



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

TATIANA DIAS SCHALCH

**Efeito do laser de baixa intensidade sobre a viabilidade, invasividade e
potencial osteoclastogênico de células de carcinoma epidermóide de
boca**

São Paulo, SP

2016



TATIANA DIAS SCHALCH

**EFEITO DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE SOBRE A VIABILIDADE,
INVASIVIDADE E POTENCIAL OSTEOCLASTOGÊNICO DE CÉLULAS DE
CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE BOCA**

Tese apresentada para defesa de doutorado do Curso de
Doutorado em Biofotônica aplicada às Ciências da Saúde

Orientadora: Profa. Dra. Kristianne Porta Santos Fernandes

Co-Orientadora: Profa. Dra. Maria Helena Raposo Fernandes

São Paulo, SP

2016

São Paulo, 04 de março de 2016

TERMO DE APROVAÇÃO

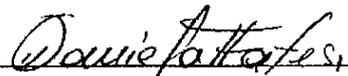
Aluno (a): Tatiana Dias Schaich

Título da Tese: "Efeito do laser de baixa intensidade sobre a viabilidade, invasividade e potencial osteoclastogênico de células de carcinoma epidermóide de boca"

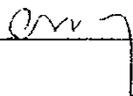
Presidente: PROF^a. DR^a. KRISTIANNE PORTA SANTOS FERNANDES



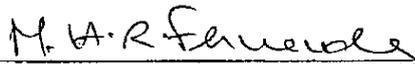
Membro: PROF^a. DR^a. DANIELA DE FÁTIMA TEIXEIRA DA SILVA



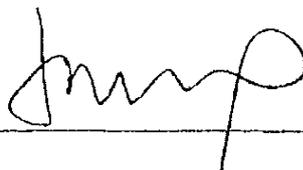
Membro: PROF^a. DR^a. CRISTINE MIRANDA FRANÇA



Membro: PROF^a. DR^a. MARIA HELENA RAPOSO FERNANDES



Membro: PROF. DR. DANIEL ARAKI RIBEIRO



DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu marido **Eduardo Schalch**, por toda sua paciência, parceria, dedicação, amor, carinho e cumplicidade. Você que é meu melhor amigo, meu maior incentivador e o meu maior fã. Obrigada por estar sempre ao meu lado, me incentivando e me ajudando em mais esta etapa. Meus sinceros e eternos agradecimentos, pois sem você nada disso seria possível.

AGRADECIMENTOS

A defesa desta tese marca uma etapa muito importante e única da minha vida. Agradeço aqui todas as pessoas que contribuíram para a realização deste trabalho. A todas elas meus sinceros agradecimentos.

À minha amada mãe **Maria Madalena Dias** por toda sua dedicação, suas palavras de encorajamento, sempre com muito amor e carinho, meu muito obrigada.

Ao meu pai **Pedro da Silva** por todo seu empenho e preocupação com minha educação. Pelo seu exemplo de vida, que sempre me fez correr atrás dos meus objetivos com a mesma garra que você tinha. A você minha gratidão eterna.

Ao meu irmão **Ayres Augusto da Silva**, agradeço pela sua admiração ao meu trabalho, por sempre acreditar em mim e por sempre me receber sorrindo.

À minha irmã do coração **Bianca Fréo** muito obrigada pela sua amizade sincera, por estar sempre por perto me ajudando e incentivando.

À minha orientadora **Profa. Dra. Kristianne Porta Santos Fernandes**, agradeço mais uma vez por ter acreditado em mim. Agradeço sua paciência e toda sua dedicação para a conclusão deste trabalho. Deixo aqui minha eterna gratidão e admiração pela sua competência, honestidade, caráter e integridade, e levo comigo um imenso orgulho por ter tido você sempre ao meu lado em todas as etapas da minha vida acadêmica e profissional. Espero não apenas ter concluído esta etapa, mas sim, atingido a honra ao mérito.

À minha co-orientadora **Profa. Dra. Maria Helena Raposo Fernandes**, agradeço por toda hospitalidade, carinho, dedicação e paciência comigo e com este trabalho.

Ao **Prof. João Costa Rodrigues** agradeço por sua dedicação, empenho e pelos ensinamentos transmitidos durante esse trabalho.

Ao **Prof. Fabio Daumas Nunes** da Faculdade de Odontologia da USP pela doação das células e pela gentileza em permitir que eu utilizasse seu laboratório de cultivo celular.

A todos os alunos do laboratório de pesquisa e alunos de iniciação científica da UNINOVE, especialmente às colegas **Simone Aleksandra de Moraes**, que foi minha parceira nos cultivos celulares e **Kaline de Brito Sousa** que sempre me ajudou de maneira essencial, sendo meu braço direito em todos os experimentos realizados.

A todos os alunos do laboratório de Regeneração Óssea da Universidade do Porto, especialmente à **Mônica Pereira Garcia** por todo coleguismo e por sua colaboração fundamental nos experimentos lá realizados.

Ao colega **Douglas Magno Guimarães**, da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, por ter me ajudado e orientado com a cultura celular e por sua ajuda e experiência imprescindíveis para realização do ensaio de “ferida”.

A **todos os professores** do programa de Doutorado em Biofotônica Aplicada às Ciências da Saúde, que de uma maneira ou outra contribuíram para este trabalho com seus ensinamentos.

Aos funcionários do laboratório de pesquisa da UNINOVE **Ângela e Giovanni** e as secretárias da Pós Graduação **Andrea, Camila, Ligia e Priscila**, obrigada pela colaboração de vocês.

A todos os amigos que fiz durante o Doutorado: **Carol, Luiz, Lara, André, Camila e Fábio**.

A minha amiga e colega de programa **Katia Llanos do Vale** por todo companheirismo, cumplicidade e amizade.

À **Dirce Candia**, minha fiel amiga, agradeço sua admiração ao meu trabalho e pelas palavras de incentivo sempre com muito amor e carinho.

Aos meus professores da graduação e hoje colegas de profissão: **Ana, Carlinhos, Rodrigo e Sérgio** obrigada por despertarem em mim o amor à docência.

Agradeço à **Universidade Nove de Julho (UNINOVE)** pela concessão de bolsa de doutorado, e a **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pela bolsa PROSUP que possibilitou a minha dedicação exclusiva ao Doutorado, e a realização de parte deste projeto na Universidade do Porto em Portugal.

Agradeço a todos os demais **colegas do programa de Doutorado em Biofotônica Aplicada às Ciências da Saúde** e aqueles que diretamente ou indiretamente contribuíram e compartilharam deste trabalho, que será para sempre um marco em minha vida.

Finalmente a **Deus** por sua intercessão em minha vida. Pela oportunidade de ter vivenciado esta experiência única, e por todos os ensinamentos e amadurecimento por ela proporcionados, Amém.

Resumo

O carcinoma epidermóide de boca representa 95% dos cânceres da cavidade oral e seu tratamento normalmente envolve cirurgia, radioterapia

e/ou quimioterapia. A complicação mais comum em pacientes que recebem quimioterapia e radioterapia é a mucosite oral que dependendo de sua severidade pode comprometer a continuidade do tratamento do tumor. O laser em baixa intensidade (LBI) tem sido usado para tratar e prevenir a mucosite, porém ainda existe controvérsia em relação aos efeitos desta irradiação sobre as células tumorais que possam ter permanecido na área a ser irradiada após o tratamento do câncer. O objetivo deste trabalho foi analisar o efeito do LBI (em parâmetros dosimétricos recomendados para o tratamento da mucosite oral) sobre a viabilidade, proliferação, invasividade e potencial osteoclastogênico de uma linhagem de células de carcinoma epidermóide de boca (SCC9). As células foram cultivadas em meio DMEM/F12 suplementado com soro fetal bovino (10%) e hidrocortisona (400 ng/mL). As culturas foram irradiadas com os lasers de InGaAlP (660nm em 40mW- 4J/cm²) e GaAlAs (780nm em 40 e 70mW- 4J/cm²) e avaliadas quanto a sua viabilidade (após 1 e 3 dias pelos ensaios MTT, Cristal Violeta, Vermelho Neutro e atividade da caspase 3), invasividade (pelo ensaio de ferida) e potencial osteoclastogênico (após 2 e 9 dias pela expressão de IL-11 e PTHrP e após 7, 14 e 21 dias pela indução da atividade da TRAP em monócitos). Culturas não irradiadas serviram como controle em todas as avaliações. Os dados foram comparados pela análise de variância complementada pelo teste de Tukey. Os resultados demonstraram que a irradiação com LBI na fluência de 4J/cm², em ambos os comprimentos de onda (660 e 780nm) e potências (40 e 70mW) diminuiu a viabilidade e induziu a apoptose das células da linhagem SCC9. As células irradiadas com LBI de 780nm (em 40 e 70mW) demonstraram menor capacidade de invasão que as do grupo controle não irradiado. Todos os parâmetros dosimétricos avaliados diminuíram a capacidade das SCC9 em induzir a atividade da TRAP e em expressar IL-11. Já a expressão de PTHrP foi menor apenas quando as células foram irradiadas com laser de 780nm na potência de 70mW. Este estudo concluiu que a irradiação com laser de 780nm (70mW, 4J/cm²) diminuiu a viabilidade, o potencial osteoclastogênico e a invasividade de células da linhagem SCC9. O laser de infravermelho de 780nm utilizado com menor potência (40mW, 4J/cm²) e o laser vermelho de 660nm (40mW, 4J/cm²) não demonstraram a mesma capacidade de inibição nestas avaliações. Estes resultados corroboram a importância da escolha da dosimetria na determinação da eficácia e da segurança da fototerapia no tratamento da mucosite oral.

Palavras-chave: SCC9, fototerapia, osteoclastos, mucosite, câncer.

Abstract

Squamous cell carcinoma accounts for 95% of cases oral cancer and treatment normally involves surgery, radiotherapy and/or chemotherapy. Oral

mucositis is the most common complication in patients who receive chemotherapy and radiotherapy. Depending on the severity, this condition can compromise the continuity of cancer treatment. Low-level laser therapy (LLLT) has been used for the treatment and prevention of oral mucositis, but divergent findings are reported regarding the effects of this form of treatment on unintentionally irradiated tumor cells that may remain after cancer treatment. The aim of the present study was to analyze the effect of LLLT (with dosimetric parameters recommended for the treatment of oral mucositis) on the viability, invasiveness and osteoclastogenic potential of a line of oral squamous cell carcinoma (SCC9). The cells were cultured in DMEM/F12 medium supplemented with bovine fetal serum (10%) and hydrocortisone (400ng/mL). The cultures were irradiated with InGaAlP (660nm, 40mW, 4J/cm²) and GaAlAs (780nm, 40 and 70mW, 4J/cm²) lasers. Viability was evaluated after 1 and 3 days using MTT assays, crystal violet, neutral red and caspase 3 activity. Invasiveness was evaluated using the wound assay and osteoclastogenic potential was evaluated after 2 and 9 days based on the expression of IL-11 and PTHrP as well as after 7, 14 and 21 days based on the induction of TRAP activity in monocytes. Non-irradiated cultures served as the control for all evaluations. Statistical analysis involved ANOVA complemented by Tukey's test. Low-level laser with irradiance at a fluence of 4 J/cm², both wavelengths (660 and 780nm) and both output powers (40 and 70mW) led to a reduction in viability as well as induced apoptosis in SCC9 cells. Cells irradiated with 780 nm at output powers of 40 and 70 mW demonstrated less invasive capacity in comparison to the control group. All dosimetric parameters investigated led to a reduction in the ability of SCC9 cells to induce TRAP activity and express IL-11. The expression of PTHrP was only diminished when cells were irradiated at a wavelength of 780nm and output power of 70mW. The present findings demonstrate that laser irradiation at 780nm, 70 mW and 4J/cm² reduced the viability, osteoclastogenic potential and invasiveness of SCC9 cells. In contrast, infrared laser (780 nm) at a lower output power (40 mW and 4J/cm²) and red laser (660 nm, 40mW and 4J/cm²) did not demonstrate the same inhibition capacity. The findings underscore the importance of the choice of dosimetric parameters to the efficacy and safety of phototherapy for the treatment of oral mucositis.

Keywords: SCC9, phototherapy, osteoclasts, mucositis, cancer

Sumário

1.	Contextualização	18
1.1.	Carcinoma Epidermóide	18
1.1.1.	Invasão óssea pelo CEC	19
1.1.2.	Mecanismo de reabsorção óssea	20
1.1.3.	Papel da TRA	22
1.1.4.	Tratamento do CEC	23
2.	Objetivos	26
2.1.	Objetivo geral	26
2.2.	Objetivos específicos	26
3.	Material e Métodos	27
3.1.	Linhagem SCC9 (<i>Squamous Cell Carcinoma</i>)	27
3.2.	Irradiação laser	27
3.3.	Avaliação do efeito do LBI sobre a atividade mitocondrial das células SCC9 (Ensaio MTT)	29
3.4.	Avaliação do efeito do LBI sobre a viabilidade celular das células SCC9 (ensaio Cristal Violeta)	30
3.5.	Avaliação do efeito do LBI sobre a viabilidade celular das células SCC9 (ensaio Vermelho Neutro)	30
3.6.	Avaliação do efeito do LBI sobre a indução de apoptose em células SCC9 (Atividade da Caspase-3)	31
3.7.	Avaliação do efeito do LBI sobre a invasividade das células SCC9 (Ensaio de “Ferida”)	32
3.8.	Avaliação da atividade osteoclastogênica das células SCC9	33
3.8.1.	Capacidade de indução da atividade da TRAP em células mononucleares do sangue periférico	33
3.8.1.a)	Isolamento e cultivo de precursores osteoclásticos	33

3.8.1.b)	Obtenção de meios condicionados das células SCC9	33
3.8.1.c)	Cultura de PBMC com meios condicionados das células SCC9	33
3.8.1.d)	Co-culturas de PBMC e células SCC9	34
3.8.1.e)	Indução da atividade TRAP (<i>Tartrate-Resistant Acid Phosphatase</i>)	34
3.8.2.	Imunomarcção de receptores de vitronectina e calcitonina em PBMC	35
3.9.	Avaliação do efeito do LBI sobre a atividade osteoclastogênica das células SCC9	36
3.9.1.	Indução da atividade TRAP em co-culturas de PMBC e células SCC9 irradiadas	36
3.9.2.	Efeito do LBI sobre as vias de sinalização intracelulares para produção de TRAP	36
3.9.3.	Efeito do LBI sobre a expressão de IL-11 e PTHrP em células SCC9	37
3.10.	Avaliação dos dados	38
4.	Resultados	39
4.1.	Avaliação do efeito do LBI sobre a atividade mitocondrial (Ensaio MTT) das células SCC9	39
4.2.	Avaliação do efeito do LBI sobre a viabilidade celular das células SCC9 (Ensaio Cristal Violeta)	39
4.3.	Avaliação do efeito do LBI sobre a viabilidade celular das células SCC9 (ensaio Vermelho Neutro)	40
4.4.	Avaliação do efeito do LBI sobre a indução de apoptose em células SCC9 (Atividade Caspase 3)	41
4.5.	Avaliação do efeito do LBI sobre a invasividade das células SCC9 (Ensaio de “Ferida”)	42
4.6.	Avaliação da atividade osteoclastogênica das células SCC9	43
4.6.1.	Indução da atividade TRAP em culturas de PBMC com meios condicionados das células SCC9	43

4.6.2.	Indução da atividade TRAP em co-culturas de PBMC e células SCC9	45
4.6.3.	Imunomarcção de receptores de Vitronectina e Calcitonina em PBMC	46
4.7.	Avaliação do efeito do LBI sobre a atividade osteoclastogênica das células SCC9	47
4.7.1.	Indução da atividade TRAP em co-culturas de PBMC e células SCC9 irradiadas	47
4.7.2.	Efeito do LBI sobre as vias de sinalização intracelulares de co-culturas de PBMC e células SCC9 irradiadas	48
4.7.3.	Efeito do LBI sobre a expressão de IL-11 e PTHrP em células SCC	53
5.	Discussão	56
6.	Conclusão	65
7.	Referências Bibliográficas	66
8.	Anexo I - Full Article	78

Lista de Tabelas

Tabela 1-	Parâmetros usados para as irradiações: comprimento de onda, potência de saída, potência efetiva, área irradiada, densidade de potência efetiva, densidade de energia total efetiva e tempo de irradiação.	29
Tabela 2-	Primers utilizados para análise do RT-PCR das células SCC9	38
Tabela 3-	Análise de todos os resultados da linhagem SCC9 e co-cultura com PBMC. As setas indicam os parâmetros que aumentaram ou diminuíram, significativamente em relação ao controle, a resposta celular quanto aos experimentos. Os parâmetros que não tiveram alterações significantes não foram aqui ilustrados.	55

Lista de Figuras

Figura 1-	Processo de diferenciação dos osteoclastos	21
Figura 2-	Processo de reabsorção óssea	22
Figura 3-	Vias de Sinalização da Osteoclastogênese	23
Figura 4-	Aparelho Twin-laser (MM Optics, São Carlos – SP - Brasil) sendo utilizado para irradiação das células na parte inferior dos tubos de centrifugação.	28
Figura 5-	Percentual de atividade mitocondrial (ensaio de MTT) de células SCC9 (10^4 células/poço) após com irradiação laser (660nm e 780nm) e incubação por 1 e 3 dias em relação à atividade mitocondrial das células não irradiadas (controle) no dia 1.	39
Figura 6-	Percentual de viabilidade (ensaio Cristal Violeta) de células SCC9 (10^4 células/poço) após a irradiação com laser (660nm e 780nm) e incubação por 1 e 3 dias, em relação à viabilidade das células não irradiadas (controle) no dia 1.	40
Figura 7-	Percentual de viabilidade celular (ensaio Vermelho Neutro) de células SCC9 (10^4 células/poço) após irradiação laser (660nm e 780nm) e incubação por 1 e 3 dias em relação à viabilidade das células não irradiadas (controle) no dia 1	41
Figura 8-	Percentual de atividade da Caspase 3 (Apoptose Celular) de células SCC9 (10^4 células/poço) irradiadas com laser (660nm e 780nm) e incubadas por 3 dias em relação às células não irradiadas (controle).	42
Figura 9-	Invasividade (Ensaio de Ferida). Os resultados correspondem à média do percentual remanescente da área da ferida original de cada grupo após os diferentes períodos de avaliação.	43
Figura 10-	Percentual de atividade da TRAP das culturas PBMC (em relação a atividade da TRAP do controle positivo no dia 7) após 7, 14 e 21 dias de cultivo. As culturas de PBMC cultivadas com meio de cultura padrão (controle negativo), tratadas com M-CSF e RANKL (controle positivo) ou com meios condicionados obtidos de	

	culturas de células SCC9 (de 2 e 14 dias) usados na concentração de 10 ou de 20%.	45
Figura 11-	Percentual de atividade da TRAP (em relação ao controle positivo no dia 7) após 7, 14 e 21 dias de cultura de PBMC cultivadas com meio de cultura padrão (controle negativo), tratadas com M-CSF e RANKL (controle positivo) ou co-cultivadas com células SCC9 (10^4 células/poço).	46
Figura 12-	Imunomarcagem para anéis de actina (azul) e expressão de receptores de vitronectina e calcitonina (verde) nas PBMC cultivadas com agentes indutores de diferenciação osteoblástica (M-CSF e RANK-L) ou com células SCC9.	47
Figura 13-	Percentual de atividade da TRAP (após 7, 14 e 21 dias de cultura) de PBMC co-cultivadas com células SCC9 (10^4 células/poço) irradiadas com laser (660nm e 780nm) em relação a atividade da TRAP das co-culturas de PBMC+SCC9 não irradiadas (no dia 7).	48
Figura 14-	Percentual de atividade da TRAP nas co-culturas PBMC+SCC9 mantidas com o inibidor U0126 (via de sinalização da MEK) em relação às co-culturas de PBMC+SCC9 não tratadas com inibidor no dia 14.	49
Figura 15-	Percentual de atividade da TRAP nas co-culturas PBMC+SCC9 mantidas com o inibidor SB202190 (via de sinalização da p38) em relação às co-culturas de PBMC+SCC9 não tratadas com inibidor no dia 14.	50
Figura 16-	Percentual de atividade da TRAP nas co-culturas PBMC+SCC9 mantidas com o inibidor PDTC (via de sinalização do NFκB) em relação às co-culturas de PBMC+SCC9 não tratadas com inibidor no dia 14.	51
Figura 17-	Percentual de atividade da TRAP nas co-culturas PBMC+SCC9 mantidas com o inibidor SP600125 (via de sinalização JNK) em relação às co-culturas de PBMC+SCC9 não tratadas com inibidor no dia 14.	53
Figura 18-	Expressão de IL-11 (após 2 e 9 dias de cultura) nas células SCC9 ($2,5 \times 10^6$ células/placa) irradiadas com laser (660nm e 780nm) em relação às células SCC9 (controle dia 2).	54

Figura 19- Expressão de PTHrP (após 2 e 9 dias de cultura) nas células SCC9 ($2,5 \times 10^6$ células/placa) irradiadas com laser (660nm e 780nm) em relação às células SCC9 (controle dia 2).

55

BrdU	Bromodeoxiuridina
CEC	Carcinoma Espinocelular
CO ₂	Dióxido de Carbono
CTR	Calcitonina
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DV	Desvio Padrão
GaAIs	<i>Gallium-Aluminum-Arsenide</i>
GAPDH	<i>Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase</i>
HPV	Human Papiloma Virus
IL-11	Interleucina
INCA	Instituto Nacional do Câncer
InGaAlP	<i>Indium Gallium Aluminium Phosphide</i>
JNK	<i>c-Jun N-terminal Kinases</i>
LBI	Laser de Baixa Intensidade
MAPK	<i>Mitogen Activated Protein Kinases</i>
M-CSF	<i>Macrophage Colony Stimulating Factor</i>
MEK	<i>Methyl Ethyl Ketone</i>
MTT	<i>3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide</i>
NFκB	Factor Nuclear Kappa B
PBMC	Células Mononucleares do Sangue Periférico
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
PDTC	<i>Pyrrolidinedithiocarbamate Ammonium</i>
pNPP	<i>para-Nitrophenilphosphate</i>
PTHrP	Hormônio Relacionado a Proteína da Paratireóide
RANK	Receptor Ativador do Fator Nuclear Kappa B

RANKL	Receptor Ativador do Fator Nuclear Kappa B Ligante
RT-PCR	Reação em Cadeia de Polimerase - Tempo Real
SCC9	<i>Squamous Cell Carcinoma</i>
SZ	Zona de Selamento
TGF β	Fator de Crescimento de Transformação β
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TRAP	Fosfatase Ácida Resistente ao Tartarato
VNR	Vitronectina
v/v	Volume a volume

1. Contextualização

1.1. Carcinoma Epidermóide

O carcinoma epidermóide de boca, também conhecido como carcinoma espinocelular (CEC) ou carcinoma de células escamosas, é uma neoplasia maligna que se origina no epitélio de revestimento (Kademani *et al.* 2005). Esta neoplasia tem como característica a invasão tecidual e alta taxa de metástase para os linfonodos cervicais (Deyama *et al.* 2008, Tang *et al.* 2008, Chuang *et al.* 2009, Tada *et al.* 2009, Van Cann *et al.* 2009).

Mais de 500 mil pessoas são diagnosticadas com CEC por ano, sendo este o quinto tipo de câncer mais comum em todo o mundo. Na Ásia é a neoplasia mais comum e nos Estados Unidos é responsável por 3,3% das neoplasias malignas (Saba *et al.* 2011). No Brasil, a estimativa do Instituto Nacional do Câncer (INCA 2015) indicava 11.280 novos casos de câncer da cavidade oral em homens e 4.010 em mulheres para o biênio 2016/2017, sendo que este câncer seria o quarto mais frequente entre os homens (15,48 novos casos a cada 100 mil homens) e o nono entre as mulheres (4,88 novos casos a cada 100 mil mulheres) na região Sudeste (INCA 2015).

Os principais fatores de risco desta doença são: o tabagismo, o etilismo, a infecção pelo HPV (*Human Papiloma Virus*) principalmente pelo tipo 16 em adultos jovens, e a exposição à radiação solar nos casos de câncer de lábio (INCA 2015; Moore II & Mehta 2015). Dentre esses fatores, os que mais se destacam são os dois primeiros (INCA 2015, Varoni *et al.* 2015), sendo que o risco está relacionado com a longevidade, intensidade e frequência dos hábitos (INCA 2015).

O CEC acomete normalmente a língua, os lábios, o assoalho da boca ou a gengiva (Tada *et al.* 2009, Siegel *et al.* 2012). Os tumores de língua representam 50% de todos os tumores da cavidade oral (Saba *et al.* 2011, Siegel *et al.* 2012). Já o carcinoma de gengiva é o segundo carcinoma mais comum da cavidade oral (Jimi *et al.* 2011) sendo que cerca de 70% dos casos ocorrem na mandíbula e 30% na maxila e costuma acometer mais a gengiva inserida do que a gengiva livre ou a região edêntula (Sheikh & D'Souza 2012). A lesão primária do CEC é geralmente caracterizada por uma superfície com lesões elevadas e presença

de eritema (Jimi *et al.* 2011), na maior parte dos casos a progressão deste tumor é lenta e indolor, o que torna o diagnóstico tardio (Kademani *et al.* 2005).

1.1.1. Invasão óssea pelo CEC

A invasão dos ossos mandibulares ou maxilares pelo CEC é um sinal de que o tumor está no estágio IV sendo o prognóstico considerado ruim. O CEC de gengiva costuma invadir mais facilmente o osso mandibular e maxilar subjacente do que o carcinoma de língua e costuma acarretar quadros de fraturas acompanhados de algia intensa que diminuem drasticamente a qualidade de vida dos pacientes principalmente após a sua ressecção (Iguchi *et al.* 1996, Deyama *et al.* 2008, Tang *et al.* 2008, Chuang *et al.* 2009, Tada *et al.* 2009, Van Cann *et al.* 2009, Jimi *et al.* 2011).

Acredita-se que a reabsorção óssea promovida pelo CEC é realizada pelos osteoclastos com mediação dos osteoblastos, porém as células tumorais atuam decisivamente neste processo (Tang *et al.* 2008, Chuang *et al.* 2009, Tada *et al.* 2009, Jimi *et al.* 2011).

Já foi demonstrado, por exemplo, que as células de CEC oral são capazes de produzir várias substâncias ligadas ao processo de reabsorção óssea por osteoclastos, como: as prostaglandinas E2 e F2, as citocinas TGF β , IL-1 β , IL-6, IL-11, TNF- α e a PTHrP (proteína ligada ao paratormônio) (Carter *et al.* 1983, Guise and Mundy 1998, Shibahara *et al.* 2005, Kayamori *et al.* 2010, Jimi *et al.* 2011). Além disso, já foi reportado que pacientes com CEC de cabeça e pescoço apresentam níveis séricos elevados de IL-6 (Jabonska *et al.* 1997; Chen *et al.* 1999; Duffy *et al.* 2008) e que a IL-6, a IL-11, o TNF α e a PTHrP estão altamente expressos nos casos de CEC gengival invasivo (Shibahara *et al.* 2005).

As citocinas IL-1, TNF- α , IL-6 e IL-11 atuam de maneira sinérgica participando do mecanismo de reabsorção óssea realizada pelos osteoclastos, principalmente pela indução da expressão de RANKL (ligante do receptor ativador do fator nuclear *kappa* B) em osteoblastos, mas podem também agir diretamente sobre os osteoclastos nas diferentes fases de sua ativação e diferenciação (O'Brien *et al.* 1999, Shibahara *et al.* 2005, Matsuo & Irie 2008, Kayamori *et al.* 2010). Já a PTHrP é capaz de estimular a atividade osteoclástica através da indução da produção de IL-6, TNF e RANKL (Shibahara *et al.* 2005, Nagamine *et al.* 2006, Nomura *et al.* 2007, Kayamori *et al.* 2010, Lv *et al.* 2014).

No mecanismo de invasão óssea pelo tumor, o papel da PTHrP e da IL-11 é tão importante, que são consideradas indicadores de prognóstico (Shibahara *et al.* 2005, Nagamine *et al.* 2006, Wu *et al.* 2013, Lv *et al.* 2014).

1.1.2. Mecanismo de reabsorção óssea

Os osteoclastos são derivados da mesma linhagem hematopoiética que os macrófagos. Seu processo de diferenciação e ativação pode envolver a ação coordenada de várias vias de sinalização (figura 1), sendo que as citocinas M-CSF (fator estimulante de colônias de macrófagos) e RANKL, produzidas principalmente pelos osteoblastos, são consideradas as principais responsáveis pela sua diferenciação, proliferação e ativação (Kameda *et al.* 2013, Zupan *et al.* 2013, Nie *et al.* 2016).

O M-CSF, por exemplo, induz as células precursoras de osteoclastos a expressarem a molécula RANK. O RANKL (presente na superfície dos osteoblastos) interage com a molécula RANK (presente na superfície de precursores de osteoclastos e também osteoclastos maduros) e esta ligação dá início a uma cascata de eventos intracelulares que culmina na ativação, migração, diferenciação e fusão das células precursoras formando os osteoclastos e dando início ao processo de reabsorção óssea (Kameda *et al.* 2013, Zupan J, Jeras M, Marc J. 2013, Georgess *et al.* 2014, Nie *et al.* 2016) (figura 1).

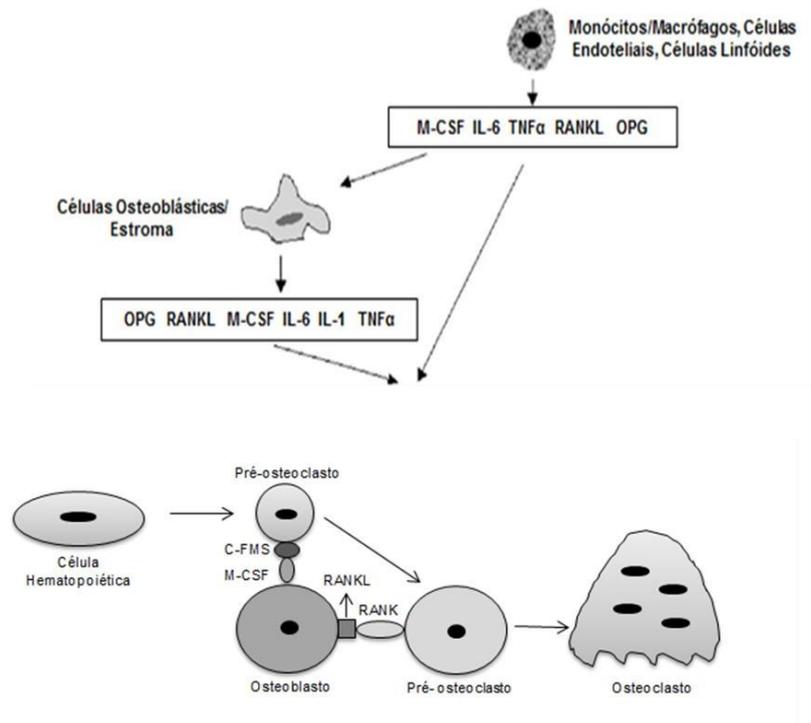


Figura 1: Processo de diferenciação dos osteoclastos. (Adaptada de Kwan Tat 2004).

A reabsorção óssea (figura 2) se inicia a partir do momento em que os osteoclastos se aderem à matriz do osso mineralizado e formam a zona de selamento, que servirá para a criação de um microambiente que separa o local de reabsorção ativa das regiões adjacentes que não serão afetadas. A criação deste microambiente é obtida a partir do rearranjo das fibras de actina que formam os anéis de actina e da ligação entre a integrina $\alpha\beta 3$ (também denominada receptor de vitronectina - VNR) à vitronectina óssea (Boyce 2013, Georgess et al. 2014).

Os osteoclastos desenvolvem ainda uma área ondulada da sua membrana que é o resultado da fusão de vesículas lisossomais secretoras, através da qual são secretadas substâncias como íons H^+ (que irão dar origem ao ácido clorídrico), a catepsina K, metaloproteinase 9 (MMP-9) e fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) que conjuntamente irão degradar as porções mineral e orgânica da matriz óssea (Boyce 2013).

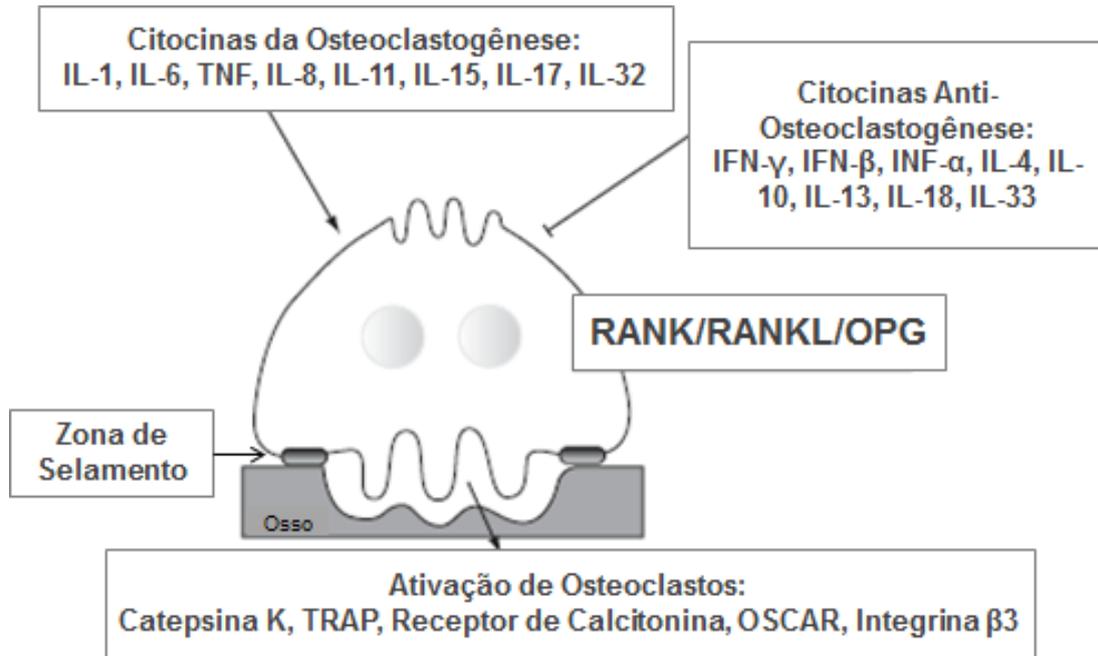


Figura 2: Processo de reabsorção óssea. (Adaptada de Zupanet al. 2013, Georgess et al. 2014).

1.1.3. Papel da TRAP

A TRAP (fosfatase ácida resistente ao tartarato) é uma glicoproteína catiônica que promove a desfosforilação das fosfoproteínas da matriz óssea mineralizada (Saraiva & Lazaretti-Castro et al. 2002, Andersson et al. 2003, Blumer et al. 2012). Várias vias de sinalização podem ativar a sua produção, dentre elas, a via da MEK (quinase ativadora de MAPK), da p38, do NF κ B (fator nuclear kappa B) e da JNK (c-Jun N-terminal quinase) (Hotokezaka et al. 2002, Nie et al. 2016).

Figura 3

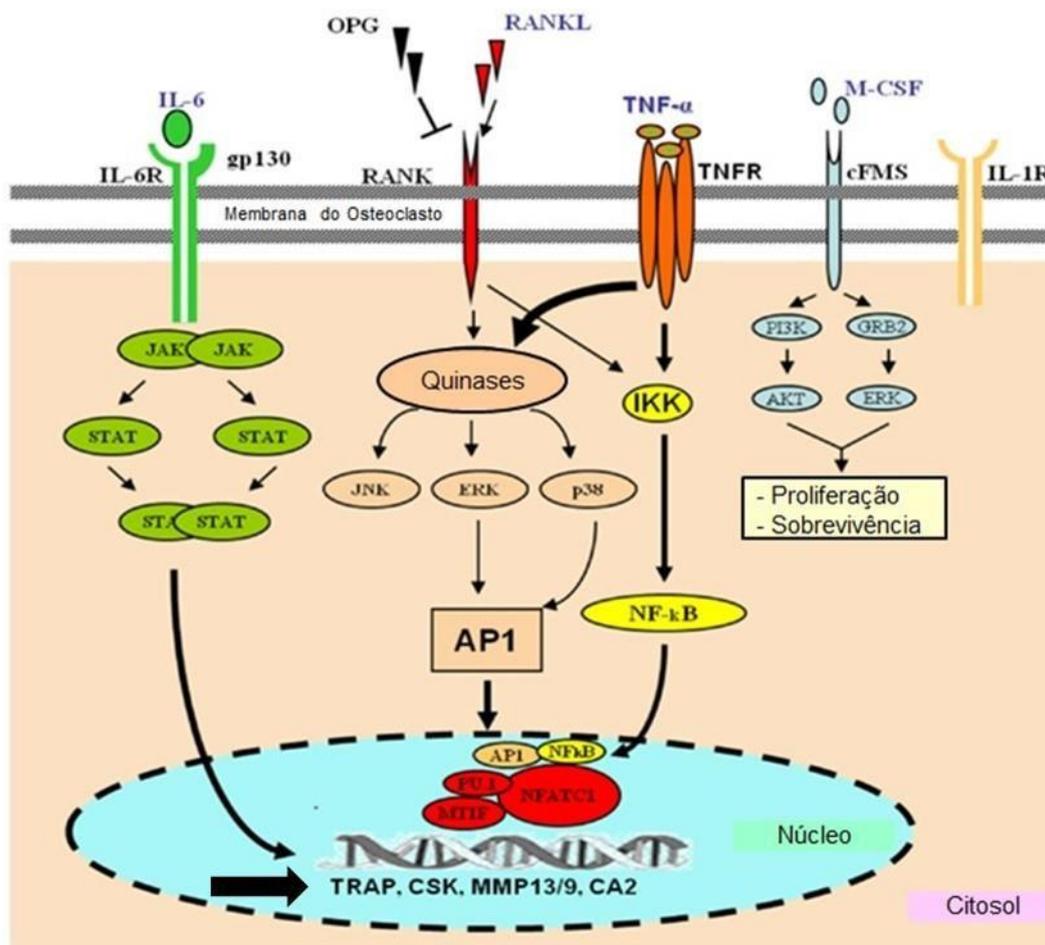


Figura 3: Vias de Sinalização da Osteoclastogênese. (Adaptada de Osta B, Benedetti G, Miossec P, 2014).

Recentemente alguns estudos sugeriram que a expressão de TRAP em um ambiente tumoral é um indicador de um prognóstico ruim em tumores com metástases ósseas (Honig et al., 2006, How et al. 2014) e melanomas (Scott et al., 2011, How et al. 2014).

1.1.4. Tratamento do CEC

O tratamento do CEC oral envolve não só a ressecção cirúrgica, mas também a radioterapia ou radioterapia combinada com a quimioterapia (Kademani *et al.* 2005, Goda *et al.* 2010).

A complicação mais comum em pacientes que receberam quimioterapia e radioterapia é a mucosite oral, que acomete aproximadamente 12% dos pacientes que recebem quimioterapia e de 80 a 100% dos pacientes que receberam quimioterapia e radioterapia (Cruz *et al.* 2007, Antunes *et al.* 2008, Genot-Klasterky *et al.* 2008, Simões *et al.* 2009, Bensadoun & Nair 2012, Gouvêa de Lima *et al.* 2012, Antunes *et al.* 2013, Bensadoun & Nair 2015).

A mucosite é uma inflamação da mucosa oral e da orofaringe, caracterizada pela presença de áreas de eritema, edema e hemorragia que progridem para ulcerações com ou sem formação de pseudomembrana (Antunes *et al.* 2008, Antunes *et al.* 2013, Al-Ansari *et al.* 2015). As lesões ocorrem mais comumente nos lábios, borda lateral de língua e assoalho bucal (Rosenthal & Trotti 2009). A ocorrência da mucosite limita o consumo de alimentos devido à dor e ao desconforto ao mastigar e/ou engolir, além de reduzir a superfície intestinal de absorção, aumentando o risco de desnutrição (Cruz *et al.* 2007, Simões *et al.* 2009) e de infecções graves (Antunes *et al.* 2008, Bensadoun & Nair 2012, Gouvêa de Lima *et al.* 2012, Antunes *et al.* 2013, Al-Ansari *et al.* 2015, Bensadoun & Nair 2015). Todo esse quadro faz da ocorrência da mucosite uma limitação para a continuidade do tratamento do tumor (Genot-Klasterky *et al.* 2008, Simões *et al.* 2009, Gouvêa de Lima *et al.* 2012, Al-Ansari *et al.* 2015).

Originalmente, a prevenção e o tratamento da mucosite oral eram baseados em cuidados paliativos como bochechos, crioterapia, anti-inflamatórios, antibióticos e lubrificantes (Lilleby *et al.* 2006, Gori *et al.* 2007, Simões *et al.* 2009, Bensadoun & Nair 2012).

Porém, estudos clínicos randomizados e controlados descritos em revisões sistemáticas (Kreisler *et al.* 2004, Nes & Posso 2005, Arora *et al.* 2008, Bensadoun & Nair 2012) tem demonstrado que o LBI é eficaz no tratamento da mucosite oral, especialmente na redução da dor e cicatrização das lesões da mucosa (Pourreau Schneider *et al.* 1990, Simões *et al.* 2009, Bensadoun & Nair 2012).

A revisão sistemática de Bensadoun & Nair (2012) indicou que o tratamento para mucosite oral deve ser realizado com a dose de 4J/cm² por ponto em aparelhos que emitam laser vermelho ou infravermelho com potências de saída de 10 a 150 mW. Assim sendo, os parâmetros dosimétricos utilizados neste estudo foram baseados nesta revisão.

Por outro lado, alguns estudos afirmam que o LBI deve ser evitado ou usado com muita cautela em pacientes portadores de câncer de cabeça e pescoço ou que foram acometidos pela doença pela possibilidade de efeitos diretos e indiretos do LBI sobre as células tumorais que poderiam ser irradiadas não intencionalmente durante o tratamento da mucosite (Pinheiro *et al.* 2002, Schartinger *et al.* 2012, Sperandio *et al.* 2013, Gomes Henriques *et al.* 2014,

Hawkins, Hourel, and Abrahamse 2005, Myakishev-Rempel *et al.* 2012, Sperandio *et al.* 2013, Sonis *et al.* 2016).

O presente estudo visou contribuir para esta questão, avaliando os efeitos do LBI, em parâmetros dosimétricos recomendados para o tratamento da mucosite oral, sobre a viabilidade, proliferação, ciclo celular, capacidade de invasão e potencial osteoclastogênico das células derivadas de carcinoma epidermóide de boca da linhagem celular SCC9 (*squamous cell carcinoma*).

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Avaliar o efeito da irradiação laser, em parâmetros indicados para o tratamento da mucosite, sobre células derivadas de carcinoma epidermóide de boca da linhagem SCC9 (*squamous cell carcinoma*).

2.2. Objetivos específicos

Avaliar o efeito do LBI sobre:

- A viabilidade das células SCC9 (ensaios MTT, Cristal Violeta, Vermelho Neutro);
- A apoptose das células SCC9 (atividade da Caspase 3);
- A invasividade das células SCC9 (ensaio de ferida);
- A atividade osteoclastogênica das células SCC9 (expressão gênica de IL-11 e de PTHrP e indução da atividade da TRAP quando em co-cultura com osteoclastos).

3. Material e Métodos

3.1. Linhagem SCC9 (*Squamous Cell Carcinoma*)

A linhagem SCC9 (*squamous cell carcinoma* - ATCC®), derivada carcinoma epidermóide de humanos, foi cultivada no meio de cultura DMEM/F-12 (Vitrocell, Campinas, SP, Brasil) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Vitrocell, Campinas, SP, Brasil) e 400 ng/ml de hidrocortisona. As culturas foram mantidas em estufa (HEPA class 3110, Thermo Electron Corporation, Marietta, OH, EUA) a 37°C, numa atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. A monitorização do crescimento celular foi feita a cada 24 horas, utilizando-se microscópio invertido de fase (Eclipse TE 2000U, Nikon, Melville, NY, EUA) e o subcultivo realizado quando a monocamada celular se tornava subconfluyente para perpetuar a linhagem celular. Antes de cada ensaio, a viabilidade das células foi avaliada por contagem com corante vital azul de Trypan (0,4%) em câmara de Neubauer sendo utilizadas nos ensaios somente as culturas com viabilidade maior que 95%.

3.2. Irradiação laser

Para os ensaios, as células SCC9 foram contadas, divididas em tubos Falcon e centrifugadas a 262g a 20°C por 5 minutos (Centrífuga Excelsa 4-280R, Fanem, São Paulo, SP, Brasil). As culturas foram irradiadas utilizando o aparelho Twin-laser (MM Optics, São Carlos – SP - Brasil), uma única vez.



Figura 4: Aparelho Twin-laser (MM Optics, São Carlos – SP - Brasil) sendo utilizado para irradiação das células na parte inferior dos tubos de centrifugação.

Os parâmetros dosimétricos levaram em conta as recomendações de uma revisão sistemática recente (Bensadoun & Nair 2012) que indica que o tratamento para mucosite oral deve ser realizado com a dose de $4\text{J}/\text{cm}^2$ por ponto em aparelhos que emitam laser vermelho ou infravermelho com potências de saída de 10 a 150 mW.

Para calcular o tempo das aplicações foi usada a fórmula descrita na referida revisão:

$$\text{TEMPO (s)} = \frac{\text{DOSE (J}/\text{cm}^2) \times \text{área irradiada (cm}^2)}{\text{POTÊNCIA (W)}}$$

As irradiações se deram na extremidade inferior dos tubos de centrifugação contendo os precipitados celulares (conforme descrito anteriormente por Fujihara *et al.* 2006).

Os dados referentes aos diferentes parâmetros dosimétricos utilizados neste estudo constam da tabela 1. O termo “efetivo/a” se refere aos valores remanescentes após passagem da luz pelo plástico dos tubos, que conforme descrito por Silva *et al.* 2012, corresponde a 75% do valor de saída para o laser

vermelho (660 nm) e a 77% do valor de saída para o laser infravermelho (780 nm).

Tabela 1: Parâmetros usados para as irradiações: comprimento de onda, potência de saída, potência efetiva, área irradiada, densidade de potência efetiva, densidade de energia total efetiva e tempo de irradiação.

comprimento de onda (nm)	660	780	780
potência de saída (mW)	40	40	70
potência efetiva (mW)	30	30,8	53,9
área irradiada (cm ²)	0,19	0,19	0,19
área saída do feixe (cm ²)	0,14	0,14	0,14
densidade de potência efetiva (mW/cm ²)	214,3	220,0	385,0
densidade de energia na abertura (J/cm ²)	5,4	5,4	5,4
densidade de energia no área irradiada (J/cm ²)	4	4	4
energia EFETIVA (J)	0,76	0,76	0,76
tempo (s)	25,3	24,7	14,1

3.3. Avaliação do efeito do LBI sobre a atividade mitocondrial das células SCC9 (Ensaio MTT)

O ensaio MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) é amplamente utilizado para avaliar a viabilidade e proliferação celular. O MTT é um sal hidrossolúvel, de cor amarela, que quando em contato com células viáveis é convertido em cristais de formazan, principalmente pela ação da enzima succinato desidrogenase presente nas mitocôndrias. Como os cristais tem cor azul escura, sua dissolução gera uma coloração que pode ser mensurada em espectrofotômetro. Acreditava-se que a enzima succinato desidrogenase das mitocôndrias era a única responsável por reduzir o sal MTT a cristal de formazan (Saravanan et al., 2003). Porém já foi demonstrada a formação de cristais de formazan no reticulo endoplasmático, endossomos/lisossomos e na membrana plasmática (Stockert et al. 2012).

Para este ensaio, após as irradiações (conforme descrito no item 3.2), as células foram distribuídas em placas de 96 poços, na concentração de 1×10^4 células/poço, e permaneceram incubadas a 37°C em um ambiente úmido com 5% de CO₂ por 1 e 3 dias. Ao final dos períodos experimentais, a atividade mitocondrial foi avaliada por meio do ensaio MTT. Para tanto, o MTT (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) foi adicionado às culturas celulares numa concentração de 0,1 mg/mL e as células foram incubadas no mesmo ambiente por 3 horas. Depois deste período, 100 µL de DMSO (Dimetilsulfóxido, Thermo

Fisher Scientific, Rockford, USA) foi adicionado em cada poço para dissolver os cristais formazan. A absorvância das amostras foi mensurada a 550nm usando um leitor de ELISA (Synergy HT, Biotek, Winooski, Vermont, USA). Os dados de densidade óptica (DO) medidos como absorvância correspondem à atividade mitocondrial. Foram realizados três experimentos em triplicata.

3.4. Avaliação do efeito do LBI sobre a viabilidade celular das células SCC9 (ensaio Cristal Violeta)

O cristal violeta é um corante muito utilizado para ensaios de viabilidade de células aderentes em monocamada. O corante é absorvido pelas células viáveis corando o DNA. A intensidade da cor mensurada pelo espectrofotômetro está relacionada ao número de células viáveis (Ishiyama *et al.* 1996, Vega-Avila & Pugsley 2011).

Para este ensaio, as culturas de células SCC9 foram contadas, irradiadas (conforme descrito no item 3.2, tabela 1) e imediatamente plaqueadas (quadruplicata) na concentração de 1×10^4 células/poço em placas de 96 poços que ficaram incubadas em um ambiente úmido com 5% de CO₂ por 1 e 3 dias. Após estes períodos, as placas foram lavadas com 100 µL de PBS por poço, e coradas com 40 µL de solução de Cristal Violeta a 0,5% (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) em 30% de ácido acético por 15 minutos, em temperatura ambiente, sendo lavadas 2 vezes com água destilada após esse período. O cristal violeta foi solubilizado com a adição de 100 µL de metanol por poço. A absorvância foi medida a 550nm usando um leitor de microplacas (SpectraMax i3 Imaging Cytometer, Molecular Devices, Califórnia USA), a absorvância corresponde ao número de células viáveis. Foram realizados três experimentos em quadruplicata.

3.5. Avaliação do efeito do LBI sobre a viabilidade celular das células SCC9 (ensaio Vermelho Neutro)

O corante Vermelho Neutro é um corante ligeiramente catiônico, que penetra na membrana celular de células viáveis por difusão passiva não-iônica e se concentra nos lisossomos, sendo que somente as células viáveis são capazes de realizar a sua incorporação (Arbo *et al.* 2014).

Para este ensaio, as culturas de células SCC9 foram contadas, irradiadas (conforme descrito no item 3.2) e imediatamente plaqueadas (quadruplicata) na concentração de 1×10^4 células/poço em placas de 96 poços e incubadas em um ambiente úmido com 5% de CO₂ por 1 e 3 dias. Após estes períodos, o meio de cultura foi removido, as placas receberam 200 µL de solução de vermelho neutro (40µg/ml) por poço. Após incubação por 3 horas em estufa a 37°C, a solução foi desprezada e cada poço recebeu 200µL de solução de CaCl₂ em formaldeído. Após 2 minutos em temperatura ambiente, o formaldeído foi removido e 200µL de solução de ácido acético (1%) foram adicionados em cada poço. A placa foi agitada por 5 minutos até a completa homogeneização do corante e a absorbância foi medida a 550nm usando um leitor de microplacas (SpectraMax i3 Imaging Cytometer, Molecular Divices, Califórnia USA). A absorbância correspondente ao número de células viáveis. Foram realizados três experimentos em quadruplicata.

3.6. Avaliação do efeito do LBI sobre a indução de apoptose em células SCC9 (Atividade da Caspase-3)

As caspases (*cysteine-dependent aspartate-specific proteases*) clivam substratos que possuam resíduos de aspartato, levando a condensação e fragmentação do núcleo e externalização dos fosfolipídios de membrana, gerando um sinal para que a célula seja fagocitada. São conhecidas 14 caspases, sendo que 6 destas estão envolvidas com o mecanismo da apoptose, são elas: Caspase 3, 6, 7, 8, 9 e 10. A caspase 3 é uma caspase efetora, as caspases efetoras são responsáveis pela clivagem dos substratos, como a proteína que se liga à p53, que ao ser clivada se transloca para o núcleo ativando a transcrição de genes pró apoptóticos (Grivicich et al. 2007).

Para este ensaio, após a irradiação (conforme descrito no item 3.2) as células foram distribuídas em placas de 96 poços, na concentração de 1×10^4 células/poço, e incubadas em um ambiente úmido com 5% de CO₂ por 3 dias. A indução da apoptose foi avaliada utilizando o ensaio EnzChek® Caspase-3 Assay kit#2 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) seguindo as instruções do fabricante. Resumidamente, as células foram lavadas com PBS e depois lisadas por 30 minutos utilizando solução tampão (20X cell lysis buffer, do Kit). A solução

de trabalho com substrato foi adicionada aos poços e as placas foram incubadas por 30 minutos no escuro à temperatura ambiente. A fluorescência foi medida a 485 / 528 nm (excitação / emissão) usando um leitor de placas (Synergy HT, Biotek, Winooski, Vermont, USA). Os dados da fluorescência correspondem a atividade da caspase. Foram realizados três experimentos em triplicata.

3.7. Avaliação do efeito do LBI sobre a invasividade das células SCC9 (Ensaio de “Ferida”)

O ensaio de ferida é uma técnica muito utilizada para avaliar a migração celular, pois tem uma metodologia simples, e possibilita a visualização das células durante o processo de fechamento do espaço gerado pela remoção mecânica da monocamada celular (ferida). A avaliação da migração das células tumorais é um passo importante, para estimar a capacidade de invasão e metástase de um tumor (Riahi *et al.* 2012)

Para este ensaio, as culturas de células SCC9 foram irradiadas (conforme descrito no item 3.2) e imediatamente inseridas em placas de 6 poços. As placas foram incubadas em ambiente úmido com 5% de CO₂ até atingir a confluência. Após este período, o meio foi aspirado e foi feita (com o auxílio de uma ponteira de 10µL) uma “ferida” em forma de cruz, pela remoção da monocamada celular. Os poços foram lavados com PBS para remoção das células desaderidas e foi adicionado novo meio de cultivo. As imagens dos poços foram obtidas com uma câmera fotográfica (Axio Cam HRc-Zeiss, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha) acoplada a um microscópio invertido de contraste de fase (Zeiss®Axiovert 25 – Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha) a cada 12 horas até que a ferida estivesse completamente fechada. Pontos de referência foram demarcados no fundo de cada placa para assegurar que as imagens fossem feitas sempre na mesma posição. A área sem células (ferida) foi mensurada com auxílio do Software NIS-elements D 3.1 (Nikon, Toquio, Japão). Foram calculadas as médias das áreas mensuradas de três experimentos realizados em triplicata. Os resultados de cada período de avaliação, foram expressos em percentual em relação à área da ferida original de cada grupo experimental.

3.8. Avaliação da atividade osteoclastogênica das células SCC9

3.8.1. Capacidade de indução da atividade da TRAP em células mononucleares do sangue periférico

a) Isolamento e cultivo de precursores osteoclásticos

Células mononucleares do sangue periférico (PBMC, do inglês *Peripheral Blood Mononuclear Cell*) foram isoladas do sangue de doadores saudáveis do sexo masculino com idades entre 25 e 35 anos, conforme descrito anteriormente (Costa-Rodrigues *et al.* 2011). Resumidamente, após diluição com PBS (1:1), o sangue foi adicionado a Ficoll-Paque™ PREMIUM (GE Healthcare Bio-Sciences) para separar as células mononucleares do plasma sanguíneo, e centrifugado a 400 G, durante 30 minutos. As células mononucleares foram recolhidas e lavadas duas vezes com PBS. Em média, para cada 100 mL de sangue processado, foram obtidas cerca de 70×10^6 células mononucleares.

b) Obtenção de meios condicionados das células SCC9

As células SCC9 foram semeadas a 5×10^4 células/cm² em placas de cultura de 10mm e mantidas no meio de cultura por 2 e 14 dias. Durante estes períodos não foram efetuadas trocas de meio de cultura. No final dos períodos de incubação, os meios foram recolhidos, centrifugados a 400 G durante 10 minutos, e os sobrenadantes foram aliquotados e armazenados à 20°C. A partir deste momento, estes sobrenadantes foram denominados meios condicionados.

c) Cultura de PBMC com meios condicionados das células SCC9

As PBMC foram semeadas a $1,5 \times 10^6$ células/cm² e cultivadas em meio DMEM/F-12 com 400 ng/ml de hidrocortisona, suplementado com 20% soro humano (do mesmo doador das células PBMC) 100 UI/ml de penicilina, 2,5 µg/ml de estreptomicina, 2,5 µg/ml de anfotericina B e 2 mM L-glutamina. As culturas foram mantidas na ausência (controle negativo) ou presença dos meios condicionados da linhagem celular SCC9, obtidos após 2 e 14 dias de cultura. Foram testadas duas concentrações de meios condicionados (10% e 20%). Culturas de PBMC mantidas na presença dos indutores osteoclastogênicos M-CSF (25 ng/mL) e RANKL (40 ng/mL) foram usadas como controle positivo. Todas as culturas foram incubadas, durante 7, 14 e 21 dias, a 37°C em atmosfera úmida a 5% de CO₂. O meio de cultura foi trocado uma vez por semana. Após

os períodos experimentais, as células PBMC foram submetidas a análise da atividade TRAP. Foram realizados três experimentos em triplicata.

d) Co-culturas de PBMC e células SCC9

As células SCC9 foram semeadas na densidade celular de 10^4 células/poço e mantidas em meio de cultura para as culturas de células SCC9 (conforme descrito item 3.1). Após 24h, foram adicionadas as PBMC ($1,5 \times 10^6$ células/cm²) e as co-culturas foram mantidas em meio DMEM/F-12 suplementado com 400 ng/ml de hidrocortisona, 20% soro humano (do mesmo doador das células PBMC), 100 UI/ml de penicilina, 2,5 µg/ml de estreptomicina, 2,5 µg/ml de anfotericina B e L-glutamina (2 mM). Culturas isoladas de SCC9 e de PBMC foram usadas como controles. As monoculturas e as co-culturas foram incubadas por 7, 14 e 21 dias, a 37°C em atmosfera úmida a 5% de CO₂. O meio de cultura foi trocado uma vez por semana. Após os períodos experimentais as co-culturas foram submetidas à análise da atividade TRAP, conforme descrito a seguir. Foram realizados três experimentos em triplicata.

e) Indução da atividade TRAP (*Tartrate-Resistant Acid Phosphatase*)

A TRAP é considerada um marcador de osteoclastos e um indicador de reabsorção óssea ativa nos casos de CEC (Bull et al 2002, Cui et al 2010). Esta enzima é responsável pela degradação das fosfoproteínas da matriz óssea e está também envolvida na regulação da adesão destas células à superfície a ser reabsorvida (Ek-Rylander 1994, Vääräniemi et al 2004).

Para análise da atividade TRAP das células PBMC, foi realizado o ensaio de hidrólise pNPP (para-nitrophenilphosphate), como descrito anteriormente por Costa-Rodrigues & Fernandes, 2011. Deste modo, após os períodos experimentais, as co-culturas e as culturas de PBMC com meios condicionados das células SCC9 foram solubilizadas com 0,1% (v/v) de Triton X-100 e os extratos celulares foram incubados com 12,5 mM pNPP (para-Nitrophenylphosphate) em tampão de 0,04 M ácido tartárico e 0,09 M citrato (pH 4,8) durante 1 hora em estufa a 37°C. A reação foi bloqueada com NaOH 5M e a absorbância das amostras foi medida a 405nm num leitor de placas (Synergy HT, Biotek, Winooski, Vermont, USA). Os resultados foram normalizados com a dosagem da proteína total das culturas (determinado pelo método de

Bradford,1976), e expressos em porcentagem da atividade da TRAP em relação à atividade da TRAP do grupo controle positivo (período de sete dias), que foi considerado como 100% de atividade. Foram considerados controle positivo as culturas de PBMC tratadas com M-CSF e RANKL e controle negativo, as culturas de PMBC não tratadas. Foram realizados três experimentos em triplicata.

3.8.2. Imunomarcção de receptores de vitronectina e calcitonina em PBMC

O receptor de vitronectina, como já relatado anteriormente, está relacionado a formação da zona de selamento que antecede a reabsorção óssea. Já receptor de calcitonina (CTR), é uma proteína relacionada à ativação, diferenciação, função e sobrevivência dos osteoclastos (Boyce 2013, Zupan J, Jeras M, Marc J 2013). O osteoclasto ativo irá sempre expressar o receptor de calcitonina em sua superfície. No processo de reabsorção óssea o receptor de calcitonina irá inibir a atividade osteoclástica, através do seu ligante a calcitonina, que rapidamente irá induzir a perda da adesão na zona de selamento, afastando o osteoclasto da superfície óssea, interrompendo a reabsorção (Newa et al. 2011).

Para esta análise, as células mononucleares do sangue periférico (PBMC) e as co-culturas PBMC e SCC9 foram fixadas (3.7% (v/v) para-formaldeído 15 min) e permeabilizadas (0.1% (Triton X- 100, 5 min) após 21 dias de co-cultura. A proteína actina foi corada com 5 U/mL do anticorpo Alexa Fluor1 647-Phalloidin (Invitrogen - Life Technologies, Paisley, Scotland), e os receptores de vitronectina and calcitonina (VNR and CTR) foram marcados com uso dos anticorpos específicos (50 mg/ml dos anticorpos anti-vitronectina e anti-calcitonina, ambos da R&D Systems Minneapolis, Minnesota, USA). A detecção das IgGs anti-VNR e anti-CTR foi feita com 2mg/ml do anticorpo Alexa Fluor1 488-Goat anti-mouse IgGs. As imagens das culturas foram realizadas em microscópio confocal de varredura a laser (CLSM , Leica TCP SP2 AOBS). Foram realizados três experimentos em triplicata.

3.9. Avaliação do efeito do LBI sobre a atividade osteoclastogênica das células SCC9

3.9.1. Indução da atividade TRAP em co-culturas de PMBC e células SCC9 irradiadas

Para este ensaio, as culturas de células SCC9 foram contadas, irradiadas (conforme descrito no item 3.2), plaqueadas (10^4 células/poço) e mantidas em meio de cultura por 24h. Após este período, foram adicionadas as PBMC ($1,5 \times 10^6$ células/cm²) e as co-culturas foram mantidas em meio DMEM/F-12 com 400 ng/ml de hidrocortisona suplementado com 20% soro humano (do mesmo doador das células PBMC), 100 IU/ml de penicilina, 2,5 µg/ml de estreptomicina, 2,5 µg/ml de anfotericina B e L-glutamina (2 mM). Culturas isoladas de SCC9 e de PBMC foram usadas como controles. As monoculturas e co-culturas foram incubadas, por 7, 14 e 21 dias, a 37°C em atmosfera úmida a 5% de CO₂. O meio de cultura foi trocado uma vez por semana. Após os períodos experimentais, as co-culturas foram submetidas a análise da atividade TRAP (descrito no item 3.9.1). Os resultados foram normalizados com a dosagem da proteína total das culturas (determinado pelo método de Bradford, 1976), e expressos em porcentagem de atividade TRAP em relação à atividade da TRAP do controle positivo (após sete dias de incubação), que foi considerado como 100%. Foram considerados grupos controle positivo as culturas de PBMC tratadas com M-CSF e RANKL e controle negativo as culturas de PMBC não tratadas. Foram realizados três experimentos em triplicata.

3.9.2. Efeito do LBI sobre as vias de sinalização intracelulares para produção de TRAP

Com o objetivo de entender melhor os mecanismos envolvidos na indução da atividade da TRAP, as co-culturas de células SCC9 e PBMC foram mantidas com vários inibidores das vias de sinalização intracelulares envolvidas neste processo, ou seja, as vias MEK (quinase ativadora de MAPK), da p38, do NFκB (factor nuclear kappa B) e da JNK (c-Jun N-terminal quinase).

Para este ensaio, as culturas de células SCC9 foram contadas, irradiadas (conforme descrito no item 3.2), plaqueadas (triplicata, 10^4 células/poço) e mantidas no meio de cultura descrito para as células SCC9. Após 24h, foram adicionadas as PBMC ($1,5 \times 10^6$ células/cm²) e as co-culturas passaram a ser mantidas em meio DMEM/F-12 suplementado com 400 ng/ml de hidrocortisona, 20% soro humano (do mesmo doador das células PBMC), 100 UI/ml de penicilina, 2,5 µg/ml de estreptomicina, 2,5 µg/ml de anfotericina B e L-glutamina (2 Mm). As co-culturas foram incubadas, durante 14 e 21 dias, a 37°C em

atmosfera úmida a 5% de CO². O meio de cultura foi trocado uma vez por semana. Para avaliar o efeito das células SCC9 sobre a atividade osteoclastogênica foram avaliadas as vias da MEK (utilizando o inibidor U0126, 1 µM), da p38 (utilizando o inibidor SP202190, 5 µM), do NFκB (utilizando o inibidor PDTC, 10 µM) e da JNK (utilizando o inibidor SP600125, 10 µM). Monoculturas de PMBC tratadas com os mesmos inibidores foram usadas como controle. Os resultados foram normalizados com a dosagem da proteína total das culturas (determinado pelo método de Bradford, 1976), e expressos em porcentagem de atividade TRAP em relação à atividade da TRAP das co-culturas de PBMC e células SCC9 (no sétimo dia do período experimental), que foram consideradas como 100% de atividade da TRAP. Foram realizados três experimentos em triplicata.

3.9.3. Efeito do LBI sobre a expressão de IL-11 e PTHrP em células SCC9

Sabe-se que o CEC é um tumor invasivo e que a reabsorção óssea está ligada ao prognóstico desse tumor. No mecanismo de invasão óssea pelo tumor, o papel da PTHrP e da IL-11 é tão importante, que elas são consideradas indicadores de prognóstico (Shibahara *et al.* 2005, Nagamine *et al.* 2006, Wu *et al.* 2013, Lv *et al.* 2014). Deste modo, avaliou-se o efeito do LBI sobre a expressão destes produtos.

A avaliação da expressão de IL-11 e PTHrP pelas células SCC9 foi realizada pelo método da reação da transcriptase reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR). As culturas de células SCC9 foram contadas, irradiadas (conforme descrito no item 3.2) e imediatamente inseridas (2,5 x 10⁶ células) em placas de 100 mm de diâmetro. Após 2 e 9 dias de incubação, o RNA total foi extraído utilizando o kit Nucleo Spin kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany), de acordo com as instruções do fabricante e amplificado usando o método da reação da transcriptase reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) (Titan One Tube RT-PCR system; Roche, Branchburg, NJ) em 35 ciclos com temperatura de 55^o C. Os *primers* utilizados estão listados na tabela 5. Os produtos de RT-PCR foram analisados em 1% (v/v) de gel de agarose. A intensidade das bandas do gel foi analisada utilizando o software Image J 1.41 e os valores foram expressos em unidades arbitrárias, de acordo

com a intensidade das bandas, do valor correspondente ao gene GAPDH de cada condição experimental. Foram realizados três experimentos em triplicata.

Tabela 2: Primers utilizados para análise do RT-PCR das células SCC9

Gene	Sequência de Primers (Forward)	Sequência de Primers (Reverse)
GAPDH	5'-CAGGACCAGGTTCAACCAACAAGT-3'	5'-GTGGCAGTGATGGCATGGACTGT-3'
IL-11	5'-ACTGCTGCTGCTGAAGACTCGGCTGTGA-3'	5'-ATGGGGAAGAGCCAGGGCAGAAGTCTGT-3'
PTHrP	5'-GACTGGTTCAGCAGTGGAGC-3'	5'-ATCGAGCTCCAGCGACGTTGT-3'

3.10. Avaliação dos dados

Os dados estão representados como médias \pm valores de desvio padrão (DV) e foram comparados pelo método ANOVA complementado pelo teste Tukey considerando o nível de significância de 5% ($p < 0.05$), utilizando o Software Graph Pad InStat 3.1.

4. Resultados

4.1. Avaliação do efeito do LBI sobre a atividade mitocondrial (Ensaio MTT) das células SCC9

A irradiação com LBI foi capaz de reduzir a atividade mitocondrial das células SCC9 de maneira significativa em todos os parâmetros avaliados quando comparada à atividade do grupo controle, nos períodos de 1 e 3 dias de cultivo (figura 5).

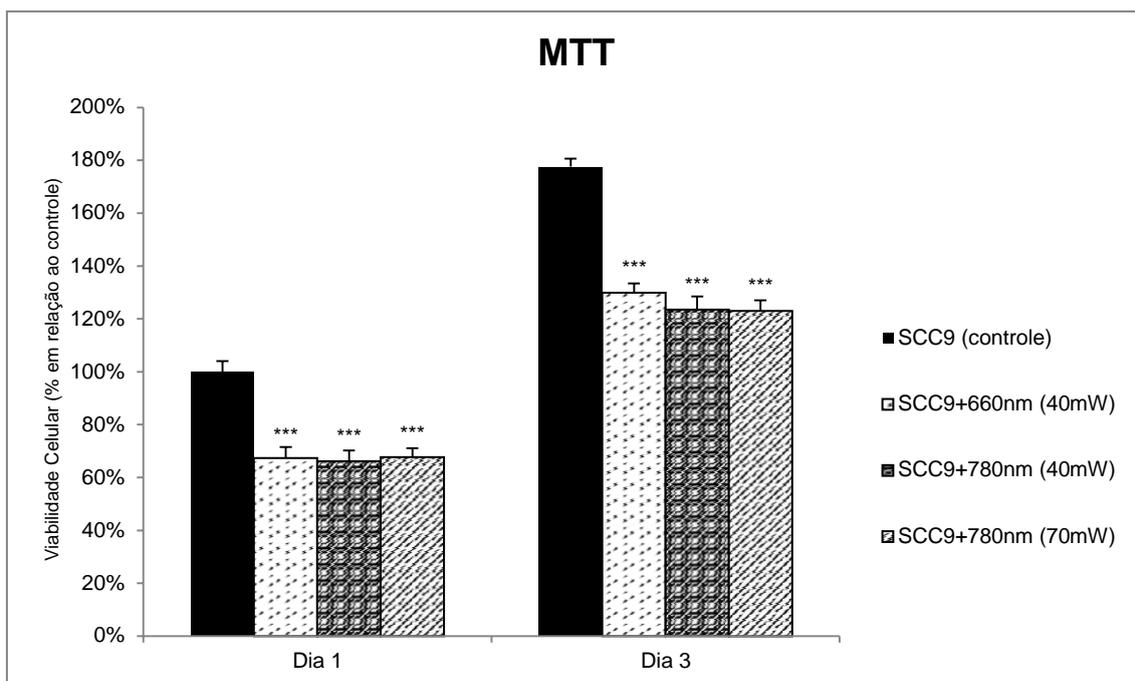


Figura 5. Percentual de atividade mitocondrial (ensaio de MTT) de células SCC9 (10^4 células/poço) após com irradiação laser (660nm e 780nm) e incubação por 1 e 3 dias em relação à atividade mitocondrial das células não irradiadas (controle) no dia 1. Os resultados correspondem à média e desvio padrão de 3 experimentos independentes realizados em triplicata. *** $p < 0.001$ em relação ao controle (ANOVA/Tukey).

4.2. Avaliação do efeito do LBI sobre a viabilidade celular das células SCC9 (Ensaio Cristal Violeta)

A irradiação com laser (em todos parâmetros avaliados) não alterou o percentual de viabilidade, avaliada pelo método cristal violeta, das células SCC9 após 1 dia de cultivo. Já no terceiro dia, a irradiação com laser de 780 nm (70mW, $4\text{J}/\text{cm}^2$) foi capaz de inibir a viabilidade celular quando comparado à das células do grupo controle (não irradiadas), a irradiação com os demais parâmetros não causou diferenças significantes em relação às células não irradiadas (figura 6).

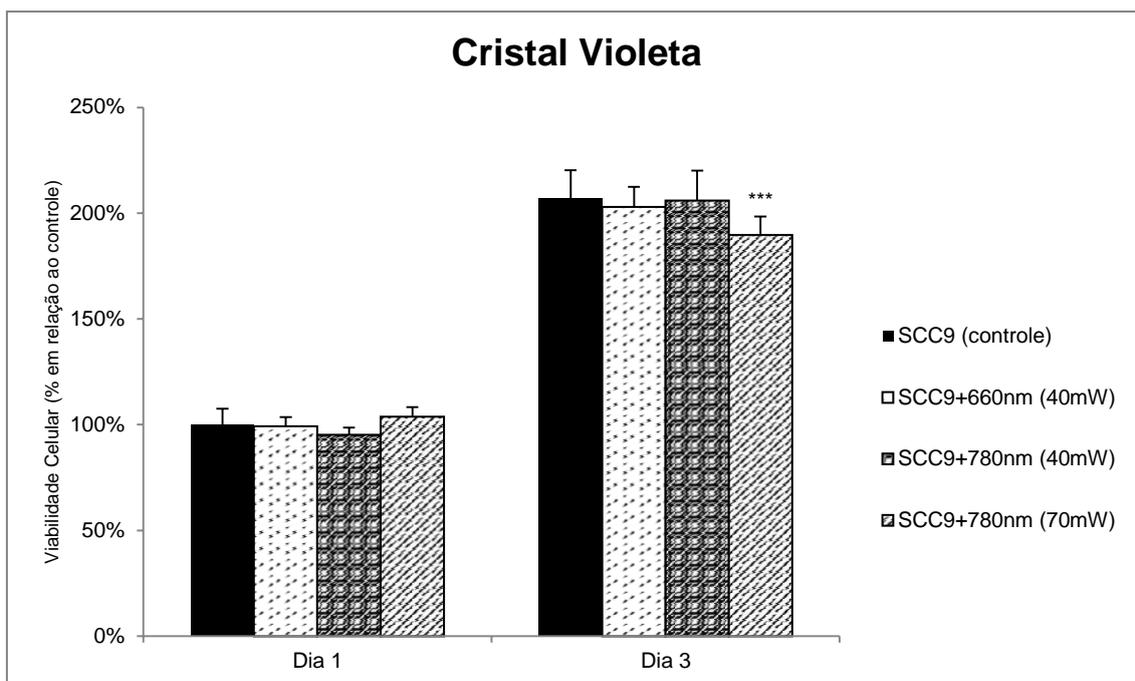


Figura 6. Percentual de viabilidade (ensaio Cristal Violeta) de células SCC9 (10^4 células/poço) após a irradiação com laser (660nm e 780nm) e incubação por 1 e 3 dias, em relação à viabilidade das células não irradiadas (controle) no dia 1. Os resultados correspondem a média e desvio padrão de 3 experimentos independentes realizados em quadruplicata. *** $p < 0.001$ em relação ao controle (ANOVA/Tukey).

4.3. Avaliação do efeito do LBI sobre a viabilidade celular das células SCC9 (ensaio Vermelho Neutro)

Pelo ensaio de vermelho neutro, após 1 dia de cultivo, as células irradiadas com laser no parâmetro de 660 nm (40mW, $4\text{J}/\text{cm}^2$) mostraram viabilidade menor que as células não irradiadas. Já após 3 dias de cultivo, todas as culturas irradiadas mostraram menor viabilidade que as não irradiadas (figura 7).

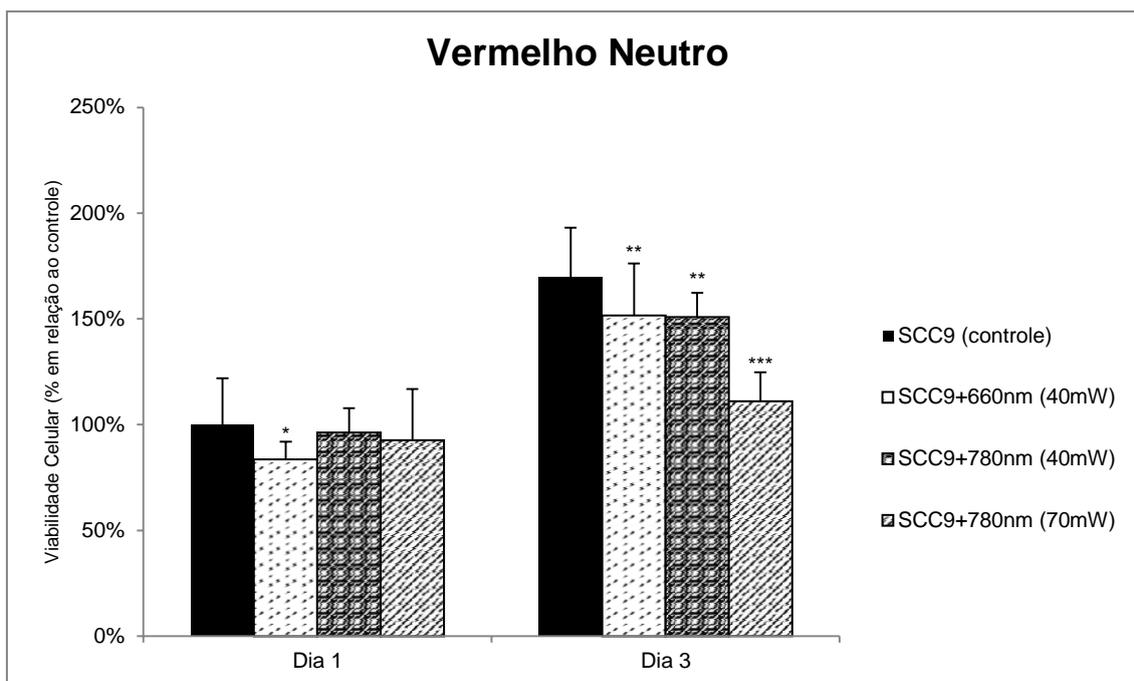


Figura 7. Percentual de viabilidade celular (ensaio Vermelho Neutro) de células SCC9 (10^4 células/poço) após irradiação laser (660nm e 780nm) e incubação por 1 e 3 dias em relação à viabilidade celular das células não irradiadas (controle) no dia 1. Os resultados correspondem a média e desvio padrão de 3 experimentos independentes realizados em quadruplicata. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$ em relação ao controle (ANOVA/Tukey).

4.4. Avaliação do efeito do LBI sobre a indução de apoptose em células SCC9 (Atividade Caspase 3)

A irradiação com laser nos parâmetros 660nm (40mW, $4\text{J}/\text{cm}^2$) e 780nm (70mW, $4\text{J}/\text{cm}^2$) gerou aumento significativo da atividade Caspase 3 no terceiro dia de cultivo. A irradiação com laser de 780 nm (40mW, $4\text{J}/\text{cm}^2$) não causou diferença significativa na atividade Caspase 3 quando comparada ao controle (figura 8).

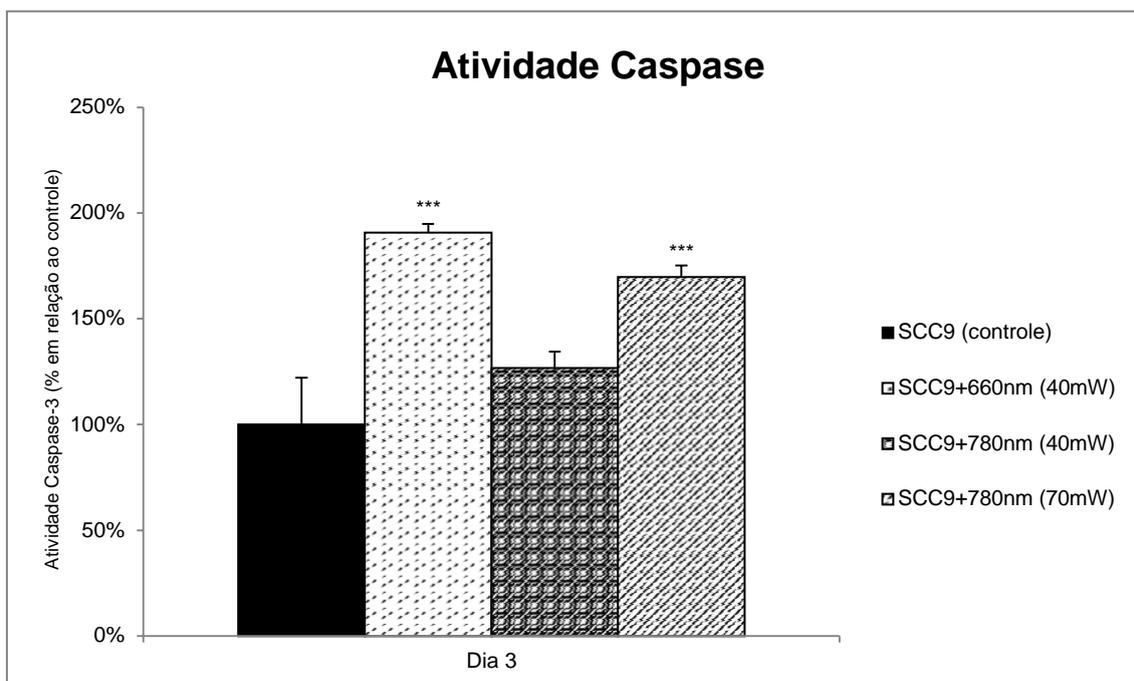


Figura 8. Percentual de atividade da Caspase 3 (Apoptose Celular) de células SCC9 (10^4 células/poço) irradiadas com laser (660nm e 780nm) e incubadas por 3 dias em relação às células não irradiadas (controle). Os resultados correspondem a média e desvio padrão de 3 experimentos independentes realizados em triplicata. *** $p < 0.001$ em relação ao controle (ANOVA/Tukey).

4.5. Avaliação do efeito do LBI sobre a invasividade das células SCC9 (Ensaio de “Ferida”)

Nos primeiros períodos avaliados (0 e 12 horas) não houve diferença entre os grupos no que concerne ao percentual de fechamento da área da ferida original. Após 24 horas, as células irradiadas com todos os parâmetros demonstraram menor capacidade no fechamento da ferida que as não irradiadas ($p < 0.001$). A partir de 36 horas de cultivo, as células irradiadas com o laser de 660nm demonstraram maior capacidade de fechamento da ferida e este efeito se manteve até o fechamento total das feridas em 120 horas ($p < 0.001$). Já as células irradiadas com o laser de 780nm (em ambos os parâmetros) demonstraram menor capacidade no fechamento da ferida quando comparadas ao controle, durante todo período experimental ($p < 0.001$). (figura 9).

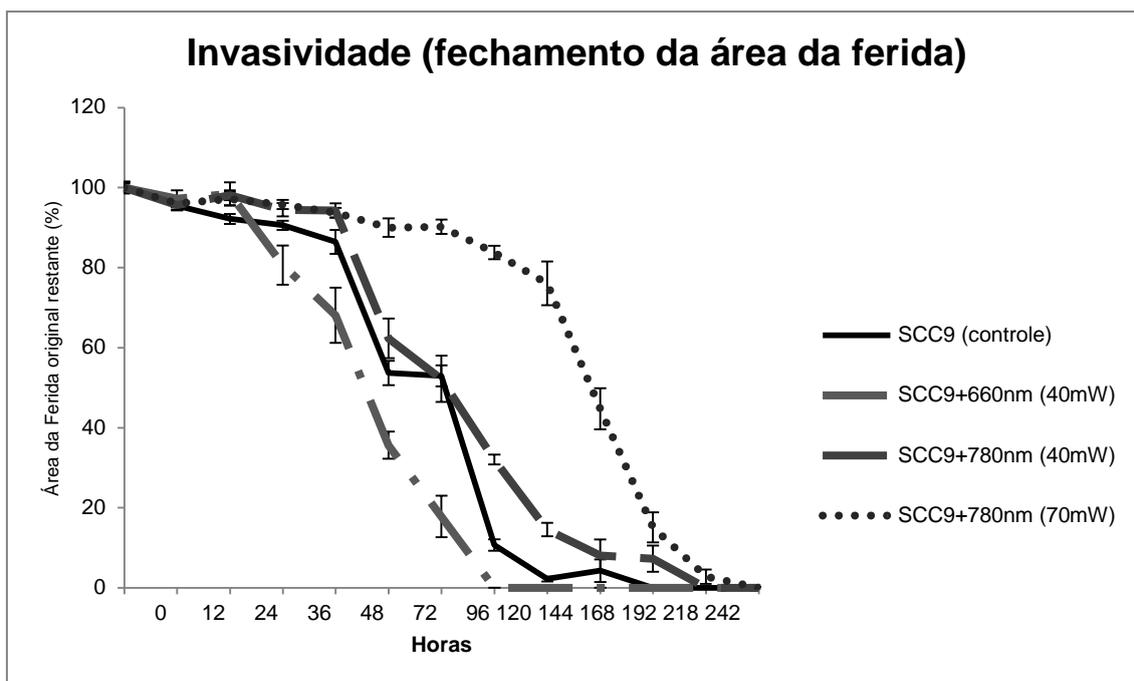


Figura 9. Invasividade (Ensaio de Ferida). Os resultados correspondem à média do percentual remanescente da área da ferida original de cada grupo após os diferentes períodos de avaliação. Foram tabulados os dados de 3 experimentos independentes em quadruplicata. (ANOVA/Tukey).

4.6. Avaliação da atividade osteoclastogênica das células SCC9

4.6.1. Indução da atividade TRAP em culturas de PBMC com meios condicionados das células SCC9

No sétimo dia do período experimental, foi constatado um aumento na atividade da TRAP em todas as culturas de PBMC tratadas com o meio condicionado e nas culturas do controle positivo (PBMC tratadas com RANKL e M-CSF) quando comparadas ao controle negativo (monoculturas de PBMC).

Após 14 dias do período experimental, comparando-se ao controle negativo (monoculturas de PBMC), foi observado um aumento na atividade da TRAP nas culturas de PBMC tratadas com o meio condicionado (nas concentrações de 10% e 20%) obtido de culturas de 2 dias de células SCC9 e nas culturas de PBMC tratadas com o meio condicionado (na concentração de 10%) obtido de culturas de 14 dias de células SCC9 e nas culturas do controle positivo (PBMC tratadas com RANKL e M-CSF). Nas culturas de PBMC tratadas com o meio condicionado (usado na concentração de 20%) obtido de culturas de 14 dias de células SCC9 foi constatada uma diminuição na atividade da TRAP quando comparadas ao controle negativo (monoculturas de PBMC).

Após 21 dias do período experimental, quando comparadas ao controle negativo (monoculturas de PBMC), foi constatado um aumento na atividade da TRAP nas culturas de PBMC tratadas com o meio condicionado (usado nas concentrações de 10% e 20%) obtido de culturas de 2 dias de células SCC9 e nas culturas de PBMC tratadas com o meio condicionado (usado na concentração de 10%) obtido de culturas de 14 dias de células SCC9 e nas culturas do controle positivo (PBMC tratadas com RANKL e M-CSF). Nas culturas de PBMC tratadas com o meio condicionado (usado na concentração de 20%) obtido de culturas de 14 dias de células SCC9 foi constatada uma diminuição na atividade da TRAP quando comparadas ao controle negativo (monoculturas de PBMC).

Já na comparação em relação às culturas de PBMC tratadas com RANKL e M-CSF (controle positivo) foi constatado um aumento na atividade da TRAP nas culturas de PBMC tratadas com o meio condicionado (usado na concentração de 20%) obtido de culturas de 2 dias de células SCC9 quando comparadas ao controle positivo (PBMC tratadas com RANKL e M-CSF) no sétimo dia do período experimental. Os demais meios condicionados utilizados não alteraram a atividade da TRAP neste período.

Após 14 dias do período experimental, foi constatado uma diminuição na atividade da TRAP nas culturas de PBMC tratadas com o meio condicionado (usado na concentração de 10%) obtido de culturas de 2 dias de células SCC9 e nas culturas de PBMC tratadas com o meio condicionado (usado nas concentrações de 10% e 20%) obtido de culturas de 14 dias de células SCC9 quando comparadas ao controle positivo (PBMC tratadas com RANKL e M-CSF). O meio condicionado (usado na concentração de 20%) obtido de culturas de 2 dias de células SCC9 não alterou a atividade da TRAP neste período experimental quando comparado ao controle positivo (PBMC tratadas com RANKL e M-CSF).

No vigésimo primeiro dia do período experimental, foi constatado um aumento na atividade da TRAP nas culturas de PBMC tratadas com o meio condicionado (usado nas concentrações de 10% e 20%) obtido de culturas de 2 dias de células SCC9 quando comparadas ao controle positivo (PBMC tratadas com RANKL e M-CSF). Nas culturas de PBMC tratadas com o meio condicionado (usado na concentração de 20%) obtido de culturas de 14 dias de

células SCC9 foi constatada uma diminuição na atividade da TRAP quando comparada ao controle positivo (PBMC tratadas com RANKL e M-CSF). O meio condicionado (usado na concentração de 10%) obtido de culturas de 14 dias de células SCC9 não alterou a atividade da TRAP neste período experimental quando comparado ao controle positivo (PBMC tratadas com RANKL e M-CSF) (figura 10).

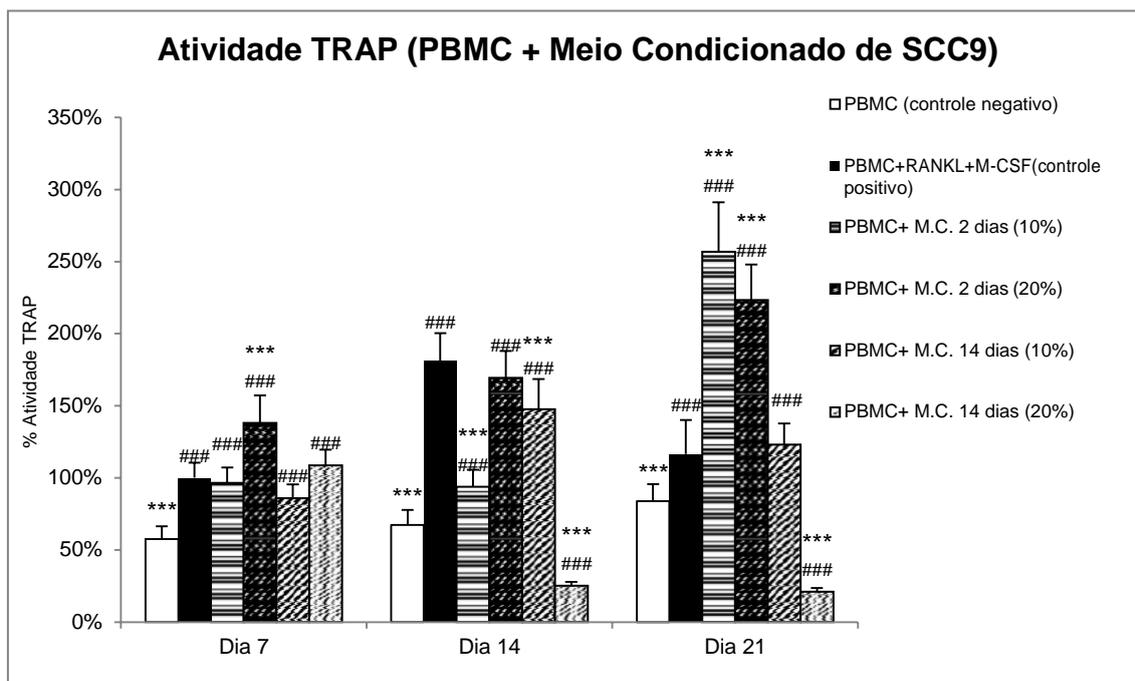


Figura 10. Percentual de atividade da TRAP das culturas PBMC (em relação a atividade da TRAP do controle positivo no dia 7) após 7, 14 e 21 dias de cultivo. As culturas de PBMC cultivadas com meio de cultura padrão (controle negativo), tratadas com M-CSF e RANKL (controle positivo) ou com meios condicionados obtidos de culturas de células SCC9 (de 2 e 14 dias) usados na concentração de 10 ou de 20%. Os resultados correspondem a média e desvio padrão de 3 experimentos independentes realizados em triplicata. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$ em relação ao controle positivo. # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ e ### $p < 0.001$ em relação ao controle negativo (ANOVA/Tukey).

4.6.2. Indução da atividade TRAP em co-culturas de PBMC e células SCC9

Após os períodos experimentais (7, 14 e 21 dias), foi constatado um aumento na atividade da TRAP nas culturas co-culturas de PBMC e SCC9 quando comparadas às monoculturas de PBMC (controle negativo) e às PBMC tratadas com RANKL e M-CSF (controle positivo) (figura 11).

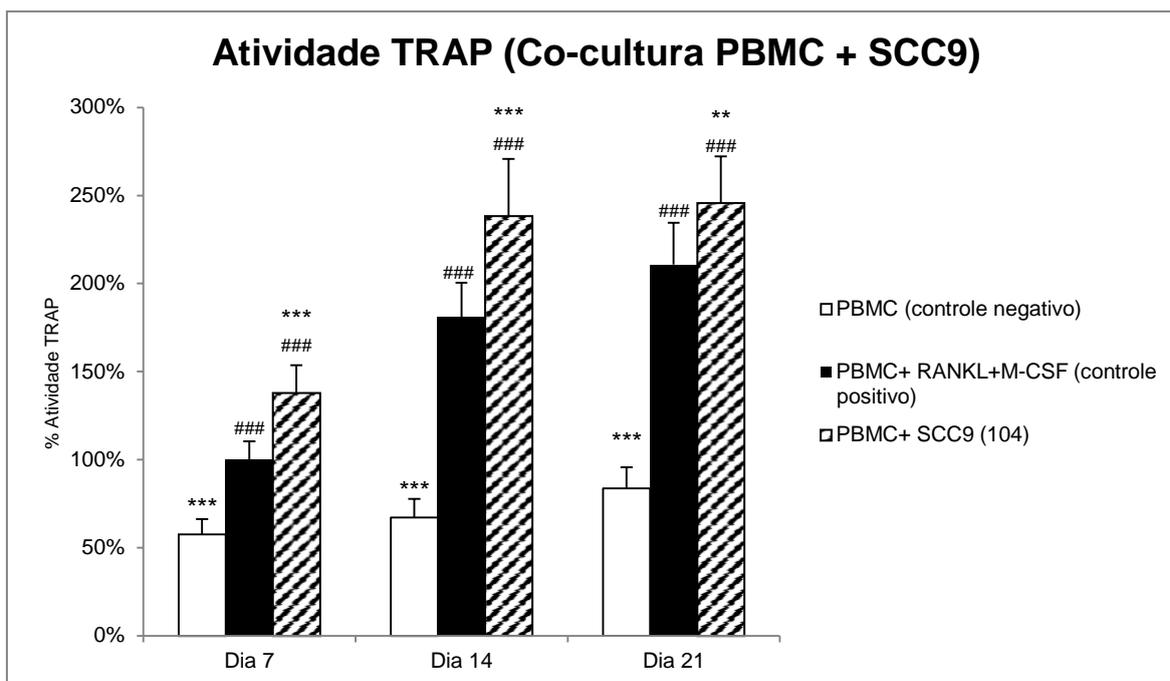


Figura 11. Percentual de atividade da TRAP (em relação ao controle positivo no dia 7) após 7, 14 e 21 dias de cultura de PBMC cultivadas com meio de cultura padrão (controle negativo), tratadas com M-CSF e RANKL (controle positivo) ou co-cultivadas com células SCC9 (10^4 células/poço). Os resultados correspondem a média e desvio padrão de 3 experimentos independentes realizados em triplicata. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$ em relação ao controle positivo. # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ e ### $p < 0.001$ em relação ao controle negativo (ANOVA/Tukey).

4.6.3. Imunomarcção de receptores de Vitronectina e Calcitonina em PBMC

A figura 12 evidencia a imunomarcção para os receptores de vitronectina e calcitonina (verde), e para os anéis de actina (azul) nas PBMC cultivadas com agentes que sabidamente induzem a sua diferenciação para osteoclastos (M-CSF e RANK-L) e na situação de co-cultura com as células SCC9 (10^4 células/poço). Foi constatado um aumento na imunomarcção dos anéis de actina nas co-culturas de PBMC com as células SCC9 em relação as monoculturas de PBMC tratadas com M-CSF e RANK-L. É possível observar um aumento na imunomarcção dos receptores de calcitonina nas co-culturas de PBMC com as células SCC9 em relação as monoculturas de PBMC tratadas com M-CSF e RANK-L. Já na imunomarcção dos receptores de vitronectina não houve diferença significativa entre as co-culturas de PBMC com as células SCC9 e as monoculturas de PBMC tratadas com M-CSF e RANK-L.

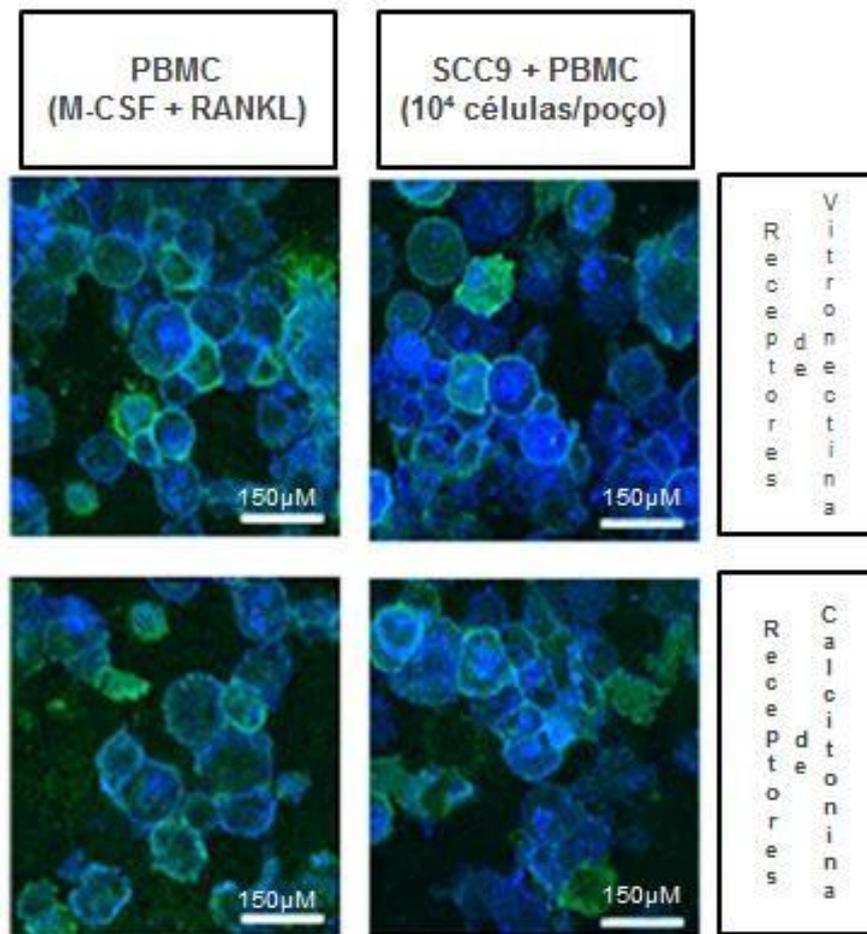


Figura 12. Imunomarcção para anéis de actina (azul) e expressão de receptores de vitronectina e calcitonina (verde) nas PBMC cultivadas com agentes indutores de diferenciação osteoblástica (M-CSF e RANK-L) ou com células SCC9.

4.7. Avaliação do efeito do LBI sobre a atividade osteoclastogênica das células SCC9

4.7.1. Indução da atividade TRAP em co-culturas de PBMC e células SCC9 irradiadas

A irradiação com laser (em todos os parâmetros avaliados) não alterou atividade da TRAP, nas co-culturas de PBMC e células SCC9 irradiadas quando comparadas ao controle (PBMC+SCC9 não irradiada) após 7 dias de cultivo.

Após 14 dias do período experimental, foi constatado um aumento na atividade da TRAP nas co-culturas de PBMC+SCC9 irradiadas com laser de 660 nm com 40mW, quando comparadas às células não irradiadas (controle). Enquanto as co-culturas de PBMC+SCC9 irradiadas com laser de 780nm com 40mW e com 70 mW demonstraram uma diminuição na atividade da TRAP

quando comparadas as co-culturas que continham SCC9 não irradiadas (controle).

As co-culturas de PBMC+SCC9 irradiadas com laser, em todos os parâmetros estudados, demonstraram uma diminuição na atividade da TRAP quando comparadas às culturas controle, após 21 dias de cultivo (figura 13).

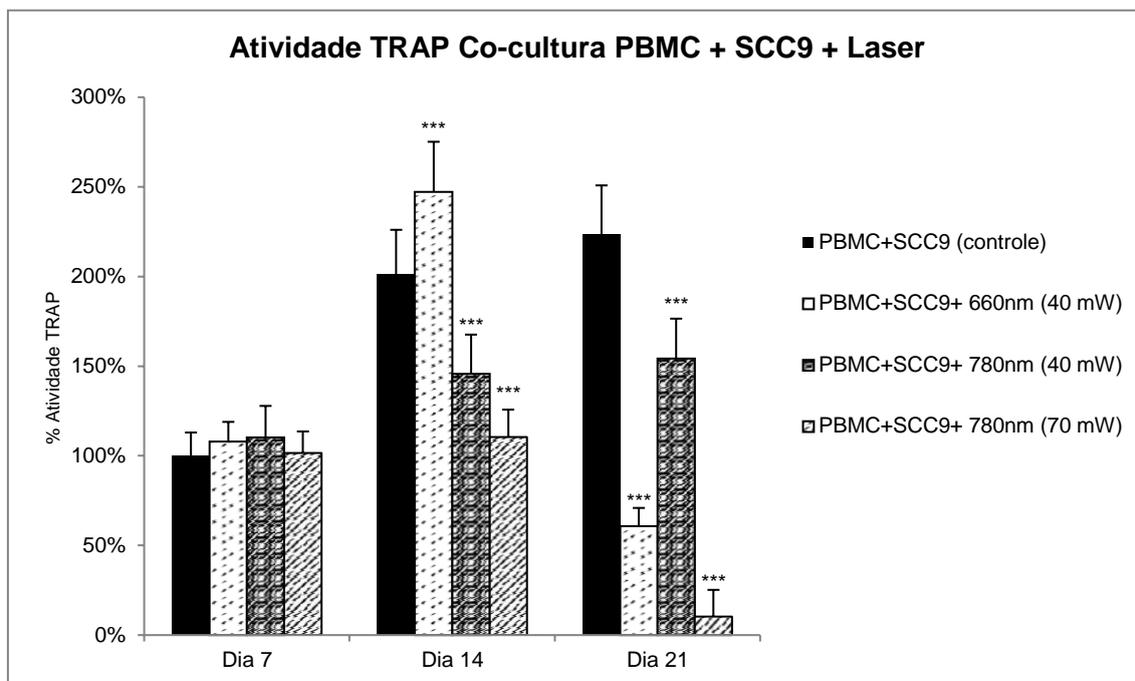


Figura 13. Percentual de atividade da TRAP (após 7, 14 e 21 dias de cultura) de PBMC co-cultivadas com células SCC9 (10^4 células/poço) irradiadas com laser (660nm e 780nm) em relação a atividade da TRAP das co-culturas de PBMC+SCC9 não irradiadas (no dia 7). Os resultados correspondem a média e desvio padrão de 3 experimentos independentes realizados em triplicata. *** $p < 0.001$ (ANOVA/Tukey) em relação ao controle (PBMC+SCC9).

4.7.2. Efeito do LBI sobre as vias de sinalização intracelulares de co-culturas de PBMC e células SCC9 irradiadas

Via da MEK

Após 14 dias do período experimental foi constatado um aumento na atividade da TRAP nas co-culturas de PBMC+SCC9 cultivadas na presença do inibidor específico da via da MEK (U0126) em relação às co-culturas de PBMC+SCC9 cultivadas na ausência deste inibidor, indicando que esta via provavelmente não está envolvida na produção de TRAP por PBMC cultivadas com células SCC9. Já nas co-culturas de PBMC+SCC9 irradiadas (todos parâmetros) cultivadas na presença do inibidor específico da via MEK (U0126)

houve menor atividade da TRAP do que nas co-culturas de PBMC+SCC9 não irradiadas tratadas e não tratadas com inibidor, no mesmo período experimental.

Após 21 dias do período experimental não foi verificada diferença na atividade da TRAP entre as co-culturas de PBMC+SCC9 cultivadas na presença do inibidor específico da via MEK (U0126) e as co-culturas de PBMC+SCC9 cultivadas na ausência deste inibidor, reiterando que esta via provavelmente não está envolvida na produção de TRAP por PBMC cultivadas com células SCC9.

Novamente, nas co-culturas de PBMC+SCC9 irradiadas (todos parâmetros) cultivadas na presença do inibidor específico da via MEK (U0126) houve menor atividade da TRAP do que nas co-culturas de PBMC+SCC9 não irradiadas tratadas ou não com o inibidor, no mesmo período experimental (figura 14).

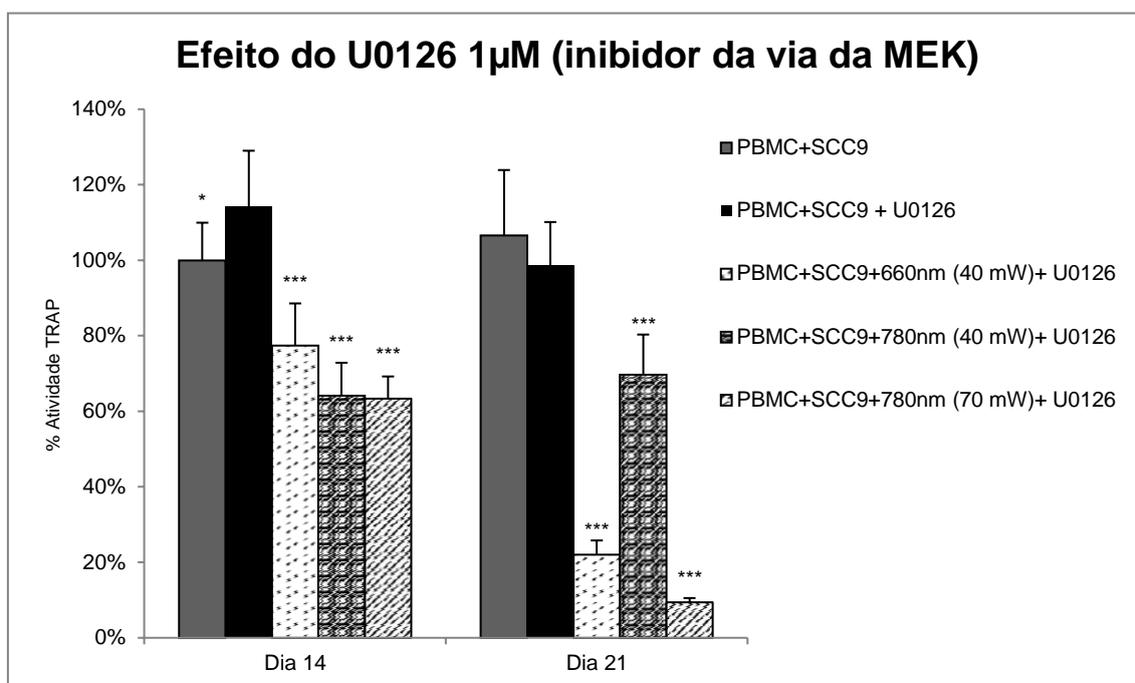


Figura 14. Percentual de atividade da TRAP nas co-culturas PBMC+SCC9 mantidas com o inibidor U0126 (via de sinalização da MEK) em relação às co-culturas de PBMC+SCC9 não tratadas com inibidor no dia 14. Os resultados correspondem a média e desvio padrão de 3 experimentos independentes realizados em triplicata. * $p < 0.05$ e *** $p < 0.001$ em relação às co-culturas tratadas com inibidor (ANOVA/Tukey).

Via da p38

Após 14 dias do período experimental foi constatado um aumento na atividade da TRAP nas co-culturas de PBMC+SCC9 cultivadas na presença do inibidor específico da via p38 (SB202190) em relação às co-culturas de PBMC+SCC9 cultivadas na ausência deste inibidor, indicando que esta via

provavelmente também não está envolvida na produção de TRAP por PBMC cultivadas com células SCC9. Novamente nas co-culturas de PBMC+SCC9 irradiadas (todos parâmetros) cultivadas na presença do inibidor específico da via p38 (SB202190) houve menor atividade da TRAP que nas co-culturas de PBMC+SCC9 não irradiadas tratadas ou não com o inibidor, no mesmo período experimental.

Após 21 dias do período experimental não foi verificada diferença na atividade da TRAP entre as co-culturas de PBMC+SCC9 cultivadas na presença do inibidor específico da via p38 (SB202190) e as co-culturas de PBMC+SCC9 cultivadas na ausência deste inibidor, reiterando que esta via provavelmente não está envolvida na produção de TRAP por PBMC cultivadas com células SCC9. Novamente, nas co-culturas de PBMC+SCC9 irradiadas (todos parâmetros) cultivadas na presença do inibidor específico da via p38 (SB202190) houve menor atividade da TRAP que nas co-culturas de PBMC+SCC9 não irradiadas tratadas ou não com o inibidor, no mesmo período experimental (figura 15).

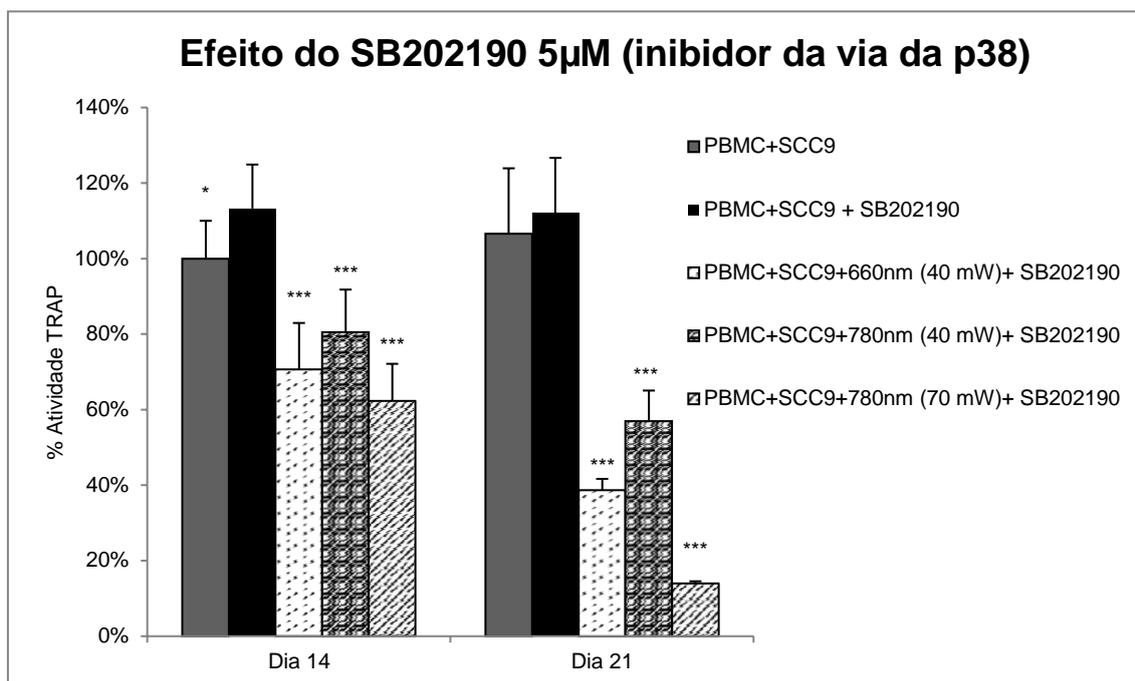


Figura 15. Percentual de atividade da TRAP nas co-culturas PBMC+SCC9 mantidas com o inibidor SB202190 (via de sinalização da p38) em relação às co-culturas de PBMC+SCC9 não tratadas com inibidor no dia 14. Os resultados correspondem a média e desvio padrão de 3 experimentos independentes realizados em triplicata.* $p < 0.05$ e *** $p < 0.001$ em relação às co-culturas tratadas com inibidor (ANOVA/Tukey).

Via do NF κ B

Após 14 dias do período experimental não foi demonstrado diferença na atividade da TRAP nas co-culturas de PBMC+SCC9 cultivadas na presença do inibidor específico da via NFkB (PDTC) em relação às co-culturas de PBMC+SCC9 cultivadas na ausência deste inibidor. Já nas co-culturas de PBMC+SCC9 irradiadas (todos parâmetros) cultivadas na presença do inibidor específico da via NFkB (PDTC) houve menor atividade da TRAP que nas co-culturas de PBMC+SCC9 não irradiadas tratadas ou não com o inibidor no mesmo período experimental.

Após 21 dias do período experimental as co-culturas de PBMC+SCC9 cultivadas na presença do inibidor específico da via NFkB (PDTC) exibiram menor a atividade da TRAP que as co-culturas de PBMC+SCC9 cultivadas na ausência deste inibidor. Indicando que esta via provavelmente está envolvida na produção de TRAP por PBMC cultivadas com células SCC9. Novamente, nas co-culturas de PBMC+SCC9 irradiadas (todos parâmetros) cultivadas na presença do inibidor específico da via NFkB (PDTC) houve menor atividade da TRAP que nas co-culturas de PBMC+SCC9 não irradiadas tratadas ou não com o inibidor, no mesmo período experimental (figura 16).

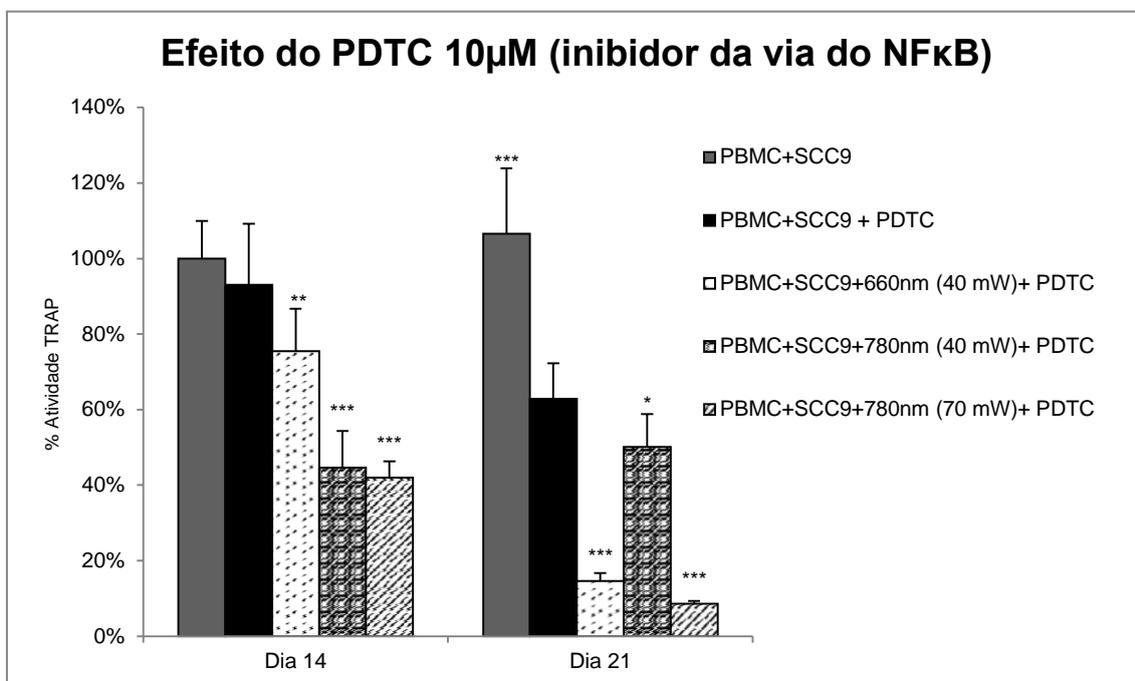


Figura 16. Percentual de atividade da TRAP nas co-culturas PBMC+SCC9 mantidas com o inibidor PDTC (via de sinalização do NFkB) em relação às co-culturas de PBMC+SCC9 não tratadas com inibidor no dia 14. Os resultados correspondem a média e desvio padrão de 3 experimentos independentes realizados **Via da JNK** * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$ em relação às co-culturas tratadas com inibidor (ANOVA/Tukey).

Após 14 dias do período experimental foi constatado uma diminuição na atividade da TRAP entre as co-culturas de PBMC+SCC9 cultivadas na presença do inibidor específico da via JNK (SP600125) e as co-culturas de PBMC+SCC9 cultivadas na ausência deste inibidor. Indicando que esta via provavelmente está envolvida na produção de TRAP por PBMC cultivadas com células SCC9. Nas co-culturas de PBMC+SCC9 irradiadas (todos parâmetros) cultivadas na presença do inibidor específico da via JNK (SP600125) houve uma potencialização da inibição da atividade da TRAP, quando comparadas às co-culturas de PBMC+SCC9 não irradiadas tratadas com inibidor no mesmo período experimental.

Após 21 dias do período experimental foi constatada uma menor atividade da TRAP nas co-culturas de PBMC+SCC9 cultivadas na presença do inibidor específico da via JNK (SP600125) do que nas co-culturas de PBMC+SCC9 cultivadas na ausência deste inibidor. Indicando novamente que esta via provavelmente está envolvida na produção de TRAP por PBMC cultivadas com células SCC9. Em todas co-culturas de PBMC+SCC9 irradiadas (todos parâmetros) cultivadas na presença do inibidor específico da via JNK (SP600125) houve menor a atividade da TRAP do que nas co-culturas de PBMC+SCC9 não irradiadas não tratadas com inibidor no mesmo período experimental. As co-culturas de PBMC+SCC9 irradiadas com laser de 660 nm (40mW) e de 780 nm (70 mW) mostraram potencialização do efeito inibitório do SP600125, já as co-culturas que continham SCC9 irradiadas com laser de 780 nm (70 mW) houve maior atividade da TRAP que nas co-culturas tratadas com o inibidor (figura 17).

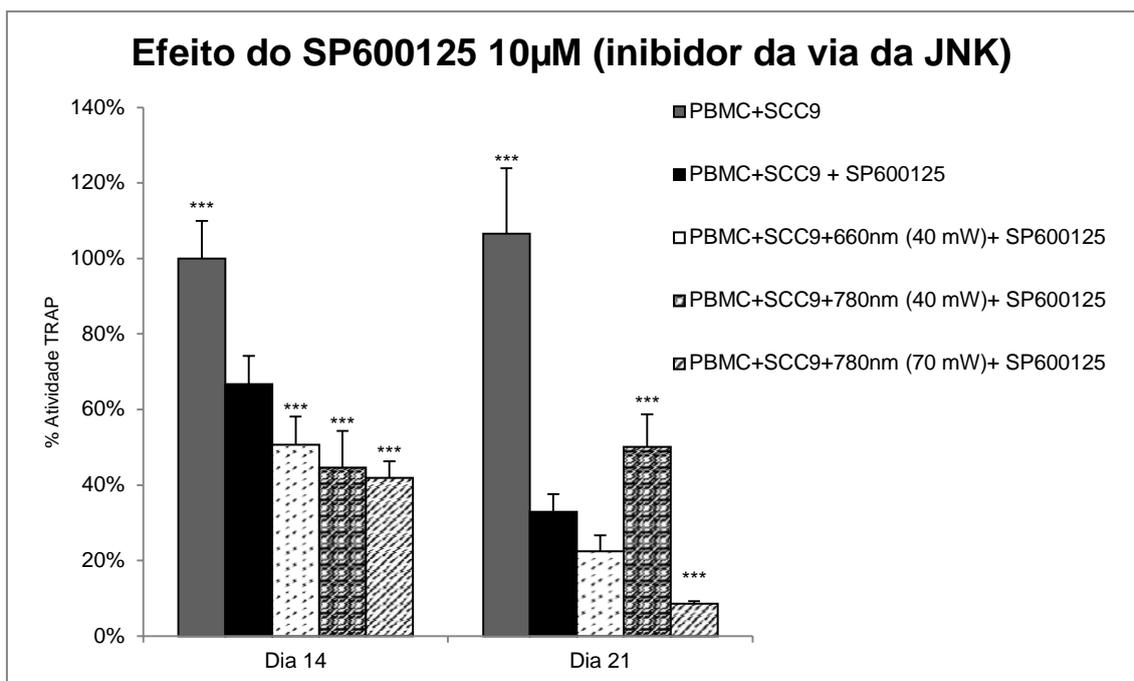


Figura 17. Percentual de atividade da TRAP nas co-culturas PBMC+SCC9 mantidas com o inibidor SP600125 (via de sinalização JNK) em relação às co-culturas de PBMC+SCC9 não tratadas com inibidor no dia 14. Os resultados correspondem a média e desvio padrão de 3 experimentos independentes realizados em triplicata.

*** $p < 0.001$ em relação às co-culturas tratadas com inibidor (ANOVA/Tukey).

4.7.3. Efeito do LBI sobre a expressão de IL-11 e PTHrP em células SCC9

No segundo dia do período experimental, foi constatado um aumento na expressão de IL-11 nas células SCC9 irradiadas com os parâmetros 660 nm-40Mw e 780 nm-40mW, quando comparadas às culturas de SCC9 não irradiadas. Enquanto as células SCC9 irradiadas com o parâmetro 780 nm-70mW não demonstraram alteração na expressão de IL-11 quando comparadas às células não irradiadas (controle).

No nono dia do período experimental, foi constatada uma diminuição na expressão de IL-11 nas células SCC9 irradiadas com todos os parâmetros estudados, quando comparadas às células não irradiadas (controle) (figura 18).

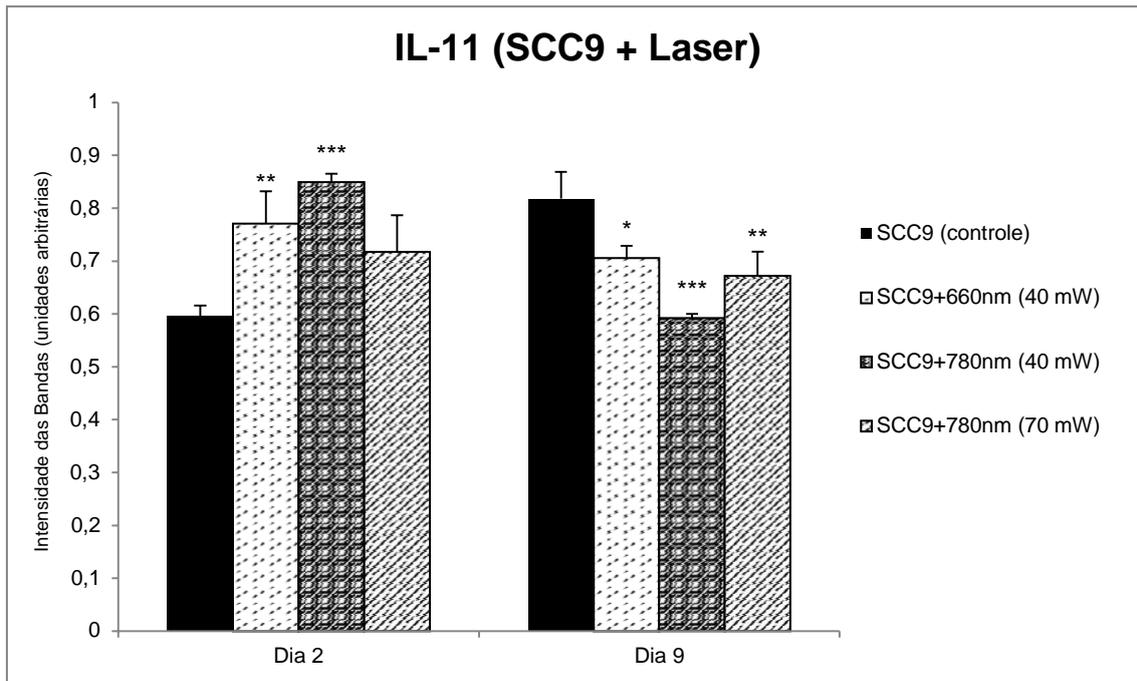


Figura 18. Expressão de IL-11 (após 2 e 9 dias de cultura) nas células SCC9 ($2,5 \times 10^6$ células/placa) irradiadas com laser (660nm e 780nm) em relação às células SCC9 (controle dia 2. Os resultados correspondem a média e desvio padrão de 3 experimentos independentes realizados em triplicata. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$ em relação ao controle em cada período experimental (ANOVA/Tukey).

Já com relação à expressão de PTHrP, no segundo dia do período experimental foi constatado um aumento na expressão de PTHrP nas células SCC9 irradiadas com os parâmetros 660 nm-40mW-4J/cm² e 780 nm-40mW-4J/cm², quando comparadas às células não irradiadas (controle). Enquanto as células SCC9 irradiadas com o parâmetro 780 nm-70mW-4J/cm² não demonstraram alteração na expressão de PTHrP.

Após 9 dias do período experimental foi constatada uma diminuição na expressão de PTHrP nas células SCC9 irradiadas com o parâmetro 780 nm-70mW-4J/cm², quando comparadas às células não irradiadas (controle). Enquanto as células SCC9 irradiadas com os parâmetros 660 nm-40mW-4J/cm² e 780 nm-40mW-4J/cm² não demonstraram alteração na expressão de PTHrP em relação às células não irradiadas (controle) (figura 19).

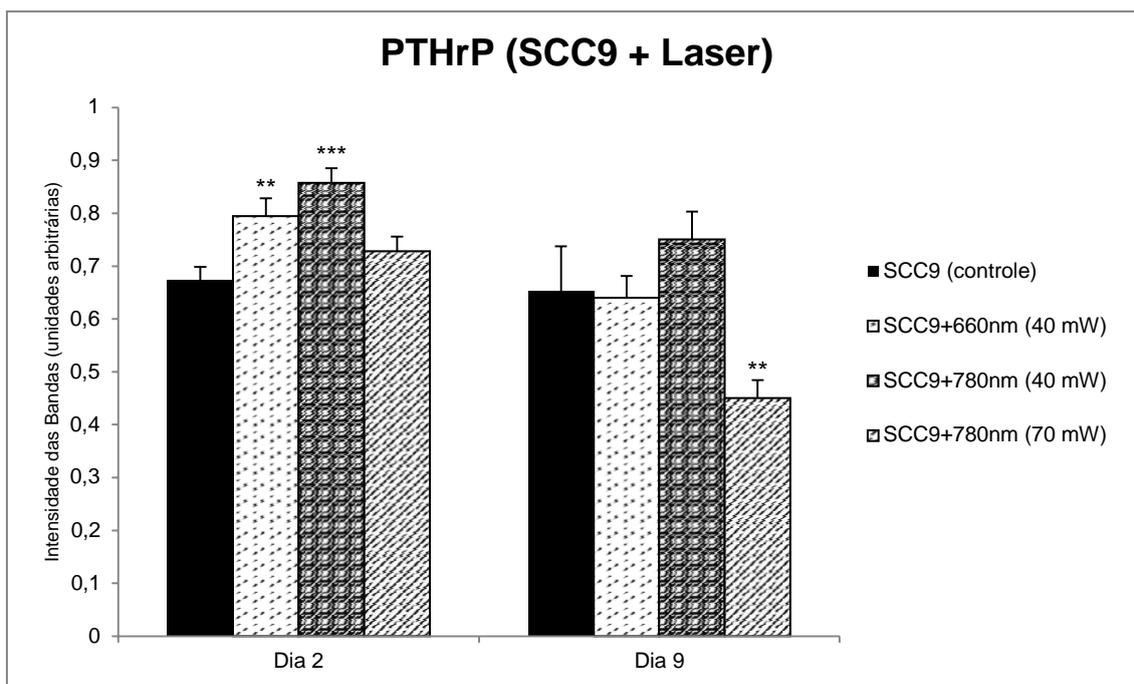


Figura 19. Expressão de PTHrP (após 2 e 9 dias de cultura) nas células SCC9 ($2,5 \times 10^6$ células/placa) irradiadas com laser (660nm e 780nm) em relação às células SCC9 (controle dia 2). Os resultados correspondem a média e desvio padrão de 3 experimentos independentes realizados em triplicata ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$ em relação ao controle em cada período experimental (ANOVA/Tukey).

Tabela 3: Sinopse de todos resultados. As setas indicam os parâmetros que aumentaram ou diminuíram, significativamente em relação ao controle, a resposta celular quanto aos experimentos. Os parâmetros que não tiveram alterações significativas não foram aqui ilustrados.

	660	780	780
comprimento de onda (nm)	660	780	780
potência de saída (mW)	40	40	70
densidade de energia (J/cm ²)	4	4	4
Viabilidade - atividade Mitocondrial(3 dias)	↓	↓	↓
Viabilidade - Cristal Violeta (3 dias)			↓
Viabilidade -Vermelho neutro (3 dias)	↓	↓	↓
5. Indução de apoptose (3 dias)	↑	↑	↑
Invasividade (3 dias)	↑	↓	↓
Indução da Atividade da TRAP (21 dias)	↓	↓	↓
Expressão gênica de IL-11 (9 dias)	↓	↓	↓
Expressão gênica de PTHrP (9 dias)			↓

Discussão

O LBI vem sendo utilizado de maneira profilática ou terapêutica no tratamento da mucosite em pacientes com histórico de CEC, que irão receber ou que receberam tratamento com radioterapia e quimioterapia, porém ainda restam controvérsias em relação à dosimetria e segurança desta aplicação no que

concerne à irradiação não intencional de células tumorais ou pré-tumorais que possam ter permanecido na área a ser irradiada após o tratamento do câncer (Pinheiro *et al.* 2002, Schartinger *et al.* 2012, Benasdoum & Nair 2012, Sperandio *et al.* 2013).

De fato, a existência de uma relação direta entre efeito/dosimetria já está bem estabelecida no estudo da fototerapia (AlGhamdi *et al.* 2012, Chung *et al.* 2012) e esta questão também já vem sendo debatida no tratamento da mucosite. Benasdoum & Nair (2012), em revisão sistemática sobre o uso da fototerapia no tratamento da mucosite oral, propuseram que a padronização da dosimetria deve incluir os parâmetros de comprimento de onda (nm), potência (mW), e densidade de energia (J/cm²). Além disso, devem ser considerados o número e frequência de sessões, o local de aplicação, o tipo de aplicação (única área, escaneamento da região), a calibração dos aparelhos e a necessidade de treinamento prévio. Esta revisão concluiu que os melhores resultados no tratamento da mucosite foram obtidos nos estudos que utilizaram os comprimentos de onda de 633-685nm (vermelho) ou de 780-830nm (infravermelho próximo), com potências entre 10 e 150 mW; densidade de energia entre 2 a 6 J/cm², com duas a sete aplicações por semana, mas recomendaram aplicações com densidades de energia de até 4J/cm² e potências de 10 a 100mW.

Porém, como citado anteriormente, a indicação do LBI para o tratamento da mucosite oral também está envolvida em outra controvérsia, a possibilidade de que esta irradiação atinja não intencionalmente células tumorais ou pré-tumorais que possam ter restado na cavidade oral durante ou após o tratamento do tumor (Pinheiro *et al.* 2002, Schartinger *et al.* 2012, Sperandio *et al.* 2013, Sonis *et al.* 2016).

Esta questão encontra respaldo no fato de que LBI tem demonstrado ser capaz de aumentar a proliferação celular, bem como alterar o ciclo celular e a apoptose em diferentes linhagens celulares (Gao & Xing 2009, Huang *et al.* 2009, Huang *et al.* 2011, Schartinger *et al.* 2012, Sonis *et al.* 2016), porém deve ser considerado que os efeitos do LBI, assim como de qualquer outro agente terapêutico ou farmacológico, dependem da dosimetria e do tipo celular e tecidual avaliado (Chung *et al.* 2012, AlGhamdi *et al.* 2012, Sonis *et al.* 2016)

Assim sendo, é fundamental continuar avaliando os efeitos do LBI em diferentes tipos de células tumorais e principalmente avaliar os efeitos da

irradiação com os parâmetros indicados para o tratamento da mucosite oral (Sonis *et al.* 2016)

No que concerne às células derivadas de CEC de laringe e de boca, ainda existem poucos estudos, como descrito a seguir.

Pinheiro *et al.* (2002) avaliaram o efeito do LBI em células de CEC de laringe (linhagem H.Ep.2 cells). As células foram irradiadas com laser 635 e 670nm com potência de 5mW e doses de 0,04; 0,06; 0,08; 1,2; 2; 4 e 4,8 J/cm² durante 7 dias consecutivos e a atividade mitocondrial foi avaliada pelo ensaio de MTT. Os resultados mostraram que o LBI no comprimento de onda de 670nm, irradiado com doses entre 0,04 e 4,8 J/cm² foi capaz de aumentar a proliferação das células H.Ep.2 após sete dias. Os parâmetros utilizados não estão dentro dos indicados por Bensadoun & Nair 2012, para tratamento da mucosite.

Um aumento na viabilidade (pelo método MTT) de células da linhagem H.Ep.2 cells também foi verificado no estudo de Werneck *et al.* (2005), 12 e 24 horas após a irradiação com laser de 685nm (31mW) e de 830nm (34,5mW), respectivamente, ambos com dose de 4 J/cm². Estes parâmetros já estariam dentro dos indicados para tratamento da mucosite (Bensadoun & Nair 2012).

Já Gomes Henriques *et al.* (2014) utilizaram densidades de energia fora das indicadas por Bensadoun & Nair 2012, para avaliar o efeito do LBI (660nm) sobre linhagem de células derivadas de CEC de língua (linhagem SCC25) Foram utilizadas irradiações com 0,5 J/cm² e 1 J/cm² com 30mW. Os resultados demonstraram que o LBI foi capaz de aumentar a viabilidade (ensaio Azul de Trypan) e a capacidade de invasão (ensaio transwell) destas células, principalmente nas culturas irradiadas com 1J/cm².

A proliferação de células da linhagem SCC25 (CEC de língua) também foi avaliada por Schartinger *et al.* (2012) através do ensaio de MTT. As células foram expostas ao LBI de 660nm, com 350mW e densidades de potência entre 0,39 a 63,7 mW/cm² por 15 minutos (parâmetros não indicados por Bensadoun & Nair 2012), durante 3 dias consecutivos e resultados mostraram que um dia após a última irradiação, as células tumorais irradiadas (em todos parâmetros dosimétricos) exibiram menor proliferação que as não irradiadas (controle).

Já Sperandio *et al.* (2013) avaliaram o efeito do LBI sobre células de CEC das linhagens SCC9 (a mesma usada neste estudo atual) e SCC25, e de uma linhagem displásica de queratinócitos (DOK) sobre a viabilidade celular (ensaio

MTS). As células foram irradiadas com LBI de 660 e 780 nm com 40mW e doses de 2,05, 3,07 e 6,15 J/cm² e a viabilidade avaliada pelo ensaio MTS. As células da linhagem SCC9 apresentaram menor viabilidade quando irradiadas com os lasers de 660 e de 780 nm em todas as densidades de energia testadas após 72h de cultivo. Este resultado se repetiu nos períodos de 24 e 48h nas células irradiadas com laser de 660 nm nas densidades de 3,07 e 6,15 J/cm², já as culturas irradiadas com laser de 780 nm e 2,05 J/cm² evidenciaram aumento de viabilidade em 12, 24 e 48h. As células SCC25 também demonstraram efeitos diversos em relação à dosimetria e tempo de avaliação, houve diminuição da viabilidade após 72h nas culturas irradiadas com laser de 660nm (6,15 J/cm²) e de 780 nm (3,07 e 6,15 J/cm²), mas foi observado aumento de viabilidade nas irradiadas com laser de 660 nm (2,05; 3,07 e 6,15 J/cm²) e nas irradiadas com laser de 780 nm (2,05 e 3,07 J/cm²) em 48h. Já a linhagem displásica DOK não demonstrou diferenças na viabilidade quando irradiada com o laser de 780nm após 24 e 48 horas. Já em 72 horas as células irradiadas com todas as doses demonstraram aumento na viabilidade celular quando comparadas às células não irradiadas (controle). Quando irradiadas com o laser no comprimento de onda de 660nm as células demonstraram maior viabilidade em todos os períodos experimentais. Neste estudo, Sperandio et al. (2013) utilizaram parâmetros recomendados para tratamento da mucosite e como citado anteriormente, relataram efeitos que variam de acordo com a dosimetria e tipo celular avaliado. No presente estudo, avaliou-se o efeito do LBI (em 3 parâmetros dosimétricos recomendados para o tratamento da mucosite por Benasoun & Nair 2012) sobre a viabilidade, invasividade e potencial osteoclastogênico de células de carcinoma epidermóide de boca da linhagem SCC9.

Como os testes de viabilidade *in vitro* podem apresentar diferenças de sensibilidade, este desfecho deve ser avaliado por mais de um tipo de teste (Fotakis & Timbrell 2006, van Tonder *et al.* 2015, Abrahamse 2015).

Deste modo, foram realizados os ensaios de atividade mitocondrial (MTT), cristal violeta, vermelho neutro e atividade da Caspase-3.

No ensaio MTT, as células SCC9 irradiadas (em todos os parâmetros testados) apresentaram menor atividade mitocondrial que as não irradiadas nos períodos de 1 e 3 dias. Como citado anteriormente, Sperandio et al. (2013) relataram diminuição da viabilidade, pelo ensaio MTS (teste similar ao MTT), nas

culturas de SCC9 irradiadas com laser de 660 nm com 3,07 e 6,15 J/cm² e aumento da viabilidade nas culturas irradiadas com laser de 780 nm e 2,05 J/cm² no período de 24h. Já para o período de 72h, os autores relataram resultado similar do presente estudo, ou seja, diminuição da atividade mitocondrial nas culturas irradiadas embora tenham usado parâmetros dosimétricos diferentes (660 e 780 nm com 2,05; 3,07 e 6,15 J/cm²).

No presente estudo, no ensaio cristal violeta, não houve diferença significativa entre as culturas irradiadas e as do grupo controle no período de 1 dia. Já no terceiro dia, apenas as células irradiadas com o laser de 780nm com 70mW apresentaram diminuição na viabilidade em relação às não irradiadas. Já no ensaio de captação do corante vermelho neutro, apenas as células que receberam irradiação do LBI de 660 nm com 40mW, apresentaram diminuição da viabilidade celular quando comparadas ao controle no primeiro dia após a irradiação. Já após 3 dias de cultivo, todos os parâmetros avaliados foram capazes de diminuir a viabilidade das SCC9.

As diferenças entre os resultados dos 3 ensaios de viabilidade provavelmente estão relacionadas às diferenças intrínsecas dos testes (Fotakis & Timbrell 2006, Tonder *et al.* 2015). No ensaio MTT há a conversão de um sal em um cristal por meio de um processo metabólico (que ocorre principalmente nas mitocôndrias, mas não exclusivamente). A taxa de conversão do sal pode ser modificada de acordo com o estado metabólico das culturas, o número de mitocôndrias presente nas células e à absorção da luz laser nestas organelas. Mesmo mitocôndrias não totalmente funcionais podem reter a capacidade de metabolizar este sal. Já o ensaio de captação do vermelho neutro indica a presença de um mecanismo ativo de captação de corante por lisossomos viáveis e o cristal violeta a existência de células aderidas que tiveram seu núcleo corado (Kueng *et al.* 1989, Souza *et al.* 2014, van Tonder *et al.* 2015). Aglutinando os resultados dos testes de viabilidade, pode-se concluir que as células irradiadas com o laser de 780 nm em 70 mW foram as únicas a apresentar menor viabilidade que as não irradiadas, porém é importante também considerar que as células irradiadas (em todos parâmetros) não mostraram aumento de viabilidade em nenhum dos testes nos 2 períodos avaliados.

No ensaio de avaliação da atividade da Caspase-3, após 3 dias de cultivo, apenas as células irradiadas com laser 660nm com 40mW e de 780nm com

70mW apresentaram aumento da atividade Caspase-3, o que sugere que estas células estavam em processo de apoptose (Grivicich et al. 2007), corroborando os dados dos testes anteriores.

Sperandio *et al.* (2013) avaliaram o efeito do LBI com parâmetros diferentes dos usados no estudo atual, sobre a apoptose de células da linhagem SCC9, através do ensaio de TUNEL, porém não foram encontradas diferenças entre as células irradiadas (660 nm com 2,05 J/cm² e 780 nm com 6,15 J/cm²) e o grupo controle após 3 dias. Esta diferença nos resultados pode estar relacionada aos parâmetros dosimétricos, como já discutido anteriormente ou ao tipo de teste aplicado, já que o ensaio de TUNEL avalia a integridade do DNA (Hughes 2003) enquanto que o ensaio da Caspase avalia a atividade de uma das enzimas (caspase 3) responsáveis por clivar substratos que levarão à ativação de genes pró apoptóticos (Grivicich et al. 2007).

O efeito do LBI sobre a invasividade das SCC9 foi avaliado pelo fato do CEC ser um tumor que pode envolver os ossos mandibular e maxilar subjacentes (Iguchi *et al.* 1996, Deyama *et al.* 2008, Tang *et al.* 2008, Chuang *et al.* 2009, Tada *et al.* 2009, Van Cann *et al.* 2009, Jimi *et al.* 2011), sendo estes fatores determinantes de prognóstico (Honig et al., 2006, How et al. 2014)

Os resultados demonstraram que as células irradiadas com o laser de 780nm, nos dois parâmetros estudados, precisaram de mais tempo que as células não irradiadas para fechar a ferida, o que sugere que a irradiação laser no comprimento de onda de 780nm em ambos os parâmetros (40mW e 70mW) mas principalmente com 70 mW, foi capaz de reduzir a invasividade destas células.

Como as células tumorais atuam decisivamente no processo de reabsorção óssea promovida pelo CEC (Tang *et al.* 2008, Chuang *et al.* 2009, Tada *et al.* 2009, Jimi *et al.* 2011), neste estudo primeiramente foi avaliada a atividade osteoclastogênica das células SCC9 e posteriormente os efeitos do LBI sobre esta atividade.

Primeiramente, foi avaliada a atividade da TRAP em culturas de PBMC tratadas com meios condicionados de culturas de células SCC9 e em situação de co-cultivo com estas células. Foi observado que PBMC, cultivados com células SCC9 ou com o meio condicionado de culturas destas células, apresentam maior atividade da TRAP que PBMC cultivados isoladamente e que

PBMC classicamente ativados para diferenciação em osteoclastos (tratamento com RANKL+M-CSF). Esta modulação foi mais evidente na situação de co-cultivo, onde as células SCC9 foram plaqueadas na concentração de 10^4 células/poço.

Estudos anteriores já vinham indicando aumento na marcação de TRAP em monócitos cultivados com meios condicionados oriundos de células de carcinomas, mas este é o primeiro relato com a linhagem SCC9, com dados de atividade enzimática da TRAP em modelo de co-cultivo.

Tang et al. (2008) relataram aumento na marcação de TRAP em PBMC cultivados com meios condicionados obtidos de culturas de células de CEC oral (linhagem SCC4) na concentração de 50%.

Tada et al. 2009 evidenciaram aumento na marcação de TRAP em osteoclastos cultivados com células derivadas de CEC oral humano (linhagem BHY) e com meio condicionado obtido de culturas de BHY cells nas concentrações 20, 50 e 100%. A ação dos meios condicionados foi concentração dependente, sendo que o meio condicionado usado na concentração de 20% não evidenciou um aumento estatisticamente significativo na marcação da TRAP.

Que et al 2012 também avaliaram a marcação de TRAP em células de medula óssea da tíbia de camundongos (BMCs) cultivadas com osteoblastos (UASM-32) e meio condicionado oriundo das linhagens HSC3, HSC3-C13, HSC3-C17 (derivadas de CEC). Mesmo havendo diferenças em relação à capacidade de induzir diferenciação osteoclástica entre os meios condicionados obtidos das diferentes linhagens celulares, o número de células positivas para TRAP sempre foi maior nas culturas suplementadas com os meios condicionados do que nas culturas controle.

A capacidade de indução osteoclastogênica das células SCC9 também foi observada pela imunomarcção de anéis de actina, de receptores de calcitonina e de vitronectina, que são características de osteoclastos, nas PBMC mantidas com as células SCC9, assim como observado nas PBMC tratadas com RANKL+M-CSF.

Para avaliar os efeitos do LBI sobre a indução da atividade osteoclastogênica pelas células SCC9, foram avaliadas a indução da atividade da TRAP em culturas de PBMC e células SCC9 irradiadas (bem como as vias de sinalização

envolvidas nesta indução) e também a expressão de IL-11 e de PTHrP em células SCC9.

No que diz respeito à atividade da TRAP, no período experimental de maior atividade desta enzima (21 dias), as co-culturas que continham células SCC9 irradiadas com laser (em todos os parâmetros estudados) exibiram menor atividade que as co-culturas de PBMC com células SCC9 não irradiadas. O mesmo ocorreu no período de 14 dias, com exceção das co-culturas que continham células SCC9 irradiadas com o laser de 660nm com 40mW onde houve aumento da atividade TRAP. No período de 7 dias não houve diferença entre co-culturas que continham células irradiadas e não irradiadas. A maior redução na atividade da TRAP foi observada nas co-culturas que continham células SCC9 que tinham sido irradiadas com laser de 780nm com 70 mW.

Para melhor avaliar os mecanismos envolvidos na indução da atividade osteoclastogênica das co-culturas, as células SCC9 e PBMC foram cultivadas na presença de inibidores das vias de sinalização intracelulares envolvidas no processo da osteoclastogênese: as vias da MEK, NFkB, p38 e JNK (Zhao et al. 2007).

Neste sentido, foi possível verificar primeiramente que nas co-culturas de SCC9 não irradiadas e PBMC, as vias de sinalização da MEK e p38 parecem não estar envolvidas de maneira significativa. Já as vias NFkB e da JNK parecem exercer um efeito importante. A irradiação causou mudanças importantes nessas vias. Quando as PBMC foram cultivadas com SCC9 irradiadas foi observado uma inibição na atividade da TRAP nas co-culturas cultivadas na presença dos inibidores MEK e p38, já nas vias NFkB e JNK houve uma potencialização do efeito inibitório observado nas co-culturas com SCC9 não irradiadas (principalmente nas co-culturas que continham SCC9 irradiadas com laser de 780 nm com 70 mW), indicando que a irradiação das células SCC9 foi capaz de modificar as vias intracelulares que modulam a sua ação osteoclastogênica nos osteoclastos.

Como o processo da osteoclastogênese é muito complexo e sabe-se que as células tumorais são capazes de produzir várias substâncias ligadas ao processo de reabsorção óssea, entre elas a IL-11 e a PTHrP (proteína ligada ao paratormônio) (Carter *et al* 1983, Guise and Mundy 1998, Shibahara *et al.* 2005,

Kayamori *et al.* 2010, Jimi *et al.* 2011), é importante considerar as diferentes etapas envolvidas.

A IL-11 está envolvida no processo de reabsorção óssea, principalmente pela sua capacidade de induzir a expressão de RANKL, enquanto que a PTHrP estimula a atividade osteoclastogênica por meio da indução da produção de IL-6, TNF e RANKL e está expressa em quase 100% dos casos de CEC (O'Brien *et al.* 1999, Shibahara *et al.* 2005, Matsuo & Irie 2008, Kayamori *et al.* 2010, Shibahara *et al.* 2005, Nagamine *et al.* 2006, Nomura *et al.* 2007, Kayamori *et al.* 2010, Lv *et al.* 2014, Takamatsu *et al.* 2014). A expressão de IL-11 e PTHrP em níveis elevados são indicativos de CEC invasivos (Shibahara *et al.* 2005).

Nagamine *et al.* (2006) e Kayamori *et al.* (2010) demonstraram que muitas linhagens derivadas de CEC humano (HSC2, HSC3, HSC4, BHY, Ca9-22[Ca9], HSC3, e HO1-u-1[HO1]) superexpressam PTHrP. Já Lv *et al.* (2014) demonstraram que as linhagens SCC4, SCC9 (usada neste estudo) e SCC25 todas derivadas de CEC de língua, também produzem níveis elevados de PTHrP. Neste estudo, foi verificado que as células SCC9 expressam os genes IL-11 e PTHrP, assim como já reportado anteriormente e este pode ser um dos mecanismos de diferenciação induzidos pelas SCC9 sobre as culturas de PMBC. No que se refere aos efeitos do LBI, nas SCC9 irradiadas com potência de 40 mW (660 e 780nm) houve um aumento da expressão de IL-11 e PTHrP no período de 2 dias. Já no período de 9 dias, a expressão de IL-11 foi menor nas células irradiadas (em todos parâmetros) e a expressão de PTHrP foi menor nas células irradiadas com laser de 780 nm com 70 mW. Estes dados corroboram a diminuição da atividade da TRAP observada nos períodos de cultivo mais longos.

Aglutinando sinteticamente os dados que exibiram diferenças significantes em uma tabela (tabela 3), pode-se estabelecer que a irradiação com LBI na fluência de 4J/cm², em ambos os comprimentos de onda (660 e 780nm) e potências (40 e 70mW) diminuiu a viabilidade e induziu a apoptose das células da linhagem SCC9. As células irradiadas com LBI de 780nm (em 40 e 70mW) demonstraram menor capacidade de invasão que as do grupo controle não irradiado. Todos os parâmetros dosimétricos avaliados diminuíram a capacidade das SCC9 em induzir a atividade da TRAP e em expressar IL-11. Já a expressão de PTHrP foi menor apenas quando as células foram irradiadas com laser de 780nm na potência de 70mW. Deste modo, a irradiação com laser de 780nm

(70mW, 4J/cm²) pareceu ter maior capacidade de diminuir a viabilidade, o potencial osteoclastogênico e a invasividade de células da linhagem SCC9.

6. Conclusão

Utilizando parâmetros indicados para o tratamento da mucosite oral, observamos que a irradiação laser pode gerar diferentes respostas na linhagem de células SCC9. Deste modo, considerando as limitações deste estudo (modelo *in vitro*, uso de uma única linhagem), pode-se concluir que a utilização do LBI para o tratamento da mucosite oral ainda requer avanços no que concerne ao estabelecimento de uma dosimetria eficaz e segura e que seu papel pode vir a ser mais complexo do que o proposto originalmente na terapêutica das lesões de mucosite decorrentes do tratamento do CEC oral.

7. Referências Bibliográficas

1. Abrahamse H. Stimulation of Cellular Proliferation and Migration: Is It a Viable Measure of Photobiomodulation? *Photomed Laser Surg.* 2015 Jul;33(7):347-8.
2. Al-Ansari S, Zecha JA, Barasch A, de Lange J, Rozema FR, Raber-Durlacher JE. Oral Mucositis Induced By Anticancer Therapies. *Curr Oral Health Rep.* 2015;2(4):202-211.
3. AlGhamdi KM, Kumar A, Moussa NA. Low-level laser therapy: a useful technique for enhancing the proliferation of various cultured cells. *Lasers Med Sci.* 2012 Jan;27(1):237-49.

4. Andersson G, Ek-Rylander B, Hollberg K, Ljusberg-Sjölander J, Lång P, Norgård M, Wang Y, Zhang SJ. TRACP as an osteopontin phosphatase. *J Bone Miner Res.* 2003 Oct;18(10):1912-5.
5. Antunes HS, Ferreira EM, de Matos VD, Pinheiro CT, Ferreira CG. The Impact of low power laser in the treatment of conditioning-induced oral mucositis: a report of 11 clinical cases and their review. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2008 Mar 1;13(3):E189-92.
6. Antunes HS, Herchenhorn D, Small IA, Araújo CM, Viégas CM, Cabral E, Rampini MP, Rodrigues PC, Silva TG, Ferreira EM, Dias FL, Ferreira CG. Phase III trial of low-level laser therapy to prevent oral mucositis in head and neck cancer patients treated with concurrent chemoradiation. *Radiother Oncol.* 2013 Nov;109(2):297-302.
7. Arbo MD, Silva R, Barbosa DJ, da Silva DD, Rossato LG, Bastos ML, Carmo H. Piperazine designer drugs induce toxicity in cardiomyoblast h9c2 cells through mitochondrial impairment. *Toxicol Lett.* 2014 Aug 17;229(1):178-89.
8. Arora H, Pai KM, Maiya A, et al. Efficacy of He-Ne Laser in the prevention and treatment of radiotherapy-induced oral mucositis in oral cancer patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008; 105:180–186.
9. Azim H, Azim HAJr. Targeting RANKL in breastcancer: bone metastasis and beyond. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2013 Feb;13(2):195-201.
10. Bensadoun RJ, Nair RG. Low-Level Laser Therapy in the Management of Mucositis and Dermatitis Induced by Cancer Therapy. *Photomed Laser Surg.* 2015 Oct;33(10):487-91.
11. Bensadoun RJ, Nair RG. Low-level laser therapy in the prevention and treatment of cancer therapy-induced mucositis: 2012 state of the art based on literature review and meta-analysis. *Curr Opin Oncol.* 2012 Jul;24(4):363-70.
12. Blumer MJ, Hausott B, Schwarzer C, Hayman AR, Stempel J, Fritsch H. Role of tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) in long bone development. *Mech Dev.* 2012 Jul;129(5-8):162-76.
13. Boyce, B.F., Advances in the regulation of osteoclasts and osteoclast functions. *J Dent Res,* 2013. 92(10): 860-7.

14. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976 May 7;72:248-54.
15. Bull H, Murray PG, Thomas D, Fraser AM, Nelson PN. Acid phosphatases. *Mol Pathol.* 2002 Apr;55(2):65-72.
16. Carter RL, Tsao SW, Burman JF, Pittam MR, Clifford P, Shaw HJ. Patterns and mechanisms of bone invasion by squamous carcinomas of the head and neck. *Am J Surg.* 1983 Oct;146(4):451-5.
17. Chen Z, Malhotra PS, Thomas GR, Ondrey FG, Duffey DC, Smith CW, Enamorado I, Yeh NT, Kroog GS, Rudy S, McCullagh L, Mousa S, Quezado M, Herscher LL, Van Waes C. Expression of proinflammatory and proangiogenic cytokines in patients with head and neck cancer. *Clin Cancer Res.* 1999 Jun;5(6):1369-79.
18. Chuang FH, Hsue SS, Wu CW, Chen YK. Immunohistochemical expression of RANKL, RANK and OPG in human oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 2009 Nov;38(10):753-87.
19. Chung H, Dai T, Sharma SK, Huang YY, Carroll JD, Hamblin MR. The nuts and bolts of low-level laser (light) therapy. *Ann Biomed Eng.* 2012 Feb;40(2):516-33.
20. Costa-Rodrigues J, Fernandes A, Fernandes MH. Reciprocal osteoblastic and osteoclastic modulation in co-cultured MG63 osteosarcoma cells and human osteoclast precursors. *J Cell Biochem.* 2011 Dec;112(12):3704-13.
21. Costa-Rodrigues J, Moniz KA, Teixeira MR, Fernandes MH. Variability of the paracrine-induced osteoclastogenesis by human breast cancer cell lines. *J Cell Biochem.* 2012 Mar;113(3):1069-79.
22. Cruz LB, Ribeiro AS, Rech A, Rosa LG, Castro CG Jr, Brunetto AL. Influence of low-energy laser in the prevention of oral mucositis in children with cancer receiving chemotherapy. *Pediatr Blood Cancer.* 2007 Apr;48(4):435-40.
23. Cui N, Nomura T, Takano N, Wang E, Zhang W, Onda T, Shibahara T. Osteoclast-related cytokines from biopsy specimens predict mandibular invasion by oral squamous cell carcinoma. *Exp Ther Med.* 2010 Sep;1(5):755-760.

24. Deyama Y, Tei K, Yoshimura Y, Izumiyama Y, Takeyama S, Halta M, Totsuka Y, Suzuki K. Oral squamous cell carcinomas stimulate osteoclast differentiation. *Oncol Rep.* 2008 Sep;20(3):663-8.
25. Duffy SA, Taylor JM, Terrell JE, Islam M, Li Y, Fowler KE, Wolf GT, Teknos TN. Interleukin-6 predicts recurrence and survival among head and neck cancer patients. *Cancer.* 2008 Aug 15;113(4):750-7.
26. Fotakis G, Timbrell JA. In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicol Lett.* 2006 Jan 5;160(2):171-7.
27. Fujihara NA, Hiraki KR, Marques MM. Irradiation at 780 nm increases proliferation rate of osteoblasts independently of dexamethasone presence. *Lasers Surg Med* 2006;38(4):332-6.
28. Gao X, Xing D (2009) Molecular mechanisms of cell proliferation induced by low power laser irradiation. *J Biomed Sci* 2009 Jan;12;16:4
29. Genot-Klastersky MT, Klastersky J, Awada F, Awada A, Crombez P, Martinez MD, Jaivenois MF, Delmelle M, Vogt G, Meuleman N, Paesmans M. The use of low-energy laser (LEL) for the prevention of chemotherapy- and/or radiotherapy-induced oral mucositis in cancer patients: results from two prospective studies. *Support Care Cancer.* 2008 Dec;16(12):1381-7.
30. Georgess D, Machuca-Gayet I, Blangy A, Jurdic P. Podosome organization drives osteoclast-mediated bone resorption. *Cell Adh Migr.* 2014;8(3):191-204.
31. Girasole G, Passeri G, Jilka RL, Manolagas SC. Interleukin-11: a new cytokine critical for osteoclast development. *J Clin Invest.* 1994 Apr;93(4):1516-24.
32. Goda T, Shimo T, Yoshihama Y, Hassan NM, Ibaragi S, Kurio N, Okui T, Honami T, Kishimoto K, Sasaki A. Bone destruction by invading oral squamous carcinoma cells mediated by the transforming growth factor-beta signalling pathway. *Anticancer Res.* 2010 Jul;30(7):2615-23.
33. Gomes Henriques AC, Ginani F, Oliveira RM, Keesen TS, Galvão Barboza CA, Oliveira Rocha HA, de Castro JF, Della Coletta R, de Almeida Freitas R. Low-level laser therapy promotes proliferation and invasion of oral squamous cell carcinoma cells. *Lasers Med Sci.* 2014 Jul;29(4):1385-95.

34. Gori E, Arpinati M, Bonifazi F, Errico A, Mega A, Alberani F, Sabbi V, Costazza G, Leanza S, Borrelli C, Berni M, Feraut C, Polato E, Altieri MC, Pirola E, Loddo MC, Banfi M, Barzetti L, Calza S, Brignoli C, Bandini G, De Vivo A, Bosi A, Baccarani M. Cryotherapy in the prevention of oral mucositis in patients receiving low-dose methotrexate following myeloablative allogeneic stem cell transplantation: a prospective randomized study of the Gruppo Italiano Trapianto di Midollo Osseo nurses group. *Bone Marrow Transplant.* 2007 Mar;39(6):347-52.
35. Gouvêa de Lima A, Villar RC, de Castro G Jr, Antequera R, Gil E, Rosalmeida MC, Federico MH, Snitcovsky IM. Oral mucositis prevention by low-level laser therapy in head-and-neck cancer patients undergoing concurrent chemoradiotherapy: a phase III randomized study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2012 Jan 1;82(1):270-5.
36. Grivicich I, Regner A, da Rocha AB. Morte Celular por Apoptose. *Revista Brasileira de Cancerologia* 2007; 53(3): 335-343.
37. Guise TA, Mundy GR. Cancer and bone. *Endocr Rev.* 1998 Feb;19(1):18-54.
38. Hawkins D, Houreld N, Abrahamse H. Low level laser therapy (LLLT) as an effective therapeutic modality for delayed wound healing. *Ann N Y Acad Sci.* 2005 Nov;1056:486-93.
39. Hill PA, Tumber A, Papaioannou S, Meikle MC. The cellular actions of interleukin-11 on bone resorption in vitro. *Endocrinology.* 1998 Apr;139(4):1564-72.
40. Honig A, Rieger L, Kapp M, Krockenberger M, Eck M, Dietl J, Kammerer U. Increased tartrate resistant acid phosphatase (TRAP) expression in malignant breast, ovarian and melanoma tissue: an investigational study. *BMC cancer.* 2006; 6:199.
41. Hotokezaka H, Sakai E, Kanaoka K, Saito K, Matsuo K, Kitaura H, Yoshida N, Nakayama K. U0126 and PD98059, specific inhibitors of MEK, accelerate differentiation of RAW264.7 cells into osteoclast-like cells. *J Biol Chem.* 2002 Dec 6;277(49):47366-72.
42. How J, Brown JR, Saylor S, Rimm DL. Macrophage expression of tartrate-resistant acid phosphatase as a prognostic indicator in colon cancer. *Histochem Cell Biol.* 2014 Aug;142(2):195-204.

43. Huang YY, Chen ACH, Carroll JD, Hamblin MR. Biphasic dose response in low level light therapy. *Dose Response* (2009)7:358–383
44. Huang YY, Sharma SK, Carroll J, Hamblin MR. Biphasic dose response in low level light therapy - an update. *Dose Response*. 2011;9(4):602-18.
45. Hughes SE. Detection of apoptosis using in situ markers for DNA strand breaks in the failing human heart. Fact or epiphenomenon? *J Pathol*. 2003 Oct;201(2):181-6.
46. Iguchi H, Tanaka S, Ozawa Y, Kashiwakuma T, Kimura T, Hiraga T, Ozawa H, Kono A. An Experimental Model of Bone Metastasis by Human Lung Cancer Cells: The Role of Parathyroid Hormone-related Protein in Bone Metastasis. *Cancer Res*. 1996 Sep;56:4040-4043.
47. INCA – Instituto Nacional do câncer, 2015 – Estimativa 2016/2017 Incidência de Câncer no Brasil - Rio de Janeiro. Disponível em <http://www.inca.gov.br/wcm/dncc/2015/por-tipos.asp>. Acesso em 08.Dez.2015.
48. Ishiyama M, Tominaga H, Shiga M, Sasamoto K, Ohkura Y, Ueno K. A combined assay of cell viability and in vitro cytotoxicity with a highly water-soluble tetrazolium salt, neutral red and crystal violet. *Biol Pharm Bull*. 1996 Nov;19(11):1518-20.
49. Jablonska E, Piotrowski L, Grabowska Z. Serum Levels of IL-1b, IL-6, TNF- α , sTNF-RI and CRP in Patients with Oral Cavity Cancer. *Pathol Oncol Res*. 1997;3(2):126-129.
50. Jimi E, Akiyama S, Tsurukai T, Okahashi N, Kobayashi K, Udagawa N, Nishihara T, Takahashi N, Suda T. Osteoclast differentiation factor acts as a multifunctional regulator in murine osteoclast differentiation and function. *J Immunol*. 1999 Jul 1;163(1):434-42.
51. Jimi E, Furuta H, Matsuo K, Tominaga K, Takahashi T, Nakanishi O. The cellular and molecular mechanisms of bone invasion by oral squamous cell carcinoma. *Oral Dis*. 2011;17(5):462-8.
52. Jimi E, Shuto T, Koga T. Macrophage colony-stimulating factor and interleukin-1 alpha maintain the survival of osteoclast-like cells. *Endocrinology*. 1995 Feb;136(2):808-11.

53. Kademani D, Bell RB, Bagheri S, Holmgren E, Dierks E, Potter B, Homer L. Prognostic factors in intraoral squamous cell carcinoma: the influence of histologic grade. *J Oral Maxillofac Surg.* 2005 Nov;63(11):1599-605.
54. Kameda Y, Takahata M, Komatsu M, Mikuni S, Hatakeyama S, Shimizu T, Angata T, Kinjo M, Minami A, Iwasaki N. Siglec-15 regulates osteoclast differentiation by modulating RANKL-induced phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and Erk pathways in association with signaling Adaptor DAP12. *J Bone Miner Res.* 2013 Dec;28(12):2463-75.
55. Kayamori K, Sakamoto K, Nakashima T, Takayanagi H, Morita K, Omura K, Nguyen ST, Miki Y, Iimura T, Himeno A, Akashi T, Yamada-Okabe H, Ogata E, Yamaguchi A. Roles of interleukin-6 and parathyroid hormone-related peptide in osteoclast formation associated with oral cancers: significance of interleukin-6 synthesized by stromal cells in response to cancer cells. *Am J Pathol.* 2010 Feb;176(2):968-80.
56. Kreisler MB, Haj HA, Noroozi N, Willershausen Bd. Efficacy of low level laser therapy in reducing postoperative pain after endodontic surgery-- a randomized double blind clinical study. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2004 Jan;33(1):38-41.
57. Kueng W, Silber E, Eppenberger U. Quantification of cells cultured on 96-well plates. *Anal Biochem.* 1989 Oct;182(1):16-9.
58. Kwan Tat S, Padrines M, Théoleyre S, Heymann D, Fortun Y. IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2004 Feb;15(1):49-60.
59. Lilleby K, Garcia P, Gooley T, McDonnell P, Taber R, Holmberg L, Maloney DG, Press OW, Bensinger W. A prospective, randomized study of cryotherapy during administration of high-dose melphalan to decrease the severity and duration of oral mucositis in patients with multiple myeloma undergoing autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2006 Jun;37(11):1031-5.
60. Liu TC, Zhang J, Li XE. The balance between normal and tumor tissues in phototherapy of tissues harboring cancer. *Photomed Laser Surg.* 2013 Mar;31(3):93-4.
61. Lv Z, Wu X, Cao W, Shen Z, Wang L, Xie F, Zhang J, Ji T, Yan M, Chen W. Parathyroid hormone-related protein serves as a prognostic indicator

- in oral squamous cell carcinoma. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 2014;18:33-100.
62. Matsuo K, Irie N. Osteoclast-osteoblast communication. *Arch Biochem Biophys.* 2008 May 15;473(2):201-9.
 63. Moore II KA, Mehta V. The Growing Epidemic of HPV-Positive Oropharyngeal Carcinoma: A Clinical Review for Primary Care Providers. *J Am Board Fam Med.* 2015 Jul-Aug;28(4):498-503.
 64. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983;65:55–63.
 65. Myakishev-Rempel M, Stadler I, Brondon P, Axe DR, Friedman M, Nardia FB, Lanzafame R. A preliminary study of the safety of red light phototherapy of tissues harboring cancer. *Photomed Laser Surg.* 2012 Sep;30(9):551-8.
 66. Nagamine K, Kitamura T, Yanagawa-Matsuda A, Ohiro Y, Tei K, Hida K, Higashino F, Totsuka Y, Shindoh M. Expression of parathyroid hormone-related protein confers malignant potential to mucoepidermoid carcinoma. *Oncol Rep.* 2013 Jun;29(6):2114-8.
 67. Nes AG, Posso MB. Patients with moderate chemotherapy-induced mucositis: pain therapy using low intensity lasers. *Int Nurs Rev.* 2005 Mar;52(1):68-72.
 68. Newa M, Bhandari KH, Tang L, Kalvapalle R, Suresh M, Doschak MR. Antibody-mediated "universal" osteoclast targeting platform using calcitonin as a model drug. *Pharm Res.* 2011 May;28(5):1131-43.
 69. Nie S, Xu J, Zhang C, Xu C, Liu M, Yu D. Salicortin inhibits osteoclast differentiation and bone resorption by down-regulating JNK and NF- κ B/NFATc1 signaling pathways. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016 Jan 29;470(1):61-7.
 70. Nomura T, Shibahara T, Katakura A, Matsubara S, Takano N. Establishment of a murine model of bone invasion by oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2007 Mar;43(3):257-62.
 71. O'Brien CA, Gubrij I, Lin SC, Saylor RL, Manolagas SC. STAT3 activation in stromal/osteoblastic cells is required for induction of the receptor activator of NF- κ B ligand and stimulation of osteoclastogenesis by

- gp130-utilizing cytokines or interleukin-1 but not 1,25-dihydroxyvitamin D3 or parathyroid hormone. *J Biol Chem*. 1999 Jul 2;274(27):19301-8.
72. Osta B, Benedetti G, Miossec P. Classical and Paradoxical Effects of TNF- α on Bone Homeostasis. *Front Immunol*. 2014 Feb 13;5:48.
73. Oue E, Lee JW, Sakamoto K, Imura T, Aoki K, Kayamori K, Michi Y, Yamashiro M, Harada K, Amagasa T, Yamaguchi A. CXCL2 synthesized by oral squamous cell carcinoma is involved in cancer-associated bone destruction. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012 Aug 3;424(3):456-61.
74. Pan D, Xu L, Liu H, Zhang W, Liu W, Liu Y, Fu Q, Xu J. High expression of interleukin-11 is an independent indicator of poor prognosis in clear-cell renal cell carcinoma. *Cancer Sci*. 2015 May;106(5):592-7.
75. Pinheiro AL, do Nasclento SC, de Vieira AL, Rolim AB, da Silva PS, Brugnera A Jr. Does LLLT stimulate laryngeal carcinoma cells? An in vitro study. *Braz Dent J*. 2002;13(2):109-12.
76. Pourreau-Schneider N, Ahmed A, Soudry M, Jacquemier J, Kopp F, Franquin JC, Martin PM. Helium-neon laser treatment transforms fibroblasts into myofibroblasts. *Am J Pathol*. 1990 Jul;137(1):171-8.
77. Riahi R, Yang Y, Zhang DD, Wong PK. Advances in wound-healing assays for probing collective cell migration. *J Lab Autom*. 2012 Feb;17(1):59-65.
78. Rodrigues C, Costa-Rodrigues J, Capelas JA, Fernandes MH. Long-term dose- and time-dependent effects of endodontic sealers in human in vitro osteoclastogenesis. *J Endod*. 2013 Jun;39(6):833-8.
79. Rosenthal DI, Trotti A. Strategies for managing radiation-induced mucositis in head and neck cancer. *Semin Radiat Oncol*. 2009 Jan;19(1):29-34.
80. Saba NF, Goodman M, Ward K, Flowers C, Ramalingam S, Owonikoko T, Chen A, Grist W, Wadsworth T, Beitler JJ, Khuri FR, Shin DM. Gender and ethnic disparities in incidence and survival of squamous cell carcinoma of the oral tongue, base of tongue, and tonsils: a surveillance, epidemiology and end results program-based analysis. *Oncology*. 2011;81(1):12-20.
81. Saraiva GL, Lazaretti-Castro M. Marcadores Bioquímicos da Remodelação Óssea na prática clínica. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2002; 46: 72-78.

82. Saravanan BC, Sreekumar C, Bansal GC, Ray D, Rao JR, Mishra AK. A rapid MTT colorimetric assay to assess the proliferation index of two Indian strains of *Theileria annulata*. *Vet Parasitol* 2003;113:211–6.
83. Schartinger VH, Galvan O, Riechelmann H, Dudás J. Differential responses of fibroblasts, non-neoplastic epithelial cells, and oral carcinoma cells to low-level laser therapy. *Support Care Cancer*. 2012 Mar;20(3):523-9.
84. Scott KL, Nogueira C, Heffernan TP, van Doorn R, Dhakal S, Hanna JA, Min C, Jaskelioff M, Xiao Y, Wu CJ, Cameron LA, Perry SR, Zeid R, Feinberg T, Kim M, Vande Woude G, Granter SR, Bosenberg M, Chu GC, DePinho RA, Rimm DL, Chin L. Proinvasion metastasis drivers in early stage melanoma are oncogenes. *Cancer cell*. 2011; 20:92–103.
85. Sheikh S, D'souza J. A case of well differentiated squamous cell carcinoma in an extraction socket. *J Indian Soc Periodontol*. 2012 Oct;16(4):602-5.
86. Shibahara T, Nomura T, Cui NH, Noma H. A study of osteoclast-related cytokines in mandibular invasion by squamous cell carcinoma. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg*. 2005; 34: 789–793.
87. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics 2012. *CA Cancer J Clin*. 2012;62(1):10-29.
88. Silva DF, Mesquita-Ferrari RA, Fernandes KP, Raelle MP, Wetter NU, Deana AM. Effective transmission of light for media culture, plates and tubes. *Photochem Photobiol*. 2012 Sep-Oct;88(5):1211-6.
89. Simões A, Eduardo FP, Luiz AC, Campos L, Sá PH, Cristófaró M, Marques MM, Eduardo CP. Laser phototherapy as topical prophylaxis against head and neck cancer radiotherapy-induced oral mucositis: comparison between low and high/low power lasers. *Lasers Surg Med*. 2009 Apr;41(4):264-70.
90. Sims NA, Jenkins BJ, Nakamura A, Quinn JM, Li R, Gillespie MT, Ernst M, Robb L, Martin TJ. Interleukin-11 receptor signaling is required for normal bone remodeling. *J Bone Miner Res*. 2005 Jul;20(7):1093-102.
91. Sonis ST, Hashemi S, Epstein JB, Nair RG, Raber-Durlacher JE. Could the biological robustness of low level laser therapy (Photobiomodulation) impact its use in the management of mucositis in head and neck cancer patients. *Oral Oncol*. 2016 Feb 3. pii: S1368-8375(16)00008-7

92. Souza NH, Ferrari RA, Silva DF, Nunes FD, Bussadori SK, Fernandes KP. Effect of low-level laser therapy on the modulation of the mitochondrial activity of macrophages. *Braz J Phys Ther.* 2014 Jul-Aug;18(4):308-14.
93. Sperandio FF, Giudice FS, Corrêa L, Pinto DS Jr, Hamblin MR, de Sousa SC. 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 Oct;6(10):839-47.
94. Stockert JC, Blázquez-Castro A, Cañete M, Horobin RW, Villanueva A. MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. *Acta Histochem.* 2012 Dec;114(8):785-96.
95. Tada T, Shin M, Fukushima H, Okabe K, Ozeki S, Okamoto M, Jimi E. Oral squamous cell carcinoma cells modulate osteoclast function by RANKL-dependent and –independent mechanisms. *Cancer Lett.* 2009 Feb 8;274(1):126-31.
96. Takamatsu S, Matsumura N, Baba T, Mandai M, Mikami Y, Konishi I. Humoral hypercalcemia caused by uterine corpus carcinosarcoma consisting of squamous cell carcinoma in its epithelial component. *J Obstet Gynaecol Res.* 2014 Jan;40(1):263-7.
97. Tang CH, Chuang JY, Fong YC, Maa MC, Way TD, Hung CH. Bone-derived SDF-1 stimulates IL-6 release via CXCR4, ERK and NF-kappa B pathways and promotes osteoclastogenesis in human oral cancer cells. *Carcinogenesis.* 2008 Aug;29(8):1483-92.
98. Trivedi S, Mattos J, Gooding W, Godfrey TE, Ferris RL. Correlation of tumor marker expression with nodal disease burden in metastatic head and neck cancer. *Otolaryngol. Otolaryngol Head Neck Surg.* 2013 Aug;149(2):261-8.
99. Vääräniemi J, Halleen JM, Kaarlonen K, Ylipahkala H, Alatalo SL, Andersson G, Kaija H, Vihko P, Väänänen HK 2004 Intracellular machinery for matrix degradation in bone-resorbing osteoclasts. *J Bone Miner Res.* 19:1432-1440.
100. Van Cann EM, Slootweg PJ, de Wilde PC, Otte-Höller I, Koole R, Stoelenga PJ, Merks MA. The prediction of mandibular invasion by squamous cell carcinomas with the expression of osteoclast-related cytokines in biopsy specimens. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2009 Mar;38(3):279-84.

101. van Tonder A, Joubert AM, Cromarty AD. Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays. *BMC Res Notes*. 2015 Feb 20;8:47.
102. Varoni EM, Lodi G, Iriti M. Ethanol versus Phytochemicals in Wine: Oral Cancer Risk in a Light Drinking Perspective. *Int J Mol Sci*. 2015 Jul 27;16(8):17029-47.
103. Vega-Avila E, Pugsley MK. An overview of colorimetric assay methods used to assess survival or proliferation of mammalian cells. *Proc West Pharmacol Soc*. 2011;54:10-4.
104. Werneck CE, Pinheiro AL, Pacheco MT, Soares CP, de Castro JL. Laser light is capable of inducing proliferation of carcinoma cells in culture: a spectroscopic in vitro study. *Photomed Laser Surg*. 2005 Jun;23(3):300-3.
105. Wu D, Tao J, Ding J, Qu P, Lu Q, Zhang W. Interleukin-11, an interleukin-6-like cytokine, is a promising predictor for bladder cancer prognosis. *Mol Med Rep*. 2013 Feb;7(2):684-8.
106. Zhao Q, Shao J, Chen W, Li YP. Osteoclast differentiation and gene regulation. *Front Biosci*. 2007 Jan 1;12:2519-29.
107. Zupan J, Jeras M, Marc J. Osteoimmunology and the influence of pro-inflammatory cytokines on osteoclasts. *Biochem Med (Zagreb)*. 2013;23(1):43-63.

FULL ARTICLE

Photomodulation of the osteoclastogenic potential
of oral squamous carcinoma cells

Tatiana Dias Schalch¹, Kristianne Porta Santos Fernandes^{a,1}, João Costa-Rodrigues²,
Mônica Pereira Garcia², Raquel Agnelli Mesquita-Ferrari¹, Sandra Kalil Bussadori¹,
and Maria Helena Fernandes²

¹ Biophotonics Applied to Health Sciences Postgraduate Program, Nova de Julho University – UNINOVE,
235/249 Vergueiro Street, Zip Code: 01504-001, São Paulo, Brazil

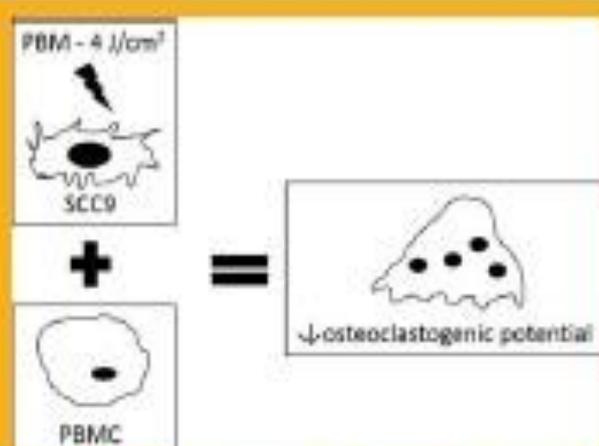
² Laboratory for Bone Metabolism and Regeneration, Faculdade de Medicina Dentária, Universidade do Porto,
Portugal, Dr. Manuel Pereira da Silva Street, Zip Code 4200-303 Porto, Portugal

Received 10 November 2015, revised 15 March 2016, accepted 15 March 2016

Published online 19 April 2016

Key words: photobiomodulation, low-level laser therapy, mucositis, osteoclastogenesis, mouth neoplasms

The treatment for oral cancer usually involves surgical resection followed by chemotherapy and/or radiotherapy. The combination of these therapies generally promotes a serious inflammation of the mucosa of the digestive tract, denominated mucositis, which compromises continuity of treatment. Photobiomodulation (PBM) therapy has been used successfully to reduce the oral mucositis, however there is still some controversy regarding the effects of this therapy on unintentionally irradiated tumor cells that may remain after cancer treatment. The aim of this study was to analyze the effect of PBM therapy (using parameters for mucositis) on the modulation of osteoclastogenic potential of a cell line derived from human lingual squamous cell carcinoma (SCC9). Previously irradiated SCC9 cells were co-cultured with human osteoclast precursors. Co-cultures performed with non-irradiated SCC9 cells served as control. After 7, 14 and 21 days the co-cultures were evaluated for the tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) activity, an osteoclastogenic marker. Additionally, the monocultures of SCC9 cells (non-irradiated and irradiated) were analyzed for cell viability/proliferation and for the expression of IL-11 and PTHrP. The irradiation of SCC9 cells with PBM with an energy density of 4 J/cm² decreased the pro-osteoclastogenic potential of those cells. This may represent a potential useful side effect of PBM therapy.



PBM (using recommended parameters for mucositis treatment) decreases the osteoclastogenic potential of oral squamous carcinoma cells.

* Corresponding author; e-mail: kristianneporta@univ.br, Phone: +55 11 3385-9041

1. Introduction

Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is a malignant tumor with the ability to invade surrounding tissues, presenting a high rate of metastasis to cervical lymph nodes [1–5]. Invasion of the mandible or maxilla by OSCC, which is more common in cases of gingival SCC than lingual SCC, tends to cause fractures accompanied by intense pain that dramatically decrease quality of life even after the excision of the tumor [3, 4, 6, 7]. In such cases, bone invasion is a sign that the tumor is in stage IV and the prognosis is poor [7].

Bone colonization by OSCC is believed to be associated with increased bone resorption caused by osteoclasts, with a direct participation of tumor cells [2–4, 7]. It has been demonstrated that oral SCC cells are able to produce various molecules linked to the process of bone resorption by osteoclasts, such as the prostaglandins E2 and F2, cytokines interleukin (IL)-1 β , IL-6, IL-11 and tumor necrosis factor alpha (TNF- α), transforming growth factor beta, and parathyroid hormone-related protein (PTHrP) [7, 8–11].

Treatment for OSCC usually involves surgical excision followed by chemotherapy and/or radiotherapy [12, 13]. These therapies generally cause a serious inflammation of the mucosa of the digestive tract, which is denominated mucositis [14]. Photobiomodulation (PBM) therapy has been used as a therapeutic agent to modulate the inflammatory process in cases of oral mucositis induced by chemotherapy or radiotherapy [14]. Understanding the effects that PBM therapy have on unintentionally irradiated tumor cells during such treatment has been the focus of many reports [15–19].

The most frequent bone metastases associated with OSCC display an osteolytic nature, which is related with a known pro-osteoclastogenic behavior of cancer cells. Thus, the aim of the present study was to determine whether low-level laser irradiation, using the parameters indicated for the treatment of mucositis, can modulate the osteoclastogenic potential of a cell line derived from human lingual SCC (SCC9). At the best of our knowledge, this issue has not been previously addressed. For that, SCC9 cells were subjected to different laser irradiation conditions and were co-cultured with human osteoclast precursors. Co-cultures were assessed for osteoclast parameters, and the involvement of several intracellular signaling pathways important for osteoclastogenesis was also evaluated. Further, irradiated SCC9 cells were analysed for cell viability/proliferation and for the expression of IL-11 and PTHrP, due to the role of these molecules on the activation of the bone resorption mechanisms by OSCC.

2. Materials and methods

2.1 Oral squamous cell carcinoma cell line (SCC9) culture

SCC9 cells were maintained in DMEM/F-12 medium (Sigma-Aldrich, Andover, Hampshire, UK) supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco, Paisley, UK), 100 IU/ml of penicillin (Gibco), 2.5 μ g/ml of streptomycin (Gibco), 2.5 μ g/ml of amphotericin B (Gibco), and 400 ng/ml de hydrocortisone (Sigma-Aldrich, Andover, Hampshire, UK). At about 70% confluence, cells were detached with 0.05% trypsin and 0.5 mM of EDTA. Cultures were performed at 37 °C in a 5% CO₂ humidified atmosphere.

2.1.1 Laser irradiation of SCC9 cells

After enzymatic detachment, SCC9 cells were pelleted at 1200 rpm for two minutes at 10 °C and irradiated with a Twin-Laser system (Twin-Laser, MMOptics Ltd, São Carlos, São Paulo, Brazil) using several protocols, including the parameters indicated for the treatment of mucositis [14, 16]. Table 1 displays radiance parameters and effective energy, which is the amount of energy that reaches the cells after passing through the polypropylene tube [20]. The laser spot was positioned at the bottom of 50 ml Falcon tubes (TPP, Trasadingen, Schaffhausen, Switzerland) throughout the exposure time to allow the beam to reach the cell pellet directly without going through the culture medium [21]. The experiments were performed in an environment with dim lighting to avoid the influence of external light.

Following irradiation, the pellets were re-suspended and used to perform the co-cultures with PBMC.

2.1.2 Preparation of conditioned media from SCC9 cells

Non-irradiated and irradiated SCC9 cells were seeded at 5×10^4 cells/cm² and maintained for 7 days without any medium change. Afterwards, conditioned media were collected, centrifuged at 550 g for 10 minutes, aliquoted and stored at -20 °C.

Center wavelength [nm]	660	660	660	7%	780	780	7M
Average radiant power [mW]	40	40	40	40	40	40	70
Effective average radiant	30	30	30	30.8	30.8	30.8	53.9
Aperture diameter [cm]	0.43	0.43	0.43	0.43	0.43	0.43	0.43
aperture [mW/cm ²]							
Radiant exposure considering 2	2.71	5.43	5.43	2.71	5.43	10.86	5.43
Number of treatment	1 session						
Total effective radiant	0.38	0.76	0.76	0.38	0.76	1.45	0.76

2.2 Isolation and culture of human peripheral blood mononuclear cells (PBMC)

cells were obtained from blood of healthy donors aged 25 to 35 years, after informed consent. PBMC isolation was conducted as described elsewhere [22]. Briefly, blood was diluted with PBS (1:1) and applied to the top of Ficoll-Paque PREMIUM medium (GE Healthcare Bio-Sciences, Björksgatan, Uppsala, Sweden). After centrifugation at 400 g for 30 min,

Approximately 70×10^6 PBMCs were obtained from

In order to evaluate the ability of PBMC to generate

for their differentiation [22]. PBMC (1.5×10^5 cells/cm²) were incubated for 21 days in DMEM/F12 supplemented with 30% autologous human serum, 100 IU/ml of penicillin, 2.5 µg/ml of streptomycin, 2.5 µg/ml of amphotericin B, and 2 mM of L-gluta-

the absence (unstimulated cultures) or the presence

kappa-B ligand (RANKL), the main osteoclastogenic enhancers [23]. Cultures were incubated at 37°C in a 5% CO₂ humidified atmosphere, and the medium was replaced once a week. Cultures were characterized for osteoclastogenic markers at days 7, 14 and 21.

SCC9 cells were seeded at 10^3 or 10^4 cells/cm² and

don, PBMC were added at a density of 1.5×10^5 cells/cm² and co-cultures were kept in the same cultures. The osteoclastogenic behavior of co-cultured PBMC was compared to that of monocultured PBMC performed in the absence or the presence of

M-CSF and RANKL; PBMC cultures kept with the growth factors serve as the positive control.

2.3.2 Co-culture of irradiated SCC9 cells + PBMC

SCC9 cells were subjected to irradiation, in the conditions defined above. Immediately after, they were seeded and 24 h later they were co-cultured with PBMC, using the protocol described in the previous paragraph. Co-cultures performed with non-irradiated SCC9 cells were used as control.

Both co-cultures were incubated for 7, 14, and 21 days at 37 °C in a 5% CO₂ humidified atmosphere, and culture medium was replaced once a week. Co-cultures were characterized for osteoclastogenic markers throughout the incubation time.

2.4 Viability/proliferation of SCC9 cells

The co-culture experiments described in the previous section involving irradiated SCC9 cells showed that the irradiation conditions corresponding to an energy density of 4 J/cm² elicited a negative effect on osteoclastogenesis. Based on these results, baseline laser dose effects were evaluated for SCC9 cells subjected to this irradiation protocol. This would assist on the interpretation of the role of the irradiation treatments of SCC9 cells in the modulation of the osteoclastogenic response of PBMC.

Non-irradiated and irradiated SCC9 cells were seeded at 10⁵ and 10⁶ cells/cm², and maintained in the same culture conditions described above, for 10 days. Cell viability/proliferation was assessed by the MTT assay at days 1, 7 and 10. Cells were incubated for 3h at 37 °C in the presence of 0.5 mg/mL MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide). Culture medium was removed and formazan crystals were solubilized in DMSO. The absorbance of the samples was evaluated at 550 nm in an ELISA plate reader (Synergy HT, Biotek). Results were presented as a percentage of the values obtained in the control (non-irradiated SCC9 cells).

2.5 Characterization of the osteoclastogenic response

2.5.1 Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) activity

TRAP activity was assessed using the *p*-nitrophenyl phosphate (pNPP) hydrolysis assay [24]. Briefly,

after solubilization of the cell layers with 0.1% (v/v) Triton X-100, cellular extracts were incubated with 12.5 mM of pNPP in 0.04 M of tartaric acid and 0.09 M of citrate (pH 4.8) for 1 h at 37 °C. The reaction was stopped with 5 M of NaOH and the absorbance of the samples was measured at 405 nm in an ELISA plate reader (Synergy HT, Biotek, Winooski, Vermont, USA). The results were normalized to the total protein content of the cultures. Quantification of total protein content was performed by Bradford's method [25] using bovine serum albumin as a standard. Cell cultures were washed with PBS, solubilized with 0.1 M NaOH and treated with Coomassie® Protein Assay Reagent (Fluka, St. Gallen, Switzerland). After 2 minutes of incubation at room temperature, the absorbance at 595 nm was determined in an ELISA plate reader (Synergy HT, Biotek). TRAP activity was expressed as nmol/min µg protein⁻¹.

2.5.2 Cells with actin rings and expressing vitronectin and calcitonin receptors

Cell cultures were fixed (3.7% (v/v) para-formaldehyde, 15 min) and permeabilized (0.1% Triton X-100, 5 min). Actin was stained with 5 U/mL Alexa Fluor1 647-Phalloidin (Invitrogen – Life Technologies, Paisley, Scotland), and vitronectin and calcitonin receptors (VNR and CTR) with 50 mg/ml mouse IgGs anti-VNR and IgGs anti-CTR (R&D Systems Minneapolis, Minnesota, USA), respectively. Detection of IgGs anti-VNR and IgGs anti-CTR was performed with 2 mg/ml Alexa Fluor1 488-Goat anti-mouse IgGs. Cells were observed under confocal laser scanning microscopy (CLSM).

2.5.3 Intracellular signaling pathways

Co-cultures of non-irradiated and irradiated SCC9 cells and PBMC were analyzed for the involvement of important signaling pathways related to osteoclastogenesis [26]. The co-culture experiments mentioned above involving irradiated SCC9 cells showed that the energy density of 4 J/cm² affected significantly the osteoclastogenic potential of these cells. Thus, this energy density was selected to perform the experiments focusing the intracellular pathways. In addition, another set of experiments was performed namely involving an indirect co-culture system, by culturing PBMC in the presence of conditioned media (10%) from SCC9 cells (either non-irradiated or exposed to the same irradiation conditions, energy density of 4 J/cm²). Data from the two assays would provide information on which cell type

the inhibitors are acting on, contributing to understand the role of the tested signaling pathways on the osteoclastogenic response.

Co-cultures of SCC9 cells and PBMC and mono-cultures of PBMC exposed to the conditioned media from SCC9 cells, established as described before, were treated with commercial pathway inhibitors throughout the culture time, and were characterized at days 14 and 21 for TRAP activity. The following pathways were tested: MEK (inhibitor U0126, 1 μ M), p38 (inhibitor SP202190, 5 μ M), NF κ B (inhibitor PDTC, 10 μ M) and JNK (inhibitor SP600125, 10 μ M). Results were compared to those observed in monocultured PBMC treated with the same inhibitors.

2.6 IL-11 and PTHrP gene expression by SCC9 cells

Non-irradiated and laser-irradiated SCC9 cells were cultured (10^4 cells/cm²), as described above, for two and nine days. The selected irradiation conditions were those that elicited a lower osteoclast response in the co-cultures of irradiated SCC9 cells and PBMC (corresponding to an energy density of 4 J/cm²). Cultures showed a confluence of about 30% at 2 days and were confluent at 9 days. SCC9 cells were assessed for the expression of IL-11 and PTHrP at these culture times. Total RNA was extracted using the Nucleo Spin kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) following the manufacturer's instructions and amplified using the reverse transcriptase polymerase

chain reaction (RT-PCR) method (Titan One Tube RT-PCR system; Roche, Branchburg, NJ, USA), with 35 cycles and an annealing temperature of 55 °C. Table 2 displays the primers used. The RT-PCR products were analyzed on 1% (w/v) agarose gel. Gel band intensities were analyzed using the Image J 1.41 software and values were expressed as the percentage of the corresponding GAPDH value of each experimental condition.

2.7 Statistical analysis

Three independent experiments were performed, each one in triplicate. The data were analyzed based on mean and standard deviation values. Analysis of variance (ANOVA) was employed for the comparisons with the aid of the GraphPad InStat-3 software program. Statistical significance was determined using Tukey's test, with the level of significance set at 5% ($p \leq 0.05$).

3. Results

3.1 PBMC cultures as a model for osteoclastogenesis

In order to evaluate the suitability of PBMC cultures to generate a high number of mature osteoclasts, the

Table 2 Primers used in RT-PCR analysis of SCC9 cultures.

Gene	Primer Sequence (Forward)	Primer Sequence (Reverse)
GAPDH	5'-CAGGACCAAGTTCAACCAACAAGT-3'	5'-CTGGCAATGATGGCATGGACTGT-3'
IL-11	5'-ACTGCTGCTGCTGAAGAAGCTCGCTGTGA-3'	5'-ATGGGGAAAGAGCCAGGGCAGAAAGTCTGT-3'
PTHrP	5'-GACTGGTTCAGCAGTGGAGC-3'	5'-ATCGAGCTCCAGCGACGTTTGT-3'

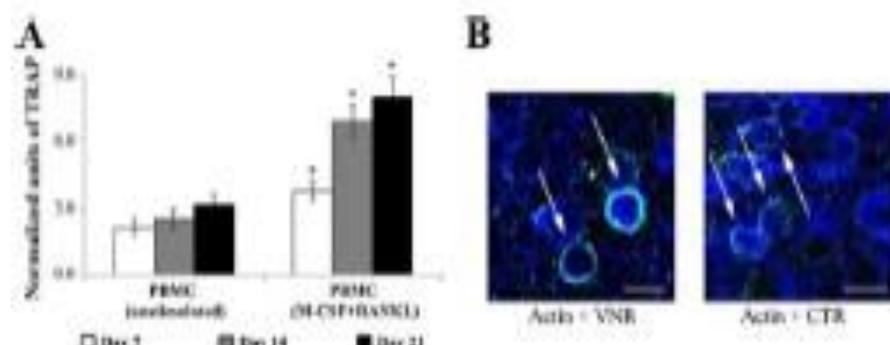


Figure 1 PBMC cultures as a model for osteoclastogenesis. Cells were cultured in the absence (unstimulated) or presence (stimulated) of recombinant M-CSF and RANKL for 21 days. (A) TRAP activity, (B) Presence of actin rings and expression of vitronectin receptors (VNR) and calcitonin receptors (CTR) in stimulated cultures. * Significantly different from unstimulated cultures. White bars represent 150 μ m.

In the absence of the growth factors, cells displayed low TRAP activity throughout the 21-day incubation time (Figure 1A). The presence of M-CSF and RANKL elicited a significant in-

crease in TRAP activity, as well as actin rings and the expression of vitronectin and

3.3 Effect of laser irradiation in the

co-cultures of SCC9 cells, seeded at two densities (10^3 and 10^4 cells/cm²), were co-cultured with PBMC, and the osteoclastic response of co-cultures was evaluated (Figure 2).

The co-culture of SCC9 cells with unstimulated PBMC revealed a significant increase in TRAP activity. With the lower SCC9 cell density, TRAP ac-

tivity was significantly higher (compared to the positive control), ~85%. In the co-cultures performed with the higher SCC9 cell density, TRAP ac-

tivity was significantly higher (compared to the positive control), ~85%. In the co-cultures performed with the higher SCC9 cell density, TRAP ac-

3.3 Effect of laser irradiation in the

co-cultures prior to co-culture with PBMC, and the

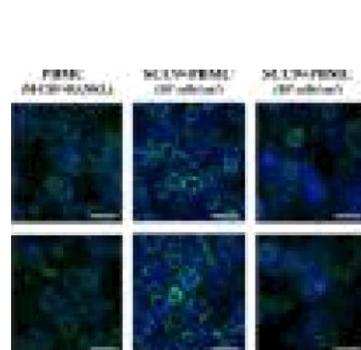
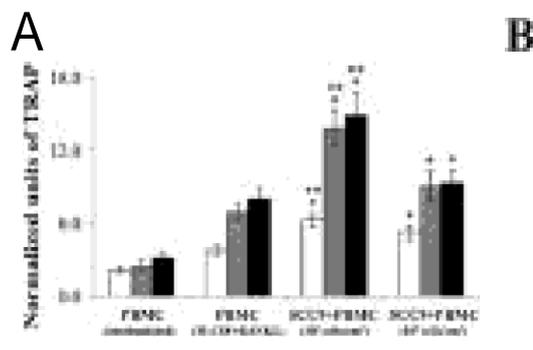
effect of laser irradiation on TRAP activity was noted until day 14 (Figure 3A); nevertheless, at day 21, important changes are worth to note. Consider-

able changes in TRAP activity were observed at 660 nm wavelength (4 J/cm^2 –40 mW) and especially an increase in the output power (780 nm – 4 J/cm^2 –70 mW), promoted a sharp decrease in TRAP activity (~60% and ~90%, respectively). The other two tested energy densities (2 and 6 J/cm^2) did not significantly affect cell response.

In the case of the co-cultures performed with 10^4

cells, the use of a higher output power (780 nm – 4 J/cm^2 –70 mW), promoted the highest decrease in TRAP

activity (~90%). The use of a lower output power (660 nm – 4 J/cm^2 –40 mW), promoted a decrease in TRAP activity (~60%).



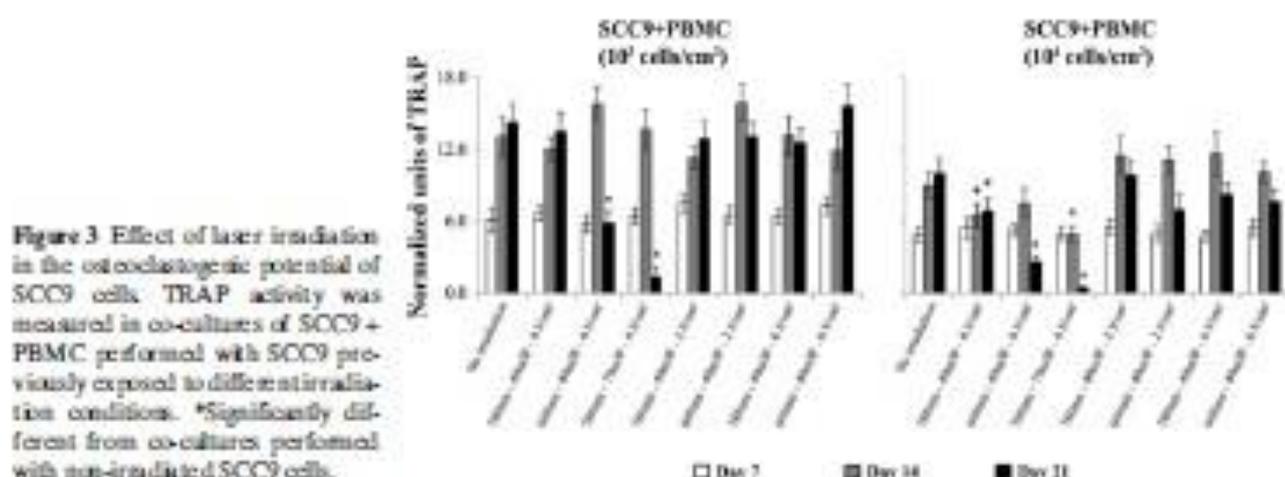


Figure 3 Effect of laser irradiation in the osteoclastogenic potential of SCC9 cells. TRAP activity was measured in co-cultures of SCC9 + PBMC performed with SCC9 previously exposed to different irradiation conditions. *Significantly different from co-cultures performed with non-irradiated SCC9 cells.

sponding to 4 J/cm^2 , and also seeding the cells at 10^3 and 10^4 cells/ cm^2 (Figure 4).

Compared to the control (absence of irradiation), it was observed that SCC9 cells seeded at 10^3 cells/ cm^2 , and subjected to different irradiation conditions, exhibited an increase in cell viability/proliferation throughout the culture period, being the effect more notorious at day 10. The lowest tested wavelength (660nm) elicited the highest cell response. Regarding cell cultures performed with 10^4 SCC9 cells/ cm^2 , at day 1, cell viability was slightly lower than the control, while after longer culture periods cell response was similar or higher than non-irradiated cells. Again, irradiation with a 660 nm laser wavelength elicited the highest cell viability/proliferation.

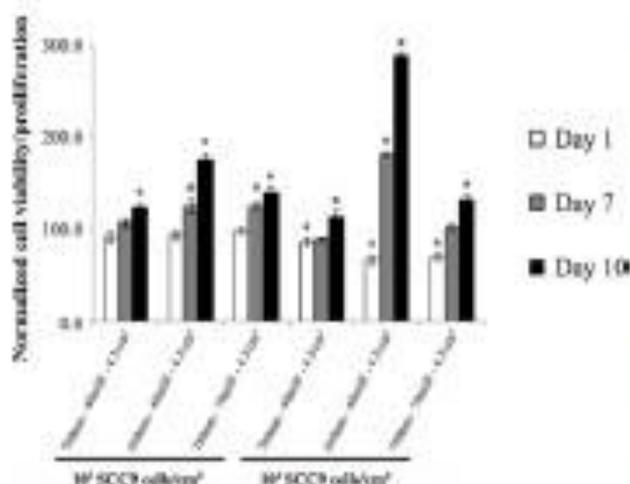


Figure 4 Cell viability/proliferation of SCC9 cell cultures exposed to different irradiation conditions. Cell response was evaluated with the MTT assay. Results are expressed as % from the control (non-irradiated SCC9 cells).

3.4 Intracellular mechanisms involved in the PBMC osteoclastogenic response modulated by laser-treated SCC9 cells

3.4.1 PBMC + SCC9 co-cultures

Figure 5 shows the results for TRAP activity measured in monocultured PBMC and co-cultured PBMC with non-irradiated and irradiated (4 J/cm^2) SCC9 cells, treated with specific inhibitors of MEK, NF κ B, p38 and JNK pathways.

In monocultured PBMC, TRAP activity decreased partially in the presence of U0126 and SP600125 (MEK and JNK pathway inhibitors, respectively), and was completely abolished with PDTC (NF κ B pathway inhibitors). Instead, the presence of SB202190 (p38 pathway inhibitor) did not significantly affect TRAP activity.

Co-cultures of non-irradiated SCC9 cells + PBMC treated with the same pathway inhibitors presented a different behavior. U0126 and SB202190 had no significant effects on TRAP activity, but cell response decreased in the presence of PDTC and SP600125. Comparatively, in the co-cultures of irradiated SCC9 cells + PBMC, U0126 and SB202190 caused a significant decrease on TRAP activity; PDTC and SP600125 also reduced TRAP activity, and the inhibitory effect was higher than that in the co-cultures done with the non-irradiated SCC9 cells. Globally, regardless the intracellular signaling pathway inhibitor, the decrease in TRAP activity observed in the co-cultures involving irradiated SCC9 cells was more notorious with $780 \text{ nm-}4 \text{ J/cm}^2\text{-}70 \text{ mW}$, followed by $660 \text{ nm-}4 \text{ J/cm}^2\text{-}40 \text{ mW}$ and then $780 \text{ nm-}4 \text{ J/cm}^2\text{-}40 \text{ mW}$; also, the inhibition was more pronounced at day 21. This pattern was similar in the co-cultures performed with the two SCC9 cell densities (10^3 or 10^4 cells/ cm^2).

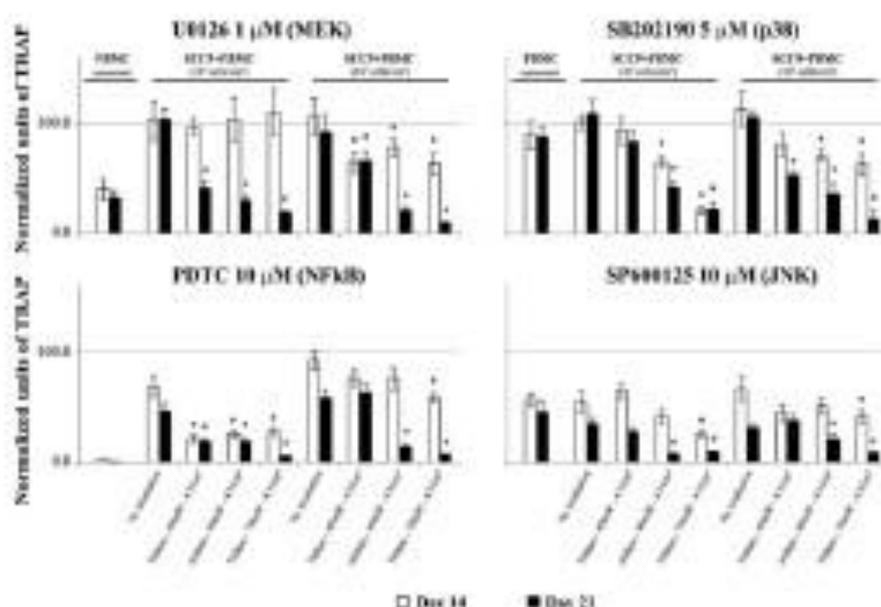


Figure 5 Intracellular mechanisms involved in the modulation of the osteoclastogenic response by SCC9 cells. TRAP activity was measured in co-cultures of non-irradiated and irradiated SCC9 cells + PBMC, performed in the presence of selective signaling pathway inhibitors. TRAP activity is presented as % of variation, after normalization with the results obtained for co-cultures performed with non-irradiated cells and maintained in the absence of any pathway inhibitor. For comparison, monocultured PBMC were also treated with the same inhibitor, and the effect on TRAP activity was evaluated. *Significantly different from co-cultures of non-irradiated SCC9 cells + PBMC.

3.4.2 PBMC cultures treated with conditioned media from SCC9 cells

In order to further characterize the intracellular mechanisms involved in the osteoclastogenic response elicited by SCC9 cells (subjected to different irradiation conditions), namely at the level of individual effects of the tested inhibitors on PBMC cells, PBMC

monocultures were supplemented with conditioned media from non-irradiated and irradiated SCC9 cells and treated with the different inhibitors (Figure 6).

Control cell cultures (maintained in the absence of any signaling pathway inhibitor) revealed high and similar TRAP activity values at days 14 and 21. Following treatment with the inhibitors, and despite the identity of the inhibitor, a decrease on TRAP activity was always observed at day 21 of culture, in the presence of conditioned media from irradiated SCC9 cells. The effects were more pronounced with 780 nm-4 J/cm²-70 mW, followed by 660 nm-4 J/cm²-40 mW and then 780 nm-4 J/cm²-40 mW.

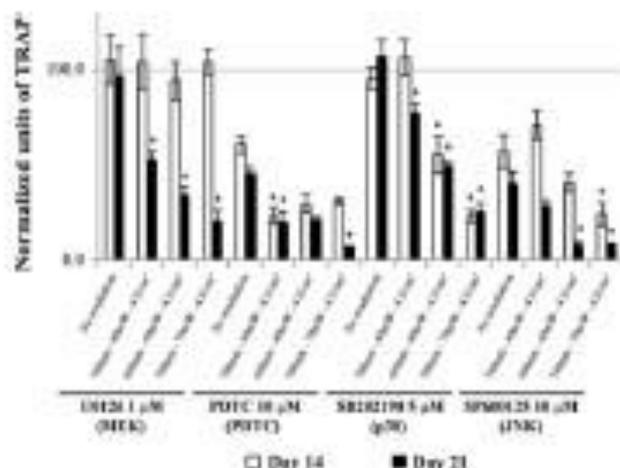


Figure 6 Intracellular mechanisms involved in the modulation of the osteoclastogenic response by conditioned media from SCC9 cells. TRAP activity was measured in PBMC cultures treated with 10% conditioned media collected from non-irradiated and irradiated SCC9 cells, in the presence of selective signaling pathway inhibitors. TRAP activity is presented as % of variation of the control (PBMC cultures treated with conditioned medium from non-irradiated cells and maintained in the absence of any pathway inhibitor). *Significantly different from the cell cultures treated with conditioned media from non-irradiated SCC9 cells.

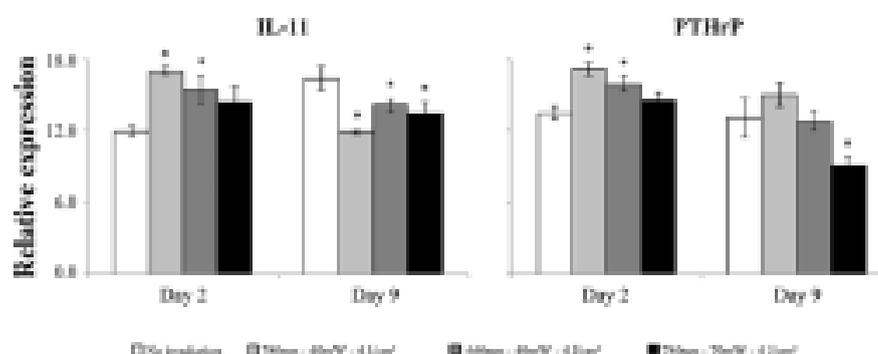
3.5 Expression of IL-11 and PTHrP by SCC9 cells

Non-irradiated and irradiated (4 J/cm²) SCC9 cells were evaluated for IL-11 and PTHrP expression, after 2 and 9 days of culture (Figure 7). At these culture times, cultures presented ~30% confluence and were confluent, respectively.

Expression of IL-11 by non-irradiated SCC9 cells increased from day 2 to day 9 of culture. Cells irradiated with 780 nm-4 J/cm²-40 mW and by 660 nm-4 J/cm²-40 mW conditions exhibited greater IL-11 expression (~42% and ~29%, respectively) at day 2; however, at day 9, cells showed decreased IL-11 expression (~20-25%) following any of the three tested irradiation protocols.

PTHrP expression by non-irradiated SCC9 cells was similar at days 2 and 9. Also, irradiation with 780 nm-4 J/cm²-40 mW and 660 nm-4 J/cm²-40 mW protocols resulted in increased expression (~27%

Figure 7 Expression of IL-11 and PTHrP genes by non-irradiated and irradiated SCC9 cells cultured for 2 and 9 days. Gene expression was analyzed by RT-PCR. * Significantly different from non-irradiated SCC9 cells.



and ~17%, respectively) at day 2; at day 9, expression of PTHrP was not affected with 780 nm-4 J/cm²-40 mW and 660 nm-4 J/cm²-40 mW irradiation but decreased (~30%) with 780 nm-4 J/cm²-70 mW conditions.

4. Discussion

OSCC is an aggressive malignant neoplasm, frequently associated to invasion of bone tissue, namely, in the mandible and maxilla. Patients with OSCC are usually subjected to chemotherapy and radiotherapy [12, 13], which may cause, in the majority of cases, mucositis [14]. Due to this, anti-inflammatory approaches that aim to reduce mucositis are widely used as a complement of OSCC therapy. PBM therapy is one of the strategies used in this context [14]. As tumor cells or premalignant cells could be irradiated unintentionally during the treatment of oral mucositis with PBM therapy in cases of head and neck cancer, evaluating the effects of laser irradiation parameters on tumor cells is a very important issue and has been the focus of previous reports [15–19]. Since the development of osteolytic metastases is frequently associated with OSCC, the aim of this work was to evaluate the effects of different low-level laser irradiations on the osteoclastogenic-modulation properties of an OSCC cell line (SCC9), an issue that was not addressed before.

PBMC were used as osteoclast precursors, since this cell population supports a high degree of osteoclastogenesis [27]. Accordingly, the supplementation of PBMC cultures with M-CSF and RANKL caused a sharp increase in the activity of the osteoclast marker TRAP, and also in the amount of cells displaying important osteoclast features, such as actin rings and vitronectin and calcitonin receptors, suggesting the formation of fully differentiated osteoclasts [28]. This is in line with the well-established role of both growth factors on osteoclastogenesis [26]. Thus, in the present work, non-supplemented PBMC cultures were regarded as unstimulated precursors, whereas

PBMC cultures supplemented with M-CSF and RANKL were used as a positive control to address the osteoclastogenic potential of SCC9 cells.

The ability of SCC9 cells to induce osteoclastic differentiation was evaluated in co-cultures of SCC9 cells and PBMC, performed for 21 days. Due to the scarcity of information regarding the behavior of co-cultured SCC9 cells and PBMC, two SCC9 cell seeding densities were used. With the lowest cell density (10⁵ SCC9/cm²), TRAP activity of the co-cultures increased significantly compared with that observed on the unstimulated precursors, and was even higher than that observed in PBMC cultures supplemented with M-CSF and RANKL (the positive control). Regarding the co-cultures established with the higher SCC9 cell seeding density (10⁶/cm²), TRAP activity was also higher than that measured in unstimulated PBMC cultures, and similar to that of PBMC treated with M-CSF and RANKL. The difference on the magnitude of the cell response on both co-cultures might be explained, at least partly, by the different ratio PBMC/SCC9 cells in co-culture (lower in the culture with the higher SCC9 cell seeding density), affecting the value calculated for TRAP activity, due to the normalization with the total protein content. Nevertheless, the results suggest a high osteoclastogenic potential of SCC9 cells, namely the ability to support osteoclast development in the absence of any osteoclastogenic enhancer, to a degree similar, or even higher, than that observed in PBMC supplemented with the classic M-CSF and RANKL inducers. This is in line with previous reports, where an osteoclastogenic potential was observed for other oral SCC cell lines. It was observed that conditioned media from SCC4 cell line was able to support an increase in TRAP staining in PBMC [2]. Also, BHY cell line was able to promote an increase in osteoclast response, either using conditioned media from that cell line, or in co-cultures with osteoclasts [4]. Recently, Que et al. (2012) [29] also observed that conditioned media from HSC3, HSC3-C13 and HSC3-C17 lines promoted an increase in osteoclastogenesis, in co-cultures of mice osteoclasts and osteoblasts.

Next, the osteoclastogenic potential of irradiated SCC9 cells was also characterized in co-cultures of SCC9 cells and PBMC. SCC9 cells were subjected to different irradiation protocols, namely 2 J/cm², 4 J/cm² and 6 J/cm², and were subsequently co-cultured with PBMC. Regarding each energy density, different parameters were tested, including the wavelength, output power and exposure time, which were determined considering the recommendations found in articles that evaluated the effect of PBM therapy on tumor cells [16] and in a recent systematic review [14]. In that review, it was specified that treatment of oral mucositis should be performed with the dose of 4 J/cm² per point for devices that emit red or infrared laser, with an output power ranging from 10 mW to 150 mW. Thus, in the present work, irradiation time was calculated using the following formula: time (s) = fluence (J/cm²) × area (cm²)/power (W). This formula was determined by the authors using the effective power remaining after the passage of irradiation through the test tube (calculated in accordance with Silva et al. 2012 [20]).

Irradiation of SCC9 cells with energy densities corresponding to 4 J/cm² elicited a pronounced change in their interaction with PBMC. More precisely, co-cultures of previously irradiated SCC9 cells and PBMC presented a significant reduction in TRAP activity. The decrease was higher with an irradiation protocol involving a high wavelength and output power (780 nm and 70 mW), the conditions allowing the higher effective power. Considering the other two protocols (660 nm and 40 mW; 780 nm and 40 mW), with similar effective power, the decrease in TRAP activity was higher with the protocol involving the lower wavelength (660 nm, red laser). With the aim to understand the individual effects of laser irradiation on the behavior of SCC9 cells, a baseline for the laser effects on SCC9 viability/proliferation was established, by using the conditions that elicited a significant modulation of osteoclastogenesis (4 J/cm²). It was observed that, at the beginning, laser irradiation did not affect (cultures performed with 10³ cells/cm²), or transiently decreased (cultures performed with 10⁴ cells/cm²) cell viability. At longer culture periods, a significant increase in cell response was observed in both cell culture conditions; irradiation with the lower wavelength caused the highest increase in cell viability/proliferation, compared to the control.

In order to gain some insight into the mechanisms involved in the observed cell response, the co-cultures of SCC9 cells + PBMC were analyzed for the contribution of several intracellular signaling pathways known to be involved in osteoclastogenesis, namely MEK, NFκB, p38 and JNK pathways [26]. On monocultures of PBMC, MEK and JNK pathways play a role in the synthesis of TRAP, since the presence of specific inhibitors (respectively, U0126 and SP60125) reduced TRAP activity.

NFκB pathway was essential, as the PDTC completely prevented cell response. Instead, p38 pathway did not show a significant contribution (no effect in TRAP activity in the presence of SB202190). Compared to the monocultured PBMC, co-cultures of non-irradiated SCC9 cells and PBMC showed a different behavior regarding TRAP activity measured in the presence of the pathway inhibitors. Similar to that observed in PBMC monocultures, p38 pathway appeared not to be involved in cell response, and JNK pathway had only a partial contribution. However, MEK pathway seemed to be not involved in cell response, and the NFκB pathway had a significantly lower contribution. Further, irradiation of SCC9 cells prior to co-culture with PBMC caused important changes in these pathways. Unlike the co-cultures of non-irradiated SCC9 cell + PBMC, results suggested that MEK and p38 pathways were involved in the cell response. Further, an upregulation of NFκB and JNK pathways also appeared to occur. The effects of the tested pathway inhibitors were more significant with the irradiation protocols 660 nm–4 J/cm²–40 mW and 780 nm–4 J/cm²–70 mW (especially, the last one), and at day 21, the conditions that were associated with the lower osteoclastogenic potential of co-cultured SCC9 cells. The pattern of cell response was similar in the co-cultures performed with the two SCC9 cell densities. However, it is important to highlight that osteoclastogenesis is a very intricate process, which involves a complex network of different intracellular mechanisms [26, 28]. It is the sum of all individual contributions, which are modulated by many different intracellular and extracellular stimuli that dictate the final differentiation state of PBMC. The present study reveals that irradiation of SCC9 cells prior co-culture with PBMC has the ability to affect the complex interplay of intracellular pathways that support osteoclastogenesis, with a global negative impact on the process. It is important to note that the osteoclastogenesis model used in the present work involved two different cell types, namely, SCC9 cells and PBMC. Thus, understanding in which cell type the inhibitors are acting on appears as a critical point. In order to address this issue, the same set of experiments was conducted with an indirect co-culture model, i.e. cell cultures composed only by PBMC, and treated with conditioned media from non-irradiated and irradiated SCC9 cells. Globally, the results were identical to those observed in co-cultures, which strongly suggests that the main effects observed in the presence of signaling pathway inhibitors are related to a direct effect of those molecules on PBMC cells and, consequently, represent a modulation of some important intracellular mechanisms involving osteoclastic cells (or their precursors) by SCC9 cells.

The activation of the osteoclastogenic mechanisms by OSCC is very complex and involves many

- [1] F. F. W. F. ULB & D. I P
6, 839–847 (2013).
- [17] A. C. Gomes Henriques, F. Ghani, R. M. Oliveira, T. S. Keenan, C. A. Galvão Barbosa, H. A. Oliveira Rocha, J. F. de Castro, R. Della Coletta, and R. de Almeida Freitas, *Lasers Med Sci.* **29**, 1385–1395 (2014).
- [18] A. L. Pinheiro, N. S. Carneiro, A. L. Vieira, A. Brugnara Jr, F. A. Zanin, R. A. Barros, and O. S. Silva, *J Clin Laser Med Surg.* **20**, 23–26 (2002).
- [20] D. F. Silva, R. A. Mesquita-Ferrari, K. P. Fernandes, Racle, N. U. Wetter and A. M. Deana, *Photochem Photobiol.* **88**, 1211–1216 (2012).
- [21] G. T. Nogueira, R. A. Mesquita-Ferrari, N. H. Souza, A. Pinheiro, R. Albertini, S. K. Bassaloni, and K. P. Fernandes, *Lasers Med Sci.* **27**, 1189–1193 (2012).
- [22] J. Costa-Rodrigues, A. Fernandes, and M. H. Fernandes, *Cell Prolif.* **44**, 410–419 (2011).
- [23] H. C. Blair and M. Zaidi, *Rev Endocr Metab Disord.* **7**, 23–32 (2006).
- [24] J. Costa-Rodrigues and M. H. Fernandes, *Cell Prolif.* **44**, 264–273 (2011).
- [25] M. Bradford, *Anal Biochem.* **72**, 248–254 (1976).
- [26] J. Costa-Rodrigues, A. Fernandes, and M. H. Fernandes, *Lasers Med Sci.* **27**, 2519–2529 (2012).
- [27] J. Costa-Rodrigues, A. Fernandes, and M. H. Fernandes, *J Cell Biochem.* **112**, 3704–3713 (2011).
- [28] H. K. Väänänen and T. Lahtela-Leinonen T, *Arch Biochem Biophys.* **424**, 456–461 (2012).
- [29] E. Oae, J. W. Lee, K. Sakamoto, T. Imura, K. Aoki, K. Kayanoki, Y. Michi, M. Yamashiro, K. Hanada, T. Zhang, T. Ji, M. Yan, and W. Chen, *J Exp Clin Cancer Res.* **33**, 100 (2014).
- [30] D. Wu, J. Tao, J. Ding, P. Qu, Q. Lu, and W. Zhang, *Cancer Sci.* **106**, 592–597 (2015).
- [31] D. Pan, L. Xu, H. Liu, W. Zhang, W. Liu, Y. Liu, Q. Fu, and J. Xu, *Cancer Sci.* **106**, 592–597 (2015).
- [32] K. Naganine, T. Kitamura, A. Yanagawa-Matuda, Y. Ohtsuro, K. Tei, K. Hida, F. Higashino, Y. Totsuka, and M. Shindoh, *Oncol Rep.* **29**, 2114–2118 (2013).
- [33] S. Trivedi, J. Mattos, W. Gooding, T. E. Godfrey, and I. L. } LW W. €*m A 8 l LW F . f. Zhang, T. Ji, M. Yan, and W. Chen, *J Exp Clin Cancer Res.* **33**, 100 (2014).
- [34] S. Takamatsu, N. Matsumura, T. Baha, M. Mandai, Y. Mikami, and I. Konishi, *J Obstet Gynaecol Res.* **40**, 1409–1415 (2009).
- [35] R. J. Lovvofame, I. Stadler, A. F. Kurtz, R. Connelly, U. Oron, T. Yaakobi, A. Oron, G. Hayam, I. Gepstein, G. Rubin, T. Wolf, and S. Ben Haim, *Lasers Med.* **39**, 534–542 (2007).
- [36] H. Chang, T. Dai, S. K. Sharma, Y. Y. Huang, J. D. 516–533 (2012).
- [37] U. Oron, T. Yaakobi, A. Oron, G. Hayam, I. Gepstein, G. Rubin, T. Wolf, and S. Ben Haim, *Lasers Med.* **39**, 534–542 (2007).
- [38] H. Chang, T. Dai, S. K. Sharma, Y. Y. Huang, J. D. 516–533 (2012).
- [39] RVP @ 6w. T ¥ . B D. D. I 6m- ter, *Photomed Laser Surg.* **29**, 285–304 (2011).
- [40] P. A. Jenkins and J. D. Carroll, *Photomed Laser Surg.* **29**, 785–787 (2011).