



**UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOFOTÔNICA APLICADA ÀS
CIÊNCIAS DA SAÚDE**

JULIANA ESTEPHAN NOBILE

**AVALIAÇÃO DO ESPECTRO DE ABSORÇÃO E DA VIABILIDADE DE
LINHAGENS CELULARES CULTIVADAS SOB ESTRESSE NUTRICIONAL E
SUBMETIDAS À FOTOBIMODULAÇÃO**

São Paulo, SP
2019

**AVALIAÇÃO DO ESPECTRO DE ABSORÇÃO E DA VIABILIDADE DE
LINHAGENS CELULARES CULTIVADAS SOB ESTRESSE NUTRICIONAL E
SUBMETIDAS À FOTOBIMODULAÇÃO**

Dissertação apresentada à Universidade Nove de Julho
para a obtenção do título de Mestre em Biofotônica
aplicada às Ciências da Saúde.

Orientador: Profa. Dra. Maria Fernanda Setúbal Destro
Rodrigues
Co-orientador: Profa. Dra. Daniela de Fátima Teixeira da
Silva

São Paulo, SP
2019

FICHA CATALOGRÁFICA

Nobile, Juliana Estephan.

Avaliação do espectro de absorção e da viabilidade de linhagens celulares cultivadas sob estresse nutricional e submetidas à fotobiomodulação. / Juliana Estephan Nobile. 2020.

63 f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2020.

Orientador (a): Prof^a. Dr^a. Maria Fernanda Setúbal Destro Rodrigues.

1. Espectrofotômetro. 2. Absorbância. 3. Estresse nutricional. 4. Cultura celular. 5. LED. 6. Espectroscopia óptica. 7. Nutrição. 8. Fototerapia.

I. Rodrigues, Maria Fernanda Setúbal Destro.

II. Título.

CDU 615.831

São Paulo, 23 de janeiro de 2020

TERMO DE APROVAÇÃO

Aluno (a): Juliana Estephan Nobile

Título da Dissertação: "Avaliação do espectro de absorção e da viabilidade de linhagens celulares cultivadas sob estresse nutricional e submetidas à fotobiomodulação"

Presidente: PROF^a. DR^a. MARIA FERNANDA SETUBAL DESTRO RODRIGUES

Aprovada

Membro: PROF^a. DR^a. DANIELA DE FÁTIMA TEIXEIRA DA SILVA

Aprovada

Membro: PROF^a DR^a MARIA STELLA NUNES ARAUJO MOREIRA

Aprovada

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço minha orientadora, Professora Doutora Maria Fernanda Setúbal Destro Rodrigues, por toda paciência, orientação e dedicação na produção deste trabalho, e na qual tenho muita admiração.

À Professora Doutora Daniela de Fátima Teixeira da Silva pela acessibilidade aos equipamentos que permitiram a realização desta pesquisa e por todos os ensinamentos durante o curso.

À Universidade Nove de Julho pela infraestrutura disponível para o desenvolvimento desta pesquisa, bem como o setor administrativo e secretaria.

Ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação que forneceram conhecimentos básicos para realização da pesquisa.

Às técnicas do Laboratório de Pesquisa Celular, por estarem sempre dispostas a ajudar e colaborar.

Às colegas de Laboratório: Marlene Ferreira, Ana Melissa Ibarra, Kaline de Souza por dividirem conhecimento e experiências consolidando todo aprendizado.

Às alunas de Iniciação Científica, Cássia e Bárbara, pelo companherismo e dedicação.

Aos meus pais e irmã que sempre me apoiaram e incentivaram em todas as etapas da vida e são modelos em quem procuro me espelhar.

Ao meu namorado, Vinicius, agradeço a paciência, a motivação e por fazer tudo ficar mais leve.

Aos amigos, familiares e todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, o meu muito obrigada!

RESUMO

A absorvância exprime a fração da energia luminosa que é absorvida por uma determinada espessura de um material. Ou seja, a capacidade de absorver a luz. Em um meio de cultura celular no qual usamos a fotobiomodulação para bioestimular ou bioinibir as reações celulares, este conhecimento se faz necessário para determinar os protocolos de tratamento. Analisar o espectro de absorção de linhagens celulares (HaCat, DOK, fibroblastos, CA1, LUC4 e SCC9) cultivadas em diferentes concentrações de soro antes e após a FBM e analisar a viabilidade celular através do ensaio de MTT. As linhagens celulares foram cultivadas em seus próprios meios de cultura. 24 horas antes da leitura no espectrofotômetro, o meio de cultura foi trocado para as concentrações de 0%, 5% e 10% de SFB. Após esse período em deficit nutricional, as células foram tripsinizadas e ressuspensas em 1,5ml solução tampão fosfato-salina (PBS) para leitura da absorvância no equipamento espectrofotômetro. As células que apresentaram diferença estatística no espectro de absorção foram submetidas a FBM com LED nos parâmetros: 6J, 660nm, 240 segundos. Foram realizados dois tratamentos: no primeiro, as células ficavam 48 horas sob estresse nutricional e eram submetidas a uma única irradiação com o LED; no outro, as mesmas linhagens ficavam 96 horas sob estresse nutricional e eram tratadas por três dias consecutivos com o LED. Não foi observada diferença das linhagens CA1, LUC4 e dos fibroblastos quando cultivadas por 24 horas em deficit nutricional. Já as linhagens HACAT, DOK e SCC9 apresentaram maior absorção quando cultivadas com maior concentração de SFB. Não houve diferença estatística das linhagens HACAT, DOK e SCC9 tratadas com uma ou três irradiações e cultivadas por 48 e 96 horas em deficit nutricional. O estresse nutricional das linhagens celulares avaliadas não mostraram efeito na absorvância antes ou depois da FBM, nem na viabilidade celular.

Palavras Chave: espectrofotômetro, absorvância, estresse nutricional, cultura celular, LED; espectroscopia óptica; nutrição; fototerapia

ABSTRACT

Absorbance is the fraction of light energy that is absorbed by a specific thickness of a material. It means the ability of a material of absorbing light. In a cell culture where photobiomodulation is used to biostimulate or bioinhibit cell reactions, the knowledge spectrum of cell lines (HACAT, DOK, fibroblasts, CA1, LUC4 and SCC9) cultivated under a nutritional stress before and after a PBM and analyze the cell viability through the assay MTT. The cell lines were cultured in medium DMEM-F12 with 10% FBS and supplemented, to evaluate the effect of nutritional stress on the light absorption spectra, cells were cultured for 24 h under the following conditions: DMEM-F12 +10% FBS, DMEM-F12 + 5% FBS and DMEM-F12. After this period, 10^5 cells from each experimental condition were collected and resuspended in 1 ml of phosphate buffer solution (PBS) to measure the absorbance in the spectrophotometer. The cell lines that showed a statistical difference in absorption spectrum were subjected to FBM with LED in the parameters: 6J, 660nm, 240 s. Two treatments were performed: in the first, the cells were cultivated in 48 hours under nutritional stress and through a single irradiation; the other, the same cell lines stay 96 hours under nutritional stress and were treated for three consecutive days with the LED. There is no difference between CA1, LUC4 and fibroblasts when cultivated for 24 hours in nutritional stress. The cell lines HACAT, DOK and SCC9 showed higher absorption when cultivated with higher FBS concentration. There is no statistically significant differences between HACAT, DOK and SCC9 cell lines treated with one or three irradiations when cultivated for 48 and 96 hours under nutritional stress. Nutritional stress of the evaluated cell lines showed no effect on absorbance before or after PBM, nor on cell viability.

Key-words: spectrophotometer, absorbance, nutritional stress, cell culture, LED, optical spectroscopy, nutritional, phototherapy

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Imagem microscópica representativa das linhagens celulares HACAT, DOK, SCC9, LUC4, fibroblastos e CA1.....	30
Figura 2: Esquema representativo da cronologia experimental para avaliação do efeito do estresse nutricional e da FBM única (LED1) ou diária por três dias consecutivos (LED3) em linhagens celulares.....	32
Figura 3: Foto do equipamento espectrofotometro USB-2000	33
Figura 4: Gráficos representativos do resultado do espectro de absorção da linhagem HACAT submetida ao deficit nutricional por 24 horas.....	36
Figura 5: Gráficos representativos do resultado do espectro de absorção da linhagem DOK submetida ao deficit nutricional por 24 hora	37
Figura 6: Gráficos representativos do resultado do espectro de absorção da linhagem CA1 submetida ao deficit nutricional por 24 horas.....	38
Figura 7: Gráficos representativos do resultado do espectro de absorção da linhagem LUC4 submetida ao deficit nutricional por 24 horas	39
Figura 8: Gráficos representativos do resultado do espectro de absorção da linhagem fibroblasto submetida ao deficit nutricional por 24 horas.....	40
Figura 9: Gráficos representativos do resultado do espectro de absorção da linhagem SCC9 submetida ao deficit nutricional por 24 horas.....	41
Figura 10: Representação da área sob a curva da absorbância nos grupos 0% FBS, 5% FBS e 10% FBS das linhagens DOK e SCC9	42
Figura 11: Gráficos representativos do resultado do espectro de absorção da linhagem HACAT cultivadas por 48h em déficit nutricional e submetidas a uma única irradiação.....	43
Figura 12: Gráficos representativos do resultado do espectro de absorção da linhagem DOK cultivadas por 48h em déficit nutricional e submetidas a uma única irradiação.....	44
Figura 13: Gráficos representativos do resultado do espectro de absorção da linhagem SCC9 cultivadas por 48h em déficit nutricional e submetidas a uma única irradiação.....	45
Figura 14: Gráficos representativos do resultado do espectro de absorção da linhagem HACAT cultivadas por 96h em déficit nutricional e submetidas a três irradiações consecutivas.....	47
Figura 15: Gráficos representativos do resultado do espectro de absorção da linhagem DOK cultivadas por 96h em déficit nutricional e submetidas a três irradiações consecutivas.....	48
Figura 16: Gráficos representativos do resultado do espectro de absorção da linhagem SCC9 cultivadas por 96h em déficit nutricional e submetidas a três irradiações consecutivas.....	49

Figura 17: Gráficos representativos do resultado da análise da viabilidade celular das linhagens HACAT, DOK e SCC9 no grupo controle e LED3 nas diferentes concentrações de SFB.....51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Descrição dos valores de média e desvio padrão (DP) referentes à área sob a curva da absorbância das linhagens celulares CA1, LUC4, SCC9, DOK, HACAT e fibroblastos após 24 horas de cultivo em déficit nutricional.....35

Tabela 2: Descrição dos valores de média e desvio padrão (DP) referentes à área sob a curva da absorbância das linhagens celulares HACAT, DOK e SCC9 após 48 h de cultivo em déficit nutricional e irradiação única.....43

Tabela 3: Descrição dos valores de média e desvio padrão (DP) referentes à área sob a curva da absorbância das linhagens celulares HACAT, DOK e SCC9 após 96 h de cultivo em déficit nutricional e três irradiações consecutivas46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Grau Celsius
ANOVA	Análise de Variância, do inglês <i>Analyses of variance</i>
ATP	Adenosina trifosfato
CEB	Carcinoma Epidermóide de Boca
cm ²	Centímetros quadrados
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
FBM	Fotobiomodulação
H	Densidade de Energia
h	Hora
H ₂ O ₂	Água Oxigenada
I	Irradiância
J	Joules
km	quilômetros
Laser	Luz amplificada por emissão estimulada de radiação, do inglês <i>light amplification by stimulated emission of radiation</i>
LED	Diodo Emissor de Luz, do inglês <i>Light Emitting Diode</i>
LLLT	Terapia de luz de baixa intensidade, do inglês <i>Low Level Light Therapy</i>
MO	Mucosite Oral
MTT	Methyl-Thiazolyl-Tetrazolium
mW	Mili watts
NASA	<i>National Aeronautics and Space Administration</i>
nm	Nanometros
PBS	Tampão Fosfato, do inglês <i>Phosphate Buffered Saline solution</i>
s	Segundos
SFB	Soro Fetal Bovino
W	Watts

SUMÁRIO

1.Contextualização.....	12
1.1 Princípios físicos da luz.....	12
1.2. Fotobiomodulação.....	14
1.3. Déficit Nutricional.....	18
1.4. Carcinoma epidermóide	21
2. Objetivos.....	27
3.Materiais e Métodos.....	28
3.1. Cultivo celular.....	28
3.2 Grupos de estudo.....	30
3.2.1 Avaliação do estresse nutricional no espectro de absorção.....	30
3.2.1 Avaliação do estresse nutricional e da FBM no espectro de absorção.....	30
3.3 Estresse nutricional.....	31
3.4 Fotobiomodulação.....	32
3.5 Espectrofotometria.....	33
3.6 Análise da viabilidade celular.....	33
3.7 Análise estatística.....	34
4. Resultados.....	35
4.1 Análise da absorbância após 24 h de déficit nutricional.....	35
4.2 Análise da absorbância após 48h de déficit nutricional e única irradiação com LED.....	42
4.3 Análise da absorbância após 96 h de déficit nutricional e irradiação diária por três dias consecutivos.....	45
4.4 Análise da viabilidade celular após déficit nutricional e irradiação diária por três dias consecutivos.....	50
5. Discussão.....	52
6. Conclusão.....	58
7. Referências.....	59

1. CONTEXTUALIZAÇÃO

1.1 Princípios físicos da luz

Luz é toda radiação eletromagnética, cujo comprimento de onda encontra-se em um determinado intervalo no qual o olho humano é sensível, ou seja, entre a radiação infravermelha e a radiação ultravioleta, conhecido como faixa visível do espectro eletromagnético.¹

As ondas possuem algumas características em comum, como cristas, vales, amplitude, frequência, período, velocidade de propagação e a distância entre as cristas, denominado comprimento de onda. Este, corresponde à distância que a onda percorre até realizar uma oscilação completa. A crista da onda representa o ponto mais alto da mesma. Ao contrário do vale que é o ponto mais baixo da mesma onda. A amplitude está relacionada com a magnitude do sinal.²

As ondas de luz eletromagnética não têm necessidade de um meio material para se propagar, podendo viajar no vácuo a uma velocidade constante em torno de 300.000 km/s.²

A radiação eletromagnética depende de dois constituintes: um elétrico e outro magnético, as quais oscilam em fase e são perpendiculares entre si. Estes componentes representam os campos elétrico e magnético, os quais variam no tempo. As ondas eletromagnéticas possuem algumas grandezas: polarização, fase, monocromaticidade, colimação e coerência.²

A frequência e o comprimento de onda são duas grandezas inversamente proporcionais, ou seja, quanto maior o comprimento de onda, menor a frequência. Comprimentos de onda menores estão relacionados às ondas com altas frequências e comprimentos de onda maiores às ondas de baixa frequência.³

Quando a radiação interage com a matéria, cinco processos pode ocorrer, incluindo reflexão, espalhamento, transmissão, absorção e refração. A reflexão é o fenômeno que consiste no fato de a luz voltar a se propagar no meio de origem após incidir sobre um objeto ou superfície. A refração ocorre quando a luz passa de um meio menos denso para outro mais denso ou vice-versa e a luz é refratada (ou desviada) em relação a um eixo de referência, denominado eixo normal.

Quando a luz passa através de uma amostra, a quantidade de luz absorvida é a diferença entre a radiação incidente (I_0) e a radiação transmitida (I). A quantidade de luz absorvida é absorvância.⁵

O comprimento de onda da luz absorvida é aquele que tem energia suficiente para mover um elétron de um nível inferior de energia para um nível superior de energia. Para transições eletrônicas, a diferença de energia entre o estado fundamental e o estado excitado é relativamente grande. Portanto, a absorção de energia e o retorno para o estado fundamental são processos rápidos, e o equilíbrio é alcançado muito rapidamente. Assim, uma simples relação linear entre absorvância e concentração e a relativa facilidade de medida da luz têm feito com que a espectroscopia seja a base de vários métodos analíticos quantitativos.⁶

A espectrofotometria óptica de absorção baseia-se na absorção da radiação nos comprimentos de onda entre o ultravioleta e o infravermelho, sendo que o espectro visível está contido essencialmente na zona entre 400 e 800 nm⁷. Os métodos espectroscópicos consistem na absorção e/ou emissão de radiação eletromagnética por diversas moléculas quando seus elétrons se movimentam entre níveis energéticos.⁵

Para mensurar a absorvância de uma determinada solução, é utilizado um equipamento denominado espectrofotômetro. Este faz passar um feixe de luz monocromática através de uma solução, sendo capaz de medir a quantidade de luz que foi absorvida por ela, sendo a quantidade de luz absorvida relacionada com sua espessura ou com os próprios constituintes do meio⁸. O equipamento separa a luz em feixes com diferentes comprimentos de onda e desta maneira, é possível passar através da amostra um feixe de luz monocromática. O espectrofotômetro permite-nos saber a quantidade de luz absorvida a cada comprimento de onda, baseando-se na absorção da radiação nos comprimentos de onda entre o ultravioleta e o infravermelho^{9, 10}.

Quando a radiação eletromagnética incide sobre certos tipos de molécula, estas absorvem apenas a radiação com comprimentos de onda cujas energias correspondem às transições eletrônicas permissíveis. Cada molécula, portanto, possui um espectro de absorção de luz característico, que pode permitir a sua identificação^{11, 12}.

Os fatores determinantes da absorção constituem a espessura da camada absorvedora, a constituição eletrônica dos átomos e moléculas, a temperatura e

concentrações dos agentes absorvedores. Nos tecidos biológicos, os principais absorvedores são a água e as macromoléculas (proteínas e pigmentos)¹³.

1.2. Fotobiomodulação

A fotobiologia incluiu todos os fenômenos biológicos que envolvem a radiação não ionizante. As respostas fotobiológicas são o resultado das mudanças químicas e/ou físicas induzidas nos sistemas biológicos pelos fótons. A radiação não ionizante produz estados excitados em moléculas devido à absorção de um ou mais fótons. Moléculas excitadas podem reagir com moléculas adjacentes, mas frequentemente elas sofrem mudanças fotoquímicas e fotofísicas dentro de sua própria estrutura molecular.¹⁴

A Primeira Lei da Fotoquímica estabelece que “a luz deve ser absorvida antes de a fotoquímica ocorrer”. Entendendo o espectro de absorção de uma molécula, pode-se dizer quais comprimentos de onda podem ter um efeito fotoquímico e também quais comprimentos de onda não terão efeito fotoquímico algum (CHAMPMAN, 1924)¹⁴. A Segunda Lei da Fotoquímica afirma que para cada fóton absorvido por um sistema químico, apenas uma molécula é ativada pela reação fotoquímica (PLOTNIKOW, 1926)^{15,16}. A Lei de Bunsen-Roscoe da Reciprocidade, ou Terceira Lei da Fotoquímica, determina que um efeito fotoquímico é diretamente proporcional à energia total, independentemente do tempo necessário para entregar tal energia (PLOTNIKOW, 1926)¹⁵.

A fotobiomodulação utiliza a radiação não ionizante na faixa visível do espectro eletromagnético (400 a 760 nm) e na faixa infravermelha (760 a 1000 nm). Quando um fóton é absorvido por uma molécula, os elétrons da molécula são levados a um estado energético mais elevado. A molécula excitada precisa perder essa energia excedente e pode fazer isso emitindo novamente um fóton de comprimento de onda maior na forma de fluorescência, ou pode perder a energia liberando calor ou pode, ainda, perder a energia por meio da fotoquímica. Desta maneira, as respostas fotobiológicas procedem das mudanças fotoquímicas e/ou fotofísicas produzidas pela absorção da radiação não ionizante, não havendo fluorescência, muito menos aquecimento do alvo biológico.⁷

Há cinco mecanismos primários de ação que são propostos como resultado da fotoexcitação de estados eletrônicos: mudanças nas propriedades redução dos

componentes da cadeia respiratória após excitação; liberação de óxido nítrico (NO) do centro catalítico do citocromo c oxidase; formação de oxigênio singleto; aquecimento transitório local de cromóforos absorvedores e aumento da produção do ânion superóxido com aumento subsequente na concentração dos produtos de sua dismutação, como por exemplo H₂O₂.¹⁵

Fotobiomodulação significa bioestimular ou bioinibir, dependendo das condições do tecido alvo e dos parâmetros dosimétricos da radiação óptica. É conhecida por acelerar o processo de reparo tecidual, proliferação celular, reduzir o processo inflamatório, auxiliar na regeneração neurológica, promover a microcirculação vascular e linfática, modular o sistema imunológico e reduzir a dor. Independentemente dos mecanismos de interação, a FBM não pode causar efeitos térmicos ao alvo biológico.^{6, 16}

Os parâmetros dosimétricos para a FBM são: Potência Média (determina quantos fótons são emitidos pelo equipamento entre o pico e o zero), Área (espaço delimitado no alvo biológico no qual os fótons incidirão), Irradiância (potência média incidente na superfície do alvo), Energia (medida de quanto tempo o alvo biológico sustenta a dissipação da potência média), Exposição Radiante (energia incidente na superfície do alvo biológico), Tempo de Exposição (período de tempo em que os fótons incidirão na superfície do alvo biológico).

A palavra LASER corresponde a uma sigla composta pelas primeiras letras de light amplification by stimulated emission of radiation, a qual significa “amplificação da luz por emissão estimulada de radiação”. Conhecendo a capacidade do laser de proporcionar ao organismo uma melhor resposta à inflamação, com conseqüente redução de edema, minimização da sintomatologia dolorosa e biomodulação celular, a terapia a laser apresenta-se como uma alternativa para processos que apresentem reação inflamatória, dor e necessidade de regeneração tecidual.¹⁷

Os lasers tem sua capacidade de fornecer luz monocromática. Uma alternativa aos lasers são os LEDs, que foram inicialmente desenvolvidos pela NASA para o crescimento experimental de plantas no espaço.¹⁸ As matrizes de LED podem ser estruturadas em vários tamanhos para acomodar grandes áreas e não emitir calor, o que elimina o efeito térmico desta ferramenta¹⁹. A luz emitida por matrizes de LED com comprimentos de onda ideais penetra na pele e nos tecidos a uma profundidade de aproximadamente 1,2 cm. A penetração do laser é igual à

penetração com LED, desde que ambos tenham o mesmo comprimento de onda e atuem no mesmo tecido.^{20,7}

A primeira lei da fotobiologia afirma que para a luz visível ter qualquer efeito em um sistema biológico vivo, os fótons devem ser absorvidos por bandas de absorção eletrônica pertencentes a algumas moléculas fotoreceptoras ou cromóforos²¹.

Uma reação fotobiológica envolve a absorção de fótons em um certo comprimento de onda de luz por moléculas especializadas chamadas fotorreceptoras. Diante da luz absorvida com determinado comprimento de onda, essas moléculas assumem um estado excitado eletronicamente nos processos moleculares primários que desencadeiam efeitos biológicos em determinadas circunstâncias²¹. Exemplos desses cromóforos presentes nas células podem ser encontrados na clorofila, hemoglobina, citocromo c oxidase (Cox), mioglobina, flavinas, flavoproteínas e porfirinas.²²

Existe uma “janela óptica” no tecido, onde a efetividade da penetração da luz no tecido é maximizada. Esta janela óptica é executada aproximadamente de 600 nm a 1000 nm^{23,24}.

A fototerapia é caracterizada por sua capacidade de induzir efeitos fotobiológicos nas células^{25,26}. São necessárias análises dos espectros de ação exatos para a determinação dos fotoreceptoras, bem como para investigações sobre os mecanismos celulares da fototerapia.

Comprimentos de onda ideais e densidades de energia são necessárias para as intervenções terapêuticas. Os comprimentos de onda na faixa do vermelho ao infravermelho (630–1000 nm) juntamente com uma densidade de energia mínima de 4J/cm² são comprovadamente eficazes em estimular processos biológicos.²⁰

As mitocôndrias desempenham um papel importante na geração de energia e na manutenção do metabolismo celular²⁸. As mitocôndrias são algumas vezes descritas como “usinas celulares” porque convertem moléculas de alimentos em energia na forma de adenosina trifosfato (ATP) através do processo de fosforilação oxidativa²⁸. O mecanismo da FBM na célula foi atribuído à absorção de radiação monocromática visível e por compostos da cadeia respiratória celular²⁹. Várias hipóteses sugerem que as mitocôndrias são responsáveis pela resposta celular à FBM no espectro vermelho visível.

Dentre os cromóforos celulares, estão incluídos melanina, porfirina, hemoglobina e citocromo c oxidase ²⁵. Os espectros de absorção obtidos para o citocromo c oxidase (Cox) em diferentes estados de oxidação foram registrados e considerados muito semelhantes aos espectros de ação para respostas biológicas à luz 27. Portanto, foi proposto que Cox é o fotoreceptor primário para o faixa 620-750nm em células de mamíferos ²⁷. O óxido nítrico (NO) produzido nas mitocôndrias pode inibir a respiração celular por ligação a Cox e deslocamento competitivo de oxigênio, especialmente em situações estressantes ou em células sob hipóxia. ³⁰ Propuseram que a FBM poderia funcionar foto-dissociando o NO do Cox, revertendo a inibição mitocondrial da respiração devido ao excesso de NO ³¹.

Embora o mecanismo da FBM ainda não esteja completamente consagrado nos estudos *in vitro*, os experimentos com animais e estudos clínicos indicam que a FBM administrada em doses baixas pode produzir um melhor resultado quando comparado com a mesma luz fornecida em altas doses. Já foi observado que a FBM pode prevenir a apoptose celular e melhorar a proliferação, migração e adesão celular quando aplicada em baixas doses de energia. ³²

Estudos já demonstraram que a FBM atua na modulação da proliferação de fibroblastos, síntese de colágeno e pro-colágeno, angiogênese, estimula a resposta imunológica além de melhorar o metabolismo celular via mitocôndria ³³. Além disso, a FBM é capaz de induzir a expressão do fator de crescimento de queratinócitos (KGF), fator de transformação do crescimento β (TGF- β) e fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), favorecendo o processo de reparo tecidual ²⁰.

A FBM tem um efeito bifásico e efeito dependente do comprimento de onda 34. Acredita-se que o efeito bioestimulador esteja ligado ao aumento da produção de ATP, e o efeito bioinibitório tem sido associado ao estresse oxidativo devido às espécies reativas de oxigênio (EROs) ^{34,35}.

Alguns estudos já demonstraram o efeito bioestimulador da FBM em modelos *in vitro*. De Villers et al. (2011) observaram que células-tronco derivadas de adiposo humano (hADSCs) apresentaram um aumento significativo da proliferação celular após 48h da irradiação com exposição radiante de 5J/cm² no comprimento de onda de 636nm. Em um estudo sobre diabetes, células de fibroblastos da pele humana apresentaram aumento na proliferação e na viabilidade celular após tratamento com FBM com um comprimento de onda de 830 nm e exposição radiante de 5, 10 e 15J/cm², enquanto que nenhuma mudança significativa pode ser observada quando

o comprimento de onda de 680 nm foi utilizado com as mesmas exposições radiantes.³⁶ A dependência da exposição radiante foi observada nas células neoplásicas EMT-6 e RIF-1, derivadas respectivamente de adenocarcinoma mamário e fibrosarcoma, quando a FBM foi utilizada com comprimento de onda de 632,8 nm e exposição radiante de 180mJ/cm². Houve aumento da proliferação celular neste parâmetro enquanto que exposições radiantes mais elevadas, variando de 400 a 600mJ/cm² foram capazes de promover inibição do crescimento celular ³⁷.

1.3. Déficit Nutricional

Sob condições de estresse, vários tipos de células parecem ser mais sensíveis aos efeitos da FBM, tendo suas características regenerativas potencialmente mais estimuladas por essa terapia³⁸. Os mecanismos de estresse celular podem variar com o déficit nutricional do meio de cultura, ou seja, a diminuição da concentração de soro fetal bovino (SFB).³⁹

Em um estudo feito para analisar o efeito FBM em fibroblastos gengivais humanos, foi observado que as células cultivadas em condições de déficit nutricional (cultivadas em meio suplementado por apenas 5% de FBS) apresentaram uma taxa de proliferação celular menor que as células cultivadas em condições de cultura ideais (10% de FBS). No entanto, quando irradiadas, as células em déficit nutricional apresentaram crescimento celular semelhante ou maior do que a das células de controle cultivadas em condições de cultura ideais¹¹.

Outro estudo teve como objetivo analisar os efeitos da irradiação com laser na integridade e viabilidade de células-tronco de dentes decíduos esfoliados humanos (SHED) que foram mantidos em inanição sérica ⁴⁰. O déficit nutricional foi utilizado para imitar as condições de estresse celular do isolamento de SHED para abordagens dentárias regenerativas, nas quais a terapia a laser pode ser benéfica. As SHED foram cultivadas sob déficit nutricional (MEM α + 1% FBS) por 1 ou 24 h antes da irradiação. Em seguida, as células receberam FBM a 660 nm, 2,5 J/cm² (0,10 W), 5,0 J / cm² (0,20 W), 7,5 J / cm² (0,30 W) ou permaneceram não irradiadas. Durante a irradiação, as células foram mantidas em 1% de FBS ou 10% de FBS (condições normais de cultura). A integridade da membrana foi avaliada quantificando a liberação de lactato desidrogenase (LDH) (imediatamente após irradiação) e a viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio MTT (24, 48 e 72 h após a

irradiação). O déficit nutricional não alterou a liberação de LDH pelas SHED não irradiadas, enquanto a liberação de LDH diminuiu significativamente nos grupos irradiados e cultivados com 1% FBS mas não nos grupos irradiados em 10% de FBS, independentemente das condições de pré-irradiação. A viabilidade celular foi significativamente maior 24 horas após a irradiação na maioria dos grupos. Por outro lado, a viabilidade celular permaneceu praticamente inalterada nos grupos cultivados 24 horas em déficit nutricional. Desta maneira, conclui-se que a FBM contribuiu para manter a integridade da membrana nas SHED submetidas ao déficit nutricional antes e durante a irradiação com 0,10 ou 0,30 W. ⁴⁰

No estudo realizado por Souza et al. (2018) ⁴¹, foi investigado o efeito de diferentes doses de irradiação na viabilidade e proliferação de células-tronco de dentes decíduos esfoliados (SHED) cultivados sob déficit nutricional (estresse celular) ou condições nutricionais regulares. As células foram irradiadas com laser em comprimento de onda 660 nm exposição radiante entre 1,2 e 6,2 J/cm². Antes da irradiação, todos os grupos receberam meio de cultura suplementado com 1% de soro fetal bovino (SFB) por 1 h. Após a irradiação, as células receberam MEM α suplementado com 10% de SFB (nutrição regular) ou 1% da SFB (déficit nutricional). A viabilidade e proliferação celular foram respectivamente determinadas por MTT e por cristal violeta 6 e 24 h após irradiação. Após 24 horas, as células SHED com déficit nutricional mostraram menor viabilidade após irradiação com 1,2 J/cm². Todos os grupos irradiados revelaram viabilidade e proliferação significativamente maiores nas SHED mantidas sob déficit nutricional do que nas condições nutricionais regulares, exceto nos grupos 3,7 e 6,2 J/cm². Quando avaliadas por cristal violeta, as SHED irradiadas com 1,2 J/cm² não mostraram diferença em relação à proliferação celular entre as diferentes concentrações de FBS. Assim, a diminuição da concentração de FBS no meio de cultura parece aumentar a sensibilidade das SHED aos efeitos FBM.

Adicionalmente, SHEDs cultivadas com 15% de FBS ou 5% de FBS e irradiadas com laser InGaAIP (660 nm) duas vezes com intervalo de 6h com 3 J/cm² ou 5 J/cm² foram avaliadas em relação à viabilidade celular imediatamente após a segunda irradiação e após 24h, 48h e 72h. Foi observado que as SHED cultivadas com 5% de FBS e irradiadas com 3 J/cm² apresentaram maior viabilidade celular quando comparado com o grupo não irradiado e cultivado com a mesma concentração de FBS. Além disso, as células cultivadas com 5% de FBS e

irradiadas com 5 J/cm^2 mostraram viabilidade semelhante à observada no grupo cultivado com 15% de FBS e não irradiado. Esses achados indicam que a FBM com 5 J/cm^2 pode aumentar o crescimento de SHEDs durante situações de deficiência. Portanto, a FBM pode ser um tratamento auxiliar valioso na engenharia de tecidos ao usar células-tronco derivadas da polpa dentária de dentes decíduos.⁴²

Para analisar o efeito da LLLT na proliferação in vitro de fibroblastos gengivais, o estudo desenvolveu uma cultura primária de fibroblastos gengivais humanos. A linhagem celular chamada LMF foi cultivado com 5% de FBS (déficit nutricional) ou 10% de FBS. A irradiação com laser foi realizada com lasers de diodo com os seguintes comprimentos de onda: 670 nm (L1), 780 nm (L2), 692 nm (L3) e 786 nm (L4). A exposição radiante foi fixada em 2 J/cm^2 . Após a irradiação, foi observado que células cultivadas em déficit nutricional (5% FBS) apresentaram uma taxa de proliferação celular significativamente menor em relação às células cultivadas em condições ideais de cultura (10% FBS). No entanto, quando irradiadas, as células em déficit nutricional apresentaram crescimento celular semelhante ou superior ao de células de controle cultivadas em condições ideais de cultura. No entanto, lasers de potência igual apresentaram efeito semelhante no crescimento celular independentemente do comprimento de onda. Assim a FBM atuou melhorando a viabilidade in vitro de fibroblastos e o menor tempo de exposição ao laser resulta em maior proliferação.¹¹

Em 2010, Tagliani et al.³⁸ avaliaram os efeitos da irradiação de laser de baixa potência ($1,5 \text{ J/cm}^2$, 100mW, 1 min e 20 s) em odontoblastos sob estresse nutricional. As células foram incubadas por 24 horas em condições nutricionais ideais (10% de SFB), e posteriormente, o meio de cultura foi suplementado com menores concentrações de SFB (2% e 5%), induzindo condições de estresse celular. A irradiação foi realizada com laser infravermelho (808nm) três dias consecutivos com intervalo de 24 horas. Os ensaios utilizados após a irradiação para analisar o metabolismo e morfologia celular foram o MTT e MEV (microscopia eletrônica de varredura), respectivamente.²² Os autores concluíram que houve aumento do metabolismo celular de células mantidas em condição de déficit nutricional com 5% de SFB, sendo considerado um método adequado para a bioestimulação do tipo celular avaliado.²²⁻²³

Volpato et al. (2011)³⁹ analisaram a viabilidade de fibroblastos sob estresse celular irradiados com laser vermelho (660 nm, 40 mW, 1 W/cm^2), infravermelho

(780nm, 40 mW, 1 W/cm²) e LED (637 ± 15 nm, 40 mW, 1 W/cm²). Os parâmetros utilizados mostraram que a fototerapia estimulou a viabilidade de fibroblastos cultivados em déficit nutricional especialmente no grupo irradiado com o laser infravermelho.

Em 2017, Ginani¹⁰ et al. utilizaram células-tronco derivadas de polpa de dente decíduo cultivadas sob déficit nutricional e em condições ideais para avaliar o efeito do laser vermelho de baixa potência InGaAlP (660 nm, 40 mW e 10J/cm²) e infravermelho (780 nm, 40 mW e 10 J/cm²) durante 4 e 8 segundos, nos períodos de 24, 48 e 72 horas. A fototerapia foi realizada com intervalo de 6 horas entre as irradiações. Células não irradiadas mantidas em meios de cultura (DMEM) suplementado com 10% de SFB e 5% de SFB foram consideradas controle positivo e negativo, respectivamente. Foi observado que o laser de baixa potência (660 nm e 780 nm) estimulou significativamente a viabilidade e proliferação das SHED em ambas condições nutricionais nos períodos de 24, 48 e 72 horas.

Desta maneira, o estado nutricional de linhagens celulares utilizadas em diferentes ensaios *in vitro* interfere na resposta celular após fotobiomodulação, sendo esta ferramenta capaz de estimular a viabilidade celular neste contexto. Possivelmente, alterações no espectro de absorção dos fótons podem estar associadas à resposta positiva das células em déficit nutricional frente à fotobiomodulação.

1.4. Carcinoma epidermóide

Segundo os dados coletados pelo INCA (Instituto Nacional de Câncer) em 2018, o câncer de boca é a quinta neoplasia maligna mais frequente em homens. No Brasil, é a sétima mais presente em mulheres. Entre os vários tipos de câncer que afetam a cavidade oral, o carcinoma epidermóide de boca (CEB) é a neoplasia maligna de maior prevalência, correspondendo à cerca de 90% dos casos.⁴³

Os fatores de risco mais importantes para o desenvolvimento do carcinoma epidermóide oral (CEO) são tabaco e consumo de álcool, e particularmente para os casos em orofaringe, a infecção pelo Papiloma Vírus Humano de alto risco (HPV-16)⁴⁴. O CEB desenvolve-se a partir da camada basal do epitélio oral e evidências mostram que tanto células-tronco epiteliais, células progenitoras de amplificação transiente quanto células em estágios iniciais de diferenciação podem ser alvos das

mutações genéticas que culminam com a transformação maligna e desenvolvimento desta neoplasia ⁴⁵.

Lesões potencialmente malignas antecedem o aparecimento do CEB, embora haja dificuldade no acompanhamento e diagnóstico destas lesões em decorrência da ausência de sintomatologia⁴⁶. Microscopicamente, são caracterizadas pela presença de dispasia epitelial de diferentes graus, mostrando alterações celulares e arquiteturais do tecido epitelial ⁴⁷.

A maioria dos pacientes com CEB são diagnosticados com doença localmente avançada, na qual já há metástases para linfonodos regionais, o que está associada com uma mortalidade de 90% dos pacientes e taxa de sobrevida em 5 anos de 40-50% ^{48,49}. O tratamento do CEB é desafiador e determinado de acordo com o estágio da doença, sendo a cirurgia aliada à radioterapia as terapias mais utilizadas.

Nos casos de estágio avançado da doença, a quimioterapia também é empregada, embora haja elevada citotoxicidade e discreta melhora na sobrevida dos pacientes^{48,49,50}. Apesar dos avanços obtidos nas últimas décadas em relação ao tratamento do CEB, aproximadamente 50% dos pacientes apresentam recidivas, às quais estão associadas à elevada agressividade e resistência ao tratamento⁵¹.

Tanto a radioterapia quando as quimioterapias estão associadas com efeitos colaterais agudos, crônicos e infecciosos. As complicações agudas mais comuns são irritação cutânea e mucosite. Dentre as manifestações crônicas encontram-se a dor ou sensibilidade, limitação do movimento ou trismo, alterações do fluxo salivar e xerostomia, alteração do paladar e halitose. As manifestações de carácter infeccioso podem ser cáries, infecções periodontais e halitose. Como resultado, os pacientes podem apresentar episódios de vômitos, diarreia, depressão e desnutrição afetando o prognóstico e qualidade de vida do paciente ^{52,53}

A mucosite oral (MO), orofaríngea, faríngea e de outras áreas do trato gastrointestinal em pacientes com CEB submetidos a radioterapia associada ou não à quimioterapia, representa um dos efeitos colaterais mais debilitantes e frequentes do tratamento oncológico, afetando profundamente a qualidade de vida. Pacientes com MO apresentam dor, sangramento, disfagia, infecções e comprometimento da ingestão de alimentos ⁵⁴. Acomete aproximadamente 40% dos pacientes submetidos à quimioterapia e praticamente 100% dos pacientes submetidos à radioterapia irão desenvolver algum grau de MO durante o tratamento ⁵⁵.

Estudos recentes têm demonstrado que a FBM possui efeito benéfico na prevenção e no tratamento da mucosite oral, provendo o reparo tecidual e redução da dor, aumentando desta maneira o conforto para a alimentação e a continuidade ao tratamento oncológico⁵⁶. Elad et al. (2018)⁵⁷ demonstraram que os parâmetros recomendados para o tratamento da MO correspondem ao comprimento de onda entre 633 e 685 nm ou 780 - 830 nm, potência entre 10 e 150mW, densidade de energia de 2-3 J/cm² e não mais que 6 J/cm², evitando-se sempre local da neoplasia maligna.

A FBM com 660 nm mostrou-se eficaz na prevenção e tratamento da MO em pacientes com câncer de cabeça e pescoço submetidos a radioterapia e quimioterapia quando aplicada duas vezes por semana com laser de diodo (comprimento de onda 660 nm, potência de 30mW e energia de 2J por ponto, durante 07 semanas). Foi observada que a maioria dos pacientes do grupo FBM não apresentou MO ou dor, mas todos os pacientes do grupo controle apresentaram MO variando do Grau 1 ao 3 associada à dor. Gautam et al. (2012)⁵⁸ avaliaram o efeito da FBM em pacientes com câncer de cabeça e pescoço submetidos à radioterapia e quimioterapia com comprimento de onda 632,8 nm, densidade de potência 24 mW, energia por ponto 3 J, dose total por sessão de 36-40J, 5 sessões por semana durante 7 semanas). Os autores observaram diminuição significativa do grau de mucosite, dor, disfagia e necessidade no uso de opióides em comparação com o grupo controle.

Antunes et al. (2017)⁵⁹ avaliaram a eficácia da FBM na redução da incidência de MO de grau 3-4 em pacientes com câncer de cabeça e pescoço submetidos à radioterapia e quimioterapia. Foi utilizado durante 5 dias consecutivos, o Laser de diodo InGaAlP (660 nm, 100 mW, 1J por ponto – 4J/cm²), por 7 semanas. Constatou-se, após a avaliação realizada pelas escalas da Organização Mundial da Saúde (OMS), uma diminuição de seis vezes maior na incidência de mucosite graus 3-4 no grupo FBM quando comparado ao placebo.

Carvalho et al (2013)⁶⁰, observou a redução da sintomatologia dolorosa bem como do grau de mucosite oral em pacientes com câncer de cabeça e pescoço submetidos à radioterapia foram tratados profilaticamente com dois protocolos de FBM: 660nm, 15 mW, 3,8 J/cm² e 660nm, 5mW, 1,3 J/cm². Ao término do tratamento; pacientes submetidos ao primeiro protocolo obtiveram redução significativa da dor e controle no desenvolvimento de mucosite, a qual permaneceu

em grau 2 durante todo o tratamento. Por outro lado, pacientes que receberam o segundo protocolo de FBM, com menor potência e exposição radiante, não apresentaram redução significativa da dor bem como do grau de mucosite oral. Desta maneira, os parâmetros dosimétricos da FBM são fundamentais para que os efeitos de analgesia e reparo sejam alcançados no tratamento da mucosite oral.

Embora a FBM tenha se mostrado eficaz na prevenção e tratamento da MO, a literatura aponta que a FBM pode tanto ter efeito adverso em células tumorais em estudos *in vitro*, favorecendo a progressão tumoral e/ou recidiva quando efeito inibitório.

Os efeitos da FBM nas células dependem do tipo celular, estado redox e parâmetros dosimétricos, incluindo comprimento de onda, densidade de potência e tempo de exposição⁶¹. Assim, para que a FBM seja eficaz, os parâmetros de irradiação, incluindo a energia fornecida, densidade de potência, estrutura de pulso entrega no local anatômico, tempo e repetição adequados do tratamento precisam estar dentro da janelas bioestimulatória ^{62,63}

Os efeitos do FBM na proliferação e diferenciação celular foram investigados *in vitro* usando linhagens celulares malignas, gerando dados conflitantes em diferentes linhagens de células tumorais e parâmetros de FBM ⁶⁴. Por exemplo, Kreisler et al. (2003)⁶⁵ relataram proliferação de células de carcinoma da laringe após irradiação com laser de GaAIs com densidades de energia entre 1,96 e 7,84 J / cm². No trabalho de Werneck et al. (2005)⁶⁶ também foi observado aumento na proliferação celular de células de carcinoma HEp2 após exposição a FBM em diferentes comprimentos de onda (685 e 830 nm) e doses. Em um estudo comparando FBM administrada a osteoblastos normais e para células de osteossarcoma com diferentes comprimentos de onda e doses, apenas 10J /cm² e comprimento de onda de 830 nm foi capaz de aumentar a proliferação de osteoblastos, enquanto as densidades de energia de 1, 5 e 10 J / cm² e 780 nm diminuiu a proliferação. As células de osteossarcoma não foram afetadas pela irradiação com FBM com 830 nm, enquanto o laser de 670 nm teve um efeito proliferativo discreto.

Embora certas doses de FBM aumentaram a proliferação de células de carcinoma da mama, múltiplas exposições mostraram-se associadas com ausência de efeito ou inibição da proliferação ⁶⁷ FBM com comprimento de onda 660 nm e 1J/cm² foi capaz de aumentar a proliferação *in vitro* e aumentou o potencial invasivo

das células carcinoma epidermóide de língua ⁵⁶. Da mesma forma, outro estudo *in vitro* sugeriu que a FBM (660 ou 780 nm, 40 mW, 2,05, 3,07 ou 6,15 J / cm²) pode estimular células displásicas e linhagens celulares derivadas de carcinoma epidermóide bucal ⁶⁷.

No estudo realizado por Sperandio et al. (2013)⁶⁸, células das linhagens DOK, SCC9 e SCC25 derivadas de CEB foram irradiadas uma única vez com laser em baixa intensidade (potência 40mW), diferentes exposições radiantes (2,05J/cm², 3,07J/cm², 6,15J/cm²) e comprimento de onda vermelho (660nm) e infra-vermelho (780nm). Foram observados efeitos distintos dependendo da linhagem, sendo que a linhagem DOK, derivada de displasia epitelial, obteve aumento de viabilidade celular em todos os parâmetros bem como aumento da expressão de β -catenina e pS6. A linhagem SCC9, por outro lado, demonstrou sua viabilidade reduzida com o comprimento de onda vermelho, expressando um aumento de Akt, β -catenina e pS6 em todos os parâmetros, após um período de 12 horas. A linhagem SCC25 apresentou redução de sua viabilidade apenas com a exposição radiante de 3,07J/cm² e aumento na expressão das proteínas Akt, pS6 e ciclina D1 bem como menor taxa de apoptose. Com base nestes resultados, sugere-se que a via Akt/mTOR/CiclinaD1 pode ser ativada durante a exposição aos parâmetros dosimétricos utilizados.

Gomes Henrique et al. (2014) ⁶⁷ demonstraram que as células SCC25, derivadas de carcinoma de células escamosas, irradiadas em microplacas (imediatamente e 24 horas após a galvanização) no comprimento de onda 660 nm, potência de 30 mW e dose de 1 J / cm² demonstrou maior proliferação em comparação com os as células não irradiados após 24, 48 e 72 h. Schartinger et al. (2011)⁶⁹ encontraram uma redução na viabilidade através do ensaio de MTT, das células SCC25 usando laser de 660 nm com potência de 350 mW por 15 min em três sessões com intervalos de 24 horas.

Levando em consideração que a avaliação da absorvância em modelos *in vitro* é fundamental para que o correto comprimento de onda seja selecionado e utilizado para investigar os efeitos da FBM tanto no comportamento celular quanto molecular de células alvo, bem como considerando que diferentes condições nutricionais interferem na resposta à FBM, é necessária a realização de estudos que investiguem o espectro de absorção de linhagens celulares cultivadas sob estresse

nutricional para o entendimento da relação entre o efeito físico e a resposta biológica da célula frente a FBM.

Neste contexto, devido à controvérsia na literatura em relação ao efeito da FBM no CEB e à escassez de estudos que investigaram o espectro de absorção de linhagens celulares submetidas ao estresse nutricional e à FBM, este estudo se propôs a avaliar a absorbância e a viabilidade de linhagens celulares derivadas de CEB bem como de queratinócitos imortalizados de pele, fibroblastos e células displásicas cultivadas sob estresse nutricional e irradiadas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais:

Avaliar a absorção das linhagens celulares: HaCAT, DOK, CA1, LUC4, SCC9 e fibroblasto de polpa de dente decíduo antes e depois da irradiação e com diferentes concentrações de SFB.

2.2. Objetivos Específicos:

- a. Analisar o espectro de absorção das linhagens acima cultivadas em diferentes concentrações de soro antes e após a irradiação.
- b. Avaliar a viabilidade celular por MTT das células cultivadas com diferentes concentrações de soro, irradiadas ou não.

3.MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Cultivo celular

Neste estudo, selecionamos linhagens celulares que representam os constituintes celulares do tecido epitelial e conjuntivo que formam a mucosa oral, bem como células displásicas e células derivadas de carcinoma epidermóide oral como um modelo *in vitro* para estudar o efeito de diferentes concentrações de FBS no espectro de absorção. Este modelo *in vitro* foi selecionado pois permite que seja avaliado o efeito tanto da FBM quanto do estresse nutricional em queratinócitos imortalizados, displásicos e malignos, bem como em fibroblastos, permitindo um entendimento de como ambos afetam a absorbância e a viabilidade celular. Adicionalmente, o parâmetro de irradiação descrito abaixo foi selecionado baseando-se em achados prévios do grupo de pesquisa no qual foi observado redução da viabilidade celular nas células tumorais. Além disso, é o parâmetro da FBM que as células da mucosa oral estão sujeitas quando pacientes com CEB que desenvolvem mucosite são tratados com esta terapia.

A linhagem celular HaCAT (Figura 1A), derivada de queratinócito imortalizado de pele foi cultivada em DMEM suplementado com 1% antibiótico/antimicótico e 10% de SFB.

A linhagem celular DOK (Figura 1B), derivada de displasia oral, foi cultivada em DMEM suplementado com 1% antibiótico/antimicótico, 10% de SFB e 5ug/ml de hidrocortisona.

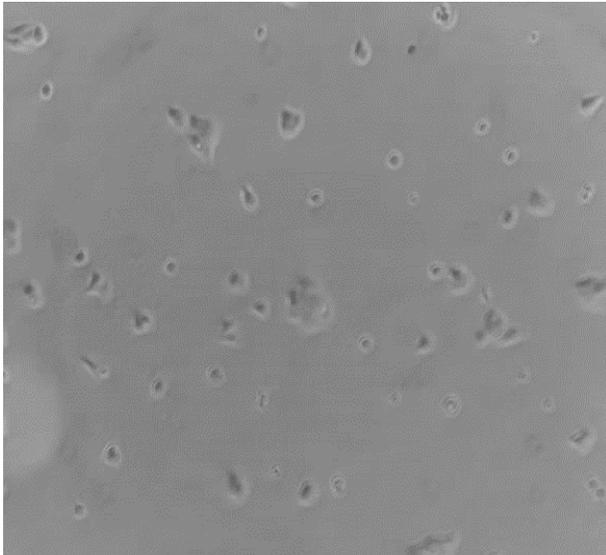
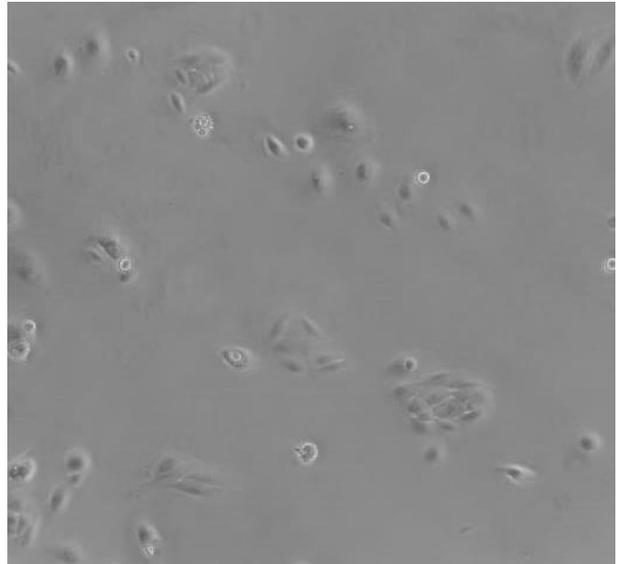
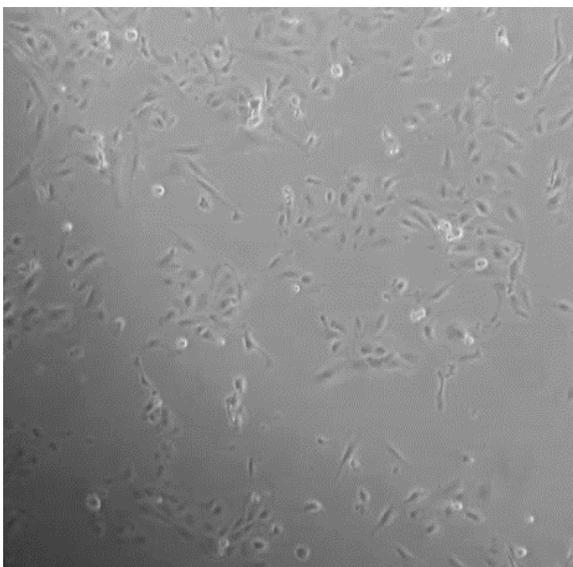
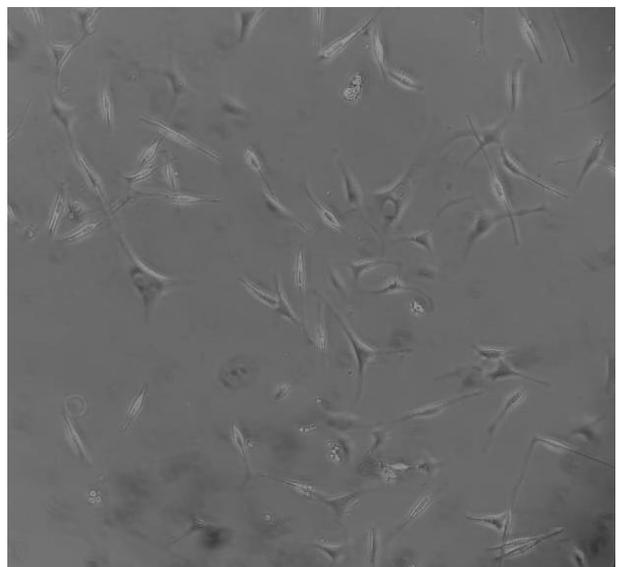
As linhagens celulares CA1 (Figura 1F) e LUC4 (Figura 1D), derivadas de carcinoma epidermóide de boca, gentilmente cedidas pelo Prof. Ian Mackenzie (Barts and The London School of Medicine and Dentistry) foram cultivadas em meio DMEM-F12 (Gibco Thermofisher, EUA) suplementado com 1% antibiótico/antimicótico (Vitrocell, Brasil), 10% de Soro Fetal Bovino (SFB- Vitrocell, Brasil), 2 µg/ml de isoproterenol (Sigma-Aldrich), 10ng/mL de EGF (Millipore, EUA) e 1% de suplemento RM+ (conforme descrito por Mackenzie, 2004).

A linhagem SCC9 (Figura 1C) derivada de carcinoma epidermóide de boca (American Type Culture Collection) foi cultivada em meio DMEM-F12 suplementado

com 1% antibiótico/antimicótico, 10% de SFB e 400ng/ml de hidrocortisona (Sigma-Aldrich).

Os fibroblastos (Figura 1E), isolados de polpa de dente decíduo humano foram cultivados em DMEM-F12 suplementado com 1% de antibiótico/antimicótico, 10% de SFB e 1% de aminoácidos não essenciais (Gibco).

Todas as linhagens celulares foram cultivadas em placas de 60mm para cultivo celular e incubadas a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO₂. As culturas celulares foram monitoradas diariamente e subcultivadas quando atingiram uma confluência de 70-80%.

A**B****C****D**

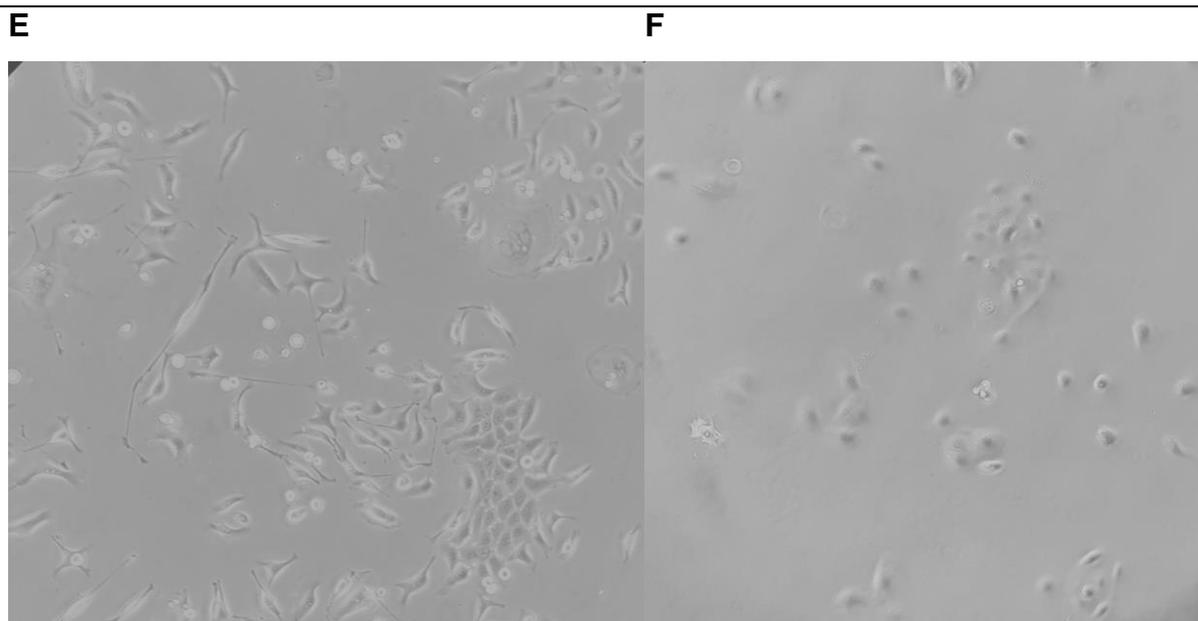


Figura 1: Imagem representativa da linhagem HaCAT (A), DOK (B), SCC9 (C), LUC4 (D), fibroblastos (E) e CA1 (F).

3.2 Grupos de estudo

3.2.1 Avaliação do estresse nutricional no espectro de absorção

As linhagens celulares CA1, LUC4, SCC9, HACAT, DOK e fibroblastos foram cultivadas em condições ideais e 7×10^4 células de cada linhagem foram colocadas em placas de cultivo de 35mm, sendo divididas nos seguintes grupos de estudo para avaliação do estresse nutricional:

- **0% FBS:** células cultivadas com meio sem FBS.
- **5% FBS:** células cultivadas com meio contendo 5% de FBS.
- **10% FBS:** células cultivadas com meio contendo 10% de FBS.

3.2.1 Avaliação do estresse nutricional e da FBM no espectro de absorção

As linhagens celulares SCC9, HACAT e DOK foram cultivadas em condições ideais e 7×10^4 células foram colocadas em placas de cultivo de 35mm, sendo divididas nos grupos descritos abaixo.

48h de deficit nutricional e 24h após FBM:

- **0% FBS:** células cultivadas com meio sem FBS.
- **0%FBS + LED1 :** células cultivadas com meio sem FBS e irradiação única.
- **5%FBS:** células cultivadas com meio contendo 5% de FBS.
- **5%FBS + LED1:** células cultivadas com meio contendo 5% de FBS e irradiação única.
- **10% FBS:** células cultivadas com meio contendo 5% de FBS.
- **10% FBS + LED1:** células cultivadas com meio contendo 10% de FBS e irradiação única.

96h de deficit nutricional e 24h após FBM:

- **0% FBS:** células cultivadas com meio sem FBS.
- **0%FBS + LED3:** células cultivadas com meio sem FBS e irradiação diária por três dias consecutivos.
- **5% FBS:** células cultivadas com meio contendo 5% de FBS.
- **5%FBS + LED3:** células cultivadas com meio contendo 5% de FBS e irradiação diária por três dias consecutivos.
- **10% FBS:** células cultivadas com meio contendo 5% de FBS.
- **10% FBS + LED3:** células cultivadas com meio contendo 10% de FBS e irradiação diária por três dias consecutivos.

3.3 Estresse nutricional

Após 24 horas do plaqueamento celular, o meio foi removido e as células foram lavadas duas vezes com solução tampão fosfato (PBS pH 7,4). Em seguida, foi adicionado meio de cultura específico de cada linhagem acrescido das diferentes concentrações de SFB descritas acima.

Nos grupos submetidos somente à avaliação do estresse nutricional, as células foram incubadas por 24h e após este período, o meio de cultura foi removido, sendo adicionada tripsina 0,05% (ThermoFisher). Um total de 5×10^4 foram ressuspensas em 1,5 mL de PBS para análise da absorbância.

Nos grupos submetidos à avaliação do estresse nutricional e da FBM, para a medição do espectro de absorção, as células foram incubadas por 48h e 96h nos

grupos LED1 e LED3, respectivamente (Figura 1). Em seguida, 5×10^4 foram ressuspensas em 1,5 mL de PBS para análise da absorbância.

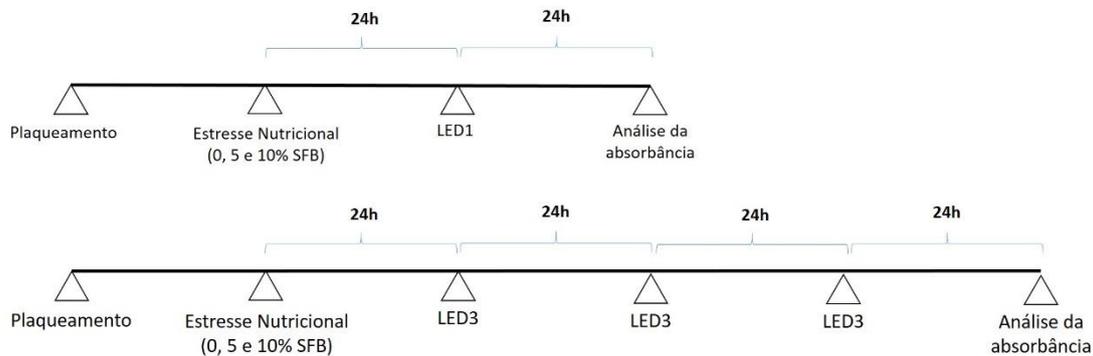


Figura 2: Esquema representativo da cronologia experimental para avaliação do efeito do estresse nutricional e da FBM única (LED1) ou diária por três dias consecutivos (LED3) em linhagens celulares.

3.4 Fotobiomodulação

Para avaliar o efeito da FBM em células cultivadas sob estresse nutricional, as linhagens celulares foram cultivadas nas diferentes concentrações de FBS e submetidas à FBM utilizando-se o equipamento LEDbox (BioLambda LEDbox, São Paulo, Brasil). Os parâmetros de irradiação utilizados foram: 660nm, 80mW, 6J/cm², 0,0255 W/cm² e 240 segundos. Este parâmetro foi selecionado baseando-se em estudo prévio do grupo de pesquisa, no qual foi observada redução da viabilidade celular das linhagens celulares CA1, LUC4 e SCC9.⁷⁶

As células do grupo LED1 receberam somente uma irradiação e as células do grupo LED3 foram submetidas a três irradiação diárias e consecutivas.

As irradiações ocorreram em ambiente com obscuridade parcial para não haver interferência da luz externa. As placas de cultivo celular foram colocadas diretamente sob a fonte de luz, sempre na mesma posição. A perda de energia causada pelo plástico foi devidamente descontada de acordo com Silva et al. (2012)⁷⁰.

3.5 Espectrofotometria

A análise da absorbância foi feita no espectrofotômetro USB-2000 (Fabricante: OceanOptics, EUA), utilizando-se o software SpectraSuite (Figura 3). Após a calibração do equipamento para excluir qualquer interferência externa, foi realizada a leitura do espectro de absorção utilizando-se somente PBS, sendo o valor obtido descontando das amostras contendo as células das diferentes linhagens celulares cultivadas com as concentrações de 0%, 5% e 10% de FBS e irradiadas.

Os resultados de absorbância obtidos foram transferidos para o programa OriginPro para a confecção dos gráficos e análise da intensidade de absorbância. Foi considerado o espectro de absorção de 400 a 1000 nm.

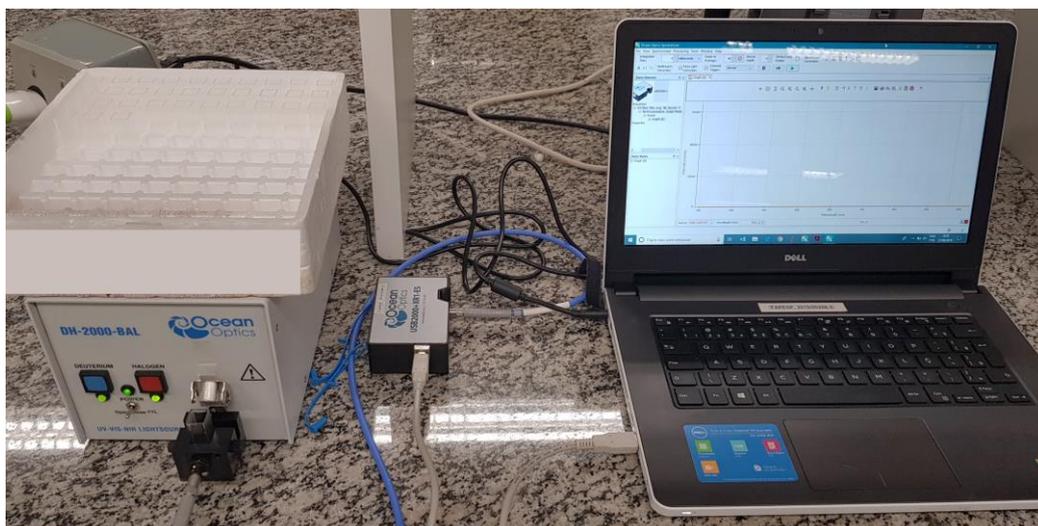


Figura 3: Equipamento espectrofotômetro USB-2000 (OceanOptics,EUA)

3.6 Análise da viabilidade celular

Para a análise de viabilidade celular, foi realizado o ensaio de MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]) nas linhagens HaCAT, DOK e SCC9. Para tal, 5000 células destas linhagens foram cultivadas em placas de 96 poços.

Após 24 horas, foi induzido o déficit nutricional das células utilizando-se as concentrações de 0%, 5% e 10% de SFB. Após 24h, iniciou-se a irradiação com LED por três dias consecutivos e com intervalo de 24 horas entre as irradiações. As células do grupo controle sofreram a mesma manipulação das células dos grupos

LED3, porém não foram irradiadas. Em seguida, o ensaio de MTT foi realizado em todos os grupos.

No ensaio de MTT, após a irradiação e os períodos de incubação descritos acima, as células foram lavadas com solução tampão fosfato (PBS, pH 7,4) e incubadas com 0,75mg/ml de MTT diluído em meio de cultura por 3h a 37°C. Em seguida, o meio contendo MTT foi descartado e os cristais de formazan foram solubilizados por meio da adição de 100ul/poço de isopropanol. Após homogeneização, a quantificação da viabilidade celular foi realizada em no espectrofotômetro (Anthos2020, Biochrom, UK) com o filtro no comprimento de onda de 595nm. Foram realizados três experimentos independentes.

3.7 Análise estatística

Todos os experimentos foram realizados em triplicata ou quadruplicata. Os resultados referentes ao espectro de absorção foram obtidos por meio do cálculo da área do gráfico abaixo da curva de absorbância levando em consideração os valores de absorbância no eixo $y > 0$ e comprimento de onda entre 400 e 1000 nm no eixo x .

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk, sendo observado distribuição normal dos mesmos. Desta maneira, foi realizado o teste ANOVA uma via para avaliar a absorbância das linhagens celulares após 24h de tratamento com diferentes concentrações de FBS. O teste ANOVA duas vias foi utilizado para avaliar diferenças em relação ao espectro de absorção das linhagens celulares cultivadas com diferentes concentrações de FBS e irradiadas uma única vez (LED1) ou por três dias consecutivos (LED3).

O nível de significância utilizado foi de $\alpha < 0,05$. Todas as análises foram realizadas utilizando-se o software OriginPro v.8 (OriginLab, EUA).

4. RESULTADOS

4.1 Análise da absorbância após 24 h de déficit nutricional

Os dados de absorbância referentes às linhagens CA1, LUC4, SCC9, DOK, HACAT e fibroblastos cultivados por 24h com 0%, 5% e 10% de FBS estão representados na Tabela 1.

Tabela 1: Descrição dos valores de média e desvio padrão (DP) referentes à área sob a curva da absorbância das linhagens celulares CA1, LUC4, SCC9, DOK, HACAT e fibroblastos após 24 horas de cultivo em déficit nutricional.

Linhagem	0% SFZ	5% SFB	10% SFB
HACAT	99,07 ± 12,16	145,28 ± 35,27	163,91 ± 16,61
DOK	20,60 ± 7,38	22,49 ± 1,67	0,99 ± 0,62
CA1	2,68±1,90	5,20 ± 1,54	5,62 ± 1,74
LUC4	1,88 ± 1,05	4,85 ± 3,28	3,03 ± 0,46
SCC9	104,25 ± 41,31	135,86 ± 17,08	66,07 ± 11,18
Fibroblastos	19,51 ±16,03	8,41 ± 3,82	11,53 ± 4,23

As células da linhagem HACAT (Figura 2) do grupo 0% SFB apresentaram menor espectro de absorção quando comparado com as células do grupo 10% SFB ($p < 0,05$). Não foi observada diferença estatística significativa entre os grupos 5% FBS e 0% SFB bem como entre os grupos 10% FBS e 5% de SFB.

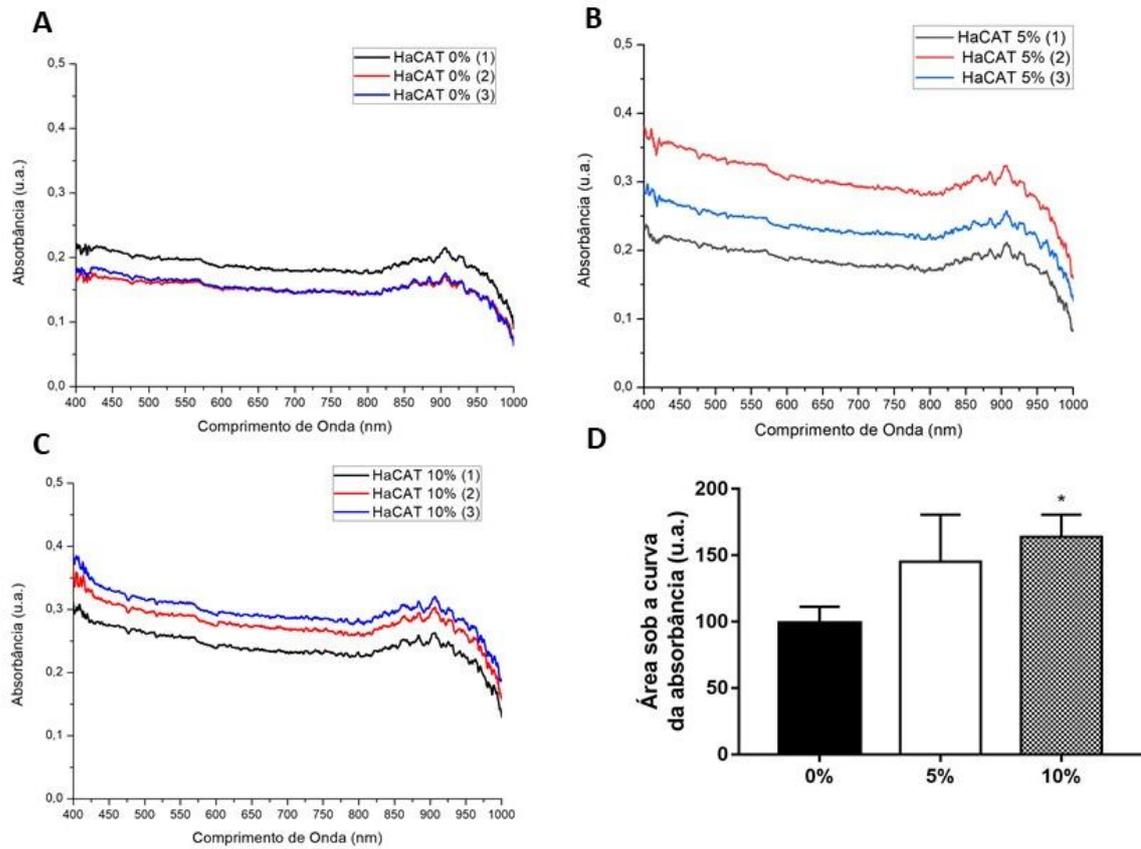


Figura 4: Espectro de absorção da linhagem HACAT dos grupos 0% FBS **(A)**, 5% FBS **(B)** e 10% FBS **(C)**. Representação da área abaixo do espectro de absorção nos grupos 0% FBS, 5% FBS e 10% FBS **(D)** (* $p < 0,05$ em relação ao grupo 0% FBS).

As células da linhagem DOK (Figura 3) apresentaram maior espectro de absorção nos grupos 0% FBS e 5% FBS ($p < 0,001$) quando comparado com o espectro de absorção observado no grupo 10% FBS. Não foi observada diferença estatística significativa entre os grupos 0% FBS e 5% FBS.

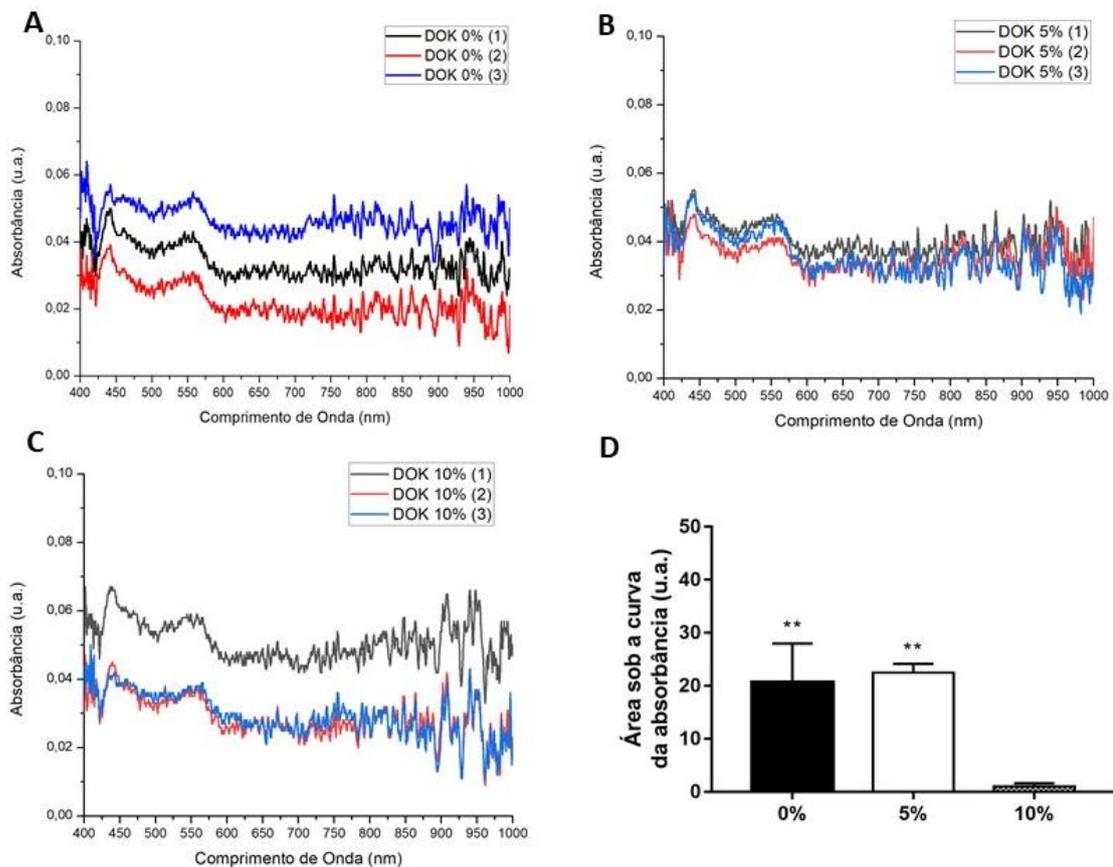


Figura 5: Espectro de absorção da linhagem DOK dos grupos 0% FBS (A), 5% FBS (B) e 10% FBS (C). Representação da área abaixo do espectro de absorção nos grupos 0% FBS, 5% FBS e 10% FBS (D) (** $p < 0,001$ em relação ao grupo 10% FBS).

Não foi observada diferença significativa em relação ao espectro de absorção das linhagens celulares CA1 (Figura 4), LUC4 (Figura 5) e fibroblasto isolado de polpa dentária de dente decíduo (Figura 6) dos grupos 0% FBS, 5% FBS e 10% FBS ($p > 0,05$).

Em relação à linhagem SCC9 (Figura 7), as células do grupo 5% FBS mostraram um aumento no espectro de absorção quando comparadas com as células do grupo 10% FBS ($p < 0,05$).

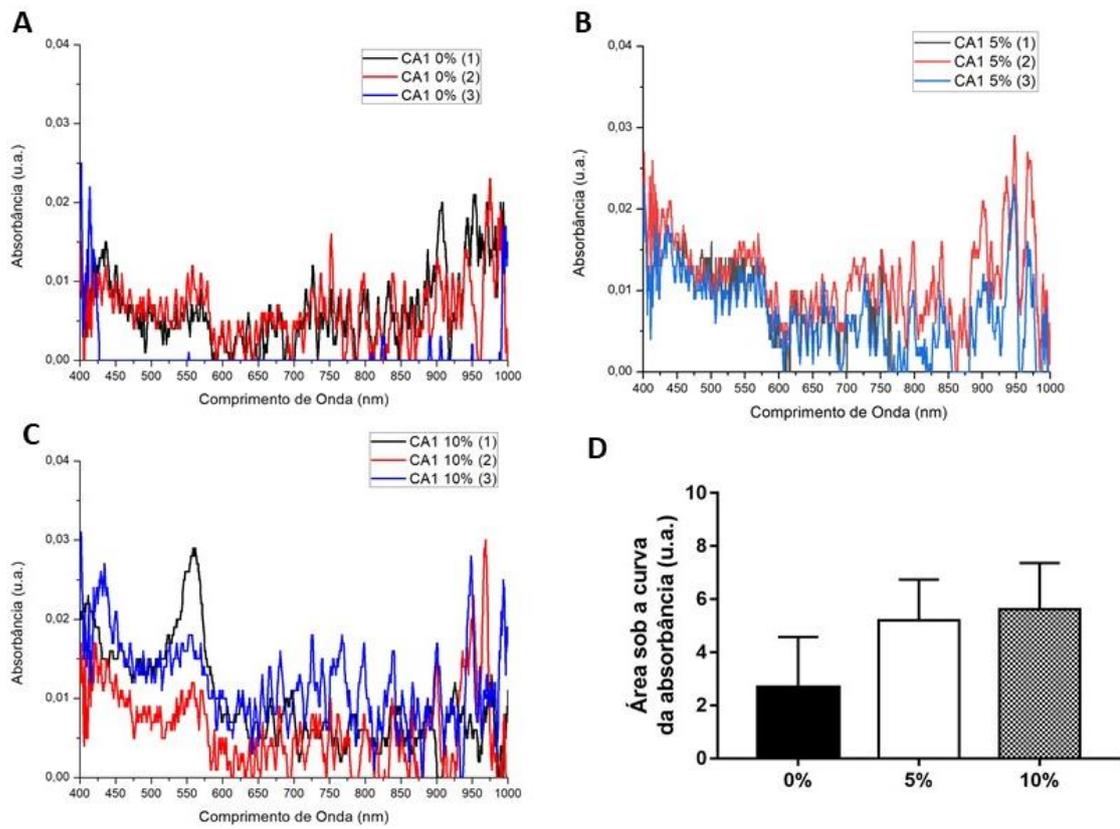


Figura 6: Espectro de absorção da linhagem CA1 dos grupos 0% FBS (A), 5% FBS (B) e 10% FBS (C). Representação da área sob a curva da absorbância nos grupos 0% FBS, 5% FBS e 10% FBS (D).

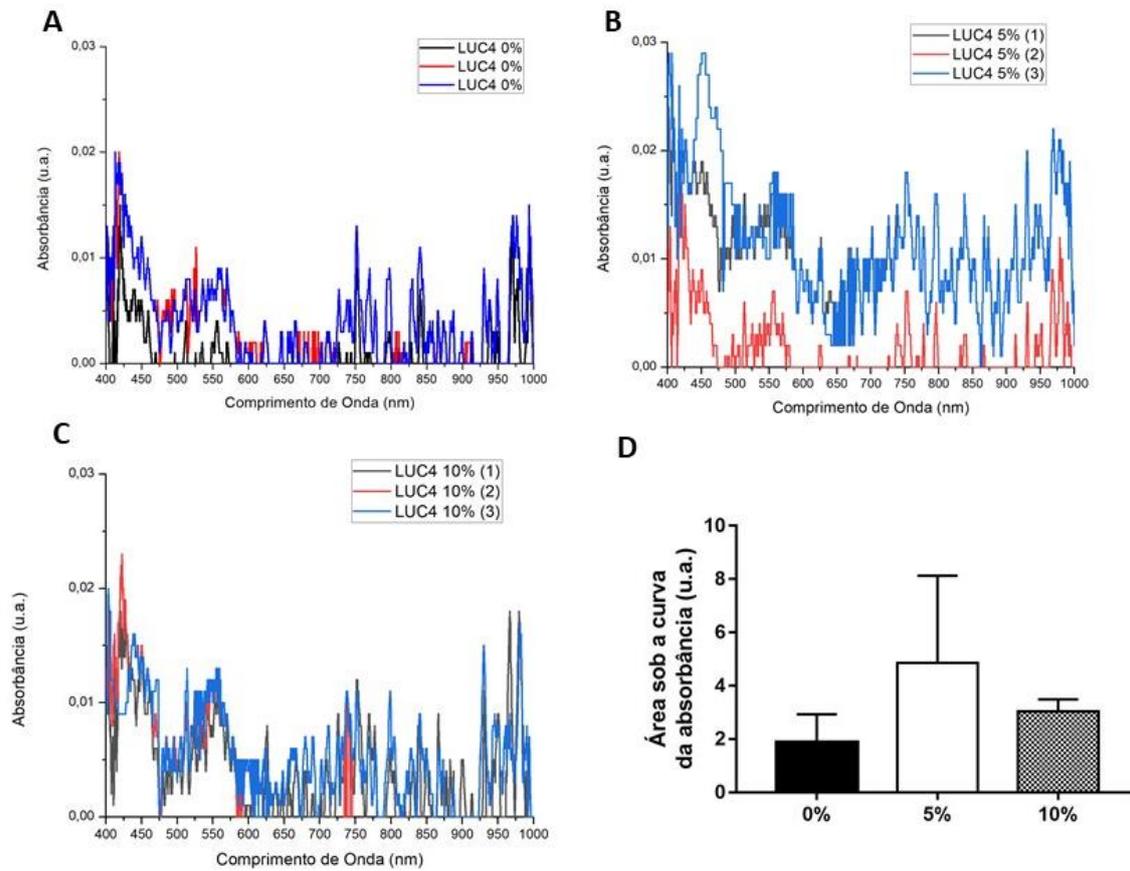


Figura 7: Espectro de absorção da linhagem LUC4 dos grupos 0% FBS (A), 5% FBS (B) e 10% FBS (C). Representação da área sob a curva da absorbância nos grupos 0% FBS, 5% FBS e 10% FBS (D).

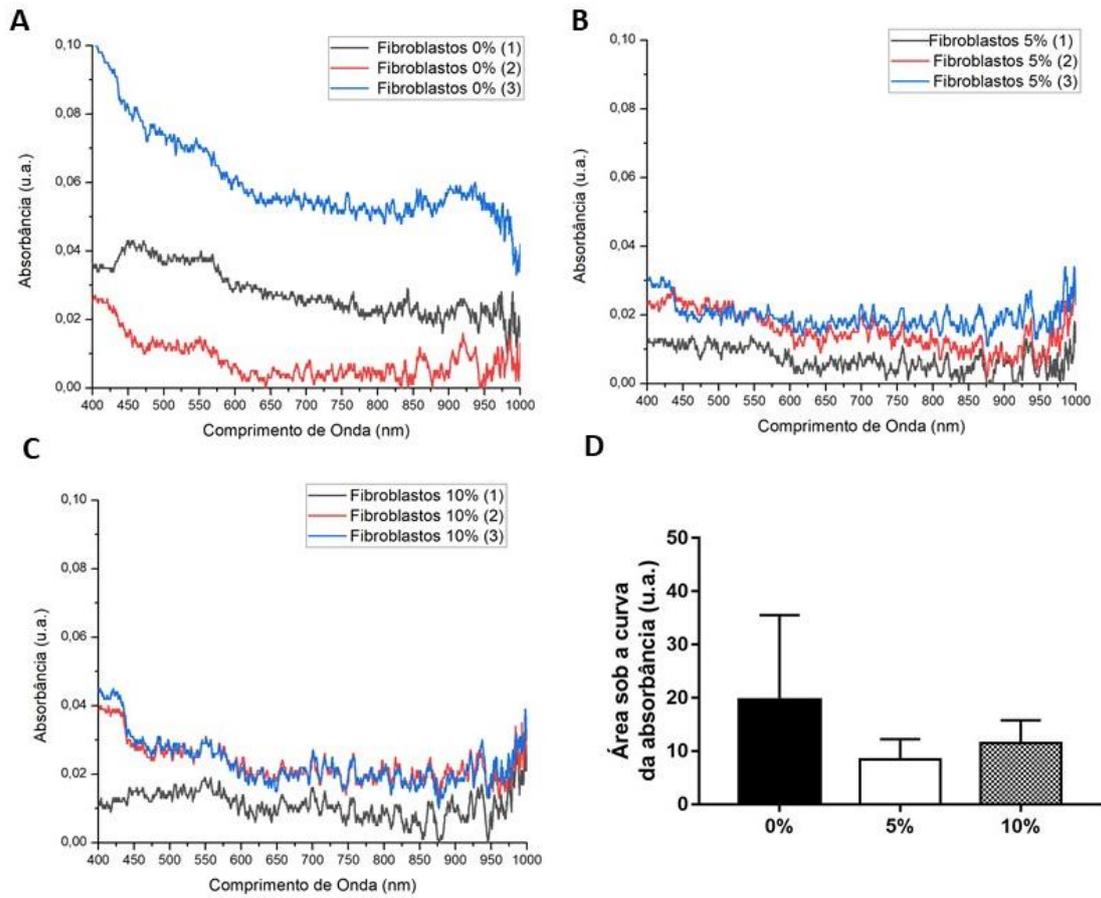


Figura 8: Espectro de absorção da linhagem fibroblasto dos grupos 0% FBS (A), 5% FBS (B) e 10% FBS (C). Representação da área sob a curva da absorbância nos grupos 0% FBS, 5% FBS e 10% FBS (D).

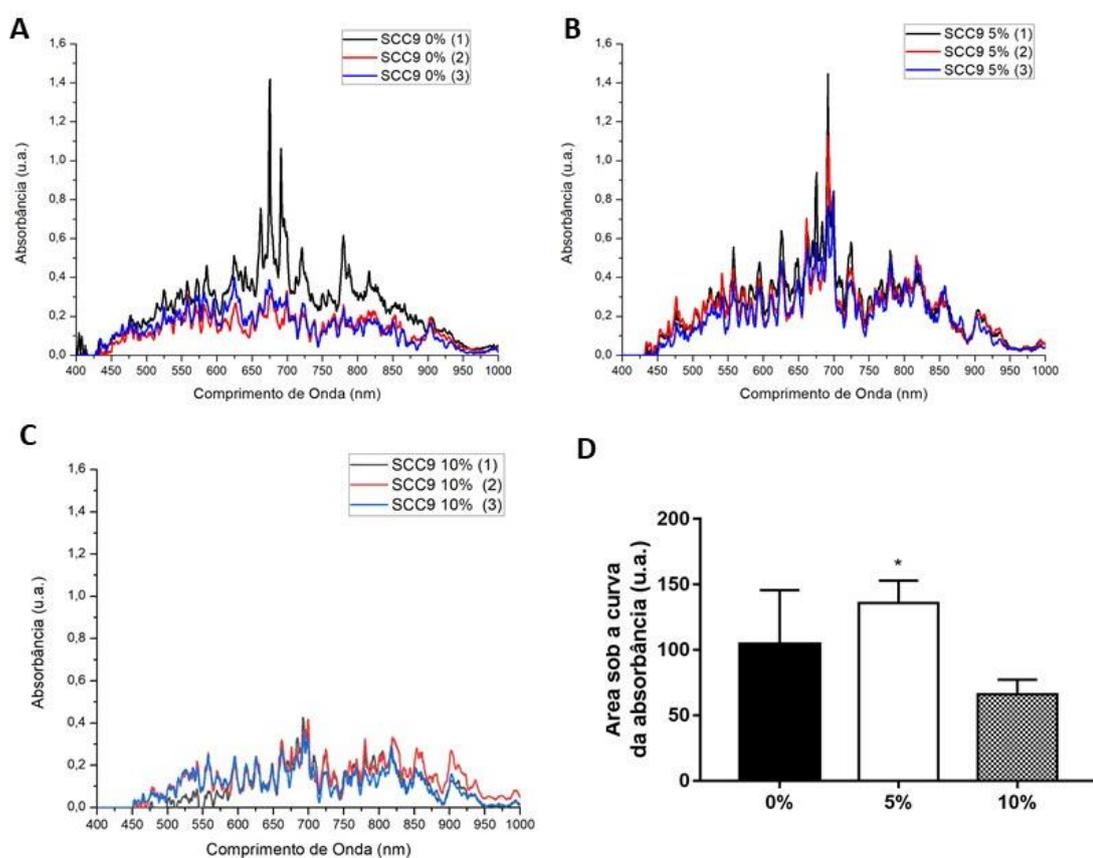


Figura 9: Espectro de absorção da linhagem SCC9 dos grupos 0% FBS (A), 5% FBS (B) e 10% FBS (C). Representação da área sob a curva da absorbância nos grupos 0% FBS, 5% FBS e 10% FBS (D) (* $p < 0,05$ em relação ao grupo 10% FBS).

Em resumo, foi observado que as linhagens celulares DOK e SCC9 apresentaram aumento no espectro de absorção quando cultivadas com 5% de FBS em relação às células cultivadas em condições ideais com 10% de FBS. Com base nestes resultados, foi comparado o espectro de absorção entre a linhagem displásica DOK e a linhagem tumoral SCC9 cultivadas nas diferentes concentrações de FBS, uma vez que ambas são originadas de cavidade oral. Adicionalmente, as lesões displásicas precedem o carcinoma epidermóide oral, sendo interessante a comparação entre as mesmas. Foi observado que as células dos grupos 0% FBS, 5% FBS e 10% FBS da linhagem tumoral SCC9 apresentam maior espectro de absorção quando comparadas com os respectivos grupos correspondentes da linhagem DOK (Figura 8). As linhagens foram comparadas uma vez que representam linhagens celulares derivadas

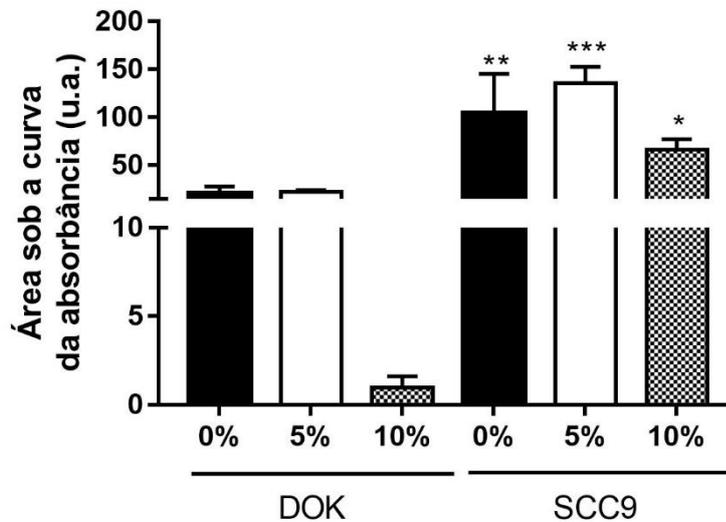


Figura 10: Representação da área sob a curva da absorbância nos grupos 0% FBS, 5% FBS e 10% FBS das linhagens DOK e SCC9. Foi observada maior absorbância nos grupos 0% FBS ($p < 0,001$), 5% FBS ($p < 0,0001$) e 10% FBS ($p < 0,05$) da linhagem SCC9 em relação aos respectivos grupos da linhagem DOK (**D**).

4.2 Análise da absorbância após 48h de déficit nutricional e única irradiação com LED

Para a avaliação do efeito da FBM no espectro de absorção, foram selecionadas as linhagens celulares HACAT, DOK e SCC9, nas quais foi observado efeito do déficit nutricional na absorbância. Desta maneira, as células foram plaqueadas e após 24h, o meio foi removido e as células foram incubadas com o meio contendo as diferentes concentrações de FBS. Após 24 de incubação, as células foram submetidas à FBM sendo coletadas após 24h da irradiação para avaliação da absorbância.

Na tabela 2 estão descritos os valores obtidos após análise da área sob a curva da absorbância nas células das linhagens SCC9, DOK e HACAT cultivadas com 0%, 5% e 10% de FBS por 48h e irradiadas uma única vez.

Foi observado que todas as linhagens avaliadas dos grupos 0% FBS+LED1, 5% FBS+LED1 e 10% FBS+LED1 não apresentaram diferença em relação à absorbância quando comparadas com seus respectivos grupos controles ($p > 0,05$) (Figuras 9, 10 e 11).

Tabela 2: Descrição dos valores de média e desvio padrão (DP) referentes à área sob a curva da absorbância das linhagens celulares HACAT, DOK e SCC9 após 48 h de cultivo em déficit nutricional e irradiação única.

Linhagens	Grupos					
	0% FBS	0% FBS +LED1	5% FBS	5% FBS +LED1	10% FBS	10% FBS +LED1
HACAT	15,33±4,52	15,74±1,70	24,87±3,82	24,15±3,41	18,16±11,23	26,85±3,02
DOK	15,58±13,43	14,32±4,81	40,37±15,48	19,81±10,26	40,81±13,46	33,65±9,24
SCC9	31,55±4,10	25,24±1,70	23,00±9,43	25,41±7,32	23,02±9,96	9,41±4,58

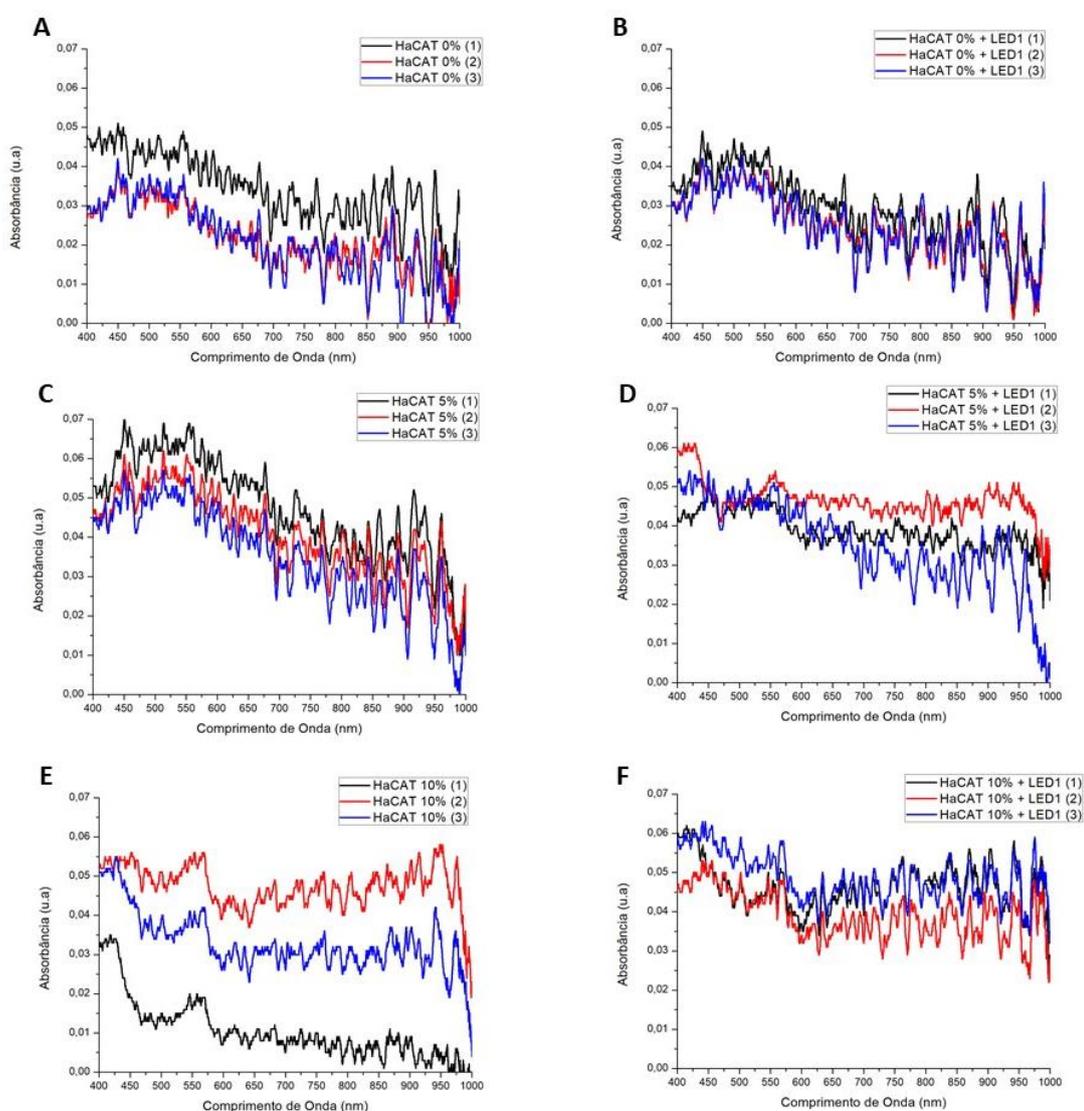


Figura 11: Espectro de absorção da linhagem HACAT nos grupos 0% FBS (A), 0% FBS+LED1 (B), 5% FBS (C), 5% FBS+LED1 (D), 10% FBS (E) 10% FBS+LED1 (F), cultivadas por 48h em déficit nutricional e submetidas a uma única irradiação.

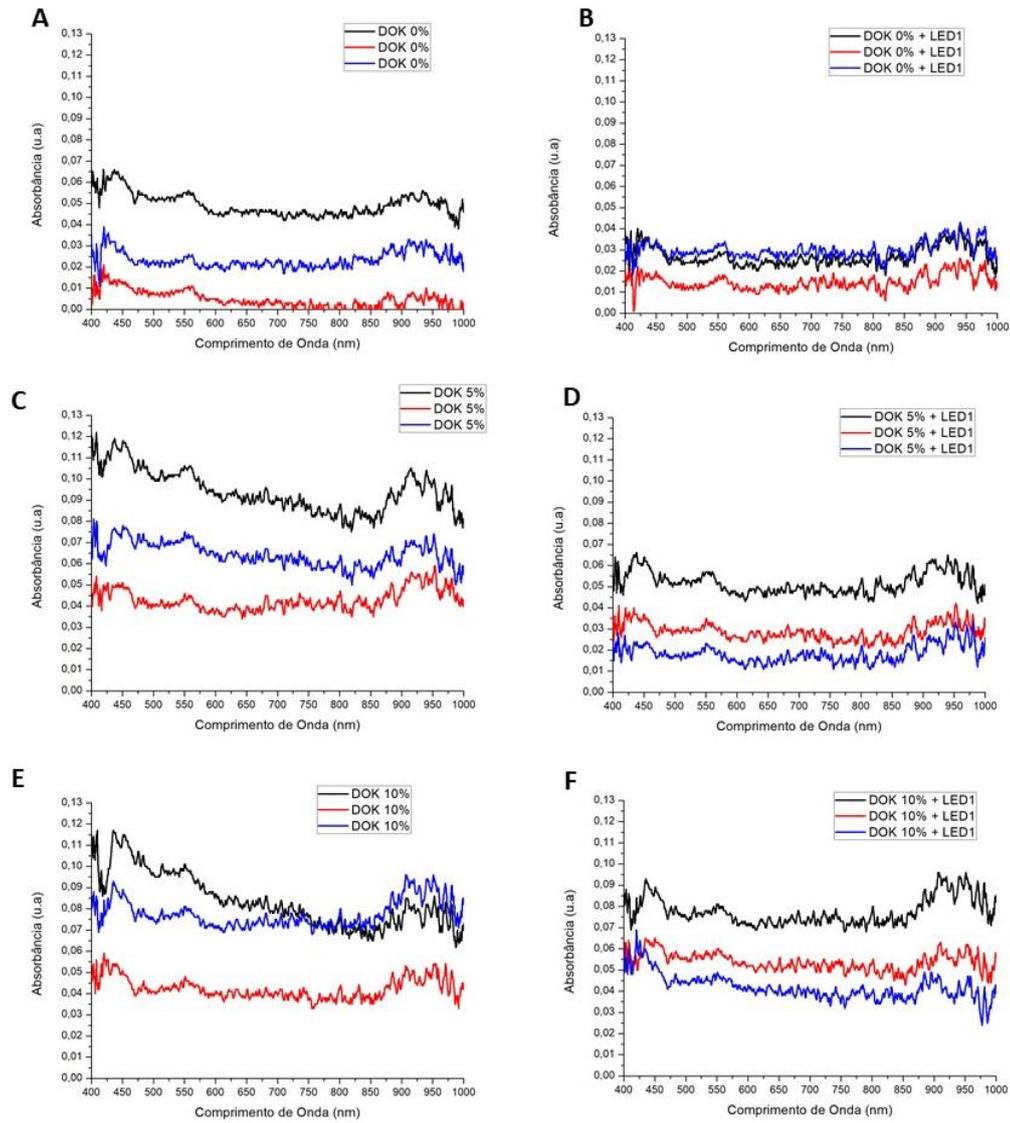


Figura 12: Espectro de absorção da linhagem DOK nos grupos 0% FBS (A), 0% FBS+LED1 (B), 5% FBS (C), 5% FBS+LED1 (D), 10% FBS (E) 10% FBS+LED1 (F), cultivadas por 48h em déficit nutricional e submetidas a uma única irradiação.

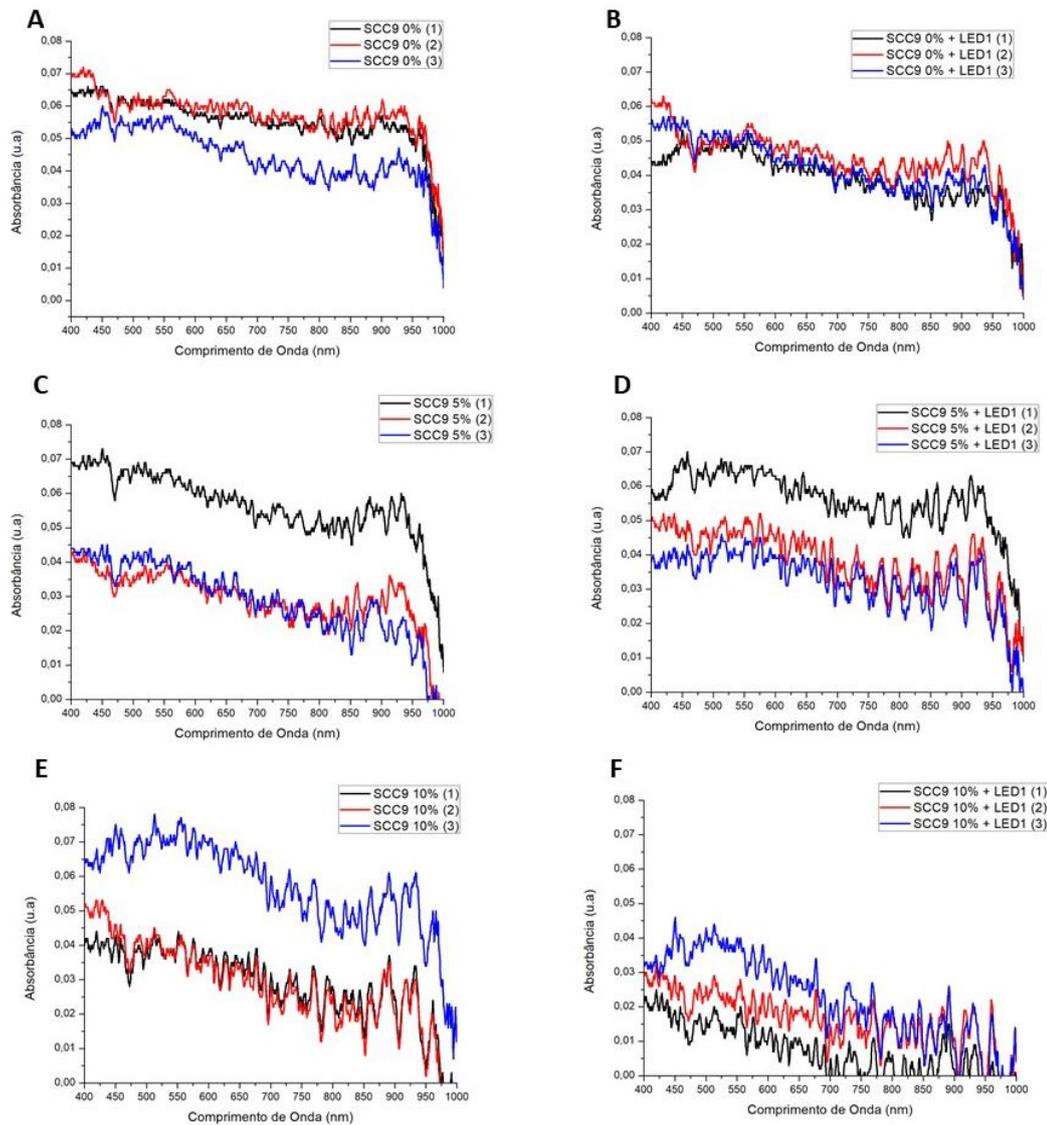


Figura 13: Espectro de absorção da linhagem SCC9 nos grupos 0% FBS (A), 0% FBS+LED1 (B), 5% FBS (C), 5% FBS+LED1 (D), 10% FBS (E) 10% FBS+LED1 (F), cultivadas por 48h em déficit nutricional e submetidas a uma única irradiação.

4.3 Análise da absorbância após 96 h de déficit nutricional e irradiação diária por três dias consecutivos

Os dados de absorbância referentes às linhagens HACAT, DOK e SCC9 cultivadas por 96h com 0%, 5% e 10% de FBS e irradiadas três dias consecutivos estão representados na Tabela 3.

Tabela 3: Descrição dos valores de média e desvio padrão (DP) referentes à área sob a curva da absorvância das linhagens celulares HACAT, DOK e SCC9 após 96 h de cultivo em déficit nutricional e três irradiações consecutivas

Linhagens	Grupos					
	0% FBS	0% FBS +LED3	5% FBS	5% FBS +LED3	10% FBS	10% FBS +LED3
HACAT	11,62 ± 6,00	8,92 ± 6,37	15,15±11,27	15,57±11,78	13,36 ± 5,54	25,16±2,56
DOK	0,99 ± 0,62	0,74 ± 0,66	2,05 ± 1,99	10,85 ± 1,17	4,15 ± 3,23	13,28±3,79
SCC9	13,98 ± 5,20	11,42±3,67	19,17 ± 7,98	18,77 ± 1,25	20,42 ± 3,32	10,46±5,06

Não foi observada alteração significativa na absorvância das células nas linhagens HACAT e SCC9 dos grupos 0% FBS+LED3, 5% FBS+LED3 e 10% FBS+LED3 quando comparado com os respectivos grupos controles (Figura 12 e 14).

As células da linhagem DOK dos grupos 5% FBS+LED3 e 10 % FBS+LED3 apresentaram maior absorvância quando comparadas com os grupos 5% FBS e 10 % FBS, respectivamente ($p < 0,001$). Nos grupos irradiados foi observado que tanto as células do grupo 5% FBS+LED3 quanto 10% FBS+LED3 apresentaram absorvância significativamente maior em relação às células do grupo 0% FBS+LED3 ($p < 0,0001$), demonstrando que a presença de FBS é relevante para a absorção das células após exposição à FBM (Figura 13). Adicionalmente, não foi observada diferença na absorvância das células dos grupo 0% FBS e 0% FBS+LED3.

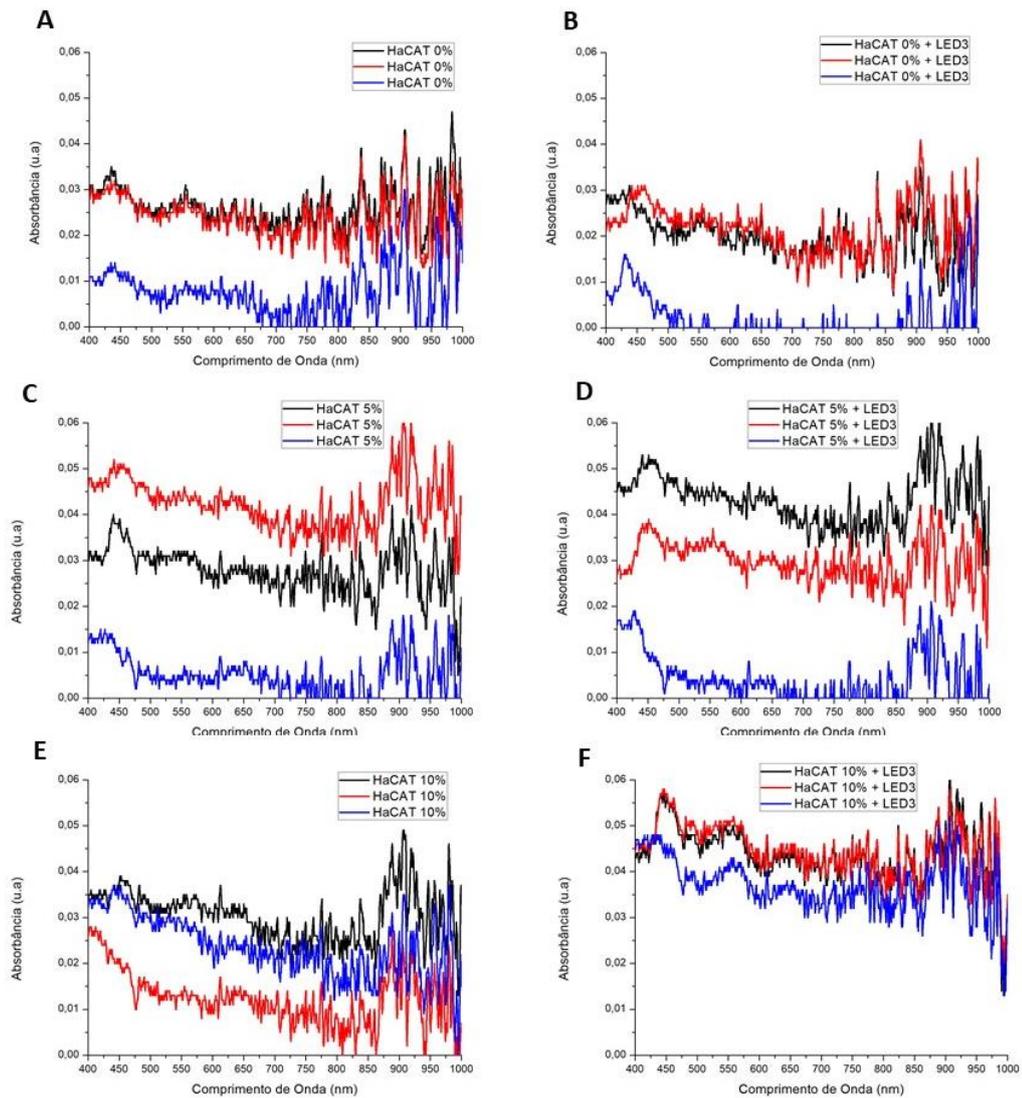


Figura 14: Espectro de absorção da linhagem HACAT nos grupos 0% FBS (A), 0% FBS+LED3 (B), 5% FBS (C), 5% FBS+LED3 (D), 10% FBS (E) 10% FBS+LED3 (F), cultivadas por 96h em déficit nutricional e submetidas a três irradiações.

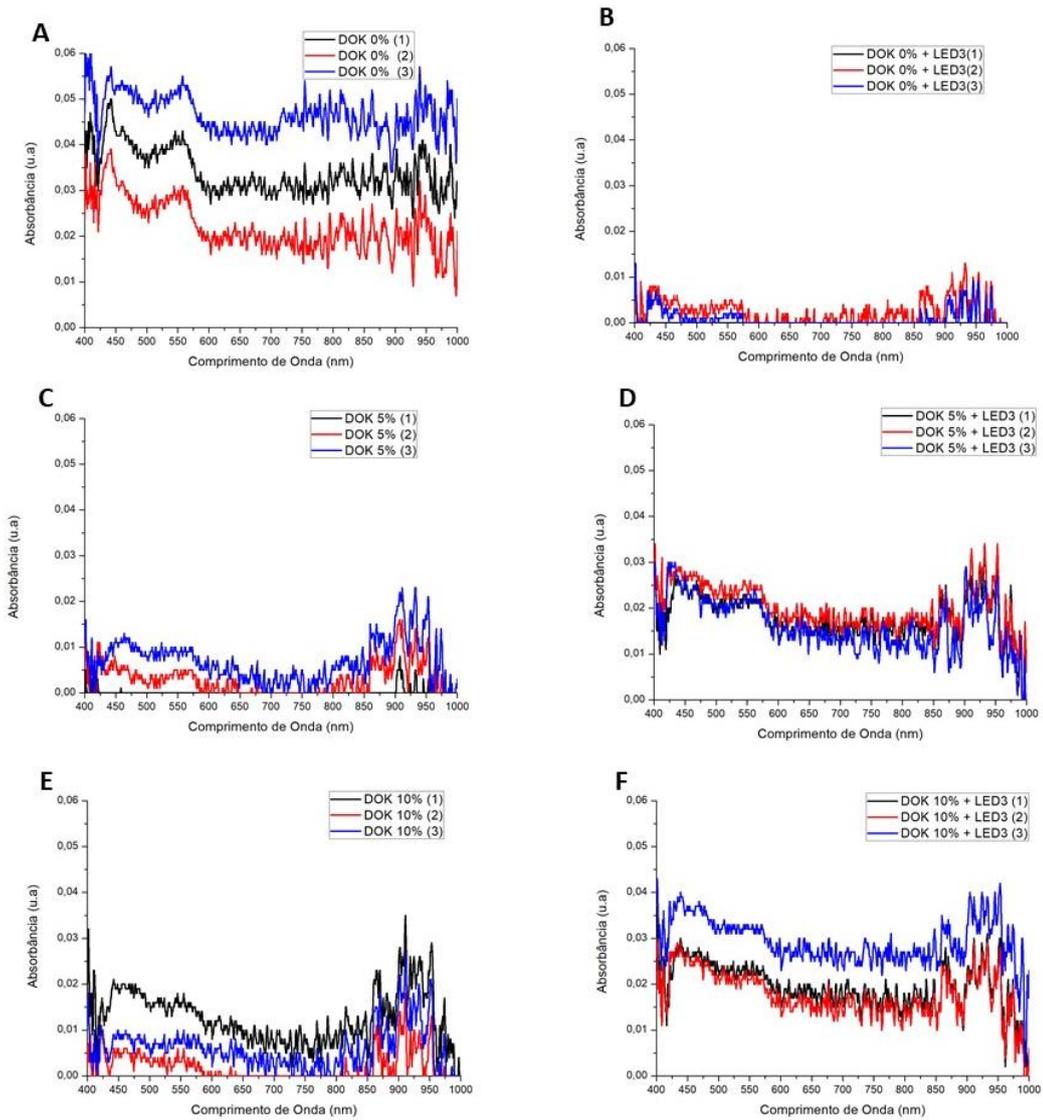


Figura 15: Espectro de absorção da linhagem DOK nos grupos 0% FBS **(A)**, 0% FBS+LED3 **(B)**, 5% FBS **(C)**, 5% FBS+LED3 **(D)**, 10% FBS **(E)** 10% FBS+LED3 **(F)**, cultivadas por 96h em déficit nutricional e submetidas a três irradiações.

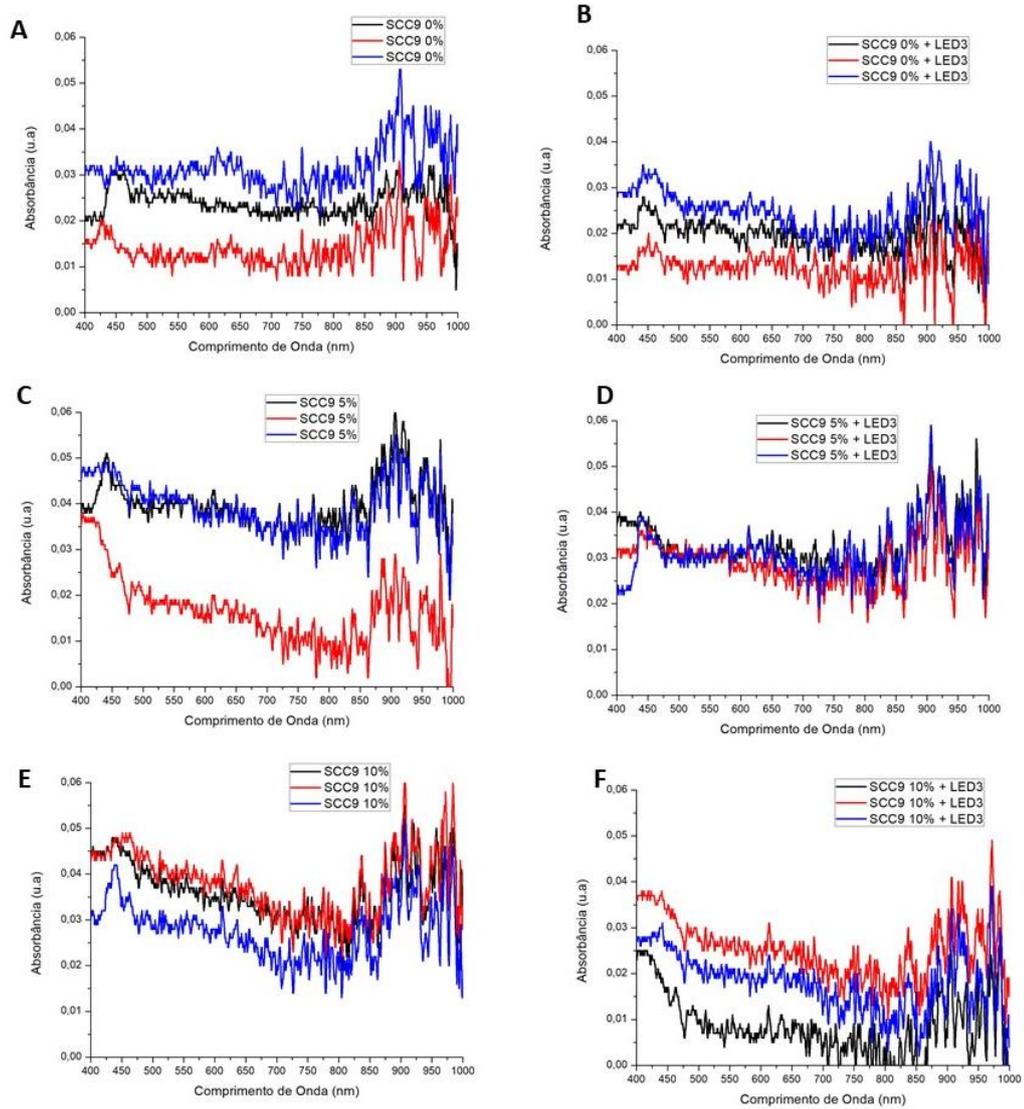


Figura 16: Espectro de absorção da linhagem SCC9 nos grupos 0% FBS (A), 0% FBS+LED3 (B), 5% FBS (C), 5% FBS+LED3 (D), 10% FBS (E) 10% FBS+LED3 (F), cultivadas por 96h em déficit nutricional e submetidas a três irradiações.

4.4 Análise da viabilidade celular após déficit nutricional e irradiação diária por três dias consecutivos

Nas linhagens celulares HACAT, DOK e SCC9, não foi observada diferença na viabilidade celular entre os grupos controle e LED3, nas diferentes concentrações de FBS. Desta maneira, a FBM não foi capaz de aumentar a viabilidade celular após o estresse nutricional. Além disso, nas condições ideais de cultivo celular (10% FBS), nenhum efeito da FBM foi observado em relação à viabilidade celular em todas as linhagens.

As células das linhagens HACAT, DOK e SCC9 dos grupos 0% FBS apresentaram redução da viabilidade quando comparadas com as células dos grupos 5% FBS e 10% FBS (HACAT e SCC9 $p < 0,0001$; DOK $p < 0,05$) (Figura 15). Foi observado também menor viabilidade das células das linhagens HACAT e SCC9 do grupo 0% FBS+LED3 em relação às células dos grupos 5% FBS+LED3 (HACAT $p < 0,0001$; SCC9 $p < 0,001$) e 10% FBS+LED3 (HACAT $p < 0,0001$; SCC9 $p < 0,05$). Na linhagem DOK, as células do grupo 10% FBS+LED3 mostraram maior porcentagem de células viáveis em relação às células do grupo 0% FBS+LED3 ($p < 0,001$).

Em resumo, foi observado que as células cultivadas na ausência de FBS possuem menor viabilidade celular quando comparadas às células cultivadas com 5% e 10% de FBS. Adicionalmente, a irradiação com LED por três dias consecutivos não foi capaz de aumentar a viabilidade das células.

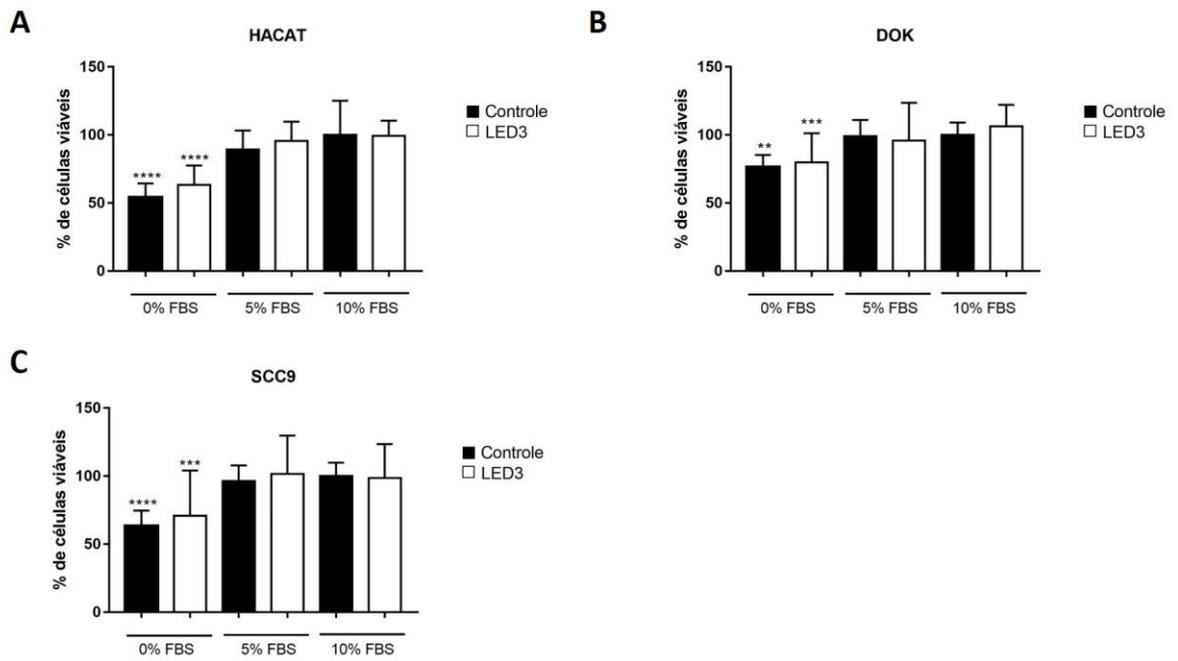


Figura 17: Análise da viabilidade celular da linhagem HACAT **(A)**, DOK **(B)** e SCC9 **(C)** no grupo controle e LED3 nas diferentes concentrações de FBS (** $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$; diferença estatística significativa no grupo 0% FBS ou 0% FBS+LED3 em relação aos respectivos grupos 5% FBS e 10% FBS).

5. DISCUSSÃO

As linhagens celulares CA1, LUC4 e fibroblastos não apresentaram diferenças significantes em relação ao espectro de absorção quando cultivadas por 24 horas nas concentrações de 0%, 5% e 10% de SFB.

A linhagem celular HACAT, apresentou menor absorção quando comparados os grupos 0% SFB e 10% SFB. Nas demais comparações da linhagem HACAT não houve diferenças significativas. A linhagem DOK 0%SFB e 5%SFB apresentaram-se semelhantes quando comparadas entre si e ambas apresentaram maior absorção em relação ao grupo 10%SFB. A linhagem SCC9 5%SFB apresentou maior espectro de absorção quando comparada ao grupo 10%SFB, porém não houve diferença entre as demais comparações.

Volpato (2011) e Tagliani (2010), observaram em seus estudos que os protocolos de FBM utilizados estimularam a viabilidade de fibroblastos cultivados sob estresse nutricional. Situação, esta, semelhante à encontrada em tecidos traumatizados (*in vivo*) na qual a viabilidade é reduzida. Observaram, ainda, que a FBM foi capaz de promover maior crescimento nas células que foram submetidas ao déficit nutricional. Já Almeida-Lopes et al (2001), conclui que os fibroblastos cultivados *in vitro* sob déficit nutricional em meio suplementado com 5% de SFB apresentou uma taxa de proliferação celular significativamente menor do que as células cultivadas em condições ideais de cultura (10% SFB). No entanto, quando irradiadas com laser de baixa potência, as células em déficit nutricional apresentaram crescimento celular semelhante ou superior as cultivadas em 10% SFB. Fato confirmado por Hawkins-Evans et al (2008)⁷¹ que citaram quando a célula é submetida à irradiação laser, observa-se um aumento na produção de ATP e uma maior atividade da enzima fosfatase alcalina, o que intensifica a proliferação celular.

Eduardo et al (2007) ⁷², determinou a concentração de SFB do meio de cultura das células epiteliais através do ensaio de viabilidade, a fim de que as células diminuíssem a velocidade de crescimento, mas mantivessem viáveis. O objetivo do trabalho foi variar o comprimento de onda e exposição radiante em células cultivadas sob estresse nutricional, diferentemente deste estudo.

Quando analisamos as linhagens celulares DOK e SCC9, ambas provenientes de lesões orais, cultivadas por 24h com 5% de SFB observamos que houve maior espectro de absorção em relação ao grupo cultivado com 10% SFB. A linhagem SCC9 apresentou maior espectro de absorção em relação à linhagem DOK. Associando ao fato que específicos comprimentos de onda e diferentes combinações da FBM resultam em efeitos que podem ser tanto estimulatórios quanto inibitórios em relação à proliferação celular em linhagens celulares epiteliais normais e tumorais, paralelamente aos trabalhos Al-Watban e Andres (2012), Magnato et al. (2004) Bamps et al. (2018)⁷³, que mostram aumento da proliferação, efeito estimulatório e aumento da viabilidade, faz-se supor que a linhagem tumoral SCC9 pode ter um efeito pró-tumoral em relação a linhagem celular displásica DOK.

De acordo com Karu(1987)⁷⁴, o laser estimula as células que estão crescendo precariamente no momento da irradiação. Pois se o tecido é completamente funcional no momento da irradiação, não existe nada que a irradiação a laser estimule e nenhum efeito terapêutico será observado.

Isto é, se o tecido está danificado, em uma situação de déficit nutricional, espera-se que a irradiação a laser normalize a função celular, restaure a homeostase e estimule a cicatrização e reparo.

Sendo assim, dois anos depois Karu (1989) conclui que a magnitude da resposta celular frente à irradiação depende do estado fisiológico da célula. A irradiação é condicionada pela quantidade de nutrientes disponíveis e pela fase do ciclo celular. Geralmente, células em fase de crescimento exponencial são mais fotossensíveis que àquelas na fase estacionária ⁷⁵. Conseqüentemente, as células com inanição sérica (cultivadas à 0% de SFB) podem não responder aos efeitos estimulatórios imaginados. Justificando, os grupos cultivados com 5% e 10% de SFB apresentarem maior espectro de absorção em comparação ao grupo 0% de SFB.

Para a avaliação do efeito da FBM no espectro de absorção, foram selecionadas as linhagens celulares HACAT, DOK e SCC9, nas quais foi observado efeito do déficit nutricional na absorbância.

A escolha nos parâmetros da FBM foi baseada em estudo prévio do grupo de pesquisa⁷⁶ que utilizou como referência alguns trabalhos, como Schalch(2018) que avaliou o efeito da FBM na linhagem SCC9 utilizando-se 11 diferentes parâmetros dosimétricos, nos períodos de 24 e 72 horas (1 e 3 dias), com os espectros vermelho (660nm) e infravermelho (780 nm) e exposição radiante variando de

1J/cm² à 6J/cm². Elad et al. (2018) demonstraram que os parâmetros recomendados para o tratamento da MO correspondem ao comprimento de onda entre 633 e 685 nm ou 780 - 830 nm, potência entre 10 e 150mW.

Carvalho et al (2013), observou a redução da sintomatologia dolorosa bem como do grau de mucosite oral em pacientes com câncer de cabeça e pescoço submetidos à radioterapia foram tratados profilaticamente com dois protocolos de FBM: 660nm, 15 mW, 3,8 J/cm² e 660nm, 5mW, 1,3 J/cm². Ao término do tratamento; pacientes submetidos ao primeiro protocolo obtiveram redução significativa da dor e controle no desenvolvimento de mucosite.

Os efeitos do FBM na proliferação e diferenciação celular foram investigados *in vitro* usando linhagens celulares malignas, gerando dados conflitantes em diferentes linhagens de células tumorais e parâmetros de FBM (Pinheiro A, 2002).

Neste contexto, devido à controvérsia na literatura em relação ao efeito da FBM no CEB (carcinoma epidermoide bucal) e à escassez de estudos que investigaram o espectro de absorção de linhagens celulares submetidas ao estresse nutricional e à FBM, este estudo se propôs a avaliar a absorbância e a viabilidade de linhagens celulares derivadas de CEB bem como de queratinócitos imortalizados de pele, fibroblastos e células displásicas cultivadas sob estresse nutricional e irradiadas.

As linhagens celulares HACAT, DOK e SCC9 quando tratadas com LED por um dia e cultivadas por 48 horas de déficit nutricional, não apresentaram diferença no espectro de absorção. Corroborando com Mester et al.que demonstraram que pequenas doses em períodos apropriados são mais efetivas do que quando administradas de uma só vez (1 irradiação). O efeito cumulativo de baixas doses (2,5 ou 5 J/ cm²) determina um efeito estimulatório enquanto múltiplas exposições a altas doses (10 e 16 J/cm²) resultam em um efeito inibitório e são caracterizadas por uma diminuição na viabilidade e proliferação celular com uma quantidade significativa de danos a membrana celular e ao DNA⁷⁵

Já Eduardo (2007), afirma que o crescimento celular está diretamente proporcional ao número de irradiações. Porém as linhagens celulares HACAT, DOK e SCC9 quando tratadas com LED por três dias consecutivos e cultivadas por 96 de déficit nutricional, também não apresentaram diferença em relação ao espectro de absorção.

Entretanto, o efeito foi observado nas células da linhagem DOK, no qual as células cultivadas com 5% e 10% de SFB e irradiadas por três dias consecutivos mostraram aumento da absorvância em comparação ao grupo cultivado com 0% de SFB. Diferentemente de Carnevalli et al.(2003) que demonstraram que células cultivadas e irradiadas com laser de baixa intensidade (830nm e 2J/cm²) exibiram maior síntese de ATP e capacidade mitótica se submetidas ao estresse nutricional quando comparadas com células não-irradiadas do grupo controle.

Além disso, nestes grupos da linhagem DOK quando cultivados com 5% e 10% de SFB e tratados por três dias com LED, a absorvância foi maior do que aquela observada no grupo 0%+LED3. Sugerindo que a presença do SFB é relevante para absorção após a FBM, mas a célula estar em déficit nutricional por um período longo (96H) não tem impacto na absorvância. Observação confirmada com o trabalho de Almeida-Lopes (2001) onde as células cultivadas em meio sem soro não apresentaram crescimento, enquanto células cultivadas em meio contendo apenas 5% de SFB apresentou uma taxa de crescimento significativamente menor que a de células cultivadas em concentração sérica ideal (10%).

Com o objetivo de elucidar o mecanismo biológico da proliferação celular, Sroka et al.⁷⁷ avaliaram o efeito da laserterapia em células de diferentes origens e diferentes graus de malignidade, comparando-as com células normais. Foi verificado um aumento do padrão mitótico em células benignas e malignas, após irradiação com doses no intervalo de 4 a 8J/cm². No entanto foi observada uma redução na taxa de proliferação celular, quando a dose ultrapassava esse intervalo de energia independente do comprimento de onda.

Em relação à viabilidade celular, como esperado, foi observado que o cultivo sem FBS está associado com menor viabilidade celular em relação ao cultivo com 5% de FBS e em condições ideais com 10% de FBS.

Eduardo (2007) afirma que o número de células viáveis para o grupo irradiadas foi três vezes maior do que o grupo controle não irradiado com déficit nutricional. Volpato (2011), ainda, relatou que a FBM estimulou a viabilidade dos fibroblastos cultivados sob estresse nutricional.

A FBM não aumentou a viabilidade celular independente da concentração de FBS tanto em linhagens não tumorais quanto tumorais. As células irradiadas e cultivadas com 5 e 10% de FBS mostraram maior viabilidade em relação as células

do grupo 0% e irradiadas, sendo a concentração de FBS importante na viabilidade celular.

Talvez sejam necessários novos estudos para correlacionar as linhagens, somente Sperandio et al. (2013), utilizou as células das linhagens DOK, SCC9 e SCC25 derivadas de CEB e irradiou-as uma única vez com laser em baixa intensidade (potência 40mW), com diferentes exposições radiantes (2,05J/cm², 3,07J/cm², 6,15J/cm²) e comprimento de onda vermelho (660nm) e infra-vermelho (780nm). Foram observados efeitos distintos dependendo da linhagem, sendo que a linhagem DOK, derivada de displasia epitelial, obteve aumento de viabilidade celular em todos os parâmetros bem como aumento da expressão de β -catenina e pS6. A linhagem SCC9, por outro lado, demonstrou sua viabilidade reduzida com o comprimento de onda vermelho, expressando um aumento de Akt, β -catenina e pS6 em todos os parâmetros, após um período de 12 horas.

Para a linhagem DOK, esse o aumento da viabilidade celular após a irradiação no grupo 10%+LED3 pode estar associado com maior absorvância, porém estudos adicionais precisam ser conduzidos.

Nos trabalhos citados observa-se que a fotobiomodulação algumas vezes estimula^{32,64,65,66}, e em outras inibe⁷⁷ ou muitas vezes é indiferente no processo de proliferação celular^{28,78}. Além disso, foi observado que cada linhagem celular responde diferentemente frente à comprimentos de onda e combinações de doses específicas⁷⁹. E que há diferentes respostas dentro da mesma linhagem⁷⁸. Diferentemente do trabalho de Fernandes et al. (2016), neste estudo não foram verificadas diferenças significativas na viabilidade das células. Vale ressaltar que as variações nos parâmetros da terapia laser tem sido um dos maiores obstáculos para a comparação dos estudos sobre fotobiomodulação., considerando o número limitado de experimentos e heterogeneidade dos métodos empregados, mais estudos são necessários para estabelecer os parâmetros ideais de déficit nutricional e fotobiomodulação.

Permanece ainda obscuro qual desses mecanismos é decisivo para desencadear a cascata de sinalização que culminará com o incremento da proliferação celular. Na realidade todos os mecanismos discutidos acima levam ao mesmo resultado: ativação da cadeia respiratória, aumento da produção de ATP, RNA e DNA. Entretanto, dependendo da dose utilizada e do estado fisiológico das

células irradiadas alguns mecanismos prevalecem significativamente ⁷⁹. Isso explica por que a bioestimulação não é sempre possível.

6. CONCLUSÃO

- As células da linhagem HACAT cultivadas na ausência de FBS apresentam menor absorvância enquanto as células das linhagens DOK e SCC9 mostraram maior absorvância quando cultivadas com 5% de FBS e 0% de FBS.
- A linhagem celular SCC9 possui maior absorvância em relação à linhagem displásica DOK.
- Tanto o déficit nutricional por 48h quanto a FBM única não alteraram a absorvância das linhagens celulares HACAT, DOK e SCC9.
- Após 96h de déficit nutricional e três irradiações diárias e consecutivas, somente a linhagem DOK mostrou maior absorvância após a irradiação quando cultivada com 5% e 10% de FBS.
- As linhagens celulares cultivadas na ausência de FBS mostraram redução da viabilidade celular. Adicionalmente, nenhum efeito na viabilidade foi observado após a FBM nas linhagens celulares cultivadas com as diferentes concentrações de FBS.
- As linhagens celulares cultivadas na ausência de FBS e irradiadas mostraram menor viabilidade celular em relação às células irradiadas e cultivadas na presença de 5% e 10% de FBS.

7. REFERÊNCIAS

1. Brosseau, C. *Fundamentals of Polarized Light: A Statistical Optics Approach*. (1998).
2. FERNANDES, KPS e colaboradores. *Biofotônica: Conceitos e Aplicações*. São Paulo: Universidade Nove de Julho- UNINOVE, 2017. 258 p.,il.color.
3. Okuno, E.; Yoshimura, E.M. *Física das Radiações*. São Paulo: Oficina de Textos, 2010.
4. Hamblin, M.R , Demidova, T. Mechanisms of low level light therapy. *Proc SPIE*. 2006; 6140. 1-12. 10.1117/12.646294.
5. Corazza, A.V, Jorge, J, Kurachi, V, Bagnato, VS. Photobiomodulation on the angiogenesis of skin wounds in rats different light sources. *Photomedicine and laser surgery*. 2007; 25 (2), 102-106
6. Lanzafame, RJ, Photobiomodulation and Cander and Other musings. *.Photomedicine and Laser. Surgery*.Jan 2011
7. Smith, KC. The Photobiological basis of low level laser radiation therapy.. 1991. *Laser Therapy* 3(1), 6
8. Low, J. Effect of hydrogen adsorption on the x-ray absorption spectra of small pt clusters. 2001. *The American Physical Society*. 78.70.Dm, 82.65.+r, 82.80.Ej
9. Palmer, G.M., Keely, P.J., Breslin, T.M., & Ramanujam, N. Autofluorescence spectroscopy of normal and malignant human breast cell lines. *Photochemistry and photobiology*, 2003. 78 5, 462-9 .
10. Ginani F, Soares DM, de Oliveira Rocha HA, de Souza LB, Barboza CAG. Low-level laser irradiation induces in vitro proliferation of stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Lasers Med Sci*. 2018. Jan;33(1):95-102.
11. Almeida-Lopes, L., Marques Jaeger, M.M., Rigau, J., Amaro Zângaro, R., and Guidugli-Neto, J. Comparison of the low level laser therapy effects on cultured human gingival fibroblasts proliferation using different irradiance and same fluence*. *Lasers in Surgery and Medicine* 2001.29, 179–184.
12. Pedroni, A.C.F., Diniz, I.M.A., Abe, G.L., D’Almeida-Couto, R.S., Moreira, M.S., Tedesco, T.K., Lima, P.L.V., de Cara, S.P.H.M., and Marques, M.M. (2016). Photobiomodulation of Dental Derived Mesenchymal Stem Cells: A Systematic Review. *Photomedicine and Laser Surgery* 34, 500–508.
13. Buckmaster, R.; Asphahani, F.; Thein, M.; Xu, J.; Zhang, M. Detection of drug-induced cellular changes using confocal raman spectroscopy on patterned single-cell biosensors. *Analyst* 2009, 134, 1440–1446. [CrossRef] [PubMed]
14. S. L. Jacques, “Optical properties of biological tissues: a review,” *Phys. Med. Biol*. 2013. 58(11), R37–61
15. Passarella S, Karu T Absorption of monochromatic and narrow band radiation in the visible and near IR by both mitochondrial and non-mitochondrial photoacceptors results in photobiomodulation. *J Photochem Photobiol B* 2014 140:344–358
16. Liu J,Yu F, Sun Y, Jiang B, ZhangW, Yang J, GT X, LiangA, Liu S . Concise reviews: characteristics and potential applications of human dental tissue-derived mesenchymal stem cells. 2015 .*Stem Cells* 33:627–638
17. Lins, RDAU, Dantas EM, Lucena KCR, Catão, MHCV, Granville-Garcia, AF, Neto, LGC. Bioestimulation effects of low-power laser in repair process. *An Bras Dermatol*. 2010;85(6):849-55.

18. Sommer AP, Pinheiro AL, Mester AR, Franke RP, Whelan HT. Biostimulatory windows in low-intensity laser activation: lasers, scanners, and NASA's light-emitting diode array system. *J Clin Laser Med Surg*. 2001.19:29–33
19. Pöntinen, PJ. Lasers in medicine and dentistry: basic and up-to-date- clinical application of low energy-level laser therapy LLLT. 2000. *Laser acupuncture*. Croatia: Rijeka; Vitgraf. P. 455-475
20. Desmet, KD. et al. Clinical and Experimental Applications of NIR-LED Photobiomodulation. 2006; *Photomedicine and Laser Surgery* Volume 24, Number 2
21. Sutherland JC. 2002. Biological effects of polychromatic light. *Photochem Photobiol* 76:164-70. Tafur J and Mills PJ. 2008. Low-intensity light therapy: exploring the role of redox mechanisms. *Photomed Laser Surg* 26:323-8
22. Huang YY, Chen AC, Carroll JD, Hamblin MR. Biphasic dose response in low level light therapy. 2009. *Dose-Response*, 7:358–383.
23. Djavid GE, Bigdeli B, Goliaei B, Nikoofar A, Hamblin MR. Photobiomodulation leads to enhanced radiosensitivity through induction of apoptosis and autophagy in human cervical cancer cells. *J Biophotonics*. 2017. 10:1732–42.
24. Oliveira Sampaio SC, de C Monteiro JS, Cangussú MC, Pires Santos GM, dos Santos MA, dos Santos JN, et al. Effect of laser and LED phototherapies on the healing of cutaneous wound on healthy and iron-deficient Wistar rats and their impact on fibroblastic activity during wound healing. *Lasers Med Sci*. 2013;28:799-806
25. Karu TI and Afanas'eva NI. Cytochrome c oxidase as the primary photoacceptor upon laser exposure of cultured cells to visible and near IR-range light. *Dokl Akad Nauk*. 1995. 342:693-5.
26. Carnevali CMM, Soares CP, Zângaro RA, Pinheiro ALB, Silva NS. Laser light prevents apoptosis on Cho K-1 cell line. *J Clin Laser Med Surg*. 2003; 1(4):193-6. Karu TI and Kolyakov SF. 2005. Exact action spectra for cellular responses relevant to phototherapy. *Photomed Laser Surg* 23:355-61.
28. Mognato M, Squizzato F, Facchini F, Zaghetto L, Corti Luigi. Cell Growth Modulation of Human Cells Irradiated in Vitro with Low-Level Laser Therapy. *Photomedicine and Laser Surgery*. 2004. Volume 22, Number 6.
29. Tumilty, S, Munn J, McDonough S, Hurley D, Basford J, Baxter D. Low Level Laser Treatment of Tendinopathy: A Systematic Review with Meta-analysis 2010. *Photomedicine and Laser Surgery*. Volume 28, Number. Mary Ann Liebert, Inc. Pp. 3–16
30. Brown GC. Regulation of mitochondrial respiration by nitric oxide inhibition of cytochrome c oxidase. *Biochim Biophys Acta* 2001. 1504:46-57
31. Lane N. 2006. Cell biology: power games. *Nature* 443:901-3.
32. Castro JLF, Pinheiro ALB, Werneck CE, Soares CP. The effect of Laser therapy on the proliferation of oral KB carcinoma cells: an in vitro study. *Photomed Laser Surg*. 2005; 23(6):586-9
33. Melo VA, Anjos DC, Albuquerque Júnior R, Melo DB, Carvalho FU. Effect of low level laser on sutured wound healing in rats. *Acta Cir Bras*. 2011. 26(2):129-34 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21445476>
34. Zecha JA, Raber-Durlacher JE, Nair RG, Epstein JB, Elad S, Hamblin MR, et al. Low-level laser therapy/photobiomodulation in the management of side effects of chemoradiation therapy in head and neck cancer: part 2: proposed applications and treatment protocols. 2016. *Support Care Cancer*
35. Mirza FN, Khatri, K. The use of lasers in the treatment of skin cancer: A review, 2017. *Journal of Cosmetic and Laser Therapy*

36. Houreld, N.N., Masha, R.T., and Abrahamse, H.. Low-Intensity laser irradiation at 660nm stimulates cytochrome c oxidase in stressed fibroblast cells. *Lasers Surg Med.* 2012. 44, 429–434
37. Al-Watban, F. A. H., & Andres, B. L.. *Laser biomodulation of normal and neoplastic cells. Lasers in Medical Science*, 2011. 27(5), 1039–1043.
38. Tagliani MM et al Nutritional stress enhances cell viability of odontoblast-like cells subjected to low level laser irradiation. *Laser Phys Lett.* 2010 .7:247–251].
39. Volpato LER, Oliveira RC, Espinosa MM, Bagnato VS, Machado MAAM, Viability of fibroblasts cultured under nutritional stress irradiated with red laser, infrared laser, and red light-emitting diode. *Journal of Biomedical Optics* 2011, July 16(7), 075004
40. Silva PCS et al. Laser treatment contributes to maintain membrane integrity in stem cells from human exfoliated deciduous teeth (shed) under nutritional déficit. 2018 *Lasers in Medical Science*
41. Souza LM et al Effect of low-level laser therapy on viability and proliferation of stem cells from exfoliated deciduous teeth under different nutritional conditions. *Laser Phys* (2018) 28:1–5
42. Moura-Neto C et al Low-intensity laser phototherapy enhances the proliferation of dental pulp stem cells under nutritional deficiency. *Braz Oral Res* (2016) 30:1
43. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A; Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. 2018, *CA Cancer J Clin.*
44. Leemans, CR. et al. The molecular biology of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer.* 2011;11(1):9-22.
45. Tang, XH. et al. Basal stem cells contribute to squamous cell carcinomas in the oral cavity. *Carcinogenesis.* 2013; 34(5):1158-64.
46. Seoane, J., Warnakulasuriya, S., Varela-Centelles, P., Esparza, G., & Dios, P. *Oral cancer: experiences and diagnostic abilities elicited by dentists in North-western Spain. Oral Diseases*, 2006; 12(5), 487–492. doi:10.1111/j.1601-0825.2005.01225.x
47. Kujan, O., Oliver, R. J., Khattab, A., Roberts, S. A., Thakker, N., & Sloan, P. Evaluation of a new binary system of grading oral epithelial dysplasia for prediction of malignant transformation. *Oral Oncology*, 2006; 42(10), 987–993. doi:10.1016/j.oraloncology.2005.12.014
48. Omura K. Current status of oral cancer treatment strategies: surgical treatments for oral squamous cell carcinoma. *Int J Clin Oncol.* 2014;19(3):423-30.
49. Marur, S; Forastiere AA. Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Update on Epidemiology, Diagnosis, and Treatment. *Mayo Clin Proc.* 2016;91(3):386-96.
50. Argiris, A. et al. Evidence-Based Treatment Options in Recurrent and/or Metastatic Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck. *Front Oncol.* 2017; 7:72.
51. Ausoni, S. et al. Targeting cellular and molecular drivers of head and neck squamous cell carcinoma: current options and emerging perspectives. *Cancer Metastasis Rev.* 2016; 35:413-426.
52. Sonis ST, Hashemi S, Epstein JB, Nair RG, Raber-Durlacher JE. Could the biological robustness of low level laser therapy (Photobiomodulation) impact its use in management of mucositis in head and neck cancer patients. *Oral Oncol.* 2016; 54:7-14

53. Epstein, J. B., Thariat, J., Bensadoun, R.-J., Barasch, A., Murphy, B. A., Kolnick, L., ... Maghami, E. Oral complications of cancer and cancer therapy. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 2012; 62(6), 400–422. doi:10.3322/caac.21157
54. De Sanctis, V., Bossi, P., Sanguineti, G., Trippa, F., Ferrari, D., Bacigalupo, A., Lalla, R. V. *Mucositis in head and neck cancer patients treated with radiotherapy and systemic therapies: Literature review and consensus statements. Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 2016; 100, 147–166.
55. Lalla, R. V., Saunders, D. P., & Peterson, D. E. *Chemotherapy or Radiation-Induced Oral Mucositis. Dental Clinics of North America*, 2014; 58(2), 341–349.
56. Bensadoun, R.-J. *Photobiomodulation or low-level laser therapy in the management of cancer therapy-induced mucositis, dermatitis and lymphedema. Current Opinion in Oncology*, 2018; 1.
57. Elad, S., Arany, P., Bensadoun, R.-J., Epstein, J. B., Barasch, A., & Raber-Durlacher, J. *Photobiomodulation therapy in the management of oral mucositis: search for the optimal clinical treatment parameters. Supportive Care in Cancer*. 2018
58. Gautam, A. P., Fernandes, D. J., Vidyasagar, M. S., Maiya, A. G., & Vadhiraja, B. M. *Low level laser therapy for concurrent chemoradiotherapy induced oral mucositis in head and neck cancer patients – A triple blinded randomized controlled trial. Radiotherapy and Oncology*, 2012; 104(3), 349–354.
59. Antunes, H. S., Wajnberg, G., Pinho, M. B., Jorge, N. A. N., de Moraes, J. L. M., Stefanoff, C. G., ... Ferreira, C. G. *cDNA microarray analysis of human keratinocytes cells of patients submitted to chemoradiotherapy and oral photobiomodulation therapy: pilot study. Lasers in Medical Science*, 2017; 33(1), 11–18.
60. 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.
61. Bensadoun R.J e Nair RG Low-level laser therapy in the prevention and treatment of cancer therapy-induced mucositis: 2012 state of the art based on literature review and meta-analysis. *Curr Opin Oncol* 2012; 24:363–370
62. Sommer, A.P., Pinheiro, A.L., Mester, A.R., et al. Biostimulatory windows in low-intensity laser activation: lasers, scanners and NASA's light-emitting diode array system. *J. Clin. Laser Med. Surg*. 2001;19, 29–33.
63. Worthington HV, Clarkson JE, Bryan G, Furness S, Glenny AM, Littlewood A, McCabe MG, Meyer S, Khalid T Interventions for preventing oral mucositis for patients with cancer receiving treatment. *The Cochrane database of systematic reviews* 2011; 4:CD000978.
64. Pinheiro, A. L. B., Nascimento, S. C., de Barros Vieira, A. L., Brugnera, A., Zanin, F. A., Rolim, A. B., & Soriano da Silva, P. *Effects of Low-Level Laser Therapy on Malignant Cells: In Vitro Study. Journal of Clinical Laser Medicine Surgery*, 2002; 20(1), 23–26.
65. Kreisler, M., Christoffers, A. B., Willershausen, B., & d' Hoedt, B. *Low-level 809 nm GaAlAs laser irradiation increases the proliferation rate of human laryngeal carcinoma cells in vitro. Lasers in Medical Science*, 2003; 18(2), 100–103.
66. Werneck, C. E., Pinheiro, A. L. B., Pacheco, M. T. T., Soares, C. P., & De Castro, J. L. F. *Laser Light Is Capable of Inducing Proliferation of Carcinoma Cells in Culture: A Spectroscopic in Vitro Study. Photomedicine and Laser Surgery*, 2005; 23(3), 300–303.

67. Gomes H. Low-level laser therapy promotes proliferation and invasion of oral squamous cell carcinoma cells. *Lasers Med Sci.* 2014; 29:1385-95.
68. Sperandio FF, Giudice FS, Corrêa L, Pinto DS Jr, Hamblin MR, et.al. Low-level laser therapy can produce increased aggressiveness of dysplastic and oral cancer cell lines by modulation of Akt/ mTOR signaling pathway *J Biophotonics.* 2013; 6: 839–847
69. Schartinger, V. H., Galvan, O., Riechelmann, H., & Dudás, J. *Differential responses of fibroblasts, non-neoplastic epithelial cells, and oral carcinoma cells to low-level laser therapy. Supportive Care in Cancer*, 2011; 20(3), 523–529. doi:10.1007/s00520-011-1113-0
70. Silva DF, Mesquita-Ferrari RA, Fernandes KP, Raele MP, Wetter NU, Deana AM. Effective transmission of light for media culture, plates and tubes. *Photochem Photobiol.* 2012 Sep-Oct;88(5):1211-6.
71. Hawkins-Evans D, Abrahamse H. Efficacy of three laser wavelengths for in vitro wound healing. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2008; 24(4):199-210.
72. Eduardo, F. P., Mehnert, D. U., Monezi, T. A., Zzell, D. M., Schubert, M. M., Eduardo, C. P., & Marques, M. M. *Cultured epithelial cells response to phototherapy with low intensity laser. Lasers in Surgery and Medicine*, 2007; 39(4), 365–372.
73. Bamps, M., Dok, R., & Nuyts, S.. *Low-Level Laser Therapy Stimulates Proliferation in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Cells. Frontiers in Oncology* 2018; 8
74. Karu TI. Photobiological fundamentals of low-power laser therapy. *J Quantum Electron* 1987; 23(10):1703-17.
75. Karu T. Photobiology of low-power laser effects. *Health Phys.* 1989; 56(5):691-704
76. Ibarra, AM. Análise dos efeitos da fotobiomodulação nas características de células-tronco de câncer e no comportamento de linhagens celulares derivadas de carcinoma epidermóide de boca. [Dissertação] Universidade Nove de Julho; 2018
77. Sroka R, Schaffer M, Fuchs C, Pongratz T, Schrader-Reichard U, Busch M et al. Effects on the mitosis of normal and tumor cells induced by light treatment of different wavelengths. *Lasers SurgMed.* 1999; 25(3):263-71.
78. Renno ACM, McDonnell PA, Parizotto NA, Laakso EL. The effects of laser irradiation on osteoblast and osteosarcoma cell proliferation and differentiation in vitro. *Photomed Laser Surg.* 2007; 25(4):275-
79. Karu TI. Low-power laser therapy. In: Vo-Dinh T, editor. *Biomedical photonics handbook.* Boca Raton: CRC Press; 2003.