

**UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO**

**PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO MESTRADO E DOUTORADO EM  
BIOFOTÔNICA APLICADA À CIÊNCIAS DA SAÚDE.**

**“ANÁLISE DOS EFEITOS DA FOTOBIMODULAÇÃO NA VIABILIDADE E  
CARACTERÍSTICAS DE CELULAS-TRONCO DE CÂNCER DE LINHAGENS  
CELULARES DERIVADAS DE CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE BOCA.”**

**ANA MELISSA CCOPA IBARRA**

**São Paulo, SP**

**2019**

**UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO**

**PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO MESTRADO E DOUTORADO EM  
BIOFOTÔNICA APLICADA À CIÊNCIAS DA SAÚDE.**

**“ANÁLISE DOS EFEITOS DA FOTOBIMODULAÇÃO NA VIABILIDADE E  
CARACTERÍSTICAS DE CELULAS-TRONCO DE CÂNCER DE LINHAGENS  
CELULARES DERIVADAS DE CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE BOCA”**

Dissertação apresentada à  
Universidade Nove de Julho, para a  
obtenção do título de Mestre em  
Biofotônica Aplicada à Ciências da  
Saúde

**Orientadora:** Profa. Dra. Maria  
Fernanda Setúbal Destro Rodrigues

**São Paulo, SP**

**2019**

## Ficha Catalográfica

***Ibarra, Ana Melissa Ccopa.***

***Análise dos efeitos da fotobiomodulação na viabilidade e características de células-tronco de câncer de linhagens celulares derivadas de carcinoma epidermóide de boca. / Ana Melissa Ccopa Ibarra. 2019.***

***80 f.***

***Dissertação (Mestrado) – Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2019.***

***Orientador (a): Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Fernanda Setúbal Destro Rodrigues.***

***1. Fotobiomodulação. 2. LLLT. 3. LED. 4. Células tronco de câncer. 5. CEB.***

***I. Rodrigues, Maria Fernanda Setúbal Destro. II. Título***

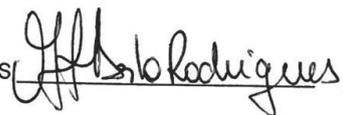
São Paulo, 23 de janeiro de 2019

**TERMO DE APROVAÇÃO**

Aluno (a): Ana Melissa Ccopa Ibarra

Título da Dissertação: "Análise dos efeitos da fotobiomodulação na viabilidade e características de células-tronco de câncer de linhagens celulares derivadas de carcinoma epidermóide de boca"

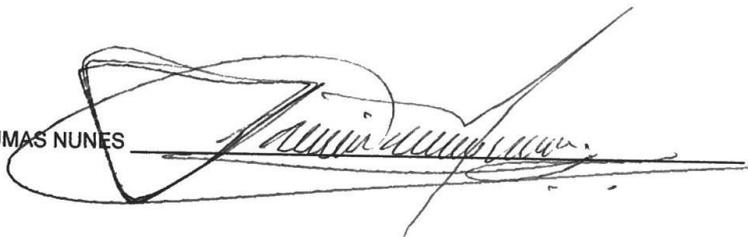
Presidente: PROFª. DRª. MARIA FERNANDA SETÚBAL DESTRO RODRIGUES



Membro: PROFª. DRª. CHRISTIANE PAVANI



Membro: PROF DR FABIO DAUMAS NUNES



## Dedicatória

Dedico esta pesquisa a Deus, por toda força e esperança para seguir em frente; aos meus pais, que juntos com muita paciência e compreensão me guiaram por toda a vida; aos meus irmãos por todos os risos e choros que dividimos; e aos meus amigos, sempre me apoiam para seguir com determinação.

## **Agradecimentos**

Primeiramente, à minha orientadora Maria Fernanda Setúbal Destro Rodrigues, por sua orientação e dedicação na produção desta pesquisa.

À Monica Pereira Garcia, por sua colaboração e parceria para a realização desta pesquisa.

À professora Daniela de Fátima Teixeira da Silva, por sua colaboração e apoio que permitiram a realização desta pesquisa.

Ao professor Renato Araujo Prates pela acessibilidade aos equipamentos que permitiram a realização desta pesquisa.

Ao Laboratório de Patologia Molecular e ao professor Fabio Daumas Nunes (FOUSP), pela acessibilidade à infraestrutura e equipamentos que permitiram o desenvolvimento desta pesquisa.

À Universidade de São Paulo pela infraestrutura disponível para o desenvolvimento desta pesquisa.

À Universidade Nove de Julho, pela infraestrutura disponível e necessária para o desenvolvimento desta pesquisa.

Aos setores administrativos do Programa de Pós-Graduação Biofotônica aplicada às Ciências da Saúde, pelo apoio e organização.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação Biofotônica aplicada às Ciências da Saúde que em suas disciplinas subsidiaram conhecimentos basilares à realização desta pesquisa.

À Coordenação de aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES), pelo apoio financeiro desta pesquisa.

## Resumo

O carcinoma epidermóide de boca (CEB), contém uma população de células denominadas células-tronco de câncer (CTC), responsáveis por sustentar o crescimento tumoral, desenvolvimento de metástases bem como resistência à terapia. O tratamento do CEB pode promover o desenvolvimento da mucosite oral, caracterizada por uma inflamação com intensa sintomatologia dolorosa. A fotobiomodulação (FBM) é utilizada para o tratamento e prevenção da mucosite oral, entretanto, existe controvérsia em relação ao uso desta ferramenta terapêutica em pacientes com CEB, uma vez que a mesma poderia atuar favorecendo a progressão tumoral ao atuar em células neoplásicas, incluindo as CTC que possam ter permanecido no local após o tratamento. Desta maneira, este estudo teve como objetivo avaliar *in vitro* a viabilidade celular e as características de CTC de linhagens celulares derivadas de CEB após a FBM com parâmetros dosimétricos utilizados para o tratamento da mucosite, por meio dos ensaios de formação de colônias, esferas e citometria de fluxo para os marcadores de superfície celular CD44 e ESA. Dentre os resultados obtidos, a viabilidade celular e autofagia celular variaram em relação à frequência de irradiações, os grupos expostos a uma única irradiação apresentaram perfil de promoção tumoral, o grupo LED1+3J/cm<sup>2</sup> apresentou aumento de viabilidade pelos ensaios de MTT e VN, bem como redução de unidade arbitrárias de autofagia, contudo, o aumento foi inibido quando as células foram expostas a irradiações diárias, onde LED3+3J/cm<sup>2</sup> e LED3+6J/cm<sup>2</sup> não promoveram o aumento de viabilidade celular. O grupo 6J/cm<sup>2</sup> apresentou um perfil inibitório de viabilidade celular. Não foram observadas alterações nos genes relacionados com fonotipo tronco, transição epitélio-mesenquimal e diferenciação celular. Não foram observadas alterações nas populações celulares CD44/ESA. Foi observada redução em formação de esferas para os grupos LED3. Os parâmetros dosimétricos que mais se aproximam da prática clínica, não foram capazes de aumentar a viabilidade das células tumorais nem favorecer o fenótipo tronco.

**Palavras Chave:** Fotobiomodulação, LLLT, LED, células tronco de câncer

## Abstract

The oral squamous cell carcinoma (OSCC) have a subpopulation of cells, termed as cancer stem cells (CSC), responsible for tumor growth, metastasis and therapeutic resistance. OSCC treatment may promote the development of oral mucositis, characterized by an inflammation with severe symptomatology. Photobiomodulation (PBM) is a tool for treatment and prevention of oral mucositis, however, the use of PBM remains controversy as it could promote tumor progression by acting in neoplastic cells, including the CSC, that could be remained in the tissue after treatment. Thus, the aim of this study is to evaluate *in vitro* the cellular viability and CSC characteristics in cell lines derived from OSCC after PBM using the clonogenic and sphere formation assay as well as flow cytometry to investigate the expression of CD44 and ESA. This study results show that the cellular viability and cellular autophagy results vary in relation to the irradiation frequency, the groups exposed to a single irradiation presented tumoral progression, the LED1+3J/cm<sup>2</sup> group presented raise of cellular viability trough MTT and VN assays, as well reduction of arbitrary autophagy units. However, the promotion was inhibited when the cells were exposed daily, where LED3+3J/cm<sup>2</sup> and LED3+6J/cm<sup>2</sup> groups did not promote the cellular viability. The 6J/cm<sup>2</sup> group presented a cellular viability reduction profile. No change in gene related to stem cell fenotype, epithelial mesenchymal transition and cellular differentiation was observed. No alteration in the cellular populations marked with CD44/ESA was observed. A reduction in sphere formation was observed for the LED3 groups. The parameters used for clinical practice were not capable of promoting the cellular viability of tumoral cell lines, nor favor the stem cell fenotype.

**Key Words:** Photobiomodulation, LLLT, LED, Cancer Stem Cells

## Sumário

<b>1.Contextualização</b> .....	15
1.1. Carcinoma Epidermóide de Boca (CEB).....	15
1.2. Células tronco de câncer no CEB.....	17
1.3. Mucosite Oral.....	22
1.4 Fotobiomodulação no tratamento de mucosite oral.....	25
1.5 Fotobiomodulação no CEB.....	29
<b>2.Objetivos</b> .....	33
2.1 Objetivo Geral.....	33
2.2 Objetivo Específico.....	33
<b>3.Materiais e métodos</b> .....	34
3.1. Cultivo celular.....	34
3.2. Grupos Experimentais.....	34
3.3. Fotobiomodulação.....	35
3.4. Análise da Viabilidade celular.....	36
3.4.1 MTT.....	37
3.4.2 Vermelho Neutro.....	37
3.4.3 Cristal Violeta.....	38
3.4.4 Índice de Unidades de Autofagia Arbitrárias.....	38
3.5. Análise de formação de colônias.....	39
3.6. Capacidade de formação de esfera.....	39
3.7. Citometria de fluxo para análise da expressão de CD44 e ESA.....	40
3.8. Isolamento do RNA.....	40
3.9 Síntese de DNA complementar (cDNA).....	41
3.10. PCR quantitativo (qPCR).....	41
3.11. Análise Estatística.....	43
<b>4.Resultados</b> .....	44
4.1Viabilidade Celular.....	44
4.1.1. Viabilidade Celular por MTT.....	44
4.1.2. Viabilidade Celular por Vermelho Neutro.....	46
4.1.3. Viabilidade Celular por Cristal Violeta.....	48
4.1 Unidades de Autofagia Arbitrarias <i>in vitro</i> .....	53

4.3 Capacidade de formação de colônias.....	53
4.4 Capacidade de formação de esferas.....	57
4.5 Análise da expressão de CD44 e ESA.....	59
4.6 Análise da expressão dos genes BMI1, OCT4, SLUG, CALGRANULINA e INVOLUCRINA.....	60
<b>5. Discussão.....</b>	<b>62</b>
<b>6. Conclusão.....</b>	<b>71</b>
<b>7. Referências bibliográficas.....</b>	<b>72</b>
<b>Anexos.....</b>	<b>78</b>
<b>Anexo I: Correlação entre os valores de AAU e viabilidade por CV</b>	
<b>Membros da Banca Avaliadora.....</b>	<b>80</b>

<b>Lista de Figuras</b>	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1:</b> Imagem representativa do equipamento LEDbox utilizado na FBM (A) e posicionamento da placa de cultura celular a 1 cm de distância da fonte de luz (B)	36
<b>Figura 2:</b> Representação esquemática das condições experimentais utilizadas para análise da viabilidade celular nas linhagens CA1, LUC4 e SCC9 por meio dos ensaios de MTT, VN e CV.	36
<b>Figura 3:</b> Média ( $\pm$ desvio padrão) da porcentagem de células viáveis obtida no ensaio de MTT nos grupos LED1+1,5J/cm <sup>2</sup> , LED1+3J/cm <sup>2</sup> e LED1+6J/cm <sup>2</sup> em relação ao grupo controle nas linhagens celulares CA1 (A), LUC4 (B) e SCC9 (C) após 24 da irradiação	44
<b>Figura 4:</b> Média ( $\pm$ desvio padrão) da porcentagem de células viáveis obtida no ensaio de MTT nos grupos LED1+1,5J/cm <sup>2</sup> , LED1+3J/cm <sup>2</sup> e LED1+6J/cm <sup>2</sup> em relação ao grupo controle nas linhagens celulares CA1 (A), LUC4 (B) e SCC9 (C) após 72h da irradiação	45
<b>Figura 5:</b> Média ( $\pm$ desvio padrão) da porcentagem de células viáveis obtida no ensaio de MTT nos grupos LED3+1,5J/cm <sup>2</sup> , LED3+3J/cm <sup>2</sup> e LED3+6J/cm <sup>2</sup> em relação ao grupo controle nas linhagens celulares CA1 (A), LUC4 (B) e SCC9 (C)	45
<b>Figura 6:</b> Média ( $\pm$ desvio padrão) da porcentagem de células viáveis nos diferentes grupos LED1 e LED3 das linhagens celulares CA1 (A), LUC4 (B) e SCC9 (C) avaliadas pelo ensaio de MTT	46
<b>Figura 7:</b> Média ( $\pm$ desvio padrão) da porcentagem de células viáveis obtida no ensaio de VN nos grupos LED1+1,5J/cm <sup>2</sup> , LED1+3J/cm <sup>2</sup> e LED1+6J/cm <sup>2</sup> em relação ao grupo controle nas linhagens celulares CA1 (A), LUC4 (B) e SCC9 (C) após 24h da irradiação.	46
<b>Figura 8:</b> Média ( $\pm$ desvio padrão) da porcentagem de células viáveis obtida no ensaio de VN nos grupos LED1+1,5J/cm <sup>2</sup> , LED1+3J/cm <sup>2</sup> e LED1+6J/cm <sup>2</sup> em relação ao grupo controle nas linhagens celulares CA1 (A), LUC4 (B) e SCC9 (C) após 72h da irradiação.	47
<b>Figura 9:</b> Média ( $\pm$ desvio padrão) da porcentagem de células viáveis obtida no ensaio de VN nos grupos LED3+1,5J/cm <sup>2</sup> , LED3+3J/cm <sup>2</sup> e LED3+6J/cm <sup>2</sup> em relação ao grupo controle nas linhagens celulares CA1 (A), LUC4 (B) e SCC9 (C)	47
<b>Figura 10:</b> Média ( $\pm$ desvio padrão) da porcentagem de células viáveis nos diferentes grupos LED1 e LED3 das linhagens celulares CA1 (A), LUC4 (B) e SCC9 (C) avaliadas pelo ensaio de VN	48
<b>Figura 11:</b> Média ( $\pm$ desvio padrão) da porcentagem de células viáveis obtida no ensaio de CV nos grupos LED1+1,5J/cm <sup>2</sup> , LED1+3J/cm <sup>2</sup> e LED1+6J/cm <sup>2</sup> em relação ao grupo controle nas linhagens celulares CA1 (A), LUC4 (B) e SCC9 (C) após 24 da irradiação	48
<b>Figura 12:</b> Média ( $\pm$ desvio padrão) da porcentagem de células viáveis obtida no ensaio de CV nos grupos LED1+1,5J/cm <sup>2</sup> , LED1+3J/cm <sup>2</sup> e LED1+6J/cm <sup>2</sup> em relação ao grupo controle nas linhagens celulares CA1 (A), LUC4 (B) e SCC9 (C) após 72h da irradiação	49

- Figura 13:** Média ( $\pm$  desvio padrão) da porcentagem de células viáveis obtida no ensaio de CV nos grupos LED3+1,5J/cm<sup>2</sup>, LED3+3J/cm<sup>2</sup> e LED3+6J/cm<sup>2</sup> em relação ao grupo controle nas linhagens celulares CA1 (A), LUC4 (B) e SCC9 (C) 49
- Figura 14:** Média ( $\pm$  desvio padrão) da porcentagem de células viáveis nos diferentes grupos LED1 e LED3 das linhagens celulares CA1 (A), LUC4 (B) e SCC9 (C) avaliadas pelo ensaio de CV 50
- Figura 15:** Média ( $\pm$  desvio padrão) dos valores de AAU nos grupos LED1+1,5J/cm<sup>2</sup>, LED1+3J/cm<sup>2</sup> e LED1+6J/cm<sup>2</sup> em relação ao grupo controle nas linhagens celulares CA1 (A), LUC4 (B) e SCC9 (C) após 24h da irradiação 53
- Figura 16:** Média ( $\pm$  desvio padrão) dos valores de AAU nos grupos LED1+1,5J/cm<sup>2</sup>, LED1+3J/cm<sup>2</sup> e LED1+6J/cm<sup>2</sup> em relação ao grupo controle nas linhagens celulares CA1 (A), LUC4 (B) e SCC9 (C) após 72h da irradiação 54
- Figura 17:** Média ( $\pm$  desvio padrão) dos valores de AAU nos grupos LED3+1,5J/cm<sup>2</sup>, LED3+3J/cm<sup>2</sup> e LED3+6J/cm<sup>2</sup> em relação ao grupo controle nas linhagens celulares CA1 (A), LUC4 (B) e SCC9 (C) após 72h da irradiação 55
- Figura 18:** Média ( $\pm$  desvio padrão) comparação dos valores de AAU nos grupos LED1 e LED3 das linhagens celulares CA1 (A), LUC4 (B) e SCC9 (C) 56
- Figura 19:** Morfologia das colônias formadas nos grupos controle, LED3+3J/cm<sup>2</sup> e LED3+6J/cm<sup>2</sup> das linhagens celulares CA1, LUC4 e SCC9. 56
- Figura 20:** Formação de colônias nas linhagens celulares CA1, LUC4 e SCC9 nos grupos controle, LED3+3J/cm<sup>2</sup> e LED3+6J/cm<sup>2</sup> (A). Média ( $\pm$ desvio padrão) do número de colônias observado em cada grupo (B) 57
- Figura 21:** Formação de esferas nas linhagens CA1, LUC4 e SCC9 nos grupos controle, LED3+3J/cm<sup>2</sup> e LED3+6J/cm<sup>2</sup> (A). Média ( $\pm$ desvio padrão) do número de esferas observado em cada grupo (B) 58
- Figura 22:** Imagem representativa da seleção das subpopulações CD44<sup>high</sup>/ESA<sup>high</sup>, CD44<sup>high</sup>/ESA<sup>low</sup> e CD44<sup>low</sup> na linhagem CA1 nos grupos Controle (A), LED3+3J/cm<sup>2</sup> (B) e LED3+6J/cm<sup>2</sup> (C). 59
- Figura 23:** Análise da expressão de CD44<sup>high</sup>/ESA<sup>high</sup>, CD44<sup>high</sup>/ESA<sup>low</sup> e CD44<sup>low</sup> nas linhagens CA1 (A), LUC4 (B) e SCC9 (C) nos grupos controle, LED3+3J/cm<sup>2</sup> e LED3+6J/cm<sup>2</sup> 59
- Figura 24:** Análise da expressão dos genes BMI1 (A), OCT4 (B), SLUG (C), CALGRANULINA (D)e INV (E) nas linhagens celulares CA1, LUC4 e SCC9 nos grupos controle, LED3+3J/cm<sup>2</sup> e LED3+6J/cm<sup>2</sup> 61

**Lista de Tabelas**

<b>Tabela 1:</b> Parâmetros dosimétricos utilizados para a irradiação das linhagens celulares CA1, LUC4 e SCC9.....	35
<b>Tabela 2:</b> Genes alvos utilizados para amplificação por qPCR nas linhagens CA1, LUC4 e SCC9 nos grupos controle, LED3+3J/cm <sup>2</sup> e LED3+6J/cm <sup>2</sup> , segundo o número de acesso no GenBank, sequência dos primers, temperatura de anelamento (T <sub>m</sub> ), concentração dos primers e tamanho do produto amplificado.....	42
<b>Tabela 3:</b> Resumo dos dados obtidos nos ensaios de viabilidade celular por MTT, VN e CV nos diferentes grupos de estudo, período e linhagem celular.....	52

## Lista de Abreviaturas e Símbolos

ABCT	<i>ATP-binding cassette transporter</i>
ALDH1	<i>Aldehyde Dehydrogenase</i>
ANOVA	Análise de Variância
ATP	Trifosfato de Adenosina
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
Akt	Protein Kinase B
cDNA	DNA complementar
CEB	Carcinoma Epidermóide de Boca
CTC	Célula Tronco de Câncer
CTE	Célula Tronco Embrionária
COX-2	Ciclo-oxigenase 2
CV	Cristal Violeta
DDR	<i>DNA Damage Response</i>
DNA	Ácido Ribonucleico
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
ESA	Antígeno Específico Epitelial, do inglês <i>Epithelial Specific Antigen</i>
EGFR	Receptor de Fator de Crescimento Epidermal, do inglês <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
FACS	Citometria de Fluxo, do inglês <i>Flow Cytometric Analysis</i>
FBM	Fotobiomodulação
IL	Interleucina
LASER	Luz Amplificada por Emissão Estimulada, do inglês <i>Light Amplification by Stimulated Emission</i>
LED	Diodo Emissor de Luz, do inglês <i>Light Emitting Diode</i>
LMA	Leucemia Mielóide Aguda
MTT	Methyl-Thiazolyl-Tertrazolium
MO	Mucosite Oral
NFKB	Fator Nuclear Kappa B
PBS	Tampão Fosfato
PolyHEMA	Polyhydroxyethylmethacrylate
Ph	Potencial Hidrogênico
SFB	Soro Fetal Bovino
TEM	Transição Epitelio-Mesenquimal
TGF-B	Fator de Transformação do Crescimento
TNF-A	Fator de Necrose Tumoral
VN	Vermelho Neutro

## 1. CONTEXTUALIZAÇÃO

### 1.1 Carcinoma Epidermóide de Boca

O câncer de cavidade oral representa atualmente um dos mais frequentes tipos de câncer no mundo, sendo considerado um problema de saúde pública mundial<sup>1</sup>. No Brasil, o câncer oral ocupa a quinta posição dentre os tipos de neoplasias malignas mais comuns no sexo masculino, sendo o décimo primeiro, entre as mulheres<sup>2</sup>.

Entre os vários tipos de câncer que afetam a cavidade oral, o carcinoma epidermóide de boca (CEB) é a neoplasia maligna de maior prevalência, correspondendo à cerca de 90% dos casos<sup>3</sup>. Para seu desenvolvimento, pode ser categorizado em fatores de risco de duas formas, ou seja, em fatores intrínsecos e extrínsecos. Alguns fatores de risco extrínsecos correlacionados com o desenvolvimento do CEB mais comuns são o tabagismo, consumo de álcool, exposição prolongada à luz ultravioleta e infecção pelo vírus HPV. Os fatores de risco intrínsecos constituem a deficiência imune, deficiência de vitaminas A, E ou C bem como a susceptibilidade genética.<sup>1,3</sup>

Frequentemente, os pacientes com CEB são diagnosticados em estágio avançado da doença, sendo que 21% dos pacientes apresentam metástases cervicais e regionais no momento do diagnóstico e desta maneira, a taxa de sobrevida é estimada em 5 anos em 50% dos casos<sup>4</sup>. Em estados iniciais, o CEB pode se apresentar como uma alteração indolor e com a evolução da doença, pode haver desconforto ou sensibilidade, acompanhados de um crescimento tecidual ou lesão ulcerada persistente<sup>5</sup>. O CEB pode se manifestar em diversas regiões anatômicas incluindo assoalho, dorso e borda de língua, gengiva, palato duro e lábios; sendo mais frequente nas regiões de assoalho e borda lateral de língua.<sup>4</sup>

A região de cabeça e pescoço se caracteriza por ser rica em vias linfáticas e, por esta razão, a principal via de disseminação do CEB ocorre por drenagem linfática de células tumorais para os linfonodos do pescoço. A presença de tumores metastáticos representa um fator crítico para a sobrevida dos pacientes, sendo responsável por mais de 90% da taxa de mortalidade associadas aos

pacientes com CEB. Aproximadamente 40% a 60% dos pacientes desenvolvem recorrências ou metástase à distância.<sup>6,7</sup>

O prognóstico dos pacientes com CEB é avaliado caso a caso, no qual são avaliados o tamanho, infiltração e localização da lesão, bem como a disseminação metastática e o grau de diferenciação da neoplasia<sup>8</sup>. Atualmente, o tamanho do tumor e a presença de metástase regional permanecem sendo os melhores indicadores de prognóstico do paciente, com implicação direta na determinação do tratamento<sup>8</sup>.

A cirurgia e a radioterapia são, isoladas ou associadamente, as principais modalidades terapêuticas aplicáveis ao CEB<sup>9</sup>. O tratamento quimioterápico é muitas vezes associado à radioterapia e drogas à base de platina, como cisplatina ou carboplatina, são frequentemente utilizadas em combinação com 5-fluorouracil ou ao anticorpo monoclonal Cetuximab, sendo este último responsável pela melhora na sobrevida dos pacientes<sup>10</sup>. Todavia, o CEB apresenta resistência ao tratamento radioterápico e quimioterápico e entre 20% a 30% dos pacientes desenvolvem metástase e/ou recidivas locais após a terapia inicial<sup>11</sup>. Recentemente, acredita-se que a resistência à terapia esteja associada com a presença de células denominadas células-tronco de câncer (CTC).

Tanto a radioterapia quanto a quimioterapia estão associadas com efeitos adversos, os quais podem ser categorizados em crônicos, infecciosos e agudos bem como complicações decorrentes dos efeitos adversos. Dentre as manifestações crônicas, exemplificam-se: dor ou sensibilidade, limitação do movimento ou trismo, alterações do fluxo salivar e xerostomia, alteração do paladar e halitose. As manifestações de carácter infeccioso podem ser cáries, infecções periodontais e halitose. As complicações agudas mais comuns são irritação cutânea e mucosite. Por consequência destas manifestações, os pacientes podem sofrer com episódios de vômitos, diarreia, depressão e desnutrição afetando diretamente o prognóstico e qualidade de vida do paciente. Neste contexto, reduzir a manifestação e severidade dos efeitos adversos é fundamental para o paciente.<sup>11, 12</sup>

## 1.2 Células-tronco de câncer no CEB

Muitos estudos têm demonstrado que neoplasias malignas de origem hematológica e sólidas possuem uma população rara de células, denominadas células-tronco de câncer (CTC), com potencial proliferativo indefinido, sendo responsáveis por sustentar o crescimento tumoral bem como pela recorrência e metástase<sup>14, 15</sup>. A presença das CTC em neoplasias malignas está associada com maior taxa de proliferação tumoral, decorrente de sua capacidade de auto renovação e divisão assimétrica e, conseqüentemente, maior instabilidade genética.<sup>16</sup>

Acredita-se que as CTC em diferentes neoplasias possam surgir, a partir de células-tronco regulatórias do tecido de origem que tenham sofrido diversas mutações, no decorrer de sua longa vida útil, justificando portanto as similaridades moleculares entre as CTC e células-tronco normais; células progenitoras, que ainda possuem seu potencial de auto-renovação porém reduzido, podem também ser alvo de mutações múltiplas e por conseguinte promover o desenvolvimento tumoral e ainda, células diferenciadas podem adquirir características de células-tronco e sofrer o processo de des-diferenciação.<sup>17</sup>

Quatro características fundamentais definem as CTC: (1) potencial tumorigênico quando inoculadas em camundongos imunodeficientes, (2) podem ser identificadas por meio da expressão de marcadores de superfície específicos, o que as distingue das demais células que constituem a neoplasia maligna; (3) são capazes de reconstituir a heterogeneidade tumoral, auto-renovação, assim como as células-tronco normais; (4) podem ser transplantadas em série, indicando que possuem capacidade de auto-renovação.<sup>14,15,18</sup>

As CTC foram identificadas primeiramente em leucemia mielóide aguda (LMA) a partir da caracterização de uma população celular rara, identificada pela expressão dos marcadores CD34 e CD38, característicos de células-tronco hematopoiéticas<sup>19</sup>. Foi observado que somente a população de células leucêmicas com o fenótipo CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> isoladas de pacientes com LMA foram capazes de iniciar a LMA humana em camundongos imunodeficientes NOD/SCID, podendo ser ainda transplantadas em série nos animais, resultando no desenvolvimento da doença. Além disso, os animais com LMA apresentavam

não somente células CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> mas também células CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>, as quais representavam a maior quantidade de blastos leucêmicos, indicando que esta população de CTC, identificada pelo fenótipo CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> era capaz de se auto-renovar e reconstituir a heterogeneidade tumoral.<sup>19</sup>

Em 2003, uma população de células raras com fenótipo CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> com potencial tumorigênico foi identificada em câncer de mama, sendo capaz de se auto renovar e reconstituir a heterogeneidade tumoral após ser transplantada em animais imunodeficientes<sup>20</sup>. Atualmente, diferentes populações de CTC já foram identificadas em neoplasias malignas sólidas, incluindo aquelas localizadas na mama<sup>20</sup>, pulmão<sup>21</sup>, ovário<sup>22</sup> e CEB<sup>23</sup>. Essas células têm sido identificadas por meio da expressão de marcadores de superfície celular específicos, os quais são correlacionados com células-tronco, dentre eles os marcadores CD44, CD24 e CD133, bem como pela atividade de enzimas e ativação de vias de sinalização.<sup>24,25</sup>

CD44 é uma família de glicoproteínas expressas em diversas células derivadas dos tecidos hematopoiéticos, endoteliais, epiteliais e mesenquimais. Possui diferentes isoformas que atuam na adesão e migração de células T e células B, na ativação de linfócitos T e células *natural killer*. Atua em vias de sinalização que resultam na produção de TNF- $\alpha$  e IL-1 nos monócitos, modulando a inflamação crônica.<sup>26</sup> Na tumorigênese, CD44 atua em vias relacionadas com maior agressividade<sup>24,27</sup>. CD44 possui uma região para ligação com o ácido hialurônico, e no CEB, a ligação de ambos promove a ativação de EGFR e TGF- $\beta$ , sendo correlacionado com a resistência à cisplatina, maior taxa de migração e proliferação celular.<sup>28</sup> Dentre suas isoformas, CD44v6<sup>28</sup> é expressa em tumores associados com alta taxa de proliferação, invasão celular e resistência no CEB devido à sua interação com EGFR<sup>26,28,29</sup>

Baseando-se na expressão de CD44, Prince et al. (2007) identificaram no CEB células com alta expressão de CD44, as quais apresentaram elevada capacidade tumorigênica, sendo capazes de reconstituir a heterogeneidade tumoral quando inoculadas em animais imunodeficientes, mesmo em baixa concentração<sup>23</sup>. Por outro lado, as células que apresentaram baixa expressão de CD44, foram incapazes de formar tumores mesmo quando inoculadas em elevada concentração em animais imunodeficientes<sup>23</sup>. Adicionalmente, células com alta expressão de CD44 (CD44<sup>high</sup>) possuem elevada capacidade de

formação de esferas e colônias, expressão aumentada de genes associados com o fenótipo-tronco e resistência à terapia<sup>30, 31</sup>. Alguns trabalhos têm demonstrado que a expressão de CD44 está associada a tumores pouco diferenciados, pior prognóstico e menor taxa de sobrevida dos pacientes com CEB.<sup>31, 32</sup>

Embora o CD44 seja um marcador amplamente utilizado para a identificação de CTC em diferentes tipos de neoplasias sólidas, há um consenso na literatura em relação à necessidade de utilização de uma combinação de marcadores, pois se acredita que a aquisição da expressão ou o aumento da expressão de diferentes marcadores de CTC são necessários para a manutenção do fenótipo tronco.

O marcador ESA, denominado EpCAM (Molécula de adesão celular epitelial) consiste em uma glicoproteína transmembrana do tipo I, expressa em alguns tipos de epitélio normal, células-tronco adultas de diferentes tecidos bem como em células-tronco embrionárias (CTE).<sup>34, 35</sup> Esta localizada na membrana basolateral da célula em um complexo formado por CD9, CD44 e claudina-7, sendo essencial para a manutenção da auto-renovação e fenótipo pluripotente em CTE. Sua elevada expressão em tecidos saudáveis está associada a ativação de vias de sinalização intracelulares como Wnt, além do controle da proliferação celular, migração e diferenciação durante a morfogênese e regeneração tecidual.<sup>36, 37</sup> Atua no contato célula-célula e também transmite sinais da membrana plasmática para o núcleo regulando a expressão de genes associados com o fenótipo tronco como Oct4, Nanog e SOX2.<sup>38</sup>

Utilizando a combinação da expressão de CD44 e ESA no CEB, Biddle et al. (2011) demonstraram que existem duas subpopulações de CTC no CEB. A subpopulação de CTC caracterizada pelo perfil CD44<sup>high</sup>/ESA<sup>high</sup> possui alta capacidade proliferativa e forma colônias com morfologia de holoclones, as quais são constituídas por células com capacidade indefinida de auto-renovação, típica de células-tronco epiteliais normais.<sup>39</sup> Devido à sua plasticidade, esta população de CTC é capaz de originar células que podem assumir dois destinos distintos. O primeiro consiste em células com baixa expressão de CD44, as quais não possuem capacidade de auto-renovação e formam paraclones, mudança morfológica esta, associada à diferenciação epitelial terminal. O segundo, consiste na população caracterizada pelo fenótipo CD44<sup>high</sup>/ESA<sup>low</sup>, com células

que possuem baixa taxa de proliferação, são dotadas de motilidade e capacidade migratória, formam elevado número de esferas e expressam genes associados com a TEM (Transição Epitélio-Mesenquimal) como *VIM*, *TWIST1*, *AXL*, enquanto possuem baixa expressão de marcadores epiteliais como *CDH1*, *IVL* e *KRT15*. É importante ressaltar que as CTC com fenótipo  $CD44^{high}/ESA^{high}$  e  $CD44^{high}/ESA^{low}$  transitam alternativamente entre um ou outro estado fenotípico, sob influência do microambiente tumoral. Por outro lado, a baixa expressão *CD44* está associada com células epiteliais bem diferenciadas e com limitada ou ausente capacidade de proliferação.

Esta plasticidade entre os fenótipos de CTC desempenha um papel essencial no desenvolvimento de metástases, uma vez que as CTC com fenótipo  $CD44^{high}/ESA^{high}$  são capazes de ativar a TEM, adquirindo o fenótipo  $CD44^{high}/ESA^{low}$  e habilidades para ultrapassar as etapas iniciais da cascata metastática e ao chegar a um sítio distante, reassumem o fenótipo  $CD44^{high}/ESA^{high}$ , sendo então responsável pela colonização metastática.<sup>39</sup>

Em relação à morfologia, as CTC se apresentam como células de pequeno tamanho, fortemente aderidas entre si, com elevado potencial de auto-renovação, formando colônias designadas como holoclones. Por outro lado, células maiores em processo de diferenciação bem como células diferenciadas estão associadas com a formação de colônias identificadas como meroclones e paraclones, respectivamente, ambas com reduzido potencial proliferativo.<sup>40</sup>

Vários genes associados com o fenótipo tronco já foram identificados como desregulados nas CTC.<sup>41, 42, 43</sup> Os genes *OCT4*, *SOX2* e *NANOG* são fatores de transcrição que atuam no desenvolvimento embrionário e no CEB podem ser identificados em tumores mais agressivos e resistentes à radioterapia, sendo também correlacionados com as populações de CTC.<sup>41,42</sup> *In vitro*, a expressão de *OCT4* e *NANOG* está associada com maior formação de esferas tumorais e capacidade de auto-renovação celular<sup>43</sup>.

*BMI1* é um gene que atua na proliferação e manutenção de células progenitoras e células-tronco, promovendo a ativação da telomerase e prevenindo a senescência celular, bem como atua na regulação do ciclo celular pela supressão da proteína p14ARF, por conseguinte reduzindo p53/p21, que participam do controle das fases G1/G2 do ciclo celular.<sup>44</sup> Nas CTC, o aumento de expressão de *BMI1* confere maior resistência terapêutica e manutenção da

auto-renovação celular.<sup>44</sup> No CEB, a expressão de *BMI1* ainda é controversa em relação ao seu impacto clinicopatológico, recorrência e taxa de sobrevida. No estudo realizado por Hayry et.al. (2010), a redução de *BMI1* foi correlacionada com um pior prognóstico dos pacientes com CEB.<sup>45</sup>

*OCT4* é um fator de transcrição crucial para a regulação do processo de embriogênese, diferenciação celular e expressão de genes relacionados com a pluripotência celular, incluindo *SOX2* e *NANOG*.<sup>46</sup> É expresso em células-tronco embrionárias, células-tronco adultas, mas não em células adultas diferenciadas. A remoção ou silenciamento de *OCT4* afeta diretamente vias de diferenciação celular favorecendo a transformação maligna.<sup>47</sup>

A expressão desregulada de *OCT4*, *SOX2* e *NANOG* é observada em tumores mais agressivos, resistentes à radioterapia e está correlacionada com a presença das CTC.<sup>47</sup> Células com expressão de *OCT4*, *NANOG* e positivas para CD133 demonstraram elevada capacidade migratória e invasiva *in vitro* e *in vivo*, estando ainda correlacionadas com pior prognóstico dos pacientes com CEB.<sup>47</sup> A expressão de *OCT4* e *SOX2* também foi correlacionada com pior prognóstico em tumores positivos para a expressão de ALDH1 e CD44.<sup>48</sup>

As CTC possuem sete diferentes linhas de defesa que contribuem para a resistência terapêutica, podendo ser próprios ou adquiridos como: (1) evasão à exposição ao fármaco por estarem localizadas em nichos em hipóxia bem como devido à proximidade à vasos sanguíneos; (2) evasão molecular ao efeito das drogas quimioterápicas, por possuírem proteínas transmembranas (Transportadores de ATP, ABCs) capazes de expulsar corantes e drogas e ainda, pela alta atividade de enzimas detoxificantes como ALDH (aldeído desidrogenase)<sup>49, 50</sup>; (3) capacidade de entrar em quiescência, onde a atividade do ciclo celular é reduzida (longo período de G1), e por conseguinte, não se torna alvo de quimioterápicos atuantes em células altamente proliferativas ou do efeito da radioterapia que afeta principalmente células em proliferação<sup>49</sup>; (4) elevada e eficiente ativação dos genes de reparo de DNA; (5) ativação de vias celulares que promovem a sobrevivência celular bem como a evasão da apoptose; (6) capacidade de auto-renovação e ativação da TEM; (7) a própria toxicidade do quimioterápico, que pode levar à suspensão da terapia.<sup>51</sup>

Avaliando a resistência à cisplatina de CTC derivadas do CEB isoladas por meio da marcação com ALDH1, foi observado que *in vivo* a cisplatina não foi

capaz de reduzir o tamanho do tumor e ainda, promoveu um aumento na expressão de *BMI1* e *CD44*<sup>52</sup>. No mesmo estudo, o número de CTC aumentou em resposta ao tratamento com cisplatina, mostrando que estas células são resistentes à terapia convencional, assim como, contribuem para a recidiva da neoplasia maligna<sup>52</sup>.

Em relação à resistência ao tratamento radioterápico, as CTC com fenótipo *CD44*<sup>high</sup>/*ESA*<sup>low</sup> mantiveram seu ritmo de crescimento e proliferação após exposição a elevadas doses de radiação ionizante.<sup>53</sup> Isso se deve à alta capacidade de correção dos danos de DNA induzido pela radiação ionizante nestas células, possivelmente pelo aumento de expressão de proteínas envolvidas com a maquinaria de reparo como algumas proteínas DDR (*DNA Damage Response*).<sup>53</sup>

Desta maneira, as CTC desempenham papel fundamental nos mecanismos de invasão, metástase e resposta à terapia, sendo essencial o desenvolvimento de estratégias terapêuticas que especificamente e eficientemente tenham como alvo as CTC.

### 1.3 Mucosite Oral

A mucosite oral (MO), orofaríngea, faríngea e de outras áreas do trato aerodigestivo induzida pelo tratamento em pacientes com CEB submetidos a radioterapia associada ou não à quimioterapia é um dos mais debilitantes e incidentes efeito colateral agudo do tratamento oncológico e afeta profundamente a qualidade de vida. Está associada a sintomas como dor, sangramento, disfagia, infecções e comprometimento da ingestão de alimentos.<sup>5</sup> Ocorre em aproximadamente 40% dos pacientes que receberam quimioterapia convencional, 80% dos pacientes que recebem altas doses de quimioterapia para transplante de células-tronco hematopoiéticas e em quase todos os pacientes que recebem radioterapia no eixo faríngeo.<sup>54</sup>

A MO apresenta como manifestação inicial um eritema, seguido do desenvolvimento de placas brancas descamativas, que são dolorosas ao contato. Crostas epiteliais e exsudato fibrinoso levam à formação de uma pseudomembrana e ulceração, representando a forma mais pronunciada da mucosite que frequentemente restringe seriamente as atividades do dia-a-dia

como falar, comer e até mesmo engolir saliva. O eritema inicial surge com doses cumulativas de radiação de cerca de 10 Gy. Nesta fase, os pacientes também se queixam frequentemente de sensação de ardor e intolerância a comidas apimentadas. Quando o acumulado atinge 30 Gy, usualmente após a terceira semana de tratamento, desenvolvem-se as úlceras que geralmente são dolorosas e exigem a prescrição de opiáceos para o alívio da dor.<sup>55</sup> Nesta fase há a exposição do tecido conjuntivo subjacente ricamente innervado devido à perda do revestimento epitelial. Em pacientes mielossuprimidos a mucosite ulcerativa pode servir como veículo para a invasão sistêmica de bactérias.<sup>55</sup>

Estudos recentes indicam que os mecanismos fundamentais envolvidos na patogênese de mucosite são complexos e envolvem uma sequência de eventos biológicos que culminam com a destruição da mucosa. As alterações celulares e moleculares que ocorrem durante o desenvolvimento da MO têm início segundos após a exposição à radiação ou quimioterapia, com morte direta ou indireta das células-tronco basais praticamente imediata.<sup>56</sup> Entretanto, existe um atraso na manifestação clínica da MO, apesar de que já exista dano celular e molecular associado a ambas terapias.

O modelo de cinco fases para descrever a patogênese da mucosite é atualmente o mais aceito e consiste em:<sup>56, 57</sup>

- Iniciação (Fase I): a radiação e/ou quimioterapia induzem dano direto no DNA com conseqüente quebra da dupla fita e morte das células da camada basal do epitélio. Adicionalmente, são produzidas espécies reativas de oxigênio (ERO), responsáveis pela peroxidação lipídica e ainda, juntamente com o dano no DNA levam à ativação de fatores de transcrição como NFkB, Wnt e p53 e suas respectivas vias de sinalização. O surgimento de ERO induzido por radiação ou quimioterapia exerce um papel no início da lesão da mucosa. A via do NFkB é uma das mais estudadas na MO, sendo diretamente ativada pela radiação ou quimioterapia ou indiretamente pela produção de ERO. Dentre os 200 genes que são regulados por esta via, destacam-se aqueles associados à produção de moléculas que ativamente estão envolvidas com a patogênese da MO, incluindo citocinas e moduladores de citocinas, moléculas de resposta a estresse como COX-2, óxido nítrico sintase induzida, superóxido dismutase e moléculas de adesão celular. Citocina pró-inflamatórias como TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$  produzem dano precoce ao endotélio e fibroblastos na submucosa, iniciando a

casca de sinalização epitélio-mesênquima que culmina com a apoptose das células basais. À medida que a destruição tecidual alcança o tecido conjuntivo, ocorre fibrinólise e macrófagos são estimulados a produzirem metaloproteinases de matriz, contribuindo para amplificação do dano tecidual.

-Sinalização e amplificação (Fase II e III): nesta fase, muitas das moléculas produzidas durante a fase de iniciação promovem um *feedback positive* para muitas vias associadas com a destruição tecidual. Particularmente, citocinas pró-inflamatórias atuam nesta fase, com destaque para TNF $\alpha$ , a qual não somente é per si uma molécula deletéria, mas também é um potente ativador de NF $\kappa$ B e, portanto, é capaz de controlar indiretamente a expressão de genes alvo, amplificando a resposta inflamatória e dano tecidual. Várias outras vias de sinalização interconectadas à via do NF $\kappa$ B são ativadas simultaneamente, sendo inibição e ativação de diferentes genes que direcionarão o dano tecidual até o desenvolvimento da ulceração.

-Ulceração (Fase IV): a ulceração se desenvolve como consequência dos mecanismos direto e indiretos descritos acima, que culminam com a apoptose das células epiteliais. As ulcerações são profundas e rapidamente se tornam colonizadas por bactérias orais. A perda de epitélio e a exsudação fibrinosa, leva à formação de pseudomembranas e úlceras permitindo a colonização por bactérias Gram positivas e fungos na superfície da mucosa danificada, que pode ser exacerbada por uma neutropenia concomitante. A infecção por micro-organismos vai resultar num aumento na liberação de mediadores inflamatórios, como a IL-1, o óxido nítrico e o TNF- $\alpha$  contribuindo para piora do quadro e até mesmo infecções sistêmicas. Em pacientes submetidos à quimioterapia, a mucosite geralmente é um evento agudo, com sintomas aparecendo após 3-5 dias da infusão e as ulcerações alguns dias mais tarde, com resolução em 2 semanas. Por outro lado, a MO associadas à radioterapia tem um curso crônico, e com o acúmulo de 30Gy (após 3 semanas de tratamento), ulcerações frequentemente coalescentes e cobertas por pseudomembranas estão presentes. As mesmas permanecem de 3-4 semanas, após o término do tratamento.

-Reparação (Fase V): o processo de reparação da mucosa ocorre espontaneamente. A resolução das ulcerações ocorre como resultado de um processo biológico ativo no qual a matriz extracelular da submucosa guia a

proliferação, migração e diferenciação do epitélio íntegro adjacente à ulceração por meio da modulação de receptores e ligantes, ativação de proteínas intracelulares.

Originalmente, a prevenção e o tratamento da mucosite oral eram baseados em cuidados paliativos como bochechos, crioterapia, anti-inflamatórios, antibióticos e lubrificantes.<sup>58</sup> Entretanto, estudos clínicos randomizados e dados descritos em revisões sistemáticas<sup>59-61</sup> têm demonstrado que a fotobiomodulação (FBM) é eficaz no tratamento da mucosite oral, especialmente na redução da dor e reparação das lesões, promovendo aumento da produção de ATP, redução dos radicais livres e liberação de citocinas e quimiocinas inflamatórias.

#### **1.4 Fotobiomodulação no tratamento da mucosite oral**

A FBM consiste na interação da luz com células e tecidos, sendo capaz de promover a proliferação celular, modular o processo inflamatório, microcirculação vascular e linfática, modular o sistema imunológico, reduzir a dor e, portanto, acelera o processo de reparação tecidual.<sup>62</sup>

Representa uma nova metodologia terapêutica que vem sendo abordada em diversas áreas do conhecimento, como estudos de revisão, estudos *in vitro*, estudos pré-clínicos e estudos clínicos, consistindo na interação da luz com células e tecidos para promover uma modulação biológica.<sup>63</sup>

Ocorre pela radiação não ionizante e absorção de um fóton sem que se tenha uma reação de fluorescência, fosforescência ou de aquecimento.<sup>64</sup> O mecanismo pelo qual a FBM atua pode ser categorizado em mecanismo primário e secundário. O mecanismo primário é o resultado da absorção do fóton por um cromóforo (receptor de luz) sendo o mais comum na célula, a mitocôndria. São cinco ações resultantes desta absorção, iniciando pela liberação de óxido nítrico, geração de oxigênio singleto, aquecimento transitório dos cromóforos, aumento de produção de ânion superóxido e em seguida aumento da concentração de espécies reativas de oxigênio.<sup>65</sup> Os mecanismos secundários da FBM são consequências da atividade do mecanismo primário, como alteração do metabolismo celular, do estado REDOX, entre outras.<sup>65</sup>

A FBM atua aumentando a síntese de ATP, ciclina D1, espécies reativas de oxigênio bem como ativação das vias de sinalização intracelulares Scr, PI3K/Akt/mTOR, HGF e vias Ras/Raf/MEK/ERK.<sup>66, 67 68</sup>. Adicionalmente, alguns estudos têm demonstrado efeito nos mecanismos de apoptose, por meio da inativação de GSK3 $\beta$ /Bax e ativação de caspase-3 e das vias p73/YAP/Akt, com conseguinte aumento de inibidores de apoptose como survivina.<sup>67</sup> Alteração na expressão de mediadores inflamatórios como IL-6, IL-10, TNF $\alpha$  e dos receptores do tipo Toll, já foi observada na literatura e se acredita que a modulação destas citocinas seja decorrente do efeito da FBM no fator de transcrição NF-kB.<sup>70</sup> Assim, por meio de diferentes mecanismos moleculares, a FBM tem ação promotora no processo de reparação.

Tanto o laser de baixa intensidade quanto o LED podem ser utilizados para a FBM. A diferença entre os equipamentos é dada pela coerência do feixe luminoso emitido, onde os equipamentos de Laser são capazes de emitir a luz de forma monocromática, em fase colimada, portando, de forma coerente, mas os equipamentos de LED não são capazes de emitir a luz de forma colimada, portanto não são coerentes. A eficácia do uso do Laser e/ou LED no processo de reparação tecidual já foi avaliada em estudos *in vivo* e *in vitro*, sendo observado que ambos equipamentos são capazes de promover a proliferação de fibroblastos, produção de colágeno e angiogênese, favorecendo o processo de reparo, portanto, ambos os equipamentos podem ser utilizados para a FBM<sup>63</sup>. Adicionalmente, os comprimentos de onda mais utilizados na literatura com finalidade terapêutica na reparação tecidual foram de 660nm à 830nm, com a exposição radiante variando entre 0,09J/cm<sup>2</sup> e 5J/cm<sup>2</sup>.<sup>71</sup>

Pesquisas recentes têm mostrado evidências de que o uso da FBM com laser de Baixa Intensidade (LBI) ou LED (Light Emitting Diode) possuem efeito benéfico na prevenção e no tratamento da mucosite oral<sup>71</sup>, reduzindo a dor, provendo o reparo tecidual, assegurando assim o conforto para alimentação e a continuidade ao tratamento oncológico, sem efeitos colaterais quando corretamente administradas.<sup>72</sup> Desta forma, tais terapias tendem a proporcionar uma melhor qualidade de vida aos pacientes ao longo do tratamento antineoplásico.

Elad et al. (2018) relataram os parâmetros clínicos da FBM para o tratamento seguro e eficaz da MO em pacientes com câncer de cabeça e

pescoço submetidos a quimioterapia e radioterapia. Os parâmetros baseados na eficácia clínica relatada na literatura recomendados para o tratamento da MO são: comprimento de onda entre 633 e 685 nm ou 780 - 830 nm, potência entre 10 e 150mW, densidade de energia de 2-3 J/cm<sup>2</sup> e não mais que 6 J/cm<sup>2</sup>. Recomenda-se evitar o local da neoplasia maligna e sempre seguir as boas práticas clínicas.<sup>73</sup>

Zanin et al (2010) avaliaram quantitativa e qualitativamente o efeito do Laser diodo de 660 nm na prevenção e tratamento da MO em pacientes com câncer de cabeça e pescoço submetidos a radioterapia e quimioterapia. A FBM foi realizada em combinação com radioterapia e quimioterapia duas vezes por semana com laser de diodo (comprimento de onda 660 nm, potência de 30mW e energia de 2J por ponto, durante 07 semanas). Na análise dos resultados foi observada diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos, sendo que a maioria dos pacientes do grupo FBM não apresentou MO ou dor, mas todos os pacientes do grupo controle apresentaram MO variando do Grau 1 ao 3 associada à dor. Esta diferença foi significativa a partir da primeira semana de tratamento, aumentando até a quarta semana. Concluiu-se que a FBM foi eficaz na prevenção ou tratamento da MO induzida pela radioterapia e quimioterapia, melhorando assim a qualidade de vida dos pacientes.<sup>74</sup>

No estudo triplo-cego com 221 pacientes realizado por Gautam et al. (2012), pacientes com câncer de cabeça e pescoço submetidos à radioterapia e quimioterapia receberam tratamento com FBM com comprimento de onda 632,8 nm, densidade de potência 24 mW, energia por ponto 3 J, dose total por sessão de 36-40J, 5 sessões por semana durante 7 semanas) ou tratamento simulado diariamente antes da radiação (laser desligado). A MO foi avaliada pela Escala EORTC (Organização Européia de Pesquisa e Tratamento do Câncer), dor oral por meio da Escala Analógica Visual (EVA) e também foram avaliadas a disfagia, perda de peso e a necessidade de suspensão do tratamento oncológico. Foi verificada uma redução significativa na incidência de MO grave e dor associada, disfagia e uso de analgésicos opióides nos pacientes tratados com laser quando comparados aos pacientes do grupo placebo.<sup>75</sup>

Antunes et al. (2013) avaliaram a eficácia da FBM na redução da incidência de MO de grau 3-4 em pacientes com câncer de cabeça e pescoço submetidos à radioterapia e quimioterapia. Foi utilizado o Laser de diodo

InGaAIP (660 nm, 100 mW, 1J por ponto – 4J/cm<sup>2</sup>), durante 5 dias consecutivos e por 7 semanas. A avaliação da MO foi realizada pelas escalas da Organização Mundial de Saúde (OMS) e a qualidade de vida pelos questionários da EORTC. Constatou-se uma diminuição de seis vezes na incidência de mucosite graus 3-4 no grupo FBM quando comparado ao placebo, além da redução de efeitos adversos associados ao tratamento. Após o tratamento, a análise da qualidade de vida mostrou diferenças que favorecem o grupo FBM em relação ao funcionamento físico, emocional, fadiga e dor bem como deglutição e nos transtornos alimentares sociais.<sup>76</sup> Adicionalmente, os mesmos pesquisadores avaliaram o impacto da FBM utilizada no tratamento da mucosite oral no prognóstico dos pacientes com câncer de cabeça e pescoço.<sup>77</sup> Foi observado que os pacientes tratados com a FBM apresentaram maior taxa de sobrevida, ausência de recorrência e menor necessidade do uso de opióides em relação ao grupo controle.<sup>77</sup>

Redução da sintomatologia dolorosa bem como do grau de mucosite oral foi também observado por Carvalho et al. (2011).<sup>78</sup> Pacientes com câncer de cabeça e pescoço submetidos à radioterapia foram tratados profilaticamente com dois protocolos de FBM: 660nm, 15 mW, 3,8 J/cm<sup>2</sup> e 660nm, 5mW, 1,3 J/cm<sup>2</sup>. Ao término do tratamento; pacientes submetidos ao primeiro protocolo obtiveram redução significativa da dor e controle no desenvolvimento de mucosite, a qual permaneceu em grau 2 durante todo o tratamento. Por outro lado, pacientes que receberam o segundo protocolo de FBM, com menor potência e exposição radiante, não apresentaram redução significativa da dor bem como do grau de mucosite oral. Desta maneira, os parâmetros dosimétricos da FBM são fundamentais para que os efeitos de analgesia e reparo sejam alcançados no tratamento da mucosite oral.<sup>78</sup>

Com a finalidade de estabelecer um padrão nos parâmetros dosimétricos utilizados para a mucosite oral, foram propostos protocolos para a prevenção e tratamento da mucosite oral no decorrer dos últimos anos. De acordo com Bjordal et al. (2011), a FBM pode ser aplicada com os comprimentos de onda no espectro vermelho e infra-vermelho, com o mínimo de 3 sessões semanais para o tratamento da mucosite oral e sessões diárias durante todo o tratamento radioterápico para a prevenção da mucosite oral, com exposição radiante de 3 a 6J/cm<sup>2</sup>, 10-100mW de potência do equipamento.<sup>61</sup> Segundo Bensadoun et.al.

(2012), não foram relatados efeitos adversos diretos com a FBM para a prevenção de mucosite oral com exposição radiante de 2-3J/cm<sup>2</sup>.<sup>59</sup> A mais recente revisão de literatura em relação aos parâmetros dosimétricos da FBM na mucosite oral, propõe que a irradiância seja entre 10-150mW/cm<sup>2</sup> e exposição radiante de 2 a 3J/cm<sup>2</sup> para prevenção da mucosite oral, por ponto e para o tratamento da mucosite oral, o máximo de 6J/cm<sup>2</sup> devem ser administrados com no mínimo de 3 sessões semanais.<sup>60</sup>

### **1.5 Fotobiomodulação e CEB**

Apesar dos efeitos benéficos associados à FBM no tratamento da mucosite, existe controvérsia em relação à sua utilização como ferramenta terapêutica em pacientes diagnosticados com câncer de cabeça e de pescoço, incluindo o CEB, principalmente, devido à possibilidade de que essa mesma ferramenta terapêutica, possa atuar em células neoplásicas remanescentes, favorecendo a progressão tumoral e/ou recidiva. Sonis et al. (2016) descreve possíveis efeitos adversos da FBM em células tumorais frente a robustez do potencial biológico da FBM. Assim, a FBM poderia impactar no crescimento e proliferação das células tumorais por promover vias de proliferação pela ativação de MAPK, Akt, PKC e EGFR, aumentar o risco local de invasões e metástases pela modulação de citocinas e fatores de crescimento relacionados com a adesão e vascularização local e afetar negativamente o tratamento oncológico por alterar vias relacionadas com a inibição de apoptose e sobrevivência celular.<sup>79</sup> Adicionalmente, sabe-se que muitas das vias moleculares pela qual a FBM atua estão desreguladas e ativadas de maneira aberrante no câncer, incluindo o CEB, as quais serão discutidas a seguir.

No estudo realizado por Sperandio et al.(2013) células das linhagens DOK, SCC9 e SCC25 derivadas de CEB foram irradiadas uma única vez com laser em baixa intensidade (potência 40mW), diferentes exposições radiantes (2,05J/cm<sup>2</sup>, 3,07J/cm<sup>2</sup>, 6,15J/cm<sup>2</sup>) e comprimento de onda vermelho (660nm) e infra-vermelho (780nm). Foram observados efeitos distintos dependendo da linhagem, sendo que a linhagem DOK, derivada de displasia epitelial, obteve aumento de viabilidade celular em todos os parâmetros bem como aumento da expressão de  $\beta$ -catenina e pS6. A linhagem SCC9, por outro lado, demonstrou

sua viabilidade reduzida com o comprimento de onda vermelho, expressando um aumento de Akt,  $\beta$ -catenina e pS6 em todos os parâmetros, após um período de 12 horas. A linhagem SCC25 apresentou redução de sua viabilidade apenas com a exposição radiante de 3,07J/cm<sup>2</sup> e aumento na expressão das proteínas Akt, pS6 e ciclina D1 bem como menor taxa de apoptose. Com base nestes resultados, sugere-se que a via Akt/mTOR/CiclinaD1 pode ser ativada durante a exposição aos parâmetros dosimétricos utilizados.<sup>69</sup>

Outro estudo *in vitro* utilizando a linhagem SCC25, avaliou a proliferação celular e invasão após a FBM com laser em baixa intensidade, 660nm, 30mW, 0,03W/cm<sup>2</sup>, exposições radiantes de 0,5J/cm<sup>2</sup> e 1J/cm<sup>2</sup> após 48h e 72h da FBM. Os resultados mostraram que a FBM com 1J/cm<sup>2</sup> foi capaz de aumentar significativamente a proliferação celular, a qual foi acompanhada de aumento na expressão de ciclina D1 e  $\beta$ -catenina no núcleo.<sup>80</sup> Além disso, este mesmo parâmetro dosimétrico foi capaz de reduzir a expressão de E-caderina, aumentara a expressão de MMPe e desta maneira, favorecer o processo de invasão celular.<sup>80</sup>

Ottavani e colaboradores (2016) avaliaram os efeitos da irradiação com os parâmetros L1(660nm, 100mW, 3J/cm<sup>2</sup>); L2 (800nm, 1W, 6J/cm<sup>2</sup>); L3 (970nm, 2,5W, 6J/cm<sup>2</sup>) em modelo *in vivo* de CEB induzido por 4-NQO. Foi possível observar um aumento da perfusão tecidual e a maturação de vasos sanguíneos, assim como uma redução do tamanho do tumor nos grupos L2 e L3. Além disso, houve melhor infiltração de linfócitos T CD4 e CD8 no CEB nos grupos irradiados quando comparados ao grupo controle bem como maior ativação de células dendríticas, a qual foi mediada pela liberação de diferentes tipos de INF.<sup>81</sup>

O efeito da FBM na atividade osteoclastogênica da linhagem SCC9 irradiada com diferentes parâmetros dosimétricos (660nm, 40mW, 214,29mW/cm<sup>2</sup> com 2, 4 ou 6J/cm<sup>2</sup>), (780nm, 40mW, 220mW/cm<sup>2</sup> com 2, 4 e 6J/cm<sup>2</sup>) e (780nm, 70mW, 385mW/cm<sup>2</sup>, com 4J/cm<sup>2</sup>) em co-cultura com células periféricas mononucleares do sangue (PBMC) mostrou que após 21 dias houve uma redução da atividade osteoclastogênica nos comprimentos de onda de 660nm e 780nm com exposição radiante de 4J/cm<sup>2</sup>. No mesmo estudo, ainda foram observados mecanismos moleculares envolvidos na atividade osteoclastogênica bem como expressão de NFkB, JNK, p38, MEK, os quais

foram significativamente reduzidos no grupo irradiado com 780nm, 70mW, 4J/cm<sup>2</sup>).<sup>82</sup>

O efeito da FBM na linhagem SCC9 foi avaliado, utilizando-se 11 diferentes parâmetros dosimétricos, nos períodos de 24 e 72 horas (1 e 3 dias), com os espectros vermelho e infravermelho e exposição radiante variando de 1J/cm<sup>2</sup> à 6J/cm<sup>2</sup>. Após a realização dos ensaios, todos os parâmetros dosimétricos demonstraram redução da viabilidade celular bem como o aumento da atividade de caspase3. No mesmo estudo, as células foram submetidas à análise de migração por ferida e proliferação celular por BrdU com exposição radiante de 4J/cm<sup>2</sup>, em quatro parâmetros dosimétricos (espectro vermelho com 40mW, 70mW, espectro infravermelho com 40mW, 70mW). Não foi observada alteração da proliferação celular nos grupos, contudo, o ensaio de migração demonstrou que no grupo 660nm+40mw-4J/cm<sup>2</sup> houve fechamento precoce da ferida em comparação ao grupo controle e o grupo 780nm+70mW-4J/cm<sup>2</sup> teve redução significativa em sua capacidade migratória em comparação ao controle.<sup>83</sup>

Em relação ao efeito da FBM em CTC no CEB, não foram encontrados na literatura estudos que avaliaram se a FBM promove expansão desta subpopulação de células tumorais e ainda, se interfere com suas características e expressão de genes associados com o fenótipo tronco.

Em resumo, a FBM tem se mostrado uma alternativa terapêutica promissora, de baixo custo e de grande eficácia para o tratamento da mucosite oral, observada na maioria dos pacientes diagnosticados com CEB e submetidos à radioterapia e/ou quimioterapia, aliviando a dor e acelerando o processo de reparação. Entretanto, existe controvérsia sobre o possível efeito da FBM em células tumorais remanescentes na mucosa oral após o tratamento cirúrgico. Adicionalmente, o tratamento radioterápico e/ou quimioterápico do CEB está associado com a aquisição de resistência, tanto intrínseca quanto adquirida das células tumorais, sendo que, durante o próprio tratamento, podem ser selecionadas células resistentes, as quais eventualmente poderiam ser submetidas à FBM, com efeitos adversos em relação ao comportamento tumoral. Como a resistência à terapia do CEB está associada com a presença das CTC, sendo estas células responsáveis por sustentar o crescimento tumoral, o conhecimento sobre os efeitos da FBM no comportamento bem como nas

propriedades das CTC é de extrema relevância para que esta ferramenta seja indicada e utilizada de maneira segura no tratamento de complicações decorrentes da radioterapia e/ou quimioterapia.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da FBM na viabilidade e nas características de CTC de linhagens celulares derivadas de carcinoma epidermóide bucal.

### 2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito da FBM única ou diária na viabilidade de linhagens celulares derivadas de carcinoma epidermóide bucal por meio do ensaio de MTT, Vermelho Neutro e Cristal Violeta;
- Mensurar *in vitro* a morte celular por autofagia;
- Avaliar o efeito da FBM na capacidade de formação de colônias de linhagens celulares derivadas de carcinoma epidermóide bucal por meio do ensaio clonogênico;
- Avaliar o efeito da FBM na capacidade de formação de esferas de linhagens celulares derivadas de carcinoma epidermóide bucal;
- Avaliar o efeito da FBM na expressão de CD44 e ESA em linhagens celulares derivadas de carcinoma epidermóide bucal por meio de citometria de fluxo;
- Avaliar o efeito da FBM na expressão de genes associados com o fenótipo tronco, transição epitélio-mesenquimal e diferenciação epitelial por meio de PCR quantitativo em tempo real.

### 3 MATERIAS E MÉTODOS

#### 3.1 Cultivo Celular

A linhagem celular derivada de carcinoma epidermóide de boca SCC9 proveniente da ATCC (American Type Culture Collection) e as linhagens celulares CA1 e LUC4, gentilmente cedidas pelo Prof. Ian C. Mackenzie (Barts and The London School of Medicine and Dentistry, Reino Unido) foram cultivadas em frascos plásticos de 75cm<sup>2</sup> (Kasvi, Brasil) em meio de cultura DMEM/F12 (Gibco Thermofisher, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Vitrocell, Brasil), 1% de antibiótico/antimicótico (Vitrocell, Brasil). O meio de cultura utilizado para cultivar a linhagem SCC9 foi suplementado com 400 ng/ml de hidrocortisona (Sigma-Aldrich, EUA) e para o cultivo das linhagens celulares CA1 e LUC4, foi adicionado o suplemento RM<sup>+</sup>, composto por: 1mg/ml isoproterenol (Sigma-Aldrich), 10ng/ml de Fator de Crescimento Epitelial (EGF, Millipore, EUA), 400ng/ml de hidrocortisona (Sigma-Aldrich, EUA), 5ug/ml de insulina humana (Sigma-Aldrich, EUA), 5ug/ml de transferrina (Sigma-Aldrich, EUA), 2.10<sup>-11</sup>M de 3,3'-triiodotironina (Sigma Aldrich, EUA), como descrito por Mackenzie (2004)<sup>84</sup>

As células foram mantidas à 37°C de atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de umidade. O meio de cultura foi trocado a cada 2 ou 3 dias, de acordo com o metabolismo celular.

#### 3.2 Grupos Experimentais

As células das linhagens CA1, LUC4 e SCC9 foram divididas nos seguintes grupos experimentais:

- Controle: células não irradiadas
- LED1+1,5J/cm<sup>2</sup>: células submetidas a uma única irradiação com exposição radiante de 1,5J/cm<sup>2</sup>.
- LED1+3J/cm<sup>2</sup>: células submetidas a uma única irradiação com exposição radiante de 3J/cm<sup>2</sup>.
- LED1+6J/cm<sup>2</sup>: células submetidas a uma única irradiação com exposição radiante de 6J/cm<sup>2</sup>.

- LED3+1,5J/cm<sup>2</sup>: células submetidas a uma irradiação diária por três dias consecutivos com exposição radiante de 1,5J/cm<sup>2</sup>.
- LED3+3J/cm<sup>2</sup>: células submetidas a uma irradiação diária por três dias consecutivos com exposição radiante de 3J/cm<sup>2</sup>.
- LED3+6J/cm<sup>2</sup>: células submetidas a uma irradiação diária por três dias consecutivos com exposição radiante de 6J/cm<sup>2</sup>.

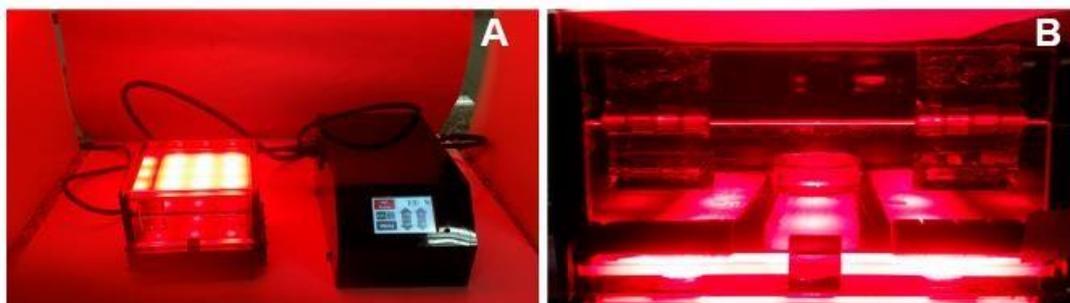
### 3.3 Fotobiomodulação

As células foram irradiadas utilizando-se o equipamento LEDbox (BioLambda LEDbox, São Paulo, Brasil) com comprimento de onda de 660nm (659±9nm). Foram selecionadas as exposições radiantes de 1,5J/cm<sup>2</sup>, 3J/cm<sup>2</sup> e 6J/cm<sup>2</sup> para a FBM, as quais já foram descritas na literatura e são indicadas para a prevenção e tratamento da mucosite oral.<sup>59-61</sup> Os parâmetros dosimétricos utilizados estão descritos com detalhes na Tabela 1.

As irradiações ocorreram em ambiente com obscuridade parcial para não haver interferência da luz externa. Antes de todas as irradiações, a potência de saída do equipamento foi analisada previamente com o Power Meter (FieldMax II, Coherent, USA), o qual realiza a leitura da potência a 1 cm de distância da fonte de luz. Desta maneira, as placas de cultivo celular utilizadas nos diferentes experimentos foram colocadas a 1 cm de distância da fonte de luz, como demonstrado na Figura 1. A perda de energia causada pelo plástico da placa foi descontada de acordo com Silva et.al.<sup>85</sup>

**Tabela 1:** Parâmetros dosimétricos utilizados para a irradiação das linhagens celulares CA1, LUC4 e SCC9.

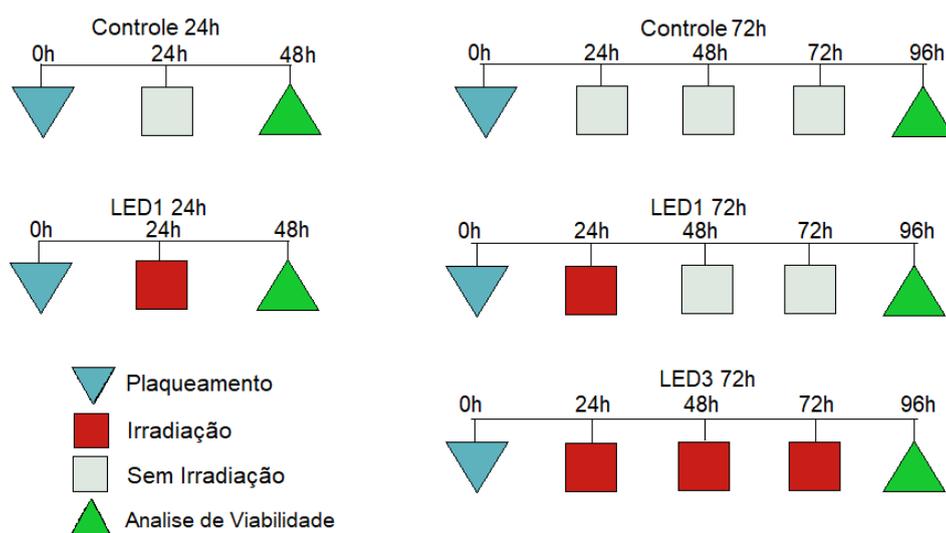
Potência Efetiva (W)	Perda (W)	Potência de Saída (W)	I (W/cm <sup>2</sup> )	H (J/cm <sup>2</sup> )	Tempo (s)	Energia (J)
0,080	0,018	0,098	0,0255	1,5	60	4,8
0,080	0,018	0,098	0,0255	3,05	120	9,6
0,080	0,018	0,098	0,0255	6,11	240	19,2



**Figura 1:** Imagem representativa do equipamento LEDbox utilizado na FBM (A) e posicionamento da placa de cultura celular a 1 cm de distância da fonte de luz (B).

### 3.4 Análise da Viabilidade Celular

Para avaliar o efeito da FBM na viabilidade das linhagens celulares CA1, LUC4 e SCC9, foram realizados os ensaios de MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]), Vermelho Neutro (VN) e Cristal Violeta (CV). Nestes ensaios,  $1 \times 10^4$  células das linhagens CA1, LUC4 e SCC9 foram semeadas em placas de 96 poços e após 24h, as mesmas foram submetidas à FBM. As células do grupo controle sofreram a mesma manipulação das células dos grupos LED1 e LED3, porém não foram irradiadas. A viabilidade celular foi avaliada após 24h no grupo controle e LED1 e após 72h nos grupos controle, LED1 e LED3 (Figura 2).



**Figura 2:** Representação esquemática das condições experimentais utilizadas para análise da viabilidade celular nas linhagens CA1, LUC4 e SCC9 por meio dos ensaios de MTT, VN e CV.

### 3.4.1 MTT

O MTT (brometo de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium) é um composto solúvel que ao ser diluído em meio de cultura e incubado com as células, é internalizado e reduzido por enzimas mitocondriais, o que leva à formação de cristais de formazan. Sua solubilização resulta em uma solução de coloração roxa que pode ser quantificada em espectrofotômetro. A quantidade de cristais de formazan formada é indicativa da atividade mitocondrial e comumente é utilizada para avaliar a viabilidade celular.<sup>86</sup>

No ensaio de MTT, após a irradiação e períodos de incubação descritos na Figura 2, as células foram lavadas com solução tampão fosfato (PBS, pH 7,4) e incubadas com 0,75ug/ml de MTT diluído em meio de cultura por 2h a 37°C. Em seguida, o meio contendo MTT foi descartado e os cristais de formazan foram solubilizados por meio da adição de 100ul/poço de isopropanol. Após homogeneização manual, a quantificação da viabilidade celular foi realizada em um espectrofotômetro (Anthos2020, Biochrom, UK) em comprimento de onda de 595nm. Foram realizados três experimentos independentes em quintuplicada. Os valores de absorbância foram transformados em porcentagem em relação ao grupo controle 24h.

### 3.4.2 Vermelho Neutro

O ensaio de Vermelho Neutro (VN) é baseado no fato que células viáveis incorporam o VN, o qual fica retido nos lisossomos devido ao pH ácido lisossomal até o momento de sua solubilização (após incubação por 2 horas) conforme descrito por Repetto et al. (2008).<sup>87</sup>

Para o ensaio de Vermelho Neutro, após a irradiação e períodos de incubação descritos na Figura 2, as células foram lavadas com solução tampão fosfato (PBS, pH 7,4) e incubadas com 60ug/ml de VN diluído em meio de cultura por 2h a 37°C. Após este período, o VN foi removido, as células foram lavadas com PBS e foram adicionados 150ul de uma solução contendo 50% de álcool etílico absoluto e 1% de ácido acético. Em seguida, a placa foi agitada no equipamento TS-2000A VDRL SHAKER (BiomiXer, Alemanha) por 10min e a quantificação da viabilidade celular foi realizada em um espectrofotômetro

(Anthos2020, Biochrom, UK) em comprimento de onda de 492nm. Foram realizados três experimentos independentes em quadruplicata. Os valores de absorbância foram transformados em porcentagem em relação ao grupo controle 24h.

### 3.4.3 Cristal violeta

A análise da viabilidade celular por cristal violeta (CV) está baseada na coloração de proteínas e DNA das células pelo CV, sendo proporcional à densidade de células aderidas.<sup>88</sup> O ensaio de CV foi realizado nos mesmos poços de cultivo celular utilizados para o VN, de acordo com o protocolo descrito por Martins et.al.<sup>89</sup> Desta maneira, os poços foram lavados três vezes com água e em seguida, foram adicionados 40ul/poço de uma solução de cristal violeta a 0,02% por 5 minutos. Após três lavagens com água, foram adicionados 100ul de uma solução a 0,1M de citrato de sódio em 50% de etanol. A leitura da viabilidade celular foi realizada no leitor Anthos2020 (Biochrom, UK) em comprimento de onda de 620nm. Foram realizados três experimentos independentes em quintuplicata. Os valores de absorbância foram transformados em porcentagem em relação ao grupo controle 24h.

### 3.4.4 Unidades Arbitrárias de Autofagia

O índice de unidades de autofagia arbitrárias (UAA), do inglês *Arbitrary Autofagy Units* (AAU), mensura indiretamente a morte celular autofágica pelo cálculo que correlaciona a proporção de vacúolos autofágicos corados no ensaio de VN, pela taxa de sobrevivência celular, obtida pela média entre os valores obtidos pelos ensaios de MTT e CV ( $AAU = \{VN / [CV+MTT]\}$ ). Conforme descrito por Martins et.al.<sup>89</sup>, há uma maior incorporação e retenção de VN em vacúolos autofágicos tardios e desta maneira, há uma superestimação da viabilidade celular com o ensaio de VN, a qual deve ser normalizada pela média da viabilidade celular obtida por MTT e CV. A correlação positiva com morte celular por autofagia é descrita quando a AAU é maior que 1. Assim, os dados obtidos nos experimentos de MTT, VN e CV nas diferentes linhagens, grupos de estudo

e períodos foram utilizados para o cálculo da AAU conforme descrito por Martins et al.<sup>89</sup>

Com base nos resultados de viabilidade e unidades de autofagia, que são discutidos posteriormente neste trabalho, foram selecionados os grupos LED3+3J/cm<sup>2</sup> e LED6 +6J/cm<sup>2</sup> para a realização dos ensaios de formação de colônia, formação de esfera, citometria de fluxo e RT-PCR.

### **3.5 Análise de formação de colônias**

As células das linhagens CA1, LUC4 e SCC9 dos grupos Controle, LED3+3J/cm<sup>2</sup> e LED3+6J/cm<sup>2</sup> foram semeadas em placas de 6 poços na densidade de 200 células/poço por 8 dias. Após este período, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% por 15 min, lavadas com solução tampão fosfato PBS e coradas com cristal violeta 1,5% diluído 40 vezes em água por 5 min. Em seguida, os poços foram lavados em água corrente e permaneceram 24h a temperatura ambiente para secagem. As colônias foram fotografadas para análise da morfologia e as placas foram digitalizadas para contagem do número de colônias com o auxílio do software ImageJ (Versão 1.4, Fiji, 2012). Foram consideradas colônias celulares os agregados contendo mais de 50 células ou 2mm. Três experimentos independentes em triplicata foram realizados e a contagem das colônias foi feita por dois investigadores.

### **3.6 Capacidade de formação de esferas**

Para avaliação da formação de esferas, as células das linhagens CA1, LUC4 e SCC9 dos grupos Controle, LED3+3J/cm<sup>2</sup> e LED3+6J/cm<sup>2</sup> foram cultivadas em placas de cultivo celular de 35mm e após a última irradiação,  $1 \times 10^3$  células foram ressuspensas em 1ml de meio de cultura contendo 1% de metilcelulose 1% (Sigma-Aldrich) e cultivadas por 15 dias em placas de 24 poços pré-tratadas com 12mg/mL de polyHEMA (Sigma-Aldrich) em etanol 95% para redução da aderência celular aos poços. Após este período, as esferas foram fotografadas utilizando-se o equipamento ZOE Fluorescent Cell Imager (Bio-Raid, Singapore) e em seguida contadas manualmente. Três experimentos

independentes foram realizados em quadruplicata e a contagem das esferas foi feita por dois investigadores.

### **3.7 Citometria de fluxo para análise de expressão de CD44 e ESA**

As células das linhagens CA1, LUC4 e SCC9 dos grupos Controle, LED3+3J/cm<sup>2</sup> e LED3+6J/cm<sup>2</sup> foram removidas da placa utilizando-se tripsina, centrifugadas e incubadas com os anticorpos anti-CD44-APC (1:25, Clone G44-26, BD Bioscience) e anti-ESA-Violet Blue (1:100, clone EBA-1, BD Biosciences) por 30 min no escuro em temperatura ambiente. Em seguida, as células foram lavadas com PBS e imediatamente analisadas no aparelho FACS Canto II (BD, Pharmigen, Califórnia, EUA) utilizando-se o software FACS Diva (versão 6.1.1, BD Bioscience). Foram analisados 20.000 eventos e três experimentos independentes foram realizados. A porcentagem de células CD44<sup>high</sup>/ESA<sup>low</sup>, CD44<sup>high</sup>/ESA<sup>high</sup> e CD44<sup>low</sup> foi determinada de acordo com Biddle et al. 2011<sup>39</sup>.

### **3.8 Isolamento do RNA**

O RNA total foi extraído das linhagens CA1, LUC4 e SCC9 dos grupos Controle, LED+3J/cm<sup>2</sup> e LED3+6J/cm<sup>2</sup> pelo uso da técnica de isoticianato de guanidina, seguindo as recomendações do fabricante. Desta maneira, as células foram lavadas com PBS gelado e incubadas com 0,5 mL de TRIzol (Thermo Fisher) por 5 minutos a temperatura ambiente. Após a lise celular, as amostras foram coletadas e transferidas para tubos de polipropileno livres de RNase e DNase e em cada amostra foi adicionado 0,1 mL de clorofórmio gelado. Após agitação por 15s e incubação por 3min em temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas a 12.000 xg por 15 min a 4°C. A fase aquosa contendo o RNA foi transferida para tubos estéreis e foram adicionados 0,25 ml de álcool isopropílico gelado, permanecendo por 10 min a temperatura ambiente. Os tubos foram novamente centrifugados a 12.000 xg por 10 min a 4°C. Neste momento, foi possível observar a formação do precipitado de RNA no fundo do tubo. O sobrenadante foi descartado e foi adicionado 300ul de etanol 75% gelado. Após centrifugação a 6.000 xg durante 5 min, o álcool foi descartado e o RNA foi ressuspensão em água DEPC. A concentração e pureza do RNA foi determinada

no Nanodrop 2000 (ThermoFisher, USA) com comprimento de onda de 260 e 280 nm. As amostras foram armazenadas a -80°C até o momento de sua utilização.

### 3.9 Síntese do DNA Complementar (cDNA)

Um micrograma de RNA foi reversamente transcrito em cDNA utilizando-se o *High Capacity cDNA Archive kit* (Applied Biosystems), de acordo com as instruções do fabricante. Previamente à síntese de cDNA, o RNA total foi incubado com a enzima *DNase I Amplification Grade* (Thermo Fisher, USA) por 15 min em temperatura ambiente. Para a síntese do cDNA, as amostras foram incubadas em termociclador (Termociclador Materecycler Gradient, Eppendorf AG, Hamburg, Alemanha) e submetidas a 25°C por 10 min seguidos de 120 min a 37°C e 85°C por 5 min. O cDNA foi armazenado em freezer a -20°C até o momento de sua utilização.

### 3.10 PCR quantitativo (RT-qPCR)

As reações de qPCR foram realizadas utilizando-se o termociclador 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems Carlsbad, CA, USA), o fluoróforo SYBR® Green I (SYBR Green Master Mix®, Applied Biosystems), *primers* específicos para os genes *BMI1*, *POU5F1 (OCT4)*, *IVL* (Involucrina), *S100A9* (Calgranulina B), *SNAI2* (SLUG) e o gene constitutivo *GAPDH*. Os *primers* foram desenhados utilizando-se o software Gene Tool 2.0 (Biotools Incorporated, Edmonton, Alberta, Canada).

O cDNA serviu de molde para a amplificação por qPCR, sendo todas as reações realizadas num volume final de 10 µL em tubos óticos com os seguintes reagentes: *primers sense* e *antisense* para cada gene, 5 µl de Sybr Green Master Mix® (Applied Biosystems), cDNA (1 µL) e água. O processo de ciclagem térmica consistiu em desnaturação inicial a 95°C por 10 min, seguido por quarenta ciclos de amplificação a 95°C por 10 seg e 60°C por 1 min para o gene *BMI1* e 62°C por 1 min para o gene *POU5F1 (OCT4)*. Para os genes *IVL* (Involucrina), *S100A9* (Calgranulina B), *SNAI2* (SLUG) e o gene constitutivo *GAPDH*, o processo de ciclagem constituiu em desnaturação inicial a 95°C por 10 min, seguido por quarenta ciclos de amplificação a 95°C por 10 seg, 60°C por 30seg e 72 °C por

40seg. Após o término do último ciclo, todas as amostras foram submetidas à análise da curva de dissociação, conferindo-se a ausência de qualquer curva bimodal ou sinal anormal de amplificação. Para cada par de *primers* foi realizada qPCR utilizando-se água estéril (*blank*) para avaliação de sua possível contaminação. As sequências dos *primers* utilizados bem como as condições das reações de qPCR específicas para cada gene estão descritas na Tabela 2.

A análise quantitativa da expressão foi realizada de acordo com o método matemático de Pfaffl (2001) e a eficiência da reação de qPCR foi obtida utilizando-se 5 diluições seriadas do cDNA das linhagens celulares, quantificada em triplicata. A eficiência da reação para cada gene analisado foi determinada por meio da respectiva diluição do cDNA X valores de Ct e calculada por meio da equação  $E = 10^{(-1/\text{slope})}$ , na qual 'E' é a eficiência e 'slope' representa o coeficiente angular da reta. As reações de qPCR foram realizadas em duplicata e as amostras de cDNA em cada reação foram analisadas em triplicata, sendo consideradas para quantificação somente àquelas com desvio padrão  $\leq 0,05$  entre os valores de Ct.

**Tabela 2** - Genes alvos utilizados para amplificação por qPCR nas linhagens CA1, LUC4 e SCC9 nos grupos controle, LED3+3J/cm<sup>2</sup> e LED3+6J/cm<sup>2</sup>, segundo o número de acesso no GenBank, sequência dos *primers*, temperatura de anelamento (Tm), concentração dos *primers* e tamanho do produto amplificado.

Gene	Acesso GenBank	Primers 5' → 3'	Tm (°C)	%primers (nM)
<b>POU5F1</b>	NM_001173531.1	F: acttcactgcactgtactcctc	62	200
		R: aggttctctttccctagctcctc		
<b>BMI1</b>	NM_005180.8	R: caagtgggaactggaacgat	60	400
		R: tgctgggcatcgtaagtatctt		
<b>SNAI1</b>	NM_003068.4	F: caaggaatacctcagcctgg	60	400
		R: catctgagtgggtctggagg		
<b>S100A9</b>	NM_002965.3	F: aagagctggtgcgaaaaga	60	400
		R: ggtccaggctcctccatgat		
<b>IVL</b>	NM_005547.3	F: caagacattcaaccagccct	60	400
		R: agcggacccgaaataagtg		
<b>GAPDH</b>	NM_001256799.2	F: gtgaacctgagaagtatgacaac	60	400
		R: catgagtcctccacgatacc		

### 3.11 Análise Estatística

Todos os experimentos foram realizados em triplicata ou quadruplicata, os resultados foram submetidos a análise estatística utilizando-se do software GraphPad Prism (Versão 7.04, Graphpad, USA).

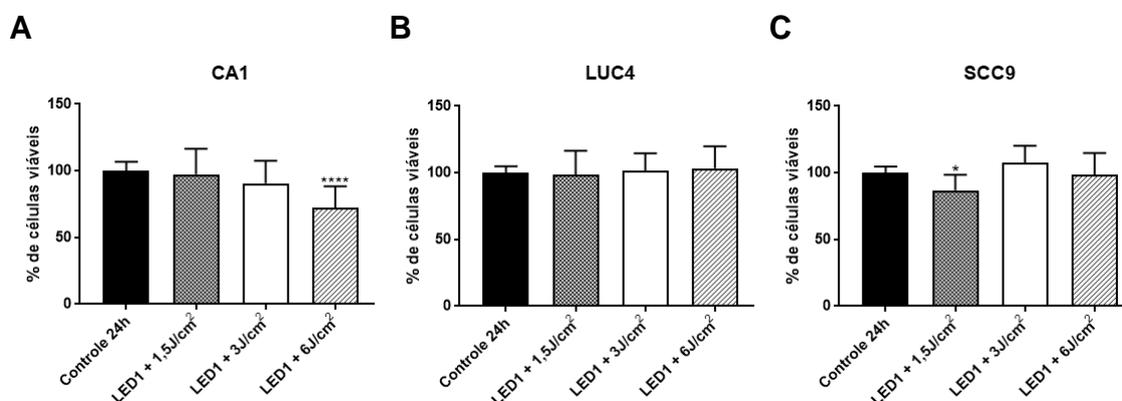
Para verificar a distribuição dos dados, foi realizado o teste de normalidade Shapiro-Wilk. A comparação entre os grupos foi feita utilizando-se o teste Kruskal-Wallis quando os dados não apresentaram normalidade e com o teste ANOVA uma via seguido de teste de Tukey quando os dados apresentaram normalidade. Para a comparação entre dois grupos, foi utilizado o teste Mann-Whitney seguido de teste Hodges-Lehmann quando os dados não apresentaram normalidade e foi utilizado o teste T seguido por correção de Welch quando os dados apresentaram normalidade. O nível de significância utilizado foi de  $p < 0,05$ .

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Viabilidade Celular

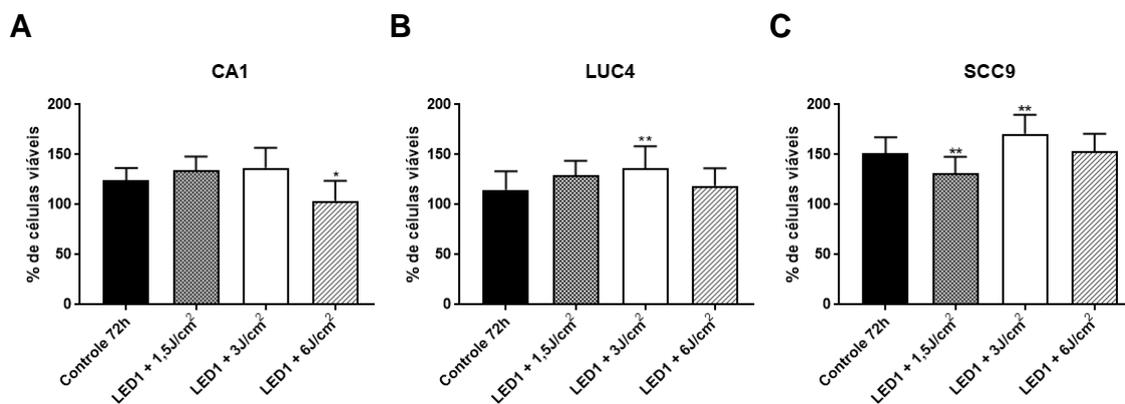
#### 4.1.1 Viabilidade celular por MTT

Após 24 da irradiação, foi observada redução significativa da viabilidade celular nos grupos LED1+6J/cm<sup>2</sup> e LED1+1,5J/cm<sup>2</sup> linhagens celulares CA1 e SCC9, ( $p < 0,0001$  e  $p < 0,05$  respectivamente), quando comparado com o grupo controle (Figura 3). Não foi observada diferença estatística significativa entre os grupos na linhagem LUC4.



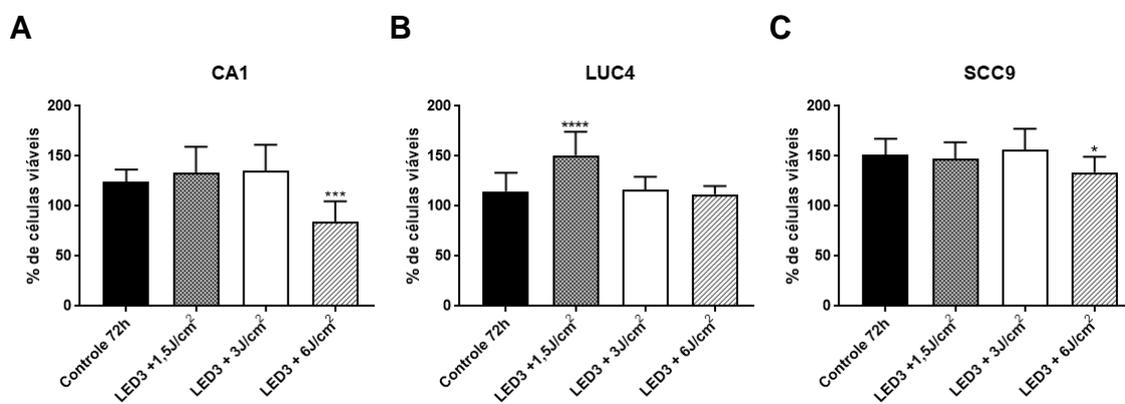
**Figura 3:** Média ( $\pm$  desvio padrão) da porcentagem de células viáveis obtida no ensaio de MTT nos grupos LED1+1,5J/cm<sup>2</sup>, LED1+3J/cm<sup>2</sup> e LED1+6J/cm<sup>2</sup> em relação ao grupo controle nas linhagens celulares CA1 (A), LUC4 (B) e SCC9 (C) após 24 da irradiação (Kruskal-Wallis seguido por ANOVA, \* $p < 0,05$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ ).

Após 72h da irradiação (Figura 4), foi observada redução significativa da viabilidade celular nos grupos LED1+6J/cm<sup>2</sup> e LED1+1,5J/cm<sup>2</sup> nas linhagens celulares CA1 e SCC9, ( $p < 0,05$  e  $p < 0,001$  respectivamente), quando comparado com o grupo controle. Adicionalmente, foi observado aumento na porcentagem de células viáveis das linhagens LUC4 e SCC9 nos grupos LED1+3J/cm<sup>2</sup> ( $p < 0,01$ ).



**Figura 4:** Média ( $\pm$  desvio padrão) da porcentagem de células viáveis obtida no ensaio de MTT nos grupos LED1+1,5J/cm<sup>2</sup>, LED1+3J/cm<sup>2</sup> e LED1+6J/cm<sup>2</sup> em relação ao grupo controle nas linhagens celulares CA1 (A), LUC4 (B) e SCC9 (C) após 72h da irradiação (Kruskal-Wallis seguido por ANOVA, \* $p < 0,5$  \*\* $p < 0,001$ ).

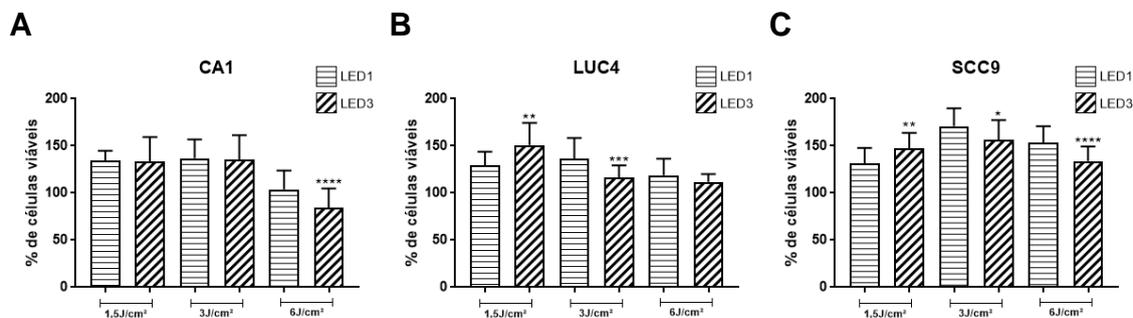
No grupo LED3+6J/cm<sup>2</sup> das linhagens celulares CA1 e SCC9 foi observada redução significativa na viabilidade celular quando comparado com o grupo controle ( $p = 0,0001$  e  $p < 0,05$  respectivamente). Na linhagem celular LUC4, foi observado aumento da viabilidade celular no grupo LED3+1,5J/cm em relação ao grupo controle ( $p < 0,0001$ ) (Figura 5).



**Figura 5:** Média ( $\pm$  desvio padrão) da porcentagem de células viáveis obtida no ensaio de MTT nos grupos LED3+1,5J/cm<sup>2</sup>, LED3+3J/cm<sup>2</sup> e LED3+6J/cm<sup>2</sup> em relação ao grupo controle nas linhagens celulares CA1 (A), LUC4 (B) e SCC9 (C) (Kruskal-Wallis seguido por ANOVA, \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p = 0,0001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ ).

Quando comparamos o efeito da irradiação entre os grupos LED1 e LED3 nos diferentes parâmetros (Figura 6), foi observada redução significativa na viabilidade celular no grupo LED3+6J/cm<sup>2</sup> quando comparado com o grupo LED1+6J/cm<sup>2</sup> para CA1 ( $p < 0,0001$ ). Em relação a linhagem LUC4, foi observado

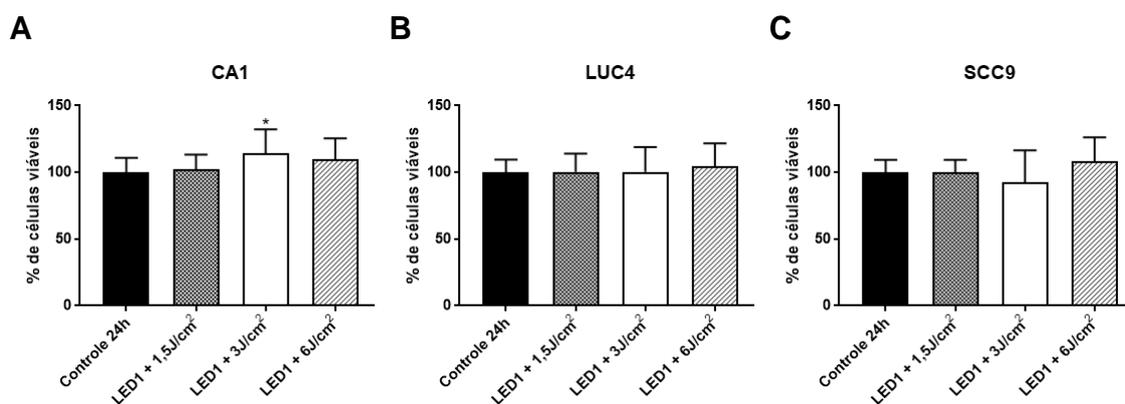
um aumento significativo na porcentagem de células viáveis no grupo LED3+1,5J/cm<sup>2</sup> ( $p<0,001$ ) bem como redução no grupo LED3+3J/cm<sup>2</sup> quando comparado com o grupo LED1 ( $p<0,001$ ). A linhagem SCC9 apresentou aumento de viabilidade celular no grupo LED3+1,5J/cm<sup>2</sup> ( $p<0,001$ ) e redução nos grupos LED3+3J/cm<sup>2</sup> e LED3+6J/cm<sup>2</sup> quando comparado com o grupo LED1 em 72 horas ( $p<0,05$  e  $p<0,0001$ ) (Figura 6).



**Figura 6:** Média ( $\pm$  desvio padrão) da porcentagem de células viáveis nos diferentes grupos LED1 e LED3 das linhagens celulares CA1 (A), LUC4 (B) e SCC9 (C) avaliadas pelo ensaio de MTT (Mann-Whitney \* $p<0,05$ , \*\* $p<0,001$ , \*\*\* $p=0,0001$ , \*\*\*\* $p<0,0001$ ).

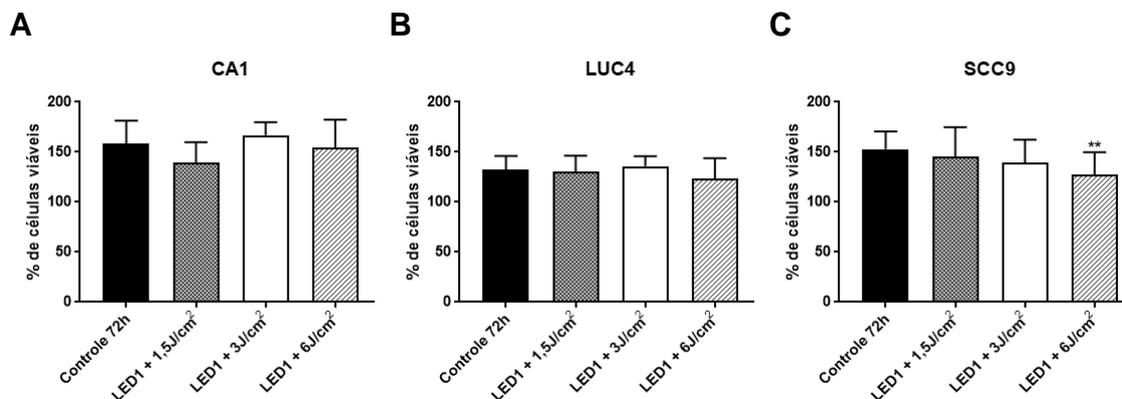
#### 4.1.2 Viabilidade celular por Vermelho Neutro

Após 24h da irradiação, somente o grupo LED1+3J/cm<sup>2</sup> da linhagem CA1 apresentou aumento significativo na porcentagem de células viáveis quando comparado com o grupo controle ( $p<0,05$ ). Não foi observada diferença estatística significativa entre os grupos nas linhagens LUC4 e SCC9. (Figura 7)



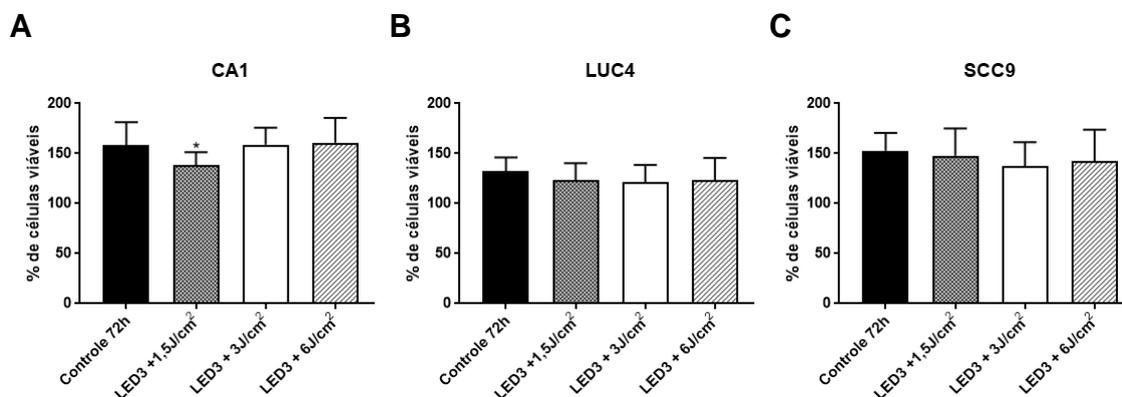
**Figura 7:** Média ( $\pm$  desvio padrão) da porcentagem de células viáveis obtida no ensaio de VN nos grupos LED1+1,5J/cm<sup>2</sup>, LED1+3J/cm<sup>2</sup> e LED1+6J/cm<sup>2</sup> em relação ao grupo controle nas linhagens celulares CA1 (A), LUC4 (B) e SCC9 (C) após 24h da irradiação. (Kruskal-Wallis seguido por ANOVA \* $p<0,05$ )

Após 72h, não houve diferença estatística significativa na porcentagem de células viáveis entre os grupos controle, LED1+1,5J/cm<sup>2</sup>, LED1+3J/cm<sup>2</sup> e LED1+6J/cm<sup>2</sup> nas linhagens CA1 e LUC4. Na linhagem SCC9, o grupo LED1+6J/cm<sup>2</sup> apresentou diminuição da viabilidade celular em relação ao grupo controle ( $p < 0,001$ ) (Figura 8).



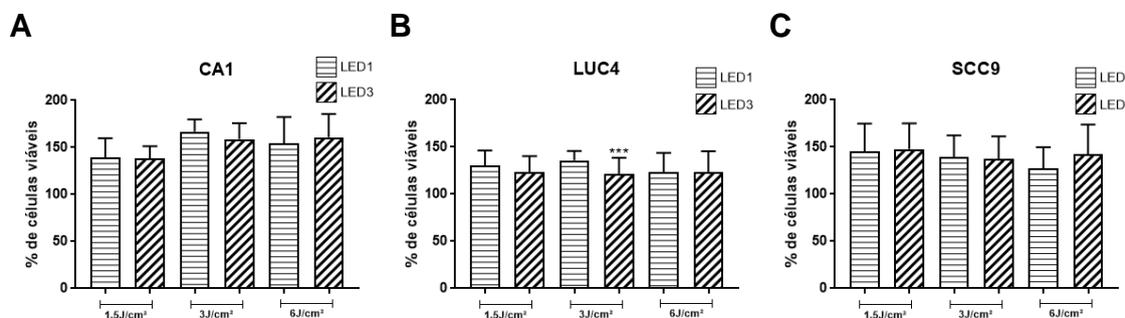
**Figura 8:** Média ( $\pm$  desvio padrão) da porcentagem de células viáveis obtida no ensaio de VN nos grupos LED1+1,5J/cm<sup>2</sup>, LED1+3J/cm<sup>2</sup> e LED1+6J/cm<sup>2</sup> em relação ao grupo controle nas linhagens celulares CA1 (A), LUC4 (B) e SCC9 (C) após 72h da irradiação. (Kruskal-Wallis seguido por ANOVA \* $p < 0,001$ )

Em relação ao grupo LED3, foi observada redução na porcentagem de células viáveis somente na linhagem CA1 do grupo LED3+1,5J/cm<sup>2</sup> quando comparado com o controle ( $p < 0,05$ ). Nos demais grupos e linhagens celulares, não foi observada diferença significativa na viabilidade celular quando as células foram submetidas a três irradiações consecutivas (Figura 9).



**Figura 9:** Média ( $\pm$  desvio padrão) da porcentagem de células viáveis obtida no ensaio de VN nos grupos LED3+1,5J/cm<sup>2</sup>, LED3+3J/cm<sup>2</sup> e LED3+6J/cm<sup>2</sup> em relação ao grupo controle nas linhagens celulares CA1 (A), LUC4 (B) e SCC9 (C) (Kruskal-Wallis seguido por ANOVA \* $p < 0,05$ )

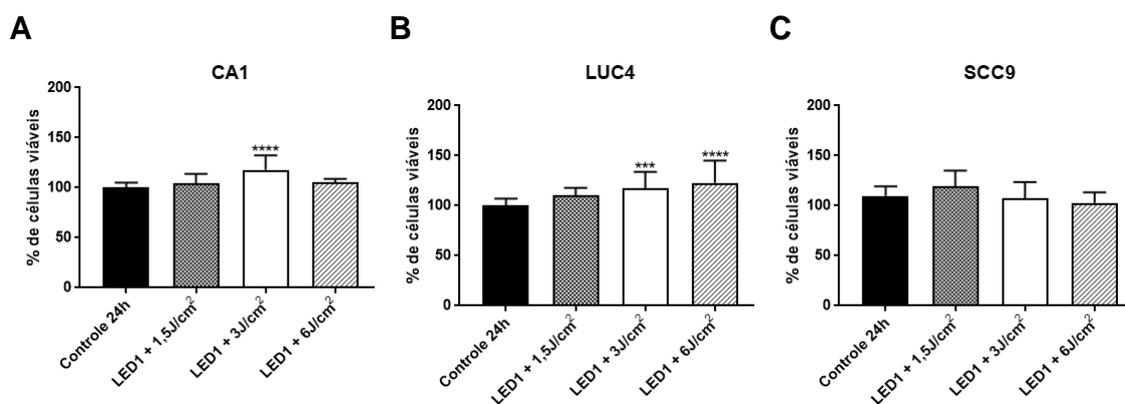
Ao fazer a comparação entre os grupos LED1 e LED3 foi possível observar a redução da viabilidade celular no grupo LED3+3J/cm<sup>2</sup> quando comparado com o grupo LED1+3J/cm<sup>2</sup> ( $p=0,0001$ ). Não foi observada diferença entre os grupos nas linhagens CA1 e SCC9. (Figura 10)



**Figura 10:** Média ( $\pm$  desvio padrão) da porcentagem de células viáveis nos diferentes grupos LED1 e LED3 das linhagens celulares CA1 (A), LUC4 (B) e SCC9 (C) avaliadas pelo ensaio de VN (Teste T de Welch \*\*\* $p=0,0001$ ).

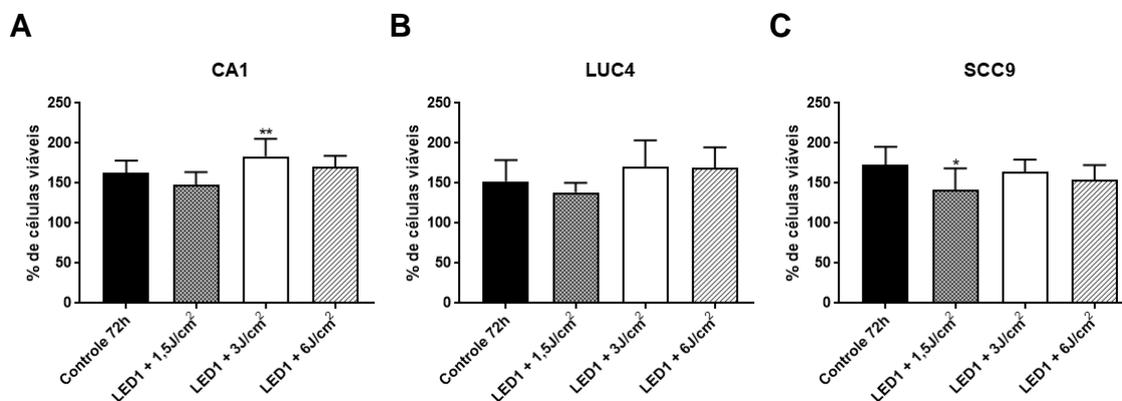
#### 4.1.3 Viabilidade celular por coloração Cristal Violeta

Após 24h, foi observado aumento na porcentagem de células viáveis das linhagens CA1 do grupo LED1+ 3J/cm<sup>2</sup> ( $p<0,0001$ ) bem como aumento crescente nos grupos LED1+3J/cm<sup>2</sup> e LED1+6J/cm<sup>2</sup> da linhagem celular LUC4 quando comparado com o grupo controle ( $p=0,0001$  e  $p<0,0001$ ). Na linhagem SCC9, não houve diferença entre os grupos irradiados e controle. (Figura 11)



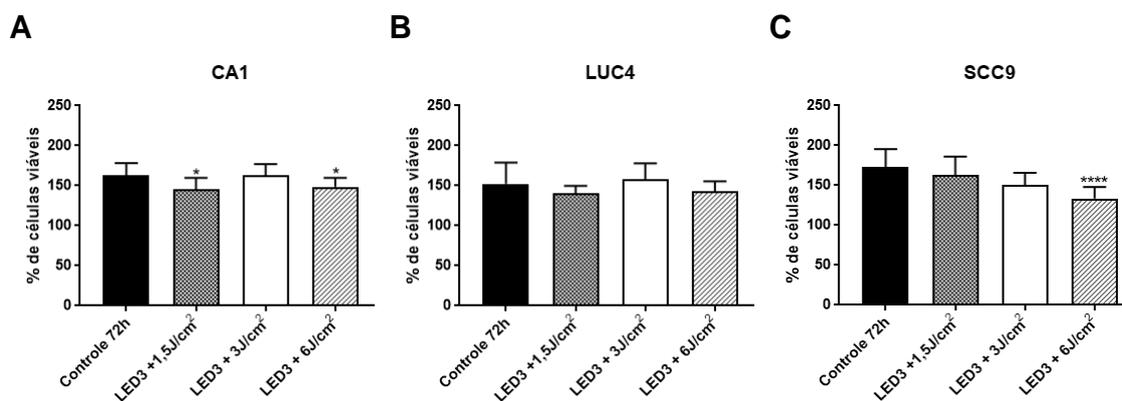
**Figura 11:** Média ( $\pm$  desvio padrão) da porcentagem de células viáveis obtida no ensaio de CV nos grupos LED1+1,5J/cm<sup>2</sup>, LED1+3J/cm<sup>2</sup> e LED1+6J/cm<sup>2</sup> em relação ao grupo controle nas linhagens celulares CA1 (A), LUC4 (B) e SCC9 (C) após 24 da irradiação (Kruskal-Wallis seguido por ANOVA \*\*\* $p=0,0001$ , \*\*\*\* $p<0,0001$ ).

Após 72h, foi possível observar um aumento da viabilidade celular no grupo LED1+3J/cm<sup>2</sup> na linhagem CA1 ( $p < 0,001$ ) bem como redução no grupo LED1+1,5J/cm<sup>2</sup> da linhagem SCC9 quando comparado com o grupo controle ( $p < 0,05$ ) (Figura 12).



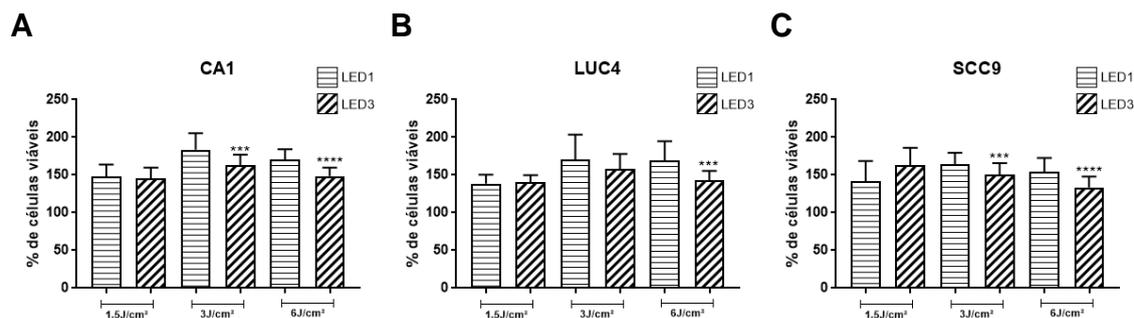
**Figura 12:** Média ( $\pm$  desvio padrão) da porcentagem de células viáveis obtida no ensaio de CV nos grupos LED1+1,5J/cm<sup>2</sup>, LED1+3J/cm<sup>2</sup> e LED1+6J/cm<sup>2</sup> em relação ao grupo controle nas linhagens celulares CA1 (A), LUC4 (B) e SCC9 (C) após 72h da irradiação (Kruskal-Wallis seguido por ANOVA \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,001$ ).

Nas células que receberam irradiação diária por três dias consecutivos, redução significativa da viabilidade celular foi observada nos grupos LED3+1,5J/cm<sup>2</sup> e LED3+6J/cm<sup>2</sup> (\* $p < 0,05$ ) da linhagem CA1 e no grupo LED3+6J/cm<sup>2</sup> da linhagem SCC9 em relação ao grupo controle ( $p < 0,0001$ ). (Figura 13).



**Figura 13:** Média ( $\pm$  desvio padrão) da porcentagem de células viáveis obtida no ensaio de CV nos grupos LED3+1,5J/cm<sup>2</sup>, LED3+3J/cm<sup>2</sup> e LED3+6J/cm<sup>2</sup> em relação ao grupo controle nas linhagens celulares CA1 (A), LUC4 (B) e SCC9 (C) (Kruskal-Wallis seguido por ANOVA \* $p < 0,05$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ ).

Fazendo a comparação entre LED1 e LED3, as linhagens CA1 e SCC9 mostraram redução da viabilidade celular no grupo LED3+3J/cm<sup>2</sup> quando comparado ao grupo LED1+3J/cm<sup>2</sup> (p=0,0001). Todas as linhagens celulares apresentaram redução na porcentagem de células viáveis no grupo LED3+6J/cm<sup>2</sup> em relação ao grupo LED1+6J/cm<sup>2</sup> (p<0,0001 e p=0,0001) (Figura 14).



**Figura 14:** Média ( $\pm$  desvio padrão) da porcentagem de células viáveis nos diferentes grupos LED1 e LED3 das linhagens celulares CA1 (A), LUC4 (B) e SCC9 (C) avaliadas pelo ensaio de CV (Teste T de Welch \*\*\*p=0,0001, \*\*\*\*p<0,0001).

Na tabela 3 estão representados os resultados obtidos nos ensaios de MTT, VN e CV em relação à viabilidade celular das linhagens celulares CA1, LUC4 e SCC9 nos diferentes grupos de estudo. É possível observar que após 24h da irradiação, as linhagens CA1 e LUC4 do grupo LED1+1,5J/cm<sup>2</sup> não apresentaram alteração da viabilidade celular quando esta foi avaliada pelos ensaios de MTT, VN e CV. Adicionalmente, a linhagem SCC9 mostrou redução da viabilidade somente quando avaliada pelo ensaio de MTT. Já no grupo LED1+3J/cm<sup>2</sup>, aumento da viabilidade celular foi somente observado na linhagem CA1 quando avaliada por VN e na linhagem LUC4 quando avaliada por CV, isoladamente. No grupo LED1+6J/cm<sup>2</sup>, a linhagem CA1 apresentou redução da viabilidade quando avaliada por MTT e a linhagem LUC4 apresentou aumento da viabilidade celular quando avaliada por CV.

Após 72h da irradiação, as células das linhagens CA1 e LUC4 do grupo LED1+1,5J/cm<sup>2</sup> não demonstraram alteração da viabilidade celular em todos os ensaios realizados bem como as células da linhagem SCC9 continuaram demonstrando redução da viabilidade celular por MTT e também por CV. Já no grupo LED1+3J/cm<sup>2</sup>, houve aumento da viabilidade celular, observada nas linhagens LUC4 e SCC9 por MTT e na linhagem CA1 por CV. No grupo

LED1+6J/cm<sup>2</sup>, o aumento da viabilidade que foi observado por CV após 24h da irradiação na linhagem CA1 e LUC4 não foi observado após 72h da irradiação e ainda, a linhagem CA1 continuou mostrando redução da porcentagem de células viáveis na análise por MTT. Adicionalmente, a linhagem SCC9 mostrou redução da viabilidade quando avaliada por VN.

No grupo LED3, o qual recebeu uma irradiação diária por três dias consecutivos, observamos uma redução da viabilidade celular na linhagem CA1 quando avaliada por VN e CV, aumento da viabilidade na linhagem LUC4 por MTT e ausência de efeito na linhagem SCC9 quando 1,5J/cm<sup>2</sup> foram utilizados (grupo LED3+1,5J/cm<sup>2</sup>). Entretanto, no grupo LED3+3J/cm<sup>2</sup> não foi observada alteração da viabilidade celular quando esta foi avaliada por MTT, VN e CV. Já no grupo LED3+6J/cm<sup>2</sup>, redução da viabilidade das linhagens CA1 e SCC9 foram observadas tanto no ensaio de MTT quanto CV e nenhuma alteração foi observada na linhagem LUC4.

Desta maneira, baseando-se nos resultados descritos acima, a irradiação diária com o parâmetro de 6J/cm<sup>2</sup> mostrou um efeito negativo na viabilidade das células das linhagens CA1 e SCC9 e nenhum efeito na linhagem LUC4. Adicionalmente, o parâmetro 3J/cm<sup>2</sup>, quando aplicado diariamente, não afetou a viabilidade celular, fato este que ocorreu quando uma única irradiação foi realizada. Desta maneira, os parâmetros 3J/cm<sup>2</sup> e 6J/cm<sup>2</sup> foram selecionados para avaliar se a FBM é capaz de alterar as características de CTC destas linhagens.

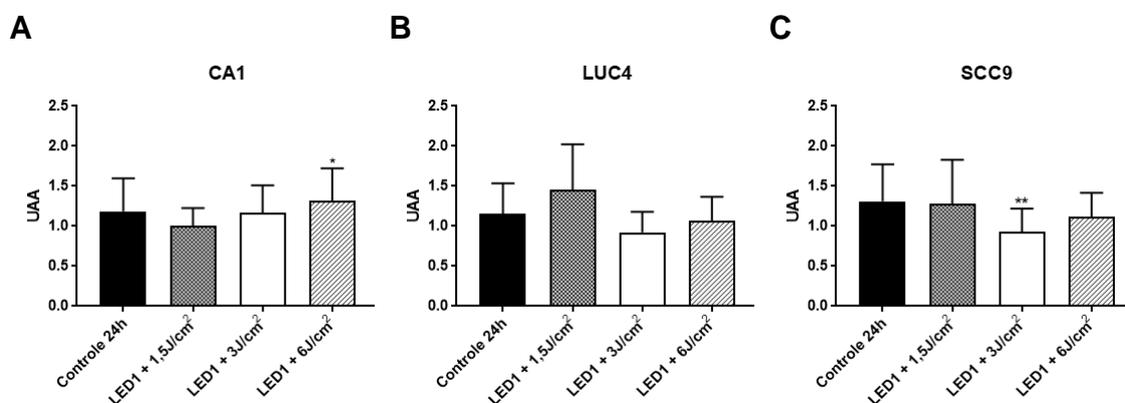
**Tabela 3:** Resumo dos dados obtidos nos ensaios de viabilidade celular por MTT, VN e CV nos diferentes grupos de estudo, período e linhagem celular.

<b>Grupos</b>	<b>Linhagem</b>	<b>MTT</b>	<b>VN</b>	<b>CV</b>
<b>24h</b>				
LED1+1,5J/cm <sup>2</sup>	CA1	-	-	-
	LUC4	-	-	-
	SCC9	<b>Redução</b>	-	-
LED1+3J/cm <sup>2</sup>	CA1	-	<b>Aumento</b>	-
	LUC4	-	-	<b>Aumento</b>
	SCC9	-	-	-
LED1+6J/cm <sup>2</sup>	CA1	<b>Redução</b>	-	-
	LUC4	-	-	<b>Aumento</b>
	SCC9	-	-	-
<b>72h</b>				
LED1+1,5J/cm <sup>2</sup>	CA1	-	-	-
	LUC4	-	-	-
	SCC9	<b>Redução</b>	-	<b>Redução</b>
LED1+3J/cm <sup>2</sup>	CA1	-	-	<b>Aumento</b>
	LUC4	<b>Aumento</b>	-	-
	SCC9	<b>Aumento</b>	-	-
LED1+6J/cm <sup>2</sup>	CA1	<b>Redução</b>	-	-
	LUC4	-	-	-
	SCC9	-	<b>Redução</b>	-
<b>72h</b>				
LED3+1,5J/cm <sup>2</sup>	CA1	-	<b>Redução</b>	<b>Redução</b>
	LUC4	<b>Aumento</b>	-	-
	SCC9	-	-	-
LED3+3J/cm <sup>2</sup>	CA1	-	-	-
	LUC4	-	-	-
	SCC9	-	-	-
LED3+6J/cm <sup>2</sup>	CA1	<b>Redução</b>	-	<b>Redução</b>
	LUC4	-	-	-
	SCC9	<b>Redução</b>	-	<b>Redução</b>

## 4.2 Detecção de unidades arbitrárias de autofagia *in vitro*

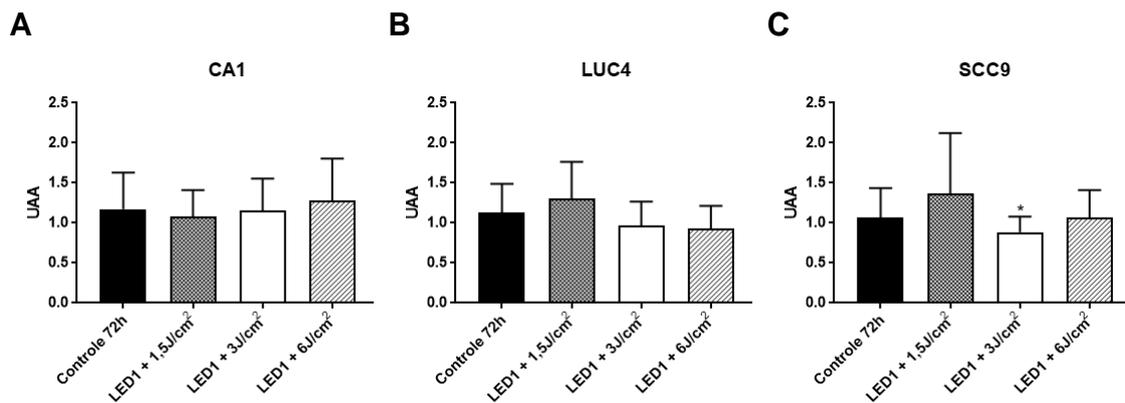
A avaliação da autofagia *in vitro* foi realizada a partir da análise de incorporação por VN em comparação com CV e MTT, de acordo com Martins et al. (2013).<sup>89</sup> Os valores de UAA maiores que 1 um indicam morte por autofagia e quanto maior este valor, maior será a correlação com este tipo de morte celular.

Em relação aos valores obtidos pelo cálculo de UAA, após 24 horas (Figura 15), somente o grupo LED1+6J/cm<sup>2</sup> da linhagem CA1 mostrou aumento significativo ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle. Na linhagem SCC9, foi observada diminuição das UAA no grupo LED1+3J/cm<sup>2</sup> quando comparado com o grupo controle ( $p < 0,001$ ).



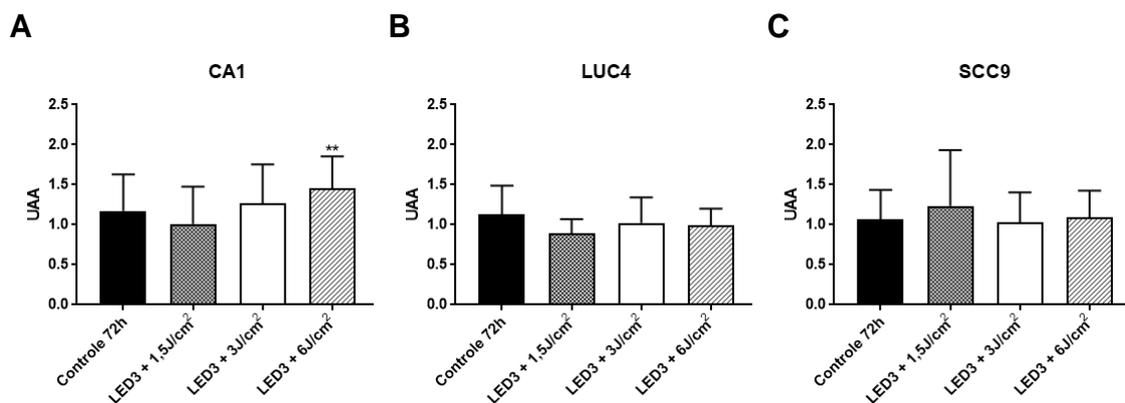
**Figura 15:** Média ( $\pm$  desvio padrão) dos valores de UAA nos grupos LED1+1,5J/cm<sup>2</sup>, LED1+3J/cm<sup>2</sup> e LED1+6J/cm<sup>2</sup> em relação ao grupo controle nas linhagens celulares CA1 (A), LUC4 (B) e SCC9 (C) após 24h da irradiação (Kruskal-Wallis seguido por ANOVA \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,001$ ).

Após 72 horas, somente o grupo LED1+3J/cm<sup>2</sup> da linhagem SCC9 mostrou redução da UAA quando comparado com o grupo controle ( $p < 0,05$ ) (Figura 16).



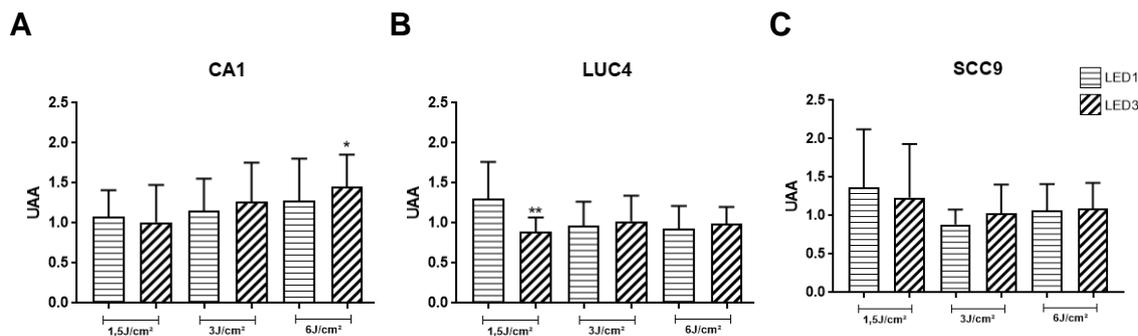
**Figura 16:** Média ( $\pm$  desvio padrão) dos valores de UAA nos grupos LED1+1,5J/cm<sup>2</sup>, LED1+3J/cm<sup>2</sup> e LED1+6J/cm<sup>2</sup> em relação ao grupo controle nas linhagens celulares CA1 (A), LUC4 (B) e SCC9 (C) após 72h da irradiação (Kruskal-Wallis seguido por ANOVA \* $p < 0,05$ ).

Nas células que receberam uma irradiação diária por três dias consecutivos, somente o grupo LED3+6J/cm<sup>2</sup> da linhagem CA1 apresentou aumento significativo da UAA quando comparado com o controle ( $p < 0,001$ ).



**Figura 17:** Média ( $\pm$  desvio padrão) dos valores de UAA nos grupos LED3+1,5J/cm<sup>2</sup>, LED3+3J/cm<sup>2</sup> e LED3+6J/cm<sup>2</sup> em relação ao grupo controle nas linhagens celulares CA1 (A), LUC4 (B) e SCC9 (C) após 72h da irradiação (Kruskal-Wallis seguido por ANOVA \*\* $p < 0,001$ ).

Na comparação entre os grupos LED1 e LED3 (Figura 18), foi possível observar maior formação de UAA autofagia do grupo LED3+6J/cm<sup>2</sup> da linhagem CA1 relação ao grupo LED1+6J/cm<sup>2</sup> ( $p < 0,05$ ). Para a linhagem Luc4, foi possível observar menor formação de UAA no grupo LED3+1,5J/cm<sup>2</sup> em relação ao grupo LED1+1,5J/cm<sup>2</sup> ( $p < 0,001$ ). Não houve diferença entre os demais grupos das linhagens CA1, LUC4 e SCC9.



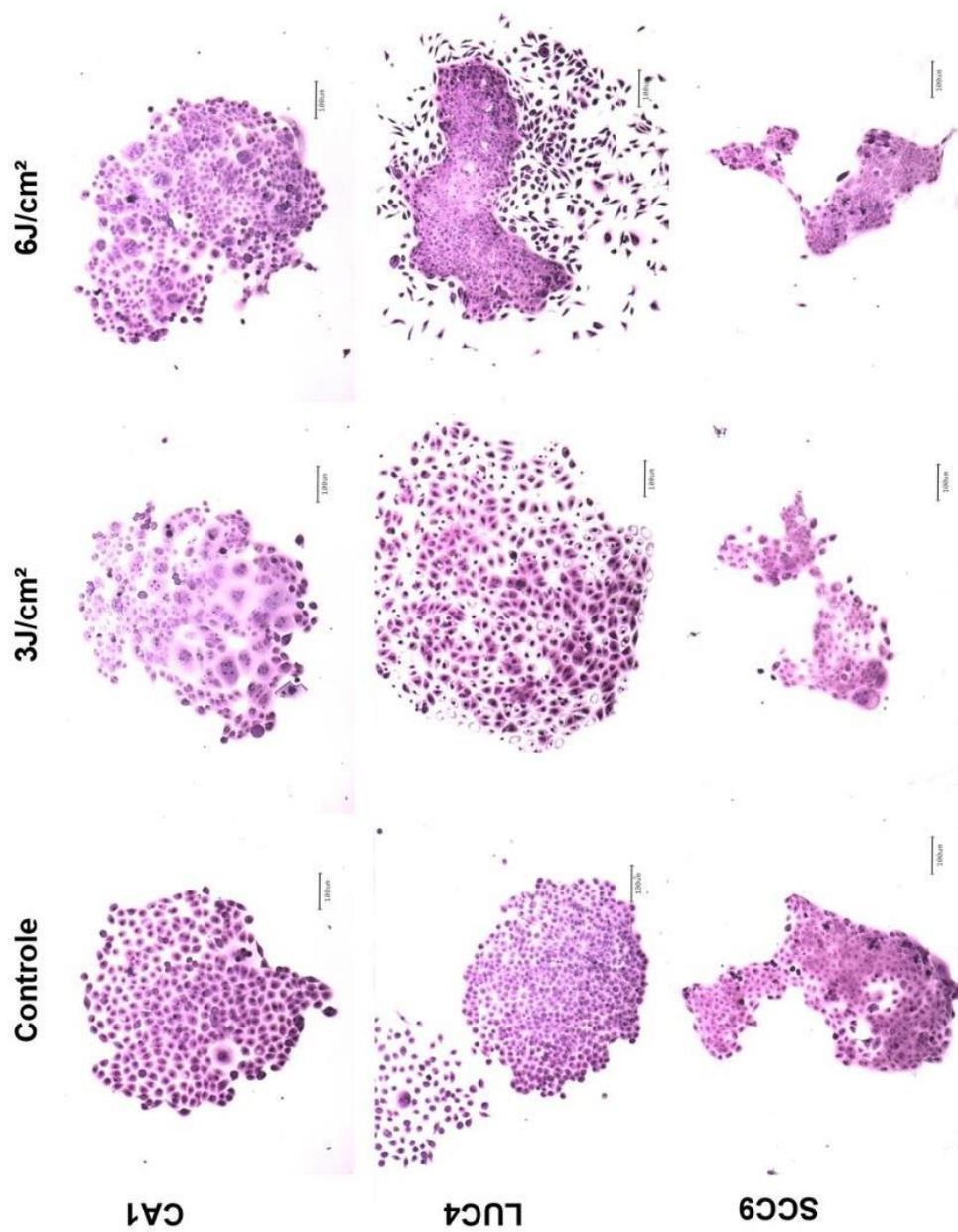
**Figura 18:** Média ( $\pm$  desvio padrão) comparação dos valores de UAA nos grupos LED1 e LED3 das linhagens celulares CA1 (A), LUC4 (B) e SCC9 (C) (Mann-Whitney \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,001$ ).

Foi realizada a correlação linear entre a morte celular por autofagia e a viabilidade celular dada pelo ensaio de cristal violeta. A distribuição dos dados demonstrou fraca ou nenhuma correlação de morte celular por autofagia para todos os grupos (Anexo 1).

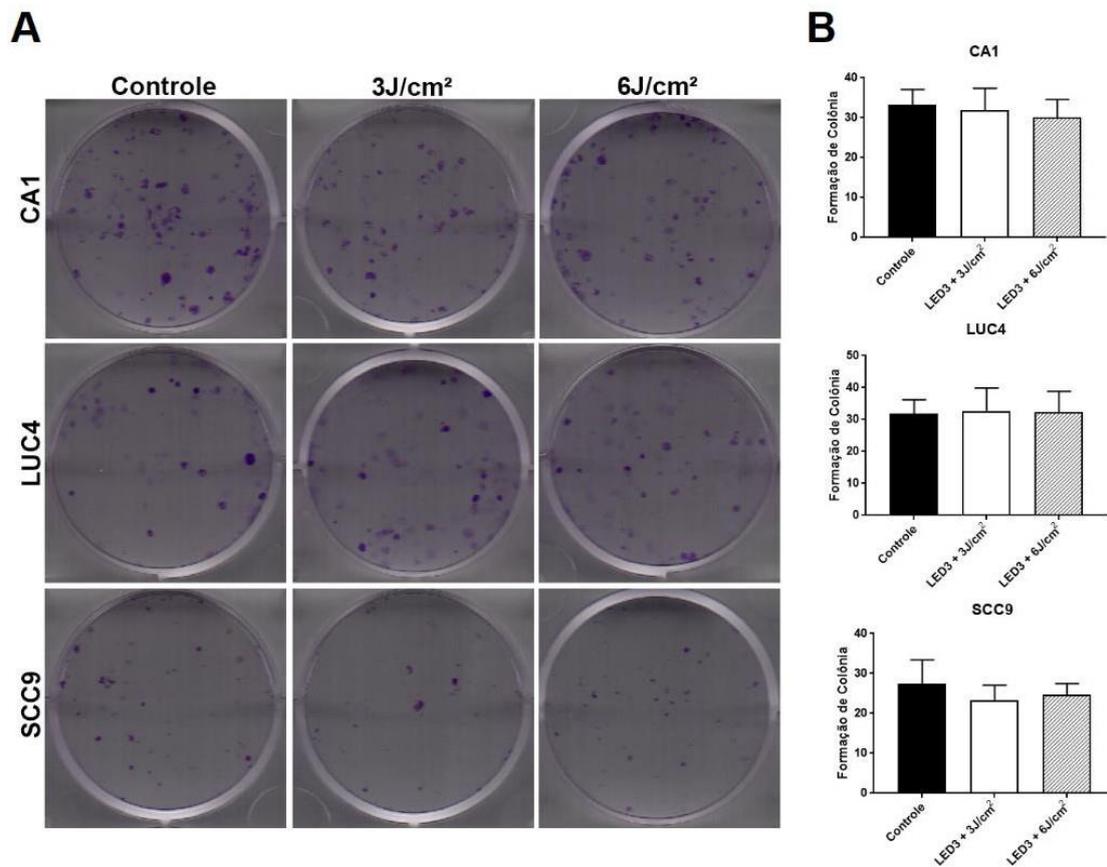
### 4.3 Capacidade de formação de colônias

A análise de formação de colônias foi avaliada nos grupos controle, LED3+3J/cm<sup>2</sup> e LED3+6J/cm<sup>2</sup> das linhagens celulares CA1, LUC4 e SCC9. Em relação à morfologia das colônias, as linhagens celulares CA1 e SCC9 dos diferentes grupos apresentaram células pequenas e redondas bem aderidas umas às outras, com características morfológicas de holoclones (Figura 19). Na linhagem LUC4, além do aspecto de holoclones, o qual foi observado em todos os grupos, foi observado que células localizadas na periferia das colônias epiteliais apresentaram morfologia alongada, com aspecto mesenquimal.

Em relação ao número de colônias formadas após a irradiação diária por três dias consecutivos nos grupos LED3+3J/cm<sup>2</sup> e LED3+6J/cm<sup>2</sup> das linhagens celulares CA1, LUC4 e SCC9, não foi observada diferença significativa entre os grupos (Figura 20)



**Figura 19:** Morfologia das colônias formadas nos grupos controle, LED3+3J/cm<sup>2</sup> e LED3+6J/cm<sup>2</sup> das linhagens celulares CA1, LUC4 e SCC9 (Aumento 100x).

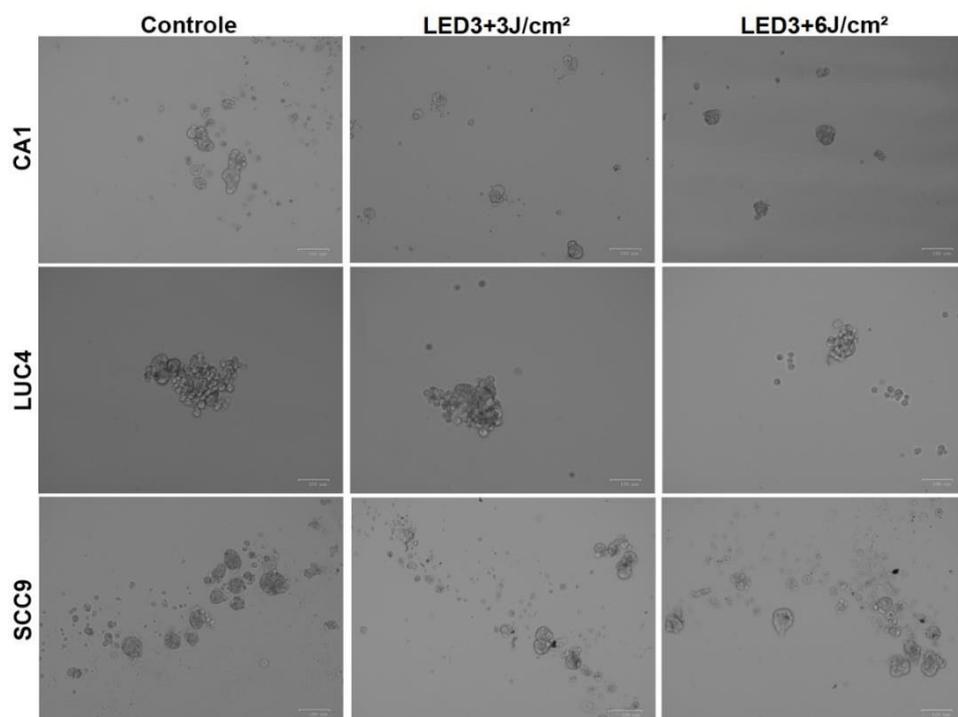


**Figura 20:** Formação de colônias nas linhagens celulares CA1, LUC4 e SCC9 nos grupos controle, LED3+3J/cm<sup>2</sup> e LED3+6J/cm<sup>2</sup> (**A**). Média ( $\pm$ desvio padrão) do número de colônias observado em cada grupo (**B**) (Teste T de Welch).

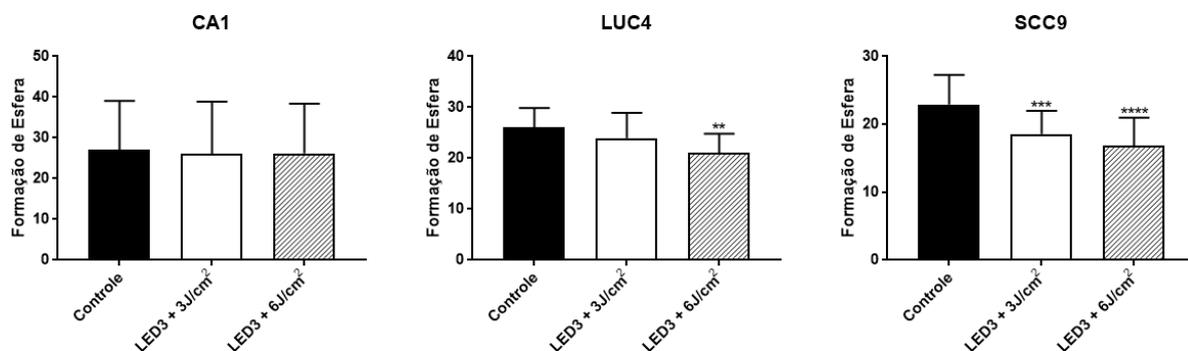
#### 4.4 Capacidade de formação de Esferas

A linhagem CA1 não apresentou diferença no número de esferas formadas entre os grupos controle, LED3+3J/cm<sup>2</sup> e LED3+6J/cm<sup>2</sup>. Entretanto, a linhagem LUC4 mostrou redução significativa no número de esferas no grupo LED3+6J/cm<sup>2</sup> ( $p < 0,01$ ) e a linhagem SCC9, nos grupos LED3+3J/cm<sup>2</sup> e LED3+6J/cm<sup>2</sup> ( $p < 0,001$  e  $p < 0,0001$ ) (Figura 20).

A



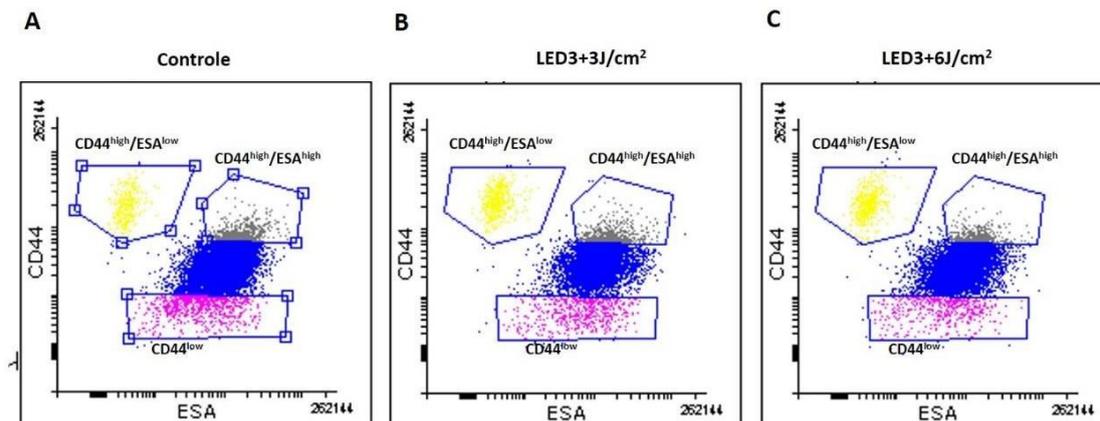
B



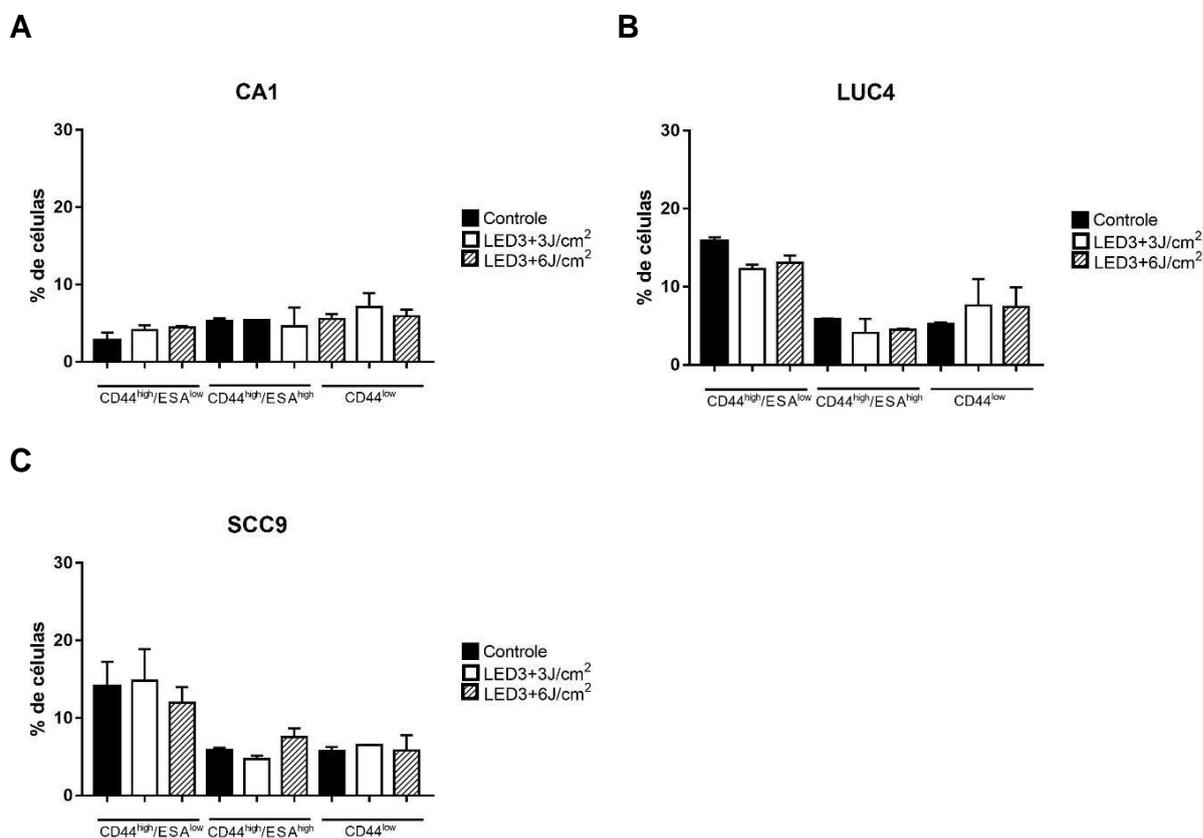
**Figura 21:** Formação de esferas nas linhagens CA1, LUC4 e SCC9 nos grupos controle, LED3+3J/cm<sup>2</sup> e LED3+6J/cm<sup>2</sup> (A). Média ( $\pm$ desvio padrão) do número de esferas observado em cada grupo (B) (Teste T de Welch \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ ).

#### 4.5 Análise da expressão de CD44 e ESA

As subpopulações CD44<sup>high</sup>/ESA<sup>high</sup>, CD44<sup>high</sup>/ESA<sup>low</sup> e CD44<sup>low</sup> das linhagens CA1, LUC4 e SCC9 foram identificadas de acordo com Biddle et al. (2011)<sup>39</sup> (Figura 22). Como demonstrado na figura 23, não foi observada diferença entre os grupos nas linhagens CA1, LUC4 e SCC9 em relação à porcentagem de células de cada subpopulação.



**Figura 22:** Imagem representativa da seleção das subpopulações  $CD44^{high}/ESA^{high}$ ,  $CD44^{high}/ESA^{low}$  e  $CD44^{low}$  na linhagem CA1 nos grupos Controle (A), LED3+3J/cm<sup>2</sup> (B) e LED3+6J/cm<sup>2</sup> (C).



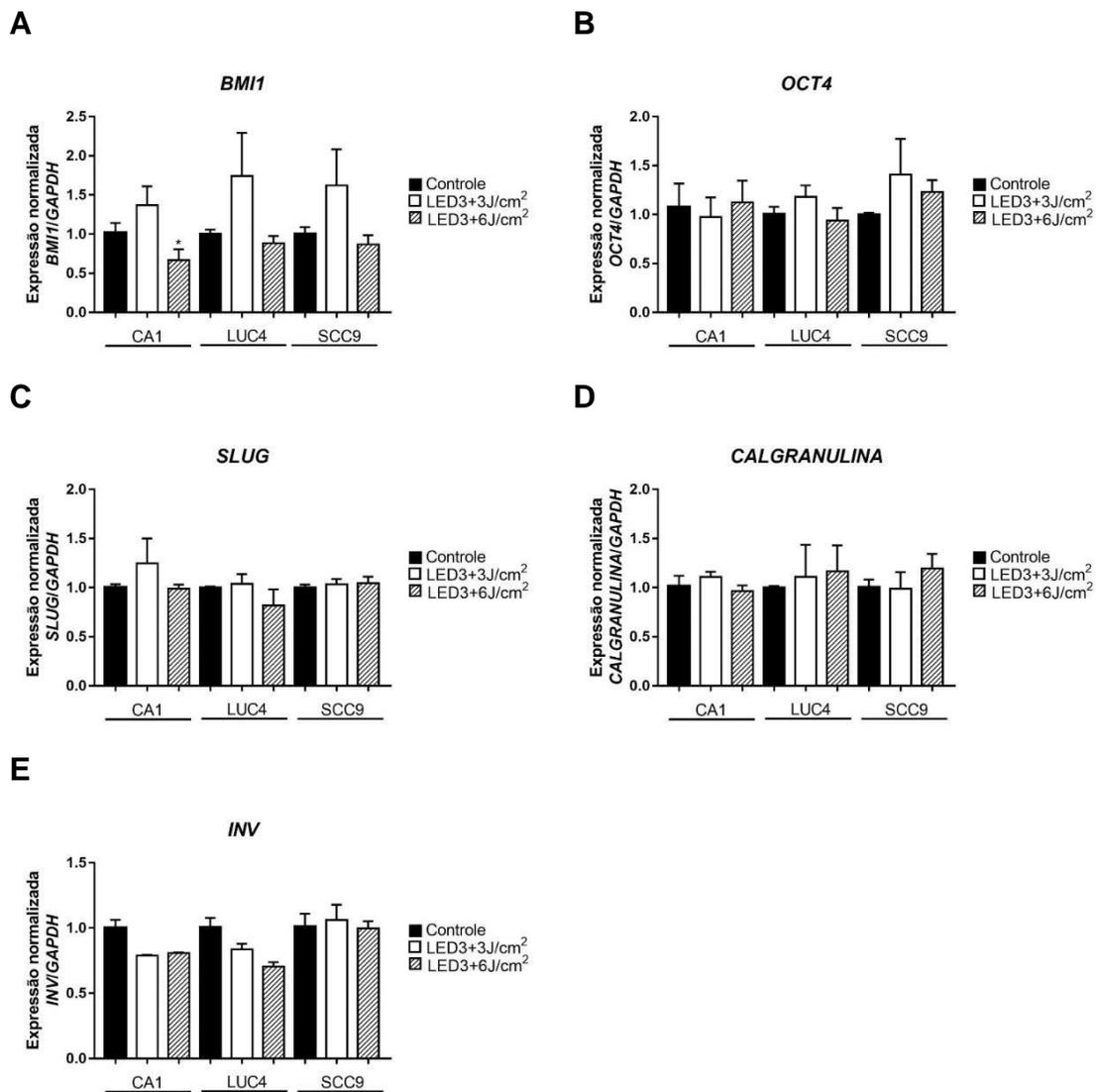
**Figura 23:** Análise da expressão de  $CD44^{high}/ESA^{high}$ ,  $CD44^{high}/ESA^{low}$  e  $CD44^{low}$  nas linhagens CA1 (A), LUC4 (B) e SCC9 (C) nos grupos controle, LED3+3J/cm<sup>2</sup> e LED3+6J/cm<sup>2</sup> (Teste T de Welch)

#### **4.6 Análise da expressão dos genes *BMI1*, *OCT4*, *SLUG*, *CALGRANULINA* e *INVOLUCRINA***

Em relação à expressão dos genes *BMI1* e *OCT4*, ambos associados com o fenótipo tronco, foi observado que somente a linhagem CA1 do grupo LED3+6J/cm<sup>2</sup> mostrou redução significativa da expressão do gene *BMI1* quando comparado com o grupo controle (Figura 24A). Nenhuma diferença foi observada em relação à expressão do gene *OCT4* em todos os grupos e nas três linhagens avaliadas (Figura 24B)

A expressão do gene *SLUG*, associado com aquisição do fenótipo de transição epitélio-mesequimal, não foi alterada nos grupos LED3+3J/cm<sup>2</sup> e LED3+6J/cm<sup>2</sup> em todas as linhagens analisadas (Figura 24C).

Adicionalmente, nenhuma alteração foi observada em relação aos níveis de expressão dos genes relacionados com diferenciação epitelial *CALGRANULINA* e *INV* nas linhagens celulares CA1, LUC4 e SCC9 após a irradiação (Figura 24D e 24E).



**Figura 24:** Análise da expressão dos genes *BMI1* (A), *OCT4* (B), *SLUG* (C), *CALGRANULINA* (D) e *INV* (E) nas linhagens celulares CA1, LUC4 e SCC9 nos grupos controle, LED3+3J/cm<sup>2</sup> e LED3+6J/cm<sup>2</sup> (ANOVA seguido por teste de Tukey \*p<0,05).

## 5. DISCUSSÃO

Compreender os efeitos e mecanismos de interação da FBM com as células tumorais é fundamental para garantir a segurança de seu uso no tratamento das complicações orais decorrentes do tratamento oncológico dos pacientes com CEB, evitando-se assim um efeito deletério desta ferramenta, o que poderia levar a um pior prognóstico e/ou favorecer a recorrência.

Para avaliar o efeito da FBM na viabilidade celular bem como nas características de CTC de diferentes linhagens de CEB, foram selecionados os parâmetros 1,5J/cm<sup>2</sup>, 3J/cm<sup>2</sup> e 6J/cm<sup>2</sup> e irradiância de 25,5mW/cm<sup>2</sup>. A escolha dos parâmetros foi baseada naqueles recomendados pela literatura para a prevenção e terapia da MO, conforme descrito nas revisões sistemáticas de Zecha et al. (2016)<sup>60</sup> e Bjordal et al. (2011)<sup>61</sup>, sendo 3J/cm<sup>2</sup> indicados para a prevenção da mucosite oral e 6J/cm<sup>2</sup> para a terapia. Adicionalmente, apesar de não se enquadrar nos parâmetros recomendados para o tratamento e prevenção da mucosite oral, o parâmetro dosimétrico de 1,5J/cm<sup>2</sup> foi também incluído uma vez que parâmetros entre 1 e 2J/cm<sup>2</sup> tem sido utilizados com frequência nos trabalhos que visam compreender a interação da FBM com células derivadas de câncer.<sup>69, 80, 83, 93</sup>

Além disso, vale ressaltar que a maioria dos estudos que avaliaram o efeito da FBM em células tumorais derivadas de CEB realizaram somente uma única irradiação, sendo que, um mínimo de 3 sessões semanais é indicado para prevenção e/ou tratamento da MO.<sup>59-61</sup> Desta maneira, torna-se necessário avaliar o efeito da FBM com aplicações diárias nas células tumorais, já que caso as mesmas tenham permanecido na mucosa oral após o tratamento do CEB, serão expostas diariamente à FBM.

Para avaliar a viabilidade das linhagens celulares derivadas de CEB após a FBM, foram realizados os ensaios de MTT, Vermelho Neutro e Cristal Violeta, uma vez que estas metodologias apresentam algumas desvantagens quando realizadas individualmente. O ensaio de MTT avalia a atividade enzimática de desidrogenases intracelulares capazes de converter o sal tetrazolium solúvel em água, e cristais de formazan insolúveis na mitocôndria<sup>86,90</sup>. A FBM atua diretamente na mitocôndria onde ocorre a absorção da energia pelos cromóforos, gerando aumento da produção de ATP, óxido nítrico e espécies

reativas de oxigênio, que por sua vez desencadeiam a ativação de fatores de transcrição que regulam a viabilidade e proliferação celular.<sup>63</sup> Por outro lado, a presença de superóxidos pode levar a uma redução na formação dos cristais de formazan e desta maneira, os resultados obtidos pelo ensaio de MTT podem resultar em valores superestimados.<sup>91, 92</sup> Em relação ao ensaio de VN, células viáveis incorporam o VN, o qual fica retido nos lisossomos até o momento de sua solubilização. Porém, este ensaio também pode resultar em uma superestimação da viabilidade celular já que o VN também é incorporado e retido em vacúolos autofágicos tardios.<sup>89</sup> Por fim, a coloração com cristal violeta fornece uma quantificação da viabilidade celular que é proporcional à quantidade de células aderidas.<sup>88</sup> Por esta razão, é indicado que mais de uma metodologia seja utilizada para avaliação da viabilidade celular, principalmente quando se utiliza a FBM.<sup>83</sup>

Assim, ao avaliar o efeito da FBM na viabilidade de linhagens celulares, os resultados obtidos foram variados em relação ao tipo de ensaio, linhagem celular, período de avaliação, parâmetro dosimétrico e frequência da irradiação. Após 24 e 72 horas de uma única irradiação, observou-se que a exposição radiante de 1,5 e 6J/cm<sup>2</sup> foram capazes de diminuir a viabilidade da linhagem SCC9. Efeito inibitório na viabilidade celular também foi observado nas linhagens CA1 e LUC4 com 6J/cm<sup>2</sup> após 24h da irradiação, por meio dos ensaios de MTT e CV, respectivamente. Sperandio et al. (2013) e Schalch et al. (2018) observaram redução da viabilidade celular da linhagem SCC9 após 24h da FBM com exposição radiante de 3 e 6/cm<sup>2</sup> e 1, 2, 4 e 6J/cm<sup>2</sup>, respectivamente.<sup>69,83</sup>

Alguns trabalhos na literatura têm demonstrado que a irradiação com exposição radiante variando entre 0,5 e 2J/cm<sup>2</sup> têm um efeito promotor da proliferação celular, sendo este dependente da dose e do tempo de exposição. A FBM com 660nm e exposição radiante 1J/cm<sup>2</sup> foi capaz de aumentar a proliferação celular da linhagem SCC25 derivada de CEB e ainda, aumentar a porcentagem de células na fase S do ciclo celular bem como a expressão de ciclina D1.<sup>80</sup> Adicionalmente, foi observada redução na expressão de E-caderina, aumento na expressão de MMP9 e maior capacidade de invasão após a FBM, demonstrando que neste parâmetro, a FBM tem um efeito estimulatório na proliferação e invasão da linhagem SCC25.<sup>80</sup>

Bamps et al. (2018), utilizando também exposição radiante de  $1\text{J}/\text{cm}^2$  observaram aumento da proliferação celular em linhagens celulares derivadas de CEB, porém nenhuma alteração foi observada em linhagem celulares de células epiteliais normais da tonsila. Além disso, o ganho de proliferação foi acompanhado do aumento pAKT, pERK e expressão de Ki67. Entretanto, quando  $2\text{J}/\text{cm}^2$  foram utilizados, nenhum efeito em relação à proliferação celular foi observado.<sup>93</sup> Schalch et al. (2018) não observaram aumento na porcentagem de célula positivas para BrdU ao utilizar  $4\text{J}/\text{cm}^2$  após 1 e 3 dias da irradiação com 660nm e 780nm.<sup>83</sup>

Nossos resultados demonstraram que o parâmetro  $3\text{J}/\text{cm}^2$  e uma única irradiação foi capaz de promover o aumento da viabilidade celular nas linhagens celulares CA1 e LUC4 após 24h e em todas as linhagens após 72h da irradiação sugerindo que o mesmo tenha um efeito bioestimulatório nas células derivadas de CEB. Sperandio et al. (2013) observaram que a FBM única com  $2\text{J}/\text{cm}^2$  na linhagem celular SCC9 promove aumento da expressão de ciclina D1 após 24h e 72h da irradiação bem como aumento da proteína S6 fosforilada e redução de HSP90, sugerindo assim que a FBM possa contribuir para a agressividade das células tumorais.<sup>69</sup>

Por outro lado, Djavid et al. (2017) não observaram efeito da FBM na linhagem celular HeLa quando a FBM foi aplicada com os parâmetros 1, 5, 10 e  $20\text{J}/\text{cm}^2$  bem como em relação à distribuição das células nas diferentes fases do ciclo celular. Pinheiro et al. (2002) também observou que a FBM por 7 dias consecutivos com 635nm e exposição radiante variando de 0,04 a  $4,8\text{J}/\text{cm}^2$  em células da linhagem Hep-2 derivada de carcinoma epidermóide de laringe não foi capaz de alterar a viabilidade celular, mesmo quando as mesmas foram cultivadas com 5 ou 10% de SFB.<sup>94</sup>

Outro estudo avaliando a viabilidade das células Hep-2 demonstrou que a mesma aumentou com a exposição radiante de  $4\text{J}/\text{cm}^2$  e 830nm, não havendo diferença nos valores de viabilidade para o grupo irradiado com  $4\text{J}/\text{cm}^2$  e 685nm, sugerindo que o comprimento de onda utilizado afeta a resposta celular à FBM.<sup>95</sup> Neste contexto, Magnato et al. (2004) demonstraram que a viabilidade das células da linhagem Hela não foi afetada com diferentes exposições radiantes (1, 4, 15, 30,  $60\text{J}/\text{cm}^2$ ) em laser contínuo com 808nm.<sup>96</sup> Entretanto, um efeito

estimulatório foi observado após a irradiação com laser pulado com 905nm bem como quando a irradiação com 808nm foi associada à irradiação com 905nm.<sup>96</sup>

Interessantemente, quando a irradiação foi aplicada diariamente por três dias consecutivos, nenhum efeito foi observado na SCC9 irradiadas com 1,5J/cm<sup>2</sup> e aumento com a LUC4, adicionalmente somente a linhagem CA1 apresentou redução da viabilidade quando comparado com o controle. Já em relação ao parâmetro 6J/cm<sup>2</sup>, foi observado que nas linhagens celulares CA1 e SCC9 houve uma inibição da viabilidade celular quando avaliada por ambos ensaios, MTT e CV, sugerindo que a irradiação diária tenha um efeito negativo na viabilidade de células derivadas de CEB. Vale ressaltar que nenhum efeito positivo em relação

à irradiação diária com este parâmetro foi observado na linhagem LUC4, demonstrando que este parâmetro aplicado diariamente tem efeito inibitório ou não interfere com a viabilidade de células derivadas de CEB. Quando o efeito da FBM única ou diária foi comparada em todos os parâmetros, aquele que resultou em maior inibição da viabilidade foi o parâmetro de 6J/cm<sup>2</sup> com irradiação diária. Adicionalmente, a irradiação diária com o parâmetro 3J/cm<sup>2</sup> foi capaz de reverter o efeito bioestimulatório observado quando somente uma única irradiação foi realizada nas linhagens celulares LUC4 e SCC9.

Desta maneira, é evidente que o efeito da FBM *in vitro*, assim como *in vivo*, é extremamente dependente dos parâmetros utilizados, frequência da irradiação e tipo de célula e tecido avaliado.<sup>79</sup> Além disso, a absorção da luz por diferentes cromóforos também pode interferir diretamente na resposta celular observada frente à FBM. Adicionalmente, a FBM possui um efeito bifásico dependente tanto da dose quanto do comprimento de onda, o qual pode resultar desde um estímulo na proliferação celular quanto indução da morte celular por apoptose<sup>97</sup>, sendo ambos efeitos benéficos dependendo do contexto terapêutico. O efeito estimulatório da FBM está associado ao aumento nos níveis de ATP enquanto que o efeito inibitório está relacionado com o estresse oxidativo e elevada produção de EROs.<sup>98</sup>

Al-Watban e Andres (2012) observaram que existe uma dependência de dose da FBM em relação à proliferação celular, no qual, parâmetros entre 60-180mJ/cm<sup>2</sup> são capazes de promover a proliferação de linhagens de células tumorais enquanto que parâmetros entre 420-600mJ/cm<sup>2</sup> possuem um efeito inibitório quando a FBM foi aplicada por 3 dias consecutivos.<sup>99</sup> Na linhagem

SCC25 derivada de CEB, foi observada redução da viabilidade celular quando a mesma foi submetida a três irradiações consecutivas com laser vermelho (660nm e irradiância de 0,39 a 63,7 mW/cm<sup>2</sup>) e ainda, aumento da porcentagem de células na fase S do ciclo celular e de células positivas para Anexina V, sugerindo que no modelo *in vitro* utilizado, a FBM não teve efeito pró-tumoral.<sup>100</sup> De Castro et.al. (2005) observaram redução da viabilidade celular da linhagem KB derivada de CEB no período de 48 e 72 horas com o parâmetro dosimétrico de 4J/cm<sup>2</sup>.<sup>101</sup>

Powel et al. (2010) avaliaram o efeito da FBM com diferentes parâmetros dosimétricos (780nm, 0,5, 1, 2,3,4,10 e 12J/cm<sup>2</sup>; 830 e 904nm, 0,5, 1, 2,3,4,15 e 12J/cm<sup>2</sup>) em linhagem celular derivada de câncer de mama (MCF-7), melanoma (MDA-MB-435S) e em duas linhagens imortalizadas de célula epitelial mamária (SVCT e Bre80hhTERT). No geral, mudanças mínimas em relação à taxa de proliferação foi observada nas linhagens MDA-MB-435S e Bre80hhTERT quando as mesmas receberam uma única irradiação, independente do comprimento de onda e exposição radiante utilizada. Na linhagem SVCT assim como na linhagem tumoral MCF-7, foi observado aumento progressivo na proliferação celular à medida que a exposição radiante foi aumentando, sendo claramente observada uma correlação linear entre proliferação e exposição radiante quando as células foram submetidas a uma única irradiação. Entretanto, quando a linhagem MCF-7 foi exposta a três irradiações consecutivas com intervalos de 24h, uma diminuição significativa da proliferação celular ocorreu com os parâmetros 0,5, 4,10 e 12J/cm<sup>2</sup>.<sup>102</sup> Sroka et al. (1999) também demonstraram que células da linhagem MCF7 bem como células das linhagens U373MG (derivada de glioblastoma) e ZMK1 (derivada de CEB) apresentaram discreta diminuição da proliferação celular independente do comprimento de onda utilizado (410, 488, 630, 635, 640, 805, e 1,064nm), sendo que nenhuma diferença em relação à incorporação de BrdU foi observada.<sup>103</sup>

Desta maneira, específicos comprimentos de onda e diferentes combinações da FBM resultam em efeitos que podem ser tanto estimulatórios quanto inibitórios e até mesmo não promoverem nenhum efeito em relação à proliferação celular em linhagens celulares epiteliais normais e tumorais.

Somente um estudo na literatura avaliou o efeito *in vivo* da FBM em modelo animal de melanoma e carcinogênese oral com 4NQO utilizando os parâmetros

660 nm, 100 mW, 50 mW/cm<sup>2</sup>, 3J/cm<sup>2</sup>; 800 nm, 1 W, 200 mW/cm<sup>2</sup>; 6 J/cm<sup>2</sup> e 970 nm, 2.5 W, 200 mW/cm<sup>2</sup>, 6J/cm<sup>2</sup>, sendo que somente o primeiro parâmetro se enquadra naqueles utilizados para o tratamento da mucosite oral.<sup>81</sup> Todos os parâmetros testados foram associados com redução da progressão tumoral e somente a FBM com 970 nm foi associado com aumento do recrutamento de linfócitos e células dendríticas, redução de macrófagos com perfil M2 e organização vascular. Entretanto, vale ressaltar que neste parâmetro, a potência utilizada foi de 2,5W e o equipamento laser utilizado foi o de alta potência, com uma sonda adaptada para a realização das irradiações. Assim, apesar do evidente efeito inibitório da FBM nos modelos *in vivo* avaliados neste estudo, é possível que a elevada potência utilizada tenha contribuído para a redução tumoral e recrutamento do sistema imunológico. Ainda neste estudo, os autores destacam que apesar de terem observado um aumento do metabolismo e proliferação celular *in vitro* após a FBM, os resultados *in vivo* resultaram em inibição do crescimento do tumor, sendo os resultados *in vitro* não representativos das condições *in vivo*.

A FBM com 3 e 6J/cm<sup>2</sup> aplicada diariamente por três dias consecutivos é a que mais se aproxima da prática clínica em relação à prevenção e tratamento da mucosite oral nos pacientes com CEB. Neste estudo, estes parâmetros, os quais são utilizados na clínica, não foram capazes de aumentar a viabilidade celular e ainda, o parâmetro 6J/cm<sup>2</sup> teve um efeito inibitório em duas das três linhagens celulares derivadas de CEB. Entretanto, estudos que investiguem os mecanismos moleculares envolvidos com este efeito inibitório da FBM no CEB são necessários, assim como a realização de estudos *in vivo*, para assegurar a segurança no uso desta ferramenta no tratamento da mucosite oral em pacientes com CEB.

Em relação à autofagia, foi observado que a linhagem celular CA1 apresentou redução das UAA após 24h da FBM com 6J/cm<sup>2</sup> bem como após a irradiação diária por três dias consecutivos, fato este que foi acompanhado pela redução da viabilidade celular. Adicionalmente, na linhagem SCC9 houve redução das UAA após 24h e 72h da FBM única com 3J/cm<sup>2</sup>, estando esta diminuição associada com aumento da viabilidade celular. Apesar da UAA ser um método *in vitro* e indireto de quantificação de autofagia, é possível que a FBM diária com 6J/cm<sup>2</sup> tenha favorecido este processo. Djauid et al. (2017)

demonstraram que a PBM com 20J/cm<sup>2</sup> antes da exposição à radiação ionizante (6Gy) foi capaz de reduzir a viabilidade celular, aumentar a produção de EROs, induzir morte celular por apoptose e autofagia na linhagem celular Hela. Os autores sugerem que o estresse oxidativo causado pela FBM pode ter sido responsável pela indução da autofagia. Entretanto, estudos adicionais são necessários para entender os mecanismos moleculares pelo qual a FBM induz a autofagia nas células tumorais.<sup>94</sup>

Baseando-se nos resultados da viabilidade celular obtidos neste estudo, os parâmetros 3 e 6J/cm<sup>2</sup> utilizando irradiação diária por três dias consecutivos foram selecionados para avaliação dos efeitos da FBM nas características de CTC de linhagens celulares derivadas de CEB. Foi demonstrado que a FBM não foi capaz de promover o fenótipo tronco do CEB, após a análise das propriedades de CTC por meio de diferentes metodologias, incluindo número de colônias formadas, porcentagem de células das subpopulações CD44<sup>high</sup>/ESA<sup>high</sup>, CD44<sup>high</sup>/ESA<sup>low</sup> e CD44<sup>low</sup> e expressão do gene *OCT4*, associado com o fenótipo tronco, *SLUG*, associado com a transição epitélio-mesenquimal e dos genes *CALGRANULINA* e *INV*, ambos associados com diferenciação epitelial. Adicionalmente, foi observada redução no número de esferas formadas após a FBM com o parâmetro 6J/cm<sup>2</sup> nas linhagens LUC4 e SCC9 bem como redução na expressão de *BMI1*, embora somente a linhagem CA1 tenha mostrado redução significativa.

No CEB, Biddle et al. (2011) demonstraram que duas populações de CTC são identificadas pela expressão de CD44 e ESA, sendo o fenótipo CD44<sup>high</sup>/ESA<sup>high</sup> associado com morfologia epitelial, capacidade de auto-renovação e responsável por sustentar o crescimento tumoral e o fenótipo CD44<sup>high</sup>/ESA<sup>low</sup>, associado com uma morfologia mesenquimal e altamente migratória, sendo responsável pela invasão tecidual e desenvolvimento de metástases. Funcionalmente, a maior capacidade de formação de colônias e esferas está associada ao fenótipo CD44<sup>high</sup>/ESA<sup>high</sup> e CD44<sup>high</sup>/ESA<sup>low</sup>, respectivamente.<sup>39, 40</sup> Além da participação destas diferentes subpopulações de CTC no desenvolvimento e progressão tumoral, sabe-se que as mesmas estão associadas com maior resistência à radioterapia e quimioterapia no CEB,<sup>53</sup> sendo possivelmente as células que permanecem na mucosa oral após o

tratamento oncológico e aquelas responsáveis pelo desenvolvimento de recidivas.<sup>53</sup>

Já foi demonstrado que o tratamento de linhagens celulares de CEB com cisplatina, comumente utilizado no tratamento do CEB em combinação com a radioterapia, seleciona células com características de CTC identificadas pelo fenótipo CD44<sup>high</sup>/ALDH<sup>high</sup>, as quais apresentam maior expressão de *BMI1* e capacidade de formação de esferas tumorais<sup>52</sup>. Adicionalmente, células resistentes à cisplatina alternam em relação à expressão da proteína CD44 padrão e suas isoformas, sendo a aquisição da expressão da proteína CD44 padrão associada à indução da TEM via aumento da expressão do fator de transcrição ZEB1.<sup>104</sup>

Devido à relevância que as CTC possuem no desenvolvimento e progressão do câncer, muitos estudos apontam que o sucesso da terapia oncológica, incluindo o CEB, deve ter como foco a terapia alvo contra as CTC, aliada ao tratamento convencional.<sup>14,41-43</sup> Adicionalmente, uma estratégia terapêutica também apontada na literatura consiste na indução da diferenciação das CTC.<sup>105</sup> Neste contexto, Rodrigues et al. (2018) observaram que as linhagens celulares CA1 e LUC4 expostas ao imunoterápico Cetuximab apresentam redução da subpopulação CD44<sup>high</sup>/ESA<sup>high</sup> e concomitante aumento da população CD44<sup>low</sup>, redução na capacidade de formação de colônias e aumento da expressão dos marcadores de diferenciação epitelial Calgranulina e Involucrina, demonstrando que a diminuição da CTC com fenótipo CD44<sup>high</sup>/ESA<sup>high</sup> ocorreu devido à indução da diferenciação celular nesta subpopulação.<sup>31</sup>

Não foi encontrado na literatura estudos que avaliaram o efeito da FBM nas características de CTC no CEB. Crous et al. (2016) avaliaram o efeito da FBM única em células tronco de câncer de pulmão da linhagem A549 isoladas por meio da expressão de CD133, com as exposições radiantes de 5, 10 e 20J/cm<sup>2</sup>, 636nm e irradiância de 9,36mW/cm<sup>2</sup>. Os autores observaram um aumento da viabilidade celular por meio do ensaio de MTT após 24, 48 e 72h da irradiação.<sup>106</sup> Abrahamse et.al. (2016)<sup>107</sup> também avaliou o efeito da FBM única em CTC da linhagem celular A549 positiva para CD133 usando 5, 10, 20 e 40J/cm<sup>2</sup> e comprimentos de onda de 635, 825 e 1060. Foi observado que a FBM pode ter efeito estimulatório ou inibitório dependendo tanto da exposição

radiante quanto do comprimento de onda. Em relação ao comprimento de onda 635nm, o qual foi utilizado nesta pesquisa, 40J/cm<sup>2</sup> resultou em diminuição da viabilidade das CTC, o que foi acompanhado por aumento no número de células positivas para Anexina V. Neste estudo, o efeito bioestimulatório e bioinibitório da FBM foi dependente da exposição radiante e do comprimento de onda utilizado, estando de acordo com a lei “Arndt-Schultz”, a qual descreve que um fraco estímulo da FBM (em relação ao tempo de irradiação e dose) aumenta a atividade fisiológica, um estímulo moderado inibe a atividade a um estímulo muito intenso bloqueia a atividade fisiológica.<sup>108</sup>

Na recente revisão publicada por Kiro et al. (2018) sobre a FBM em CTC de pulmão e câncer cervical, os autores sugerem, baseando-se nos estudos acima, que a FBM com elevada exposição radiante pode representar uma ferramenta contra as CTC. Sugerem ainda que apesar dos mecanismos envolvidos com o efeito inibitório da FBM não serem ainda conhecidos, possivelmente, o excesso de produção de EROs incluindo oxigênio singlete e radicais hidroxila em decorrência da exposição prolongada à FBM e conseqüentemente, da incapacidade dos sistemas antioxidantes das CTC em eliminarem as EROS, devem ser considerados como um dos mecanismos responsáveis por induzir apoptose das CTC.<sup>109</sup>

Com base nos resultados apresentados nesta pesquisa, foi observado que a FBM diária com os parâmetros 3J/cm<sup>2</sup> e 6J/cm<sup>2</sup>, utilizados para profilaxia e tratamento da mucosite oral, respectivamente não promoveram o aumento da viabilidade celular nem foram capazes de aumentar as subpopulações CD44<sup>high</sup>/ESA<sup>high</sup> e CD44<sup>high</sup>/ESA<sup>low</sup> nas linhagens de CEB, bem como a formação de colônias, esferas e expressão de genes associados com o fenótipo tronco. Embora mais estudos sejam necessários para avaliar os efeitos moleculares da FBM nas CTC e ainda, levando em consideração as limitações de um estudo *in vitro*, os parâmetros de 3J/cm<sup>2</sup> e 6J/cm<sup>2</sup> e nas condições utilizadas neste estudo não foram capazes de favorecer a viabilidade das células derivadas de CEB nem tampouco promoveu a expansão das populações de CTC.

## 6. CONCLUSÕES

Baseando-se nos resultados, podemos concluir que:

- O efeito da FBM na viabilidade das linhagens celulares CA1, LUC4 e SCC9 foi variado e dependente da frequência da irradiação e da exposição radiante utilizada. Efeito inibitório na viabilidade celular foi observado quando as células foram submetidas à FBM diária por três dias consecutivos com 6J/cm<sup>2</sup>.
- As células da linhagem CA1 irradiadas por três dias consecutivos com 6J/cm<sup>2</sup> apresentaram aumento nas AAU. Porém, na linhagem SCC9 irradiada uma única vez com 3J/cm<sup>2</sup>, foi observada redução nas AAU. Portanto, o efeito da FBM, avaliado indiretamente, da autofagia foi dependente da frequência da irradiação e da exposição radiante utilizada.
- A FBM diária por três dias consecutivos nos parâmetros 3 e 6J/cm<sup>2</sup> não alterou a capacidade de formação de colônias e esferas das linhagens celulares CA1, LUC4 e SCC9.
- A FBM diária por três dias consecutivos nos parâmetros 3 e 6J/cm<sup>2</sup> não foi capaz de promover alteração nas subpopulações CD44<sup>high</sup>/ESA<sup>high</sup> e CD44<sup>high</sup>/ESA<sup>low</sup> das linhagens celulares CA1, LUC4 e SCC9.
- A FBM diária por três dias consecutivos nos parâmetros 3 e 6J/cm<sup>2</sup> não modulou a expressão dos genes *OCT4*, *SLUG*, *INV* e *CALGRANULINA* nas linhagens celulares CA1, LUC4 e SCC9. Somente a linhagem CA1 apresentou diminuição na expressão do gene *BMI1* após irradiação com 6J/cm<sup>2</sup>.
- Nas condições experimentais utilizadas neste estudo *in vitro* foi observado que a FBM com parâmetros usados para a prevenção e tratamento da mucosite oral, com irradiação diária, condição esta que mais se aproxima da prática clínica, não foi capaz de aumentar a viabilidade das células tumorais nem favorecer o fenótipo tronco.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A; Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. 2018, *CA Cancer J Clin*. Disponível em: (doi: 10.3322/caac.21492.)
2. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2018. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/estimativa-2018.pdf>
3. Rivera C. Essentials of oral câncer 2015 *Int J. Clin Exp Pathol*. 8 11884-11894
4. Markopoulos AK. Current Aspects on Oral Squamous Cell Carcinoma. 2012 *Open Dent J*. Vol 6: 126–130.
5. De Sanctis, et al. Mucositis in head and neck cancer patients treated with radiotherapy and systemic therapies: Literature review and consensus statements. 2016 *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 100, p. 147–166
6. de Vicente JC, Rodríguez-Santamarta T, Rosado P, Peña I, de Villalaín L. Survival after free flap reconstruction in patients with advanced oral squamous cell carcinoma. 2012 *J Oral Maxillofac Surg*. (2):453-9
7. Rogers SN; Brown JS; Woolgar JA; Lowe D; Magennis P; et.al. Survival following primary surgery for oral cancer. 2009 *Oral Oncol*. 45:201-211
8. Scully C, Bagan J. Oral squamous cell carcinoma: overview of current understanding of aetiopathogenesis and clinical implications. 2009 *Oral Dis*. (6):388-99
9. Grégoire V; Lefebvre J.L; Licitra L; Felip E. Squamous cell carcinoma of the head and neck: EHNS–ESMO–ESTRO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. 2010 *Annals of Oncology*, (5)184–186
10. Vermorken J.B.; Mesia R; Rivera F; Remenar E. Platinum-Based Chemotherapy plus Cetuximab in Head and Neck Cancer. 2008 *N Engl J Med*. 359:1116-1127
11. Vermorken J.B; Specenier P. Optimal treatment for recurrent/metastatic head and neck. 2010 *Annals of Oncology* 7:252–261
12. Sonis ST et al Perspectives on cancer therapy-induced mucosal injury: pathogenesis, measurement, epidemiology, and consequences for patients. 2004 *Cancer* 100:1995-2025
13. Epstein J.B. et.al. Oral complications of cancer and cancer therapy: from cancer treatment to survivorship. 2012 *CA Cancer J Clin*. 62:400-22.
14. Beck B, Blanpain C. Unravelling cancer stem cell potential. 2013 *Nat Rev Cancer*. (10):727-38
15. Rodini CO, Lopes NM, Lara VS, Mackenzie IC. Oral câncer stem cells – properties and consequences. 2017 *Appl Oral Sci*. (6) 708-715
16. Falzacappa M.V., Ronchini C., Reavie, L. B. and Pelicci, P. G Regulation of self-renewal in normal and cancer stem cells. 2012 *FEBS Journal* 279 3559–3572
17. Shah A, Patel S, Pathak J, Swain N, Kumar S. The Evolving Concepts of Cancer Stem Cells in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma 2014 *Scientific World Journal Vol* 2014 8424-8
18. Nassar D, Blanpain C Cancer Stem Cells: Basic Concepts and Therapeutic Implications. 2016 *Annu Rev Pathol*. 23;11:47-76
19. Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. 1997 *Nat Med*. (7):730-737
20. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells 2003 *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100(7):3983-8
21. Wang J, Li ZH, White J, Zhang LB. Lung cancer stem cells and implications for future therapeutics. 2014 *Cell Biochem Biophys*.(3):389-9
22. Ahmed N, Abubaker K, Findlay JK. Ovarian cancer stem cells: Molecular concepts and relevance as therapeutic targets. 2014 *Mol Aspects Med*. 39:110-25

23. Prince ME, Sivanandan R, Kaczorowski A, Wolf GT, Kaplan MJ, et.al. Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. 2007. PNAS (3):973-978
24. Sahlberg SH; Spiegelberg D; Glimelius B; Stenerlöv B; Nestor M. Evaluation of Cancer Stem Cell Markers CD133, CD44, CD24: Association with AKT Isoforms and Radiation Resistance in Colon Cancer Cells. 2014 PLoS One. (4): e94621.
25. Lupatov Y; A. M. Gisina; P. A. Karalkin; K. N. Yarygin. Identification of "side population" associated with cancer stem cells by flow cytometry with violet laser 2013 Biomed Khim. (3):339-348
26. Bourguignon, LYW, Zhu D, Zhu H: CD44 isoform-cytoskeleton interaction in oncogenic signaling and tumor progression. 1998 Frontiers in Bioscience, 3, d637-649
27. Emich H, Chapiro D, Hutchison I, Mackenzie I. The potential of CD44 as a diagnostic and prognostic tool in oral cancer. 2015 J Oral Pathol Med. (6):393-400.
28. Wang SJ, Wong G, de Heer AM, Xia W, Bourguignon LY CD44 variant isoforms in head and neck squamous cell carcinoma progression. 2009 Laryngoscope. 119:1518-30
29. Wang SJ, Bourguignon LY. Hyaluronan and the interaction between CD44 and epidermal growth factor receptor in oncogenic signaling and chemotherapy resistance in head and neck cancer. 2006 Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 132:771-8.
30. Andrade NP, et al. Cancer stem cell, cytokeratins and epithelial to mesenchymal transition markers expression in oral squamous cell carcinoma derived from orthotopic xenotransplantation of CD44high cells. 2017 Pathol Res Pract. 213:235-244.
31. Rodrigues MFSD, et al. GLI3 knockdown decreases stemness, cell proliferation and invasion in oral squamous cell carcinoma. 2018 Int J Oncol. 53: 2458-2472
32. Boxberg M, et al. Immunohistochemical expression of CD44 in oral squamous cell carcinoma in relation to histomorphological parameters and clinicopathological factors. 2018 Histopathology. 73:559-572.
33. Rodrigues, MFSR. et al. Prognostic implications of CD44, NANOG, OCT4, and BMI1 expression in tongue squamous cell carcinoma. 2018 Head Neck. 40:1759-1773.
34. Went TH, et al. Frequent EpCAM protein expression in human carcinomas. 2004 Hum Pathol. 35(1):122-8.
35. Ng VY, Ang SN et al. Characterization of epithelial cell adhesion molecules as a surface. 2010 Stem Cells. 28(1):29-35.
36. Bauerle et al EpCAM (CD326) findings its role in cancer. Br J Cancer. 2007 96:417-23
37. Kuechlin S, et al. EpCAM controls morphogenetic programs during zebrafish pronephros development. 2017 Biochem Biophys Res Commun. 27:209-215.
38. Imrich S, et al. EpcAM and its potential role in tumor initiating cells. 2012 Cell Adh Migr 6:30-8.
39. Biddle A, Liang X, Gammon L, Fazil B, Harper LJ. Cancer Stem Cells in Squamous Cell Carcinoma Switch between Two Distinct Phenotypes That Are Preferentially Migratory or Proliferative 2011. Cancer Res; (15); 5317–26
40. Harper LJ, Piper K, Common J, Fortune F, Mackenzie IC. Stem Cell patterns in cell lines derived from head and neck squamous cell carcinoma. 2007 J. Oral. Pathol. Med, 35: 591-603
41. Chiou SH, Yu CC, Huang CY, Lin SC, Liu CJ, et.al. Positive correlations of Oct-4 and Nanog in oral cancer stem-like cells and high-grade oral squamous cell carcinoma. 2008. Clin Cancer Res. 13:4085-95
42. Fu TY, Hsieh IC, Cheng JT, Tsai MH, Hou YY, et.al Association of OCT4, SOX2, and NANOG expression with oral squamous cell carcinoma progression. 2016. J Oral Pathol Med. 45: 89–95

43. Lim YC, Oh SY, Cha YY, Kim SH, Jin X, Kim H. Cancer stem cell traits in squamouspheres derived from primary head and neck squamous cell carcinomas. 2011. *Oral Oncol.* 47:83-91
44. Siddique RH, Saleem M. Role of BMI1, a Stem Cell Factor, in Cancer Recurrence and Chemoresistance: 2012 Preclinical and Clinical Evidences *STEM CELLS* 30:372-8
45. Hayry V, Maˆkinen LK, Atula T, Sariola H, Makitie A et.al. Bmi-1 expression predicts prognosis in squamous cell carcinoma of the tongue. 2010 *British Journal of Cancer* 102, 892–897.
46. Babaie Y, et.al. Analysis of Oct4-Dependent Transcriptional Networks Regulating Self-Renewal and Pluripotency in Human Embryonic Stem Cells 2006 *Stem Cells* Vol 25
47. Chiou SH, Yu CC, Huang CY, Lin SC, Liu CJ, et.al. Positive correlations of Oct-4 and Nanog in oral cancer stem-like cells and high-grade oral squamous cell carcinoma. 2008. *Clin Cancer Res.* 13:4085-95
48. Huang CF, Xu XR, Wu TF, Sun ZJ, Zhang WF Correlation of ALDH1 CD44 OCT4 and SOX2 in tongue squamous cell carcinoma and their association with disease progression and prognosis 2014 *Jo. Oral. Pathol. Med.* Vol 43
49. Kim JK, Jeon HY, Kim H. The molecular mechanisms underlying the therapeutic resistance of cancer stem cells. 2015 *Arch. Pharm. Res.* (3):389-401.
50. Torres M R, Allan A L. Aldehyde dehydrogenase as a marker and functional mediator of metastasis in solid tumors. 2016 *Clin Exp Metastasis.* 33: 97–113
51. Zhao J. Cancer Stem Cells and Chemoresistance: The Smartest Survives the Raid. 2016 *Pharmacol Ther.* 160: 145–158
52. Nr C, Zhang Z, Warner KA, Bernardi L, Visioli F, et.al Cisplatin Induces Bmi-1 and Enhances the Stem Cell Fraction in Head and Neck Cancer. 2014 *Neoplasia J.* (2): 137–146
53. Gemenetzidis E, et al. Invasive oral cancer stem cells display resistance to ionising radiation. 2015 *Oncotarget.* 6:43964-77.
54. Lalla RV et al. MASCC/ISOO clinical practice guidelines for the management of mucositis secondary to cancer therapy: MASCC/ISOO Mucositis Guidelines. 2014 *Cancer* 120:1453–1461.
55. Moslemi D, et al. Management of chemo/radiation-induced oral mucositis in patients with head and neck cancer: A review of the current literature. 2016 *Radiotherapy and Oncology* 120:13–20.
56. Sonis ST. Mucositis: The impact, biology and therapeutic opportunities of oral mucositis. *Oral Oncol.* 2009 Dec;45(12):1015-20.
57. Sonis ST. Oral mucositis in head and neck cancer: risk, biology, and management. *Am Soc Clin Oncol Educ Book.* 2013. doi: 10.1200/EdBook\_AM.2013.33.e236
58. Cohen E.W., Lingen M.W, Vokes E.E. The Expanding Role of Systemic Therapy in Head and Neck Cancer. 2004 *J Clin Oncol.* 22:1743-1752
59. 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 2012 *oncology* 24 363-370
60. Zecha JAEM et.al. Low-level laser therapy photobiomodulation in the management of side effects of chemoradiation therapy in head and neck cancer part 2 proposed applications and treatment protocols. 2016 *Support Care Cancer* 24:2793:2805
61. Bjordal JM, Bensadoun RJ, Tuner J, Frigo L, Gjerde K, Martins RABL. A systematic review with meta analysis of the effect of low level laser therapy III in cancer therapy-induced oral mucositis 2011 *Support Care Cancer* 19:1069-1077
62. Lanzafame R.J. Photobiomodulation, Tissue Effects and Bystanders 2011 *Photomedicine and Laser Surg.* 28:1-2

63. Hamblin MR. Introduction to Experimental and Clinical Studies Using Low-Level Laser (Light) Therapy (LLLT) 2010 *Lasers Surg Med* 42:447-449
64. Smith KC. The photobiological basis of low level laser radiation therapy. 1991 *Laser Rher.* 3:19-24
65. Karu T. Cellular and Molecular Mechanisms of Photobiomodulation (Low-Power Laser Therapy) 2014 *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*
66. Ribeiro BG, Alves AN, Santos LAD, Cantero TM, Fernandes KPS, et.al. Red and Infrared Low-Level Laser Therapy Prior to Injury with or without Administration after Injury Modulate Oxidative Stress during the Muscle Repair Process. 2016 *PLoS One*.11:e0153618
67. Sperandio FF, Simões A, Corrêa L, Aranha AC, Giudice FS, et.al. Low-level laser irradiation promotes the proliferation and maturation of keratinocytes during epithelial wound repair. 2015 *J Biophotonics.* 8:795-803
68. Vigaros E. Oral mucosal changes induced by anticancer targeted therapies and immune checkpoint inhibitors 2017 *Support Care Cancer* 25:1713-1739
69. Sperandio FF, Giudice FS, Corrêa L, Pinto DS Jr, Hamblin MR, et.al. Low-level laser therapy can produce increased aggressiveness of dysplastic and oral cancer cell lines by modulation of Akt/ mTOR signaling pathway 2013. *J Biophotonics.* 6: 839–847
70. Gupta A et.al. Superpulsed (Ga-As, 904nm) low-level laser therapy (LLLT) attenuates inflammatory response and enhances healing of burn wounds. 2014 *J. Biophotonics* 6:489-501
71. Chaves MEA, Araújo AR, Piancastelli ACC, Pinotti M. Effects of low-power light therapy on wound healing: LASER x LED. 2014 *An Bras Dermatol.* 89: 616–623.
72. Bensadoun RJ. Photobiomodulation or low-level laser therapy in the management of cancer therapy-induced mucositis, dermatitis and lymphedema. *Curr Opin Oncol.* 2018 Jul;30(4):226-232.
73. Elad S, et al. Photobiomodulation therapy in the management of oral mucositis: search for the optimal clinical treatment parameters. *Support Care Cancer.* 2018 May 22. doi: 10.1007/s00520-018-4262-6
74. Zanin T, et al. Use of 660-nm diode laser in the prevention and treatment of human oral mucositis induced by radiotherapy and chemotherapy. *Photomedicine and Laser Surgery.* *Photomed Laser Surg.* 2010 Apr;28(2):233-7.
75. Gautam AP, et al. Low level laser therapy for concurrent chemoradiotherapy induced oral mucositis in head and neck cancer patients - a triple blinded randomized controlled trial. *Radiother Oncol.* 2012 Sep;104(3):349-54.
76. Antunes HS, et al. 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.
77. Antunes HS, Herchenhorn D, Small IA, Araújo CMM, Viégas CMP et.al. Long-term survival of a randomized phase III trial of head and neck cancer patients receiving concurrent chemoradiation therapy with or without low-level laser therapy (LLLT) to prevent oral mucositis. 2017. *Oral Oncol.* 71:11-15.
78. Carvalho PA, Jaguar GC, Pellizzon AC, Prado JD, Lopes RN, Alves FA. Evaluation of low-level laser therapy in the prevention and treatment of radiation-induced mucositis: a double-blind randomized study in head and neck cancer patients. 2011 *Oral Oncol.* 47:1176-81.
79. Sonis ST, Hashemi S, Epstein JB, Nair RG, Raber-Durlacher JE. Could the biological robustness of low level laser therapy (Photobiomodulation) impact its use in management of mucositis in head and neck cancer patients. 2016 *Oral Oncol.* 54:7-14
80. Henriques ACG et.al. Low-level laser therapy promotes proliferation and invasion of oral squamous cell carcinoma cells. 2014 *Lasers Med Sci.* 29:1385-1395

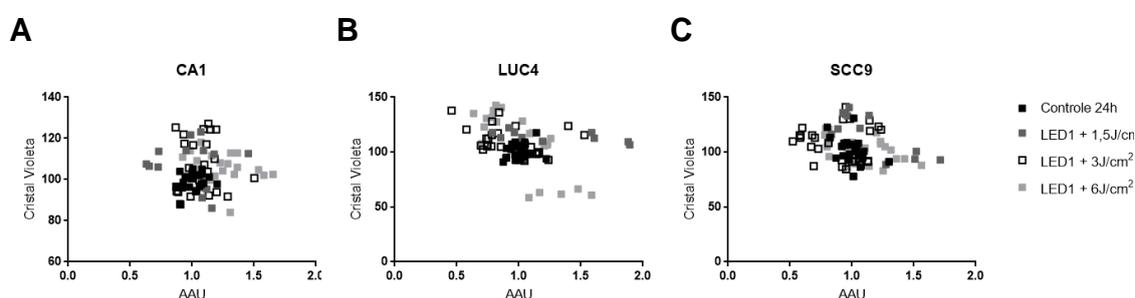
81. Ottaviani G, Martinelli V, Rupel K, Caronni N, Naseem A, et.al. Laser Therapy Inhibits Tumor Growth in Mice by Promoting Immune Surveillance and Vessel Normalization 2016 *EBioMedicine*. 11: 165–172
82. Schalch DT, Fernandes KPS, Rodrigues JC, Garcia PM, Mesquita-Ferrari AR, et.al. Photomodulation of the osteoclastogenic potential of oral squamous carcinoma cells 2016 *J. Biophotonics* 9:1136–1147
83. Schalch DT et.al. Photobiomodulation is associated with a decrease in cell viability and migration in oral squamous cell carcinoma. 2018 *Lasers in Medical Science* epub doi: 10.1007/s10103-018-2640-4.
84. Mackenzie IC Growth of malignant oral epithelial stem cells after seeding into organotypical cultures of normal mucosa. 2004 *J Oral Pathol Med*. 33:71-8
85. Silva DF, Mesquita-Ferrari RA, Fernandes KP, Raele MP, Wetter NU, Deana AM. Effective transmission of light for media culture, plates and tubes. *Photochem Photobiol*. 2012 Sep-Oct;88(5):1211-6
86. Mossmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. 1983 *J Immunol Methods* 16:55-63
87. Repetto G, del Peso A, Zurita JL. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. 2008 *Nat Protoc* doi: 10.1038/nprot.2008.75
88. Feoktistova M, Geserick P, Levekus M. Crystal Violet Assay for Determining Viability of Cultured Cells. 2016 *Cold Spring Harb Protoc*. doi: 10.1101/pdb.prot087379.
89. Martins WK, Severino D, Souza C, Stolf BS, Baptista MS. Rapid screening of potential autophagic inductor agents using mammalian cell lines. 2013 *Biotechnol*. 8:730-737
90. Marshall NJ, Goodwin CJ, Holt SJ. A critical assessment of the use of microculture tetrazolium assays to measure cell growth and function. 1995 *Growth regul*. 5:69-84
91. Passarella S, Karu T. Absorption of monochromatic and narrow band radiation in the visible and near IR by both mitochondrial and non-mitochondrial photoacceptors results in photobiomodulation. 2014 *J Photochem Photobiol B*. 140:344-58
92. Wang S, Yu H, Wickliffe JK Limitation of the MTT and XTT assays for measuring cell viability due to superoxide formation induced by nano-scale TiO<sub>2</sub>. 2011 *Toxicol In Vitro* 25:2147-2151
93. Bamps M, Dok R, Nuyts S. Low-Level Laser Therapy Stimulates Proliferation in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Cells. 2018 *Front Oncol*. Epub doi: 10.3389/fonc.2018.00343
94. Djavaid GE, Bigdeli B, Goliaei B, Nikoofar A, Hamblin MR Photobiomodulation leads to enhanced radiosensitivity through induction of apoptosis and autophagy in human cervical cancer cells. *J Biophotonics*. 2017 10:1732-1742.
95. Werkeck CE, et.al. Laser Light Is Capable of Inducing Proliferation of Carcinoma Cells in Culture: A Spectroscopic in Vitro Study 2005 *Photomedicine and Laser Surgery* 23:300-3003
96. Mognato M. Cell Growth Modulation of Human Cells Irradiated in Vitro with Low-Level Laser Therapy *Photomedicine and Laser Surgery* 2004 *Photomed Laser Surg*. 2004 22:523-6.
97. Hamblin MR, Demidova, TN "Mechanisms of low level light therapy" 2006 *Proc. SPIE* 6140 doi: 10.1117/12.646294
98. Kim HP Lightening up Light Therapy: Activation of Retrograde Signaling Pathway by Photobiomodulation 2014 *Biomol Ther* 22: 491–496.
99. Al-Watban FA, Andres BL. Laser biomodulation of normal and neoplastic cells. 2012 *Lasers Med Sci*. 27:1039-43.
100. Schattinger VH. Differential responses of fibroblasts, non-neoplastic epithelial cells, and oral carcinoma cells to low-level laser therapy 2012 *Supportive Care in Cancer* 20:523–529

101. De Castro JLF et.al. The Effect of Laser Therapy on the Proliferation of Oral KB Carcinoma Cells: An in Vitro Study. 2005 *Photomed Laser Surg* 23:586-9
102. Powell K, Low P, McDonnell PA, Laakso EL, Ralph SJ. The effect of laser irradiation on proliferation of human breast carcinoma, melanoma, and immortalized mammary epithelial cells. 2010 *Photomed Laser Surg*. 28:115-23
103. Sroka R et.al. Effects on the mitosis of normal and tumor cells induced by light treatment of different wavelengths. 1999 *Lasers Surg Med*. 25:263-71
104. Miyazaki H. et.al. CD44 exerts a functional role during EMT induction in cisplatin-resistant head and neck cancer cells 2018 *Oncotarget*. 9:10029–10041
105. Pattabiraman DR, Weinberg RA Targeting the Epithelial-to-Mesenchymal Transition: The Case for Differentiation-Based Therapy. 2016 *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 81:11-19.
106. Crous A, Abrahamse H. Low-Intensity Laser Irradiation at 636 nm Induces Increased Viability and Proliferation in Isolated Lung Cancer Stem Cells 2016 *Photomed Laser Surg* 34:525-532
107. Abrahamse H, Crous A. Biochemical Responses of Isolated Lung CSCs After Application of Low Intensity Laser Irradiation 2016 *Proc. SPIE* 9695 doi: 10.1117/12.2228902
108. Huang YY, Chen ACH, Carroll JD, Hamblin MR. Biphasic Dose Response in Low Level Light Therapy. 2009 *Dose Response* 7:358-383
109. Kiro NE, Hamblin MR, Abrahamse H. Photobiomodulation of breast and cervical cancer stem cells using low-intensity laser irradiation. 2017 *Tumour Biol*. 2017 39:10104283

## ANEXOS

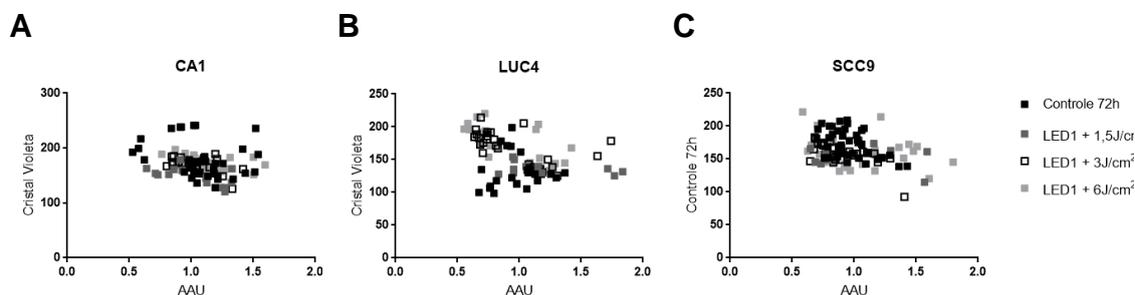
## ANEXO I: Correlação entre os valores de UAA e viabilidade por CV.

Em relação à viabilidade celular pelo cálculo de UAA, após 24 horas, foi possível correlacionar morte celular por autofagia nos grupos LED1+3J/cm<sup>2</sup> e LED1+6J/cm<sup>2</sup> para a linhagem LUC4 ( $p < 0,05$ ,  $r = -0,41$  e  $p = 0,0004$ ,  $r = 0,64$ ), com os grupos LED1+1,5J/cm<sup>2</sup> e 6J/cm<sup>2</sup> para a linhagem SCC9 ( $p < 0,05$ ,  $r = -0,75$  e  $p < 0,05$ ,  $r = -0,46$ ), não foi possível correlacionar autofagia com os demais grupos.



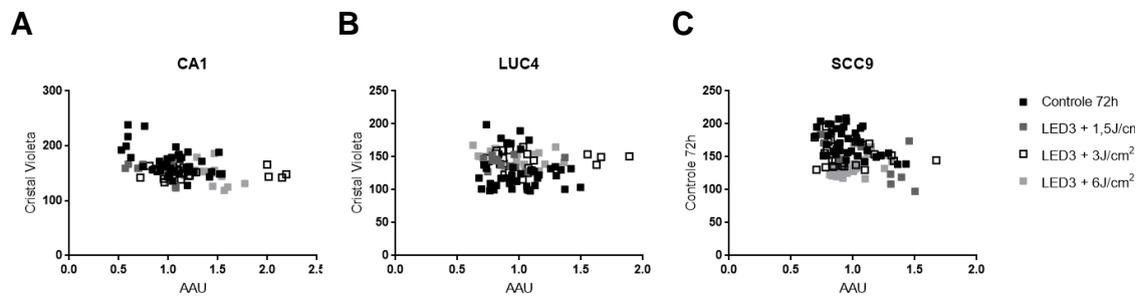
**Figura:** Distribuição da correlação dos valores obtidos pelo cálculo de AAU nos grupos Controle, LED1+1,5J/cm<sup>2</sup>, LED1+3J/cm<sup>2</sup> e LED1+6J/cm<sup>2</sup> em relação à taxa de sobrevivência respectiva aos valores obtidos no ensaio de Cristal Violeta nas linhagens celulares CA1 (A), LUC4 (B) e SCC9 (C) após 24h da irradiação. (Correlação de Spearman)

Após 72 horas, foi possível correlacionar morte celular por autofagia nos grupos LED1+3J/cm<sup>2</sup> e LED1+6J/cm<sup>2</sup> para a linhagem CA1 ( $p < 0,05$ ,  $r = -0,45$  e  $p < 0,05$ ,  $r = -0,52$ ) LUC4 ( $p < 0,0001$ ,  $r = -0,69$  e  $r = -0,72$ ), para a linhagem SCC9 foi correlacionado no grupo LED1+3J/cm<sup>2</sup> ( $p < 0,05$ ,  $r = -0,55$ ).



**Figura:** Distribuição da correlação dos valores obtidos pelo cálculo de AAU nos grupos Controle, LED1+1,5J/cm<sup>2</sup>, LED1+3J/cm<sup>2</sup> e LED1+6J/cm<sup>2</sup> em relação à taxa de sobrevivência respectiva aos valores obtidos no ensaio de Cristal Violeta nas linhagens celulares CA1 (A), LUC4 (B) e SCC9 (C) após 72h da irradiação. (Correlação de Spearman)

Após 72 horas das irradiações, para as linhagens CA1 e LUC4 não foi possível correlacionar a morte celular com autofagia nos grupos, para a linhagem SCC9 foi possível correlacionar positivamente a morte celular por autofagia no grupo LED3+6J/cm<sup>2</sup> ( $p=0,0005$ ,  $r=0,64$ )



**Figura:** Distribuição da correlação dos valores obtidos pelo cálculo de AAU nos grupos Controle, LED3+1,5J/cm<sup>2</sup>, LED3+3J/cm<sup>2</sup> e LED3+6J/cm<sup>2</sup> em relação à taxa de sobrevivência respectiva aos valores obtidos no ensaio de Cristal Violeta nas linhagens celulares CA1 (A), LUC4 (B) e SCC9 (C) após 72h da irradiação. (Correlação de Spearman)

**MEMBROS DA BANCA AVALIADORA**