

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

ANGELA CRISTINA MOLON

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE LIGANTES DE CÉLULAS NATURAL KILLER
EM LINHAGENS CELULARES DERIVADAS DE CARCINOMA
EPIDERMÓIDE ORAL SUBMETIDAS À TERAPIA FOTODINÂMICA**

São Paulo, SP

2021

ANGELA CRISTINA MOLON

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE LIGANTES DE CÉLULAS NATURAL KILLER
EM LINHAGENS CELULARES DERIVADAS DE CARCINOMA
EPIDERMÓIDE ORAL SUBMETIDAS À TERAPIA FOTODINÂMICA**

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

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

**São Paulo, SP
2021**

Molon, Angela Cristina.

Análise da expressão de ligantes de células natural killer em linhagens celulares derivadas de carcinoma epidermóide oral submetidas à terapia fotodinâmica. / Angela Cristina Molon. 2021. 60 f.

Dissertação (Mestrado) -Programa de Biofotônica Aplicada às Ciências da Saúde- Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2021.

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

1. Carcinoma epidermóide oral. 2. Terapia fotodinâmica. 3. 5-ALA. 4. Células natural killer. 5. NKG2DL.

I. Rodrigues, Maria Fernanda Setúbal Destro.

II. Título.

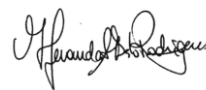
São Paulo, 28 de junho de 2021.

TERMO DE APROVAÇÃO

Aluno (a): Angela Cristina Molon

Título da Dissertação: “Análise da expressão de ligantes de células natural killer em linhagens celulares derivadas de carcinoma epidermóide oral submetidas à terapia fotodinâmica”.

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



Membro: PROF^a. DR^a. ADRIANA LINO DOS SANTOS FRANCO



Membro: PROF^a DR^a. MARIA STELLA NUNES ARAÚJO MOREIRA



AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, **Amon e Helena** e avós, **Adhemar e Ana**, por tudo que fizeram e fazem por mim, pelo incentivo e apoio na minha vida profissional e pessoal. Em especial ao meu pai e avó que são as pessoas mais presentes e sem eles provavelmente eu não teria chegado até aqui. Aos amores da minha vida, meus irmãos, **Andreia, Aron, Amanda, Adhemar, Amon e Arthur**, por toda ajuda tanto em tarefas quanto em me ouvir nos dias que eu precisei, sem eles nada faria sentido.

Aos meus queridos amigos e ao meu cunhado, **Andrei**, que me apoiaram e estiveram ao meu lado comemorando cada conquista e me ajudando nos momentos difíceis durante esse período, inclusive no desenvolvimento do trabalho. Todo tem um lugar especial e uma contribuição para realização desse trabalho.

Aos meus colegas de laboratório, tanto da Uninove quanto da FOUSP por toda ajuda em experimentos e pela convivência nos dias trabalhados.

À minha querida professora e orientadora **Dr^a Maria Fernanda Setúbal Destro Rodrigues**, não só por me orientar como aluna de mestrado, mas por toda ajuda que a senhora me deu durante esse período, pelo crescimento pessoal e profissional que me proporcionou. Não tenho palavras para descrever quão grata eu sou por tudo que a senhora fez e faz por mim. Não imagino pessoa melhor para ter vivenciado o mestrado. Muito obrigada por tudo!!

As professoras **Dr. ^{as} Kristianne Porta Santos Fernandes, Tatiana Dias Schalch e Katia Llanos do Vale**, por todo incentivo e exemplo durante a graduação e a iniciação científica. Sem vocês eu não saberia a existência de todas as oportunidades que eu tive até aqui! Deixo registrada toda minha admiração e carinho.

À **UNINOVE** pela bolsa de estudos e suporte necessário e, todos os seus integrantes, **professores, pesquisadores e funcionários** que contribuíram para a agregação de conhecimento adquirida até aqui. Meu muito obrigada!

Ao professor **Dr. Fabio Daumas Nunes**, do departamento de Patologia Bucal da **Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP)** pela colaboração para realização dos experimentos desse trabalho.

À **CAPES** pela concessão da bolsa durante todo o período do mestrado.

RESUMO

A neoplasia mais comum na cavidade oral é o Carcinoma Epidermóide Oral (CEO). O diagnóstico geralmente é tardio e o tratamento consiste em cirurgia associada a radioterapia e/ou quimioterapia. A terapia fotodinâmica (TFD) ocorre pela interação da luz com um fotossensibilizador (Fs), originando espécies reativas de oxigênio (ERO). A 5-ALA-TFD é uma técnica minimamente invasiva, preserva a integridade funcional e anatômica, possui poucos efeitos colaterais, é seletiva para as células tumorais e possui baixa toxicidade, o que favorece a utilização de múltiplos ciclos. Estudos já demonstraram que a TFD é capaz de modular a resposta imune, embora não se conheça o efeito da mesma na modulação de ligantes para ativação das células NK, importantes na resposta imune anti-tumoral. Desta maneira, o objetivo desse estudo foi analisar *in vitro* o efeito da TFD na viabilidade de linhagens celulares derivadas de CEO (ca1 e Luc4) bem como na expressão gênica de ligantes das células *Natural Killer* e na expressão proteica de HLA-ABC. Adicionalmente, o efeito do meio condicionado da linhagem Luc4 na expressão dos receptores NKG2D, Nkp30, Nkp44 e NKp46 da linhagem NK92-MI foi também avaliado. Para isso, foram realizados ensaios de viabilidade por Cristal Violeta e Alamar blue, análise da expressão genica dos genes *ULBP1-4* e *MICA/B* por RT-qPCR após 3h, 12h e 24h do tratamento e análise da expressão de HLA-ABC, NKp30, NKp44, NKp46 e NKG2D por citometria de fluxo. Os resultados demonstram uma diminuição na viabilidade celular no grupo TFD em ambas as linhagens; os dados da expressão gênica demonstraram que apenas o gene *ULBP1* aumentou após a TFD na linhagem Ca1 e houve redução na expressão das *ULBPs* avaliadas no grupo TFD após 12 e 24h. Por outro lado, houve aumento da expressão de *ULBP1*, *ULBP3* e *ULBP4* no grupo 5-ALA no período 12h bem como de *MICA/B* nos períodos de 3h e 24h e o tratamento com LED aumentou a expressão de todos os genes avaliados após 24h do tratamento. Na linhagem Luc4, a TFD aumentou a expressão dos genes *ULBP1*, *ULBP3*, *ULBP4* nos períodos 3h e 12h e *MICA/B* no grupo 5-ALA e LED após 12h e 24h do tratamento, respectivamente bem como de *ULBP1* após 12h do tratamento. No geral, foi observada uma redução na expressão das *ULPBs* avaliadas após 24h da TFD; na avaliação da expressão de HLA-ABC houve uma diminuição na linhagem Ca1 do grupo TFD quando comparado ao grupo Controle e na linhagem Luc4 não houve diferença significativamente estatística e, após 24h de cultivo no meio condicionado da linhagem Luc4 houve uma diminuição na porcentagem de células na expressão de NKG2D, NKp30, NKp44 e NKp46 no grupo TFD em relação ao grupo Controle. Com isso, pode-se concluir que a TFD modula a expressão de ligantes de ativação para células NK.

Palavras-chave: Carcinoma epidermóide oral, terapia fotodinâmica, 5-ALA, células *Natural Killer*, NKG2DL

ABSTRACT

The most common neoplasm in the oral cavity is the Oral Epidermoid Carcinoma (OEC). Diagnosis is usually late, and treatment is associated with radiotherapy and/or chemotherapy. Photodynamic therapy (PDT) occurs through the interaction of light with a photosensitizer (Ps), originating reactive oxygen species (ROS). A minimally invasive technique is the 5-ALA-PDT. It preserves functional and anatomical integrity, has few side effects, is selective for tumor cells, and has low toxicity, which favors the use of multiple cycles. Studies have already shown that a PDT is capable of modulating an immune response. Although its effect on the modulation of ligands for the activation of NK cells is not known, which are important in the antitumor immune response. Thus, this study aimed to analyze, *in vitro*, the effect of PDT on the viability of OEC-derived cell lines (ca1 and Luc4) as well as on the gene expression of Natural Killer cell ligands and the protein expression of HLA-ABC. Additionally, it was also evaluated the effect of the conditioned environment from the Luc4 cell line, on the expressions of NKG2D, Nkp30, Nkp44, as well as the NKp46 receptors from the NK92-M1 cell line. For that, viability tests were performed by Cristal Violeta and Alamar blue. It was analyzed the gene expression of the *ULBP1-4* and *MICA/B* genes by RT-qPCR after 3, 12, and 24 hours of treatment, as well as the expression of HLA-ABC, Nkp30, Nkp44, NKp46, and NKG2D by flow cytometry. The results demonstrate a decrease in cell viability in the PDT group in both lines. The gene expression data showed that only the *ULBP1* gene increased after PDT in the Ca1 lineage and there was a reduction in the expression of *ULBPs* evaluated in the PDT group after 12 and 24 hours. On the other hand, there was an increase in the expression of *ULBP1*, *ULBP3*, and *ULBP4* in the 5-ALA group after 12 hours, as well as of *MICA/B* after 3 and 24 hours of treatment. In addition, the LED treatment increased the expression of all genes obtained after 24 hours. In the Luc4 lineage, PDT increased the expression of *ULBP1*, *ULBP3*, *ULBP4* genes after 3 and 12 hours of treatment; *MICA/B* in the 5-ALA after 12 hours; LED group after 24 hours and *ULBP1* after 12 hours. In general, a reduction in the expression of *ULPBs* evaluated after 24 hours of PDT was observed. In the evaluation of HLA-ABC expression, there was a decrease in the Ca1 lineage of the PDT group when compared to the Control group. There was no statistical difference in the Luc4 lineage, and after 24 hours of cultivation in its conditioned environment, there was a decrease in the percentage of cells in the expression of NKG2D, Nkp30, Nkp44, and NKp46 in the PDT group compared to the Control group. Based on all of that, it can be concluded that a PDT module is the expression of activating ligands for NK cells.

Keywords: Oral squamous cell carcinoma, photodynamic therapy, 5-ALA, *Natural Killer* cells, NKG2DL.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|--|----|
| Figura 1: Diagrama de Jablonski Adaptado..... | 15 |
| Figura 2: Conversão do 5-ALA em Protoporfirina IX. | 17 |
| Figura 3: (A) Equipamento LedBOX que foi utilizado para irradiação e (B) imagem representativa da irradiação para realização da TFD. | 28 |
| Figura 4: Análise da viabilidade celular por Alamar Blue e Cristal Violeta nas linhagens celulares Ca1 (A e C) e Luc4 (B e D) nos grupos Controle, 5-ALA, LED e TFD. * p<0,05 e *** p<0,0001 no grupo TFD quando comparado aos demais grupos; # p<0,05 entre o grupo LED e 5-ALA; &p<0,05 entre o grupo 5-ALA e Controle. Dados expressos em média±EPM..... | 34 |
| Figura 5: Análise da expressão do gene <i>ULBP1</i> na linhagem CA1 (A-C) e Luc4 em (D-F) nos grupos Controle, 5-ALA, LED e TFD nos períodos 3h, 12h e 24h após a TFD. *p<0,05; **p<0,001 e ***p<0,001 no grupo TFD em relação aos demais grupos. & p<0,05 no grupo 5-ALA em relação aos grupos Controle e LED. # p<0,0001 no grupo LED em relação ao Controle..... | 35 |
| Figura 6: Análise da expressão do gene <i>ULBP2</i> na linhagem CA1 (A-C) e Luc4 em (D-F) nos grupos Controle, 5-ALA, LED e TFD nos períodos 3h, 12h e 24h após a TFD. *p<0,05 no grupo TFD em relação aos demais grupos. & p<0,05 no grupo 5-ALA em relação ao grupo Controle e/ou LED. # p<0,05 no grupo LED em relação ao Controle e/ou 5-ALA. | 36 |
| Figura 7: Análise da expressão do gene <i>ULBP3</i> nas linhagens CA1 (A-C) e Luc4 em (D-F) nos grupos Controle, 5-ALA, LED e TFD nos períodos 3h, 12h e 24h após a TFD. *p<0,05, **p<0,001 no grupo TFD em relação aos demais grupos. & p<0,05 no grupo 5-ALA em relação ao grupo Controle e/ou LED. #p<0,05 no grupo LED em relação ao Controle e/ou 5-ALA. | 38 |
| Figura 8: Análise da expressão do gene <i>ULBP4</i> nas linhagens CA1 (A-C) e Luc4 em (D-F) nos grupos Controle, 5-ALA, LED e TFD nos períodos 3h, 12h e 24h após a TFD. *p<0,05, **p<0,001 e ***p<0,0001 no grupo TFD em relação aos demais grupos. & p<0,05 no grupo 5-ALA em relação ao grupo Controle e/ou LED. #p<0,05 no grupo LED em relação ao Controle e/ou 5-ALA..... | 39 |
| Figura 9: Análise da expressão do gene <i>MICA/B</i> nas linhagens CA1 (A-C) e Luc4 em (D-F) nos grupos Controle, 5-ALA, LED e TFD nos períodos 3h, 12h e 24h após a TFD. *p<0,05, **p<0,001 e ***p<0,0001 no grupo TFD em relação | |

aos demais grupos. & $p < 0,05$ no grupo 5-ALA em relação ao grupo Controle e/ou LED. # $p < 0,05$ no grupo LED em relação ao Controle e/ou 5-ALA. 40

Figura 10: Histograma representativo da expressão de HLA-ABC nas linhagens Ca1 **(A)** e Luc4 **(B)** dos grupos Controle, 5-ALA, LED e TFD. Análise da intensidade de fluorescência e porcentagem de células marcadas para HLA-ABC na linhagem Ca1 **(C e E)** e na linhagem Luc4 **(D e F)**. * $p < 0,05$ no grupo TFD quando comparado aos demais grupos ou somente ao grupo Controle; & $p < 0,05$ no grupo 5-ALA em relação ao grupo controle. 44

Figura 11: Análise da expressão de NKp30 nos grupos NK92-MI **(A)**, Controle **(B)**, 5-ALA **(C)**, LED **(D)** e TFD **(E)** por citometria de fluxo. Avaliação da porcentagem de células positivas para NKp30 nos diferentes grupos **(F)**. 45

Figura 13: Análise da expressão de NKp46 nos grupos NK92-MI **(A)**, Controle **(B)**, 5-ALA **(C)**, LED **(D)** e TFD **(E)** por citometria de fluxo. Avaliação da porcentagem de células positivas para NKp46 nos diferentes grupos **(F)**. 47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1– Genes e primers utilizados para análise da expressão gênica por RT-qPCR nas linhagens Ca1 e Luc4 nos grupos controle, 5-ALA, LED e TFD. 30

Tabela 2- Descrição dos anticorpos e controles isotípicos utilizados na citometria de fluxo..... 32

Tabela 3: Avaliação da expressão dos genes *ULBP1*, *ULBP2*, *ULBP3*, *ULBP4* e *MICA/B* nas linhagens Ca1 e Luc4 nos diferentes períodos. Os dados estão expressos em relação ao grupo Controle..... 42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIF – Fator de Indução de Apoptose

5- ALA - Ácido Aminulevulínico

ALDH1 - Aldeído desidrogenase 1

APC – Aloficocianina

ATP - Adenosina Tri-fosfato

CEO - Carcinoma Epidermóide Oral

CTC - Células Tronco de Câncer

CTT- Células Tronco Tumorais

CV – Cristal Violeta

DAMPS - Padrões moleculares associados a danos

DMEM - Meio Modificado Enriquecido Dulbeco

EGFR - Receptor de Fator de Crescimento Epitelial

EROS - Espécies Reativas de Oxigênio

ESA - Antígeno Epitelial de Superfície

FECH – Ferroquitalase

FITC - Isotiocianato de fluoresceína

FS – Fotossensibilizador

GSK3B - Enzima glicogênio sintase quinase 3B

LDL - Lipoproteína de baixa densidade

LED - Laser emissão diodo

NF-κB – Fator Nuclear Kappa B

NK- Natural Killer

PPIX -Protoporfirina 9

RIP1 – Receptor de Interação de proteína 1

SFB - Soro Fetal Bovino

TEM - Transição Epitélio Mesenquima

TFD - Terapia Fotodinâmica

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1. CONTEXTUALIZAÇÃO | 13 |
| 1.1 CARCINOMA EPIDERMÓIDE ORAL (CEO) | 13 |
| 1.2 TERAPIA FOTODINÂMICA (TFD) | 14 |
| 1.3 TFD NO CEO | 18 |
| 1.4 RESPOSTA IMUNE MEDIADA PELA TERAPIA FOTODINÂMICA | 20 |
| 2. OBJETIVO | 26 |
| 3 METODOLOGIA | 27 |
| 3.1 CULTIVO CELULAR | 27 |
| 3.2 TERAPIA FOTODINÂMICA | 27 |
| 3.3 ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR | 28 |
| 3.3.1 CRISTAL VIOLETA | 28 |
| 3.3.2 ALAMAR BLUE | 29 |
| 3.4 EXTRAÇÃO DE RNA, SÍNTESE DO CDNA, PCR EM TEMPO REAL E ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE LIGANTES PARA ATIVAÇÃO DE CÉLULAS NK | 29 |
| 3.5 COLETA DO MEIO CONDICIONADO | 30 |
| 3.6 TRATAMENTO DAS CÉLULAS NK92-MI COM MEIO CONDICIONADO | 31 |
| 3.7 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE HLA-ABC, NKP30, NKP44, NKP46 E NKG2D POR CITOMETRIA DE FLUXO | 31 |
| 3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA | 32 |
| 4 RESULTADOS | 33 |
| 4.1 ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR APÓS A TFD | 33 |
| 4.2 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE LIGANTES PARA ATIVAÇÃO DE CÉLULAS <i>NATURAL KILLER</i> POR PCR EM TEMPO REAL | 34 |
| 4.2.1 EXPRESSÃO DE <i>ULBP1</i> | 34 |
| 4.2.2 EXPRESSÃO DE <i>ULBP2</i> | 36 |
| 4.2.3 EXPRESSÃO DE <i>ULBP3</i> | 37 |
| 4.2.4 EXPRESSÃO DE <i>ULBP4</i> | 38 |
| 4.2.5 EXPRESSÃO DE <i>MICA/B</i> | 39 |
| 4.3 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE HLA-ABC APÓS 24H DA TFD | 43 |
| 4.4 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE RECEPTORES DE CÉLULAS NK APÓS 24H DE CULTIVO NO MEIO CONDICIONADO | 45 |
| 5 DISCUSSÃO | 49 |
| 6 CONCLUSÃO | 54 |
| 7 REFERÊNCIAS | 55 |

1. CONTEXTUALIZAÇÃO

1.1 Carcinoma Epidermóide Oral (CEO)

O câncer de cabeça e pescoço é a quinta neoplasia maligna mais comum em homens no Brasil (INCA). A cavidade oral é o sítio mais comum, representando cerca de 3% dos casos de câncer em todo o mundo¹. O tipo mais comum de câncer oral é o Carcinoma Epidermóide Oral (CEO), também conhecido como carcinoma de células escamosas ou carcinoma epidermóide, representando mais de 90% dos casos diagnosticados². No Brasil, o câncer oral é a quinta neoplasia maligna mais frequente em homens (INCA), com 15.190 novos casos estimados em 2020, sendo 11.180 em homens e 4.010 em mulheres³.

O CEO tem origem multifatorial e nenhum fator pode, por si só, ser determinante para o seu desenvolvimento. Tais fatores são de origem extrínseca, como o tabagismo, sífilis, HPV, radiação e etilismo, ou, de origem intrínseca, envolvendo o estado de saúde sistêmico do paciente como a imunossupressão, desnutrição e anemias⁴.

O diagnóstico costuma ser tardio e os tratamentos disponíveis são invasivos e com impacto direto na qualidade de vida dos pacientes⁵. O tratamento convencional consiste em ressecção cirúrgica do tumor, com margem de segurança, e subsequente radioterapia, radioterapia associada à quimioterapia ou quimioterapia isolada, sendo que, o tratamento quimioterápico é usualmente empregado em casos avançados de forma adjuvante para facilitar a intervenção cirúrgica ou a radioterapia⁵.

Apesar dos avanços em relação ao tratamento, aproximadamente 50% dos pacientes desenvolvem recidivas e 21% desenvolvem metástase regionais e cervicais¹. Até 86% de todos os tumores recorrentes ocorrem nos primeiros 2 anos após o tratamento, sendo as recidivas precoces descritas como pior fator prognóstico em relação às recidivas tardias⁶. Além disso, o prognóstico de pacientes diminui drasticamente em caso de recidiva, com taxas de mortalidade de até 92%⁶.

O prognóstico dos pacientes com CEO depende do tamanho, infiltração e localização da lesão, disseminação metastática e grau de diferenciação da neoplasia⁷. 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. Com o objetivo de auxiliar os médicos e pesquisadores no referenciamento do tumor, foi estabelecido pela UICC (União Internacional Contra o Câncer) um parâmetro qualitativo denominado estadiamento TMN, no qual (T) refere-se ao tamanho do tumor, (N) envolvimento de linfonodos regionais e (M) metástases à distância⁷.

1.2 Terapia Fotodinâmica (TFD)

A terapia fotodinâmica envolve o uso de um fotossensibilizador (Fs), um composto químico que, quando ativado pela luz em comprimento de onda apropriado produz oxigênio singlete (1O_2) e espécies reativas de oxigênio (ERO), induzindo morte celular por diversos mecanismos moleculares⁸. A possibilidade de tratamento não invasivo é a principal razão pela qual atualmente a TFD está sendo empregada em diversas áreas, como dermatologia, estética e oncologia^{8,9}.

Após a administração do Fs, as células ou tecido devem ser irradiadas com um comprimento de onda específico para sua estimulação, que variam de 400nm a 800nm, dependendo do Fs utilizado⁸. Tanto o laser quanto o LED podem ser utilizados. O LED é uma alternativa econômica comparada com outras opções no mercado e a área de alcance de irradiação da placa de LED é mais larga que a ponteira de uma luz de laser, além disso, a propagação da luz do LED é não colimada, não coerente e monocromática, apesar de apresentar uma largura espectral maior que do laser⁹.

Após a absorção da luz (fótons), o Fs adquire um estado singlete excitado (S₂), logo após tal excitação apresenta uma leve diminuição e o Fs adquire um estado de excitação menor (S₁), que ocorre em nano segundos. Quando está em S₁, o Fs pode perder energia e as moléculas podem voltar ao estado fundamental emitindo luz fluorescente. No estado singlete excitado a molécula também pode sofrer um processo conhecido como cruzamento inter-sistemas e

então o Fs assume o estado tripleto excitado que possui uma vida útil de microssegundos e pode reagir com o oxigênio por reações do tipo I e tipo II⁹.

Na reação do tipo I, o Fs pode reagir diretamente com um substrato, como uma molécula, e transferir um próton ou um elétron para formar radicais livres. Podem ainda reagir com oxigênio para produzir espécies reativas de oxigênio, radicais de ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxilas^{10,11,12}. Já em uma reação Tipo II, o Fs pode transferir sua energia diretamente para o oxigênio molecular em estado fundamental, para formar oxigênio singleto de estado excitado. Tais reações podem ocorrer simultaneamente e, a escolha entre esses processos depende do tipo de Fs utilizado e as concentrações de substrato e oxigênio disponível (Figura 1)^{10,11}.

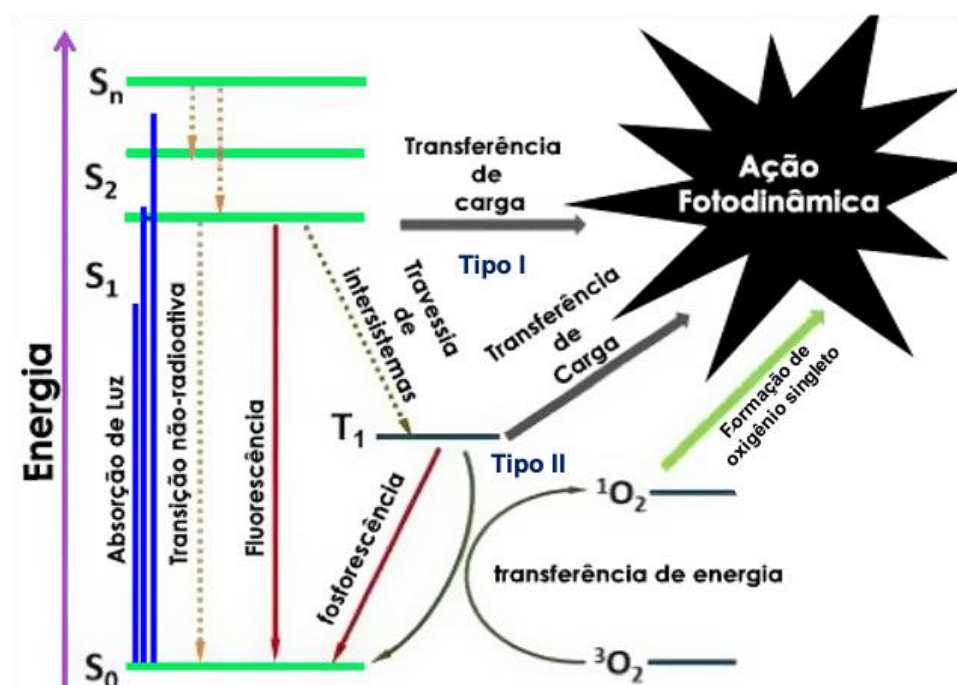


Figura 1: Diagrama de Jablonski Adaptado.

Existem diversos Fs utilizados na TFD, sendo divididos em primeira, segunda e recentemente, terceira geração⁸. Os Fs de primeira geração estão disponíveis desde a década de 70, sendo mais frequentes os derivados estruturais da hematoporfirina (HpD)⁸. No entanto, eles apresentam muitas desvantagens, como: alta tendência de agregação, falta de especificidade, baixa solubilidade em líquidos fisiológicos e fototoxicidade cutânea, tornando necessário o desenvolvimento de novos Fs¹⁰. Como uma tentativa de potencializar a eficácia dos agentes de primeira geração, surgem os Fs de segunda geração, os quais apresentam melhores propriedades

farmacocinéticas, menor toxicidade e melhora na absorção de luz¹⁰. Entre esses novos Fs, estão as moléculas de porfirinas nucleares ou estruturalmente modificadas ou substituídas, sendo estas, as bacterioclorinas, clorinas, ftalocianinas ou outros compostos macrocíclicos¹⁰.

Para aprimorar ainda mais o alvo dos Fs, estão sendo estudados os Fs de terceira geração, que tem o intuito de melhorar a interação alvo-efetor do Fs de segunda geração, por meio da conjugação com moléculas biológicas ou que possuam propriedades de “extinção por foto”, ou seja, esses materiais fotossensíveis somente são ativados no local alvo específico¹⁰. As possíveis moléculas transportadoras incluem, por exemplo, anticorpos monoclonais, transportadores de proteínas não baseadas em anticorpos e marcadores de superfície como o receptor do fator de crescimento epidérmico¹¹.

Algumas propriedades dos Fs são recomendadas para sua utilização clínica, incluindo a elevada absorção na região da janela terapêutica (entre 600-800nm); apresentar uma pré-seleção para tumores sem atingir as células normais; ser altamente tóxico apenas na presença da luz e no comprimento ideal; não causar efeitos celulares colaterais; ter pureza química, estabilidade, síntese fácil, reprodutibilidade, baixo custo e estrutura bem definida¹³. Levando em consideração a evolução dos Fs, atualmente são aprovados pelas autoridades reguladoras o uso do Fotofrin para uso no esôfago, pulmão, estômago, colo do útero e bexiga e do 5-ALA apenas para distúrbios não malignos e pré-malignos, que pode ser ativado por luz vermelha, verde e azul¹⁴.

O Fs 5- ALA é um fotossensibilizador intrínseco, que é convertido *in situ* em protoporfirina IX na mitocôndria¹⁵. O ALA é o primeiro intermediário na via de biossíntese do grupo Heme, sendo sintetizado a partir da glicina e succinil – Coa, no interior da mitocôndria e sua síntese é controlada pela enzima ALA sintetase que, por sua vez, é inibida pelo acúmulo de Heme (feedback negativo). Já no citoplasma das células, duas moléculas de ALA formam o porfobilinogênio (PBG) e 4 moléculas de PBG formam o uroporfirinogênio III. Este último é convertido em coproporfirinogênio III e, novamente no interior da mitocôndria, em protoporfirinogênio IX, que é convertido em PpIX, pela ação da protoporfirinogênio oxidase. A PpIX abundante não pode ser convertido para o produto heme pela ferroquelatase rapidamente e, portanto, permanece disponível como um sensibilizador por um tempo limitado. As enzimas

porfobilinogênio desaminase (PBGD) e ferroquelatase (FC) parecem contribuir para o acúmulo diferencial de PpIX em células tumorais^{14,16}. O acúmulo excessivo de PpIX no interior da mitocôndria induz à sua difusão para o retículo endoplasmático e membrana celular e quando isso ocorre, a PpIX do tecido alvo pode ser irradiada com luz ultravioleta ou luz visível (400-800 nm) para fotoativação¹¹.

A PpIX possui vários picos de absorção da luz. O principal é em 405 nm, correspondente à luz azul. Outros picos, que são de 10 a 40x menores também têm importância e são chamados de “Q bands”. São picos que ocorrem em 510, 545, 580, 630, 670 e 700 nm. Muitos estudos em TFD são conduzidos usando fonte de luz no espectro da luz vermelha entre 620 e 635 nm, por proporcionarem maior penetração no tecido, otimizando a TFD para lesões mais profundas¹⁷. A especificidade da fluorescência induzida por 5-ALA se baseia no fato de que células tumorais e outras células em replicação ativa acumulam preferencialmente PpIX na presença de 5-ALA, como mostrado *in vitro*, tornando essas células-alvo da TFD (Figura 2)^{11,18}. A TFD mediada por 5-ALA (5-ALA-TFD) tem sido vista como alternativa terapêutica em tumores de cabeça e pescoço em estágios iniciais, com resultados promissores¹².

Biossíntese do grupo Heme

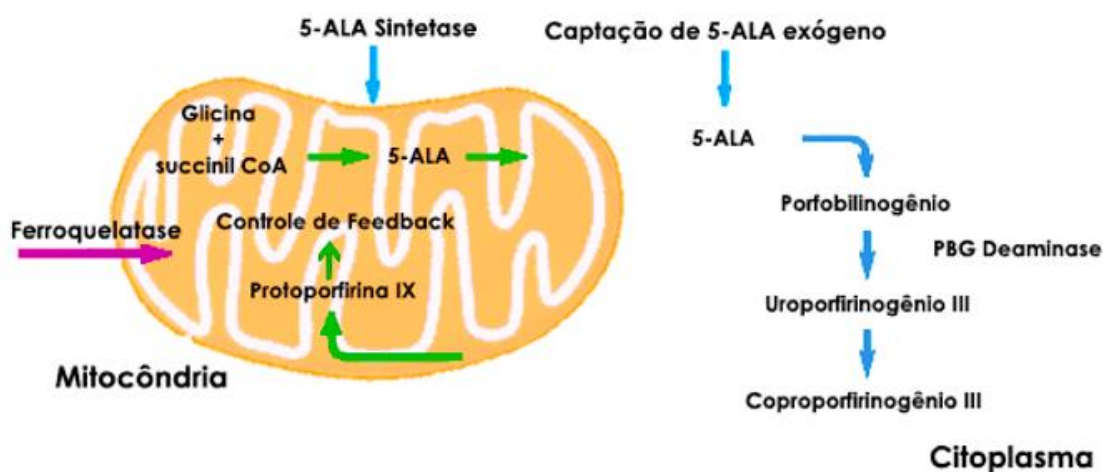


Figura 2: Conversão do 5-ALA em Protoporfirina IX.

Com a aplicação da TFD são provocados danos irreparáveis às macromoléculas celulares, induzindo a morte de células tumorais por um mecanismo apoptótico, necrótico ou autofágico, acompanhado pela indução de uma reação inflamatória local aguda que participa da remoção de células mortas, restauração da homeostase normal do tecido e, às vezes, no desenvolvimento de imunidade sistêmica^{10,12,14}.

1.3 TFD no CEO

Os tratamentos disponíveis para CEO são invasivos e com alto custo, além de não serem eficazes a longo prazo, devido à alta taxa de recidiva do tumor¹⁹. Assim, terapias alternativas vêm sendo estudadas visando um tratamento mais eficaz e acessível. A TFD está ganhando destaque como uma dessas alternativas por ser uma técnica minimamente invasiva, preserva a integridade funcional e anatômica, possui poucos efeitos colaterais e seletividade para as células tumorais, além de possuir baixa toxicidade, favorecendo a utilização de múltiplos ciclos de tratamento^{9,20,21}.

A excitação do Fs em células tumorais resulta na produção de EROS e consequentemente de ativação de vias de morte celular por apoptose e necrose¹⁴. A morte de células tumorais é ainda mais potencializada por danos à microvasculatura, que restringe ainda mais o suprimento de oxigênio e nutrientes¹⁴. A morte das células tumorais é acompanhada pela ativação da cascata do complemento, secreção de citocinas pró-inflamatórias, recrutamento rápido de neutrófilos, macrófagos e células dendríticas (CDs)¹⁴. As células tumorais que foram mortas e os restos das células tumorais são fagocitados por células fagocíticas, incluindo CDs, que migram para os linfonodos locais e se diferenciam em células apresentadoras de antígenos profissionais¹⁴.

No tratamento de tumores de cabeça e pescoço já são usados, em estudos clínicos, Fs como: Meta-Tetra (hidroxifenil), Clorina (mTHPC, Foscan), Porfirina de Sódio (Photofrin), Metil Aminolevulinato (MAL) e Ácido Aminolaevulínico (5-ALA), além de outros Fs, com intuito de estabelecer protocolos de aplicação da TFD nesse tipo de tumor²².

Fang et.al realizaram um estudo clínico com uso da TFD com 5-ALA para lesões pré malignas e malignas de boca onde 18 pacientes com lesões orais

diagnosticas histopatologicamente foram sensibilizadas com 5-ALA na cavidade oral e logo após o Laser foi aplicado¹³. Para avaliação foi feita uma remoção previa de uma parte do tumor, uma remoção imediatamente, 2 e 5 dias após a TFD para avaliação da profundidade da necrose causada no tecido¹³. Os pacientes foram mantidos em uma sala escura por 24h após a aplicação do Fs. Os resultados mostraram que a TFD produz necrose epitelial consistente, com excelente cicatrização na displasia da boca e é uma forma simples e eficaz de manejo para uso clínico. No entanto, em tumores invasivos seu uso foi menos satisfatório e os autores atribuíram esse fator a um efeito superficial da TFD de acordo com os protocolos e Fs usado no estudo¹³.

O uso da TFD com o fotossensibilizador 5-ALA em linhagens celulares derivadas de CEO (HSC-4 e HSC-2) induziu a apoptose por perda da função mitocondrial e um aumento da peroxidação lipídica²³. Um outro estudo demonstrou o envolvimento significativo das vias de sinalização NF-κB e JNK induzidas por TFD-5-ALA em linhagem celular derivada de CEO²⁴.

Qiao et al. demonstraram que nas linhagens de carcinoma de cabeça e pescoço (A431 e COLO-6), a TFD-5-ALA poderia alterar a expressão da proteína Bcl2/Bax, o que causou a inibição da via JAK-STAT, associada à proliferação, diferenciação e migração celular²⁴.

Yu et al. observaram em estudo *in vitro* que o tratamento da com 5-ALA-TFD reduziu a atividade da ALDH1 e a positividade para CD44, que foram usados como marcadores de células-tronco tumorais em câncer de cabeça e pescoço²⁵. Além disso, a terapia 5-ALA-TFD reduziu a capacidade de auto-renovação e a expressão de genes associados com o fenótipo tronco como *Oct4* e *Nanog*²⁵. Adicionalmente, a terapia 5-ALA-TFD sensibilizou as células-tronco tumorais altamente tumorigênicas ao tratamento com quimioterápicos convencionais, além de atenuar a capacidade de invasão e clonogenicidade das CTT¹³.

Korbelik et al. demonstraram que a TFD direcionada contra tumores murinos resultou na geração de memória imune²⁶. Também foi demonstrado que a TFD clínica antitumoral aumenta a imunidade antitumoral²⁷. A TFD em angiossarcoma multifocal da cabeça e pescoço resultou em aumento da infiltração de células imunes em tumores distantes não tratados, acompanhados

por regressão do tumor²⁷. No carcinoma basocelular (CBC) a TFD aumentou a reatividade das células imunes contra um antígeno associado²⁸.

1.4 Resposta imune mediada pela terapia fotodinâmica

A busca por novas terapias contra o câncer que sejam menos tóxicas e mais eficazes do que o tratamento convencional, aliado ao crescente conhecimento sobre os mecanismos pelos quais o sistema imunológico atua durante o desenvolvimento da neoplasia maligna fez com que a imunoterapia seja atualmente considerada uma estratégia revolucionária e promissora no tratamento do câncer. De fato, evidências clínicas têm demonstrado aumento significativo no controle da doença e na taxa de sobrevivência de pacientes diagnosticados com melanoma e câncer de pulmão em estágio avançado tratados com drogas que promovem a reativação do sistema imunológico contra as células tumorais²⁹.

A hipótese de que o sistema imune atua no controle do desenvolvimento de neoplasias malignas foi sistematicamente introduzida na década de 50 por Burnet e Thomas^{30,31}. Sendo estabelecido o termo “vigilância imunológica do câncer” para o mecanismo de reconhecimento e eliminação das células neoplásicas pelo sistema imune. Neste contexto, a imunidade inata consiste na primeira linha de defesa contra as células tumorais, sendo desempenhada por monócitos, macrófagos, células dendríticas e células Natural Killer (NK)^{32,33}. Adicionalmente, a resposta imune inata pode desencadear uma resposta imune adaptativa contra antígenos especificamente expressos pelas células tumorais lisadas, culminando conseqüentemente com o controle do crescimento tumoral a longo prazo, mediado principalmente por linfócitos T. Componentes importantes do sistema imune inato e adaptativo como perforina, interferon- γ , TRAIL (fator de necrose tumoral associado à apoptose induzida por ligante), células NK, linfócitos T CD8 e linfócitos T CD4+ com polarização Th1 são essenciais para a atividade antitumoral do sistema imune, limitando o estabelecimento de diferentes tipos de câncer^{34,35}.

A sensibilização do tumor pela TFD envolve uma combinação de citotoxicidade direta para as células tumorais e eventos de dano secundário

causados por paralisação vascular e inflamação³⁶. A resposta inflamatória após a TFD foi implicada no desenvolvimento da imunidade antitumoral³⁶.

Além de destruir o tecido tumoral por um processo que pode produzir necrose celular e induzir a expressão de proteínas de estresse, a TFD produz uma inflamação aguda e atrai leucócitos para os tumores tratados, além de interromper a vascularização tumoral^{13,37,38}. A TFD pode aumentar a imunogenicidade de células tumorais mortas, expondo ou criando novos antígenos e induzindo proteínas de choque térmico que aumentam a eficiência da apresentação cruzada do antígeno para formar células T citotóxicas tumor-específicas mais eficazes³⁶. Os efeitos pró-inflamatórios da TFD podem aumentar a migração de células dendríticas, captação de antígenos e maturação^{36,39}.

Canti et al. foram os primeiros a demonstrar o potencial imune induzida pela TFD, demonstrando que linfócitos T isolados de linfonodos que drenam tumor de camundongos tratados com TFD foram capazes de conferir resistência a novos tumores em camundongos⁴⁰. Nesse estudo, a proliferação de linfócitos após a TFD foi significativamente maior em relação aos animais controle não tratados ou tratados apenas com laser.

1.5 Terapia fotodinâmica e células *natural-killer*

As células NK são linfócitos granulares grandes que representam aproximadamente 10-15% dos linfócitos circulantes⁴¹. Sua função efetora contra as células tumorais ocorre sem a necessidade de sensibilização prévia, por meio de citotoxicidade direta mediada por grânulos contendo perforina e granzima B; pela expressão de ligantes para receptores de morte celular TRAIL e FasL; pela secreção de moléculas efectoras como IFN γ e por meio da citotoxicidade celular mediada por anticorpo^{41,42,43}.

Estas células são caracterizadas pelo fenótipo CD3⁻/CD56⁺ e dois subtipos celulares distintos funcionalmente podem ser identificados baseando-se na densidade de expressão de CD56: células CD16⁺/CD56^{dim}, encontrado no sangue, mais numerosas e com elevada citotoxicidade e células CD16⁻/CD56^{bright}, encontradas nos linfonodos, menos maduras, presente em menor quantidade e responsáveis pela produção de IFN γ , TNF- α , GM-CSF e IL-10^{41,43}.

As células NK são ativadas por meio de citocinas como IL-2, IL-12, IL-15 e IL-21, sendo diversas técnicas empregadas para sua expansão *ex vivo* com fins terapêuticos⁴⁴.

Existem linhagens comerciais imortalizadas de células NK humanas, as quais vêm sendo avaliadas em estudos clínicos devido à facilidade de obtenção de grandes quantidades para a terapia⁴⁵. Essas linhagens têm ausência de expressão de todos os KIR inibitórios e alta expressão de receptores ativadores, como NKG2D, NKp46, NKp30 e NKp44, possuindo, portanto, maior potencial citotóxico em comparação com as células NK obtidas a partir de doadores saudáveis. Por isso, a linhagem NK92 é utilizada em vários estudos de susceptibilidade e resistência à atividade das NK⁴⁵.

As células tumorais podem ativar a função efetora das células NK como citotoxicidade, pela produção de citocinas e proliferação por meio da perda da expressão do complexo MHC de classe I (HLA) ou pela elevada expressão de ligantes que ativam receptores das células NK⁴¹. Desta maneira, a função das células NK é criticamente regulada pelo balanço entre os sinais ativadores e inibitórios entregues a uma ampla variedade de receptores celulares, por meio dos quais as células NK irão decidir entre eliminar a célula alvo ou permanecer tolerante^{41,43}. Além disso, as células NK são capazes de adaptar seu potencial citolítico de acordo com o repertório de ligantes expressos nas células alvo e desta maneira, a exposição crônica a ligantes ativadores ou níveis extremamente baixos de moléculas de MHC de classe I é capaz de tornar as células NK pouco reativas⁴⁶.

Os receptores das células NK são divididos em duas famílias estruturais: receptores KIRs (killer cell immunoglobulin-like receptors) e receptores semelhantes a lectina Tipo C (CD94/NKG2)⁴¹. Os receptores KIRs reconhecem especificamente as moléculas de MHC classe I clássicas HLA-A, HLA-B e HLA-C (Antígeno Leucocitário Humano) presentes nas células alvo, podendo causar tanto ativação quanto inibição das células NK⁴¹. Os KIRs inibitórios têm elevada afinidade pelo complexo MHC classe I, presente na maioria das células e, portanto, a co-estimulação de receptores ativadores e KIRs resulta em um sinal negativo dominante e inibição da ativação das células NK. CD94/NKG2 consiste em um receptor heterodimérico com uma cadeia invariante (CD94) e a cadeia

NKG2, a qual pode fornecer sinal inibitório (NKG2A/B) ou ativador (NKG2C, NKG2D, NKG2E/H e NKG2F)^{42,47}.

NKG2D (também conhecido como CD341), NCRs (Natural Cytotoxicity Receptors-NKp30, NKp40 e NKp46), DNAM (CD226) e CD16 consistem nos receptores de ativação das células NK mais bem caracterizados e implicados na resposta imune contra o câncer⁴⁷. NKG2D é particularmente importante pois é ativado por uma ampla variedade de ligantes como *MICA/B*, *MICB* e *ULBP1-ULBP6*, seletivamente superexpressos em células sob estresse, infecções e transformações, incluindo as células tumorais e células epiteliais durante o processo de transformação maligna⁴⁸. López-Soto et. al demonstraram que entre os ligantes do receptor NKG2D, *MICA/B*, *ULBP1*, *ULBP2* e *ULBP3* são os mais ativados em linhagem derivada de câncer colorretal humano⁴⁹.

As células NK podem eliminar células tumorais que apresentam baixa expressão de moléculas MHC de classe I mas mantem a expressão de ligantes que ativam os receptores das células NK ou pode eliminar células tumorais que expressam MHC classe I mas que apresentam alta expressão de ligantes que ativam os receptores das células NK, superando os sinais inibitórios^{41,43}. Entretanto, diferentes mecanismos de escape ao ataque das células NK são utilizados pelas células tumorais, incluindo a clivagem dos ligantes ativadores de NKG2D, estimulação crônica do receptor NKG2D, ativação de plaquetas, secreção de TGF β e o estabelecimento de um microambiente imunossupressor^{42,43,46}. Neste contexto, diferentes estratégias têm sido utilizadas para restabelecer e/ou aumentar a função das células NK⁵⁰. Além disso, a associação da imunoterapia mediada pelas células NK à radioterapia e/ou quimioterapia possui efeito anti-tumoral sinérgico pois ambas atuam ativando vias de resposta ao dano no DNA nas células tumorais, o que resulta na expressão de ligantes ativadores das células NK e consequentemente, reconhecimento e eliminação das células tumorais.

A função das células NK é regulada por um delicado equilíbrio de sinais iniciados por uma variedade de receptores ativadores e inibitórios⁵¹. NKG2D é um receptor de ativação primário, que tem como papel induzir a citotoxicidade das células NK. Em humanos, o NKG2D foi identificado pela primeira vez como um receptor para *MICA* e *MICB* (MHC classe I relacionados à cadeia A e B) e, posteriormente, para as moléculas *ULBP1*, *ULBP2*, *ULBP3*, *ULBP4*, *ULBP5* e

*ULBP6*⁵¹. Os ligantes de NKG2D são frequentemente superexpressos em diferentes tipos de tumores, incluindo tumor gástrico, câncer de pulmão e carcinoma de colon⁵¹.

Alguns estudos demonstram que o uso da TFD pode sensibilizar o microambiente tumoral por meio da promoção da morte e/ou lesão celular, promovendo a expressão de ligantes de ativação para as células NK⁵². Kabingu et al. avaliaram a contribuição de células NK para o controle de tumores distantes por meio da TFD. Células tumorais derivadas de carcinoma murino mamário foram injetadas subcutaneamente em camundongos SCID e após atingirem 6-8mm³, os mesmos foram tratados com TFD com mTHPC. Adicionalmente, os autores avaliaram o efeito da terapia com células NK combinada à TFD. Foi observado que a TFD causou um aumento da infiltração de células T CD8 em tumores distantes não tratados, sendo o efeito dependente das células NK⁵³.

Korbelik et al. trataram tumores *in vivo* das linhagens SiHa (carcinoma de células escamosas cervicais humanas), HT-29 (adenocarcinoma colorretal humano) e EMT6 (sarcoma mamário de camundongo) com mTHPC-TFD e células NK92 e NK92MI *in vivo*⁵⁴. Os resultados demonstraram que a atividade anti-tumoral de células NK transferidas adotivamente é provavelmente influenciada por várias citocinas liberadas no contexto da reação inflamatória induzida pela TFD, incluindo IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-8 e G-CSF, enquanto outros, como o IFN- γ , podem se tornar indiretamente regulados. Também foi demonstrado que a atividade das células NK é aumentada pelo tratamento prévio com a TFD⁵⁴. Adicionalmente, Park et al. demonstraram que doses subletais de TFD com o Fs hematoporfirina, aumentaram os níveis de mRNA e a expressão proteica de *ULBP1*, *ULBP2* e *ULBP3* bem como a susceptibilidade das células tumorais à citotoxicidade mediada pelas células NK. Além disso, esse efeito foi inibido após o tratamento com anticorpos monoclonais contra NKG2D, demonstrando que a TFD aumenta a susceptibilidade às células NK via indução de ligantes de NKG2D nas células tumorais⁵⁵.

Belicha-Villanueva et al. analisaram a expressão de *MICA/B* bem como *ULBP1*, *ULBP2*, *ULBP3* em células de carcinoma de cólon humano e tumores CT26 murinos tratados com HPPH-TFD. Foi realizado também o ensaio de citotoxicidade com a linhagem Colo205 em co-cultivo com a linhagem NK92MI por 2h. Os resultados demonstraram uma indução de *MICA/B* após a TFD em

células de linhagem Colo205 e o aumento da expressão de NKG2DL nos tumores murinos, indicando que a TFD desempenha papel na indução de imunidade anti-tumoral. Adicionalmente, as células tumorais apresentaram maior sensibilidade à lise mediada por célula NK após a TFD⁵².

Não existe na literatura estudos que se propuseram a avaliar o efeito da TFD com 5-ALA na expressão de ligantes para as células NK no CEO. Assim, uma vez que a TFD representa uma opção terapêutica para o CEO, principalmente em estágios iniciais, torna-se necessário o entendimento de como essa terapia atua na modulação do sistema imune, principalmente nas células NK, as quais possuem papel relevante na vigilância imunológica.

2. OBJETIVO

Este estudo tem como objetivo avaliar *in vitro* os efeitos da TFD mediada pelo 5-ALA na:

- Viabilidade de linhagens celulares derivadas de CEO após a TFD;
- Expressão dos genes *ULBP1*, *ULBP2*, *ULBP3*, *ULBP4* e *MICA/B* em linhagens celulares derivadas de CEO após 3h, 12h e 24h da TFD.
- Avaliar a expressão proteica de HLA-ABC em linhagens celulares derivadas de CEO após a TFD.
- Avaliar o efeito do meio condicionado das linhagens derivadas de CEO após a TFD na expressão dos receptores NKG2D, Nkp30, Nkp44 e NKp46 na linhagem NK92-MI.

3 METODOLOGIA

3.1 Cultivo celular

As linhagens celulares Ca1 e Luc4, derivadas de carcinoma epidermóide oral, gentilmente cedidas pelo Prof. Ian Mackenzie (Instituto Blizard, Queen Mary University of London) foram cultivadas em frascos plásticos de 75cm² (Corning) em meio DMEM/F12 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 1% de antibiótico/antimicótico e suplemento RM⁺ e mantidas a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO₂ e 95% de umidade.

A Linhagem NK-92 MI (CRL-2408, ATCC) foi cultivada em meio MEM- α contendo 2mM de L-glutamina, 1,5 g/L de bicarbonato de sódio, 0,2 mM de inositol, 0,1 mM 2-mercaptoetanol, 0,02 mM de ácido fólico, 12,5% de SFB e 15,5% de soro fetal de cavalo. Esta linhagem foi gentilmente cedida pela Dra. Maria da Glória Martins Teixeira do Laboratório de Tecnologia Recombinante (LATER) da Fiocruz.

3.2 Terapia Fotodinâmica

A terapia fotodinâmica foi realizada utilizando o Fs 5-ALA (Sigma-Aldrich).

As células das linhagens CA1 e Luc4 foram divididas em quatro grupos de estudo:

Controle: células não submetidas à TFD.

5-ALA: células incubadas com 5-ALA e não submetidas à irradiação.

LED: células submetidas somente à irradiação com LED.

TFD: células incubadas com 5-ALA e submetidas à irradiação com LED.

As células do grupo 5-ALA e TFD foram incubadas com 1 mM de 5-ALA (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) diluído em meio de cultura sem soro fetal bovino por 4 horas em estufa a 37°C no escuro. Após a incubação do Fs, o meio foi removido e substituído por solução tampão fosfato (PBS, pH 7,4) e as células dos grupos LED e TFD foram irradiadas com o equipamento BioLambda modelo LedBOX (Brasil), 660 \pm 9 nm, 0,0255W/cm², 6J/cm² e 240s. Este

parâmetro foi selecionado em estudo prévio do grupo de pesquisa, no qual houve morte de 50% das células tumorais após a TFD.

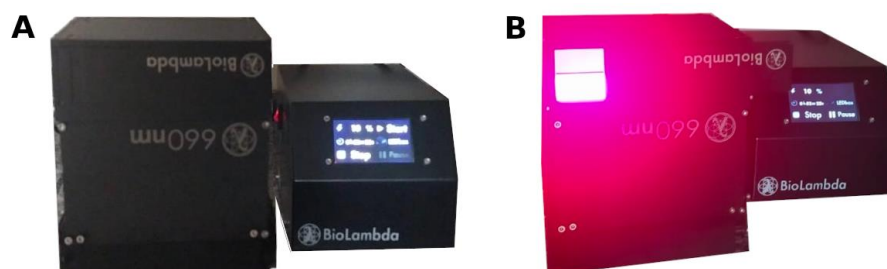


Figura 3: (A) Equipamento LedBOX que foi utilizado para irradiação e **(B)** imagem representativa da irradiação para realização da TFD.

3.3 Análise da Viabilidade Celular

Para avaliar o efeito da TFD na viabilidade das linhagens celulares CA1 e LUC4, foram realizados os ensaios de Cristal Violeta (CV) e Alamar Blue. Nestes ensaios, 5×10^4 células das linhagens CA1, LUC4 foram cultivadas em placas de 96 poços. A viabilidade celular foi avaliada após 24h nos grupos controle, 5-ALA, LED E TFD.

3.3.1 Cristal violeta

A técnica de Cristal Violeta (CV) é usada para avaliar a viabilidade celular. As células mortas, de linhagens que crescem em aderência, tendem a perder tal aderência do frasco de cultivo, tornando viável a quantificação de células vivas após o uso de alguma terapia. Quando utilizamos a coloração com CV temos sua interação com proteínas e DNA das células, que se relaciona com a quantidade de células aderidas⁵⁶. Desta maneira, 5×10^4 células foram semeadas nos poços da placa de 96 poços, sendo mantidas em cultura por 24h. Após este período, as células foram submetidas aos tratamentos descritos anteriormente. Depois de 24h do tratamento, o meio foi aspirado, as células foram lavadas com solução tampão fosfato (PBS pH 7.0) e fixadas com paraformaldeído 4% por 15 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, as células foram lavadas e coradas com cristal violeta (CV) a 0,5% por 20 minutos, lavadas em água corrente e deixadas em temperatura ambiente por 24h para secagem. Por fim, o

CV foi solubilizado em metanol por 20 minutos em agitação no equipamento Red Rocker (Hoefer). A análise da viabilidade celular foi avaliada por meio de absorbância em comprimento de onda de 570nm, utilizando-se o equipamento Synergy H1 (BioTek). Foram realizados três experimentos independentes em quintuplicata. Os valores de absorbância foram transformados em porcentagem em relação ao grupo controle.

3.3.2 Alamar Blue

A análise de viabilidade por Alamar Blue foi realizada de acordo com especificações do fabricante. Desta maneira, 5×10^4 células foram semeadas nos poços da placa de 96 poços, sendo mantidas em cultura por 24h. Após este período, as células foram submetidas aos tratamentos descritos anteriormente. Depois de 24h do tratamento, o meio de cultura foi removido, as células foram lavadas com PBS e meio de cultura DMEM/F12 contendo 10% de Alamar Blue (Biolegend) foi adicionado. Em seguida, a placa foi incubada em estufa a 37°C por 2 horas. Após esse período, foi realizada a leitura da fluorescência com comprimento de onda de excitação de 530nm e emissão de 590nm no equipamento Synergy H1 (BioTek). Foram realizados três experimentos independentes em quintuplicata. Os valores de fluorescência foram transformados em porcentagem em relação ao grupo controle.

3.4 Extração de RNA, síntese do cDNA, PCR em tempo real e análise da expressão de ligantes para ativação de células NK

Após 3h, 12h e 24h da realização da TFD, as células das linhagens CA1 e Luc4 dos diferentes grupos (Controle, 5-ALA, LED e TFD) foram coletadas para extração de RNA total utilizando-se o reagente Trizol, de acordo com as instruções do fabricante. Posteriormente, 1µg de RNA total foi reversamente transcrito em DNA complementar (cDNA) por meio do kit High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (ThermoFisher). As reações de PCR em tempo real foram realizadas em um termociclador ABI7500 utilizando o reagente SYBR Green (Applied Biosystems) e *primers* específicos para os genes *ULBP1*, *ULBP2*, *ULBP3*, *ULBP4* e *MICA/B* (Tabela 1). O gene constitutivo *GAPDH* foi

utilizado para normalização dos dados de expressão. Os produtos da RT serviram de molde para a amplificação por qPCR, sendo todas as reações realizadas num volume final de 10 μ L em tubos ópticos com os seguintes reagentes: *primers* sense e antisense para cada gene, 5 μ l de SYBR Green Master Mix® (Applied Biosystems), 1 μ L de cDNA e o restante do volume composto por 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 segundos, 62°C por 30 segundos e 72°C por 40 segundos. Após o término do último ciclo, as amostras foram submetidas a 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 para avaliação de sua possível contaminação.

A análise quantitativa da expressão foi obtida de acordo com o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ⁵⁷. As reações de qPCR foram realizadas em duplicata e três amostras de cDNA de cada linhagem foram utilizadas, sendo consideradas para quantificação somente àquelas com desvio padrão $\leq 0,05$ entre os valores de Ct.

Tabela 1– Genes e *primers* utilizados para análise da expressão gênica por RT-qPCR nas linhagens Ca1 e Luc4 nos grupos controle, 5-ALA, LED e TFD.

| Gene | Primers 5' → 3' | Tm (°C) | Concentração (nM) |
|---------------|---|---------|-------------------|
| ULBP1 | F: CAG TCC CTG GAG CCT TCT CA R: CAG GGA CCC AGA CCA GGC TAA | 62 | 400 |
| ULBP2 | F: GCA AGG ATG GTC TTG TGA GCA R: GGC CAC AAC CCT TGT CAT TCT | 62 | 400 |
| ULBP3 | F: GTA TGC CAC AGA TGC CTG GG R: GCT CAG TGT CAG CCA CTT CC | 62 | 400 |
| ULBP4 | F: ATG GTC AAA CCT CTG GGC CT R: CCC ACT TCT CCC AGC GTT TG | 62 | 400 |
| MICA/B | F: ACA TGG AAT GTC TGC CAA TGA CT R: AAT GGA ACC TAC CAG ACC TGG G | 62 | 400 |
| GAPDH | F: AGG TCG GAG TCA ACG GAT TT R: ATG AAG GGG TCA TTG ATG GCA | 62 | 400 |

3.5 Coleta do meio condicionado.

Imediatamente após os tratamentos descritos anteriormente, as células da linhagem Luc4 foram cultivadas por 24h com meio da linhagem NK92-MI para

coleta do meio condicionado e posterior análise do efeito do mesmo na expressão de receptores nas células NK92-MI. Assim, após este período, o meio condicionado foi coletado, centrifugado, na centrífuga Centrifuge 5810 R (appendorf), com 1500 rpm por 5 min em temperatura ambiente. O sobrenadante foi então removido e armazenado no freezer -80°C.

3.6 Tratamento das células NK92-MI com meio condicionado

Para avaliação do efeito do meio condicionado das células da linhagem Luc4 na expressão de receptores na linhagem NK92-MI, 2×10^6 células NK92-MI foram incubadas com meio condicionado na proporção 1:1 (meio condicionado: meio de cultivo não condicionado) por 24h. Após este período, as células foram coletadas e incubadas com os anticorpos descritos a seguir.

3.7 Análise da expressão de HLA-ABC, NKp30, NKp44, NKp46 e NKG2D por citometria de fluxo

Após 24h da TFD, as células das linhagens Ca1 e Luc4 foram incubadas com os anticorpos anti-HLA-ABC PE Cy7 (1:800, Biolegend, W6-32) por 30 min a 4°C, bem como com seu respectivo controle isotípico (1:2400, IgG2a PE Cy7, Biolegend). Após este período, as células foram lavadas com PBS+BSA1%, centrifugadas, ressuspensas em PBS+BSA1% contendo 100ng/mL de DAPI para exclusão de células mortas.

Para identificação da expressão de Nkp30, Nkp44, NKp46 e NKG2D na linhagem NK92-MI após 24h de cultivo no meio condicionado da linhagem Luc4 dos diferentes grupos (Controle, 5-ALA, LED e TFD), as mesmas, foram incubadas com os anticorpos primários e controles isotípicos descritos na Tabela 2 por 30 min a 4°C. Após este período, as células foram lavadas com PBS+BSA1%, centrifugadas, ressuspensas em PBS+BSA1% contendo 100ng/mL de DAPI.

Um mínimo de 10.000 eventos foi adquirido utilizando-se o software FlowJo v10.0 e o equipamento FACS Canto II (BD Biosciences). A porcentagem de células positivas para HLA-ABC, Nkp30, Nkp44, NKp46 e NKG2D foi avaliada em dois experimentos independentes.

Tabela 2- Descrição dos anticorpos e controles isotípicos utilizados na citometria de fluxo.

| Anticorpo | Marca/Clone | Diluição |
|------------------------|--------------------|-----------------|
| anti-Nkp30 PE Cy7 | Biolegend/P30-15 | 1:500 |
| anti-HLA-PE Cy7 | Biolegend/W6/32 | 1:800 |
| anti-Nkp44 PerCP 5.5 | Biolegend/P44-8 | 1:100 |
| anti-Nkp46 PE Cy7 | Biolegend/9E2 | 1:100 |
| Anti-NKG2D PerCP 5.5 | Biolegend/1D11 | 1:100 |
| Isotipo IgG1 PE Cy7 | Biolegend/RMG1-1 | 1:500 |
| Isotipo IgG1 PerCP 5.5 | Biolegend/RMG1-1 | 1:400 |

3.8 Análise estatística

Os dados foram avaliados em relação à normalidade utilizando-se o teste de Shapiro-Wilk. Em seguida, a comparação entre os diferentes grupos foi realizada por meio da análise de variância ANOVA seguido pelo teste de Dunn's para dados não paramétricos e Teste de Tukey para dados paramétricos utilizando-se o software GraphPad Prism (Versão 7.04, Graphpad, USA). O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Análise da viabilidade celular após a TFD

A viabilidade das linhagens celulares Ca1 e Luc4 nos diferentes grupos foi avaliada após 24h da TFD, por Alamar Blue e CV (Figura 4). No ensaio de viabilidade por Alamar Blue, as linhagens Ca1 e Luc4 mostraram uma diminuição significativa na porcentagem de células viáveis quando comparada aos demais grupos ($p < 0,05$ e $p < 0,0001$, respectivamente) (Figura 4A e 4B). Adicionalmente, foi observado aumento significativo da viabilidade no grupo LED em comparação ao grupo 5-ALA ($p < 0,05$; Figura 4B).

No ensaio por CV, o grupo TFD demonstrou uma diminuição significativa na porcentagem de células viáveis quando comparado ao grupo controle, 5-ALA e LED em ambas as linhagens ($p < 0,0001$; Figura 4C e 4D). Adicionalmente, foi observado aumento da viabilidade no grupo LED em comparação ao grupo 5-ALA tanto na linhagem Ca1 quanto Luc4 ($p < 0,05$; Figura 4C e 4D). O grupo 5-ALA da linhagem Luc4 mostrou uma diminuição significativa da viabilidade quando comparado com o grupo Controle ($p < 0,05$; Figura 4D).

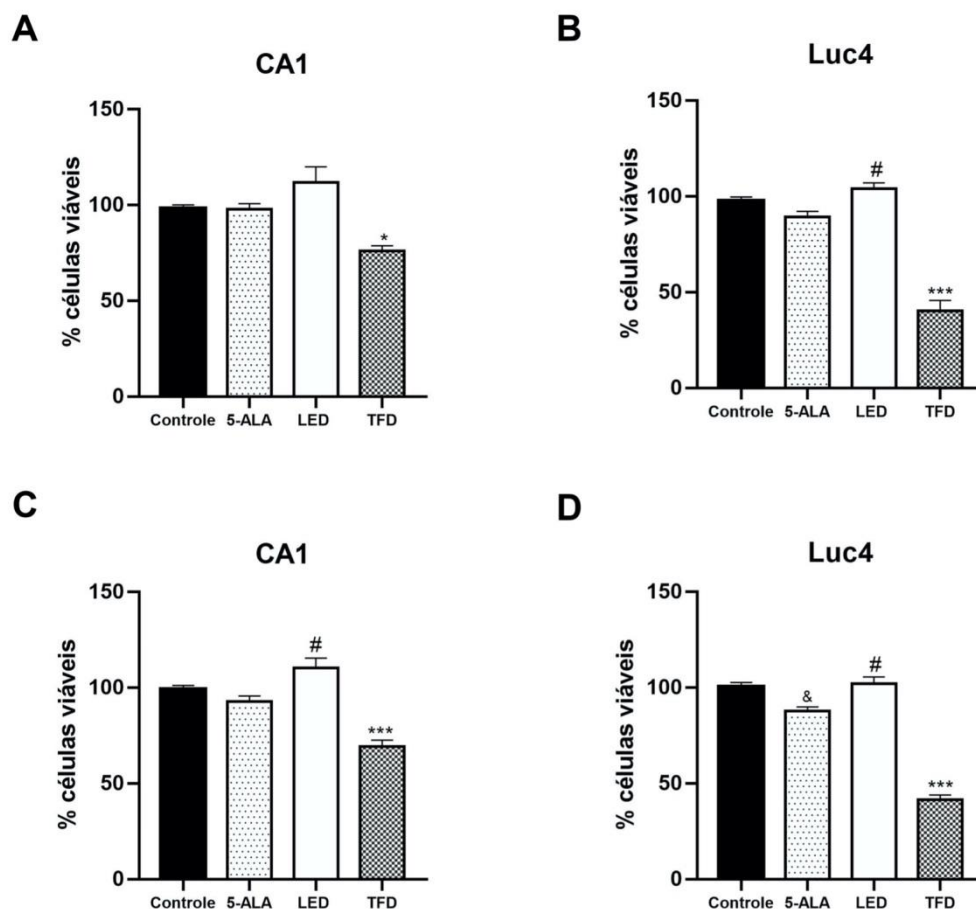


Figura 4: Análise da viabilidade celular por Alamar Blue e Cristal Violeta nas linhagens celulares Ca1 (**A** e **C**) e Luc4 (**B** e **D**) nos grupos Controle, 5-ALA, LED e TFD. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,0001$ no grupo TFD quando comparado aos demais grupos; # $p < 0,05$ entre o grupo LED e 5-ALA; & $p < 0,05$ entre o grupo 5-ALA e Controle. Dados expressos em média \pm EPM.

4.2 Análise da expressão de ligantes para ativação de células *Natural Killer* por PCR em tempo real

4.2.1 Expressão de *ULBP1*

Na linhagem Ca1 e Luc4, após 3h da TFD, houve um aumento significativo na expressão do gene *ULBP1* ($p < 0,001$) no grupo TFD quando comparado com os demais grupos (Figura 5A e 5D). No período 12h, o grupo TFD da linhagem Ca1 apresentou redução significativa dos níveis de mRNA de *ULBP1* em relação ao grupo controle e 5-ALA ($p < 0,05$) (Figura 5B). Adicionalmente, um aumento da expressão de *ULBP1* no grupo 5-ALA em relação aos grupos Controle e LED

($p < 0,05$) (Figura 5B). Na linhagem Luc4, em 12h, foi observado aumento da expressão de *ULBP1* no grupo LED em relação aos demais grupos ($p < 0,001$) (Figura 5E). No período 24h após a TFD, houve uma diminuição na expressão de *ULBP1* no grupo TFD quando comparado com os demais grupos tanto na linhagem Ca1 quanto Luc4 ($p < 0,001$ e $p < 0,05$, respectivamente) (Figura 5C e 5F). Adicionalmente, ambas as linhagens do grupo 5-ALA mostraram redução dos níveis de mRNA de *ULBP1* quando comparado com os grupos Controle e LED ($p < 0,05$) (Figura 5C e 5F). E, o grupo LED, houve aumento da expressão de *ULBP1* na linhagem Ca1 e diminuição na linhagem Luc4 em relação ao grupo Controle ($p < 0,0001$) (Figura 5C e 5F).

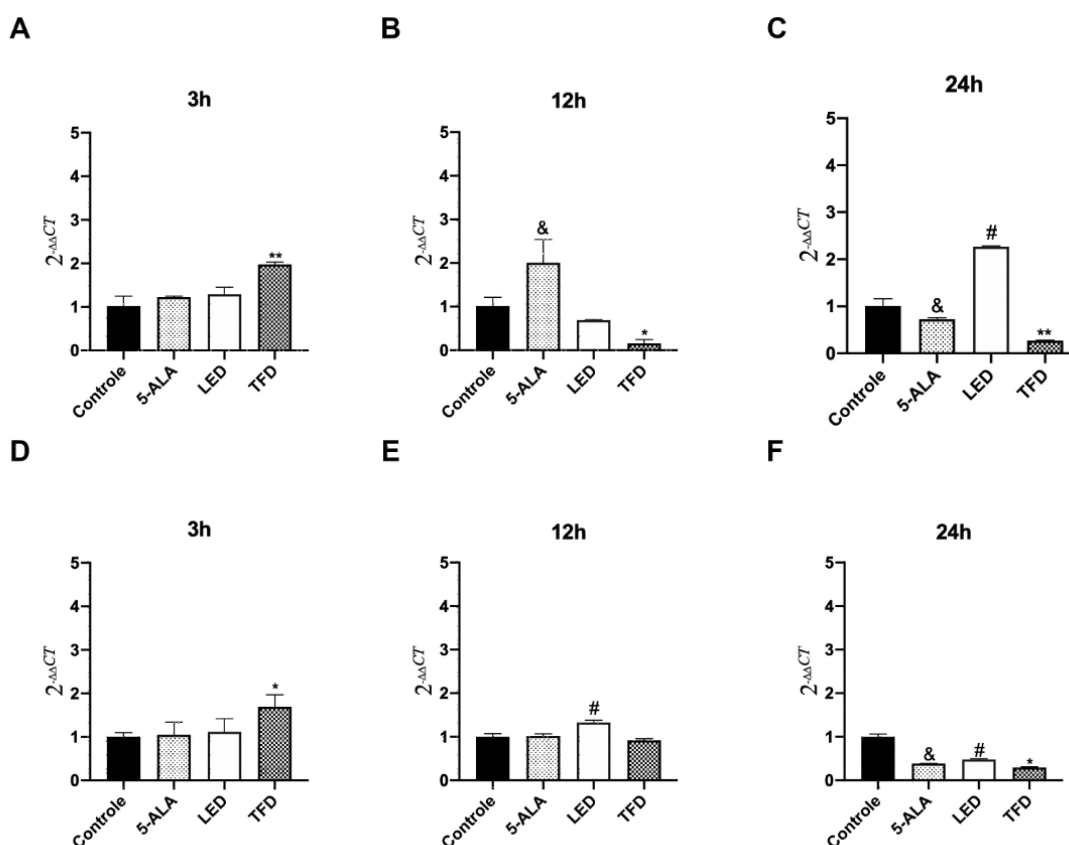


Figura 5: Análise da expressão do gene *ULBP1* na linhagem CA1 (A-C) e Luc4 em (D-F) nos grupos Controle, 5-ALA, LED e TFD nos períodos 3h, 12h e 24h após a TFD. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,001$ no grupo TFD em relação aos demais grupos. & $p < 0,05$ no grupo 5-ALA em relação aos grupos Controle e LED. # $p < 0,0001$ no grupo LED em relação ao Controle.

4.2.2 Expressão de *ULBP2*

Na linhagem Ca1, não houve diferença estatística entre os grupos na expressão de *ULBP2* no período 3h (Figura 6A). Após 12h, foi observada redução significativa dos níveis de mRNA do ligante *ULBP2* no grupo TFD e LED ($p < 0,05$) em relação ao grupo Controle e 5-ALA (Figura 6B). Em 24h, houve diminuição de *ULBP2* no grupo TFD em relação ao grupo Controle e LED ($p < 0,05$) e um aumento na expressão no grupo LED ($p < 0,0001$) em relação aos grupos 5-ALA e Controle (Figura 6C).

Na linhagem Luc4, houve uma diminuição significativa dos níveis de mRNA de *ULBP2* no grupo TFD ($p < 0,05$) no período 3h em relação aos demais grupos (Figura 6D). No período 12h, houve diminuição de *ULBP2* no grupo TFD em relação ao grupo 5-ALA ($p < 0,05$) e uma diminuição significativa nos grupos 5-ALA e LED ($p < 0,001$ e $p < 0,05$, respectivamente) em relação ao grupo controle (Figura 6E). Após 24h, a expressão de *ULBP2* ($p < 0,05$) diminuiu em relação aos grupos 5-ALA e Controle (Figura 6F).

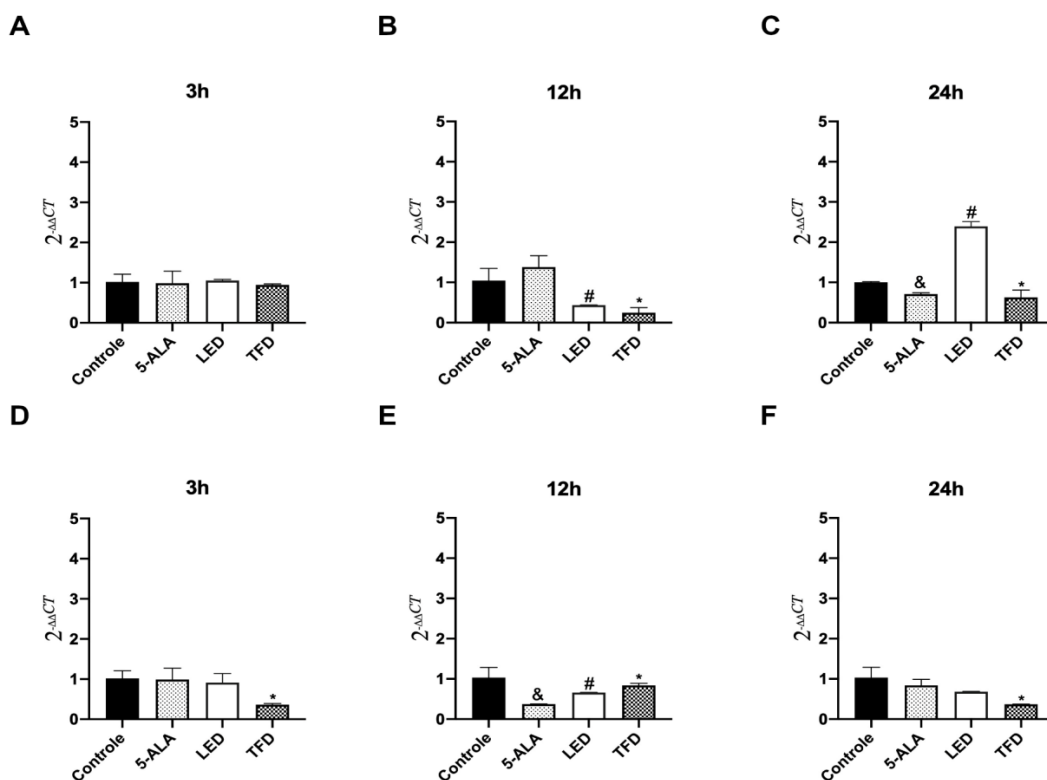


Figura 6: Análise da expressão do gene *ULBP2* na linhagem CA1 (A-C) e Luc4 em (D-F) nos grupos Controle, 5-ALA, LED e TFD nos períodos 3h, 12h e 24h após a TFD. * $p < 0,05$ no grupo TFD em relação aos demais grupos. & $p < 0,05$ no grupo 5-ALA em relação ao grupo Controle e/ou LED. # $p < 0,05$ no grupo LED em relação ao Controle e/ou 5-ALA.

4.2.3 Expressão de *ULBP3*

Na linhagem Ca1, houve uma diminuição significativa nos níveis de mRNA do ligante *ULBP3* no grupo TFD ($p < 0,05$) em relação ao grupo Controle após 3h (Figura 7A). No período 12h, também foi observada diminuição de *ULBP3* no grupo TFD ($p < 0,05$) quando comparado com o grupo 5-ALA e Controle bem como um aumento no grupo 5-ALA ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle e LED (Figura 7B). Em 24h, a expressão de *ULBP3* diminuiu no grupo TFD em relação aos demais grupos ($p < 0,05$) bem como aumentou no grupo LED ($p < 0,0001$) (Figura 7C).

Na linhagem Luc4, a expressão de *ULBP3* aumentou no grupo TFD após 3h e 12h em relação aos demais grupos ($p < 0,05$). Adicionalmente, houve uma diminuição dos níveis de mRNA de *ULBP3* no grupo LED em relação ao grupo 5-ALA e Controle e no grupo 5-ALA em relação ao grupo controle (Figura 7D-E). Após 24h, houve redução significativa da expressão de *ULBP3* em todos os grupos em relação ao Controle ($p < 0,05$) (Figura 7F).

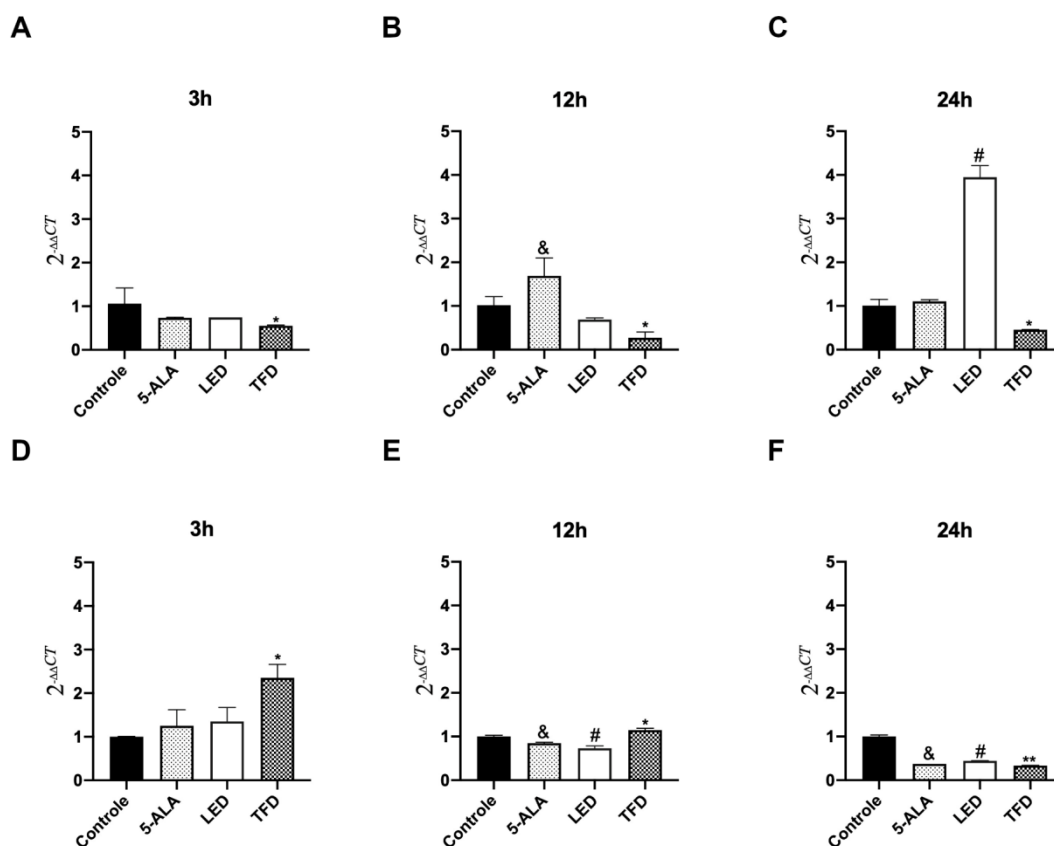


Figura 7: Análise da expressão do gene *ULBP3* nas linhagens CA1 (A-C) e Luc4 em (D-F) nos grupos Controle, 5-ALA, LED e TFD nos períodos 3h, 12h e 24h após a TFD. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$ no grupo TFD em relação aos demais grupos. & $p < 0,05$ no grupo 5-ALA em relação ao grupo Controle e/ou LED. # $p < 0,05$ no grupo LED em relação ao Controle e/ou 5-ALA.

4.2.4 Expressão de *ULBP4*

Não houve diferença na expressão gênica de *ULBP4* na linhagem Ca1 no período 3h (Figura 8A). No período 12h, houve redução de *ULBP4* no grupo TFD em relação aos grupos 5-ALA e Controle ($p < 0,05$) e um aumento no grupo 5-ALA em relação ao grupo Controle e LED ($p < 0,05$) (Figura 8B). Em 24h, houve uma diminuição significativa dos níveis de mRNA de *ULBP4* no grupo TFD em relação aos demais grupos ($p < 0,05$) e aumento no grupo LED em relação ao grupo 5-ALA e Controle ($p < 0,0001$) (Figura 8C).

Na linhagem Luc4, houve um aumento do gene *ULBP4* no grupo TFD nos períodos 3h e 12h em relação aos demais grupos ($p < 0,001$). Adicionalmente, foi observada diminuição de *ULBP4* no grupo LED em relação ao grupo 5-ALA e

Controle ($p < 0,05$) (Figura 8D-E). No período 24h, houve redução da expressão de *ULBP4* em todos os grupos quando comparado com o Controle (Figura 8F).

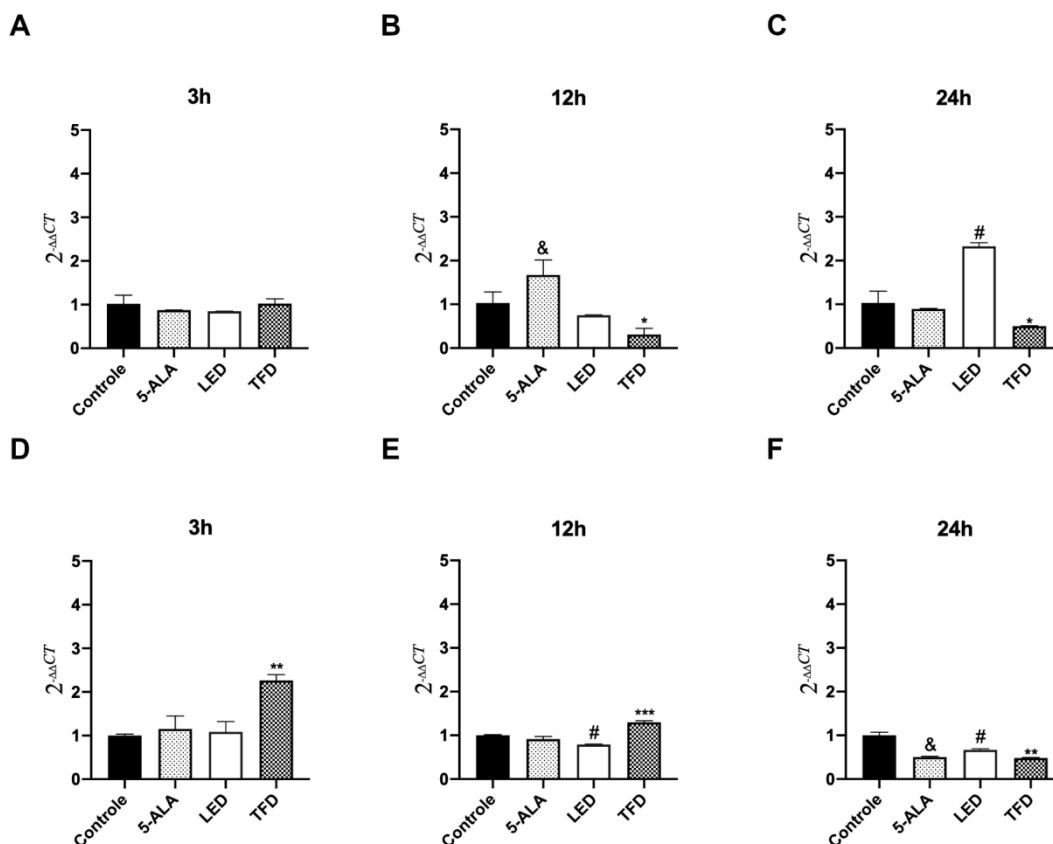


Figura 8: Análise da expressão do gene *ULBP4* nas linhagens CA1 (A-C) e Luc4 em (D-F) nos grupos Controle, 5-ALA, LED e TFD nos períodos 3h, 12h e 24h após a TFD. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,0001$ no grupo TFD em relação aos demais grupos. & $p < 0,05$ no grupo 5-ALA em relação ao grupo Controle e/ou LED. # $p < 0,05$ no grupo LED em relação ao Controle e/ou 5-ALA.

4.2.5 Expressão de *MICA/B*

Na linhagem Ca1 houve redução significativa *MICA/B* no grupo TFD e 5-ALA em relação ao grupo Controle ($p < 0,05$) nos períodos 3h e 12h (Figura 9A-B). Além disso, após 24h, os grupos 5-ALA e LED mostraram aumento significativo da expressão de *MICA/B* em relação aos grupos Controle e TFD ($p < 0,05$) (Figura 9C).

Na linhagem Luc4, a expressão de *MICA/B* reduziu em todos os grupos em relação ao grupo Controle ($p < 0,001$) no período de 3h (Figura 9D). Entretanto, após 12h e 24h, somente o grupo 5-ALA e LED, respectivamente,

mostraram aumento significativo nos níveis de *MICA/B* em relação aos demais grupos ($p < 0,05$) (Figura 9E-F).

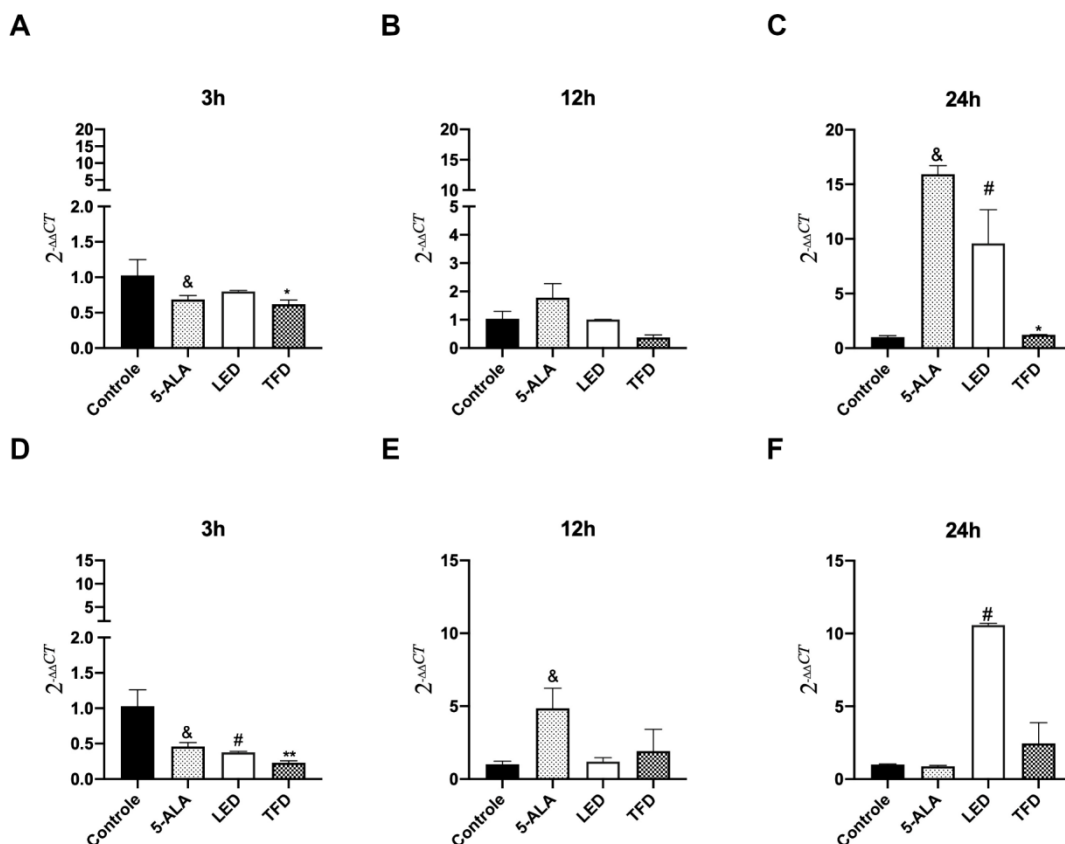


Figura 9: Análise da expressão do gene *MICA/B* nas linhagens CA1 (A-C) e Luc4 em (D-F) nos grupos Controle, 5-ALA, LED e TFD nos períodos 3h, 12h e 24h após a TFD. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,0001$ no grupo TFD em relação aos demais grupos. & $p < 0,05$ no grupo 5-ALA em relação ao grupo Controle e/ou LED. # $p < 0,05$ no grupo LED em relação ao Controle e/ou 5-ALA.

Os dados da expressão gênica das linhagens Ca1 e Luc4 nos diferentes períodos estão descritos de maneira resumida na Tabela 3. Em resumo, os dados da expressão gênica demonstraram que apenas o gene *ULBP1* aumentou após a TFD na linhagem Ca1. Além disso, houve redução na expressão das *ULBPs* avaliadas no grupo TFD após 12 e 24h. Por outro lado, houve aumento da expressão de *ULBP1*, *ULBP3* e *ULBP4* no grupo 5-ALA no período 12h bem como de *MICA/B* nos períodos de 3h e 24h. Interessantemente, o tratamento com LED aumentou a expressão de todos os genes avaliados após 24h do tratamento.

Na linhagem Luc4, a TFD foi capaz de aumentar a expressão dos genes *ULBP1*, *ULBP3* e *ULBP4* nos períodos 3h e 12h. Adicionalmente, houve

aumento da expressão de *MICA/B* no grupo 5-ALA e LED após 12h e 24h do tratamento, respectivamente bem como de *ULBP1* após 12h do tratamento. No geral, foi observada uma redução na expressão das ULPBs avaliadas após 24h da TFD.

Tabela 3: Avaliação da expressão dos genes *ULBP1*, *ULBP2*, *ULBP3*, *ULBP4* e *MICA/B* nas linhagens Ca1 e Luc4 nos diferentes períodos. Os dados estão expressos em relação ao grupo Controle.

| Linhagens/ períodos | <i>ULBP1</i> | | | | <i>ULBP2</i> | | | | <i>ULBP3</i> | | | | <i>ULBP4</i> | | | | <i>MICA/B</i> | | | | |
|------------------------|--------------|-------|-----|-----|--------------|-------|-----|-----|--------------|-------|-----|-----|--------------|-------|-----|-----|---------------|-------|-----|-----|---|
| | Cont | 5-ALA | LED | TFD | Cont | 5-ALA | LED | TFD | Cont | 5-ALA | LED | TFD | Cont | 5-ALA | LED | TFD | Cont | 5-ALA | LED | TFD | |
| Ca1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 3h | | | | ↑ | | | S# | | | | | ↓ | | | | S# | | | ↑ | | ↓ |
| 12h | | ↑ | | ↓ | | | ↓ | ↓ | | ↑ | | ↓ | | ↑ | | ↓ | | | S# | | |
| 24h | | ↓ | ↑ | ↓ | | | ↑ | ↓ | | | ↑ | ↓ | | | ↑ | ↓ | | ↑ | ↑ | | |
| Luc4 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 3h | | | | ↑ | | | | ↓ | | | | ↑ | | | | ↑ | | ↓ | ↓ | | ↓ |
| 12h | | | ↑ | | | ↓ | ↓ | | | ↓ | ↓ | ↑ | | | ↓ | ↑ | | ↑ | | | |
| 24h | | ↓ | ↓ | ↓ | | | | ↓ | | ↓ | ↓ | ↓ | | ↓ | ↓ | ↓ | | | ↑ | | |

4.3 Análise da expressão de HLA-ABC após 24h da TFD

Foi observada uma redução significativa na expressão de HLA-ABC do grupo TFD na linhagem Ca1 quando comparado ao grupo Controle, considerando-se a intensidade de fluorescência ($p < 0,05$) e a porcentagem de células positivas e, no grupo 5-ALA em relação ao grupo Controle ($p < 0,05$) (Figura 10A, 10C e 10E). Na linhagem Luc4, não houve diferença significativa na porcentagem de células positivas para HLA-ABC e nem na intensidade de fluorescência no grupo TFD em relação aos demais grupos, embora uma redução na expressão de HLA-ABC tenha sido observada (Figura 10B, 10D e 10F).

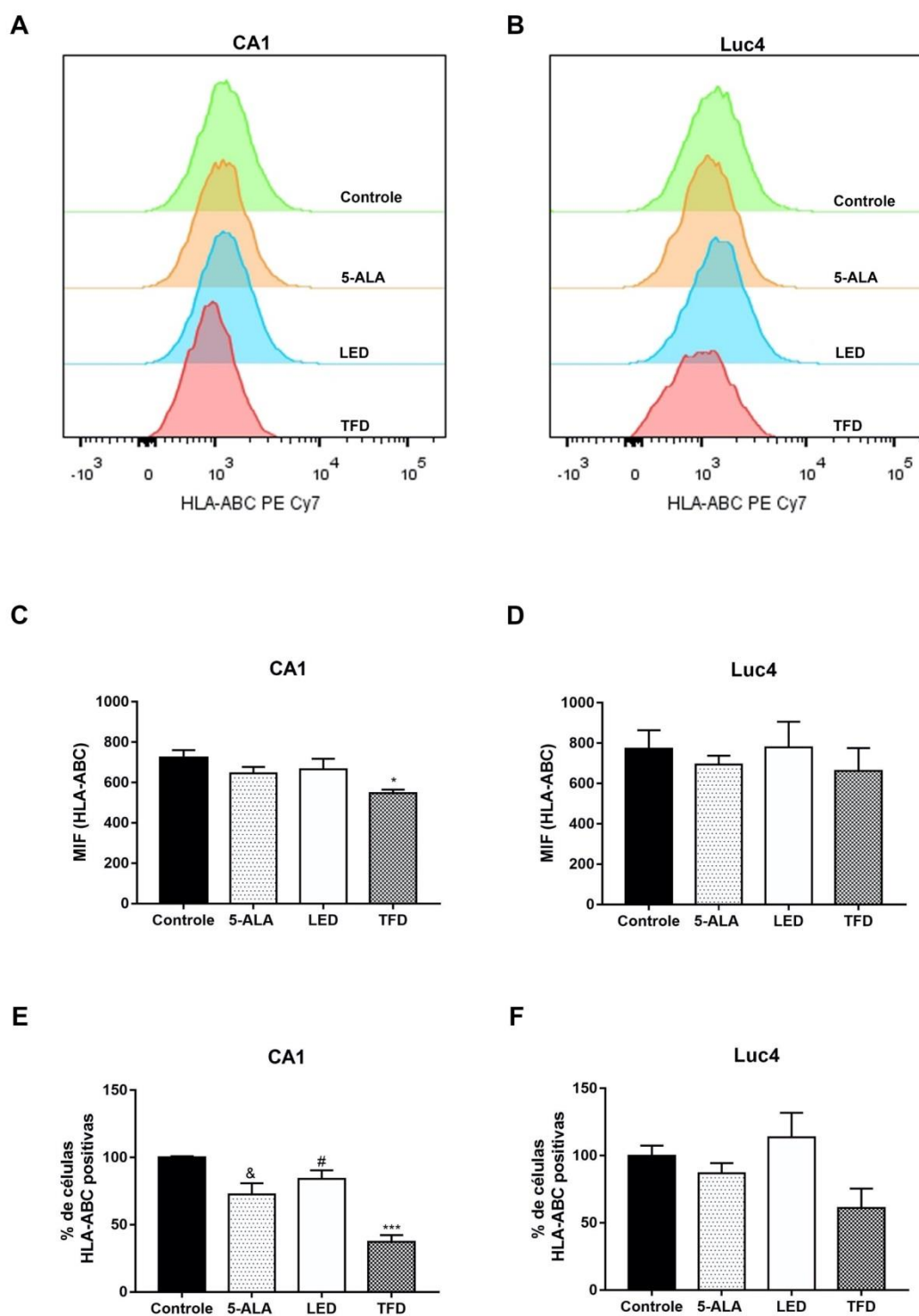


Figura 10: Histograma representativo da expressão de HLA-ABC nas linhagens Ca1 **(A)** e Luc4 **(B)** dos grupos Controle, 5-ALA, LED e TFD. Análise da intensidade de fluorescência e porcentagem de células marcadas para HLA-ABC na linhagem Ca1 **(C e E)** e na linhagem Luc4 **(D e F)**. * $p < 0,05$ no grupo TFD quando comparado aos demais grupos ou somente ao grupo Controle; & $p < 0,05$ no grupo 5-ALA em relação ao grupo controle.

4.4 Análise da expressão de receptores de células NK após 24h de cultivo no meio condicionado

Não houve diferença na expressão de NKp30 na linhagem NK92-MI quando as células foram cultivadas com os diferentes meios condicionados da linhagem Luc4 (Figura 11).

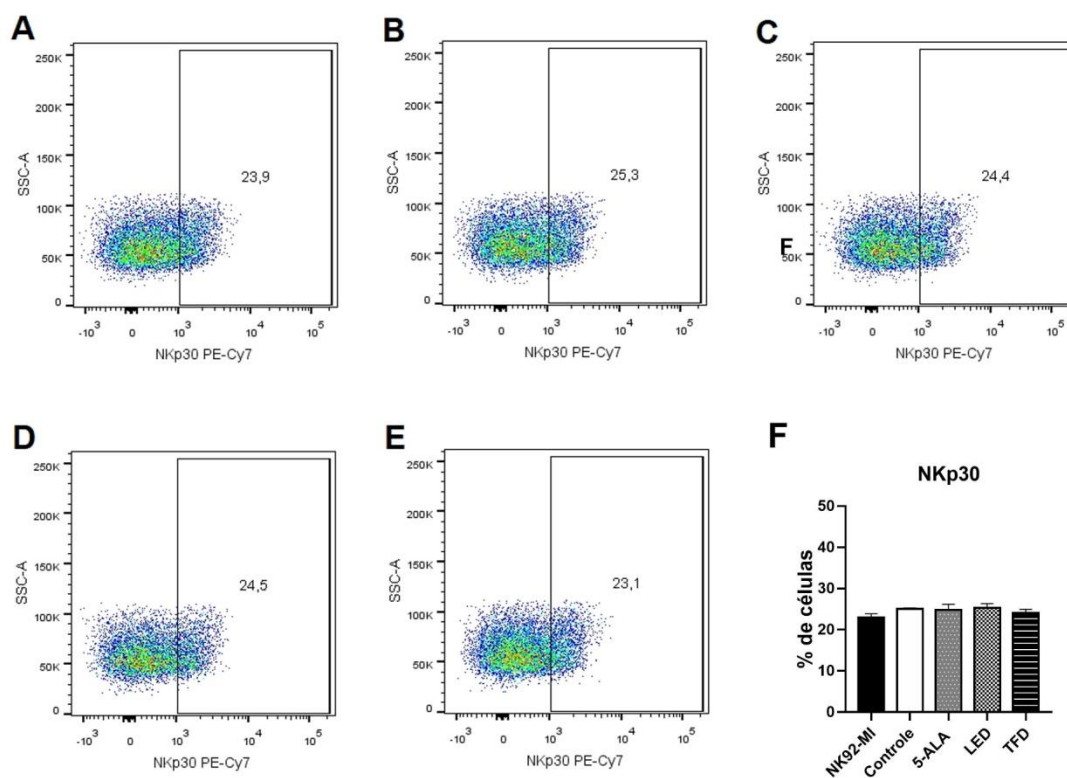


Figura 11: Análise da expressão de NKp30 nos grupos NK92-MI (A), Controle (B), 5-ALA (C), LED (D) e TFD (E) por citometria de fluxo. Avaliação da porcentagem de células positivas para NKp30 nos diferentes grupos (F).

Foi observado aumento da expressão de NKp44 nas células NK92-MI incubadas com o meio condicionado dos grupos Controle, 5-ALA e LED em relação ao grupo NK92-MI (células cultivadas em meio sem condicionamento) ($p < 0,05$) (Figura 12F). Não houve alteração na expressão de Nkp44 após o cultivo com meio condicionado do grupo TFD quando comparado com o grupo NK92-MI.

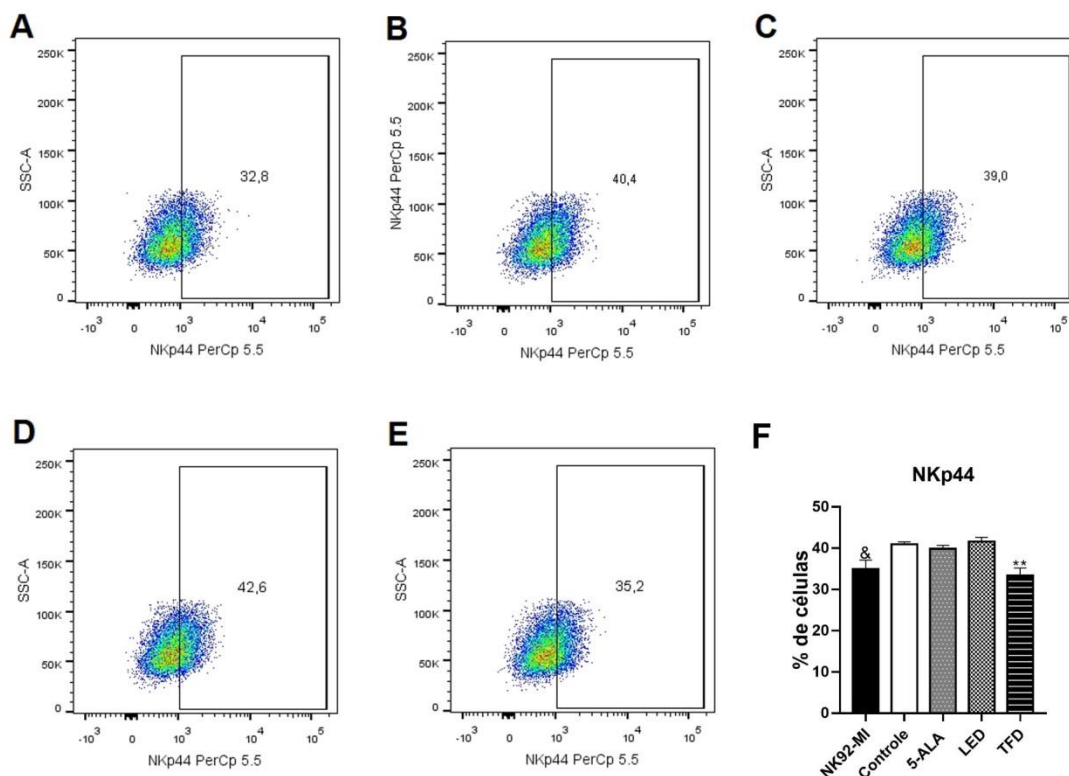


Figura 12: Análise da expressão de NKp44 nos grupos NK92-MI (A), Controle (B), 5-ALA (C), LED (D) e TFD (E) por citometria de fluxo. Avaliação da porcentagem de células positivas para NKp44 nos diferentes grupos. & $p < 0,05$ no grupo NK92-MI e ** $p < 0,001$ no grupo TFD em relação aos grupos Controle, 5-ALA e LED.

Não houve diferença na expressão de NKp46 na linhagem NK92-MI quando as células foram cultivadas com os diferentes meios condicionados da linhagem Luc4 (Figura 13).

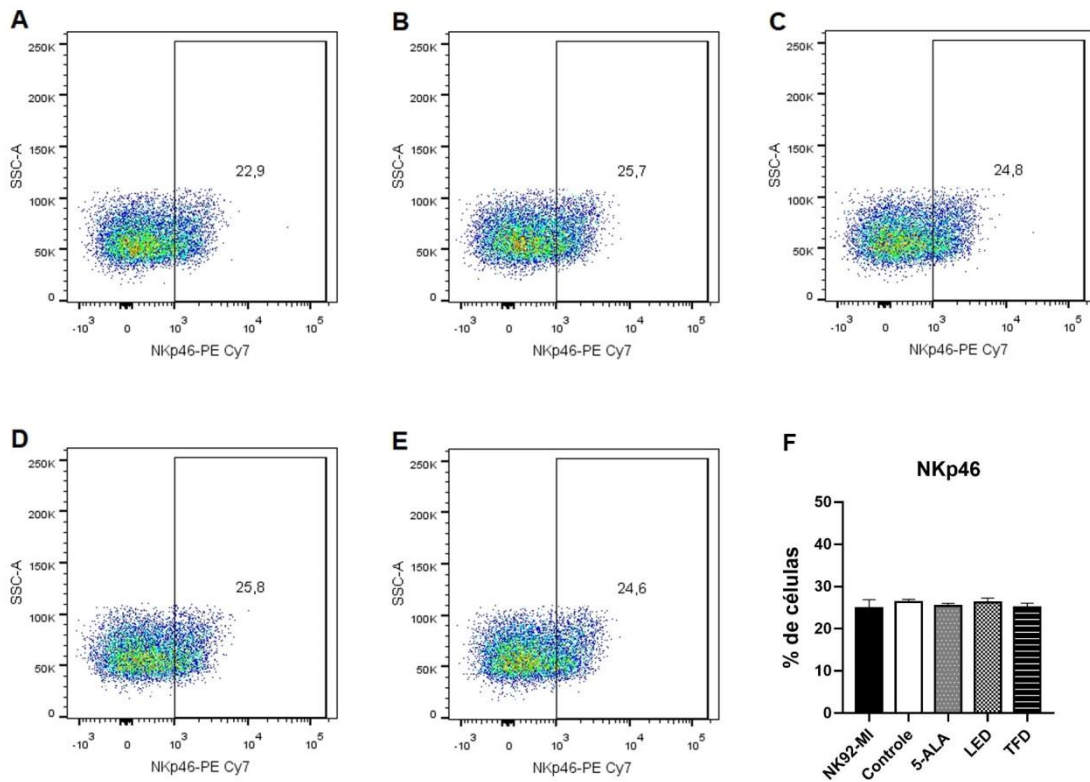


Figura 12: Análise da expressão de NKp46 nos grupos NK92-MI (A), Controle (B), 5-ALA (C), LED (D) e TFD (E) por citometria de fluxo. Avaliação da porcentagem de células positivas para NKp46 nos diferentes grupos (F).

As células NK92-MI incubadas com o meio condicionado do grupo TFD mostraram uma redução significativa da porcentagem de células positivas para NKG2D em relação ao grupo Controle, 5-ALA e LED ($p < 0,05$). Porém, nenhuma diferença foi observada em relação ao grupo NK92-MI. Adicionalmente, foi observado aumento da expressão de NKG2D nas células NK92-MI incubadas com o meio condicionado dos grupos Controle, 5-ALA e LED em relação ao grupo NK92-MI (células cultivadas em meio sem condicionamento) ($p < 0,05$) (Figura 14F).

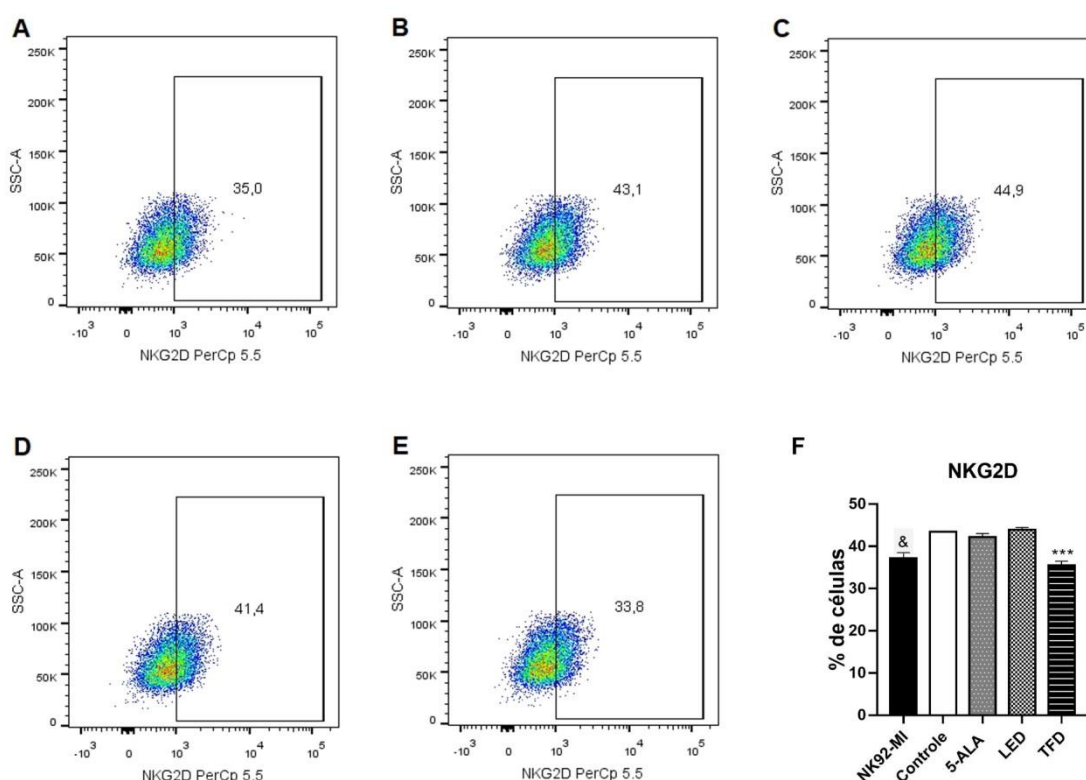


Figura 12: Análise da expressão de NKG2D nos grupos NK92-MI (A), Controle (B), 5-ALA (C), LED (D) e TFD (E) por citometria de fluxo. Avaliação da porcentagem de células positivas para NKG2D nos diferentes grupos. & $p < 0,05$ no grupo NK92-MI e *** $p < 0,001$ no grupo TFD em relação aos grupos Controle, 5-ALA e LED.

5 DISCUSSÃO

Alguns estudos demonstram que a TFD possui potencial elevado para uso coadjuvante com a Imunoterapia devido à indução de EROS, que por sua vez podem induzir a expressão de alguns ligantes e/o receptores de células da imunidade inata bem como aumentar sua citotoxicidade^{29,52,58}. Neste contexto, a TFD apresenta-se como uma alternativa terapêutica não somente pelo seu efeito direto nas células tumorais induzindo sua morte por apoptose e/ou necrose, mas também devido à sua capacidade de promover imunidade anti-tumoral^{28,58}.

A TFD induz uma inflamação aguda que contribui consideravelmente para o controle a longo prazo do crescimento tumoral⁵⁸. Esta inflamação é caracterizada pelo aumento da expressão de diversas citocinas pró-inflamatórias incluindo TNF- α , IL-1 β e IL-6, moléculas de adesão, E-selectina, ICAM e rápido influxo de leucócitos no leito tumoral, principalmente neutrófilos⁵⁹. Adicionalmente, estudos demonstraram que o tratamento de tumores primários com a TFD é capaz de promover o controle de tumores metastáticos, sendo este controle dependente de células NK, as quais são necessárias para promover a ativação de linfócitos T CD8⁵³. No CEO, Theodoraki et al. demonstraram aumento significativo na frequência de células NK após a TFD em relação à porcentagem de células observada em pacientes saudáveis, bem como aumento de citocinas pró-inflamatórias, sugerindo que a TFD resulta numa resposta inflamatória sistêmica anti-tumoral favorável, o que pode contribuir para um melhor controle do CEO, principalmente quando aliada às células NK ou terapias imunomoduladoras⁶⁰.

Entretanto, no CEO, o efeito da TFD na modulação de ligantes de receptores para ativação das células NK é desconhecido, o que pode favorecer para o entendimento de como esta terapia pode contribuir para ativação da resposta imune inata mediada pelas células NK. Desta maneira, neste estudo, primeiramente avaliamos o efeito da TFD na viabilidade celular de duas linhagens de CEO para determinação do parâmetro de irradiação. Estudos prévios demonstraram efeito inibitório da viabilidade celular com o Fs 5-ALA utilizando-se irradiação com laser e exposição radiante de 6J/cm² em linhagem celular derivada de CEO^{16,61}. Corroborando estes achados, foi observada uma redução de aproximadamente 70% e 45% da viabilidade celular nas linhagens

celulares Ca1 e Luc4, respectivamente, indicando que a linhagem Luc4 é mais susceptível à TFD. Ying et al. demonstraram que a viabilidade celular em linhagem derivada de carcinoma epidermoide oral (SCC25) diminuiu com o uso da TFD com 5-ALA em relação ao grupo controle⁶¹. Tal diminuição está associada ao fato de que a TFD induz a produção de EROS, responsáveis pelo dano oxidativo e indução da morte celular⁶¹.

Nos seres humanos, existem dois tipos principais de ligantes para NKG2D, que é o receptor que está associado a ativação do potencial citotóxico das células NK e linfócitos TCD8+⁶². O primeiro é uma família de proteínas A e B relacionadas à cadeia de classe I (*MICA/B*) e o segundo uma família de seis proteínas de ligação única de citomegalovírus longo 16 (UL16) que engloba as *ULBPs* de 1-6. Estas moléculas são expressas em condições de estresse, infecções e transformação celular, incluindo células tumorais e células epiteliais durante o processo de transformação maligna^{48,62}. Após a interação do ligante com o receptor presente nas células NK, as mesmas são ativadas, resultando na liberação de granzima B e perforina, os quais promovem a morte das células alvo⁴¹. Adicionalmente, células NK ativadas secretam IFN γ e TNF α , os quais contribuem para a inflamação aguda e ativação da resposta imune adaptativa⁶². Vale ressaltar que *MICA/B* e as *ULBPs* são expressas em uma ampla gama de tumores epiteliais, como carcinoma de cólon, câncer de mama, neuroblastoma entre outros⁶³.

Uma vez que a expressão de ligantes para NKG2D pode tornar as células tumorais mais susceptíveis ao ataque pelas células NK, e os efeitos da TFD são iniciados pela formação de EROS, este estudo avaliou quando a TFD contribui para o aumento da expressão de ligantes de NKG2D em duas linhagens derivadas de CEO. Assim, observamos que houve uma modulação da expressão gênica dependente da linhagem e do tempo após a TFD. Na linhagem Ca1, a TFD foi capaz de aumentar somente os níveis de mRNA de *ULBP1* após 3h do tratamento. Por outro lado, na linhagem Luc4, mais susceptível à TFD, foi observado aumento da expressão dos genes *ULBP1*, *ULBP3* e *ULBP4* nos períodos 3h e 12h no grupo TFD. Park et al. avaliaram a expressão dos ligantes *ULBP1*, *ULBP2*, *ULBP3* e *MICA/B* em linhagens de adenocarcinoma de estômago e carcinoma de pulmão 3h e 6h após a TFD e observaram que essa terapia regula positivamente a expressão dos ligantes para o receptor NKG2DLs

nas células tumorais e, conseqüentemente, aumenta a suscetibilidade das células tumorais contra as células NK, sendo esta regulação relacionada com o tempo⁵⁵. Entretanto, vale ressaltar que estes autores utilizaram doses subletais de TFD, na qual a viabilidade celular foi mantida em 97%, diferentemente da dose utilizada em nosso estudo, na qual obtivemos entre 45-70% de redução da viabilidade.

Belicha-Villanueva et al. demonstrara que a TFD associada ao Fs HPPH, em estudo *in vitro* e *in vivo*, não induziu um aumento na expressão de *MICA/B*, sugerindo que a expressão de *MICA/B* é independente do estresse oxidativo ou que a meia-vida de EROS induzida pela TFD seja muito curta para permitir a indução da expressão deste gene⁵². Possivelmente, tal fato pode ter contribuído para que a expressão de *MICA/B* não tenha sido aumentada após a TFD. Por outro lado, estudos demonstraram que *MICA/B* são induzidas pelo estresse oxidativo^{64,65}. Por exemplo, Hedlund et al. demonstram que em linhagens derivadas de leucemia de células T e B que foi induzido estresse termal ou oxidativo houve um aumento na expressão de NKG2D, entre eles, do ligante *MICA/B*⁶⁵.

Interessantemente, foi observado que houve um aumento na expressão dos genes *ULBP1*, *ULBP2*, *ULBP3*, *ULBP4* e *MICA/B* na linhagem Ca1 e de *MICA/B* na linhagem Luc4 após 24h do tratamento no grupo LED. Rupel et al. demonstraram que a irradiação com laser 660nm aumenta a produção de EROS antes e depois do tratamento de queratinócitos com estímulo oxidativo⁶⁶. Assim, é possível que a FBM tenha causado um aumento na produção de EROS e contribuído para o aumento tardio da expressão dos ligantes de NKG2D. Vale ressaltar que na TFD, o aumento na expressão das *ULBPs* ocorreu após 3h e 12h, indicando um efeito mais precoce da TFD, possivelmente associado ao efeito imediato da mesma na formação de EROS.

Acredita-se que um dos efeitos benéficos da FBM no câncer seja seu possível efeito na estimulação do sistema imunológico contra as células tumorais⁶⁷. Ottaviani et al utilizaram um modelo *in vivo* de melanoma e três protocolos diferentes de FBM (660 nm, 50 mW/cm², 3 J/cm²; 800 ou 970 nm, 200 mW/cm², 6 J/cm², uma vez por dia durante 4 dias) para avaliar a resposta imunológica após o tratamento. Foi observada redução da taxa de crescimento tumoral bem como aumento do recrutamento de células imunes, principalmente

linfócitos T e células dendríticas⁶⁸. Adicionalmente, Petrellis et al. demonstraram que exposição radiante de 35 J/cm² induz um aumento significativo de IL-1 β , COX2 e iNOS em tumores de Walker em ratos, bem como redução de IL-6, IL-10 e TNF α , favorecendo desta maneira a formação de EROS e inflamação aguda que pode contribuir para o controle do tumor⁶⁹. É importante ressaltar que não se sabe o efeito da FBM na ativação e recrutamento de células NK. Entretanto, os resultados aqui obtidos indicam que esta terapia aumenta a expressão de ligantes para NKG2DL, o que poderia favorecer uma maior ativação destas células e potencializar seu papel anti-tumoral. Estudos futuros *in vitro* e *in vivo* devem ser conduzidos para o entendimento da FBM na modulação da resposta imune mediada pelas células NK.

As células tumorais podem ativar as funções efetoras das células NK como citotoxicidade, pela produção de citocinas e proliferação por meio da perda da expressão do complexo MHC de classe I (HLA) ou pela elevada expressão de ligantes que ativam receptores das células NK⁷⁰. Blom et al. analisaram a expressão de HLA-ABC após a TFD com HPE (hematoporfirina ester) em melanoma e demonstraram que 2h e 6h após o tratamento houve uma diminuição na expressão de HLA-ABC. Tal diminuição possivelmente foi causada pelo fato dos aminoácidos histidina, triptofano e principalmente a cisteína serem muito sensíveis à TFD, provocando uma alteração na estrutura das moléculas HLA-ABC⁷¹. No presente estudo, uma diminuição significativa na expressão de HLA-ABC no grupo TFD foi observada na linhagem Ca1, indicando que possivelmente, nesta linhagem, a perda de HLA-ABC pode ser um dos mecanismos pelo qual as células tumorais possam se tornar mais susceptíveis às células NK, uma vez que não encontramos uma modulação dos ligantes para NKG2D nesta linhagem. Park et al. também observaram aumento da expressão de HLA-ABC após a TFD mediada pelo Fs hematoporfirina em linhagem celular derivada de adenocarcinoma de estômago e carcinoma de pulmão⁵⁵.

Pende et al. analisaram a expressão de receptores de ativação de células NK (NKG2D, NKp30, NKp44 e NKp46), em diferentes linhagens de diferentes tumores, que são os receptores envolvidos no desencadeamento da citotoxicidade mediada por células NK, sendo NKG2D um receptor de molécula de lectina do tipo C e os demais pertencem à superfamília das imunoglobulinas e representam os primeiros membros de um grupo de receptores denominados

coletivamente NCRs (Receptores de Células NK), nos quais são conhecidos apenas os NKG2DLs⁷². Foi visto que o bloqueio de um ou outro tipo de receptor resultou em diferentes efeitos inibitórios, dependendo da fonte de célula alvo analisada e com isso, para avaliar apenas o potencial citotóxico de NKG2D os NCRs foram bloqueados. No entanto, o nível de expressão de NKG2D se manteve igual mesmo com o bloqueio dos NCRs, constatando que ele tem uma ativação independente. Com isso, foi visto aumento na expressão do receptor NKG2D e que a ativação do receptor NKG2D está relacionada diretamente a expressão de ligantes *MICA/B* e *ULBP1-4* e que a correlação entre a expressão de ligantes NKG2D e a suscetibilidade aumentada à promoção de lise celular nem sempre pode ser observada quando células NK ativadas são usadas como células efetoras. Tal achado foi atribuído a presença de receptores desencadeantes adicionais, como o NKp44⁷².

Após a TFD as células tumorais secretam citocinas pró-inflamatórias, como DAMPs e IL1- β e TNF- α , promovem ativação das caspases, recrutamento rápido de neutrófilos, macrófagos e células dendríticas (CDs)¹⁴. Para entender como moléculas secretadas pelas células tumorais após a TFD poderiam modular a expressão de receptores das células NK e contribuir assim para uma maior citotoxicidade, a expressão dos receptores Nkp30, Nkp44, Nkp46 e NKG2D foi avaliada após o cultivo com o meio condicionado dos diferentes grupos na linhagem Luc4. Esta linhagem foi selecionada porque a mesma apresentou menor viabilidade celular após a TFD bem como maior modulação dos ligantes para NKG2D. Entretanto, não observamos um aumento da expressão destes receptores nas células NK92-MI após cultivo com meio condicionado do grupo TFD. Somente os receptores Nkp44 e NKG2D apresentaram aumento da expressão após cultivo com os meios condicionados nos grupos Controle, 5-ALA e LED. Tal achado pode se dar pelo fato da TFD, através da produção de EROS, poder induzir alterações nas linhagens tumorais que podem clivar os NKG2DLs e assim impedir a ativação da célula NK pelo receptor NKG2D e do receptor NKp44, que é expresso apenas na célula NK ativada⁷².

6 CONCLUSÃO

- A TFD foi capaz de diminuir a viabilidade celular das linhagens celulares Ca1 e Luc4, derivadas de CEO.
- Após a TFD, houve um aumento da expressão de *ULBP1* na linhagem Ca1 no período de 3h e dos genes *ULBP1*, *ULBP2* e *ULBP4* na linhagem Luc4 nos períodos de 3h e 12h, o que pode favorecer para uma maior susceptibilidade destas células à citotoxicidade mediada pelas células NK.
- O tratamento com 5-ALA e LED foi capaz de promover aumento da expressão dos genes *ULBP1*, *ULBP2*, *ULBP3*, *ULBP4* na linhagem Ca1 nos períodos de 12h e 24h e *MICA/B* no período 3h e, na linhagem Luc4 promoveu um aumento de *ULBP1* no período de 12h e *MICA/B* nos períodos de 12 e 24h.
- A TFD diminuiu a expressão de HLA-ABC na linhagem Ca1, podendo desta maneira aumentar a susceptibilidade desta linhagem à citotoxicidade mediada pelas células NK.
- A TFD não promoveu aumento da expressão dos receptores Nkp44 e NKGD2 da linhagem NK92-MI após o co-cultivo com meio condicionado da linhagem Luc4. Adicionalmente, houve aumento na expressão destes receptores após o cultivo com o meio condicionado dos grupos Controle, 5-ALA e LED. Em relação aos receptores Nkp30 e Nkp46, não foi observado efeito de nenhum meio condicionado na expressão dos mesmos.

7 REFERÊNCIAS

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin.* 2019 Jan;69(1):7-34. doi: 10.3322/caac.21551. Epub 2019 Jan 8. PMID: 30620402.
2. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics, 2017. *CA Cancer J Clin.* 2017 Jan;67(1):7-30. doi: 10.3322/caac.21387. Epub 2017 Jan 5. PMID: 28055103.
3. <https://www.inca.gov.br/estimativa/estado-capital/brasil>
4. Tumban E. A Current Update on Human Papillomavirus-Associated Head and Neck Cancers. *Viruses.* 2019 Oct 9;11(10):922. doi: 10.3390/v11100922. PMID: 31600915; PMCID: PMC6833051.
5. Prince ME, Sivanandan R, Kaczorowski A, Wolf GT, Kaplan MJ, Dalerba P, Weissman IL, Clarke MF, Ailles LE. Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Jan 16;104(3):973-8. doi: 10.1073/pnas.0610117104. Epub 2007 Jan 8. PMID: 17210912; PMCID: PMC1783424.
6. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. – Rio de Janeiro: INCA, 2017.
7. Weckx A, Riekert M, Grandoch A, Schick V, Zöller JE, Kreppel M. Time to recurrence and patient survival in recurrent oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2019 Jul;94:8-13. doi: 10.1016/j.oraloncology.2019.05.002. Epub 2019 May 8. PMID: 31178216.
8. Kristianne Porta Santos Fernandes, Raquel Agnelli Mesquita Ferrari, Cristiane Miranda França. *Biofotônica- Princípios e Aplicações.* São Paulo, 2017.
9. Rodini CO, Lopes NM, Lara VS, Mackenzie IC. Oral cancer stem cells - properties and consequences. *J Appl Oral Sci.* 2017 Nov-Dec;25(6):708-715. doi: 10.1590/1678-7757-2016-0665. PMID: 29211293; PMCID: PMC5701542.
10. Stájer A, Kajári S, Gajdács M, Musah-Eroje A, Baráth Z. Utility of Photodynamic Therapy in Dentistry: Current Concepts. *Dent J (Basel).* 2020 May 7;8(2):43. doi: 10.3390/dj8020043. PMID: 32392793; PMCID: PMC7345245.
11. Piffaretti D, Burgio F, Thelen M, Kaelin-Lang A, Paganetti P, Reinert M, D'Angelo ML. Protoporphyrin IX tracer fluorescence modulation for improved brain tumor cell lines visualization. *J Photochem Photobiol B.* 2019 Dec;201:111640. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2019.111640. Epub 2019 Oct 16. Erratum in: *J Photochem Photobiol B.* 2020 Apr;205:111828. PMID: 31734545.

12. Fan HY, Zhu ZL, Zhang WL, Yin YJ, Tang YL, Liang XH, Zhang L. Light stimulus responsive nanomedicine in the treatment of oral squamous cell carcinoma. *Eur J Med Chem.* 2020 Aug 1;199:112394. doi: 10.1016/j.ejmech.2020.112394. Epub 2020 Apr 28. PMID: 32402938.
13. Fang CY, Chen PY, Ho DC, Tsai LL, Hsieh PL, Lu MY, Yu CC, Yu CH. miR-145 mediates the anti-cancer stemness effect of photodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid (ALA) in oral cancer cells. *J Formos Med Assoc.* 2018 Aug;117(8):738-742. doi: 10.1016/j.jfma.2018.05.018. Epub 2018 Jun 20. PMID: 29936107.
14. Agostinis P, Berg K, Cengel KA, Foster TH, Girotti AW, Gollnick SO, Hahn SM, Hamblin MR, Juzeniene A, Kessel D, Korbelik M, Moan J, Mroz P, Nowis D, Piette J, Wilson BC, Golab J. Photodynamic therapy of cancer: an update. *CA Cancer J Clin.* 2011 Jul-Aug;61(4):250-81. doi: 10.3322/caac.20114. Epub 2011 May 26. PMID: 21617154; PMCID: PMC3209659.
15. Krammer B, Plaetzer K. ALA and its clinical impact, from bench to bedside. *Photochem Photobiol Sci.* 2008 Mar;7(3):283-9. doi: 10.1039/b712847a. Epub 2007 Dec 7. PMID: 18389144.
16. Rosin FCP, Teixeira MG, Pelissari C, Corrêa L. Photodynamic Therapy Mediated by 5-aminolevulinic Acid Promotes the Upregulation and Modifies the Intracellular Expression of Surveillance Proteins in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Photochem Photobiol.* 2019 Mar;95(2):635-643. doi: 10.1111/php.13029. Epub 2018 Nov 16. PMID: 30267573.
17. Torezan L, Niwa AB, Neto CF. Terapia fotodinâmica em dermatologia: princípios básicos e aplicações [Photodynamic therapy in dermatology: basic principles]. *An Bras Dermatol.* 2009 Sep-Oct;84(5):445-59. Portuguese. doi: 10.1590/s0365-05962009000500002. PMID: 20098846.
18. Ogino T, Kobuchi H, Munetomo K, Fujita H, Yamamoto M, Utsumi T, Inoue K, Shuin T, Sasaki J, Inoue M, Utsumi K. Serum-dependent export of protoporphyrin IX by ATP-binding cassette transporter G2 in T24 cells. *Mol Cell Biochem.* 2011 Dec;358(1-2):297-307. doi: 10.1007/s11010-011-0980-5. Epub 2011 Jul 12. PMID: 21748335.
19. Broekgaarden M, Weijer R, van Gulik TM, Hamblin MR, Heger M. Tumor cell survival pathways activated by photodynamic therapy: a molecular basis for pharmacological inhibition strategies. *Cancer Metastasis Rev.* 2015 Dec;34(4):643-90. doi: 10.1007/s10555-015-9588-7. PMID: 26516076; PMCID: PMC4661210.
20. Franco R, Schoneveld O, Georgakilas AG, Panayiotidis MI. Oxidative stress, DNA methylation and carcinogenesis. *Cancer Lett.* 2008 Jul 18;266(1):6-11. doi: 10.1016/j.canlet.2008.02.026. Epub 2008 Mar 26. PMID: 18372104.
21. Dolmans DE, Fukumura D, Jain RK. Photodynamic therapy for cancer. *Nat Rev Cancer.* 2003 May;3(5):380-7. doi: 10.1038/nrc1071. PMID: 12724736.

22. Jerjes W, Upile T, Betz CS, El Maaytah M, Abbas S, Wright A, Hopper C. The application of photodynamic therapy in the head and neck. *Dent Update*. 2007 Oct;34(8):478-80, 483-4, 486. doi: 10.12968/denu.2007.34.8.478. PMID: 18019486.
23. Quon H, Grossman CE, Finlay JC, Zhu TC, Clemmens CS, Malloy KM, Busch TM. Photodynamic therapy in the management of pre-malignant head and neck mucosal dysplasia and microinvasive carcinoma. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2011 Jun;8(2):75-85. doi: 10.1016/j.pdpdt.2011.01.001. PMID: 21497298; PMCID: PMC3598575.
24. Qiao L, Mei Z, Yang Z, Li X, Cai H, Liu W. ALA-PDT inhibits proliferation and promotes apoptosis of SCC cells through STAT3 signal pathway. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2016 Jun;14:66-73. doi: 10.1016/j.pdpdt.2016.01.008. Epub 2016 Jan 21. PMID: 26805005.
25. Yu CH, Yu CC. Photodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid (ALA) impairs tumor initiating and chemo-resistance property in head and neck cancer-derived cancer stem cells. *PLoS One*. 2014 Jan 24;9(1):e87129. doi: 10.1371/journal.pone.0087129. PMID: 24475244; PMCID: PMC3901774.
26. Korbelik M, Dougherty GJ. Photodynamic therapy-mediated immune response against subcutaneous mouse tumors. *Cancer Res*. 1999 Apr 15;59(8):1941-6. PMID: 10213504.
27. Thong PS, Ong KW, Goh NS, Kho KW, Manivasager V, Bhuvaneshwari R, Olivo M, Soo KC. Photodynamic-therapy-activated immune response against distant untreated tumours in recurrent angiosarcoma. *Lancet Oncol*. 2007 Oct;8(10):950-2. doi: 10.1016/S1470-2045(07)70318-2. PMID: 17913664.
28. Kabingu E, Oseroff AR, Wilding GE, Gollnick SO. Enhanced systemic immune reactivity to a Basal cell carcinoma associated antigen following photodynamic therapy. *Clin Cancer Res*. 2009 Jul 1;15(13):4460-6. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-0400. Epub 2009 Jun 23. PMID: 19549769; PMCID: PMC2805024.
29. Couzin-Frankel J. Breakthrough of the year 2013. Cancer immunotherapy. *Science*. 2013 Dec 20;342(6165):1432-3. doi: 10.1126/science.342.6165.1432. PMID: 24357284.
30. Burnet M. Cancer: a biological approach. III. Viruses associated with neoplastic conditions. IV. Practical applications. *Br Med J*. 1957 Apr 13;1(5023):841-7. doi: 10.1136/bmj.1.5023.841. PMID: 13413231; PMCID: PMC1973618.
31. Thomas L. Discussion. Cellular and Humoral Aspects of the Hypersensitive States. *Hoeber-Harper*. 1959:529–532.

32. Vesely MD, Schreiber RD. Cancer immunoediting: antigens, mechanisms, and implications to cancer immunotherapy. *Ann N Y Acad Sci.* 2013 May;1284(1):1-5. doi: 10.1111/nyas.12105. PMID: 23651186; PMCID: PMC3648872.
33. Bruttel VS, Wischhusen J. Cancer stem cell immunology: key to understanding tumorigenesis and tumor immune escape? *Front Immunol.* 2014 Jul 29;5:360. doi: 10.3389/fimmu.2014.00360. PMID: 25120546; PMCID: PMC4114188.
34. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science.* 2011 Mar 25;331(6024):1565-70. doi: 10.1126/science.1203486. PMID: 21436444.
35. Vesely MD, Kershaw MH, Schreiber RD, Smyth MJ. Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu Rev Immunol.* 2011;29:235-71. doi: 10.1146/annurev-immunol-031210-101324. PMID: 21219185.
36. Castano AP, Mroz P, Hamblin MR. Photodynamic therapy and anti-tumour immunity. *Nat Rev Cancer.* 2006 Jul;6(7):535-45. doi: 10.1038/nrc1894. PMID: 16794636; PMCID: PMC2933780.
37. Costa NL, Alencar Rde C, Valadares MC, Silva TA, Mendonça EF, Batista AC. The clinicopathological significance of the expression of Granzyme B in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2010 Mar;46(3):185-9. doi: 10.1016/j.oraloncology.2009.11.016. Epub 2010 Jan 8. PMID: 20060355.
38. Lisnjak IO, Kutsenok VV, Polyschuk LZ, Gorobets OB, Gamaleia NF. Effect of photodynamic therapy on tumor angiogenesis and metastasis in mice bearing Lewis lung carcinoma. *Exp Oncol.* 2005 Dec;27(4):333-5. PMID: 16404357.
39. Casas A, Perotti C, Ortel B, Di Venosa G, Saccoliti M, Batlle A, Hasan T. Tumor cell lines resistant to ALA-mediated photodynamic therapy and possible tools to target surviving cells. *Int J Oncol.* 2006 Aug;29(2):397-405. PMID: 16820882.
40. Canti GL, Lattuada D, Nicolin A, Taroni P, Valentini G, Cubeddu R. Immunopharmacology studies on photosensitizers used in photodynamic therapy. *Proc SPIE.* 1994; 2078:268–275. <https://doi.org/10.1117/12.168663>
41. Sungur CM, Murphy WJ. Positive and negative regulation by NK cells in cancer. *Crit Rev Oncog.* 2014;19(1-2):57-66. doi: 10.1615/critrevoncog.2014010805. PMID: 24941373; PMCID: PMC4242411.
42. Cheng M, Chen Y, Xiao W, Sun R, Tian Z. NK cell-based immunotherapy for malignant diseases. *Cell Mol Immunol.* 2013 May;10(3):230-52. doi: 10.1038/cmi.2013.10. Epub 2013 Apr 22. PMID: 23604045; PMCID: PMC4076738.

43. Morvan MG, Lanier LL. NK cells and cancer: you can teach innate cells new tricks. *Nat Rev Cancer*. 2016 Jan;16(1):7-19. doi: 10.1038/nrc.2015.5. PMID: 26694935.
44. Granzin M, Wagner J, Köhl U, Cerwenka A, Huppert V, Ullrich E. Shaping of Natural Killer Cell Antitumor Activity by Ex Vivo Cultivation. *Front Immunol*. 2017 Apr 26;8:458. doi: 10.3389/fimmu.2017.00458. PMID: 28491060; PMCID: PMC5405078.
45. Oliveira AA, Diamond HR. Atividade Antileucêmica das Células Natural Killer (NK). *Rev. Bras. Cancerol.* [Internet]. 30º de setembro de 2008 [citado 23º de junho de 2021];54(3):297-05. Disponível em: <https://rbc.inca.gov.br/revista/index.php/revista/article/view/1728>
46. Cantoni C, Huergo-Zapico L, Parodi M, Pedrazzi M, Mingari MC, Moretta A, Sparatore B, Gonzalez S, Olive D, Bottino C, Castriconi R, Vitale M. NK Cells, Tumor Cell Transition, and Tumor Progression in Solid Malignancies: New Hints for NK-Based Immunotherapy? *J Immunol Res*. 2016;2016:4684268. doi: 10.1155/2016/4684268. Epub 2016 May 12. PMID: 27294158; PMCID: PMC4880686.
47. Marcus A, Gowen BG, Thompson TW, Iannello A, Ardolino M, Deng W, Wang L, Shifrin N, Raulet DH. Recognition of tumors by the innate immune system and natural killer cells. *Adv Immunol*. 2014;122:91-128. doi: 10.1016/B978-0-12-800267-4.00003-1. PMID: 24507156; PMCID: PMC4228931.
48. Mistry AR, O'Callaghan CA. Regulation of ligands for the activating receptor NKG2D. *Immunology*. 2007 Aug;121(4):439-47. doi: 10.1111/j.1365-2567.2007.02652.x. PMID: 17614877; PMCID: PMC2265965.
49. López-Soto A, Huergo-Zapico L, Galván JA, Rodrigo L, de Herreros AG, Astudillo A, Gonzalez S. Epithelial-mesenchymal transition induces an antitumor immune response mediated by NKG2D receptor. *J Immunol*. 2013 Apr 15;190(8):4408-19. doi: 10.4049/jimmunol.1202950. Epub 2013 Mar 18. PMID: 23509364.
50. Malmberg KJ, Bryceson YT, Carlsten M, Andersson S, Björklund A, Björkström NK, Baumann BC, Fauriat C, Alici E, Dilber MS, Ljunggren HG. NK cell-mediated targeting of human cancer and possibilities for new means of immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother*. 2008 Oct;57(10):1541-52. doi: 10.1007/s00262-008-0492-7. Epub 2008 Mar 4. PMID: 18317755.
51. González S, López-Soto A, Suarez-Alvarez B, López-Vázquez A, López-Larrea C. NKG2D ligands: key targets of the immune response. *Trends Immunol*. 2008 Aug;29(8):397-403. doi: 10.1016/j.it.2008.04.007. Epub 2008 Jul 3. PMID: 18602338.
52. Belicha-Villanueva A, Riddell J, Bangia N, Gollnick SO. The effect of photodynamic therapy on tumor cell expression of major histocompatibility

complex (MHC) class I and MHC class I-related molecules. *Lasers Surg Med.* 2012 Jan;44(1):60-8. doi: 10.1002/lsm.21160. Epub 2012 Jan 3. PMID: 22246985; PMCID: PMC3667415.

53. Kabingu E, Vaughan L, Owczarczak B, Ramsey KD, Gollnick SO. CD8+ T cell-mediated control of distant tumours following local photodynamic therapy is independent of CD4+ T cells and dependent on natural killer cells. *Br J Cancer.* 2007 Jun 18;96(12):1839-48. doi: 10.1038/sj.bjc.6603792. Epub 2007 May 15. PMID: 17505510; PMCID: PMC2359961.

54. Korbelik M, Sun J. Cancer treatment by photodynamic therapy combined with adoptive immunotherapy using genetically altered natural killer cell line. *Int J Cancer.* 2001 Jul 15;93(2):269-74. doi: 10.1002/ijc.1326. PMID: 11410876.

55. Park MJ, Bae JH, Chung JS, Kim SH, Kang CD. Induction of NKG2D ligands and increased sensitivity of tumor cells to NK cell-mediated cytotoxicity by hematoporphyrin-based photodynamic therapy. *Immunol Invest.* 2011;40(4):367-82. doi: 10.3109/08820139.2010.551435. Epub 2011 Feb 11. PMID: 21314289.

56. Feoktistova M, Geserick P, Leverkus M. Crystal Violet Assay for Determining Viability of Cultured Cells. *Cold Spring Harb Protoc.* 2016 Apr 1;2016(4):pdb.prot087379. doi: 10.1101/pdb.prot087379. PMID: 27037069

57. Rao X, Huang X, Zhou Z, Lin X. An improvement of the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Biostat Bioinforma Biomath.* 2013 Aug;3(3):71-85. PMID: 25558171; PMCID: PMC4280562.

58. Gollnick SO. Low-dose photodynamic therapy promotes angiogenic potential and increases immunogenicity of human mesenchymal stromal cells. *J Photochem Photobiol B.* 2019 Oct;199:111596. doi:

59. Brackett CM, Gollnick SO. Photodynamic therapy enhancement of anti-tumor immunity. *Photochem Photobiol Sci.* 2011 May;10(5):649-52. doi: 10.1039/c0pp00354a. Epub 2011 Jan 21. PMID: 21253659; PMCID: PMC3197776.

60. Theodoraki MN, Lorenz K, Lotfi R, Fürst D, Tsamadou C, Jaekle S, Mytilineos J, Brunner C, Theodorakis J, Hoffmann TK, Laban S, Schuler PJ. Influence of photodynamic therapy on peripheral immune cell populations and cytokine concentrations in head and neck cancer. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2017 Sep;19:194-201. doi: 10.1016/j.pdpdt.2017.05.015. Epub 2017 May 31. PMID: 28578124.

61. Ma Y, Qu S, Xu L, Lu H, Li B. An in vitro study of the effect of 5-ALA-mediated photodynamic therapy on oral squamous cell carcinoma. *BMC Oral Health.* 2020 Sep 16;20(1):258. doi: 10.1186/s12903-020-01239-8. PMID: 32938451; PMCID: PMC7493380.

62. Zhang J, Basher F, Wu JD. NKG2D Ligands in Tumor Immunity: Two Sides of a Coin. *Front Immunol.* 2015 Mar 4;6:97. doi: 10.3389/fimmu.2015.00097. PMID: 25788898; PMCID: PMC4349182.
63. Jimenez-Perez, M.I., Jave-Suarez, L.F., Ortiz-Lazareno, P.C. et al. Cervical cancer cell lines expressing NKG2D-ligands are able to down-modulate the NKG2D receptor on NKL cells with functional implications. *BMC Immunol* 13, 7 (2012). <https://doi.org/10.1186/1471-2172-13-7>
64. Yamamoto K, Fujiyama Y, Andoh A, Bamba T, Okabe H. Oxidative stress increases MICA and MICB gene expression in the human colon carcinoma cell line (CaCo-2). *Biochim Biophys Acta.* 2001 Apr 3;1526(1):10-2. doi: 10.1016/s0304-4165(01)00099-x. PMID: 11287116.
65. Hedlund M, Nagaeva O, Kargl D, Baranov V, Mincheva-Nilsson L. Thermal- and oxidative stress causes enhanced release of NKG2D ligand-bearing immunosuppressive exosomes in leukemia/lymphoma T and B cells. *PLoS One.* 2011;6(2):e16899. Published 2011 Feb 25. doi:10.1371/journal.pone.0016899
66. Rupel K, Zupin L, Colliva A, Kamada A, Poropat A, Ottaviani G, Gobbo M, Fanfoni L, Gratton R, Santoro M, Di Lenarda R, Biasotto M, Zacchigna S. Photobiomodulation at Multiple Wavelengths Differentially Modulates Oxidative Stress In Vitro and In Vivo. *Oxid Med Cell Longev.* 2018 Nov 11;2018:6510159. doi: 10.1155/2018/6510159. PMID: 30534349; PMCID: PMC6252186.
67. Hamblin MR, Nelson ST, Strahan JR. Photobiomodulation and Cancer: What Is the Truth? *Photomed Laser Surg.* 2018 May;36(5):241-245. doi: 10.1089/pho.2017.4401. Epub 2018 Feb 21. PMID: 29466089; PMCID: PMC5946726.
68. Ottaviani G, Martinelli V, Rupel K, Caronni N, Naseem A, Zandonà L, Perinetti G, Gobbo M, Di Lenarda R, Bussani R, Benvenuti F, Giacca M, Biasotto M, Zacchigna S. Laser Therapy Inhibits Tumor Growth in Mice by Promoting Immune Surveillance and Vessel Normalization. *EBioMedicine.* 2016 Sep;11:165-172. doi: 10.1016/j.ebiom.2016.07.028. Epub 2016 Jul 25. PMID: 27475897; PMCID: PMC5049921.
69. Petrellis MC, Frigo L, Marcos RL, Pallotta RC, de Carvalho MHC, Muscará MN, Maria DA, Lopes-Martins RÁB. Laser photobiomodulation of pro-inflammatory mediators on Walker Tumor 256 induced rats. *J Photochem Photobiol B.* 2017 Dec;177:69-75. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2017.09.011. Epub 2017 Sep 18. PMID: 29107204.
70. Ljunggren HG, Malmberg KJ. Prospects for the use of NK cells in immunotherapy of human cancer. *Nat Rev Immunol.* 2007 May;7(5):329-39. doi: 10.1038/nri2073. PMID: 17438573.
71. Blom DJ, Schuitmaker HJ, de Waard-Siebinga I, Dubbelman TM, Jager MJ. Decreased expression of HLA class I on ocular melanoma cells following in

vitro photodynamic therapy. *Cancer Lett.* 1997 Jan 30;112(2):239-43. doi: 10.1016/s0304-3835(96)04578-8. PMID: 9066734.

72. Pende D, Rivera P, Marcenaro S, Chang CC, Biassoni R, Conte R, Kubin M, Cosman D, Ferrone S, Moretta L, Moretta A. Major histocompatibility complex class I-related chain A and UL16-binding protein expression on tumor cell lines of different histotypes: analysis of tumor susceptibility to NKG2D-dependent natural killer cell cytotoxicity. *Cancer Res.* 2002 Nov 1;62(21):6178-86. PMID: 12414645.