsp70, NO e IL-2 (NOVOSELOVA et al. 2006).

Em um outro estudo com animais portadores de diabetes tipo II, os autores demonstraram que a irradiação com 632 nm 4 J/cm²/dia por 4 dias em feridas profundas de pele estimulou a cicatrização e aumento da expressão de bFGF até 36 horas após o processo (BYRNES et al. 2004). Enquanto que SAFAVI et al. (2008) demonstraram que a irradiação com 632,8 nm em cortes incisionais em gengivas de camundongos inibiu a expressão da interleucina-1b (IL-1b) e do interferon-c (IFN-c),

aumentou a expressão do PDGF e do TGF- β e não apresentou alteração nos níveis de expressão do bFGF e do Fator de Necrose Tumoral α (TNF- α) (SAFAVI et al. 2008).

O estudo realizado por USUMEZ et al. (2014) em modelo animal demonstrou que o LBP aumentou a expressão do PDGF (platelet-derived growth factor) e do bFGF (blood-derived fibroblast growth factor) em camundongos com mucosite induzida por 5-Fluoracil. Os papéis destas citocinas estão relacionados com a cicatrização de feridas (USUMEZ et al. 2013). O PDGF aumenta a secreção de outros fatores de crescimento pela estimulação de macrófagos e acelera o processo de cicatrização (HELDIN e WESTERMARK 1999). O bFGF estimula a proliferação e diferenciação celular de vários tipos de células. Estimula a proliferação dos fibroblastos, exerce um papel importante no processo de cicatrização e regula o crescimento e desenvolvimento dos melanócitos (TAKAMIYA et al. 2003).

Por sua vez, FUKUDA et al. (2013) avaliaram a modulação de citocinas inflamatórias (interleucina-6-IL-6; Fator de Necrose Tumoral α -TNF- α ; e interferon- γ -IFN- γ) e pró-inflamatórias (Fator de crescimento β 1-TGF- β 1) nos processos inflamatórios em camundongos que foram submetidos a estimulação pelo LBP. Eles conseguiram demonstrar que esta terapia foi capaz de reduzir a concentração de TNF- α e de IFN- γ em camundongos submetidos a procedimentos cirúrgicos e que passaram por duas sessões de laserterapia, a IL-6 apresentou alteração, mas não foi estatisticamente significativa enquanto que o TGF- β 1 não mostrou alteração sob efeito da laserterapia (FUKUDA et al. 2013).

Em estudo recente publicado por PEZELJ-RIBARIĆ et al. (2013) foi demonstrado que pacientes com Síndrome da Ardência Bucal tratados com LBP (comprimento de onda de 685 nm, potência de 30 mw, densidade de energia de 3.0

J/cm²) apresentaram redução estatisticamente significativa nos níveis de TNF- α e IL-6 em amostras de saliva e esta redução foi correspondente a melhora clínica dos pacientes quando comparado ao grupo controle.

SILVA et al. (2015) realizaram estudo comparando os níveis de mediadores de inflamação (TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-10, TGF-b, metaloproteinases e fatores de crescimento) na saliva e no sangue de pacientes que foram submetidos a transplante de células tronco hematopoiéticas que desenvolveram mucosite. Os resultados clínicos mostraram que houve um desenvolvimento menos severo da mucosite oral no grupo tratado com laserterapia quando comparado com o controle, observaram, ainda, que neste grupo houve um aumento nos níveis da IL-6, da TNF- α e da IL-1 β . Eles concluíram que a IL-6 parece exercer um papel central na resposta sistêmica ao dano celular e que a localização local e sistêmica desta citocina parece influenciar o processo de cicatrização (SILVA et al. 2015).

Mesmo com avanços no melhor entendimento na evolução do mucosite oral em pacientes oncológicos e com o incremento de diversos estudos sobre a influência da laserterapia no seu sistema imunológico, muito ainda se tem a desvendar sobre a influência da fotoestimulação na patobiologia dos tecidos e seus benefícios na prevenção e cura das lesões. Ressalta-se que até o momento, não há um completo entendimento de como os diversos parâmetros de modulação do laser alteram o sistema imune, interferindo no curso destas lesões. Portanto, o projeto buscou investigar as alterações na expressão gênica promovida através da fotobiomodulação, comparando diferentes parâmetros para laserterapia com fins curativos ou preventivos da mucosite oral.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

O objetivo deste estudo foi investigar as bases moleculares da atuação do laser com comprimento de onda de 660 nm aplicado com diferentes parâmetros (3,8 J/cm²–15mW e 6,3 J/cm²–25mW) e modalidades terapêuticas (Curativo e Preventivo) em relação à resposta imune em pacientes oncológicos que desenvolveram mucosite oral através do monitoramento da expressão de genes codificadores de citocinas e fatores de crescimento.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Selecionar genes, relacionados com a resposta imune, e avaliar o nível de expressão gênica utilizando o painel *TaqMan® Array Human Immune Response* em amostras seriadas de pacientes submetidos a diferentes intensidades de laser e modalidades terapêuticas;
- Identificar genes modulados ao longo do desenvolvimento da mucosite oral em amostras seriadas de saliva;
- Identificar genes modulados pela laserterapia com densidade de energia de 3,8 J/cm² e potência de 15mW na mucosa normal e na mucosa ulcerada;
- Identificar genes modulados na laserterapia preventiva com diferentes potências (15mw e 25mw) na mucosa normal e ulcerada;

- Identificar genes modulados pela laserterapia com densidade de energia de $6,3 \text{ J/cm}^2$ e potência de 25mW na mucosa normal e na mucosa ulcerada;
- Fornecer bases moleculares do sistema imunológico que sustentem a definição do protocolo mais eficaz de laserterapia para o manejo da mucosite oral, correlacionando com os dados clínicos de estudo previamente realizado.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO

A pesquisa foi baseada em estudo prospectivo randomizado que avaliou a eficácia de diferentes protocolos de laser com diferentes parâmetros e diferentes modalidades terapêuticas, na prevenção ou amenização, da mucosite oral em pacientes portadores de câncer de boca, orofaringe e nasofaringe tratadas por radioterapia exclusiva ou adjuvante a cirurgia ou radioterapia associada à quimioterapia, para estudar as bases moleculares da modulação da resposta imune.

Para isso foi avaliada a produção de citocinas e fatores de crescimento na saliva dos pacientes nas diversas fases do estudo. O projeto de pesquisa está associado à tese de doutorado do aluno Paulo André Carvalho, que desenvolveu o estudo clínico destes pacientes. Para esse fim, o estudo foi enviado à CONEP, sendo aprovado sob o parecer nº 507.028 (Projeto aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa com seres Humanos do A.C.Camargo Cancer Center sob número 1709/12 - Anexo 1).

3.2 POPULAÇÃO E CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Foram considerados elegíveis para o estudo 32 pacientes portadores de câncer de boca, orofaringe e nasofaringe que foram submetidos a tratamento radioterápico no A.C.Camargo Cancer Center, destes somente 26 prosseguiram no estudo. Os

pacientes foram elucidados sobre as suas características e o termo de consentimento pós-informado foi devidamente assinado por aqueles que aceitaram participar do mesmo.

▪ **Critérios de inclusão:**

- I. Paciente com neoplasias malignas em cavidade bucal, orofaringe e nasofaringe que foram submetidos à radioterapia 3D ou IMRT com doses em campos faciais iguais ou superiores a 60 Gy, seja em caráter exclusivo ou associado à quimioterapia.
- II. Pacientes que foram submetidos à radioterapia (esquema item 1) e quimioterapia com Cisplatina 100mg/ m² de 21 em 21 dias, sendo 3 ciclos durante a radioterapia.
- III. Pacientes que fizeram radioterapia (esquema item 1) e Cisplatina até 50mg/m² semanal, sendo 5 ou 6 ciclos.
- IV. Pacientes que fizeram radioterapia (esquema item 1) e Carboplatina 1,5 A.U.C. (Area Under the Curve), semanal durante 6 semanas
- V. Pacientes que foram submetidos à radioterapia (esquema item 1) e Cetuximabe 400mg/m² 1 semana antes de iniciar a radioterapia e dose de 250mg/m² semanal concomitante ao tratamento radioterápico.

▪ **Critérios de Exclusão:**

- I. Pacientes submetidos a esquema de quimioterapia diferente dos itens 2, 3 e 4 dos critérios de inclusão.
- II. Pacientes irradiados previamente em região de cabeça e pescoço.

Seguindo o protocolo de atendimento e avaliação do Departamento de Estomatologia do A.C.Camargo Cancer Center, todos os pacientes receberam cuidados orais prévios antes de iniciar a radioterapia em região de cabeça e pescoço. O plano de tratamento é definido com base no exame oral prévio composto por avaliação clínica e radiológica e os procedimentos foram realizados a fim de remover os focos de infecção e fatores irritantes a mucosa oral, remoção de dentes irreparáveis ou com prognóstico duvidoso e adequação do meio bucal, orientação de higiene oral, orientação quanto ao uso de antissépticos sem álcool.

Estes pacientes receberam ainda todos os cuidados estabelecidos para prevenção, controle e amenização dos efeitos colaterais da radioterapia como saliva artificial (nos casos de xerostomia), vitamina E, maalox ou água bicarbonatada, glicerina e flúor.

Desse modo, os pacientes foram acompanhados durante todo o tratamento, recebendo reforço na orientação de higiene oral e esclarecimentos quanto aos efeitos colaterais como: mucosite, xerostomia (boca seca), candidose, hipossalivação (diminuição da saliva), disgeusia (perda de paladar), cárie de radiação e osterradionecrose.

Importante salientar que dentro do protocolo de atendimento do departamento, todos os pacientes da instituição que estão em tratamento oncológicos e que desenvolvem mucosite em algum momento do tratamento são tratados com laserterapia.

3.3 TERAPIA ANTI-NEOPLÁSICA

A terapia anti-neoplásica foi realizada diariamente, com o uso de radioterapia Conformada Tridimensional (3D) ou Radioterapia com Intensidade Modulada do Feixe (IMRT) em região de cabeça e pescoço. As áreas irradiadas foram delimitadas conforme princípios técnicos de radioterapia. A dose diária variou entre 1,62 e 2,12 Gy e a dose final entre 60 e 72 Gy, em aproximadamente 7 a 8 semanas de tratamento.

Para distribuição dos pacientes e denominação dos grupos foi realizado à randomização de modo centralizado levando em consideração blocos de pacientes, considerando-se o uso de quimioterapia para alocação entre os braços do estudo. Após o processo de randomização os grupos foram denominados Grupo A, Grupo B e Grupo C. Nesta etapa o pesquisador não teve conhecimento de qual dos protocolos estava utilizando em cada paciente.

3.4 APLICAÇÃO DA LUZ DO LASER

A laserterapia foi realizada no Departamento de Estomatologia do A.C.Camargo Cancer Center, diariamente, em única sessão e sempre antes da radioterapia. Para todos os três protocolos de aplicações foram utilizados aparelhos Twin Flex® (GaAlAs - MM Optics) previamente padronizados e com seus mostradores cobertos por outro pesquisador. Ambos os aparelhos emitem luz vermelha, fato este que não permite o aplicador identificar qual o protocolo que

estava sendo utilizado, a área do spot em todos os aparelhos era de 4 mm². O Quadro 1 demonstra as especificações de cada um dos protocolos.

Todas as aplicações foram feitas por um único profissional, cego para o protocolo de laserterapia. A irradiação abrangeu quatro áreas anatómicas conforme descrito por JAGUAR et al. (2007), a área tumoral ou região operada correspondente ao tumor não foi irradiada por não se conhecer exatamente a ação do laser em células tumorais. Os pacientes do Grupo C, receberam aplicação do laser diariamente, 5 dias consecutivos por semana, sempre antes das sessões de radioterapia, iniciando quando apresentarem mucosite oral grau 2, conforme classificação da OMS (Quadro 2), até a cicatrização das lesões e/ou melhora da dor (PARULEKAR et al.1998). Os pacientes dos Grupos A e B, receberam a aplicação do laser diariamente, 5 dias consecutivos por semana, sempre antes das sessões de radioterapia, iniciando no primeiro dia de radioterapia, até a cicatrização das lesões e/ou melhora da dor. Durante as aplicações de laser o aplicador e pacientes utilizam óculos específicos de proteção (JAGUAR et al. 2007).

Os grupos A e B foram considerados como grupos experimentais, sendo assim determinados, pois objetivou-se observar como as diferenças nos parâmetros de modulação da laserterapia seria capaz de influenciar no sistema imunológico dos pacientes. O grupo C representou o grupo controle, pois seguiu o protocolo padrão de tratamento das lesões da mucosite oral de pacientes oncológicos com tumores de cabeça e pescoço.

Quadro 1 - Especificações dos protocolos de aplicação do laser para cada grupo, área do *spot* em todos os aparelhos 4 mm²

Grupos	A (n=10)	B (n=9)	C-Controle (n=7)
Comprimento de Onda	660nm	660nm	660nm
Potência	15mw	25mw	15mw
Densidade de Energia	3,8 J/cm ²	6,3 J/cm ²	3,8 J/cm ²
Tempo de Aplicação	10 segundos	10 segundos	10 segundos
Tamanho do Spot	4 mm ²	4 mm ²	4 mm ²
Modalidade Terapêutica	Preventivo	Preventivo	Curativo
Início da Aplicação	Dia 1 da Radioterapia	Dia 1 da Radioterapia	Mucosite grau II (OMS/NCI)

Quadro 2 - Descrição da classificação da mucosite segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) e do National Cancer Institute (NCI).

Classificação das Lesões de Mucosite Oral					
	0	1	2	3	4
OMS	Nenhuma alteração	Presença de eritema	Presença de eritema, úlceras e alimentação sólida	Presença de úlceras e alimentação líquida	Não consegue se alimentar via oral
NCI Função e sintoma	Nenhuma alteração	Sintomas mínimos, alimentação sólida	Presença de dor e dieta modificada	Alimentação oral não é possível	Sintomas associados com risco de morte
NCI Exame clínico	Nenhuma alteração	Presença de eritema	Presença de úlceras ou pseudomembranas	Úlceras confluentes ou pseudomembranas, sangramento ao leve trauma	Necrose, sangramento espontâneo, risco de morte

3.5 PONTOS DE APLICAÇÃO

Para o protocolo de laserterapia preventiva foi determinado que a aplicação seria deferida em vários pontos anatômicos com distância de 1 cm entre eles, de modo a cobrir a maior área por cm² em cada região da boca (JAGUAR et al. 2007). A quantidade de pontos onde o laser é aplicado depende de alguns fatores como: tamanho da cavidade oral, e presença de tumor ou local de cirurgia prévia. Dessa forma, a energia é calculada por ponto aplicado. Segue abaixo os campos de aplicação:

- Mucosa jugal: linha alba (lados direito e esquerdo mínimo de 3 pontos em cada lado) e vestíbulo bucal superior e inferior (mínimo 3 pontos em cada hemi-arco).
- Língua: bordas direita e esquerda (mínimo de 3 pontos em cada) e 2 pontos na superfície ventral.
- Assoalho bucal: região anterior (2 pontos).
- Lábios superior e inferior: vermelhão (mínimo 3 pontos em cada lábio), fundo de sulco superior e inferior (mínimo 3 pontos em cada) e comissuras (1 ponto em cada lado).

Por sua vez, a laserterapia curativa consistiu na aplicação do laser diretamente sobre as áreas ulceradas.

3.6 COLETA DA SALIVA E DEFINIÇÃO DOS GRUPOS

Foi realizada a coleta de saliva total não-estimulada (SNE), com o paciente em posição sentada no Departamento de Estomatologia do A.C.Camargo Cancer Center por um único examinador. Os pacientes foram orientados a não ingerir alimentos, bebidas e não realizar higiene oral 90 minutos antes do exame. Para a coleta da SNE, os pacientes cuspiram em coletores individuais Kit da Oragene®•RNA (RE-100; DNA Genotek Inc, Canadá) por aproximadamente 5 minutos em um ambiente reservado.

Foram realizadas 4 coletas de saliva dos pacientes que se enquadraram nos critérios de inclusão do trabalho: a primeira coleta foi realizada antes de iniciar a radioterapia, a segunda foi realizada no terceiro dia de radioterapia. Foram realizadas ainda coletas no décimo primeiro dia de radioterapia (D11) e no vigésimo sexto dia de radioterapia (D26). Estes pontos foram determinados de acordo com a evolução biológica da mucosite oral, a fim de observar-se as alterações na imunidade dos pacientes.

Os dados de evolução clínica de cada paciente foram coletados na etapa clínica do estudo, e a partir destes dados foram definidos os parâmetros para classificação dos pacientes quanto a evolução da mucosite (Quadro 2). A Figura 3 apresenta a classificação clínica diária da mucosite para os pacientes do estudo.

		D0		D3							D11										D26																				
Amostras		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38		
A	SLV 06	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	3	3	3	3	3	NR	NR	NR	NR	NR	
	SLV 12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR		
	SLV 13	x	0	0	0	0	0	0	0	0	0	x	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3		
	SLV 18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	NR	NR	NR	NR		
	SLV 25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
	SLV 27	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2		
	SLV 28	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	NR	NR	NR	NR	
	SLV 31	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	x	2	2	2	2	2	2	2	2	NR	NR	NR	NR	
	SLV 29	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	2	2	2	2	NR	NR	NR	NR
	SLV 30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	
B	SLV 05	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	NR	NR	NR	NR			
	SLV 04	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	NR	NR	NR	NR			
	SLV 10	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	NR	NR	NR	NR			
	SLV 11	x	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	3	3	2	2	2	2	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR			
	SLV 14	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	2	2	2	0	0	0	0	0	NR	NR	NR	NR			
	SLV 21	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	x	2	2	3	3	3	3	3	NR	NR	NR	NR		
	SLV 26	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	3	3	3	3	3	3	NR	NR	NR	NR	NR			
	SLV 32	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	2	2	2	2	2	0	0	0	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR		
SLV 34	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	NR	NR	NR	NR			
C	SLV 07	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	2	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR			
	SLV 08	0	0	x	0	0	0	0	2	2	2	2	2	2	2	3	3	3	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	3	3	3	3	NR	NR	NR	NR			
	SLV 16	0	0	0	0	0	0	1	1	2	2	2	2	2	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	x	3	3	3	3	3	3	NR	NR	NR	NR	NR			
	SLV 17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	3	3	3	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR		
	SLV 19	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	x	2	2	2	2	2	2	2	NR	NR	NR	NR		
	SLV 22	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	3	x	2	2	2	2	2	2	2	2	NR	NR	NR	NR	
	SLV 33	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	

Figura 3 - Tabela de Dados Clínicos

Grau de Mucosite pela avaliação clínica do NCI. As caselas com “x” referem-se as amostras excluídas. NR= sem radioterapia; 0 (branco) = Nenhuma Alteração; 1 (rosa) = Presença de Eritema; 2 (vermelho) = Presença de Úlceras e Pseudomembranas; 3 (vinho) = Úlceras Confluentes ou Pseudomembranas, Sangramento Leve; Preenchimento em Amarelo= Laserterapia; Sem Preenchimento= Sem Laserterapia; Preenchimento Vermelho= Caso Excluído

A partir desta classificação, foram definidos três grupos: M0, mucosa oral sem nenhuma alteração clínica; M1, mucosa oral eritematosa; M2e3, mucosa oral com úlceras e pseudomembranas com presença ou não de sangramento (Figura 4). Nenhum dos pacientes do estudo evoluíram para o grau 4, até o final do tratamento radioterápico.



Figura 4 - Descrição dos grupos de acordo com a classificação da mucosite.

3.7 ANÁLISE MOLECULAR

A extração de RNA foi realizada no Banco de Macromoléculas/Biobanco do A.C.Camargo Cancer Center onde o protocolo para extração das moléculas foi padronizado. O estudo molecular foi realizado no Laboratório de Genômica e

Biologia Molecular, no Centro Internacional de Pesquisa (CIPE), ambos coordenados pela Dra. Dirce Maria Carraro.

3.7.1 Processamento das Amostras e Extração do RNA

Após coletada da saliva o coletor foi agitado muito vigorosamente por aproximadamente 8 segundos. As amostras podem ser armazenadas a temperatura ambiente durante até 8 semanas ou armazenado congelado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ indefinidamente.

O volume total do coletor foi dividido em alíquotas de $500\text{ }\mu\text{l}$ e antes da purificação, uma destas alíquotas foi incubada a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 1 hora num banho de água, ou durante 2 horas numa incubadora de ar. Para iniciar o processo de purificação da amostra, a alíquota foi incubada a $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 15 minutos, e depois foi submetida ao processo de resfriamento até à temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionado $20\text{ }\mu\text{l}$ do neutralizador, e as amostras foram homogenizadas e incubadas no gelo por 10 minutos. Foi realizada a centrifugação a uma velocidade máxima ($> 13.000\text{ g}$) durante 3 minutos, após a separação das fases, foi retirado cuidadosamente o sobrenadante para um tubo fresco e desprezado o sedimento. Após preparar a solução de RNeasy da Qiagen para uso com Oragene • RNA ($500\text{ }\mu\text{l}$ de tampão de RLT RNeasy com $500\text{ }\mu\text{l}$ de etanol a 95 %), foi adicionado até $500\text{ }\mu\text{l}$ da saliva tratada com o neutralizador e misturados por inversão suave. As amostras foram centrifugadas a velocidade máxima ($>13.000\text{ g}$) por 3 minutos. Cuidadosamente, foi removido o sobrenadante para o tubo SARSTEDT 2 ml, sem deixar formar bolhas. Então, prosseguiu-se as instruções de carregamento do QISymphony.

Após o processo de extração do RNA, a concentração e a pureza dos mesmos foi medida no Nanodrop-ND1000 (Thermo Scientific). A partir da verificação dos parâmetros de rendimento e pureza, a integridade do material genético foi avaliada pelo Agilent 2100 Bioanalyzer, onde amostras com o RIN>5 foram cadastradas e armazenadas no freezer -80 °C.

3.7.2 Tratamento com DNase e Síntese do cDNA

Todas as amostras passaram por um processo de descontaminação de possíveis resíduos de DNA genômico através do tratamento com Ambion® TURBO DNA-free™ Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Sendo assim, foram adicionados 0,1 volumes do TURBO Dnase Buffer (10x) e 1 µl de TURBO Dnase nas amostras de RNA, perfazendo volume total de 20 µl, e incubados a 37°C por 30 minutos. Foi adicionado 2 µl de DNase Inactivation, misturado gentilmente e incubado por 5 minutos a temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas a 10.000 g por 1,5 minutos e o sobrenadante foi transferido para um tubo limpo. O produto final foi levado para centrífuga a vácuo para reduzir o volume a 10 µl.

A verificação do eficácia do tratamento foi realizada através da amplificação de um fragmento de 254 pb da porção intrônica do gene *MLH1* (NG_007109) utilizando-se os primers direto 5'-TGGTGTCTCTAGTTCTGG-3' e reverso 5'-CATTGTTGTAGTAGCTCTTGC-3'. Para isso foram utilizadas as seguintes condições de amplificação: 1X tampão de reação, 2mM de MgCl₂, 0,25mM dNTPs, 12,5 pmoles de cada primer, 1 unidade de Taq Platinum (Invitrogen) e 1µg de RNA como molde em um volume final de reação de 20 µl. O programa da PCR foi de 4 minutos iniciais de desnaturação a temperatura de 94°C, 30 ciclos de 45 segundos a

94°C, 60 segundos a 60°C e 60 segundos a 72°C. Por fim, um passo único de 6 minutos a 72°C. O produto obtido foi visualizado por meio de eletroforese em gel agarose 1%.

Após comprovada a descontaminação do RNA por DNA genômico, os RNAs das amostras foram utilizados para a síntese de cDNAs. Para isso, 500 ng a 2 µg de RNA total foram misturados a 0,5µg de Oligo dT (Invitrogen), 10 nM de dNTPs e água livre de RNase em um volume de 12µL. A mistura foi incubada a 70°C durante 5 minutos e armazenada em gelo por aproximadamente 1 minuto. Em seguida, foram adicionados 1X *First Strand Buffer*, 2µL de DTT 0,1M, 40 unidades de *RNase out* e 200 unidades da enzima *SuperScript III* (Invitrogen), perfazendo um volume final de reação de 20µL. A reação foi incubada a 42°C por 2 horas e depois a 70°C.

Após a síntese, a qualidade dos cDNAs foi verificada por meio da amplificação do gene *GAPDH* (NM_002046) através de ensaio TaqMan® de expressão gênica utilizando-se as seguintes condições de amplificação: 1 X TaqMan® Universal Master Mix II (Applied Biosystems, CA) 1 X TaqMan Assay *GAPDH* e 9µL de cDNA como molde e água livre de RNase em uma concentração final de 20ng de cDNA. Os ensaios foram realizados no Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System. O programa da PCR foi de 2 minutos iniciais de desnaturação a temperatura de 50°C, 10 minutos a temperatura de 95°C e 40 ciclos de 15 segundos a 95°C, 60 segundos a 60°C.

3.8 QUANTIFICAÇÃO DOS ALVOS GÊNICOS

Com o intuito de observar como o laser de baixa potência age na modulação da imunidade dos pacientes que desenvolvem mucosite oral em decorrência do

tratamento oncológico, foi avaliado o nível de expressão gênica de um painel de genes pertencentes à via de resposta imune através da plataforma *The Applied Biosystems® TaqMan® Array Human Immune*. Esta matriz contém 384 poços divididos em quatro conjuntos de 96 genes para ensaios, sendo que, contém 92 genes de resposta associado do sistema imunológico e 4 genes de controle endógenos (*18S*, *GAPDH*, *HPRT1*, *BGUS*).

Este painel gênico inclui como alvo genes de funções do sistema imunológico que se enquadram em 9 classes: receptores da superfície celular, resposta ao estresse, oxiredutases, proteases, fatores de transcrição, transdução de sinal, citocinas e receptores de citocinas, quimiocinas e receptores de quimiocina, ciclo celular e proteínas quinases (Anexo 5).

Portanto, as amostras incluídas no estudo foram avaliadas quanto ao nível de expressão neste painel de genes descrito, observando os 4 períodos distintos, (D0- antes da radioterapia, D3-terceiro dia de radioterapia, D11- décimo primeiro dia de radioterapia e D26- vigésimo sexto dia de radioterapia), na evolução da mucosite e da intervenção com o LBP. Esta etapa foi realizada através da técnica de RT-qPCR array, no aparelho 7900HT fast Real Time PCR System (Applied Biosystems, CA), sendo utilizados 1 X TaqMan® Universal Master Mix II (Applied Biosystems, CA) e 80ng (4ng por poço) de cDNA como molde e água livre de RNase. O programa da PCR foi de 2 minutos iniciais de desnaturação a temperatura de 50°C, 10 minutos a temperatura de 95°C e 50 ciclos de 15 segundos a 95°C, 60 segundos a 60°C.

Para a avaliação da expressão gênica das amostras foi utilizado o método comparativo de delta delta Ct ($\Delta\Delta Ct$) (PFAFFL 2001), onde os valores dos Cts dos

genes alvos foram normalizados pelo gene endógeno para cada amostra avaliada. A fórmula utilizada para obter o valor relativo está representada abaixo.

$$\text{Expressão relativa} = 2^{-\text{ct Gene alvo}} / 2^{-\text{ct Normalizador}}$$

O valor da expressão relativa obtido foi, mais uma vez, normalizado com o valor de referência D0 (primeira coleta) a fim de diminuir as variabilidades genéticas das amostras.

3.9 COLETA DE DADOS E ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As variáveis como gênero, idade, localização, estadiamento, tipo de radioterapia, doses e campos de radiação, assim como os esquemas da quimioterapia foram coletados dos prontuários dos pacientes e anotados em ficha específica para este estudo (Anexo 3). Esta etapa do estudo foi realizada a fim de se obter os dados clínicos para as análises de correlação do estudo.

Foram considerados para as análises de expressão gênica aqueles genes que apresentaram expressão em mais de 25% das amostras. Os genes foram considerados diferencialmente expressos quando apresentaram *Fold Change* maior ou igual a 2 e menor ou igual a -2 nas comparações avaliadas.

Inicialmente, foram comparados os graus de evolução da mucosite entre si, sendo assim, foram comparados o grupo M0 (sem lesão clínica) com o grupo M1 (com eritema); M0 (sem lesão clínica) com o M2e3 (com úlcera) e o M1 (com eritema) com o M2e3 (com úlcera). Para que fossem determinadas as possíveis

correlações entre as alterações dos níveis de expressão dos genes estudados com a evolução da doença foram utilizados os testes *T Student* não pareado e o *p Valor*.

Para realizar a avaliação dos Grupo A (15 mW/3,8 J/cm²-Preventivo), Grupo B (25 mW/6,3 J/cm²-Preventivo) e Grupo C (15 mW/3,8 J/cm²-Curativo), controle, da laserterapia foi realizado a comparação das amostras, onde na avaliação clínica a mucosa não apresentava lesão (D3) e quando a mucosa apresentava ulcerações (D11 ou D26). Sendo assim, comparamos Grupo A com Grupo C, Grupo A com Grupo B e finalmente Grupo B com o Grupo C, para ambas condições de clínicas. Para que fossem determinadas as possíveis correlações entre as alterações dos níveis de expressão dos genes estudados, entre os grupos e com a biomodulação do laser de baixa potência inicialmente foram analisados somente genes que apresentavam valores validos em pelo menos 3 amostras para ambos os grupos. Assim, para as correlações foram utilizados os testes *T Student* não pareado e o *p Valor*.

3.10 ANÁLISES DOS DADOS

Para que os dados gerados pudessem ser mais bem organizados e interpretados, foram utilizados softwares online para a análise destes dados.

No NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) foram obtidos os dados dos genes estudados, devido ao banco de dados provenientes do sequenciamento do genoma.

Foi utilizado também o STEM (*Short Time-series Expression Miner*), um programa projetado para agrupar, comparar e visualizar temporalmente dados de

expressão gênica de experimentos em série, que pode diferenciar os padrões reais e aleatórios (ERNST e BAR-JOSEPH 2005; 2006).

O *Search Tool for Retrieval of Interacting Genes/Proteins-STRING* é um programa destinado a buscar associação funcional entre proteínas, em uma escala global (SZKLARCZYK et al. 2015).

Por sua vez, o WEBGESTALT é um software projetado para estudos genéticos em grande escala genômica, proteômica e funcionais a partir de listas de genes (por exemplo, conjuntos de genes diferencialmente expressos, conjuntos de genes co-expressas etc). Este programa incorpora informações de diferentes recursos públicos, dentro deles o *GO (Gene Ontology)* e o *KEGG (Enciclopédia Kyoto de genes e genomas)*.

O projeto *GO* é composto de vocabulários estruturados controlados (ontologias) que descrevem produtos de genes em termos de seus processos biológicos associados, componentes celulares e funções moleculares para cada espécie, enquanto o *KEGG* é uma coleção de bancos de dados que lidam com genomas, caminhos biológicos, doenças, drogas e substâncias químicas.

4 RESULTADOS

4.1 COLETA DAS AMOSTRAS

No período de fevereiro de 2014 a dezembro de 2014 foram selecionados 32 pacientes para ingressar no protocolo de pesquisa clínica e laboratorial. Dos pacientes selecionados, 6 foram excluídos do estudo por abandono do tratamento. Para a maioria dos pacientes que prosseguiram no estudo, foram realizadas as 4 coletas de saliva. Quatro pacientes selecionados não conseguiram realizar a última coleta devido ao agravamento da xerostomia (3) ou por falecimento (1).

Os pacientes foram distribuídos randomicamente entre os grupos de estudo, sendo assim os grupos ficaram compostos desta maneira:

- Grupo A (laserterapia preventiva, 15mW/ 3,8 J/cm²): 10 indivíduos, 40 amostras
- Grupo B (laserterapia preventiva, 25mW/6,3 J/cm²): 9 indivíduos (1 caso com 3 coletas), 35 amostras.
- Grupo C-controle (laserterapia curativa, 15mW/3,8 J/cm²): 7 indivíduos (3 casos com 3 coletas), 25 amostras.

As características clínicas e a distribuição dos pacientes nos três grupos de estudo demonstrada no Anexo 4.

4.2 EXTRAÇÃO DO RNA

As coletas de saliva foram processadas resultando em 100 amostras de RNA total. Todas as amostras foram quantificadas em espectrofotômetro (NANODROP-ND1000) e apresentaram uma variação de 0,06 a 19,49 µg, na sua massa total (Anexo 6). A integridade do RNA obtido foi avaliada no Bioanalyzer, as amostras que apresentaram RIN abaixo do aceitável (RIN maior ou igual a 5) pelo protocolo foram submetidas a um novo processo de extração do RNA (Figura 5).

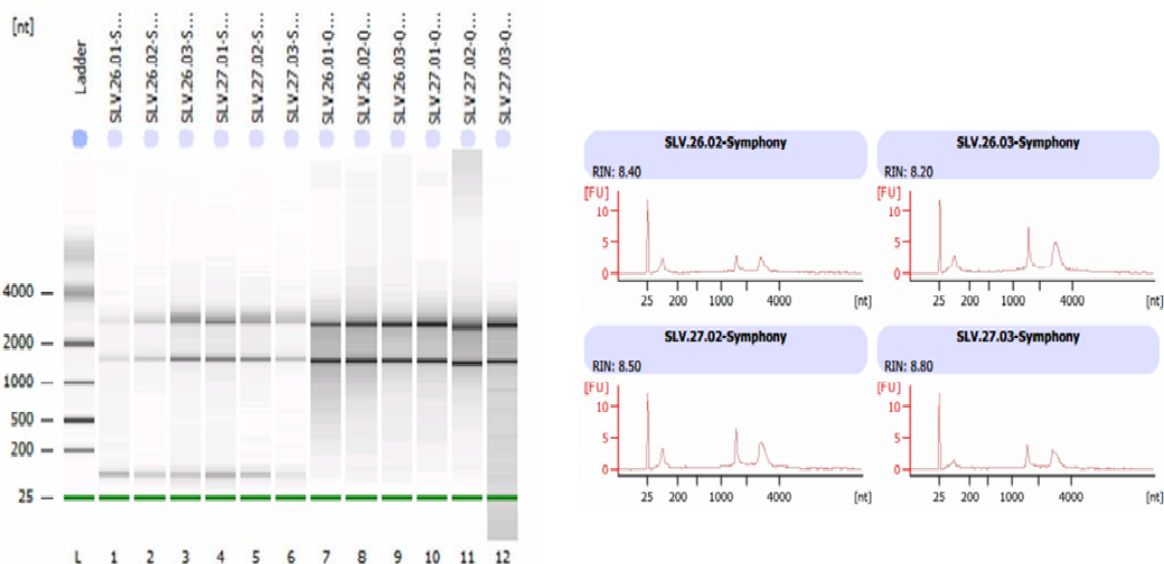


Figura 5 - Gel de eletroforese do 2100 bioanalyzer Eukaryote total RNA Nano. As amostras apresentam bandas 18S e 28S integras e sem material degradado. A maior intensidade das bandas deve-se a amostras em menor diluição. No gráfico observa-se os primeiro picos que representam o sinal do marcador e da região 5S e os dois últimos representam os fragmentos 18S e 28S, demonstrando a integridade e qualidade do RNA obtido.

4.3 SÍNTESE DO CDNA

As amostras de RNA apresentaram concentrações variadas e uma parte destas amostras apresentavam concentração inferior a 2 µg para a síntese de cDNA. Com o intuito de obter amostras com concentrações semelhantes, foi realizado um ajuste na diluição do cDNA das amostras conforme a concentração inicial do RNA, a fim de que todas as amostras estivessem com seu cDNA na concentração de 10 ng/ul ao final da síntese.

Após todas as amostras estarem em mesma concentração final, foi testado a eficiência da síntese de cDNA através da amplificação de um gene endógeno. Na figura 4 pode-se observar a amplificação do *GAPDH* das amostras, aquelas que apresentavam curva de amplificação com picos fora do padrão ou que não apresentaram amplificação significativa passavam por novo processo de extração de RNA, tratamento com DNase e síntese de cDNA. Duas amostras do estudo foram excluídas, pois mesmo após três ou mais tentativas de síntese do cDNA, não obtivemos sucesso. Ao final desta etapa restaram 98 amostras de RNA para a análise de expressão gênica correspondentes aos 26 pacientes.

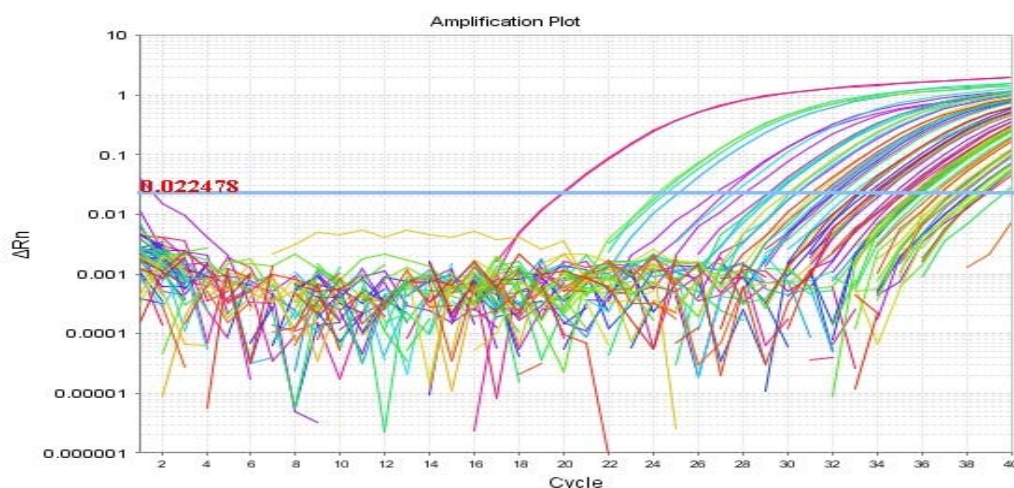


Figura 6 - Curva de amplificação do *GAPDH* em ensaio TaqMan. Presença de cDNA controle de uma linhagem celular e controle negativo.

4.4 QUANTIFICAÇÃO DOS ALVOS GÊNICOS

As amostras de cDNA que amplificaram o *GAPDH* de forma eficiente foram utilizadas em placas customizadas de 384 poços, onde continham 4 conjuntos de 92 genes alvos com funções diversas no sistema imunológico e 4 genes de controle endógenos. Sendo assim, para cada 4 amostras eram utilizadas uma placa, totalizando 26 placas.

Os resultados obtidos através do ensaio *TaqMan*® *Array Human Immune Response* foram analisadas através do software *Expression Suite Version 10.3*. Foi determinado o mesmo *threshold*, linha de corte, de todos os genes manualmente e para cada amostra que apresentasse a curva de amplificação alterada das demais, esta era omitida, pois consideramos que a amplificação não foi eficiente, portanto o seu produto final poderia ser a amplificação de estruturas secundárias ou dímeros de primers.

Dos quatro genes de controle endógenos contidos no ensaio (*18S*, *HPRT1*, *BGUS* e *GAPDH*) dois apresentaram expressão na maior parte das amostras, sendo

assim foi decidido utilizar o *GAPDH* como gene normalizador do ensaio realizado, uma vez que este gene já tinha sido utilizado para a eficiência da síntese de cDNA das amostras. Nove amostras não apresentaram amplificação do *GAPDH* ou apresentaram a curva de amplificação com a fase exponencial irregular e foram excluídas do estudo, pois não seria possível realizar a análise de expressão relativa em amostras com qualidade duvidosa de amplificação ou com ausência de medida de expressão do gene endógeno usado como normalizador (Figura 7).

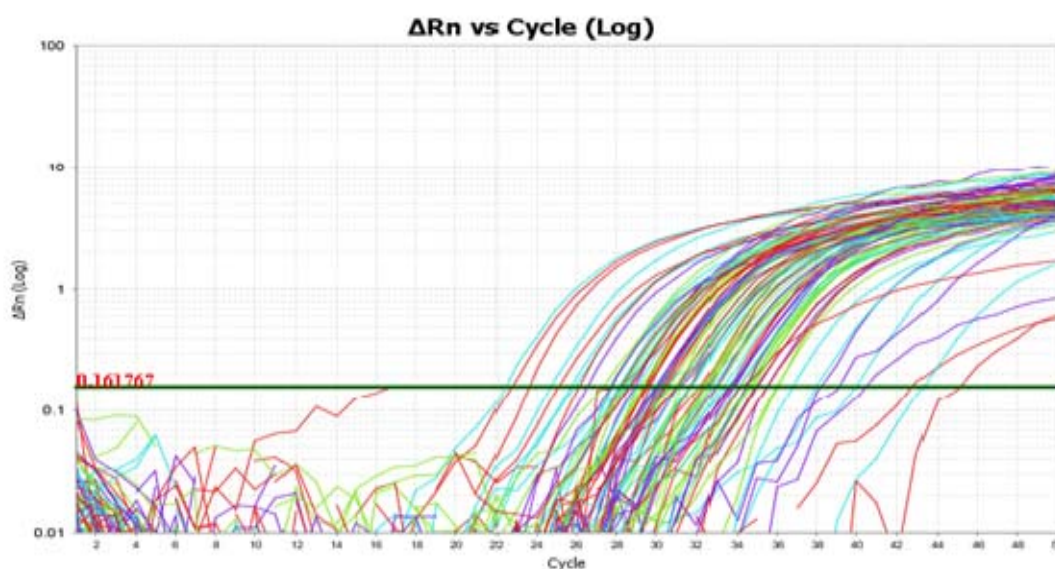


Figura 7 - Curva de amplificação do *GAPDH* em ensaio *TaqMan® Array Gene Signature 384-Well Plate*, para todas as amostras do estudo, em ensaio único.

Após análise criteriosa da amplificação do *GAPDH*, permaneceram 89 amostras para avaliação quanto ao nível de expressão gênica no painel de genes pertencentes resposta imune. Estas amostras foram normalizadas com as amostras do D0 (primeira coleta) a fim de diminuir as variabilidades genéticas entre os diferentes pacientes que pudessem interferir nos resultados em relação aparecimento da

mucosite e a ação do laser, neste processo, o caso que não apresentou amplificação para a primeira coleta (D0) foi excluído devido a impossibilidade de normalização das amostras. Portanto, os pacientes foram distribuídos segundo a descrição abaixo, totalizando 62 amostras, como ditas anteriormente, normalizadas com o valor de expressão de D0, conforme demonstrado na figura 8:

- Grupo A (laserterapia preventiva, 15mW/ 3,8 J/cm²): 8 pacientes, 23 amostras
- Grupo B (laserterapia preventiva, 25mW/6,3 J/cm²): 8 pacientes, 23 amostras
- Grupo C-controle (laserterapia curativa, 15mW/3,8 J/cm²): 7 pacientes, 16 amostras.

Em uma análise preliminar observa-se que dos 96 genes contidos no ensaio (sendo 4 genes de controle endógeno), 40 genes não foi possível detectar expressão nas amostras do estudo pela metodologia utilizada, 40 genes foi possível detectar expressão em mais 50% das amostras e 12 genes foi possível detectar expressão entre 25 a 50% das amostras. A lista dos 52 genes que foram avaliados está apresentada no Quadro 4 e a lista completa dos genes do ensaio está apresentada no Anexo 5.

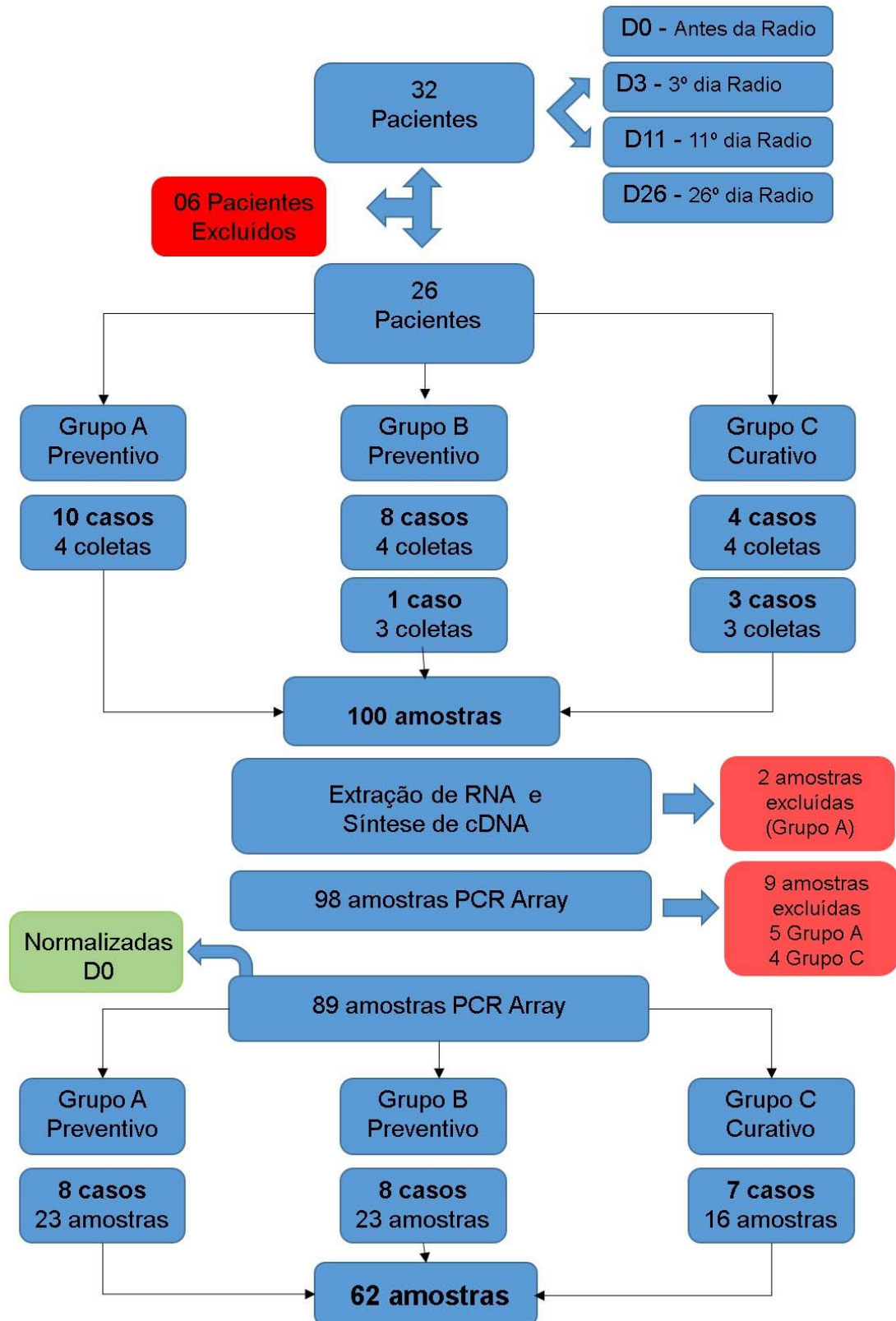


Figura 8 - Fluxograma de processamento das amostras do projeto

Quadro 3 - Lista dos 52 genes selecionados para avaliação de expressão.

#	Simbolo Gene	#	Simbolo Gene
1	BAX	27	HMOX1
2	BCL2L1	28	ICAM1
3	C3	29	IKBKB
4	CCL2	30	IL10
5	CCL3	31	IL18
6	CCL5	32	IL1A
7	CCR4	33	IL1B
8	CCR5	34	IL2RA
9	CCR7	35	IL6
10	CD38	36	IL8
11	CD4	37	LIF
12	CD40	38	LY96
13	CD68	39	MIF
14	CD80	40	NFATC3
15	CD86	41	NFKB2
16	CD8A	42	NOS2
17	CSF1	43	PTGS2
18	CSF3	44	PTPRC
19	CXCL10	45	SKI
20	EDN1	46	SMAD3
21	FAS	47	SMAD7
22	FN1	48	STAT3
23	GNLY	49	SYK
24	GZMB	50	TGFB1
25	HLA-DRA	51	TNF
26	HLA-DRB1	52	VEGFA

4.5 AVALIAÇÃO DA MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA EM GRUPOS DE AMOSTRAS REPRESENTATIVAS DA EVOLUÇÃO DA MUCOSITE

Inicialmente, 52 genes que apresentaram medida de expressão confiável foram selecionados e avaliados através do programa de *Short Time-series Expression Miner-STEM* (ERNST e BAR-JOSEPH 2005; 2006). Este programa define um

conjunto de possíveis perfis de expressão gênica ao longo do tempo e agrupa os genes com perfil similar com base no coeficiente de correlação (Figura 9). No estudo foi avaliado o perfil de expressão dos genes em 3 grupos de amostras representativas da evolução da mucosite.

Como mencionado anteriormente, foram utilizados os critérios determinados pela pelos dados de evolução clínica de cada paciente seguindo a classificação da Organização Mundial de Saúde-OMS e pelo *National Cancer Institute*-NCI coletados na etapa clínica do estudo (Quadro 3), e a partir destes dados foram definidos os parâmetros para classificação dos pacientes quanto à evolução da mucosite.

Portanto, o primeiro ponto de avaliação, no gráfico, se refere ao grupo M0 (sem lesão clínica, n=31), o intermediário o grupo M1 (com eritema, n=8) e o último ponto o grupo M2e3 (com úlcera, n=23). Para esta análise foram considerados somente sete perfis de expressão simulados pelo programa que são representativos de genes que apresentam diminuição ou aumento de expressão nos diferentes grupos da avaliação seriada. Assim os perfis “11”, “13”, “12”, “15” e “8” representaram genes com aumento de expressão ao longo da evolução da mucosite, enquanto os perfis “4” e “7” representaram genes com diminuição de expressão neste processo de evolução. Entre os diferentes perfis, os de número “11” e “13”, com expressão aumentada nos grupos da evolução da mucosite, foram estatisticamente significativos.

Portanto, a partir dos resultados obtidos, foi possível avaliar o significado biológico do conjunto de genes atribuído ao mesmo perfil ou ao mesmo conjunto de perfis utilizando as ferramentas computacional Go e Kegg, através do programa *WEB-based GENE SeT AnaLysis Toolkit*-WebGestalt.

Sendo assim, estas análises revelaram que os genes dos perfis “11” e “13”, estatisticamente significantes, apresentavam funções relacionadas com a evolução do processo inflamatório, modulação do sistema imunológico e com a apoptose. O perfil “11”, por sua vez, estava associado a ativação de citocinas e de fatores de crescimento, estando, portanto, relacionadas com a regulação positiva do sistema imunológico e controle do processo de apoptose. Estes genes apresentam-se nas vias da artrite reumatóide e em infecções. Enquanto que os genes do perfil “13” atuam na regulação da transdução do sinal e na comunicação celular.

Em relação aos demais perfis de aumento de expressão durante a evolução da mucosite, o perfil “15” apresentou as mesmas funções reveladas no perfil “13”. As proteínas codificadas pelos genes do perfil “12” estão relacionadas à ativação da resposta imune através da via de sinalização da superfície celular e estão relacionados também com via de sinalização apoptótica.

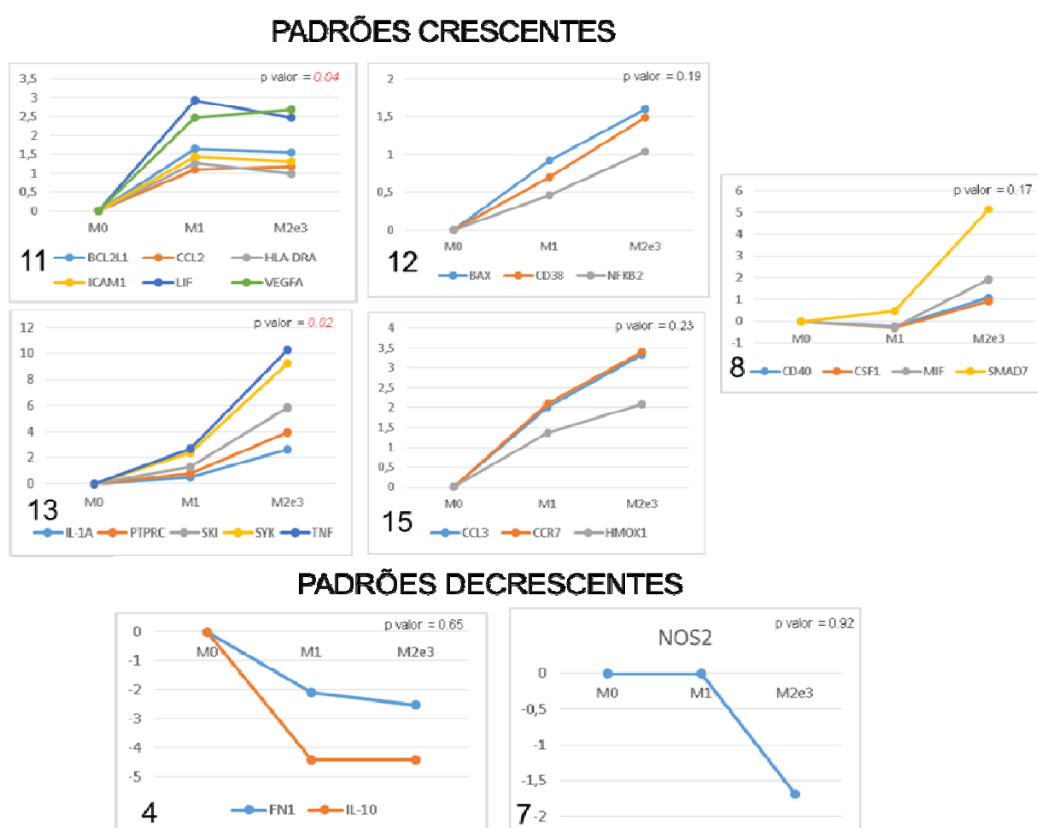


Figura 9 - Disposição seriada de expressão gênica em relação à evolução da mucosite. Estão representados os perfis que apresentaram o padrão de aumento (perfis “8”, “11”, “12”, “13” e “15”) ou diminuição (perfis “4” e “7”) da expressão gênica. O número inferior no gráfico representa qual o modelo de perfil que os genes foram agrupados. Para cada perfil esta representada o *p* valor na porção superior do gráfico.

Os genes que compõe o perfil “8” estão relacionados a proliferação e diferenciação de células precursoras hematopoiéticas do sistema imunológico, portanto elas atuam auxiliando na mediação de uma ampla variedade de respostas imunes e inflamatórias, sendo consideradas como anti-inflamatórias. Em relação aos perfis com genes que diminuem durante a evolução da mucosite, o perfil “7” é representado pelo NOS, que é um mediador biológico em diversos processos,

incluindo a neuro transmissão dos sinais, apresenta um papel antimicrobiano, além de atuar na regulação do metabolismo de compostos nitrogenados e na modulação das espécies de oxigênio reativo. Os genes do perfil “4” (FN1, IL-10) estão associados a regulação positiva na resposta imune, sendo descritos como responsivos ao dano celular e a defesa, estando, portanto, relacionados com o início da resposta inflamatória.

A Figura 10 representa a rede de interação das proteínas, agrupadas nos padrões de aumento (perfis “11”, “13”, “12”, “15” e “8”) e diminuição (perfis “4” e “7”) de expressão durante a evolução da mucosite. Esta análise foi realizada através da plataforma *STRING*, que tem como objetivo pesquisar e interpretar padrões na organização do genoma com o objetivo de encontrar associações funcionais para um determinado gene, incluindo os efeitos diretos (física), bem como associações indiretas (funcionais). As interações e visualização dos genes permitiram a análise e delineamento do conjunto de potenciais parceiros de interação (SZLARCZYK D. et al. 2015). Apenas duas destas proteínas (LIF, HLA-DRA) não tem interação entre si ou com as demais, porém todas as outras apresentam ligações diretas ou indiretas.

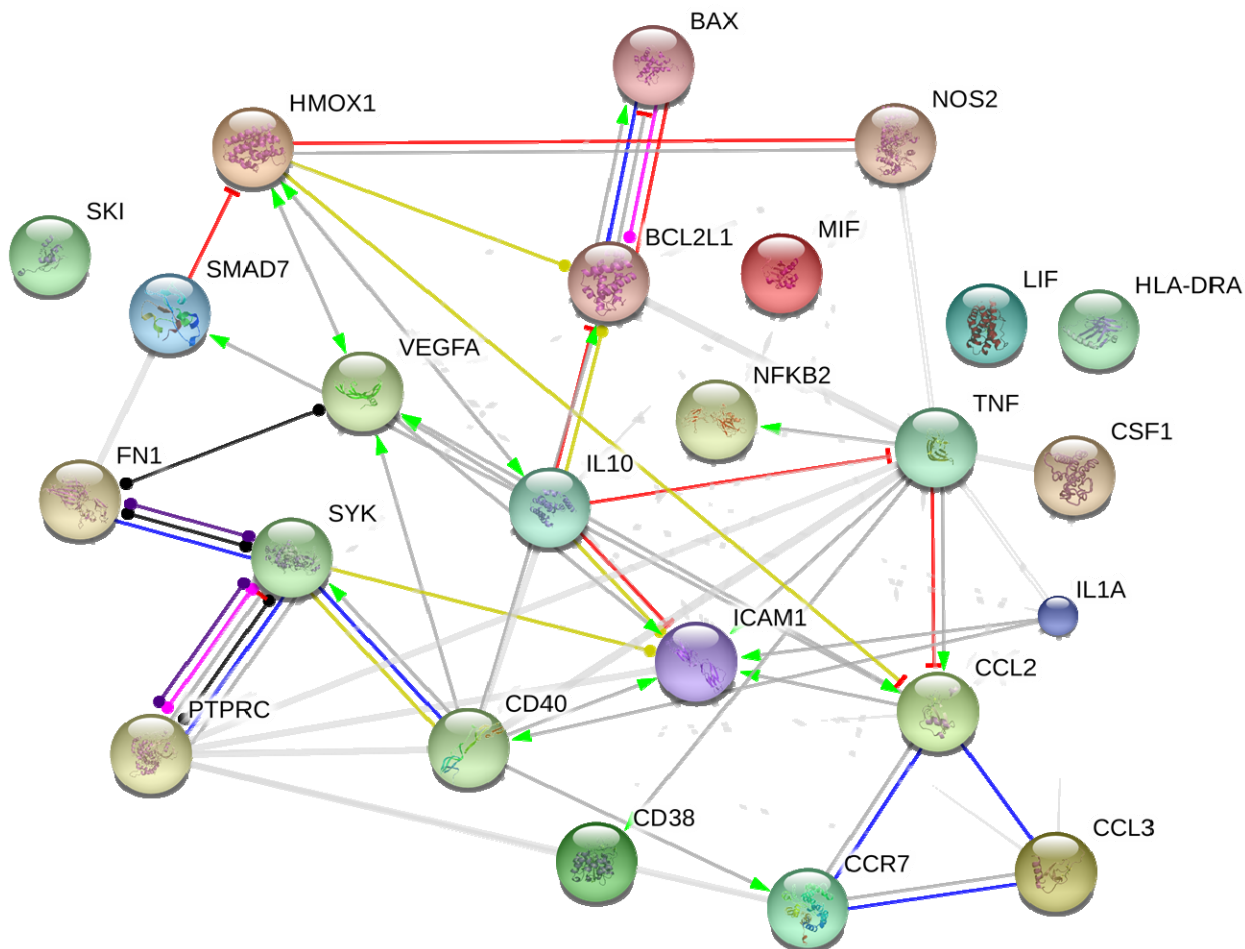


Figura 10 - Rede de proteínas que interagem, representado pelo nome do gene, gerado pelo *STRING*. As setas em verde representam as proteínas que são ativadas quando sofrem interação. As linhas vermelhas representam as que são inibidas, em azul as que possuem ligações, em rosa as que sofrem modificações pós translacionais, em preto as que sofrem reações, ou seja, sofrem transformação em outra proteína. As amarelas as que sofrem regulação transcricional. As linhas em cinza representam as ligações indiretas entre as proteínas. As setas são ação positiva, a circunferência ação indeterminada e o traço ação negativa.

4.6 IDENTIFICAÇÃO DE GENES MODULADOS AO LONGO DO DESENVOLVIMENTO E EVOLUÇÃO DA MUCOSITE ORAL

Com o intuito de avaliar a diferença de expressão entre padrões fisiológicos diferentes, as amostras foram avaliadas segundo o aparecimento e progressão da lesão, ou seja, as lesões morfológicamente parecidas foram agrupadas, independente da ação do laser. Os grupos ficaram divididos da seguinte maneira, como mencionado anteriormente:

- Grupo M0: sem lesão clínica, 31 amostras.
- Grupo M1: mucosa eritematosa, 08 amostras.
- Grupo M2e3: mucosa ulcerada, 23 amostras.

Para a determinação de genes diferencialmente expressos, associados com a doença e sua gravidade independente da ação do laser, os três grupos foram comparados entre si, sempre em direção ao aparecimento e evolução da lesão. Nesta análise não foram considerados os grupos de laserterapia e sim todas as amostras isoladamente que apresentavam as lesões. Foram considerados os critérios de *Fold Change* maior ou igual a 2 e menor ou igual a -2 e o teste do *p Valor*, através do teste *T student* não pareado. Os genes mais expressos e os genes menos expressos foram avaliados de forma independente, e, desta maneira foi possível identificar 42 diferencialmente expresso entre as comparações. No Quadro 4 encontra-se o valor do *Fold Change* para todas as comparações e na Figura 11 pode-se visualizar as comparações realizadas.



Figura 11 - Comparação dos grupos de evolução da mucosite para identificação de genes diferencialmente expressos no curso da doença. Foram realizados 3 conjuntos de comparação, conforme descrição das figuras.

Quadro 4 - Genes diferentemente expressos entre os grupos de amostras com diferentes graus de mucosite. *Fold Change* dos 42 genes diferencialmente expressos nas comparações entre os grupos (M0-sem lesão; M1-mucosa eritematosa; M2e3-mucosa ulcerada). Os sinais negativos e positivos representam genes com diminuição e aumento de expressão respectivamente no primeiro grupo (lesões menos avançadas) quando comparado com o segundo (lesões mais avançadas). Os valores dos genes que estão em vermelho apresentaram *valor de p* estatisticamente significativo.

Genes	M0/M1	Genes	M0/M2e3	Genes	M1/M2e3
Alvo	Fold Change	Alvo	Fold Change	Alvo	Fold Change
BCL2L1	-3.12	BAX	-3.04	C3	-4.14
C3	2.07	BCL2L1	-2.93	CCL3	-2.45
CCL2	-2.14	C3	-2.00	CCL5	-9.46
CCL3	-4.07	CCL2	-2.25	CCR4	5.60
CCL5	2.05	CCL3	-9.98	CCR7	-2.45
CCR4	-5.11	CCL5	-4.61	CD40	-2.49
CCR7	-4.28	CCR7	-10.50	CD4	-3.00
CD68	-2.26	CD38	-2.80	CD80	-3.18
CXCL10	2.22	CD40	-2.10	CSF1	-2.34
FAZ	-3.09	CD8A	-5.21	CXCL10	-3.55
FN1	4.31	FN1	5.73	GZMB	-2.27
GZMB	2.18	HLA-DRB1	-3.71	HLA-DRB1	2.21
HLA-DRA	-2.39	HMOX1	-4.24	IKBKB	-6.76
HLA-DRB1	-8.20	ICAM1	-2.47	IL-1A	-4.25
HMOX1	-2.57	IKBKB	-2.75	IL-2RA	-8.09
ICAM1	-2.69	IL-10	3.70	IL-6	-5.73
IKBKB	2.46	IL-1A	-6.04	MIF	-4.48
IL-10	4.96	IL-2RA	-4.53	NOS2	3.23
IL-6	2.41	IL-6	-2.38	PTPRC	-2.09
LIF	-7.64	LIF	-5.56	SKI	-2.62
NFATC3	-2.47	MIF	-3.75	SMAD7	-25.67
STAT3	-2.25	NFKB2	-2.06	SYK	-5.11
SYK	-2.08	NOS2	3.22		
TGFB1	-2.60	PTPRC	-2.52		
VEGFA	-5.57	SKI	-3.79		
		SMAD3	3.98		
		SMAD7	-35.51		
		SYK	-10.61		
		TNF	-2.03		
		VEGFA	-6.45		

Com o intuito de identificar os genes diferencialmente expressos comuns nas diferentes comparações os três grupos estudados, os resultados foram dispostos no diagrama de Venn (Figura 12).

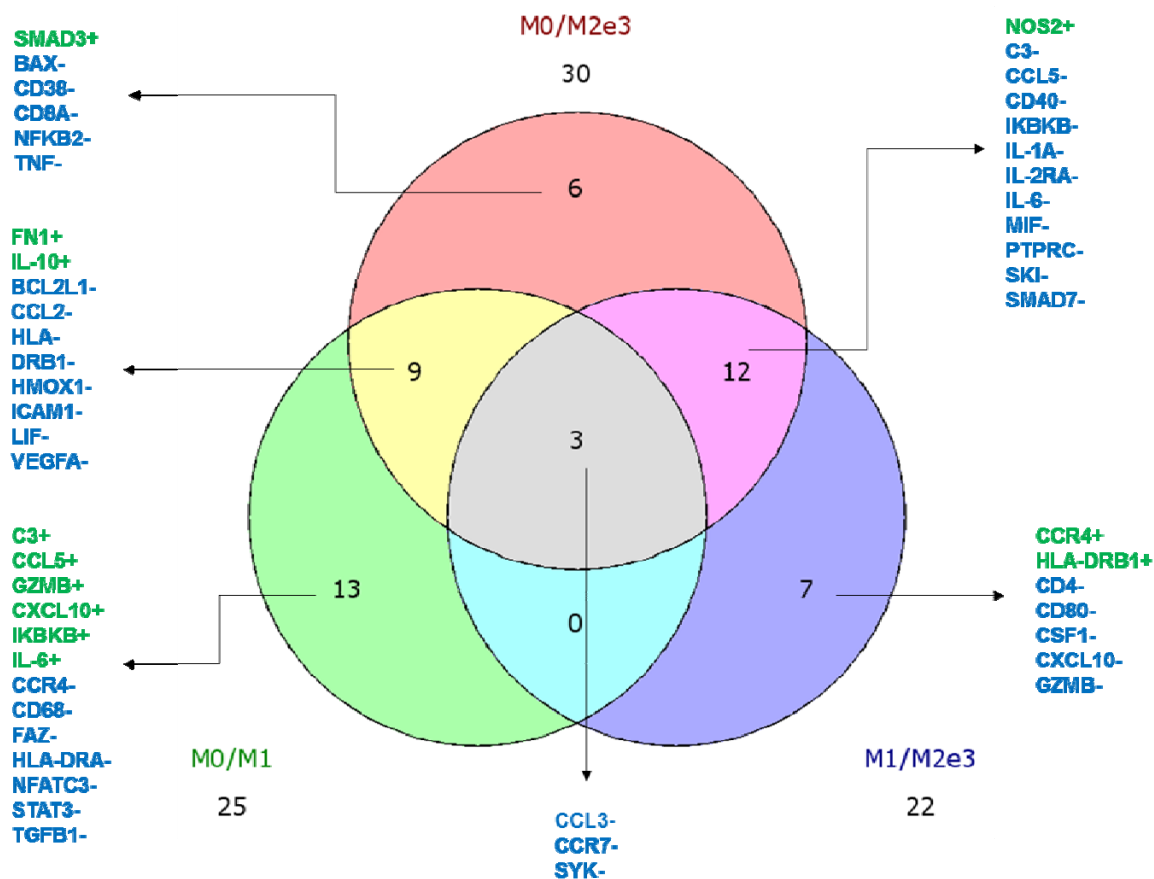


Figura 12 - Diagrama de Venn para genes diferencialmente expressos entre graus de mucosite. Pode-se visualizar os genes com aumento de expressão nos grupos M0-sem mucosite ou M1-mucosa eritematosa (em verde, com símbolo +) e os genes com diminuição de expressão (em azul, com símbolo -) nos grupos M2e3-mucosa ulcerada e M1-mucosa eritematosa, em cada uma das comparações. O valor nas caselas corresponde o valor total de genes, com alteração de expressão, encontrado em cada comparação.

Está análise revelou 24 genes com alteração de expressão gênica em pelo menos duas das comparações. Doze genes (NOS2, C3, CCL5, CD40, IKBKB, IL-1A, IL-2RA, IL-6, MIF, PTPRC, SKI, SMAD7) apresentaram alteração de expressão nas comparações M0 contra M2e3 e M1 contra M2e3 e, portanto, foram considerados como envolvidos na progressão do epitélio íntegro (normal ou eritematoso) para mucosa lesionada (úlceras). Buscando uma melhor compreensão deste processo nós submetemos estes genes a uma análise de vias gênicas enriquecidas por ferramentas computacionais de anotação funcional dos genes através do Gene Ontology (GO) e da análise de vias através da Enciclopédia de Quioto de Genes e Genomas (KEGG) e os resultados mostraram que estes estão relacionados com regulação positiva de processos do sistema imunológico, resposta inflamatória, regulação dos processos de apoptose, da proliferação celular e da angiogênese.

Na comparação entre M0 contra M1 e M0 contra M2e3, podem-se destacar nove genes (FN1, IL-10, BCL2L1, CCL2, HLA- DRB1, HMOX1, ICAM1, LIF, VEGFA) considerados genes envolvidos no início do processo inflamatório, na transformação do epitélio normal para epitélio com alteração histológica (epitélio eritematoso ou epitélio ulcerado), ou seja, estes genes estão relacionados com as primeiras alterações no epitélio normal.

Estes genes, por sua vez, encontram-se associados com doenças que tem como características as variações imunológicas e inflamação como necrose, vasculite, transplante de órgãos, granuloma. Estes genes podem modular funções biológicas como: a regulação negativa do processo apoptótico e dos processos metabólicos, a regulação da proliferação celular e o desenvolvimento vascular.

A diminuição da expressão de três genes (CCL3, CCR7, SYK) foram encontrados em comum em todas as comparações (M0 contra M2e3, M1 contra M2e3 e M0 contra M1) e estão associados ao desenvolvimento de doenças relacionadas aos transtornos causados por anormalidades nos mecanismos do sistema imune. Associam-se principalmente a regulação positiva da resposta de defesa e da produção de citocinas, e regulam os processos de homeostase e de cicatrização. Sendo assim, podemos sugerir que estes genes estão relacionados com a instalação e progressão da mucosite.

4.7 AVALIAÇÃO DA DIFERENÇA DE EXPRESSÃO GÊNICA ENTRE AS MODALIDADES TERAPÊUTICAS AVALIADAS NO ESTUDO

Para estas análises buscou-se comparar os três grupos de protocolos para tratamento da mucosite oral nos pacientes oncológicos pela laserterapia que foram avaliados no estudo. Neste contexto, foram comparadas as amostras de mucosa normal e de mucosa ulcerada que receberam protocolos de tratamento distintos (curativo ou preventivo), avaliando ainda as alterações nos parâmetros da laserterapia (Potência e Densidade de Energia) para os protocolos de laserterapia preventiva. Foram considerados para análise somente os genes que apresentavam valor da expressão relativa válidos em pelo menos três amostras de cada grupo, sendo que a alteração na expressão gênica é considerada para o primeiro grupo comparado em relação ao segundo. Os valores de expressão gênica das comparações estão discriminados no Anexo 7.

4.7.1 Efeito da Ação do Laser Baixa Potência na Mucosa Normal

Com o objetivo de identificar genes modulados pelo tratamento preventivo da mucosite oral com laserterapia com potência de 15mw na mucosa normal nós comparamos as amostras cujo a mucosa oral dos pacientes não apresentava lesão, e que estavam no protocolo de laser de caráter preventivo (Grupo A) com o grupo controle (Grupo C). Os parâmetros (potência e densidade de energia) do laser para ambos os grupos são iguais, porém, os pacientes incluídos no Grupo C (curativo), não havia iniciado a laserterapia no momento da coleta, como representado na Figura 13.

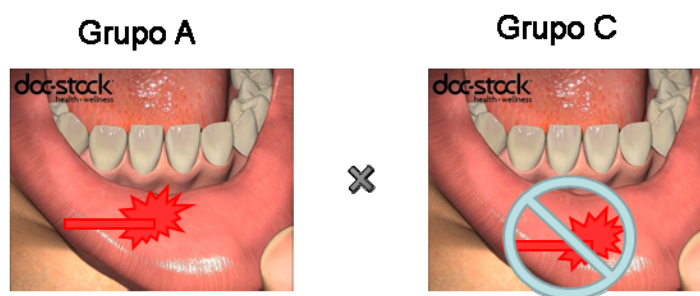


Figura 13 - Comparação entre grupo A (preventivo) e grupo C (curativo), nas amostras onde a mucosa não apresentava lesões de mucosite oral.

Considerando genes com valores válidos em pelo menos três amostras em ambos os grupos, dos 52 genes selecionados foram avaliados 34 genes para 7 amostras do Grupo A e 6 amostras do Grupo C, considerando os critérios de *Fold Change* maior ou igual a 2 e menor ou igual a -2 e o teste do *p Valor* $\leq 0,05$, através do teste *T student* não pareado. Onze apresentaram diferença de expressão considerando somente o *Fold Change*, sendo três genes mais expressos e oito genes

menos expressos no grupo A quando comparado com o grupo C, respectivamente, porém sem significância estatística (Figura 19).

Dos 11 genes diferentemente expressos, 10 estão relacionados à manutenção da homeostase, ou seja, estes genes modulam o ambiente celular, de modo a manter uma condição estável para o funcionamento celular mais eficiente. Estão relacionados à resposta ao estresse e regulação do metabolismo celular, modulação do sistema imune e regulação ao sistema de defesa imunológica.

Os genes que estão com aumento de expressão no grupo A em relação ao grupo C (IL-10, IL-1A, LY96) estão relacionados à secreção de citocinas, regulação da morte celular e regulação da sinalização da via do NFkB e apresentam papel anti-inflamatório. O LY96 codifica uma proteína de membrana que tem a função de conferir capacidade de resposta ao lipopolissacárido, ou seja apresenta um papel de defesa celular a bactérias. Os genes com diminuição de expressão (CD4, CD86, IL-6, MIF, NFATC3, PTGS2, PTPRC, SMAD3), no grupo A, estão relacionados com a hematopoese. Deste modo, estes estão relacionados com ativação e diferenciação de células mononucleares, agregação de leucócitos e de linfócitos, e a produção de citocinas.

4.7.2 Avaliação da Resposta Imune Frente à Ação Preventiva do Laser em Mucosa Ulcerada

Com o objetivo de identificar genes modulados pelo tratamento preventivo mucosite oral com laserterapia com potência de 15mw na mucosa ulcerada foram considerados as amostras cujos pacientes apresentavam mucosite em grau 2 ou 3, e que estavam no protocolo de laser de caráter preventivo (Grupo A) sendo comparado

com as amostras do grupo controle (Grupo C). Os parâmetros (potência e densidade de energia) do laser para ambos os grupos, são iguais, porém, o Grupo C iniciou a laserterapia quando diagnosticado mucosite grau 2, como representado na Figura 14.

Considerando genes com valores válidos em pelo menos três amostras em ambos os grupos, dos 52 genes selecionados foram avaliados 20 genes para 6 amostras do Grupo A e 6 amostras do Grupo C, considerando os critérios de *Fold Change* maior ou igual a 2 e menor ou igual a -2 e o teste do *p Valor* $\leq 0,05$, através do teste *T student* não pareado. Dos genes estudados, treze apresentaram diferença de expressão, considerando somente o *Fold Change*, sendo doze genes mais expressos e um gene menos expresso, no grupo A quando comparado com o grupo C, respectivamente, porém sem significância estatística (Figura 19).

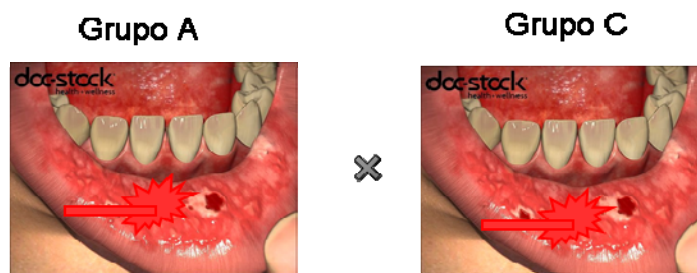


Figura 14 - Comparação entre grupo A (preventivo) e grupo C (curativo), nas amostras onde a mucosa apresentava úlceras decorrentes de mucosite oral.

Do total genes com alteração de expressão, doze (CCL3, CD68, HMOX1, ICAM1, IL-1A, LY96, MIF, NFkB2, STAT3, TGFB1, TNF, VEGFA) estão relacionados com regulação positiva do processo metabólico e na resposta ao estímulo. Alguns destes genes estão relacionados também na cicatrização de feridas envolvidas em processos inflamatórios, regulação negativa da morte celular, resposta a imune inata, regulação positiva de quimiotaxia, sendo assim, estes genes estão

relacionados com a migração dos neutrófilos e outros leucócitos ao local da infecção ou inflamação, além da diferenciação de monócitos em macrófagos e resposta à hipóxia.

O gene CCL2, que se apresenta menos expresso no grupo A, é um fator quimiotático que atrai os monócitos (estão relacionados com a defesa a corpos estranhos, se transformam em macrófagos nos tecidos) e basófilo (hipersensibilidade imediata a alérgenos).

4.7.3 Papel das Diferentes Potências do Laser na Mucosa Normal

Para identificar genes modulados na laserterapia com diferentes potências (15mw e 25mw) aplicado na modalidade preventiva na mucosa normal foram comparadas amostras cujos pacientes não apresentavam nenhuma lesão, e que estavam no protocolo de laser de caráter preventivo, ou seja, os pacientes iniciaram a laserterapia no início do tratamento oncológico dos grupos A e B. No grupo A potência e densidade de energia apresentam parâmetros diferentes do grupo B, como representado na Figura 15.

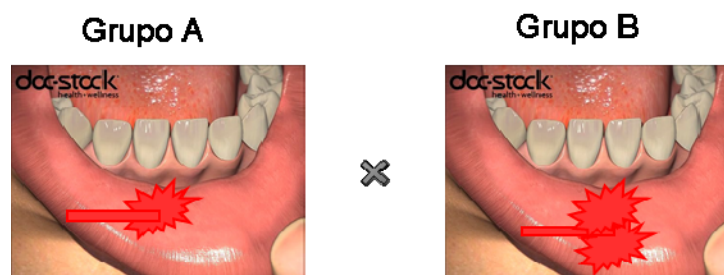


Figura 15 - Comparação entre grupo A (Potência 15mw, comprimento de onda 3,8 j/cm²-preventivo) e grupo B (Potência 25mw, comprimento de onda 6,3 j/cm²-preventivo), nas amostras onde a mucosa não apresentava lesões de mucosite oral.

Considerando genes com valores válidos em pelo menos três amostras em ambos os grupos, dos 52 genes selecionados foram avaliados 29 genes para 7 amostras do Grupo A e 8 amostras do Grupo B, considerando os critérios de *Fold Change* maior ou igual a 2 e menor ou igual a -2 e o teste do *p Valor* $\leq 0,05$, através do teste *T student* não pareado. Dos genes estudados, dezessete apresentaram diferença de expressão, sendo apenas um gene mais expresso no grupo A quando comparado com o grupo B, respectivamente, porém sem significância estatística (Figura 19).

Estes genes estão relacionados principalmente a regulação negativa do sistema imunológico, ativação celular e regulação da resposta ao estímulo (químicos).

A maioria dos genes com diminuição de expressão, no grupo A quando comparado com o grupo B, está relacionada com a regulação positiva na ativação de células, como a agregação de leucócitos e linfócitos e regulação da morte celular. Podem ainda estar associados com a regulação negativa da morte neural (HMOX1, STAT3, IL6, CCL2, BCL2L1, BAX), porém a maioria tem um papel na regulação na sinalização celular (SKI, PTPRC, STAT3, ICAM1, HMOX1, MIF, IL6, BCL2L1, TGFB1, CCL3).

O SKI codifica uma proteína nuclear que é descrita como associada com a cicatrização de feridas, através da proliferação de fibroblastos e inibição a secreção de colágeno. O seu aumento de expressão é associado com o menor tempo na cicatrização de feridas, com a diminuição da inflamação e maior aumento na taxa de reepitelização, conseqüentemente, aumentando formação de tecido de granulação, e

diminuindo a produção de colágeno, além disso, está envolvida com a regulação da sinalização de TGF-beta (LI et al. 2011).

4.7.4 Papel das Diferentes Potências do Laser no Manejo da Mucosa Ulcerada

Para identificar genes modulados na laserterapia com diferentes potências (15mw e 25mw) aplicado na modalidade preventiva na mucosa ulcerada foram comparadas amostras cujos pacientes já tinham desenvolvido úlceras em mucosa oral, e que estavam no protocolo de laser de caráter preventivo dos grupos A e B. No grupo A potência e densidade de energia apresentam parâmetros diferentes do grupo B, como representado na Figura 16. Salientando que em ambos os grupos, o paciente recebeu a laserterapia desde primeiro dia de tratamento oncológico.

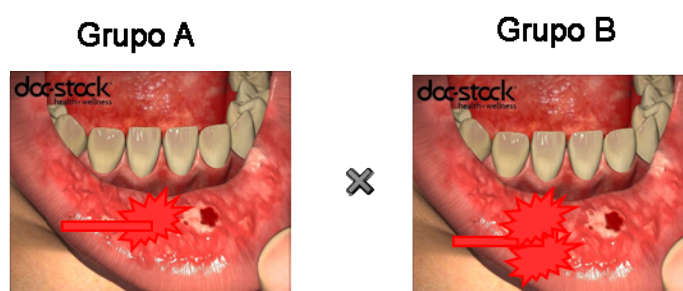


Figura 16 - Comparação entre grupo A (Potência 15mw, comprimento de onda 3,8 j/cm²-preventivo) e grupo B (Potência 25mw, comprimento de onda 6,3 j/cm²-preventivo) nas amostras onde a mucosa apresentava úlceras decorrentes de mucosite oral.

Considerando genes com valores válidos em pelo menos três amostras em ambos os grupos, dos 52 genes selecionados foram avaliados 20 genes para 5 amostras do Grupo A e 8 amostras do Grupo B, considerando os critérios de *Fold Change* maior ou igual a 2 e menor ou igual a -2 e o teste do *p Valor* $\leq 0,05$, através

do teste *T student* não pareado. Dos genes estudados, onze apresentaram diferença de expressão, sendo que sete genes se apresentavam mais expressos no grupo A quando comparado com o grupo B e 4 se apresentavam menos expressos tendo como referência o grupo A, sem significância estatística (Figura 19).

Dos 12 genes que apresentaram alteração de expressão, nove estão relacionados com a regulação de processos metabólicos, ou seja, estes genes proporcionam condições moleculares a fim de que a célula possa responder de modo rápido e eficiente aos traumas.

Os genes que apresentaram diminuição de expressão no grupo A (CCL2, HLA-DRA, LY96, NFATC3) estão relacionados com a imunidade inata, enquanto que os que apresentaram aumento de expressão neste mesmo grupo (CCL3, HMOX1, IL-1A, MIF, NFKB2, PTPRC, TNF) estão relacionados com a regulação positiva na produção de citocinas e de resposta inflamatória a dano celular, além de algum deles estarem regulando a cascata ERK1 e ERK2 (possuem função protetora, ou seja, de inibir a atividade da apoptose).

Os genes CCL3, CCL2, LY96 são responsáveis pela ativação da via de sinalização mediada por lipopolissacáridos. Esta endotoxina é um importante ativador da resposta imunológica, mediados pelo NF-kB, promovendo a transcrição de diversos genes relacionados à resposta inflamatória aguda. O gene LY96 também está relacionado com a sinalização da via do NF-kappaB e I-kappaB quinase. Estas vias podem apresentar tanto um papel anti como pró-inflamatório, porém seus efeitos são sinérgicos.

4.7.5 Efeito da Ação do Laser com Potência Elevada em Mucosa Normal

Para identificar genes modulados pelo laser preventivo com potência de 25mw na mucosa normal comparamos as amostras cujos pacientes não apresentavam nenhuma lesão, e que estavam no protocolo de laser de caráter preventivo (Grupo B) com o grupo controle (Grupo C). No grupo B potência e densidade de energia apresentam parâmetros diferentes do grupo C, como representado na Figura 17. Salientando que, um dos grupos ainda não iniciaram a laserterapia no momento da coleta (Grupo C).

Considerando genes com valores válidos em pelo menos três amostras em ambos os grupos, dos 52 genes selecionados foram avaliados 28 genes para 8 amostras do Grupo B e 6 amostras do Grupo C, considerando os critérios de *Fold Change* maior ou igual a 2 e menor ou igual a -2 e o teste do *p Valor* $\leq 0,05$, através do teste *T student* não pareado. Quatorze genes apresentaram expressão aumentada nas amostras do grupo B quando comparadas ao grupo C, enquanto quatro genes apresentaram diminuição da expressão nesta comparação. Foi obtido *valor de p* estatisticamente significativo na comparação para um dos genes (Figura 18).

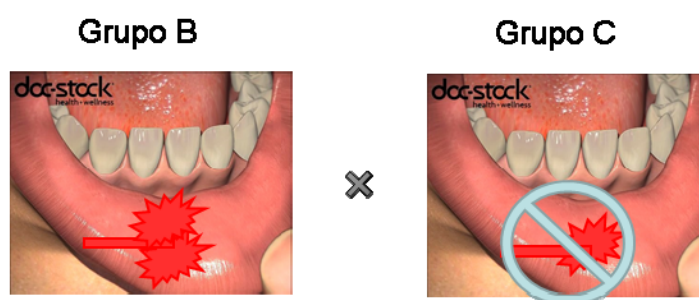


Figura 17 - Comparação entre grupo B (Potência 25mw, comprimento de onda 6,3 j/cm²-preventivo) e grupo C (Potência 15mw, comprimento de onda 3,8 j/cm²-curativo), nas amostras onde a mucosa não apresentava lesões de mucosite oral.

De uma maneira geral, os genes com aumento de expressão no grupo B, estão relacionados com a resposta inflamatória. Porém, a maioria deles está envolvida com a regulação do processo metabólico, sendo assim, este conjunto de genes contribui para a regulação dos processos de síntese e degradação de moléculas que modulam o crescimento e proliferação das células. Alguns destes genes (NFATC3, LY96, BAX, SYK) estão relacionados com a regulação da resposta das vias de sinalização mediados pelo sistema imunológico. Os genes FAS, STAT3, ICAM1, BAX, IL1A, HMOX1, CCL2 estão relacionados com a regulação negativa do processo apoptótico e a morte celular programada. Enquanto que HMOX1, CCL2, BAX realizam a regulação negativa do apoptose neuronal. Porém, HMOX1, TGFB1, IL1A estão relacionados com cicatrização de feridas envolvidos na resposta inflamatória.

Dentro dos genes que apresentam diminuição de expressão no grupo B (CD80, IKBKB, IL-6, SKI), há aqueles que atuam na regulação da via de ativação de NF-kB (IKBKB), aquelas que atuam como um potente indutor da resposta de fase aguda inflamatória além de induz a diferenciação de células nervosas (IL6), regulação positiva da produção de citocinas e ativação de linfócitos T (CD80) e gene que funciona como um repressor de sinalização de TGF-beta (SKI).

4.7.6 Resposta Imune Frente à Ação Preventiva do Laser de Potência Elevada em Mucosa Ulcerada

Para identificar genes modulados pelo laser preventivo com potência de 25mw na mucosa ulcerada comparamos as amostras cujos pacientes já tinham desenvolvido ulceras em mucosa oral, e que estavam no protocolo de laser de caráter preventivo (Grupo B) com o grupo controle (Grupo C). No grupo B potência e

densidade de energia apresentam parâmetros diferentes do grupo C, como representado na Figura 18. Salientando que os pacientes do Grupo C iniciaram a laserterapia após diagnóstico de mucosite grau 2.

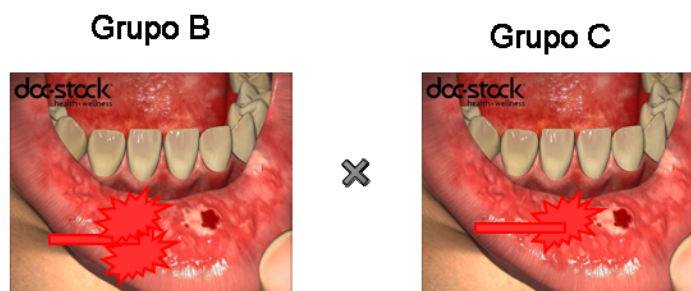


Figura 18 - Comparação entre grupo B (Potência 25mw, comprimento de onda 6,3 j/cm²-preventivo) e grupo C (Potência 15mw, comprimento de onda 3,8 j/cm²-curativo), nas amostras onde a mucosa apresentava úlceras decorrentes de mucosite oral.

Considerando genes com valores válidos em pelo menos três amostras em ambos os grupos, dos 52 genes selecionados foram avaliados 27 genes para 8 amostras do Grupo B e 6 amostras do Grupo C, considerando os critérios de *Fold Change* maior ou igual a 2 e menor ou igual a -2 e o teste do *p Valor* $\leq 0,05$, através do teste *T student* não pareado. Destes genes, onze apresentaram com a expressão aumentada nas amostras do grupo B quando comparadas ao grupo C, e quatro apresentavam-se com expressão diminuída nesta comparação, porém sem significância estatística (Figura 19).

Os genes com aumento de expressão no grupo B (BCL2L1, CD68, FAZ, HLA-DRA, HMOX1, ICAM1, LY96, NFATC3, STAT3, SYK, TGFB1) estão relacionados com a resposta inflamatória, agregação de linfócitos e de leucócitos,

ativação e diferenciação das células T, adesão célula-célula e cicatrização de feridas envolvidas na resposta inflamatória.

Por sua vez, os com diminuição de expressão neste grupo (IKBKB, IL-1A, MIF, SKI) estão relacionados com a regulação positiva na produção de citocinas, regulação da proliferação celular e do processo apoptótico. Estudos funcionais da IKBKB demonstram que esta proteína da via de sinalização intracelular é ativada por citocina e conseqüentemente, envolvida na ativação da resposta imune, através da ativação da via da NFkB (HÄCKER e KARIN 2006).

Grupo A x Grupo C				Grupo A x Grupo B				Grupo B x Grupo C			
Sem Lesão		Úlcera		Sem Lesão		Úlcera		Sem Lesão		Úlcera	
Genes Alvos	Fold Change	Genes Alvos	Fold Change	Genes Alvos	Fold Change	Genes Alvos	Fold Change	Genes Alvos	Fold Change	Genes Alvos	Fold Change
CD4	-2.65	CCL2	-3.28	BAX	-3.22	CCL2	-2.63	BAX	2.73	BCL2L1	10.02
CD86	-2.13	CCL3	2.87	BCL2L1	-2.35	CCL3	5.95	CCL2	5.48	CD68	3.00
IL-10	4.96	CD68	3.19	CCL2	-5.77	HLA-DRA	-3.70	CCL3	3.58	FAZ	213.05
IL-1A	2.14	HMOX1	29.58	CCL3	-3.33	HMOX1	4.42	CD68	3.11	HLA-DRA	2.04
IL-6	-16.23	ICAM1	4.27	CD68	-2.44	IL-1A	8.84	CD80	-2.04	HMOX1	2.58
LY96	4.63	IL-1A	3.16	FAZ	-230.75	LY96	-7.12	FAZ	99.12	ICAM1	3.17
MIF	-3.16	LY96	2.20	HLA-DRA	-3.18	MIF	9.41	HLA-DRA	2.50	IKBKB	-11.37
NFATC3	-3.85	MIF	3.92	HMOX1	-2.72	NFATC3	-4.63	HMOX1	4.05	IL-1A	-2.50
PTGS2	-2.11	NFKB2	2.51	ICAM1	-8.36	NFKB2	2.62	ICAM1	8.95	LY96	5.60
PTPRC	-2.78	STAT3	2.22	IL-1B	-2.25	PTPRC	3.35	IKBKB	-2.72	MIF	-2.40
SMAD3	-15.01	TGFB1	2.07	IL-2RA	-4.11	TNF	3.31	IL-1A	2.24	NFATC3	2.99
		TNF	3.80	MIF	-2.37			IL-6	-3.95	SKI	-3.44
		VEGFA	2.30	NFATC3	-50.32			LY96	5.50	STAT3	2.47
				PTPRC	-2.41			NFATC3	13.06	SYK	8.45
				SKI	2.61			SKI	-4.80	TGFB1	2.68
				STAT3	-3.12			STAT3	2.33		
				TGFB1	-6.05			SYK	3.86		
								TGFB1	5.22		

Figura 19 - Genes Diferencialmente Expressos entre as Comparações. Os genes que se apresentaram com aumento de expressão nas comparações entre os grupos estão representados em verde os que apresentaram diminuição de expressão em azul. A diferença de expressão é referente ao primeiro grupo em relação ao segundo. Grupo A-laserterapia preventiva, 15mW/ 3,8 J/cm²; Grupo B-laserterapia preventiva, 25mW/6,3 J/cm² e Grupo C-laserterapia curativa, 15mW/3,8 J/cm². O valor do *Fold Change* está descrito para os genes em cada uma das comparações, os valores dos genes que estão em vermelho apresentaram *valor de p* estatisticamente significativo.

4.7.7 Correlação das Bases Moleculares do Tratamento de Laserterapia

Os resultados obtidos no estudo clínico conduzido por Dr. Paulo André de Carvalho mostraram que os pacientes do Grupo A (15 mW/3,8 J/cm²-preventivo) apresentaram menor incidência de mucosite quando comparados com os pacientes dos Grupos B (25 mW/6,3 J/cm²-preventivo) e C (15 mW/3,8 J/cm²-curativo), com resultados com significância estatística. Neste grupo de pacientes estudados, o protocolo utilizado pelo Grupo A foi mais eficaz em reduzir a intensidade da mucosite oral radioinduzida e da dor. Ou seja, clinicamente, a maior quantidade de energia não foi mais efetiva na prevenção e tratamento da mucosite oral radioinduzida. Sendo assim, correlacionamos as alterações de expressão gênica entre os grupos em mucosa normal e ulcerada com o intuito de buscar um melhor entendimento desta interação.

Sem Lesão

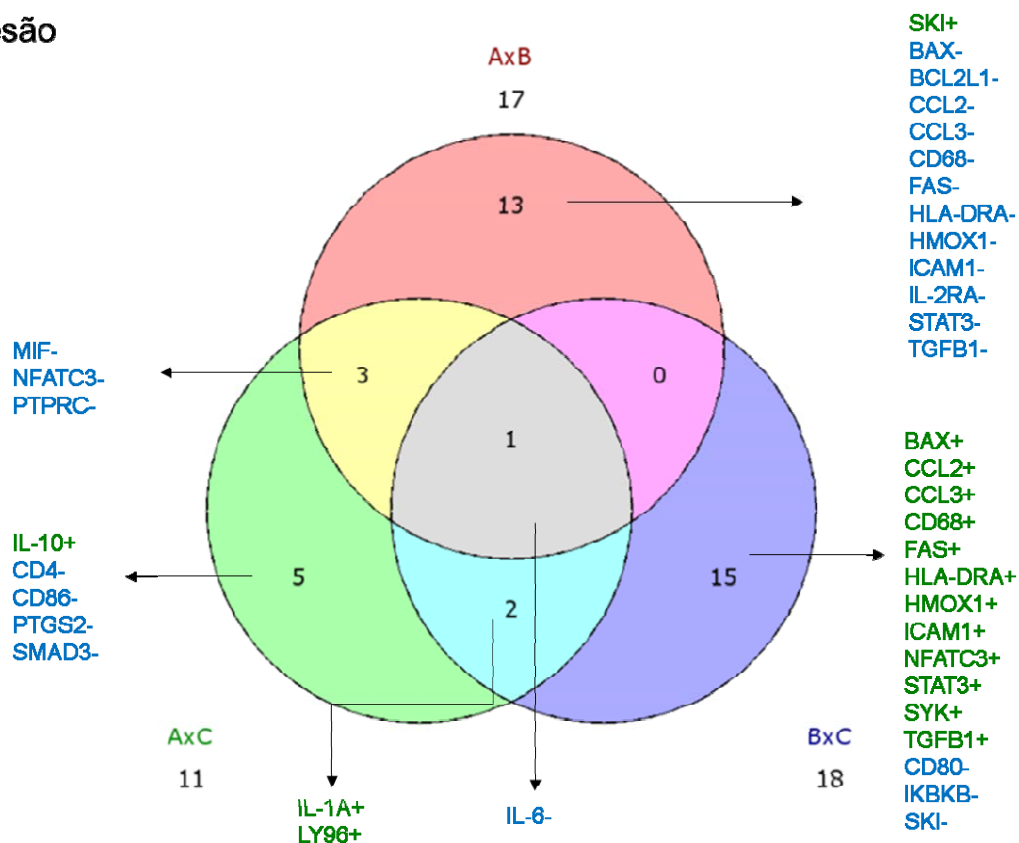


Figura 20 - Diagrama de Venn para genes diferencialmente expressos em mucosa normal entre as comparações dos grupos (AxC, AxB e BxC). Pode-se visualizar os genes com aumento de expressão (em verde, com símbolo +) e os genes com diminuição de expressão (em azul, com símbolo -), em cada uma das comparações. O valor nas caselas corresponde o valor total de genes, com alteração de expressão, encontrado em cada comparação.

Como pode ser analisado na Figura 20, nas amostras de mucosa normal, para todas as comparações (AxC, AxB e BxC) foi possível observar que houve uma menor expressão da IL-6.

Quando comparadas as amostras de mucosa normal dos pacientes que recebiam laserterapia preventiva, independente da potência e densidade de energia (grupo A e B), com as amostras que realizaram o protocolo curativo (grupo C) foi possível observar que a laserterapia foi capaz de proporcionar o aumento na

expressão dos genes IL-1A e LY96 (Figura 20). Estes genes não estão relacionados com nenhum processo biológico em comum, mas FELDMANN e SAKLATVALA (2001) relacionam a maior quantidade da IL-1A com um papel em respostas imunes, assumindo na pele a função de uma barreira, que impede a entrada de microorganismos patogênicos para o corpo (FELDMANN e SAKLATVALA 2001). Por sua vez, a proteína codificada por LY96 se associa com o receptor de tipo Toll 4 na superfície da célula e que confere capacidade de resposta à lipopolissacarídeo bacterianos (LPS), podendo estar envolvido na neutralização de endotoxinas (RefSeq, Set 2010).

Na comparação onde é observado a ação da laserterapia profilática com potência de 15mw (Grupo A) com as demais modalidades terapêuticas (grupo B e grupo C) na mucosa normal, pode-se observar que há uma menor expressão dos genes MIF, NFATC3, PTPRC (Figura 20). Estes genes estão relacionados principalmente com a regulação negativa de processo do sistema imunológico.

Úlcera

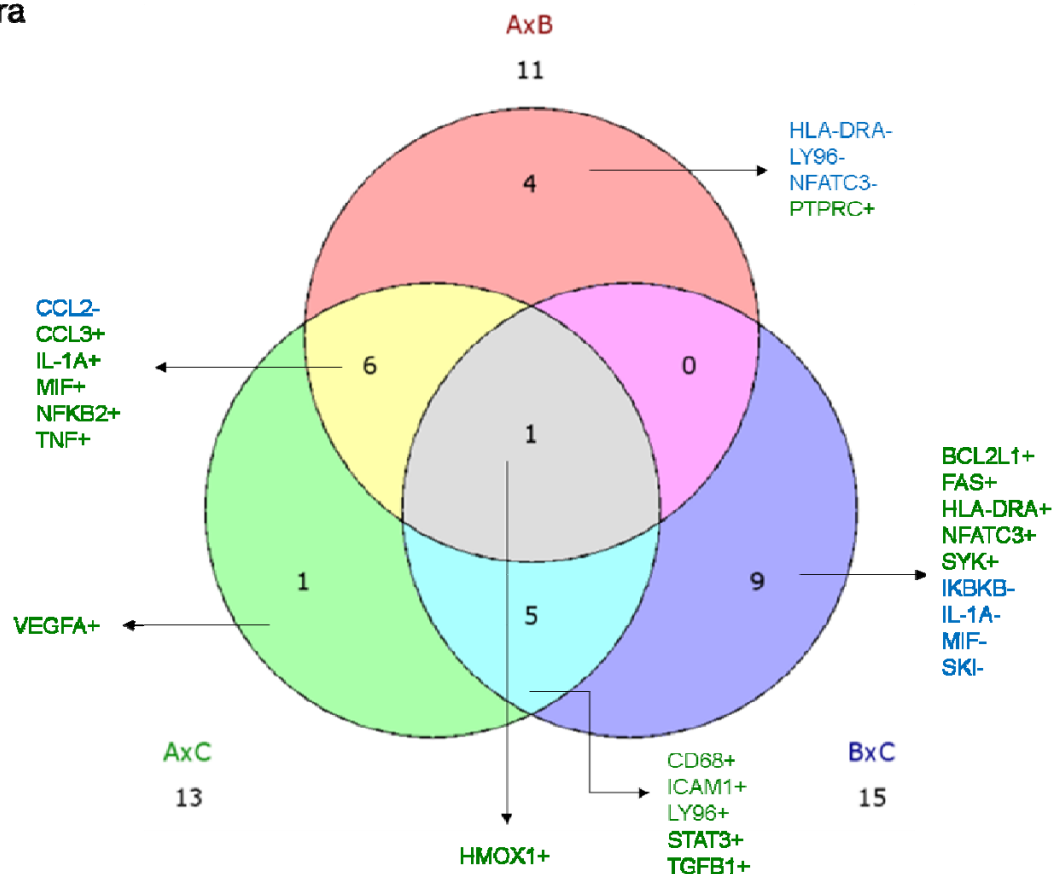


Figura 21 - Diagrama de Venn para genes diferencialmente expressos em mucosa ulcerada entre as comparações dos grupos (AxC, AxB e BxC). Pode-se visualizar os genes com aumento de expressão (em verde, com símbolo +) e os genes com diminuição de expressão (em azul, com símbolo -), em cada uma das comparações. O valor nas caselas corresponde o valor total de genes, com alteração de expressão, encontrado em cada comparação.

Analisando a Figura 21, foi possível observar, nas amostras de mucosa ulcerada que houve o aumento na expressão do gene HMOX1 nas três comparações estudadas (AxC, AxB e BxC).

Por sua vez, nas amostras de mucosa ulcerada onde os pacientes recebiam laserterapia preventiva, independente da potência e densidade de energia (grupo A e B), comparadas com as amostras que realizaram o protocolo curativo (grupo C) foi possível observar a maior expressão dos genes CD68, ICAM1, LY96, STAT3 e

TGFB1(Figura 21). Estes genes estão relacionados com a via de sinalização mediada por lipopolissacáridos, regulamentação de espécies reativas de oxigênio no processo metabólico e com a via de sinalização do NfkB.

Quando é comparado a ação da laserterapia profilática com potência de 15mw (Grupo A) com as demais modalidades terapêuticas (grupo B e grupo C) na mucosa ulcerada, pode-se observar que há uma menor expressão do gene CCL2, enquanto há um aumento na expressão dos genes CCL3, IL-1A, MIF, NFKB2 e TNF (Figura 21). Estes genes estão relacionados com a regulação na produção e secreção de citocinas.

5 DISCUSSÃO

O sistema imunológico é formado por uma complexa e redundante rede de vias e elementos imunoregulatórios que agem em conjunto para coordenar a resposta imune frente a fatores externos. Esta rede de elementos é formada por componentes celulares e moléculas solúveis que articulados entre si desencadeiam uma série de modificações celulares e bioquímicas a fim de recuperar o dano celular e consequentemente, restabelecer o funcionamento do tecido (SULTANI et al. 2012).

No desenvolvimento da mucosite oral ocorre o envolvimento de eventos celulares e moleculares que desencadeiam a ativação de vias que levam a cascata inflamatória, o que conduz a expressão de diversos genes e a síntese de várias proteínas inflamatórias, como as citocinas, quimiocinas, interleucinas, moléculas de adesão, fatores de crescimento e células inflamatórias (neutrófilos, linfócitos e monócitos / macrófagos) (BIAN et al. 2014). O início desta cascata inflamatória, a nível molecular, tem sido confirmado clinicamente, através da pesquisa de alguns fatores inflamatórios em amostras de saliva de pacientes que desenvolveram mucosite.

Na busca por desvendar esta complexa rede de vias e elementos imunoregulatórios, no desenvolvimento e tratamento da mucosite, analisamos o perfil de expressão de genes envolvidos no sistema imunológico e o significado biológico destes genes utilizando as ferramentas computacional *Go* e *Kegg*, através do programa *WEB-based GENE SeT AnaLysis Toolkit-WebGestalt* e do *STRING*, programa de análise de interação entre proteína-proteína.

Os genes que apresentaram diferença de expressão estão relacionados principalmente com a imuno-vigilância, com processo inflamatório, a morte celular programada, resposta a patógenos e a resposta a estímulos abióticos (resposta a estímulos físicos, como a radiação e a luz). O estudo desta rede de elementos indica que a modulação da resposta inflamatória é determinada por um equilíbrio delicado entre as citocinas anti e pró-inflamatória e que as alterações neste equilíbrio podem resultar resposta imune de defesa do hospedeiro, o que poderá desencadear tanto em uma inflamação crônica como na cura (SULTANI et al. 2012).

Até o momento poucas pesquisas têm utilizado a expressão gênica para avaliar a modulação do sistema imune pela laserterapia em pacientes com mucosite oral. Sendo assim, buscou-se a utilização da saliva como fonte de material biológico, pois é um método não invasivo e fácil de usar. A saliva tem muitas vantagens sobre o soro, incluindo facilidade na coleta, armazenamento e transporte, e que pode ser obtida a baixo custo em quantidades suficientes para análise. No entanto, deve-se levar em consideração a degradação do material genético pelas ribonuclease, porém, avanços técnicos recentes têm feito o possível para obter sucesso na estabilização do RNA salivar (SEGAL e WONG 2008).

No estudo, apesar de ser utilizado coletores específicos para a estabilização e o transporte deste material genético, houve a degradação e perda de algumas amostras e não foi possível amplificar o controle interno e por este motivo, algumas amostras foram excluídas do estudo. Além disso, os pacientes, ao decorrer do tratamento, diminuam a quantidade de saliva viável, o que dificultava a coleta do material. Mesmo com as dificuldades encontradas, a saliva deve ser um meio viável e importante para pesquisas de expressão gênica.

Inicialmente, buscou-se avaliar como estes genes estavam expressos ao longo da evolução da doença, independente do regime terapêutico proposto. Sendo assim, foram observados dois grupos de conjuntos gênicos que se comportavam com aumento ou diminuição de expressão ao longo do desenvolvimento da mucosite oral.

Os genes que apresentavam aumento de expressão durante a evolução da mucosite, estão descritos na plataforma *Go* como apresentando função reguladora da expressão gênica através da cascata ERK/ MAPK (ICAM1, LIF, VEGFA, IL1A, SYK, MIF, CCL3, CCR7, CD40). Nesta via, dependendo do tipo de célula e de estímulo, pode ocorrer a transmissão de sinais, o que resulta na prevenção ou indução de apoptose (BAX, HMOX1) ou progressão ciclo celular. Estes fatores estariam relacionados com as características de inflamação crônica e de tentativa de reparo através do tecido conjuntivo.

Estes genes com aumento de expressão ao longo da evolução da mucosite são descritos na plataforma *Go*, ainda, como apresentando função de regulação positiva da produção de citocinas (IL1A, SYK, MIF, CCL3, CCR7, BCL2L1, NFkB2), consequentemente, ocorre a regulação positiva ou negativa de vários genes e os seus fatores de transcrição que, por sua vez, resultam na produção de outras citocinas, ou aumento no número de receptores de superfície de outras moléculas, podendo ocorrer também a supressão do seu próprio efeito. Estes genes (ICAM1, CSF1, VEGFA, IL1A, SYK, MIF, CCL2, CCL3, CCR7, CD38, CD40, PTPRC) podem ainda estar relacionados com a regulação positiva da migração de leucócitos e de células mononucleares (linfócitos, macrófagos e plasmócitos) e o desenvolvimento de vasos sanguíneos, indicando a instalação e a manutenção de uma inflamação crônica.

Reforçando que estes genes se encontram caracterizados no perfil do *STEM*,

onde houve aumento de expressão, pode-se supor que este evento ocorreu ao longo da evolução da mucosite e está evidenciando por um quadro clínico onde há infecção persistente da mucosa oral, permanência de material necrótico no tecido e a exposição prolongada ao tratamento antineoplásico (radioterapia e / ou quimioterapia), perdurando um quadro de inflamação crônica.

Os genes que apresentam um padrão de diminuição de expressão na evolução da mucosite, através do *STEM*, estão relacionados com regulação negativa dos processos catabólicos, com a resposta celular ao reconhecimento de antígenos microbianos e na cicatrização de feridas. O padrão de expressão destes genes ao longo da evolução da doença é explicado por suas funções. Segundo descrição do *Medline*, enquanto a IL-10 e a FN1 estão relacionadas, respectivamente, com o processo anti-inflamatório e restabelecimento da homeostase tecidual, o NOS2 parecem desempenhar um papel importante na regulação inflamatória. O padrão do NOS2 de manutenção da expressão e depois decréscimo pode ser hipoteticamente explicado por uma tentativa de conter a evolução do processo inflamatório.

Com o intuito de identificar a modulação destes genes durante a desenvolvimento da mucosite, a expressão dos genes foi comparada entre os grupos de evolução da doença. Quando se observou a progressão do epitélio íntegro, estando este epitélio normal ou eritematoso, para mucosa ulcerada, ou seja, a instalação da fase ulcerativa, foi possível observar alteração na expressão de doze genes (C3, CCL5, CD40, IKBKB, IL-1A, IL-2RA, IL-6, MIF, PTPRC, SKI, SMAD7, NOS2). Nesta fase, ocorre a perda de integridade do epitélio e conseqüentemente um massivo infiltrado de células do sistema imune, em resposta tanto a injúria tecidual como a infecção microbiana associada (BIAN et al. 2015). Avaliando o perfil destes genes

pelo *Gene Ontology*, a maioria deles (C3, CCL5, CD40, IL-2RA, IL-6, MIF, PTPRC) estão envolvidos com a proliferação de células do sistema imunológico, principalmente de células mononucleares, de linfócitos e de leucócitos, além de regular positivamente a produção de citocinas, corroborando com o processo de evolução da doença, pois observa-se um aumento de expressão destes genes ao longo da instalação da fase ulcerativa.

O aumento da expressão dos genes C3, CCL5 e a IL-6, ao longo desta fase, promovem o aumento da secreção de substâncias que atuam na instalação da fase aguda do processo inflamatório, aumento da permeabilidade vascular, adesão leucocitária e quimiotaxia. Portanto, a ativação do C3 proporciona o início da cascata do sistema complemento, otimizando o processo inflamatório. O CCL5 é produzido por diversas células do sistema imune indicando que esta quimiocina pró-inflamatória atua em vários processos biológicos de controle de patógenos (MARQUES et al. 2013). Enquanto que a IL-6 apresenta um efeito duplo; na fase aguda atua como um mecanismo de defesa, além de estimular outras proteínas da inflamação aguda, mas na fase crônica esta citocina pode atuar como pró-inflamatória (HEINRICH et al. 1990; GABAY 2006).

O aumento da expressão do IKBKB, CD40, IL-1A ao longo da instalação do processo ulcerativo do epitélio parece desempenhar um papel essencial na ativação da via de sinalização de NFkB. A ativação desta via pode ser induzida também por diversos estímulos, tais como várias citocinas inflamatórias, produtos bacterianos ou virais e danos ao DNA (SULTANI et al. 2012). Contrariamente, o aumento na expressão do SKI e o SMAD7 durante este processo promove o silenciamento do TGF-beta e conseqüentemente, inibe a via do NFkB (YAN et al. 2009; BIAN et al.

2015). Este evento pode ser explicado pela regulação do SMAD7 por diferentes estímulos, incluindo a radiação ultravioleta (YAN et al. 2009), apesar da ação do laser não estar sendo observada nesta avaliação, este fator pode ter influenciado na regulação deste gene, contrariando os fatores moleculares na evolução da ulceração.

Por sua vez, quando avaliamos os genes com aumento na expressão (FN1, IL-10) que estão envolvidos na modificação da morfologia normal do epitélio, levando a sua alteração morfológica observamos que eles não apresentam nenhuma correlação direta, mas eles estão coerentes com o perfil de diminuição de expressão do *STEM*. O silenciamento da IL-10 na alteração morfológica do tecido é explicado com a instalação do quadro inflamatório, uma vez que este gene é um importante fator imunoregulatório que contribui com a diminuição da intensidade da resposta inflamatória e diminuição na produção de citocinas no tecido lesado (SULTANI et al. 2012). O silenciamento do gene FN1 durante este processo de modificação do epitélio, por sua vez, pode estar relacionado com o seu papel cicatrização de feridas, coagulação sanguínea e defesa do hospedeiro (*RefSeq, Jan 2016*).

No entanto, no processo de transformação do epitélio foram identificados genes com função de sinalização celular que apresentaram expressão diminuída no epitélio normal quando comparados com o epitélio com alterações morfológicas. Segundo as características patobiológicas da mucosite, nos estágios iniciais do tratamento oncológico ocorre a lesão do tecido através da ruptura da cadeia de DNA e morte celular nas camadas basais e suprabasais, levando a produção de espécies de oxigênio reativo (BIAN et al. 2015). Estes eventos, juntamente com o aumento da vasculatura local, podem ser explicados pelo aumento de expressão dos genes (BCL2L1, CCL2, HMOX1, ICAM1, VEGFA) na mucosite graus 1, 2 e 3. Por sua

vez, o LIF e o HLA-DRB1 atuam na apresentação de péptidos derivados de proteínas extracelulares das células do sistema imune.

Por fim, quando comparamos a expressão dos genes nas amostras com Mucosite grau 0, Mucosite grau 1 e Mucosite grau 2 e 3, pode-se observar a diminuição na expressão de três genes (CCL3, CCR7, SYK) para todas as comparações entre os grupos. O aumento na expressão destes genes, nos graus mais avançados da mucosite, os relaciona com o processo de instalação e progressão desta doença. O CCL3 é descrito por ZHANG et al. (2005) como uma quimiocina pró inflamatória com o papel de exacerbar a sintomatologia dolorosa em um processo inflamatório, através da sensibilização dos nociceptores. Esta quimiocina pode ser inibida através da produção de prostaglandinas, que tem um papel de limitar e controlar a resposta inflamatória (JING et al. 2003; ZHANG et al. 2005). O CCR7 é um receptor de quimiocina responsável pela migração que desempenha um papel importante na migração de células do sistema imune (células dendríticas e linfócitos T e B), recrutando estas células para o local da inflamação através da sua ativação por diversos ligantes (OHL et al. 2004; RAJU et al. 2015). Enquanto que o SYK apresenta papel crucial na via da imunidade adaptativa, além de ter outras funções biológicas, incluindo a adesão celular, o reconhecimento da imunidade inata, a ativação das plaquetas e desenvolvimento vascular (MÓCSAI et al. 2010).

Os efeitos da foto irradiação na mitocôndria a nível transcricional tem sido investigado, algumas hipóteses têm sido sugeridas para explicar este evento. Primeiramente, tem se estudado o aumento na expressão de genes envolvidos nas etapas do metabolismo mitocondrial (MASHA et al. 2013). Uma segunda possibilidade é a localização dos fotoreceptores que provocaria mudanças estruturais

e ativaria mecanismos como a ativação e inibição de enzimas e finalmente a ação do NO em promover a redução do citocromo *c* oxidase o que modifica a sinalização celular (KARU 2010)

Diversos estudos têm demonstrado que a fototerapia é capaz de estimular as células a nível molecular, alterando seus padrões e podem também modular o sistema imunológico (EVANS e ABRAHAMSE 2008; PIRES et al. 2011; OTON-LEITE et al. 2015; BASSO et al. 2015; SILVA et al. 2015). Uma possibilidade para estas modificações celulares poderia ser justificada pela modulação das atividades da mitocôndria. Porém, no nosso estudo, foram identificados doze genes (BAX, BCL2L1, CCL2, FAS, HMOX1, ICAM1, IL-1A, IL-6, NFATC3, SMAD3, TGFB1, VEGFA) relacionados com processos biológico de resposta a estímulos abióticos, ou seja, estes genes podem sofrer uma modificação na sua expressão devido a estímulos físicos ou químicos do meio ambiente, como a luz e a radiação. Estes genes permeiam atividades não só na mitocôndria, como no citosol e núcleo, portanto a bioestimulação do laser atua além das funções mitocondriais.

Após a avaliação de genes potencialmente envolvidos com o desenvolvimento e a progressão da mucosite, nós avaliamos a modulação da expressão gênica nos três grupos de pacientes com diferentes modalidades terapêuticas de laserterapia. No intuito de compreender como o laser de 660nm, com potência de 15mW e densidade de energia de 3,8 J/cm², modula o sistema imunológico de pacientes que o recebem de forma preventiva, este foi comparado com o grupo controle (grupo C), que receberam os mesmos parâmetros de laserterapia. Entre os genes com aumento de expressão no grupo A (15mW/3,8J/cm²) estão a citocina IL-10, citocina anti-inflamatória que apresenta efeitos pleiotrópicos

em imunomodulação, incluindo: regulação negativa de citocinas e bloqueio de a NF-kB, além do aumento na expressão do LY96, que tem um papel de defesa celular a microorganismos, isto sugere a ocorrência da fotobiomodulação do sistema imune (SULTANI et al. 2012). Esta hipótese pode ser fortalecida pelo fato de neste mesmo grupo ocorrer uma diminuição na expressão de genes que regulam a resposta ao estresse, mostrando que a laserterapia preventiva seria capaz de regular os danos causados pela terapia antineoplásica. Estes dados foram encontrados em outros estudos, onde foi demonstrado que o aumento na expressão da IL-10 estava associado com a diminuição da severidade da mucosite oral (OTON-LEITE et al. 2015).

Nesta comparação entre grupos, podemos observar o silenciamento no grupo A (15mW/3,8J/cm²) de genes (CD4, CD86, IL-6, MIF, NFATC3, PTPRC, SMAD3) envolvidos na regulação de células mononucleares do sistema imune, reforçando que na presença da ocorrência do dano celular frente a resposta ao tratamento anti-neoplásico, a laserterapia seria eficaz no controle destes primeiros eventos. Conforme discutido por EVANS e ABRAHAMSE (2008), se as células sofrem algum dano, a bioestimulação a laser estimularia a célula a normalizar a sua função, restaurando a homeostase e estimulando o reparo (EVANS e ABRAHAMSE 2008).

Quando se analisa as amostras que receberam a laserterapia preventiva, porém com potência 25mW e densidade de energia de 6,3J/cm² (Grupo B), comparando com o grupo controle que não recebeu laser (Grupo C) pode-se observar que há um padrão bem diferente na modulação imunológica. No Grupo B ocorre a ativação de diversos genes que atuam na regulação positiva dos processos do sistema imune e de genes que respondem a estímulos abióticos, propondo que a laserterapia neste grupo proporcionou a ativação de diversos genes que atuam na modulação do

sistema imune, na mucosa sem alteração morfológica.

Os genes (BAX, CCL2, FAS, HMOX1, ICAM1, IL-1A, NFATC3, TGFB1) que sofreram aumento de expressão no grupo B, respondendo a efeitos abióticos, estão relacionados com resposta aos íons metálicos e a substância inorgânica. Ou seja, estes genes estão relacionados a resposta ao estresse oxidativo celular, então haveria uma tentativa de equilibrar a produção de ROS, para que fosse possível restabelecer a homeostasia celular, uma vez que o sistema imune também utiliza o ROS para o controle de patógenos invasores. A ativação destes genes por uma potência maior do laser parece mostrar que há uma maior excitação celular, aumentando o potencial de influxo de íons intracelular.

Além da modulação destes genes, ocorre o silenciamento de genes que não apresentam correlações diretas, como o CD80, IKBKB, IL-6, SKI. A diminuição dos níveis da IL-6 sugerida por OTON-LEITE et al. (2015), com relação ao menor dano a mucosa oral. Enquanto que a diminuição da expressão da IKBKB através de inibidores, tem sido investigada como uma opção terapêutica para o tratamento de doenças inflamatórias (LLONA-MINGUEZ et al. 2013). O papel da CD80/CD86 no início da resposta imunitária pelos linfócitos T é bem documentado, porém VASILEVKO et al. (2002) demonstraram que o CD80 tem um papel importante para a manutenção destas respostas, portanto a menor expressão talvez possa ser explicada pela associação da sua diminuição de expressão em carcinoma de cabeça e pescoços com os níveis elevados de citocinas, como IL-1 e IL-6 (VASILEVKO et al. 2002).

Por fim, o SKI foi descrito por LIU et al. (2010) como fator de via de sinalização independente de SMAD, acelerando a proliferação para aumentar a

cicatrização de feridas, e, simultaneamente, diminuindo a secreção de colágeno para reduzir a formação de cicatriz.

Segundo EVANS e ABRAHAMSE (2008), as células que são irradiadas com uma dose de 16J/cm² apresentam a formação de radicais livres, pois considera-se que a dose administrada é acima do limite de sobrevivência das células alvos, resultando em um efeito inibitório. Os resultados demonstraram que estas células apresentam menor eficiência na fosforilação oxidativa, diminuição na síntese de proteínas, diminuição na proliferação e aumento na citotoxicidade (EVANS e ABRAHAMSE 2008). Sendo assim, podemos supor que o aumento na potência e densidade de energia (25mw e 6,3j/cm²) proporcionou uma maior bioestimulação celular, porém a modulação de alguns genes parece não favorecer a redução do processo inflamatório e cicatrização das úlceras.

Comparando, portanto, a expressão relativa dos genes, nas amostras onde não havia ulcerações, dos dois grupos de laserterapia preventiva [Grupo A (15mW /3,8J/cm²) contra Grupo B (25mW /6,3J/cm²)], pode-se observar que para o primeiro grupo houve uma menor expressão de genes (BAX, BCL2L1, CCL2, FAS, ICAM1, MIF, HMOX1, STAT3) envolvidos nos processos de morte celular programada, sendo que três deles (BAX, BCL2L1, STAT3) estão envolvidos com a organização da membrana mitocondrial.

O STAT3 estimula a proliferação de células B por meio da inibição de apoptose, uma função mediada pela indução do gene anti-apoptótico Bcl-2 (LEVY e LEE 2002). Porém foi observado que sob condições de stress, quando ROS é elevado nas mitocôndrias, o STAT3 funciona como captador de elétrons, reduzindo os níveis de ROS intracelular (SZCZEPANEK et al. 2012). Sendo assim, pode-se inferir que o

aumento na expressão deste gene no grupo que recebe tratamento com o laser, modulado com maior potência e densidades de energia, pode ter ocorrido devido a fotomodulação, uma vez que um dos mecanismos de ação deste gene é regular a homeostasia mitocondrial.

XANTHINAKI et al. (2008) comprovaram que há o aumento na expressão de proteínas pró-apoptóticas (BAX) e diminuição das proteínas anti-apoptóticas (BCL2L1) após a administração da radio e quimioterapia, este evento poderia explicar as altas taxas de apoptose que resultaria na mucosite (BOWEN et al. 2006; XANTHINAKI et al. 2008), pode-se presumir, portanto, que nas amostras do estudo estes genes sofreram modificações no seu padrão de expressão.

Tanto o BAX como o BCL2L1 são descritos como responsivos a estímulos abióticos, e se apresentam com diminuição de expressão no grupo A quando comparado com o grupo B. O BCL2L1 é um regulador da morte celular cuja função é modulada por ligação a complexos com os seus homólogos como o BAX. O BCL2L1 confere resistência celular a uma variedade de estímulos pró-apoptóticos, incluindo a hipóxia e a radiação. A sua expressão está correlacionada com a ausência de inflamação e morte de células endoteliais. BADRICHANI et al. (1999) sugere que esta proteína apresenta função anti-apoptótica e anti-inflamatória, através da inibição de NFkB, além de também interromper a via de morte celular iniciada pela TNF. Estes fatores podem qualificá-la como citoprotetora. O BAX é relatado com papel de interagir e aumentar a abertura do canal dependente da voltagem anión mitocondrial (VDAC), o que leva à perda de potencial de membrana e da libertação de citocromo c. Estas características propõem que estes genes são passíveis de sofrerem biomodulação pela laserterapia.

Ainda nesta comparação entre as amostras do grupo A contra as do grupo B, foi observado um aumento na expressão de genes (CCL3, HLA-DRA, HMOX1, IL-2RA, IL-6, NFATC3, TGFB1) responsáveis por regular o sistema imune nas amostras do grupo B. Destes, três genes (IL-6, NFATC3, TGFB1) respondem a estímulos abióticos, o que se faz presumir que estes genes também poderiam estar sendo modulados pela laserterapia.

Apesar de se observar o aumento na expressão de citocinas inflamatórias na fase inicial da mucosite oral, a manutenção desta fase pode atrasar o processo de cicatrização da mucosa (BARRIENTOS et al. 2008). Diante da análise da diferença de expressão dos genes modulados pela laserterapia no grupo B podemos inferir que o aumento na potência e densidade de energia (25mw e 6,3j/cm²) foi capaz de aumentar a expressão de citocinas inflamatórias, principalmente na fase inicial do tratamento anti-neoplásico, porém, avaliando a alteração de expressão destes genes e a evolução clínica das lesões, pode-se considerar que a modulação destes genes não favoreceu a resolução do processo inflamatório e acelerou a cicatrização das úlceras.

Como mencionado anteriormente, quando observamos as três comparações entre os grupos (AxC, AxB, BxC), nas amostras que não tinham desenvolvido mucosite, pode-se observar que elas apresentaram em comum a menor expressão da IL-6.

Diversos estudos mostram a diminuição da expressão da IL-6 em pacientes que recebem laserterapia para prevenção e/ou tratamento da mucosite (OTON-LEITE et al. 2015, SILVA et al. 2015; BASSO et al. 2015; EVANS e ABRAHAMSE 2008), corroborando com os achados do estudo. Deste modo pode-se levantar a hipótese de que o laser de baixa intensidade, independentemente de sua potência e

densidade de energia, é capaz de reduzir os níveis de expressão da IL-6 em mucosa não ulcerada de pacientes que estão em tratamento anti-neoplásico de tumores de cabeça e pescoço.

Pode-se observar também que independente da potência e densidade de energia do laser utilizado, os genes IL-1A e LY96 apresentaram-se com aumento de expressão em relação as amostras que não receberam a laserterapia.

A IL-1A é descrita como uma pró-proteína, que é processada proteoliticamente e libertada em resposta à lesão celular e, assim, induz apoptose. Alguns estudos demonstram que há um aumento na expressão da IL-1 em tumores quando comparados com seus controles normais, isso leva a crer que todas as amostras do estudo estariam apresentando um nível mais elevado deste gene (XANTHINAKI et al. 2008). Por sua vez, MCCARTHY et al. (2013) demonstraram que a expressão da IL-1A é induzida por aumentos endógenos do H₂O₂ e Ca²⁺ intracelular, induzindo a produção de mediadores inflamatórios, este fator explicaria o aumento de expressão deste gene quando ocorre a bioestimulação.

O LY96, como já foi mencionado anteriormente, é um gene envolvidos na defesa induzida por interferon contra a invasão de agentes patogênicos, através da neutralização de endotoxinas, mas não foi encontrado evidências que associasse seu aumento de expressão com a biomodulação pelo laser.

Por fim, parece que a biomodulação das células da mucosa sem lesão com o laser preventivo com potência de 15 mW e densidade de energia 3,8 J/cm² foi capaz de diminuir a expressão dos genes MIF, NFATC3, PTPRC, nestas amostras, quando comparado com a mucosa sem biomodulação ou quando a mucosa foi submetida a laserterapia profilática com potência de 25 mW e densidade de energia 6,3 J/cm².

Dentre estes genes destaca-se a alteração de expressão do NFATC3. Este gene é descrito como responsivo a estímulos abióticos e sua regulação é realizada através da sinalização cálcio-calcineurina, estes fatores justificariam a alteração da expressão deste gene entre os grupos estudados, uma vez que o laser aumenta o influxo de Ca^{2+} intracelular e o aumento na biodisponibilidade desta molécula estimularia a ativação deste gene. Porém, pode-se observar que o seu aumento de expressão foi observado no Grupo B, demonstrando que a maior potência e densidade de energia é necessária para a sua maior expressão.

O NFATC3 tem sido descrito por desempenhar funções pró-inflamatórias em células endoteliais, e sua inibição pode ser um alvo na regulação da inflamação (JIA et al. 2014). Porém, os dados revelados por RANJAN et al. (2014) mostram que NFATC3 também regulam a expressão de óxido nítrico sintase (iNOS) em macrófagos estimulados com lipopolissacáridos (LPS) e que este fator é essencial para a contenção da infecção bacteriana e contenção da sepse (RANJAN et al. 2014)

Como uma citocina pró-inflamatória, o MIF é libertado a partir de monócitos/macrófagos em resposta a vários estímulos, tais como endotoxina e radiação ultravioleta (NISHIHIRA 2000). O MIF participa na inflamação, respostas imunitárias, e o crescimento celular. Estudos tem demonstrados que este gene está envolvido na patogênese de doenças inflamatórias agudas e crônicas e que o bloqueio das bioatividades de MIF impede a cascata de citocinas inflamatórias. NISHIHIRA (2012) sugere que este gene poderia ser alvo em uma estratégia terapêutica no tratamento da doença inflamatória intestinal (NISHIHIRA 2012), sendo assim, a diminuição na expressão deste gene pela laserterapia poderia favorecer o controle da mucosite.

O gene PTPRC codifica uma proteína transmembrana denominada CD45 que funciona na sinalização do receptor de antígeno que está envolvida na imunidade adaptativa e inata. Além disso, a CD45 pode afetar a aderência e migração de células imunológicas e pode modular a produção e sinalização de citocinas (SAUNDERS e JOHNSON 2010). IRIE-SASAKI et al. (2003) descreveram que esta proteína regula negativamente a sinalização dos receptores de citocina envolvidos na diferenciação, proliferação, e a imunidade antiviral de células hematopoiéticas. Estes autores ainda sugerem que a modulação da atividade do CD45 poderia proporcionar uma oportunidade única para projetar drogas que poderiam ser utilizadas no câncer, alergia, transplante, ou doenças auto-imune (IRIE-SASAKI et al. 2003).

Observando a ação do laser sobre a mucosa ulcerada, nota-se que no grupo com laserterapia preventiva com potência de 15mW e densidade de energia de 3,8 J/cm² houve a modulação na expressão de genes que respondem a fatores abióticos. Estes genes estão relacionados com a cicatrização de feridas envolvidos na resposta inflamatória (HMOX1, TGFB1, IL1A) e a resposta a níveis de oxigênio diminuídos (HMOX1, ICAM, TGFB1, VEGFA, CCL2).

Ainda ocorreu a modulação de genes envolvidos na resposta inflamatória e na regulação positiva da via de sinalização mediada por lipopolissacáridos (CCL3, CD68, LY96, MIF, NFkB2, STAT3, TNF), sendo assim pode-se inferir que a laserterapia seria capaz de estimular o aumento de expressão direta ou indiretamente de genes envolvidos na modulação da resposta imune e assim favorecendo uma melhora do quadro inflamatória das lesões.

Esta hipótese também foi comprovada por outros estudos que observaram aumento na expressão do TNF e associam este dado a uma aceleração na a

cicatrização da mucosite oral e melhora na sintomatologia dolorosa (BASSO et al. 2015; SILVA et al. 2015). Porém, XANTHINAKI et al. (2008) afirmam que o TNF e a IL-1b estão envolvidos na ativação do NFkB, e que eles apresentariam efeitos sinérgicos para iniciar a resposta inflamatória. Eles comprovaram, em modelo animal, um aumento de expressão do TNF na mucosa de pacientes que desenvolveram mucosite após receber radioterapia em cabeça e pescoço (XANTHINAKI et al. 2008).

Quando observamos o Grupo B que recebeu laserterapia com aumento na potência e densidade de energia (25mW/6,3 J/cm²) comparada com a mucosa ulcerada que recebeu uma potência menor (15mW/3,8 J/cm²) e de forma curativa (Grupo C), ou seja, o grupo controle, observa-se também a modulação na expressão de genes que respondem a fatores abióticos. Porém, neste grupo os genes (BCL2L1, FAZ, HMOX1, ICAM1, NFATC3, TGFB1) que sofreram aumento de expressão estão relacionados com resposta a níveis de oxigênio. Dois destes genes (HMOX1, TGFB1) estão relacionados com a resposta a cicatrização de feridas.

Quando se compara os genes que foram ativados com o laser de potência 15mW e densidade energia 3,8 J/cm² (Grupo A) contra o laser de potência 25mW e densidade de energia 6,3 J/cm² (Grupo B) foi observado que o Grupo A, na mucosa ulcerada, parece ativar genes envolvidos na substituição de tecido conjuntivo, na regulação positiva da angiogênese, na reestruturação morfogênica de estruturas anatômicas, na regulação negativa da produção de citocinas envolvidas na resposta imune e na cicatrização de feridas. Por sua vez, os genes com expressão aumentada no Grupo B estão relacionados principalmente a resposta aos níveis de oxigênio, a ativação e agregação das células T e a agregação de leucócitos. Destes genes

ativados, somente o HMOX1, TGFB1 estão envolvidos no processo de cicatrização de feridas.

HOURELD (2014) discute diversos pontos sobre a fototerapia na cicatrização de feridas em pacientes diabéticos, ele afirma que os efeitos da irradiação do laser são dependentes dos seus parâmetros, como comprimento de onda, densidade de potência e densidade de energia, portanto as células irradiadas responderiam a laserterapia de maneiras diferentes a depender dos parâmetros estabelecidos. Ele afirma que o aumento da densidade de energia teria um efeito negativo nas células, enquanto que a densidade de energia muito baixa não proporcionaria nenhum efeito. Este fato pode ser explicado pelo espectro de absorção dos cromóforos que absorvem a luz em diferentes comprimentos de onda (HOURELD 2014).

NOVOSELOVA et al. (2006) afirmam que as ativações de genes podem servir como indicadores da resposta do organismo a luz de laser, dependendo da dose cumulativa e a localização da superfície exposta. Estes autores ainda afirmam que o laser de baixa intensidade é um instrumento muito poderoso que pode interferir com a função imunológica, e, portanto, deve ser usado com cautela, pois pode ser também um fator prejudicial por suprimir a atividade de células imunitárias (NOVOSELOVA et al. 2006).

Por fim, GAO et al. (2006) afirma que a alta densidade de energia inibe significativamente a viabilidade celular e induz a apoptose, através da inativação das proteínas quinases C. Estes autores sugerem que quando a dosagem de irradiação com laser é superior a 15 J / cm^2 ocorre a apoptose, e supõem que a dose ideal para que ocorra a proliferação celular está entre 0,8 e 15 J/cm^2 (GAO et al. 2006).

Estes dados levanta a hipótese de que o aumento na potência e densidade de

energia na laserterapia do Grupo B (25mW /6,3J/cm²) foi possível modular diversos genes que respondem aos processos relacionados ao sistema imune, porém parece não ter ocorrido um balanço da modulação destes genes com a resolução do processo inflamatório, pois segundo EVANS e ABRAHAMSE (2008) o aumento da dose pode causar uma injúria celular que poderá atuar como um efeito inibidor produzindo uma redução na proliferação celular (EVANS e ABRAHAMSE 2008). Alguns estudos propõem que a dose terapêutica não deve ser superior a 10 J/cm² (FUNK et al. 1993; VLADIMIROV et al. 2004), porém a determinação de qual a dose terapêutica ideal deveria ser utilizada de forma terapêutica não foram suficientemente estudados até agora.

Avaliando as três comparações entre os grupos (AxC, AxB, BxC), nas amostras de mucosa ulcerada, pode-se observar que o aumento na expressão do HMOX1 é comum a todas as comparações. O aumento da síntese desta hemoproteína ocorre como uma resposta geral ao estresse em sistemas biológicos, que pode ser provocado por agentes físicos ou químicos e envolve a geração de ROS. Este gene, pode também ser ativado por íons metálicos ou por mediadores inflamatórios (interleucinas e citocinas), e sua ativação ocorre devido a sua heme degradação pelo citocromo *c* levando a produção de monóxido de carbono (CO), Fe²⁺ e biliverdina. (RYTER et al. 2006; ZHU et al. 2011). Alguns estudos avaliam que as hemoproteínas podem sofrer fotosensibilização, desencadeando a decomposição de seus complexos contendo NO através da radiação do laser. BURAVLEV et al. (2014) demonstraram que a decomposição destes complexos, na presença de hemoproteína, restaura imediatamente a respiração mitocondrial (BURAVLEV et al. 2014).

Diante do exposto, pode-se supor que o aumento de expressão do HMOX1 nos grupos que receberam a laserterapia, independente dos parâmetros utilizados, em comparação aos demais, estaria relacionado com a sua regulação positiva estimulada pela fotoirradiação e que sua ativação atuaria como um mecanismo de defesa para diminuir a inflamação e lesão dos tecidos, assim como proposto por alguns estudos (ZHU et al. 2011; BURAVLEV et al. 2014).

Uma vez que este gene esteja ativado, ocorre tanto a síntese da citocina anti-inflamatória IL-10 como a biogênese mitocondrial, esta por sua vez, através do seu programa transcricional, limita a síntese de citocinas pró-inflamatórias. Sendo assim o HMOX1 atuaria como um citoprotetor geral, sendo importante durante o stress sistêmico causado por lesão ou infecção (PIANTADOSI et al. 2011).

Diante destes fatos pode-se supor que o laser do grupo A foi capaz de aumentar a expressão deste gene ao longo da evolução do processo inflamatório instaurado na mucosite, o que pode ter contribuído para a uma modulação mais eficiente do sistema imunológico buscando se obter a homeostase celular. Em contrapartida, o Grupo B apresentou um aumento na expressão deste gene mesmo em mucosa não ulcerada e manteve este aumento de expressão ao longo da evolução da doença.

Segundo, EVANS e ABRAHAMSE (2008) os efeitos biológicos da laserterapia dependem dos parâmetros estabelecidos, ou seja, o aumento ou diminuição do crescimento celular depende do comprimento de onda, da potência, do tipo e a densidade das células que estão recebendo a irradiação. Eles concluem afirmando que a dose, o comprimento de onda e o status fisiológico da célula (normal ou ulcerada) deve ser incluído nos parâmetros quando forem discutidos os

resultados de estudos com laserterapia de baixa potência (EVANS e ABRAHAMSE 2008).

Neste estudo, pode-se notar que o grupo que recebeu laserterapia profilática, independente dos parâmetros de laser que foram utilizados, para irradiação da mucosa ulcerada, apresentou aumento de expressão dos genes CD68, ICAM1, LY96, STAT3, TGFB1 quando comparado com o grupo que recebeu laserterapia curativa. Estes genes estão relacionados principalmente a via de sinalização mediada por lipopolissacáridos e a resposta a moléculas de origem bacteriana, pode-se supor, portanto que a laserterapia preventiva poderia conferir uma resistência celular a patógenos e conseqüentemente, favorecer a resposta inflamatória.

Além deste fator, REDDY (2004) afirma que os efeitos estimulatórios da laserterapia atuam principalmente na fase inflamatória e na fase proliferativa, indicando, portanto que o período de intervenção desta modalidade terapêutica pode ser decisivo para os processos de cicatrização das lesões (REDDY 2004).

No entanto, quando se observa os efeitos da laserterapia preventiva com potência de 15mW e densidade de energia de 3,8 J/cm² em relação as demais modalidades terapêuticas, constata-se que ocorreu a maior expressão de genes (CCL3, IL-1A, MIF, NFkB2) que estão envolvidos na regulação positiva da secreção de citocinas. BASSO et al. (2015) afirmam que a laserterapia pode promover a biomodulação das citocinas inflamatórias (TNF, IL-8, IL-6) e a síntese de fibroblastos, e que este efeito pode estar relacionado com a melhorar e aceleração da cicatrização de feridas orais (SIMUNOVIÇ-SOSKIÇ et al. 2010; BASSO et al. 2015). Portanto, considerando o resultado da avaliação clínica dos pacientes do grupo A, podemos entender que o estímulo na secreção de citocinas favoreceu a

melhora do quadro inflamatório e acelerou o processo de cicatrização deste grupo, quando comparado com os demais.

Deve ser enfatizado que a rápida intervenção nas lesões provocadas na mucosite oral é de grande importância para a cicatrização e para a melhora na qualidade de vida dos pacientes oncológicos que estão recebendo tratamento anti-neoplásico.

Para a análise dos dados, devemos levar em consideração a análise de evolução clínica dos grupos, realizada em outro estudo por Dr. Paulo André de Carvalho. O estudo comprovou que as aplicações de laser no Grupo A (15 mW/3,8J/cm²) reduziram o tempo e a severidade da mucosite oral em comparação com o Grupo B, (25mW /6,3J/cm²) e com o Grupo C (15 mW/3,8J/cm²) que foi submetido a laserterapia curativa. O Grupo A desenvolveu a mucosite mais tardiamente em relação aos demais, e apesar das aplicações de modo profilático, o Grupo B, com maior potência e densidade de energia (25mW/6,3J/cm²) não mostrou melhor resultado que o Grupo A (15mW/3,6J/cm²). Portanto, o estudo mostrou que os pacientes do Grupo A tiveram uma menor duração e redução na severidade das lesões, além de uma redução na intensidade da dor da mucosite oral.

Os dados comprovados no estudo clínico dos grupos corroboraram com os achados moleculares, por conseguinte o estudo mais aprofundado destes marcadores moleculares poderá elucidar os eventos que desencadeiam a mucosite oral radio e quimio induzida, assim como a biomodulação, através da laserterapia, do sistema imunológico nestes pacientes.

6 CONCLUSÃO

- 1- Foi possível identificar 52 genes que apresentaram expressão em mais de 25% das amostras estudadas, sendo que 42 destes genes apresentaram alteração de expressão ao longo da evolução da mucosite oral.
- 2- Ao longo da evolução da doença foi possível identificar o aumento de expressão dos genes CCL3, CCR7, SYK, ao longo da instalação e progressão da mucosite.
- 3- A diminuição na expressão dos genes BCL2L1, CCL2, HLA- DRB1, HMOX1, ICAM1, LIF, VEGFA e o aumento na expressão dos genes FN1, IL-10 foram relacionados com as primeiras alterações moleculares que aconteceriam no epitélio, modificando a homeostase celular.
- 4- O aumento na expressão do NOS2 e a diminuição na expressão dos genes C3, CCL5, CD40, IKBKB, IL-1A, IL-2RA, IL-6, MIF, PTPRC, SKI, SMAD7 foram relacionados com os processos que levam ao desencadeamento das lesões ulceradas da mucosa oral durante a evolução da mucosite.
- 5- Através da análise de expressão dos genes entre os grupos estudados foi possível propor que a laserterapia no Grupo A promoveu uma imunoregulação de um conjunto de genes (diminuição da expressão do CCL2 e aumento na expressão dos genes CCL3, IL-1A, MIF, NFKB2, TNF) o que proporcionou um manejo mais eficiente das lesões de mucosite oral, o que foi possível comprovar, através dos dados obtidos na avaliação clínica dos

pacientes, ou seja, os pacientes deste grupo apresentaram uma evolução clínica da doença com menor duração e uma menor severidade das lesões.

- 6- O modelo terapêutico de Laserterapia de Baixa Potência com a densidade de potência de 15 mW e densidade de energia de 3,8 J/cm² utilizado de forma preventiva pode ser sugerida como protocolo de prevenção e tratamento da mucosite oral radio e quimio induzida para pacientes em tratamento de tumores de cabeça e pescoço.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Albertini R, Aimbire FS, Correa FI, et al. Effects of different protocol doses of low power gallium-aluminum-arsenate (Ga-Al-As) laser radiation (650 nm) on carrageenan induced rat paw edema. **J Photochem Photobiol B** 2004; 74:101-7.

Albertini R, Villaverde AB, Aimbire F, et al. Anti-inflammatory effects of low-level laser therapy (LLLT) with two different red wavelengths (660 nm and 684 nm) in carrageenan-induced rat paw edema. **J Photochem Photobiol B** 2007; 89:50-5.

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; 235:1244-56.

Al-Dasooqi N, Sonis ST, Bowen JM, et al. Emerging evidence on the pathobiology of mucositis. **Support Care Cancer** 2013; 21:3233-41.

Antunes HS, Schluckebier LF, Herchenhorn D, et al. Cost-effectiveness of low-level laser therapy (LLLT) in head and neck cancer patients receiving concurrent chemoradiation. **Oral Oncol** 2016; 52:85-90.

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; 105:180-6.

Badrichani AZ, Stroka DM, Bilbao G, Curiel DT, Bach FH, Ferran C. Bcl-2 and Bcl-XL serve an anti-inflammatory function in endothelial cells through inhibition of NF-kappaB. **J Clin Invest** 1999; 103:543-53.

Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M. Growth factors and cytokines in wound healing. **Wound Repair Regen** 2008; 16:585-601.

Barton GM. A calculated response: control of inflammation by the innate immune system. **J Clin Invest** 2008; 118:413-20.

Basso FG, Pansani TN, Soares DG, et al. Biomodulation of inflammatory cytokines related to oral mucositis by low-level laser therapy. **Photochem Photobiol** 2015; 91:952-6.

Bian L, Han G, Zhao CW, Garl PJ, Wang XJ. The role of Smad7 in oral mucositis. **Protein Cell** 2015; 6:160-9.

Blijlevens NM, Donnelly JP, De Pauw BE. Mucosal barrier injury: biology, pathology, clinical counterparts and consequences of intensive treatment for haematological malignancy: an overview. **Bone Marrow Transplant** 2000; 25:1269-78.

Bowen JM, Gibson RJ, Cummins AG, Keefe DM. Intestinal mucositis: the role of the Bcl-2 family, p53 and caspases in chemotherapy-induced damage. **Support Care Cancer** 2006; 14:713-31.

Buravlev EA, Zhidkova TV, Vladimirov YA, Osipov AN. Effects of low-level laser therapy on mitochondrial respiration and nitrosyl complex content. **Lasers Med Sci** 2014; 29:1861-6.

Byrnes KR, Barna L, Chenault VM, et al. Photobiomodulation improves cutaneous wound healing in an animal model of type II diabetes. **Photomed Laser Surg** 2004; 22:281-90.

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; 47:1176-81.

Chen CH, Wang CZ, Wang YH, et al. Effects of low-level laser therapy on M1-related cytokine expression in monocytes via histone modification. **Mediators Inflamm** 2014; 2014:625048.

Citrin DE, Hitchcock YJ, Chung EJ, et al. Determination of cytokine protein levels in oral secretions in patients undergoing radiotherapy for head and neck malignancies. **Radiat Oncol** 2012; 7:64.

Dinarello CA. Proinflammatory cytokines. **Chest** 2000; 118:503-8.

Ernst J, Bar-Joseph Z. STEM: a tool for the analysis of short time series gene expression data. **BMC Bioinformatics** 2006; 7:191.

Ernst J, Nau GJ, Bar-Joseph Z. Clustering short time series gene expression data. **Bioinformatics** 2005; 21 Suppl 1:i159-68.

Evans DH, Abrahamse H. Efficacy of three different laser wavelengths for in vitro wound healing. **Photodermatol Photoimmunol Photomed** 2008; 24:199-210.

Feldmann M, Saklatvala J. Proinflammatory cytokines. In: Durum SK, Oppenheim JJ, Feldmann M, editors. Cytokine reference: a compendium of cytokines and other mediators of host defense. **Boston: Academic Press**; 2001. p.291-306.

Ferreira B, da Motta Silveira FM, de Orange FA. Low-level laser therapy prevents severe oral mucositis in patients submitted to hematopoietic stem cell transplantation: a randomized clinical trial. **Support Care Cancer** 2016; 24:1035-42.

Fukuda TY, Tanji MM, Silva SR, Sato MN, Plapler H. Infrared low-level diode laser on inflammatory process modulation in mice: pro- and anti-inflammatory cytokines. **Lasers Med Sci** 2013; 28:1305-13.

Funk JO, Kruse A, Neustock P, Kirchner H. Helium-neon laser irradiation induces effects on cytokine production at the protein and the mRNA level. **Exp Dermatol** 1993; 2:75-83.

Gabay C. Interleukin-6 and chronic inflammation. **Arthritis Res Ther** 2006; 8 Suppl 2:S3.

Gao X, Chen T, Xing D, Wang F, Pei Y, Wei X. Single cell analysis of PKC activation during proliferation and apoptosis induced by laser irradiation. **J Cell Physiol** 2006; 206:441-8.

Gautam AP, Fernandes DJ, Vidyasagar MS, Maiya GA. Low level helium neon laser therapy for chemoradiotherapy induced oral mucositis in oral cancer patients - A randomized controlled trial. **Oral Oncol** 2012; 48:893-7.

Gouvêa de Lima A, Villar RC, de Castro G Jr, et al. Oral mucositis prevention by low-level laser therapy in head-and-neck cancer patients undergoing concurrent chemoradiotherapy: a phase III randomized study. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 2012; 82:270-5.

Häcker H, Karin M. Regulation and function of IKK and IKK-related kinases. **Sci STKE** 2006; 2006:re13.

Heinrich PC, Castell JV, Andus T. Interleukin-6 and the acute phase response. **Biochem J** 1990; 265:621-36.

Heldin CH, Westermark B. Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. **Physiol Rev** 1999; 79:1283-316.

Hourel NN. Shedding light on a new treatment for diabetic wound healing: a review on phototherapy. **ScientificWorldJournal** 2014; 2014:398412.

Irie-Sasaki J, Sasaki T, Penninger JM. CD45 regulated signaling pathways. **Curr Top Med Chem** 2003; 3:783-96.

Jaguar GC, Prado JD, Nishimoto IN, et al. Low-energy laser therapy for prevention of oral mucositis in hematopoietic stem cell transplantation. **Oral Dis** 2007; 13:538-43.

Jia YY, Lu J, Huang Y, et al. The involvement of NFAT transcriptional activity suppression in SIRT1-mediated inhibition of COX-2 expression induced by PMA/Ionomycin. **PLoS One** 2014; 9:e97999.

Jing H, Vassiliou E, Ganea D. Prostaglandin E2 inhibits production of the inflammatory chemokines CCL3 and CCL4 in dendritic cells. **J Leukoc Biol** 2003; 74:868-79.

Karu T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. **J Photochem Photobiol B** 1999; 49:1-17.

Karu TI. Multiple roles of cytochrome c oxidase in mammalian cells under action of red and IR-A radiation. **IUBMB Life** 2010; 62:607-10.

Lambros MP, Parsa C, Mulamalla H, et al Identifying cell and molecular stress after radiation in a three-dimensional (3-D) model of oral mucositis. **Biochem Biophys Res Commun** 2011; 405:102-6.

Levy DE, Lee CK. What does Stat3 do? **J Clin Invest** 2002; 109:1143-8.

Li P, Liu P, Xiong RP, et al. Ski, a modulator of wound healing and scar formation in the rat skin and rabbit ear. **J Pathol** 2011; 223:659-71.

Liu X, Li P, Chen XY, Zhou YG. c-Ski promotes skin fibroblast proliferation but decreases type I collagen: implications for wound healing and scar formation. **Clin Exp Dermatol** 2010; 35:417-24.

Llona-Minguez S, Baiget J, Mackay SP. Small-molecule inhibitors of I κ B kinase (IKK) and IKK-related kinases. **Pharm Pat Anal** 2013; 2:481-98.

Logan RM, Stringer AM, Bowen JM, 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; 33:448-60.

Mariathasan S, Monack DM. Inflammasome adaptors and sensors: intracellular regulators of infection and inflammation. **Nat Rev Immunol** 2007; 7:31-40.

Marques RE, Guabiraba R, Russo RC, Teixeira MM. Targeting CCL5 in inflammation. **Expert Opin Ther Targets** 2013; 17:1439-60.

Masha RT, Houreld NN, Abrahamse H. Low-intensity laser irradiation at 660 nm stimulates transcription of genes involved in the electron transport chain. **Photomed Laser Surg** 2013; 31:47-53.

McCarthy DA, Clark RR, Bartling TR, et al. Redox control of the senescence regulator interleukin-1 α and the secretory phenotype. **J Biol Chem** 2013; 288:32149-59.

Medzhitov R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. **Nature** 2007; 449:819-26.

Miyake K. Innate immune sensing of pathogens and danger signals by cell surface Toll-like receptors. **Semin Immunol** 2007; 19:3-10.

Mócsai A, Ruland J, Tybulewicz VL. The SYK tyrosine kinase: a crucial player in diverse biological functions. **Nat Rev Immunol** 2010; 10:387-402.

Morales-Rojas T, Viera N, Morón-Medina A, Alvarez CJ, Alvarez A. Proinflammatory cytokines during the initial phase of oral mucositis in patients with acute lymphoblastic leukaemia. **Int J Paediatr Dent** 2012; 22:191-6.

Muralidharan S, Mandrekar P. Cellular stress response and innate immune signaling: integrating pathways in host defense and inflammation. **J Leukoc Biol** 2013; 94:1167-84.

Nathan C. Points of control in inflammation. **Nature** 2002; 420:846-52.

Nishihira J. Macrophage migration inhibitory factor (MIF): its essential role in the immune system and cell growth. **J Interferon Cytokine Res** 2000; 20:751-62.

Nishihira J. Molecular function of macrophage migration inhibitory factor and a novel therapy for inflammatory bowel disease. **Ann N Y Acad Sci** 2012; 1271:53-7.

Novoselova EG, Glushkova OV, Cherenkov DA, Chudnovsky VM, Fesenko EE. Effects of low-power laser radiation on mice immunity. **Photodermatol Photoimmunol Photomed** 2006; 22:33-8.

Ohl L, Mohaupt M, Czeloth N, et al. CCR7 governs skin dendritic cell migration under inflammatory and steady-state conditions. **Immunity** 2004; 21:279-88.

Oton-Leite AF, Silva GB, Morais MO, et al. Effect of low-level laser therapy on chemoradiotherapy-induced oral mucositis and salivary inflammatory mediators in head and neck cancer patients. **Lasers Surg Med** 2015; 47:296-305.

Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Res.** 2001 May 1;29(9):e45.

Papadakis KA, Targan SR. Role of cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. **Annu Rev Med** 2000; 51:289-98.

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

Peplow PV, Chung TY, Ryan B, Baxter GD. Laser photobiomodulation of gene expression and release of growth factors and cytokines from cells in culture: a review of human and animal studies. **Photomed Laser Surg** 2011; 29:285-304.

Pezelj-Ribarić S, Kqiku L, Brumini G, et al. Proinflammatory cytokine levels in saliva in patients with burning mouth syndrome before and after treatment with low-level laser therapy. **Lasers Med Sci** 2012; 8.

Piantadosi CA, Withers CM, Bartz RR, et al. Heme oxygenase-1 couples activation of mitochondrial biogenesis to anti-inflammatory cytokine expression. **J Biol Chem** 2011; 286:16374-85.

Pires D, Xavier M, Araújo T, Silva JA Jr, Aimbire F, Albertini R. Low-level laser therapy (LLLT; 780 nm) acts differently on mRNA expression of anti- and pro-inflammatory mediators in an experimental model of collagenase-induced tendinitis in rat. **Lasers Med Sci** 2011; 26:85-94.

Raju R, Gadakh S, Gopal P, George B, Advani J, Soman S, Prasad TS, Girijadevi R. Differential ligand-signaling network of CCL19/CCL21-CCR7 system. *Database (Oxford)* 2015; 2015:bav106.

Ranjan R, Deng J, Chung S, et al. The transcription factor nuclear factor of activated T cells c3 modulates the function of macrophages in sepsis. **J Innate Immun** 2014; 6:754-64.

Reddy GK. Photobiological basis and clinical role of low-intensity lasers in biology and medicine. **J Clin Laser Med Surg** 2004; 22:141-50.

Russo G, Haddad R, Posner M, Machtay M. Radiation treatment breaks and ulcerative mucositis in head and neck cancer. **Oncologist** 2008; 13:886-98.

Ryter SW, Alam J, Choi AM. Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications. **Physiol Rev** 2006; 86:583-650.

Safavi SM, Kazemi B, Esmacili M, Fallah A, Modarresi A, Mir M. Effects of low-level He-Ne laser irradiation on the gene expression of IL-1beta, TNF-alpha, IFN-gamma, TGF-beta, bFGF, and PDGF in rat's gingiva. **Lasers Med Sci** 2008; 23:331-5.

Saunders AE, Johnson P. Modulation of immune cell signalling by the leukocyte common tyrosine phosphatase, CD45. **Cell Signal** 2010; 22:339-48.

Segal A, Wong DT. Salivary diagnostics: enhancing disease detection and making medicine better. **Eur J Dent Educ** 2008; 12 Suppl 1:22-9.

Silva GB, Sacono NT, Othon-Leite AF, et al. Effect of low-level laser therapy on inflammatory mediator release during chemotherapy-induced oral mucositis: a randomized preliminary study. **Lasers Med Sci** 2015; 30:117-26.

Simões A, Eduardo FP, Luiz AC, 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; 41:264-70.

Simunović-Soskić M, Pezelj-Ribarić S, Brumini G, Glazar I, Grzić R, Miletić I. Salivary levels of TNF-alpha and IL-6 in patients with denture stomatitis before and after laser phototherapy. **Photomed Laser Surg** 2010; 28:189-93.

Smith KC. The photobiological basis of low-level laser radiation therapy. **Laser Ther** 1990; 3:19-24.

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

Sonis ST, Peterson RL, Edwards LJ, et al. Defining mechanisms of action of interleukin-11 on the progression of radiation-induced oral mucositis in hamsters. **Oral Oncol** 2000; 36:373-81.

Sonis ST, Scherer J, Phelan S, et al. The gene expression sequence of radiated mucosa in an animal mucositis model. **Cell Prolif** 2002; 35:93-102.

Sonis ST. The biologic role for nuclear factor-kappaB in disease and its potential involvement in mucosal injury associated with anti-neoplastic therapy. **Crit Rev Oral Biol Med** 2002; 13:380-9.

Sonis ST, Elting LS, Keefe D, et al. Perspectives on cancer therapy-induced mucosal injury: pathogenesis, measurement, epidemiology, and consequences for patients. **Cancer** 2004; 100:1995-2025.

Sonis ST. A biological approach to mucositis. **J Support Oncol** 2004a; 2:21-32.

Sonis ST. The pathobiology of mucositis. **Nat Rev Cancer** 2004b; 4:277-84.

Sonis ST. Pathobiology of oral mucositis: novel insights and opportunities. **J Support Oncol** 2007; 5(9 Suppl 4):3-11.

Sonis ST. Mucositis: The impact, biology and therapeutic opportunities of oral mucositis. **Oral Oncol** 2009; 45:1015-20.

Stokman MA, Spijkervet FK, Boezen HM, Schouten JP, Roodenburg JL, de Vries EG. Preventive intervention possibilities in radiotherapy- and chemotherapy-induced oral mucositis: results of meta-analyses. **J Dent Res** 2006; 85:690-700.

Sultani M, Stringer AM, Bowen JM, Gibson RJ. Anti-inflammatory cytokines: important immunoregulatory factors contributing to chemotherapy-induced gastrointestinal mucositis. **Chemother Res Pract** 2012; 2012:490804.

Szczepanek K, Lesnefsky EJ, Larner AC. Multi-tasking: nuclear transcription factors with novel roles in the mitochondria. **Trends Cell Biol** 2012; 22:429-37

Szklarczyk D, Franceschini A, Wyder S, et al. STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. **Nucleic Acids Res** 2015; 43:D447-52.

Tadakuma T. Possible application of the laser in immunobiology. **Keio J Med** 1993; 42:180-2.

Takamiya M, Saigusa K, Nakayashiki N, Aoki Y. Studies on mRNA expression of basic fibroblast growth factor in wound healing for wound age determination. **Int J Legal Med** 2003; 117:46-50.

Usumez A, Cengiz B, Oztuzcu S, Demir T, Aras MH, Gutknecht N. Effects of laser irradiation at different wavelengths (660, 810, 980, and 1,064 nm) on mucositis in an animal model of wound healing. **Lasers Med Sci** 2014; 29:1807-13.

Vasilevko V, Ghochikyan A, Holterman MJ, Agadjanyan MG. CD80 (B7-1) and CD86 (B7-2) are functionally equivalent in the initiation and maintenance of CD4+ T-cell proliferation after activation with suboptimal doses of PHA. **DNA Cell Biol** 2002; 21:137-49.

Vladimirov Iu A, Klebanov GI, Borisenko GG, Osipov AN. Molecular and cellular mechanisms of the low intensity laser radiation effect. **Biofizika** 2004; 49:339-50.

Wong SF, Wilder-Smith P. Pilot study of laser effects on oral mucositis in patients receiving chemotherapy. **Cancer J** 2002; 8:247-54.

Xanthinaki A, Nicolatou-Galitis O, Athanassiadou P, et al. Apoptotic and inflammation markers in oral mucositis in head and neck cancer patients receiving radiotherapy: preliminary report. **Support Care Cancer** 2008; 16:1025-33.

Yan X, Liu Z, Chen Y. Regulation of TGF-beta signaling by Smad7. **Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)** 2009; 41:263-72.

Zanin T, Zanin F, Carvalhosa AA, Castro PH, Pacheco MT, Zanin IC, Brugnera A Jr. Use of 660-nm diode laser in the prevention and treatment of human oral mucositis induced by radiotherapy and chemotherapy. **Photomed Laser Surg** 2010; 28:233-7.

Zhang N, Inan S, Cowan A, et al. A proinflammatory chemokine, CCL3, sensitizes the heat- and capsaicin-gated ion channel TRPV1. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2005; 102:4536-41.

Zhu X, Fan WG, Li DP, et al. Heme oxygenase-1 system and gastrointestinal inflammation: a short review. **World J Gastroenterol** 2011; 17:4283-8.

Anexo 1 – Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP



Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

São Paulo, 17 de dezembro de 2012.

Ao
Dr. Fábio de Abreu Alves.

Alunos: Roberta Cardim Lessa e Paulo André de Carvalho (Doutorado).

Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 1709/12

“Avaliação da laserterapia preventiva na imunidade de pacientes com mucosite oral relacionada à radioterapia: comparação entre os efeitos de diferentes protocolos de laser de baixa potência”.

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente – Hospital do Câncer - A.C. Camargo/SP, em sua última reunião de 11/12/2012, após analisarem as respostas aos questionamentos realizados em reunião de 23/10/2012, **aprovaram** a realização do projeto do estudo em referência (datado de 2012), o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e tomaram conhecimento dos seguintes documentos:

- Folha de Rosto para Pesquisa Envolvendo Seres Humanos;
- Termo de Compromisso do Pesquisador com as Resoluções do Conselho Nacional de Saúde;
- Declaração Sobre o Plano de Recrutamento dos Sujeitos de Pesquisa, Circunstâncias e Responsáveis pela Obtenção do TCLE;
- Declaração sobre os Dados Coletados, Publicação dos Dados e Propriedade das Informações Geradas;
- Declaração Sobre o Uso e Destino do Material Biológico, Publicação dos Dados e Propriedade das Informações Geradas;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Laboratório de Genômica e Biologia Molecular;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Estomatologia;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Radioterapia;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Oncologia Clínica;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Núcleo de Cabeça e Pescoço;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Biobanco;
- Declaração Sobre a Publicação dos Dados de Pesquisa Utilizando Amostras Fornecidas e Processadas Pelo Biobanco do Hospital AC Camargo;
- Declaração de Infraestrutura e Instalações do Departamento de Estomatologia;
- Orçamento Financeiro Detalhado;
- Cronograma do Estudo.

Para iniciar o projeto, é necessário aguardar a aprovação da CONEP para este centro.

Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas à assistente do CEP dentro de 06 meses.

Atenciosamente,


Dr. Jefferson Luiz Gross

1º Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

1/1

Anexo 2 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



DEPARTAMENTO DE ESTOMATOLOGIA

Convido-o a participar da pesquisa: *Avaliação da Laserterapia Preventiva na Imunidade de Pacientes com Mucosite Oral Relacionada à Radioterapia: Comparação entre os Efeitos de Diferentes Protocolos de Laser de Baixa Potência.*

Justificativa: Já é bem determinado que o uso da laserterapia seja eficaz em reduzir a incidência e a severidade da mucosite oral (aftas na boca) e que este tratamento é bem tolerado pelo paciente. Porém, não há uma padronização quanto ao uso desta terapia e como ela melhora a imunidade do paciente que desenvolve estas lesões. O melhor entendimento dos mecanismos produzidos pelo laser na resposta imune dos pacientes poderá melhorar a qualidade de vida do paciente.

Objetivo: O objetivo deste estudo é observar como três protocolos diferentes de laserterapia poderão influenciar na resposta do sistema imune em pacientes que desenvolveram mucosite oral (aftas na boca) durante o tratamento oncológico, através da dosagem da produção de fatores inflamatórios liberados na saliva.

Procedimento: Após os exames clínicos iniciais realizados no departamento, o Sr(a). passará por um sorteio para definir em qual dos protocolos de tratamento o Sr(a). será submetido para prevenir e/ou diminuir a mucosite oral (aftas na boca) e reduzir a intensidade da dor causada por ela. Este efeito é freqüentemente induzido pela radioterapia em região de cabeça e pescoço. A laserterapia tem o objetivo de fortalecer as células normais em relação à ação da radioterapia e com isso reduzir a intensidade da mucosite (aftas). Na região tumoral não é aplicado o laser e até o momento não foi descrito nenhum efeito colateral desta terapia. A laserterapia será realizada semanalmente, após as sessões de radioterapia. A saliva será coletada após as sessões de laserterapia, uma vez por semana. No momento da coleta da saliva, o Sr(a). estará sentado e a saliva será coletada em um recipiente apropriado, sem nenhum custo ao Sr(a)., a mesma será encaminhada ao banco de macro moléculas desta instituição, para retirada do material genético (DNA e RNA). O objetivo da retirada de material genético é selecionar genes relacionados com a via inflamatória e com a expressão de citocinas relacionadas á mucosite oral e como o efeito do laser de baixa potência pode atuar nessas vias inflamatórias. O Sr.(a) poderá a qualquer momento se retirar do estudo, independente do sorteio para o protocolo de tratamento (protocolo 1, protocolo 2 ou protocolo 3), ou mesmo poderá retirar seu consentimento, e continuará recebendo todos os cuidados já estabelecidos para prevenção, controle e

amenização dos efeitos colaterais da radioterapia (laserterapia curativa, saliva artificial, vitamina E, maalox, água bicarbonatada, glicerina e flúor) como é de rotina no Departamento de Estomatologia do Hospital A.C.Camargo. Serão realizados exames clínicos semanalmente desde o início da radioterapia até um mês após o tratamento com relação aos efeitos colaterais como: mucosite (aftas bucais), xerostomia (boca seca), candidose, hipossalivação (diminuição da saliva), disgeusia (dificuldade de sentir o gosto dos alimentos), cárie provocada pela radiação e osteonecrose (morte das células do osso). Será realizado coletas de salivas semanalmente após a sessão de laserterapia e 30 e 60 dias após a finalização do tratamento radioterápico.

Desconforto ou riscos: Não haverá nenhum risco ou desconforto. O Sr(a). irá realizar o tratamento normalmente conforme o Departamento de Radioterapia.

Método alternativo de tratamento: Não haverá método alternativo de tratamento.

Benefícios: O (a) Sr. (a) não terá nenhum benefício imediato com a participação no estudo. O estudo poderá trazer informações relevantes para o posterior estabelecimento de um protocolo padrão de laserterapia, que consiga reduzir de uma forma mais eficiente, os produtos que são produzidos durante o processo de inflamação.

Acompanhamento: Eu, Paulo André Gonçalves de Carvalho, irei aplicar o questionário, fazer os exames clínicos semanalmente, durante e após o tratamento radioterápico.

Ficha de coleta e privacidade: Os dados referentes à sua identificação, saúde e tratamento serão anotados em uma ficha de coleta que ficará sob responsabilidade do pesquisador responsável, com a garantia de que haverá sigilo quanto a sua identidade. Os resultados obtidos ficarão sob a guarda do Departamento de Estomatologia do Hospital AC Camargo, São Paulo, sob cuidados dos pesquisadores envolvidos no projeto, e serão utilizados como dados de pesquisa científica, podendo vir a serem divulgados em artigos e/ou congressos, resguardando-se sempre o sigilo quanto à sua identificação. No entanto, o Sr(a) poderá ter acesso aos resultados provenientes das análises das suas amostras genéticas, caso seja do seu interesse.

Dúvidas: Qualquer dúvida, não receie em perguntar quantas vezes necessário, e o (a) Sr(a) será esclarecido em qualquer momento da pesquisa.

Abandono: Caso não deseje participar dessa pesquisa ou retirar seu consentimento, em qualquer fase da pesquisa, poderá fazê-lo em qualquer momento sem qualquer prejuízo ou punição.

Despesas: A participação nesta pesquisa não implicará em qualquer despesa ao Sr(a).

Indenização: Embora seja pouco provável que ocorram danos, pois não há nenhum risco potencial decorrente do estudo, é garantido o direito à indenização por eventuais danos que possam vir a ocorrer devido à pesquisa.

Resultado: O pesquisador entrará em contato com o Sr(a). se tiver interesse em saber o resultado. O resultado obtido da pesquisa não alterará em nada o tratamento e/ou seguimento do Sr(a).

Eu, _____ RG número _____,
abaixo assinado, declaro que consinto participar no trabalho intitulado “*Avaliação da Laserterapia Preventiva na Imunidade de Pacientes com Mucosite Oral Relacionada à Radioterapia: Comparação entre os Efeitos de Diferentes Protocolos de Laser de Baixa Potência.*”, declaro que fui

satisfatoriamente esclarecido que estou livre para, a qualquer momento, deixar de participar da pesquisa sem que isso implique em prejuízo ao meu tratamento e que não preciso apresentar justificativas para isso. Sei também de todas as informações por mim fornecidas e os resultados obtidos na pesquisa só serão utilizados para divulgação científica em reuniões e revistas científicas. Serei informado de todos os resultados obtidos, independentemente do fato desses poderem mudar meu consentimento em participar da pesquisa. Concordo também em responder às questões contidas no formulário que me foi apresentado. Qualquer dúvida contatará um dos pesquisadores envolvidos na pesquisa, Fábio de Abreu Alves pelo telefone (11) 2189-5129 ou Paulo André Gonçalves de Carvalho, telefone (011) 98333-7530 e e-mail carvalhopag@uol.com.br ou Roberta Cardim Lessa pelo telefone (11) 954678634 e e-mail rclessa@yahoo.com.br, para questões relacionadas à pesquisa. Se o pesquisador responsável não fornecer as informações/esclarecimentos suficientes, por favor, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antônio Prudente – Hospital do Câncer - A.C. Camargo/SP R. Professor Antônio Prudente, 211 São Paulo - SP - Liberdade - CEP 01509-900 ou pelo telefone (11) 2189-5000, ramais 2069 ou 5020 de segunda-feira à quinta-feira das 7 horas às 18 horas e sexta-feira das 7 horas às 16 horas. Assim, concordo em participar da pesquisa em questão. Declaro ainda que uma via do presente Termo de Consentimento me foi entregue.

Nome Completo do Participante: _____

Endereço: _____

Cidade/Estado: _____

RG: _____ Sexo: F / M Data de Nascimento: ____ / ____ / ____

São Paulo/SP, ____ de _____ de _____

Assinatura do participante: _____

Assinatura do pesquisador responsável: _____

Este formulário foi lido enquanto eu estava presente.

Nome da testemunha _____ Assinatura _____

Anexo 3 - Ficha Clínica

Envelope: A B

1. Identificação.....|_|_|_|_|

2.Registro Hospitalar.....|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|

3. Idade (anos)..... |_|_|_|_|

4. Cor da pele (1) Melanoderma (2) Leucoderma (3) Feoderma..... |_|

5. Sexo (1) masculino 2 (feminino)..... |_|

6. Local do tumor..... |_|

(1) Cavidade oral (2) Orofaringe(3) Nasofaringe

7. TNM

Estádio T (1) T1 (2) T2 (3) T3 (4) T4 (9) TX |_|

Estádio N (1) N1 (2) N2 (3) N3 (4) N4 (9) NX..... |_|

Estádio M (1) M1 (2) M2 (3) M3 (4) M4 (9) MX |_|

8. Estadiamento Clínico..... |_|_|

(1) Estádio II (2) Estádio III (3) Estádio IV

9. Tratamento: |_|

(1) Cirurgia + RT (2) QT + RT (3) Cirurgia + QT + RT (4) RT

10. Tipo de Radioterapia: |_|

1) Convencional (2) Conformacionada-3D (3) IMRT

11. Campo de Radiação:

12. Dose total de radiação:.....

Anexo 4 - Tabela da casuística dos casos. Descrição de idade (media, desvio padrão e mediana), sexo, cor da pele, localização do tumor, tipo de radioterapia (IMRT- radioterapia com intensidade modulada; 3D- radioterapia externa tridimensional), estadiamento da doença, quimioterapia (CIS-cisplatina; ERB/TUX- Cetuximabe; CARBO- Carboplatina; RTX- sem tratamento quimioterápico adjuvante), seleção do tipo de protocolo de laserterapia (Grupo A-laserterapia preventiva, 15mW/ 3,8 J/cm², Grupo B-laserterapia preventiva, 25mW/6,3 J/cm² e Grupo C-laserterapia curativa, 15mW/3,8 J/cm²) e grupo de estudo.

Características		TOTAL				
		n	%	Varição	Média (dp)	Mediana
Idade (anos)		26		29-73	50.8 (10.9)	49
Gênero						
	Masculino	18	69.2			
	Feminino	8	30.8			
Cor da Pele						
	Leucoderma	21	80.8			
	Feloderma	4	15.4			
	Melanoderma	1	3.8			
Local do Tumor						
	Orofaringe	14	53.8			
	Nasofaringe	2	7.7			
	Retromolar	2	7.7			
	Mucosa Jugal	2	7.7			
	Língua	5	19.2			
	Gengiva	1	3.8			
Estadiamento						
	I	1	3.8			
	II	3	11.5			
	III	7	26.9			
	IV	15	57.7			
Grupos						
	A	10	38.5			
	B	9	34.6			
	C	7	26.9			
Radioterapia						
	IMRT	20	76.9			
	3D	6	23.1			
Quimioterapia						
	CIS	12	46.2			
	ERB/TUX	3	11.5			
	CARBO	2	7.7			
	RXT	9	34.6			

Anexo 5- Genes contidos no *RT-qPCR array* da via de resposta imune (*TaqMan® Array 96-well Human Immune Response Plate* – Applied Biosystems).

#	Símbolo	Nome
1	18S	RNA, 18S ribosomal 5
2	ACE	angiotensin I converting enzyme
3	AGTR1	angiotensin II receptor, type 1
4	AGTR2	angiotensin II receptor, type 2
5	BAX	BCL2-associated X protein
6	BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2
7	BCL2L1	BCL2-like 1
8	C3	complement component 3
9	CCL19	chemokine (C-C motif) ligand 19
10	CCL2	chemokine (C-C motif) ligand 2
11	CCL3	chemokine (C-C motif) ligand 3
12	CCL5	chemokine (C-C motif) ligand 5
13	CCR2	chemokine (C-C motif) receptor 2
14	CCR4	chemokine (C-C motif) receptor 4
15	CCR5	chemokine (C-C motif) receptor 5
16	CCR7	chemokine (C-C motif) receptor 7
17	CD19	CD19 molecule
18	CD28	CD28 molecule
19	CD34	CD34 molecule
20	CD38	CD38 molecule
21	CD3E	CD3e molecule, epsilon
22	CD4	CD4 molecule
23	CD40	CD40 molecule, TNF receptor superfamily member 5
24	CD40LG	CD40 ligand
25	CD68	CD68 molecule
26	CD80	CD80 molecule
27	CD86	CD86 molecule
28	CD8A	CD8a molecule
29	CSF1	colony stimulating factor 1 (macrophage)
30	CSF2	colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)
31	CSF3	colony stimulating factor 3 (granulocyte)
32	CTLA4	cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
33	CXCL10	chemokine (C-X-C motif) ligand 10
34	CXCL11	chemokine (C-X-C motif) ligand 11
35	CXCR3	chemokine (C-X-C motif) receptor 3
36	CYP1A2	cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 2
37	CYP7A1	cytochrome P450, family 7, subfamily A, polypeptide 1
38	EDN1	endothelin 1

39	FAS	Fas cell surface death receptor
40	FASLG	Fas ligand (TNF superfamily, member 6)
41	FN1	fibronectin 1
42	GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
43	GNLY	granulysin
44	GUSB	glucuronidase, beta
45	GZMB	granzyme B
46	HLA-DRA	major histocompatibility complex, class II, DR alpha
47	HLA-DRB1	major histocompatibility complex, class II, DR beta 1
48	HMOX1	heme oxygenase 1
49	HPRT1	hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1
50	ICAM1	intercellular adhesion molecule 1
51	ICOS	inducible T-cell co-stimulator
52	IFNG	interferon, gamma
53	IKBKB	inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase beta
54	IL10	interleukin 10
55	IL12A	interleukin 12A
56	IL12B	interleukin 12B
57	IL13	interleukin 13
58	IL15	interleukin 15
59	IL17A	interleukin 17A
60	IL18	interleukin 18
61	IL1A	interleukin 1, alpha
62	IL1B	interleukin 1, beta
63	IL2	interleukin 2
64	IL2RA	interleukin 2 receptor, alpha
65	IL3	interleukin 3
66	IL4	interleukin 4
67	IL5	interleukin 5
68	IL6	interleukin 6
69	IL7	interleukin 7
70	IL8 ou CXCL8	chemokine (C-X-C motif) ligand 8
71	IL9	interleukin 9
72	LIF	leukemia inhibitory factor
73	LRP2	low density lipoprotein receptor-related protein 2
74	LTA	lymphotoxin alpha
75	LY96	lymphocyte antigen 96
76	MIF	macrophage migration inhibitory factor
77	NFATC3	nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 3
78	NFATC4	nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 4
79	NFKB2	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 2

80	NOS2	nitric oxide synthase 2, inducible
81	PF4	platelet factor 4
82	PRF1	perforin 1 (pore forming protein)
83	PTGS2 ou COX2	prostaglandin-endoperoxide synthase 2
84	PTPRC ou CD45	protein tyrosine phosphatase, receptor type, C
85	SELE	selectin E
86	SELP	selectin P
87	SKI	SKI proto-oncogene
88	SMAD3	SMAD family member 3
89	SMAD7	SMAD family member 7
90	STAT3	signal transducer and activator of transcription 3
91	SYK	spleen tyrosine kinase
92	TBX21	T-box 21
93	TGFB1	transforming growth factor, beta 1
94	TNF	tumor necrosis factor
95	TNFRSF18	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 18
96	VEGFA	vascular endothelial growth factor A

Anexo 6: Tabela com a quantificação pelo espectrofotômetro (NANODROP-ND1000) das amostras de RNA extraídas.

Quant	ID (Pac-n. coleta)	R 260/280	R 260/230	Concentração (ug/ul)	Volume (ul)
1	SLV.04.01	2,0	1,9	0,201	14,0
2	SLV.04.01(B)	2,0	1,0	0,062	50,0
3	SLV.04.02	1,5	1,7	1,392	14,0
4	SLV.04.02(B)	1,9	0,9	0,077	50,0
5	SLV.04.03	2,0	1,1	0,111	14,0
6	SLV.04.03 (B)	1,6	1,0	0,218	14,0
7	SLV.04.03 (C)	1,8	0,6	0,030	50,0
8	SLV.04.04	1,9	0,9	0,033	14,0
9	SLV.05.01	1,8	0,6	0,138	14,0
10	SLV.05.01(B)	1,6	0,9	0,069	50,0
11	SLV.05.01(C)	2,0	0,6	0,019	50,0
12	SLV.05.02	1,9	1,2	0,050	14,0
13	SLV.05.02 (B)	2,1	0,1	0,007	14,0
14	SLV.05.03	2,0	1,2	0,152	14,0
15	SLV.05.03 (B)	1,8	0,6	0,036	50,0
16	SLV.05.04	2,0	2,2	0,196	14,0
17	SLV.06.01	2,0	2,2	0,423	14,0
18	SLV.06.02	2,1	1,3	0,242	14,0
19	SLV.06.03	2,1	2,1	0,249	14,0
20	SLV.06.04	1,8	1,1	0,045	14,0
21	SLV.06.04(B)	1,8	0,6	0,035	50,0
22	SLV.06.04(C)	1,8	0,7	0,037	50,0
23	SLV.06.04(D)	1,9	0,7	0,031	50,0
24	SLV.07.01	2,1	1,5	0,178	14,0
25	SLV.07.01(B)	1,7	0,6	0,029	50,0
26	SLV.07.02	2,0	1,9	0,334	14,0
27	SLV.07.03	2,0	2,2	0,244	14,0
28	SLV.07.04	1,9	1,6	0,125	14,0
29	SLV.07.04 (B)	1,8	0,7	0,033	50,0
30	SLV.08.01	2,0	0,4	0,126	14,0
31	SLV.08.02	2,0	0,8	0,078	14,0
32	SLV.08.02(B)	1,8	1,5	0,176	14,0
33	SLV.08.02(C)	1,7	0,6	0,029	50,0
34	SLV.08.03	1,1	0,2	0,015	50,0
35	SLV.08.03(B)	1,2	0,3	0,021	50,0
36	SLV.08.03(C)	1,1	0,2	0,013	50,0
37	SLV.08.03(D)	1,8	0,3	0,020	14,0
38	SLV.08.04	2,0	2,1	0,380	14,0

39	SLV.10.01	2,1	0,8	0,051	14,0
40	SLV.10.01(B)	1,9	0,8	0,059	50,0
41	SLV.10.01(C)	1,9	0,8	0,053	50,0
42	SLV.10.02	2,0	0,6	0,049	14,0
43	SLV.10.02(B)	1,7	0,5	0,037	50,0
44	SLV.10.03	2,1	1,4	0,152	14,0
45	SLV.10.04	2,0	2,0	0,287	14,0
46	SLV.11.01	2,0	1,4	0,287	14,0
47	SLV.11.01(B)	1,8	0,7	0,086	50,0
48	SLV.11.02	2,1	0,9	0,564	14,0
49	SLV.11.03	1,9	1,3	0,133	14,0
50	SLV.11.04	2,1	2,1	0,690	14,0
51	SLV.12.01	2,1	1,6	0,284	14,0
52	SLV.12.01(B)	1,7	0,8	0,055	50,0
53	SLV.12.02	2,0	0,3	0,094	14,0
54	SLV.12.03	2,0	0,9	0,085	14,0
55	SLV.12.03(B)	1,7	0,4	0,025	50,0
56	SLV.12.04	2,0	1,5	0,132	14,0
57	SLV.13.01	2,0	0,2	0,063	14,0
58	SLV.13.01(B)	1,9	0,6	0,027	14,0
59	SLV.13.01(C)	1,5	0,4	0,019	50,0
60	SLV.13.01(D)	1,6	0,3	0,016	50,0
61	SLV.13.01(E)	1,5	0,4	0,020	50,0
62	SLV.13.01(F)	1,6	0,4	0,019	50,0
63	SLV.13.02	2,0	1,8	0,436	14,0
64	SLV.13.03	2,0	0,8	0,045	14,0
65	SLV.13.03(B)	1,6	0,6	0,091	50,0
66	SLV.13.03(C)	1,6	0,5	0,075	50,0
67	SLV.13.03(D)	1,8	0,8	0,129	50,0
68	SLV.13.04	1,3	0,3	0,033	50,0
69	SLV.13.04(B)	2,1	0,9	0,077	14,0
70	SLV.14.01	2,0	1,4	0,239	14,0
71	SLV.14.02	2,1	1,4	0,235	14,0
72	SLV.14.03	2,0	1,0	0,054	14,0
73	SLV.14.03(B)	1,9	0,1	0,052	14,0
74	SLV.14.04	1,9	1,3	0,084	14,0
75	SLV.16.01	1,9	0,5	0,023	14,0
76	SLV.16.01(B)	1,3	0,2	0,014	50,0
77	SLV.16.02	1,8	0,3	0,026	14,0
78	SLV.16.02(B)	1,6	0,4	0,026	50,0
79	SLV.16.02(C)	1,5	0,6	0,036	50,0
80	SLV.16.03	1,9	1,6	0,189	14,0
81	SLV.16.04	1,4	0,4	0,030	50,0

82	SLV.17.01	1,8	0,1	0,012	14,0
83	SLV.17.01(B)	1,5	0,3	0,004	50,0
84	SLV.17.02	1,9	0,3	0,009	50,0
85	SLV.17.02(B)	1,4	0,4	0,008	50,0
86	SLV.17.02(C)	1,8	0,3	0,008	50,0
87	SLV.17.02(D)	2,0	0,3	0,007	50,0
88	SLV.17.03	2,1	0,6	0,032	14,0
89	SLV.17.03(B)	1,5	0,4	0,008	50,0
90	SLV.17.03(C)	1,8	0,8	0,048	50,0
91	SLV.18.01	1,7	0,6	0,141	14,0
92	SLV.18.01(B)	1,8	0,7	0,049	50,0
93	SLV.18.02	1,9	1,1	0,093	50,0
94	SLV.18.02(B)	2,0	1,2	0,083	50,0
95	SLV.18.03	2,0	1,1	0,073	14,0
96	SLV.18.04	1,7	0,6	0,041	50,0
97	SLV.19.01	2,0	1,0	0,093	50,0
98	SLV.19.02	1,9	0,6	0,025	14,0
99	SLV.19.02(B)	1,5	0,8	0,070	50,0
100	SLV.19.03	1,9	0,7	0,023	14,0
101	SLV.19.03(B)	1,6	0,4	0,013	50,0
102	SLV.21.01	1,8	0,4	0,067	14,0
103	SLV.21.02	1,9	0,6	0,141	14,0
104	SLV.21.03	1,3	0,3	0,037	14,0
105	SLV.22.01	2,0	0,6	0,056	14,0
106	SLV.22.01(B)	1,7	0,5	0,039	50,0
107	SLV.22.01(C)	1,7	0,5	0,035	50,0
108	SLV.22.02	1,9	0,6	0,044	14,0
109	SLV.22.02 (C)	1,3	0,3	0,025	50,0
110	SLV.22.02(B)	1,1	0,2	0,025	50,0
111	SLV.22.03(B)	1,3	0,3	0,037	50,0
112	SLV.22.03(C)	1,2	0,2	0,018	50,0
113	SLV.22.03(D)	1,2	0,3	0,020	50,0
114	SLV.22.03(E)	1,1	0,2	0,023	50,0
115	SLV.25.01	1,8	0,7	0,057	50,0
116	SLV.25.01(B)	1,8	0,7	0,063	50,0
117	SLV.25.01(C)	1,6	0,8	0,122	50,0
118	SLV.25.02	1,9	1,0	0,141	50,0
119	SLV.25.03	1,9	0,9	0,107	50,0
120	SLV.25.04	1,7	0,7	0,080	50,0
121	SLV.26.01	1,9	1,0	0,050	50,0
122	SLV.26.01(Q)	2,1	2,1	0,220	14,0
123	SLV.26.02	1,7	0,5	0,032	50,0
124	SLV.26.02(C)	1,6	0,5	0,033	50,0

125	SLV.26.02(Q)	1,7	1,7	0,117	14,0
126	SLV.26.03	1,8	0,7	0,053	50,0
127	SLV.26.03(Q)	2,0	1,6	0,125	14,0
128	SLV.26.04	1,8	0,7	0,053	50,0
129	SLV.26.04(B)	1,4	0,3	0,012	50,0
130	SLV.27.01	2,0	1,1	0,061	50,0
131	SLV.27.01(Q)	2,0	2,1	0,392	14,0
132	SLV.27.02	0,8	1,2	0,062	50,0
133	SLV.27.02(Q)	1,9	2,1	0,355	14,0
134	SLV.27.03	1,8	0,9	0,035	50,0
135	SLV.27.03(Q)	2,0	0,6	0,149	14,0
136	SLV.27.04	1,8	0,9	0,035	50,0
137	SLV.27.04(B)	1,3	0,2	0,015	50,0
138	SLV.28.01	1,9	1,0	0,133	50,0
139	SLV.28.01(B)	1,7	0,6	0,053	50,0
140	SLV.28.02	1,3	0,5	0,082	50,0
141	SLV.28.02(B)	1,4	0,4	0,047	50,0
142	SLV.28.03	1,4	0,5	0,053	50,0
143	SLV.28.03(B)	1,3	0,4	0,058	50,0
144	SLV.28.04	1,6	0,6	0,109	50,0
145	SLV.28.04(B)	1,6	0,7	0,109	50,0
146	SLV.29.01	1,9	0,7	0,031	50,0
147	SLV.29.01(B)	1,8	0,7	0,035	50,0
148	SLV.29.02	2,0	1,3	0,168	50,0
149	SLV.29.02(B)	2,0	1,2	0,182	50,0
150	SLV.29.03	1,9	1,3	0,176	50,0
151	SLV.29.03(B)	1,9	1,0	0,113	50,0
152	SLV.29.04	1,8	0,8	0,114	50,0
153	SLV.29.04(B)	1,9	1,1	0,219	50,0
154	SLV.30.01	1,8	0,5	0,008	50,0
155	SLV.30.01(B)	1,6	0,3	0,011	50,0
156	SLV.30.02	2,0	0,3	0,004	50,0
157	SLV.30.02(B)	2,4	0,3	0,005	50,0
158	SLV.30.02(C)	1,9	0,3	0,006	50,0
159	SLV.30.02(D)	1,9	0,3	0,006	50,0
160	SLV.30.03	1,4	0,4	0,044	50,0
161	SLV.30.03(B)	1,4	0,3	0,033	50,0
162	SLV.30.04	1,6	0,7	0,048	50,0
163	SLV.30.04(B)	1,7	0,6	0,042	50,0
164	SLV.31.01	1,8	0,8	0,077	50,0
165	SLV.31.01(B)	1,7	0,7	0,068	50,0
166	SLV.31.01(C)	1,8	0,7	0,082	50,0
167	SLV.31.02	1,5	0,7	0,116	50,0

168	SLV.31.02(B)	1,5	0,3	0,035	50,0
169	SLV.31.02(C)	1,3	0,3	0,029	50,0
170	SLV.31.02(D)	1,3	0,3	0,026	50,0
171	SLV.31.03	1,6	0,5	0,029	50,0
172	SLV.31.03(B)	1,5	0,5	0,040	50,0
173	SLV.31.03(C)	1,6	0,5	0,041	50,0
174	SLV.31.04	1,5	0,5	0,039	50,0
175	SLV.31.04(B)	1,3	0,3	0,036	50,0
176	SLV.31.04(C)	1,4	0,3	0,035	50,0
177	SLV.32.01	2,0	0,5	0,010	50,0
178	SLV.32.01(B)	1,8	0,4	0,010	50,0
179	SLV.32.02	1,8	0,8	0,017	50,0
180	SLV.32.02(B)	2,4	0,9	0,020	50,0
181	SLV.32.02(C)	2,0	0,7	0,019	50,0
182	SLV.32.03	1,6	1,0	0,042	50,0
183	SLV.32.03(B)	1,9	0,8	0,042	50,0
184	SLV.32.04	1,9	0,9	0,012	50,0
185	SLV.32.04(B)	2,1	0,7	0,018	50,0
186	SLV.33.01	1,8	0,6	0,111	50,0
187	SLV.33.01(B)	3,1	1,1	-0,003	50,0
188	SLV.33.01(C)	1,7	0,2	0,008	50,0
189	SLV.33.02	1,7	0,2	0,004	50,0
190	SLV.33.02(C)	1,4	0,4	0,017	50,0
191	SLV.33.02(D)	1,8	0,4	0,014	50,0
192	SLV.33.02(Q)	2,0	0,5	0,056	14,0
193	SLV.33.03	1,5	0,4	0,022	50,0
194	SLV.33.04	2,0	0,3	0,007	50,0
195	SLV.33.04(B)	1,7	0,4	0,006	50,0
196	SLV.33.04(C)	2,0	0,4	0,006	50,0
197	SLV.33.04(Q)	1,9	0,7	0,053	14,0
198	SLV.34.01	1,6	0,6	0,080	50,0
199	SLV.34.01(B)	1,7	0,6	0,068	50,0
200	SLV.34.02	1,6	0,5	0,070	50,0
201	SLV.34.02(B)	1,6	0,5	0,044	50,0
202	SLV.34.03	1,9	1,0	0,153	50,0
203	SLV.34.04	1,6	0,6	0,143	50,0

Anexo 7 – Tabela de valores de expressão e *p* valor para os genes diferencialmente expressos entre os graus de evolução da mucosite. Os valores com sinal negativo (-) representam genes hipo expressas na primeira comparação em relação ao segundo, os valores positivos representam genes hiper expressos na primeira comparação em relação a segunda. Os valores sublinhados são *p* valor < 0,05.

Genes Alvo	M0/M1		M0/M2e3		M1/M2e3	
	Fold Change	p Valor	Fold Change	p Valor	Fold Change	p Valor
BAX	-1,89	0,2786	-3,04	<u>0,0171</u>	-1,61	0,4602
BCL2L1	-3,12	0,1771	-2,93	0,0552	1,06	0,9414
C3	2,07	0,3761	-2,00	0,2084	-4,14	0,3267
CCL2	-2,14	0,4354	-2,25	0,2837	-1,05	0,9558
CCL3	-4,07	0,0678	-9,98	<u>0,0221</u>	-2,45	0,4472
CCL5	2,05	0,3495	-4,61	0,1377	-9,46	0,4124
CCR4	-5,11	***	1,10	0,9177	5,60	***
CCR5	1,33	0,6803	-1,17	0,7732	-1,55	0,4095
CCR7	-4,28	0,1670	-10,50	0,0635	-2,45	0,4791
CD38	-1,63	***	-2,80	***	-1,72	***
CD40	1,19	***	-2,10	0,1436	-2,49	***
CD4	1,72	0,4594	-1,75	0,2738	-3,00	0,1904
CD68	-2,26	0,2666	-1,80	0,2664	1,25	0,7786
CD80	1,75	0,3255	-1,82	0,0819	-3,18	0,1941
CD86	-1,04	0,9338	1,52	0,3848	1,58	0,3372
CD8A	***	***	-5,21	0,2535	***	***
CSF1	1,24	0,5717	-1,90	<u>0,0330</u>	-2,34	0,0625
CSF3	-1,64	0,4511	-1,56	0,3931	1,05	0,9446
CXCL10	2,22	0,3810	-1,60	0,5293	-3,55	0,3804
EDN1	1,29	0,6050	1,16	0,6905	-1,11	0,8788
FAZ	-3,09	0,3945	-1,68	0,7072	1,84	0,6616
FN1	4,31	0,4998	5,73	0,4691	1,33	0,5759
GNLY	***	***	-1,48	0,1244	***	***
GZMB	2,18	0,2846	-1,04	0,8856	-2,27	0,2408
HLA-DRA	-2,39	0,2686	-1,99	0,2199	1,20	0,8092
HLA-DRB1	-8,20	***	-3,71	0,0950	2,21	***
HMOX1	-2,57	0,2533	-4,24	0,1644	-1,65	0,7448
ICAM1	-2,69	0,3361	-2,47	0,2267	1,09	0,9209
IKBKB	2,46	0,3422	-2,75	0,1664	-6,76	0,3511
IL-10	4,96	0,4770	3,70	0,4510	-1,34	0,4954
IL-18	-1,22	0,6410	-1,29	0,6219	-1,06	0,9536
IL-1A	-1,42	0,4628	-6,04	0,0690	-4,25	0,3867
IL-1B	1,06	0,8609	-1,37	0,2148	-1,46	0,3410
IL-2RA	1,79	0,6785	-4,53	<u>0,0185</u>	-8,09	0,2650
IL-6	2,41	0,6399	-2,38	0,2214	-5,73	0,3124
IL-8	-1,12	0,7539	-1,48	0,1130	-1,33	0,4461

LIF	-7,64	0,1602	-5,56	0,2088	1,37	0,7947
LY96	-1,83	0,5124	1,01	0,9942	1,84	0,5477
MIF	1,19	0,7268	-3,75	0,0880	-4,48	0,3506
NFATC3	-2,47	0,4559	-1,76	0,5567	1,40	0,7461
NFKB2	-1,37	0,4766	-2,06	0,1179	-1,50	0,6163
NOS2	-1,00	***	3,22	0,2931	3,23	***
PTGS2	-1,15	0,7658	-1,53	0,1932	-1,33	0,5852
PTPRC	-1,21	0,6835	-2,52	0,0659	-2,09	0,3995
SKI	-1,45	0,5363	-3,79	0,1511	-2,62	0,5806
SMAD3	***	***	3,98	0,4938	***	***
SMAD7	-1,38	0,5374	-35,51	0,2344	-25,67	0,3912
STAT3	-2,25	0,2950	-1,73	0,3379	1,30	0,7418
SYK	-2,08	0,4739	-10,61	0,2492	-5,11	0,5513
TGFB1	-2,60	0,3341	-1,82	0,4024	1,42	0,6951
TNF	-1,26	0,5338	-2,03	0,1650	-1,61	0,5481
VEGFA	-5,57	0,0714	-6,45	0,0241	-1,16	0,8729

Anexo 8 – Tabela de valores de expressão e *p valor* para os genes diferencialmente expressos entre os grupos de tratamento para Mucosite Oral. Grupo A (Laserterapia Profilótica – Potência de 15mW e Densidade de Energia de 3,8 J/cm²), Grupo B (Laserterapia Profilótica – Potência de 25mW e Densidade de Energia de 6,3 J/cm²) e Grupo C (Laserterapia Curativa – Potência de 15mW e Densidade de Energia de 3,8 J/cm²). Os valores com sinal negativo (-) representam genes hipo expressas na primeira comparação em relação ao segundo, os valores positivos representam genes hiper expressos na primeira comparação em relação a segunda. Os valores sublinhados são *p valor* < 0,05.

Genes Alvos	Grupo A x Grupo C				Grupo B x Grupo C				Grupo A x Grupo B		
	Sem Lesão		Úlcera		Sem Lesão		Úlcera		Sem Lesão		Úlce
	Fold Change	p valor	Fold Change	p valor	Fold Change	p valor	Fold Change	p valor	Fold Change	p valor	Fold Change
BAX	-1,026	0,9664	1,311	0,7890	2,734	0,4057	-1,349	0,7239	-3,217	0,2905	1,673
BCL2L1	-1,996	0,3404	***	***	-1,011	0,9862	10,017	0,2098	-2,348	0,2274	***
CCL2	1,153	0,8131	-3,282	0,4751	5,476	0,4410	-1,249	0,8538	-5,772	0,3356	-2,628
CCL3	1,179	0,8338	2,875	0,4652	3,579	0,2851	-1,535	0,6271	-3,328	0,1984	5,954
CCR7	1,268	0,8025	***	***	***	***	1,765	0,6987	***	***	***
CD4	-2,647	0,2550	***	***	***	***	***	***	***	***	***
CD68	1,469	0,6033	3,193	0,4801	3,110	0,4353	2,998	0,3864	-2,437	0,4001	1,039
CD80	-1,577	0,3502	***	***	-2,036	0,2318	***	***	***	***	***
CD86	-2,127	0,3945	***	***	***	***	***	***	***	***	***
FAZ	-1,996	<u>0,0217</u>	***	***	99,116	0,4812	213,048	0,4460	-230,754	0,3891	***
HLA-DRA	-1,131	0,7677	-1,275	0,6922	2,503	0,5344	2,044	0,5659	-3,178	0,4194	-3,697
HMOX1	1,713	0,4789	29,584	0,4202	4,051	0,4233	2,583	0,4899	-2,723	0,3984	4,420
ICAM1	1,210	0,8154	4,265	0,2641	8,945	0,4339	3,172	0,4476	-8,364	0,3660	-1,099
IKKB	-1,876	0,5168	***	***	-2,716	0,3711	-11,370	0,1555	1,430	0,5733	***
IL-10	4,958	0,4889	***	***	***	***	***	***	-1,225	***	***
IL-18	1,581	0,3211	***	***	1,936	0,3745	-1,164	0,8010	-1,132	0,7438	***
IL-1A	2,144	0,2817	3,157	0,5081	2,236	0,3023	-2,500	0,3069	1,131	0,8259	8,842

IL-1B	1,038	0,9489	1,701	0,5106	-1,127	0,7791	1,621	0,4137	-2,250	0,8240	-1,292
IL-2RA	***	***	***	***	***	***	***	***	-4,105	0,1268	***
IL-6	-16,229	0,3390	***	***	-3,953	0,4381	***	***	-1,075	0,1024	***
IL-8	-1,318	0,5872	1,216	0,7183	-1,238	0,6656	1,880	0,3135	-1,075	0,8707	-1,478
LY96	4,631	0,4604	2,202	0,2420	5,498	0,4778	5,605	0,3377	-1,388	0,8062	-7,118
MIF	-3,165	0,2827	3,919	0,4045	-1,361	0,6444	-2,401	0,2334	-2,372	0,2023	9,410
NFATC3	-3,854	0,1104		0,7220	13,059	0,3112	2,994	0,4808	-50,325	0,2852	-4,634
NFKB2	-1,627	0,4301	2,514	0,5243	-1,273	0,7034	-1,233	0,7283	-1,325	0,6907	2,619
PTGS2	-2,107	0,2625	-1,070	0,9112	-1,442	0,5205	1,092	0,9028	-1,474	0,6028	-1,552
PTPRC	-2,783	0,2182	1,547	0,7047	-1,240	0,7274	-1,865	0,3361	-2,414	0,1538	3,354
SKI	-1,665	0,4898	***	***	-4,795	<u>0,0212</u>	-3,437	0,3363	2,613	0,4202	***
SMAD3	-15,005	0,3791	***	***	***	***	***	***	***	***	***
STAT3	-1,203	0,6442	2,217	0,5045	2,332	0,5924	2,469	0,5282	-3,125	0,4236	-1,255
SYK	***	***	***	***	3,861	0,5003	8,446	0,4791	***	***	***
TGFB1	-1,020	0,9675	2,069	0,3952	5,225	0,4479	2,679	0,5017	-6,046	0,3673	-1,910
TNF	1,219	0,7344	3,805	0,3130	1,074	0,8755	1,150	0,7955	1,008	0,9892	3,310
VEGFA	-1,181	0,5929	2,304	0,6149	-1,188	0,7710	1,912	0,5788	-1,118	0,8344	1,331