A UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

CAROLINA LOUZADA MENNA BARRETO

ANÁLISE HISTOMORFOLÓGICA E IMUNOHISTOQUÍMICA DE MUCOSA PALATINA DE RATOS COM CARCINOGÊNESE INDUZIDA POR 4NQO E SUBMETIDOS À APLICAÇÃO INDIRETA DE FOTOBIOMODULAÇÃO

Porto Alegre
2026

CAROLINA LOUZADA MENNA BARRETO

ANÁLISE HISTOMORFOLÓGICA E IMUNOHISTOQUÍMICA DE MUCOSA PALATINA DE RATOS COM CARCINOGÊNESE INDUZIDA POR 4NQO E SUBMETIDOS À APLICAÇÃO INDIRETA DE FOTOBIOMODULAÇÃO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientadora: Prof. Dra. Manoela Domingues Martins

Porto Alegre

2026

CIP - Catalogação na Publicação

Louzada Menna Barreto, Carolina
ANÁLISE HISTOMORFOLÓGICA E IMUNOHISTOQUÍMICA DE MUCOSA PALATINA DE RATOS COM CARCINOGÊNESE INDUZIDA POR 4NQO E SUBMETIDOS À APLICAÇÃO INDIRETA DE FOTOBIOMODULAÇÃO / Carolina Louzada Menna Barreto. -- 2026.
45 f.
Orientadora: Manoela Domingues Martins.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Odontologia, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Porto Alegre, BR-RS, 2026.

1. Carcinogênese. 2. Fotobiomodulação. 3. Imunohistoquímica. 4. Histopatologia. 5. Carcinoma espinocelular. I. Domingues Martins, Manoela, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

CAROLINA LOUZADA MENNA BARRETO

ANÁLISE HISTOMORFOLÓGICA E IMUNOHISTOQUÍMICA DE MUCOSA PALATINA DE RATOS COM CARCINOGÊNESE INDUZIDA POR 4NQO E SUBMETIDOS À APLICAÇÃO INDIRETA DE FOTOBIOMODULAÇÃO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientadora: Prof. Dra. Manoela Domingues Martins

Porto Alegre, 01 de junho de 2026.

Marcelo Lazzaron Lamers, PhD, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Brasil

Luiza Meurer Brand, PhD, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Brasil

Felipe Martins Silveira, PhD, La Universidad de la República (UDELAR), Uruguai

Aos meus pais e minha irmã, Carla, Ricardo e Cristina, que sempre caminharam comigo para eu chegar aonde cheguei.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora prof Manô, que foi minha inspiração na patologia e estomatologia desde quando eu era IC, me introduzindo a esse mundo da pesquisa e mostrando o quanto a dedicação ao trabalho, o amor à profissão, os colegas que encontramos no caminho e o sorriso do paciente agradecendo nosso cuidado, são o verdadeiro sucesso. Prof, tu é uma inspiração de profissional, pessoa e amiga. Tenho muito orgulho de trabalhar contigo.

À Lauren, que desde meu primeiro dia de IC no grupo das Manoeletes me recebeu com um sorriso imenso e um carinho que ela tem com todo mundo que passa por ela. Lauren, tu é um exemplo de pessoa e eu tenho muita sorte em trabalhar contigo.

À Emily, outro exemplo de profissional e pessoa, que tem um carinho excepcional pelo que ela faz e com as pessoas que ela se relacionada. É uma pessoa muito querida e que eu admiro demais.

À banca examinadora, Marcelo, Luíza e Felipe, pessoas que eu sempre admirei e continuo admirando muito como pesquisadores e como pessoas, e me sinto honrada em ter as contribuições de vocês para o meu trabalho.

À minha mãe, que sempre lutou e comemorou comigo cada momento, desde os desafios com tabuadas no início do colégio, as dificuldades durante os estágios do final da faculdade, até as comemorações das grandes conquistas como formatura, início do mestrado e agora esse momento especial de receber o título de mestre. Te amo muito!

Ao meu pai, que sempre me deu muito incentivo, carinho e caronas todas as vezes que precisei, durante toda a minha trajetória. Esteve comigo em momentos bons e desafiadores, me ajudando e me dando força desde as primeiras provas de matemática do colégio. Te amo muito!

À minha irmã, que é também minha melhor amiga e minha companheira de vida, uma das melhores pessoas que qualquer um pode conhecer. Simplesmente te agradeço por tu ser tu

mesma, por estar sempre aqui comigo, nas risadas, nas viagens, ouvindo nossas músicas e compartilhando esse amor pelo trabalho. Te amo muito!

À minha vó Carla, que nos recebe sempre feliz com um sorriso gigante e me acompanhou em todas as minhas fases, desde os almoços de domingo com suflê de chuchu, até as férias na casa de Tramandaí e as tardes de inverno fazendo canjica. Sempre comemorou junto comigo as coisas que alcancei e sempre mostrou muito orgulho de tudo.

À minha vó Nilda, sempre animada me perguntando como está a patologia, e vibrando por cada pequena conquista. E isso não é de agora, mas sim desde quando saímos do colégio e íamos passear nas quartas de tarde na pracinha Maurício Cardoso e tomar sopa em casa, sempre com um carinho imenso por nós.

Ao meu vô José Luís que me deu meu primeiro livro de patologia de aniversário e vibrava com orgulho a cada prova e a cada pequena conquista minha. Sinto muita falta dos teus bons dias e boas provas, mas mesmo que não esteja aqui nessas cadeiras do auditório, eu sei que de algum lugar está me assistindo e torcendo por mim como sempre esteve.

Ao meu vô João Carlos que mostrou todos os dias o carinho e dedicação por nós, sempre fazendo de tudo para nos agradar e tornar o dia divertido, e sempre conseguiu! Também gostaria de te ver aqui nas cadeiras desse auditório, mas eu também sinto que de algum lugar está comemorando junto comigo.

Aos meus tios e demais familiares, por serem pessoas motivadoras e sempre comemorarem minhas conquistas ao meu lado.

Às minha amigas do colégio, Gabi, Laura, Bela, Le. Obrigada por tudo, vocês são incríveis. Gabi e Laura, vocês são minhas melhores amigas e eu vou levar vocês para toda a vida.

À minha amiga mais próxima da faculdade, Manu, obrigada por tudo, te adoro e quero sempre te ter na minha vida.

Aos meus amigos do mestrado, Mariana, Juliana, Ana Toebe, Ana Figueiredo, Luiza, Rita, Daiana, Laysla, Bruna, Sabrina, Nathi e Erick. Vocês são incríveis e toram cada dia melhor e mais divertido.

Aos meus peixinhos, me fazendo companhia de dentro do aquário enquanto eu escrevo.

E, por fim, agradeço a mim, por simplesmente ter acreditado no meu potencial durante esse tempo todo, ter superado os desafios, aprendido tanta coisa, e hoje estar aqui não só recebendo o título de mestre, mas recebendo título de mestre em uma área de saúde que me encantou desde o primeiro segundo.

Success is a journey, not a destination

- Ben Sweetland

RESUMO

Objetivos: Avaliar os possíveis efeitos indiretos da fotobiomodulação (FBM) no padrão histológico e no perfil de imunomarcação da mucosa palatina de ratos submetidos à carcinogênese induzida por 4-nitroquinolina-1-óxido (4NQO).

Materiais e métodos: Foram analisadas 33 amostras de mucosa palatina provenientes de animais expostos ao 4NQO por 20 semanas e submetidos à aplicação de fotobiomodulação em língua, distribuídos em três grupos: controle (n=11), FBM 0,3 J (n=11) e FBM 1 J (n=11). As amostras foram processadas para análise histológica em hematoxilina e eosina e categorizadas de acordo com diagnóstico histológico. Após, foi realizada análise imuno-histoquímica e quantificação das amostras pela porcentagem de células positivas em áreas de mucosa normal, displásica e carcinoma dentro de cada espécime.

Resultados: Todas as amostras apresentaram carcinoma espinocelular (CEC). Observou-se redução progressiva da expressão de RPS6 da mucosa normal para displasia e carcinoma ($p<0,001$), sem influência dos grupos. A expressão de p-Akt (Ser473) não diferiu entre áreas ou grupos. TGF-β1 apresentou diminuição significativa em áreas de carcinoma em comparação à mucosa normal e displásica ($p<0,0001$), com diferença entre grupos controle e FBM 1J em mucosa normal. A nitrotirosina mostrou diferenças entre mucosa normal, displásica e carcinoma ($p<0,0001$), sem influência dos grupos.

Conclusão: A FBM indireta não alterou significativamente a carcinogênese oral induzida por 4NQO, apresentando diferenças apenas em mucosa normal entre grupos controle e FBM 1J do anticorpo TGF-B1. Os marcadores p-RPS6, TGF-β1 e nitrotirosina apresentaram diferenças significativas de imunomarcação entre mucosa normal, mucosa displásica e carcinoma, independentemente da terapia.

ABSTRACT

Aims: To evaluate the indirect effects of photobiomodulationm (PBM) on the histological pattern and immunoexpression profile of the palatal mucosa of rats subjected to 4-nitroquinoline-1-oxide (4NQO)-induced carcinogenesis.

Materials and Methods: Thirty-three palatal mucosa samples from animals exposed to 4NQO for 20 weeks and subjected to photobiomodulation applied to the tongue were analyzed. The samples were distributed into three groups: control (n=11), PBM 0.3J (n=11), and PBM 1J (n=11). The samples were processed for histological analysis using hematoxylin and eosin staining and categorized according to their histological diagnosis. Subsequently, immunohistochemical analysis was performed, and the samples were quantified based on the percentage of positive cells in areas of normal mucosa, dysplastic mucosa, and carcinoma inside each specimen.

Results: All samples presented squamous cell carcinoma (SCC). A progressive reduction in RPS6 expression was observed from normal mucosa to dysplasia and carcinoma ($p<0.001$), with no influence of the experimental groups. p-Akt (Ser473) expression did not differ between tissue areas or groups. TGF-β showed a significant decreased in carcinoma areas compared to normal and dysplastic mucosa ($p<0.0001$), with a difference between the control and PBM 1J groups in normal mucosa. Nitrotyrosine presented differences among normal mucosa, dysplasia, and carcinoma ($p<0.0001$), without influence of groups.

Conclusion: Indirect PBM did not significantly alter 4NQO-induced oral carcinogenesis, showing differences only in normal mucosa between the control and PBM 1J groups for the TGF-β1 antibody. The markers p-RPS6, TGF-β1, and nitrotyrosine showed significant differences in immunostaining among normal mucosa, dysplastic mucosa, and carcinoma, regardless of therapy.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Célula epitelial normal e célula epitelial maligna **17**
Figura 2: Desenvolvimento da carcinogênese..... **17**
Figura 3: Fases da carcinogênese..... **18**
Figura 4: Área de mucosa normal, mucosa displásica e de carcinoma **29**
Figura 5: Imunomarcação do anticorpo p-RPS6..... **31**
Figura 6: Imunomarcação do anticorpo TGF-B1..... **32**
Figura 7: Imunomarcação do anticorpo Nitrotirosina..... **33**
Figura 8: Gráficos da análise estatística..... **33**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Marcadores imuno-histoquímicos **28**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CEC	Carcinoma Espinocelular
DPMO	Desordem Potencialmente Maligna Oral
EMT	Epithelial-Mesenchymal Transition
FBM	Fotobiomodulação
IHQ	Imuno-histoquímica
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin Pathway
NO	Óxido nítrico
4NQO	4-nitroquinoline-1-oxide
OMS	Organização Mundial da Saúde
ROS	Reactive Oxygen Species
ROS	Reactive Oxygen Species
RNS	Reactive Nitrogen Species
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 14
1.1 Câncer de cabeça e pescoço e carcinoma espinocelular 14
1.2 Carcinogênese 16
1.3 Estudo da carcinogênese em animais 19
1.4 Fotobiomodulação 19
1.5 Carcinogênese e imunohistoquímica 21
1.5.1 RPS6 21
1.5.2 p-Akt em Ser 473 22
1.5.3 TGF-B1 23
1.5.4 Nitrotirosina 24
2 HIPÓTESE 25
3 OBJETIVOS 25
3.1 Objetivos gerais 25
3.2 Objetivos específicos 25
4 MATERIAIS E MÉTODOS 26
4.1 Delineamento do estudo 26
4.2 Obtenção das amostras 26
4.3 Considerações éticas 26
4.4 Análise histopatológica 27
4.5 Análise imunohistoquímica 27
4.5.1 Protocolos de imunohistoquimica 27
4.6 Análise das amostras 28
4.6.1 Análise histopatológica 28
4.6.2 Análise imunohistoquímica de p-RPS6, p-Akt (Ser 473) e TGF-B1 29
4.6.3 Análise imunohistoquímica de Nitrotirosina 29
4.7 Análise estatística 29
5 RESULTADOS 30
5.1 Análise microscópica 30
5.2 Coloração imunohistoquímica 30
5.2.1 Imunomarcação do p-RPS6 nas amostras 30
5.2.2 Imunomarcação do p-Akt em Ser 473 nas amostras 31
5.2.3 Imunomarcação do TGF-B1 nas amostras 31
5.2.4 Imunomarcação da Nitrotirosina nas amostras 32
6 DISCUSSÃO 34
7 CONCLUSÃO 39
8 REFERÊNCIAS 40

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer de cabeça e pescoço e carcinoma espinocelular

Câncer de cabeça e pescoço refere-se ao conjunto de neoplasias malignas que afeta diversas regiões da cabeça e do pescoço e é considerado o sétimo tipo de câncer mais comum no mundo. Segundo dados do GLOBOCAN (2022), apresentou uma média de 947,211 novos casos e 482,428 mortes durante o ano. Aproximadamente 90% dos casos de câncer de cabeça e pescoço são de carcinoma espinocelular (CEC), neoplasia maligna de origem epitelial cuja taxa média de sobrevida em cinco anos gira em torno de 50%. O CEC oral é considerado atualmente um problema de saúde pública global, apresentando prognóstico desfavorável principalmente em razão do frequente diagnóstico tardio (SUNG et al, 2020; JAGADEESAN et al, 2024; GORMLEY et al, 2022; INCA, 2022; GLOBOCAN, 2022).

O CEC afeta mais comumente homens acima de 50 anos e está fortemente associado ao uso de tabaco, consumo de bebidas alcoólicas e exposição crônica à radiação solar. Embora possa surgir em qualquer região da mucosa oral, o CEC é bastante encontrado em borda lateral de língua, apresentando forma clínica frequente de úlcera com bordos elevados e endurecidos. Assoalho de boca e lábio inferior também são regiões bastante afetadas. (TARLE et al, 2024; BARSPUK et al, 2023; JAGADEESAN et al, 2024; JACOB et al, 2025; LI et al, 2024).

Segundo a literatura, o tabaco apresenta mais de 5.000 substâncias químicas diferentes, das quais mais de 60 são consideradas carcinogênicas e, por tanto, tem potencial de danificar o DNA das células e aumentar o risco de desenvolvimento de neoplasias malignas. Além disso, o uso concomitante de álcool e tabaco tem um efeito multiplicativo e aumenta fortemente a chance de surgimento de CEC oral. Em relação ao CEC de lábio, a exposição frequente a luz solar tem sido um fator importante no seu surgimento, uma vez que a radiação ultravioleta (UV) provoca danos celulares através de diversos mecanismos como a indução de estresse oxidativo e mutações genéticas (BARSPUK et al, 2023; YU et al, 2024).

Frente a uma suspeita clínica de CEC, a conduta padrão-ouro do cirurgião-dentista é a realização de biópsia incisional o mais rápido possível, englobando a parte mais sugestiva de malignidade da lesão. Além disso, é importante que a técnica de biópsia seja feita na profundidade adequada, para que a peça contenha material suficiente e seja possível detectar a presença ou a ausência de invasão tecidual. Após o envio da peça para análise histopatológica,

será emitido o laudo para confirmação do diagnóstico (RAO et al, 2020; SHANTI et al, 2020).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), os critérios histológicos para um diagnóstico de CEC baseiam-se na proliferação de células epiteliais tumorais organizadas em ninhos irregulares invadindo estroma subjacente. Esse crescimento pode apresentar comportamento expansivo ou infiltrativo. A ceratinização é observada na presença de pérolas de ceratina e/ou pontes intercelulares e o pleomorfismo celular é considerado variável. O estroma tumoral pode apresentar reação desmoplásica e resposta inflamatória linfoplasmocitária. A graduação do tumor quanto ao grau de diferenciação baseia-se em critérios como: relação núcleo/citoplasma, morfologia nuclear, atividade mitótica e o grau de atipia celular, além da reação estromal e do grau de ceratinização. Tumores bem diferenciados apresentam maior semelhança com o epitélio escamoso normal, enquanto que tumores pouco diferenciados ou indiferenciados podem ser de difícil identificação quanto à sua origem escamosa. A presença de invasão perineural e/ou linfovascular pode ser observada e está associada a um prognóstico desfavorável (OMS, 2022).

O estadiamento do CEC de cabeça e pescoço segue atualmente o sistema TNM do American Joint Committee on Cancer (AJCC). Essa classificação se estabelece por meio do tamanho, extensão e profundidade de infiltração do tumor (depth of invasion ou DOI); envolvimento linfonodal e extranodal (ENE); e presença de metástases à distância. Tumores de maior tamanho, extensão e infiltração no tecido subjacente, tendem a requerer abordagens mais invasivas e apresentar prognósticos piores; assim como casos onde há envolvimento nodal, extranodal e metástases à distância. Esses critérios são cruciais tanto para estadiar e descrever os tumores, bem como para visualizar prognósticos e orientar estratégias terapêuticas. O tratamento primordial comumente utilizado para o CEC é a remoção cirúrgica, associado ou não a terapias adjuvantes como radioterapia e/ou quimioterapia. A escolha da conduta deve ser individualizada para cada caso e deve levar em consideração fatores como estadiamento tumoral e estado de saúde geral do paciente (DENARO et al, 2018; SILVEIRA et al, 2019; HOWARD et al, 2021; ANSARY et al, 2022).

O desenvolvimento do CEC oral pode ser precedido por desordens potencialmente malignas (DPMO), as quais compõem um grupo de alterações da mucosa bucal definidas clinicamente que tem potencial de transformação em CEC. Comumente, essas lesões apresentam coloração branca, vermelha ou mista e, as mais encontradas na rotina clínica são leucoplasia, eritroplasia e queilite actínica. Embora a leucoplasia seja a DPMO mais frequentemente observada na mucosa oral, a eritroplasia é descrita na literatura como a lesão

associada ao maior risco de transformação maligna. Assim como o CEC, as DPMO apresentam forte associação com fatores como tabagismo, consumo de álcool e exposição crônica à radiação ultravioleta (OMS, 2022; ODELL et al, 2021; PRITZKER et al, 2021).

Microscopicamente, as DPMO podem apresentar ou não displasia epitelial, sendo aquelas associadas à displasia as que exibem maior potencial de malignização. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o termo displasia epitelial é conceituado como "um espectro de alterações arquiteturais e citológicas do epitélio resultantes do acúmulo de alterações genéticas" (OMS, 2022; ODELL et al, 2021; MULLER et al, 2022).

Entre as alterações arquiteturais, a OMS descreve como critérios: estratificação epitelial irregular, perda de polaridade das células basais, projeções epiteliais em formato de gota, mitoses localizadas superficialmente no epitélio, ceratinização prematura generalizada, pérolas de queratina dentro das cristas epiteliais, perda de adesão celular das células epiteliais, alteração do padrão de ceratinização de acordo com o sítio, arquitetura papilífera ou verrucosa, extensão das alterações em ductos de glândulas salivares menores, margem de alterações nitidamente definidas, presença de múltiplos padrões distintos de displasia, lesões multifocais ou com áreas de "salto" (skip lesions), compartimento proliferativo expandido e agrupamento ou formação de ninhos de células basais (OMS, 2022; MULLER et al, 2022).

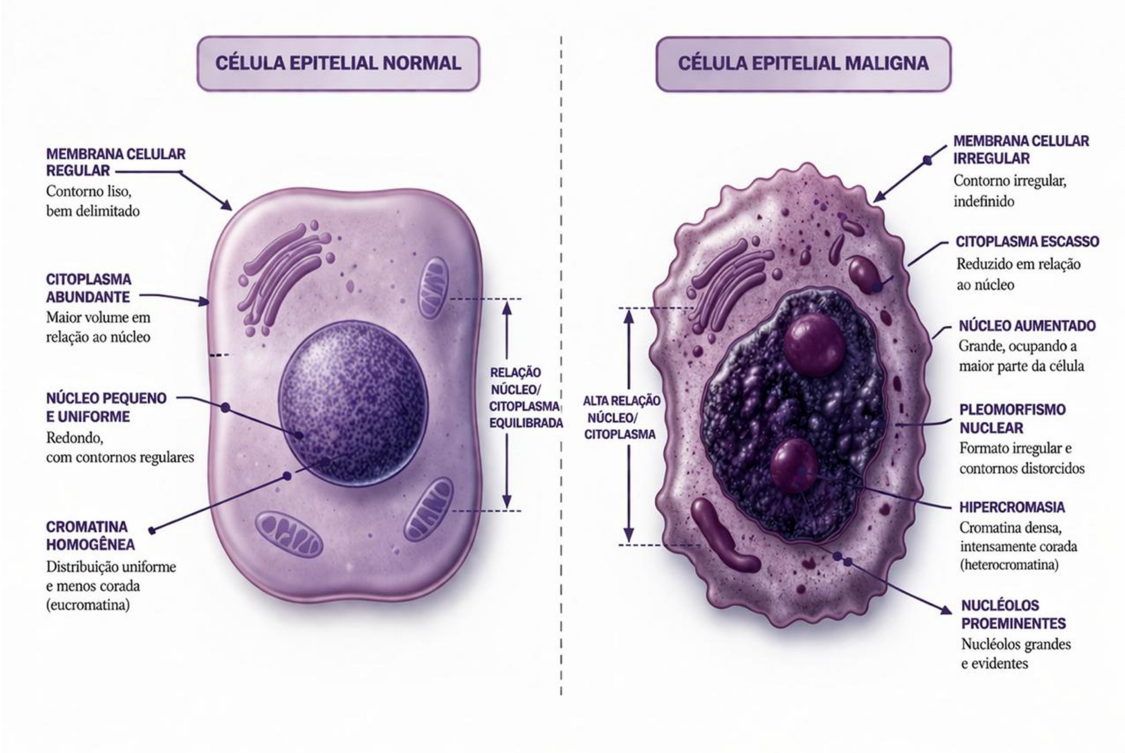
Já as alterações citológicas descritas pela OMS, são: variação anormal do tamanho nuclear, variação anormal do formato nuclear, variação anormal do tamanho celular, variação anormal do formato celular, aumento da relação núcleo-citoplasma, figuras de mitose atípicas, aumento do número e tamanho de nucléolos, hipercromatismo, ceratinização celular individual (disceratose), mitoses apoptóticas e tamanho aumentado do núcleo (OMS, 2022; MULLER et al, 2022)

1.2 Carcinogênese

As células constituintes do CEC, assim como das demais neoplasias malignas, passam por um processo biológico conhecido como carcinogênese, onde ocorre a transformação de células normais em células tumorais malignas **(Figura 1)**. Segundo a literatura, essa transformação envolve um conjunto de eventos celulares e moleculares desencadeados por agentes químicos, físicos ou biológicos. Em casos em que o surgimento do CEC está associado ao tabagismo, tem-se investigado o potencial dos carcinógenos presentes no tabaco em induzir o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS) e o consequente estresse oxidativo e nitrosativo, levando à disfunção mitocondrial e a danos

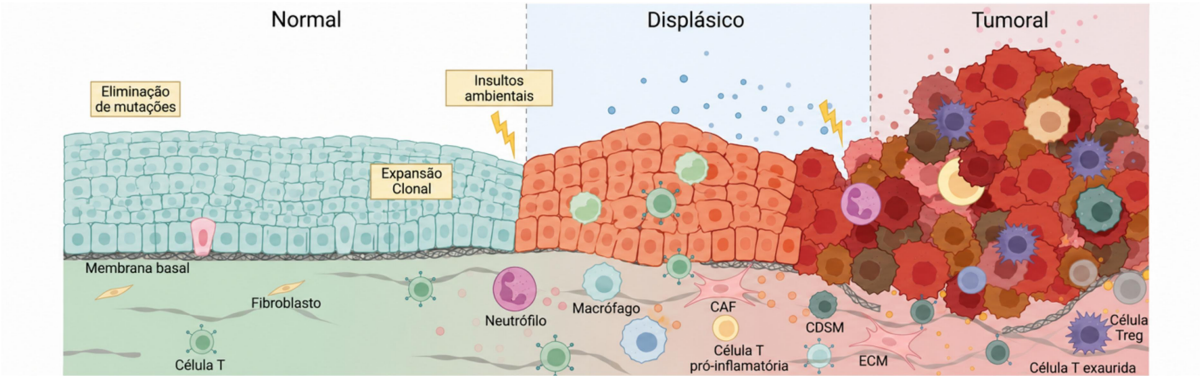
ao DNA. Esse dano genético ocasionado não será corrigido pelos mecanismos de reparo do DNA, levando à transformação maligna dessa célula **(Figura 2)** (FROHWITTER et al., 2020; ZHOU et al., 2025; CABRAL et al., 2025; LI et al., 2024; BOGLIOLO, 2021).

Figura 1: Célula epitelial normal e célula epitelial maligna



Fonte: Imagem gerada por inteligência artificial (ChatGPT, OpenAI, 2025).

Figura 2: Desenvolvimento da carcinogênese



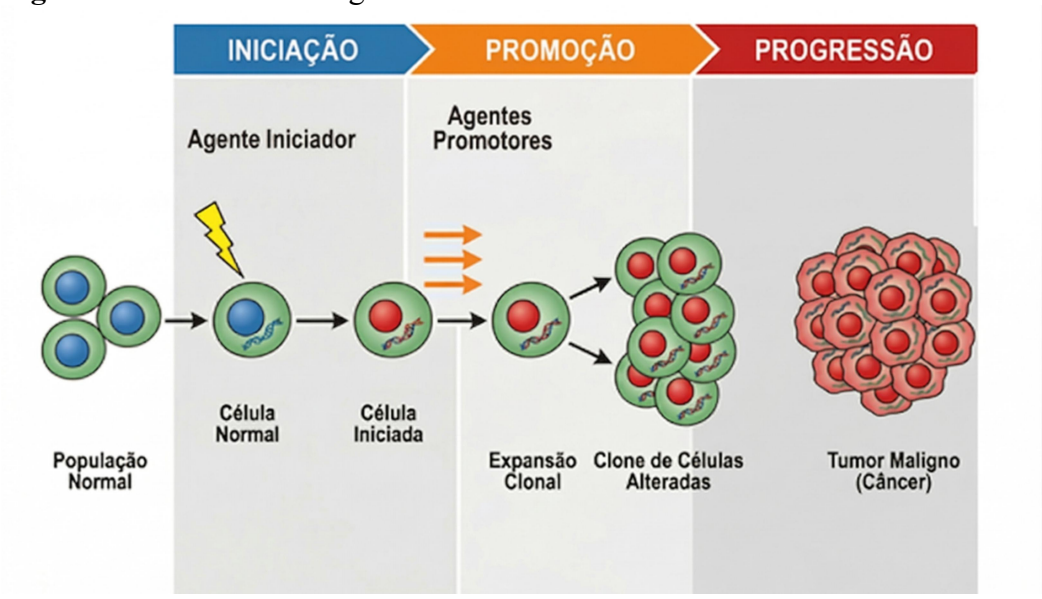
Fonte: Imagem proveniente de livro de Patologia e editada pela autora por inteligência artificial (ChatGPT, OpenAI, 2025).

Outro fenômeno intimamente relacionado ao processo de carcinogênese é a ativação de vias de sinalização, as quais são cruciais para o desenvolvimento do CEC, e irão

desencadear uma cascata de acontecimentos que permitirão o crescimento e a progressão tumoral. Algumas vias mais estudadas são as vias mTOR e MAPK. Além disso, o surgimento de oncogenes, a inativação de genes supressores de tumor e o estímulo e à transição epitélio-mesenquimal (EMT) também são pontos chaves para a transformação maligna (CABRAL et al, 2025 ZHAO et al, 2019).

Em relação às etapas da carcinogênese, podemos dividi-la em três partes: iniciação tumoral, promoção e progressão tumoral. A iniciação acontece quando uma célula sofre danos em seu DNA, podendo esses ser espontâneos ou induzidos por agentes carcinogênicos. Na fase de promoção, a exposição contínua a agentes cancerígenos leva ao acúmulo de mutações nas células, as quais serão lentamente transformadas em células malignas. Observa-se expansão clonal. Por fim, na progressão, observa-se a proliferação de células malignas e expansão da neoplasia propriamente dita. **(Figura 3).** Portanto, durante o processo de carcinogênese, as células neoplásicas irão se diferenciar das células normais de diversas maneiras, como através da resistência a sinais anti-crescimento, potencial ilimitado de replicação, estímulo à angiogênese, capacidade de invasão tecidual e vias metabólicas alteradas (LOPEZ et a, 2021; SCHUCH et al, 2024).

Figura 3: Fases da carcinogênese



Fonte: Imagem gerada por inteligência artificial (ChatGPT, OpenAI, 2025)

1.3 Estudo da carcinogênese em animais

Ao longo do tempo, diversas técnicas experimentais foram desenvolvidas para o estudo da biologia tumoral, destacando-se os modelos *in vitro* e *in vivo*. Os estudos *in vitro*

baseiam-se na cultura celular, na qual células vivas são cultivadas em condições controladas com o objetivo de investigar o comportamento celular de diferentes organismos. Apesar de sua ampla utilização e relevância experimental, esse tipo de modelo apresenta certas limitações, uma vez que não é capaz de reproduzir adequadamente o microambiente tumoral, o compartimento estromal e as complexas interações interteciduais que são observadas em modelos *in vivo* (ZIPS et al, 2005; SAGHEER et al; SAJJAD et al, 2021).

Uma das estratégias para o estudo da carcinogênese em modelos *in vivo* consiste na utilização de modelos de carcinogênese em experimentos com animais. O 4-nitroquinoline-1-oxide (4NQO), por exemplo, é um agente químico capaz de induzir a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS) por meio do estresse oxidativo e nitrosativo intracelular, desencadeando uma sequência de eventos que favorecem a carcinogênese de maneira semelhante àquela observada na exposição às substâncias carcinogênicas presentes no tabaco. Evidências recentes demonstram que o 4NQO é capaz de promover alterações no DNA celular de ratos comparáveis às observadas no desenvolvimento do CEC em humanos. Dessa forma, esse modelo experimental possibilita uma investigação detalhada dos aspectos clínicos e histopatológicos do tumor, além de contribuir para a compreensão dos mecanismos envolvidos em sua progressão e agressividade (SAGHEER et al, 2021; ZIGMUNDO et al, 2022; SCHUCH et al, 2024; VAN DEN BOSCH et al, 2025).

A eficácia e reprodutibilidade do 4NQO já foram demonstradas em revisões sistemáticas, como a realizada por Zigmundo et al. (2022), bem como em diversos estudos experimentais conduzidos em modelos animais, incluindo os de Van Den Bosch et al. (2025), Masuda et al. (2022), Nazário et al. (2025) e Schuch et al. (2024). Van Den Bosch realizou em seu estudo a indução tópica e sistêmica de carcinogênese por 4NQO em ratos, onde foi observado desenvolvimento de CEC de língua em 6 meses no grupo que recebeu o método sistêmico, comprovando eficácia do carcinógeno diluído em água. Masuda induziu carcinogênese sistemicamente em ratos via 4NQO (50ppm) e observou desenvolvimento de CEC em 5 meses, igualmente sugerindo efeito do 4NQO. Nazário induziu carcinogênese por 4NQO de forma sistêmica em camundongos e também observou desenvolvimento tumoral. Por fim, em seu estudo, Schuch induziu carcinogênese sistemicamente por 4NQO (25 ppm) em ratos e também foi observado desenvolvimento de carcinoma. Portanto, vários estudos comprovam o efeito do 4NQO na indução de CEC oral em modelo animal (ZIGMUNDO et al, 2022; SCHUCH et al, 2024; VAN DEN BOSCH et al, 2025; MASUDA et al, 2022).

1.4 Fotobiomodulação

A fotobiomodulação (FBM) é uma terapia a base de luz que tem sido amplamente investigada e aplicada na prática clínica odontológica, principalmente relacionada a efeitos biológicos como analgesia, reparo tecidual e modulação dos processos inflamatórios. A FBM é uma técnica não invasiva baseada no uso da luz de baixa potência capaz de interagir com os tecidos e provocar efeitos fotofísicos e fotoquímicos. Segundo a literatura, a FBM irá transferir energia fotônica para a célula, principalmente para a mitocôndria, aonde irá interferir no metabolismo celular por meio de vários mecanismos. Observa-se aumento da atividade respiratória, proliferação celular, prevenção de morte celular, diminuição de mediadores inflamatórios, melhora do reparo tecidual, estímulo à angiogênese, síntese de colágeno, analgesia e possível fortalecimento da resposta imune local. Portanto, essa técnica tem evidências comprovando sua ação benéfica no organismo, proporcionando uma melhor qualidade para os pacientes, através da redução de sintomatologia dolorosa, estímulo à cicatrização e diminuição da inflamação. Inclusive, existem diretrizes e guidelines da Associação Multinacional de Cuidados de Suporte em Oncologia (MASCC) recomendando o uso de FBM para o tratamento da mucosite oral em pacientes oncológicos (SCHUCH et al, 2024; CRONSHAW et al, 2020; SILVEIRA et a, 2019; PONTES et al, 2023).

Entretanto, embora já existam evidências robustas acerca dos benefícios da FBM em diversos cenários clínicos, como no processo de cicatrização de lesões de mucosite, úlceras traumáticas, entre outras condições, os efeitos da FBM no contexto da carcinogênese ainda permanecem em investigação (SCHUCH et al, 2024; SILVEIRA et al, 2019).

Estudos experimentais em modelos animais têm investigado os efeitos da FBM no processo de carcinogênese, gerando resultados ainda controversos. Observa-se considerável heterogeneidade entre os trabalhos quanto aos protocolos de aplicação, comprimento de onda, dose de energia, espécie animal utilizada, modelo experimental e estágio da lesão avaliada — fatores que devem ser considerados na interpretação dos achados. Os resultados variam entre os estudos, com alguns demonstrando efeitos antitumorais e outros não evidenciando impacto significativo, seja pró ou antitumoral. Estudos como o de Schuch et al. (2024), que avaliaram a aplicação da FBM em fases iniciais da carcinogênese, não identificaram alterações na morfologia tecidual, tampouco influência nos índices de proliferação celular ou apoptose. De modo geral, esses achados sugerem que os efeitos da FBM no contexto da carcinogênese podem depender de múltiplos fatores experimentais e biológicos, reforçando a necessidade de investigações adicionais para esclarecer essas divergências e compreender melhor seus

mecanismos de ação (SCHUCH et al, 2024; DE MONTEIRO et al, 2011; DO CARMO FILHO et al, 2025).

Cada vez mais tem se estudado o efeito à distância ou sistêmico da FBM. Esse efeito refere-se à capacidade da luz em provocar efeitos em tecidos distantes do local onde a luz é diretamente aplicada. Segundo a literatura, esse efeito se dá provavelmente por diferentes mecanismos como a estimulação de células e modulação de substâncias químicas circulantes. Trabalhos relatam que a ação da luz sobre moléculas circulantes, provavelmente citocinas, mitocinas e quimiocinas, faz com que transmitam efeitos protetores para tecidos distantes. Segundo a literatura, as mitocinas são substâncias liberadas na corrente sanguínea devido a estresse mitocondrial localizado. Esse ponto estaria em concordância com o que estamos discutindo, já que é descrito que a luz emitida durante a aplicação de FBM afeta a função das mitocôndrias. Portanto, a aplicação local de FBM, também provocaria efeitos a distância por meio da liberação dessas moléculas circulantes. Estudos prévios demonstram, por exemplo, a ocorrência de efeitos à distância da FBM, nos quais a aplicação da luz em regiões periféricas, como abdômen ou membros posteriores de camundongos, foi capaz de promover efeitos neuroprotetores, mesmo sem aplicação direta no sistema nervoso central (LIEBERT et al, 2022; GORDON et al, 2023). Outros estudos, como Wu e colaboradores (2025), mostraram efeitos neuroprotetores em ratos submetidos a traumatismos cranianos repetidos e posterior aplicação de FBM em região pulmonar, igualmente sugerindo efeitos sistêmicos da terapia (WU et al, 2025).

1.5 Carcinogênese e imuno-histoquímica

A imuno-histoquímica (IHQ) é uma técnica complementar amplamente empregada no processo diagnóstico em saúde, baseada na ligação altamente específica entre anticorpos e antígenos presentes nos tecidos. Essa ferramenta permite a identificação e localização de proteínas celulares, sendo fundamental para a caracterização, classificação e diferenciação de células e tecidos, auxiliando de forma eficaz na definição de condutas diagnósticas e terapêuticas em diversas patologias (MAGAKI et al, 2019; HOFMAN et al, 2013).

A IHQ pode ocorrer basicamente de duas formas: direta e indireta. Na ligação direta, o anticorpo primário já está ligado a alguma substância (exemplo: enzima) que permitirá a visualização da reação em estudo sem necessidade de etapas intermediárias. Já na técnica indireta, a detecção ocorre por meio da utilização de anticorpos secundários, podendo empregar diferentes sistemas de amplificação do sinal. Dentre esses, os sistemas poliméricos

destacam-se por serem amplamente utilizados na prática diagnóstica atual (MAGAKI et al, 2019; HOFMAN et al, 2013).

Diversos anticorpos são empregados na técnica de IHQ; entretanto, no contexto do estudo da carcinogênese do CEC oral, destacam-se marcadores amplamente investigados, como citoqueratinas, Ki-67 e p53. Contudo, outros anticorpos também podem estar diretamente relacionados a mecanismos fundamentais da carcinogênese oral, e sua investigação pode contribuir significativamente para o avanço do conhecimento sobre os processos moleculares envolvidos na progressão tumoral (BHALANG et al, 2023).

1.6.1 RPS6

A RPS6, ou *Ribosomal Protein S6*, recebe esse nome por corresponder à sexta proteína identificada da subunidade pequena (40S) do ribossomo. Trata-se de uma das proteínas que integram a estrutura ribossomal e participam de mecanismos celulares importantes relacionados ao funcionamento da via mTOR (HANROONGSRI et al, 2024; MEYUHAS et al, 2015).

A via mTOR, ou *mammalian target of rapamycin*, está relacionada a diversos fenômenos celulares, sendo considerada um mediador importante na síntese proteica, proliferação e sobrevivência celular. A via mTOR é dividida em dois complexos: via mTORC1 e mTORC2. O primeiro complexo está relacionado ao controle do crescimento celular, síntese proteica e autofagia, enquanto que o outro está envolvido no metabolismo, crescimento, sobrevivência e citoesqueleto das células. Segundo a literatura, a síntese e fosforilação da proteína RPS6 está muito ligada ao funcionamento da mTORC1 (ZONCU et al, 2010; CHAISUPARAT; RAGUPATHI et al, 2024).

A ativação alterada de mTORC1, a qual é um evento frequentemente observado em estágios iniciais da carcinogênese, irá promover fosforilação a ativação da quinase S6K1, a qual irá fosforilar a proteína RPS6, resultando no acúmulo de p-RPS6 tecidual. Ademais, estudos já publicados na literatura mostram a redução dos níveis de RPS6 em cânceres de cabeça e pescoço tratados com drogas inibidoras da via mTOR. Outros estudos conduzidos em camundongos demonstraram que animais com níveis reduzidos de RPS6 apresentaram diminuição do crescimento e da proliferação celular, reforçando, mais uma vez, a participação dessa proteína nos mecanismos que regulam o crescimento e a divisão celular, especialmente por meio da via mTOR. (CHAISUPARAT et al, 2013; HANROONGSRI et al, 2024).

1.6.2 p-Akt em Ser 473

Durante a ativação da via mTOR, outros componentes também participam da regulação desses eventos, como a Akt fosforilada em Ser473 (p-AKT Ser473). A Akt, também denominada proteína quinase B, é uma quinase citoplasmática que desempenha papel fundamental na sinalização celular, atuando diretamente na modulação da via mTOR. Essa proteína é composta por diversos aminoácidos e entre eles estão as serinas (Ser) e as treoninas (Thr) (MEMMOTT et al, 2009; HASSAN et al, 2024).

Fatores de crescimento farão a quinase PI3K produzir PIP3 na membrana plasmática e recrutar a Akt e PDK1 do citoplasma para membrana. Na membrana plasmática, PDK1 fosforila e ativa parcialmente a Akt em Thr308, ou seja, adiciona um grupo fosfato ao aminoácido treonina na posição 308. Após, o complexo mTORC2 da via mTOR irá completar a total ativação da Akt, através da fosforilação da mesma em Ser473, ou seja, adição de um grupo fosfato na serina em posição 473. Totalmente ativada, a p-Akt Ser473 irá ativar indiretamente a via mTORC1 (MEMMOTT et al, 2009; HASSAN et al, 2024).

Em cenário de carcinogênese, fatores como mutações genéticas e constante estímulo a fatores de crescimento específicos levarão a uma ativação aumentada da via mTOR, a qual está intimamente relacionada ao aumento da quantidade de p-Akt Ser473 nos tecidos. Ademais, sendo a via mTOR predominante em estágios iniciais da carcinogênese, é provável a existência de maior quantidade de p-Akt Ser473 nessas etapas primárias do desenvolvimento tumoral. (HASSAN et al, 2024; CHAISUPARAT et al, 2016).

1.6.3 TGF-B1

O fator de crescimento transformador Beta 1, ou *Transforming growth factor-beta 1 (TGF-B1),* é uma citocina fundamental na manutenção do equilíbrio entre crescimento e morte celular, estando envolvida em processos biológicos tais como sobrevivência, crescimento, diferenciação e migração celular, apoptose, entre outros. No contexto da carcinogênese, a literatura relata que o TGF-B1 apresenta uma ação dual nesse processo, apresentando função ora supressora ora promotora tumoral (WANG et al, 2021; SANCHEZ-CAPELO et al, 2005; YOO et al, 2022; MURPHY-ULLRICH et al, 2000).

Estudos demonstram que, em células normais e displásicas, o TGF-β1 exerce efeito antitumoral ao promover inibição da proliferação celular por meio do bloqueio do ciclo celular, indução de apoptose e redução da expressão de genes pró-oncogênicos, contribuindo, assim, para a manutenção da homeostase tecidual. Em cenários de carcinogênese mais avançada, onde se observa a ação pró-tumoral do TGF-B1, pesquisadores tem associado essa

troca de efeito a mecanismos como o funcionamento das proteínas SMAD, o crosstalk com a via PI3K/Akt/mTOR e a maior liberação de TGF-β1 e THBS1 por plaquetas em ambiente tumoral (SANCHEZ-CAPELO et al, 2005).

Estudos demonstram que células tumorais são capazes de ativar plaquetas, promovendo a liberação de diversos mediadores como, por exemplo, TGF-β1 e trombospondina-1 (THBS1). O TGF-β1 liberado no microambiente tumoral pode ativar a via canônica SMAD, bem como vias não canônicas, modulando a expressão gênica de maneira a favorecer a progressão tumoral. Entre seus principais efeitos destacam-se a redução da resposta antiproliferativa, a indução da transição epitélio-mesenquimal (EMT) e o aumento da expressão de proteínas envolvidas no remodelamento da matriz extracelular, incluindo a própria THBS1. O aumento da expressão de THBS1 contribui tanto para alterações nas interações célula-matriz e no rearranjo da matriz extracelular, como na ativação latente do TGF-B1. Dessa forma, a interação entre TGF-β1 e THBS1 no microambiente tumoral pode estabelecer um circuito pró-invasivo que potencializa a invasão tecidual e a progressão tumoral (PAL et al, 2016; MURPHY-ULLRICH et al, 2000).

1.6.4 Nitrotirosina

A nitrotirosina é formada quando o aminoácido tirosina é nitrado, ou seja, recebe um grupo nitro ($–NO_2$) em sua composição. Tudo isso está relacionado à presença de óxido nítrico tecidual em excesso. Esse excesso de óxido nítrico local está muito relacionado à indução de estresse nitrosativo celular, o qual ocorre em situações como o processo de carcinogênese. O óxido nítrico irá reagir com superóxido e formar peroxinitrito. O peroxinitrito, por sua vez, irá realizar a nitração da tirosina, transformando-a em nitrotirosina. (SERVATO et al, 2019).

Ademais, estudos demonstram aumento da produção de óxido nítrico em condições de estresse nitrosativo acompanhando a progressão de tecido saudável para desordens potencialmente malignas e, posteriormente, para o CEC estabelecido. Portanto, o maior acúmulo de nitrotirosina indica fenômenos como estresse nitrosativo, dano celular, inflamação, os quais podem estar presentes em condições como desenvolvimento tumoral (SERVATO et al, 2019).

Portanto, existem muitas possibilidades de estudos experimentais para ampliar o conhecimento dos mecanismos da carcinogênese e seu desenvolvimento em diferentes tecidos e sob diferentes circunstâncias.

2. HIPÓTESE

A FBM indireta não provoca alterações histomorfológicas ou imunohistoquímicas em mucosa palatina de ratos com carcinogênese oral induzida sistemicamente por 4NQO.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais:

Avaliar as alterações histológicas e o perfil imunohistoquímico de amostras de mucosa palatina de ratos submetidos à administração sistêmica de 4NQO e aplicação indireta de fotobiomodulação.

3.2 Objetivos específicos:

Investigar a ocorrência e o padrão de desenvolvimento de CEC nas amostras.

Analisar o efeito indireto da fotobiomodulação sobre o processo de carcinogênese nas amostras.

Analisar a diferença entre os grupos em relação à aplicação de fotobiomodulação indireta.

Avaliar o perfil de imunomarcação de TGF- β1, Nitrotirosina, p-Akt em Ser 473 e RPS6 nas amostras.

Avaliar as diferenças de expressão imuno-histoquímica dos marcadores entre os grupos.

Avaliar as diferenças de expressão imunohistoquímica dos marcadores entre diferenças zonas teciduais de uma mesma amostra.

4. DISCUSSÃO

Embora os efeitos locais da fotobiomodulação (FBM) sobre o reparo tecidual, a modulação inflamatória e a atividade celular estejam amplamente documentados na literatura, os potenciais efeitos sistêmicos dessa terapia sobre a carcinogênese oral permanecem insuficientemente elucidados (NECULQUEO et al., 2022; SCHUCH et al., 2024). No presente estudo, a aplicação indireta da FBM não promoveu alterações significativas no desenvolvimento histopatológico da carcinogênese oral induzida sistemicamente por 4NQO. Observou-se que todos os animais evoluíram para CEC em mucosa palatina, independentemente do protocolo de FBM empregado. Corroborando esses achados, a análise imunohistoquímica não evidenciou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos experimentais para a maioria dos marcadores investigados, sugerindo que a FBM indireta não exerceu influência substancial sobre os mecanismos moleculares envolvidos na progressão carcinogênica neste modelo experimental.

Nossos resultados confirmam a eficácia do 4NQO na indução de carcinogênese, onde se obteve desenvolvimento de CEC em todas as amostras, como observado em demais estudos publicados previamente (SAGHEER et al, 2021; ZIGMUNDO et al, 2022; SCHUCH et al, 2024). Outros carcinógenos como 7,12-dimetilbenzantraceno (DMBA) também são utilizados para indução de carcinogênese, mas apresentam algumas limitações que tornam o 4NQO a melhor escolha para este modelo (CHEN et al, 2010). O DMBA é geralmente aplicado de forma tópica em mucosa jugal, apresentando uma ação predominantemente local. Por outro lado, o 4NQO reproduz de forma mais fiel as alterações histopatológicas e moleculares associadas à exposição ao tabaco em humanos (SAGHEER et al, 2021; CHEN et al, 2010). Revisões sistemáticas como de Zigmundo e colaboradores (2022) também comprovam a capacidade do 4NQO na indução de carcinogênese em ratos Wistar de acordo com protocolos de doses e intervalos de administração adequados. Na etapa prévia desse estudo, de Schuch e colaboradores (2024), também se obtiveram resultados consistentes com uso do 4NQO para induzir alterações teciduais e desenvolvimento de carcinoma em língua. Um ponto também a ser discutido é ausência de perda de animais por efeito do 4NQO. Isso foi possível devido ao ajuste do protocolo de administração do 4NQO, em doses escalonadas, permitindo a adaptação do animal, além de período semanal de interrupção da dose e nutrição específica com glicose (Schuch et al., 2023). Referente à indução de carcinogênese específica em palato de ratos por 4NQO observa-se escassa informação na literatura, onde a maioria dos estudos aplica o carcinógeno de forma tópica em mucosa palatina ou, quando a indução é feita

de forma sistêmica, a avaliação é concentrada na língua (SAGHEER et al, 2021; ZIGMUNDO et al, 2022; SCHUCH et al, 2024; FERREIRA DE AGUIAR et al, 2006).

A carcinogênese oral é um processo multifatorial e dinâmico, caracterizado por alterações progressivas em vias de sinalização celular, desregulação proliferativa e modificações no microambiente tumoral, elementos fundamentais para a iniciação, promoção e progressão neoplásica (HANAHAN et al., 2000; HSU et al., 2020; SCHUCH et al., 2024). Nesse contexto, a avaliação imunohistoquímica de p-RPS6, p-Akt (Ser473), TGF-β1 e nitrotirosina possibilitou investigar potenciais repercussões da FBM sobre mecanismos moleculares associados às diferentes etapas da carcinogênese oral experimental.

A análise imunohistoquímica de p-RPS6 evidenciou redução progressiva da imunomarcação ao longo da evolução da carcinogênese oral, sem diferenças significativas entre o grupo controle e os grupos submetidos aos diferentes protocolos de FBM. Em contrapartida, observaram-se diferenças relacionadas aos distintos graus de alteração tecidual, sugerindo associação da expressão de p-RPS6 com o estágio de progressão da doença, independentemente da intervenção terapêutica. A diminuição da imunomarcação de p-RPS6 ao longo da carcinogênese já foi previamente descrita na literatura (HANROONGSRI et al., 2024). Esse padrão de expressão pode estar relacionado à desregulação da via mTOR, particularmente do complexo mTORC1, cuja ativação precoce no desenvolvimento tumoral está associada ao aumento da síntese proteica, proliferação celular e mecanismos de sobrevivência tumoral (HUA et al., 2019; HANROONGSRI et al., 2024; CHAISUPARAT, 2013). Nas fases iniciais da carcinogênese, a hiperativação dessa via favoreceria a fosforilação da proteína S6K1, resultando na subsequente fosforilação e acúmulo local de p-RPS6, justificando a maior imunomarcação observada em lesões menos avançadas (CHAISUPARAT, 2013; HUA et al., 2019). Por outro lado, a redução progressiva da expressão de p-RPS6 durante a evolução carcinogênica pode refletir alterações adaptativas do metabolismo tumoral e a perda gradual da predominância da sinalização mediada por mTORC1. Condições frequentemente observadas no microambiente tumoral, como hipóxia e estresse energético, podem favorecer a ativação de vias metabólicas alternativas, especialmente da AMP-activated protein kinase (AMPK), a qual exerce regulação negativa sobre o mTORC1 e participa de processos relacionados à transição epitélio mesenquimal e à progressão tumoral (ZHAO et al., 2019; KIM et al., 2016). Esse racional biológico mostra-se compatível com os achados observados no presente estudo.

A análise imunohistoquímica de p-Akt (Ser473) não evidenciou diferenças significativas entre o grupo controle e os grupos submetidos aos diferentes protocolos de

FBM, tampouco entre as distintas áreas morfológicas ao longo da progressão da carcinogênese oral. Esses achados sugerem que, neste modelo experimental, a expressão de p-Akt (Ser473) não esteve associada nem ao efeito da FBM indireta nem ao avanço histopatológico da doença. A literatura demonstra que o aumento da expressão de p-Akt (Ser473) está relacionado à fosforilação da proteína Akt na serina 473, evento mediado predominantemente pelo complexo mTORC2, um dos principais componentes da via mTOR frequentemente ativada durante a carcinogênese (HUA et al., 2019). A ativação dessa via desempenha papel relevante na regulação da sobrevivência celular, proliferação, metabolismo e resistência à apoptose, sendo frequentemente associada à progressão tumoral e a fenótipos mais agressivos em diferentes neoplasias (RAGUPATHI et al., 2024). Entretanto, no presente estudo, não foi observado um padrão consistente de superexpressão de p-Akt (Ser473) em áreas de CEC, divergindo de achados previamente descritos na literatura, que correlacionam elevados níveis desse marcador com a progressão da carcinogênese oral e pior prognóstico tumoral (MARTINS et al., 2016; LIM et al., 2005). Uma possível explicação para a variabilidade observada na imunomarcação de p-Akt pode estar relacionada à complexidade de sua regulação biológica, uma vez que sua ativação depende da integração de múltiplos sinais extracelulares e de diferentes complexos intracelulares de sinalização, incluindo interações com vias associadas ao metabolismo celular, inflamação e adaptação ao microambiente tumoral (RAGUPATHI et al., 2024; LIU et al., 2011). Esse comportamento multifatorial pode justificar a ausência de um padrão homogêneo de expressão durante a progressão carcinogênica observada neste estudo.

Em relação ao TGF-β1, observaram-se diferenças significativas entre as distintas áreas morfológicas analisadas, particularmente entre mucosa normal e carcinoma, bem como entre mucosa displásica e carcinoma, evidenciando redução acentuada da imunomarcação nas áreas de CEC. Em contrapartida, não foram observadas diferenças relevantes entre os grupos experimentais, exceto em mucosa normal, na qual o grupo FBM 1J apresentou menor expressão quando comparado ao grupo controle. Esses achados sugerem que as alterações na expressão de TGF-β1 estiveram predominantemente associadas ao estágio da progressão carcinogênica, e não aos diferentes protocolos de FBM empregados. A redução da expressão de TGF-β1 observada nas áreas de carcinoma pode estar relacionada ao comportamento dual desse mediador durante a carcinogênese, bem como a alterações em sua principal via de sinalização intracelular, mediada pelas proteínas SMAD (HELDIN et al., 1997). A via TGF-β/SMAD desempenha papel central na transdução de sinais celulares envolvidos na regulação

da proliferação, diferenciação e apoptose, exercendo, nas fases iniciais da carcinogênese, um importante efeito supressor tumoral (HELDIN et al., 1997).

Nesse sentido, a maior imunomarcação de TGF-β1 observada em mucosa normal e displásica pode refletir sua atuação antitumoral nas etapas iniciais do processo carcinogênico, contribuindo para o controle da proliferação celular aberrante. Entretanto, à medida que ocorre a progressão tumoral e a invasão tecidual, mecanismos de resistência à sinalização de TGF-β1 podem emergir, tornando sua ação supressora progressivamente ineficaz, o que poderia justificar a redução da imunomarcação observada nas áreas de carcinoma. Estudos sugerem ainda que, em fases mais avançadas da carcinogênese, o TGF-β1 pode readquirir papel pró tumoral, favorecendo remodelamento tecidual, imunossupressão e progressão tumoral, o que potencialmente estaria associado a um novo aumento de sua expressão (WANG et al., 2021). Adicionalmente, nas amostras de mucosa normal, observou-se redução significativa da imunomarcação de TGF-β1 no grupo FBM 1J em comparação ao grupo controle. Esse achado pode estar relacionado à capacidade da FBM de modular fatores de crescimento e mediadores celulares em tecidos não submetidos ao estresse carcinogênico, favorecendo mecanismos de manutenção da homeostase tecidual e equilíbrio metabólico local, sem necessariamente induzir respostas proliferativas exacerbadas (DIPALMA et al., 2023).

A análise da nitrotirosina evidenciou diferenças significativas entre as áreas morfológicas avaliadas, com maior imunomarcação em mucosa displásica, seguida por mucosa normal e CEC, sem diferenças entre o grupo controle e os grupos submetidos aos diferentes protocolos de FBM. Esses achados sugerem que a expressão da nitrotirosina esteve predominantemente associada às alterações teciduais decorrentes da progressão carcinogênica. Considerada um importante marcador de estresse nitrosativo e dano celular, a nitrotirosina reflete a presença de espécies reativas de nitrogênio e modificações oxidativas proteicas. Assim, a maior imunomarcação observada em mucosa displásica pode ser atribuída ao intenso desequilíbrio redox característico das fases iniciais e intermediárias da carcinogênese oral, período marcado por alterações moleculares e inflamatórias capazes de intensificar o estresse oxidativo e nitrosativo local. Esses achados estão em consonância com estudos prévios que demonstram aumento da expressão de nitrotirosina em tecidos displásicos e lesões potencialmente malignas da cavidade oral (SERVATO et al., 2019; FROHWITTER et al., 2020; BENTZ et al., 2000). Entretanto, diferentemente de parte dos estudos previamente publicados, observou-se no presente trabalho redução da imunomarcação de nitrotirosina em áreas de CEC. Uma possível explicação para esse comportamento reside na

capacidade adaptativa das células tumorais frente ao estresse oxidativo e nitrosativo persistente. Durante a progressão tumoral, mecanismos celulares de tolerância metabólica e defesa antioxidante podem ser selecionados, reduzindo o acúmulo de danos moleculares detectáveis e, consequentemente, a imunomarcação da nitrotirosina (HAYES et al., 2020). Esse racional biológico é compatível com a hipótese de adaptação tumoral ao microambiente pró oxidante estabelecido durante a carcinogênese.

Nosso estudo apresenta limitações tais como o número amostral relativamente pequeno e a ausência de um grupo experimental com aplicação direta de FBM em mucosa palatina, o que limitou a possibilidade de comparação entre efeitos locais e indiretos da terapia em palato. Outro ponto seria que, sendo a carcinogênese um fenômeno que envolve múltiplas vias de sinalização e abrange eventos biológicos de alta complexidade, seria interessante a inclusão de outros anticorpos além dos estudados no presente trabalho. É importante salientar a segurança e eficácia que o modelo 4NQO em ratos Wistar mostrou no nosso estudo, mimetizando a carcinogênese no ser humano em diversos aspectos sem provocar óbito de animais. Estudos futuros com maior número amostral e maior diversidade de marcadores devem ser conduzidos. Além disso, estudos abrangendo testes moleculares e análise genética do assunto podem contribuir significativamente para ciência.

5. CONCLUSÃO

A FBM indireta não exerceu influência sobre a progressão da carcinogênese oral induzida por 4NQO, uma vez que não foram observadas diferenças histomorfológicas ou imunohistoquímicas relevantes entre os grupos experimentais. Esses achados sugerem que a aplicação indireta da FBM é segura no contexto da carcinogênese oral nesse modelo experimental. Por outro lado, p-RPS6, TGF-β1 e nitrotirosina apresentaram diferenças de imunomarcação entre mucosa normal, mucosa displásica e carcinoma, sugerindo padrões de expressão relacionados aos diferentes estágios da carcinogênese oral, independentemente da aplicação da FBM.

6. REFERÊNCIAS

ANSARY, T. M.; HOSSAIN, M. D. R.; KOMINE, M.; OHTSUKI, M. Immunotherapy for the treatment of squamous cell carcinoma: potential benefits and challenges. International Journal of Molecular Sciences, v. 23, n. 15, p. 8530, 2022.

BARSOUK, A.; ALURU, J. S.; RAWLA, P.; SAGINALA, K.; BARSOUK, A. Epidemiology, risk factors, and prevention of head and neck squamous cell carcinoma. Medical Sciences, v. 11, n. 2, p. 42, 2023.

BENTZ, B. G.; HAINES, G. K.; RADOSEVICH, J. A. Increased protein nitrosylation in head and neck squamous cell carcinogenesis. Head & Neck, v. 22, n. 1, p. 64-70, 2000.

BRASILEIRO FILHO, G. Bogliolo – Patologia. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2021.

CABRAL, L. G. S. et al. Molecular mechanisms in the carcinogenesis of oral squamous cell carcinoma: a literature review. Biomolecules, v. 15, n. 5, p. 621, 2025.

CHAISUPARAT, R.; ROJANAWATSIRIVEJ, S.; YODSANGA, S. Ribosomal protein S6 phosphorylation is associated with epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma of the oral cavity. Pathology Oncology Research, v. 19, n. 2, p. 189-193, 2013.

CHEN, Y. K.; LIN, L. M. DMBA-induced hamster buccal pouch carcinoma and VX2-induced rabbit cancer as a model for human oral carcinogenesis. Expert Review of Anticancer Therapy, v. 10, n. 9, p. 1485-1496, 2010.

CRONSHAW, M. et al. Photobiomodulation and oral mucositis: a systematic review. Dentistry Journal, v. 8, n. 3, p. 87, 2020.

DENARO, N.; RUSSI, E. G.; MERLANO, M. C. Pros and cons of the new edition of TNM classification of head and neck squamous cell carcinoma. Oncology, v. 95, n. 4, p. 202-210, 2018.

DIPALMA, G. et al. Photobiomodulation and growth factors in dentistry: a systematic review. Photonics, v. 10, p. 1095, 2023.

FROHWITTER, G. et al. Oxidative and nitrosative stress in oral squamous cell carcinoma. Cells Tissues Organs, v. 209, n. 2-3, p. 120-127, 2020.

Global Cancer Observatory (GCO) – Cancer Today Database. International Agency for Research on Cancer. GLOBOCAN 2022 database. Accessed June 2026.

GORMLEY, M. et al. Reviewing the epidemiology of head and neck cancer: definitions, trends and risk factors. British Dental Journal, v. 233, n. 9, p. 780-786, 2022.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. Cell, v. 100, n. 1, p. 57-70, 2000.

HANROONGSRI, J. et al. Expression of PD-L1 and p-RPS6 in epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma of the oral cavity. Frontiers in Oral Health, v. 5, 2024.

HAYES, J. D.; DINKOVA-KOSTOVA, A. T.; TEW, K. D. Oxidative stress in cancer. Cancer Cell, v. 38, n. 2, p. 167-197, 2020.

HELDIN, C. H.; MIYAZONO, K.; TEN DIJKE, P. TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. Nature, v. 390, p. 465-471, 1997.

HOFMAN, F. M.; TAYLOR, C. R. Immunohistochemistry. Current Protocols in Immunology, v. 103, 2013.

HSU, P. J. et al. Molecular biology of oral cavity squamous cell carcinoma. Oral Oncology, v. 102, p. 104552, 2020.

HUA, H. et al. Targeting mTOR for cancer therapy. Journal of Hematology & Oncology, v. 12, n. 1, p. 71, 2019.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (Brasil). Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2022.

JAGADEESAN, D. et al. Comprehensive insights into oral squamous cell carcinoma: diagnosis, pathogenesis, and therapeutic advances. Pathology Research and Practice, v. 261, p. 155489, 2024.

KIM, J. et al. AMPK activators: mechanisms of action and physiological activities. Experimental & Molecular Medicine, v. 48, e224, 2016.

LI, J.; AB RAHMAN, N.; MOHAMAD, S. Decoding oral carcinogenesis and tumor progression in whole cigarette smoke exposure: a systematic review. Cureus, v. 16, n. 8, 2024.

LIM, J. et al. Prognostic value of activated Akt expression in oral squamous cell carcinoma. Journal of Clinical Pathology, v. 58, n. 11, p. 1199-1205, 2005.

LIU, G. Y.; SABATINI, D. M. mTOR at the nexus of nutrition, growth, ageing and disease. Nature Reviews Molecular Cell Biology, v. 21, n. 4, p. 183-203, 2020.

LOGULLO, A. F. et al. Transforming growth factor beta1 expression in head and neck squamous cell carcinoma patients as related to prognosis. Journal of Oral Pathology & Medicine, v. 32, n. 3, p. 139-145, 2003.

MAGAKI, S. et al. An introduction to the performance of immunohistochemistry. Methods in Molecular Biology, v. 1897, p. 289-298, 2019.

MARTINS, F. et al. PI3K-AKT-mTOR pathway proteins are differently expressed in oral carcinogenesis. Journal of Oral Pathology & Medicine, v. 45, n. 10, p. 746-752, 2016.

MASUDA, H. et al. Early Detection of Leukoplakic Oral Squamous Cell Carcinoma Using 4NQO-induced Rat Tongue Cancer Model: Study Utilizing Fluorescence Intensity and Histopathological Evaluation. Bull Tokyo Dent Coll, v. 63, n. 1, p. 1-12, 2022.

MULLER, S.; TILAKARATNE, W. M. Update from the 5th edition of the WHO classification of head and neck tumors. Head and Neck Pathology, v. 16, n. 1, p. 54-62, 2022.

NECULQUEO, G. W. et al. Laser photobiomodulation does not alter clinical and histological characteristics of 4-NQO-induced oral carcinomas and leukoplakia in mice. Journal of Photochemistry and Photobiology B, v. 237, p. 112597, 2022.

ODELL, E. et al. Oral epithelial dysplasia: recognition, grading and clinical significance. Oral Diseases, v. 27, n. 8, p. 1947-1976, 2021.

PANIERI, E.; SANTORO, M. M. ROS homeostasis and metabolism: a dangerous liaison in cancer cells. Cell Death & Disease, v. 7, e2253, 2016.

PRITZKER, K. P. H. et al. Oral potentially malignant disorders (OPMD): what is the clinical utility of dysplasia grade? Expert Review of Molecular Diagnostics, v. 21, n. 3, p. 289-298, 2021.

R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation, 2024.

SAGHEER, S. H. et al. 4NQO induced carcinogenesis: a mouse model for oral squamous cell carcinoma. Methods in Cell Biology, v. 163, p. 93-111, 2021.

SCHUCH, L. F. et al. Investigating the safety of photobiomodulation in oral carcinogenesis: insights into cell proliferation, invasion, and apoptosis via the 4NQO model. Scientific Reports, v. 14, p. 28303, 2024.

SILVEIRA, F. M. et al. Examining tumor modulating effects of photobiomodulation therapy on head and neck squamous cell carcinomas. Photochemical & Photobiological Sciences, v. 18, n. 7, p. 1621-1637, 2019.

SUNG, H. et al. Global cancer statistics 2020. CA: A Cancer Journal for Clinicians, v. 71, p. 209-249, 2021.

TARLE, M.; LUKŠIĆ, I. Pathogenesis and therapy of oral carcinogenesis. International Journal of Molecular Sciences, v. 25, n. 12, p. 6343, 2024.

VAN DEN BOSCH, J. et al. Optimizing preclinical models for oral cancer: the influence of 4NQO administration routes on tumor development. Cancers, v. 17, n. 13, p. 2108, 2025.

WAGNER, V. P. et al. Immunohistochemical study of TGF-β1 in oral leukoplakia and oral squamous cell carcinoma. Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology, 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO classification of tumours of the head and neck. 5. ed. Lyon: IARC, 2022.

WU, C. et al. Remote photobiomodulation ameliorates behavioral and neuropathological outcomes in a rat model of repeated closed head injury. Transl Psychiatry, v. 15, n. 1, p.8, 2025.

YU, Z. W. et al. Ultraviolet radiation: a double-edged sword in cancer development and therapy. Molecular Biomedicine, v. 5, n. 1, p. 49, 2024.

ZHOU, S. et al. Cancer-associated fibroblasts in carcinogenesis. Journal of Translational Medicine, v. 23, n. 1, p. 50, 2025.

ZIGMUNDO, G. C. O. et al. 4-nitroquinoline-1-oxide induced oral carcinogenesis: a systematic literature review. Pathology Research and Practice, v. 236, p. 153970, 2022.

ZONCU, R.; EFEYAN, A.; SABATINI, D. M. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. Nature Reviews Molecular Cell Biology, v. 12, n. 1, p. 21-35, 2011.