



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

MARLENE APARECIDA FERREIRA PINTO

**EFEITO DA TERAPIA FOTODINÂMICA NO FENÓTIPO TRONCO DE
LINHAGENS CELULARES DE CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE BOCA**

São Paulo, SP

2021



MARLENE APARECIDA FERREIRA PINTO

**EFEITO DA TERAPIA FOTODINÂMICA NO FENÓTIPO TRONCO DE
LINHAGENS CELULARES DE CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE BOCA**

Tese apresentada à Universidade Nove de Julho, para obtenção do título de Doutor em biofotônica aplicada às Ciências da Saúde.

Orientadora : Prof^a Dra. Maria Fernanda Setúbal Destro Rodrigues

Co-orientadora: Prof^a Dra. Christiane Pavanni

São Paulo, SP

2021

Pinto, Marlene Aparecida Ferreira.

Efeito da terapia fotodinâmica no fenótipo tronco de linhagens celulares de carcinoma epidermóide de boca. / Marlene Aparecida Ferreira Pinto. 2021.

77 f.

Tese (Doutorado) - Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2021.

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

1. Carcinoma epidermóide de boca. 2. Terapia Fotodinâmica. 3. 5-ALA. 4. Células-tronco de câncer.

I. Rodrigues, Maria Fernanda Setúbal Destro.

II. Título.

CDU 615.831

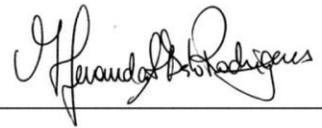
São Paulo, 04 de agosto de 2021.

TERMO DE APROVAÇÃO

Aluno (a): Marlene Aparecida Ferreira Pinto

Título da Tese: "Efeito da terapia fotodinâmica no fenótipo tronco de linhagens celulares de carcinoma epidermóide de boca".

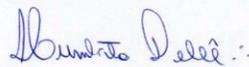
Presidente: PROF^a. DR^a. MARIA FERNANDA SETÚBAL DESTRO RODRIGUES



Membro: PROF^a. DR^a. CHRISTIANE PAVANI



Membro: PROF. DR. HUMBERTO DELLÊ



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



Membro: PROF. DR. FÁBIO DAUMAS NUNES



Dedicatória

Dedico ao meu marido Ricardo que esteve ao meu lado e transmitiu a calma e a serenidade necessárias para conclusão desse trabalho, por sua paciência, companheirismo e parceria para que eu tivesse tempo para me dedicar. À minha filha Isabella que chegou no último ano da realização desse trabalho e que ressignificou tudo em minha vida, e que acima de tudo me ensinou que a fé e a garra são essenciais para conquistarmos tudo que almejamos. Aos meus pais Edison e Fátima e meu irmão Raphael pelo incentivo e amor incondicional.

Agradecimentos

À minha orientadora Maria Fernanda Setúbal Destro Rodrigues, por sua orientação, paciência, compreensão e dedicação para o desenvolvimento e conclusão desse trabalho.

À minha co-orientadora professora Christiane Pavani por sua colaboração para realização dessa pesquisa.

À Universidade Nove de Julho, pela oportunidade e disponibilidade da infraestrutura necessária para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biofotônica Aplicada às Ciências da Saúde.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação Biofotônica Aplicada às Ciências da Saúde por suas contribuições em cada uma das disciplinas cursadas.

Ao professor Fabio Daumas Nunes (FOUSP), pela disponibilidade do Laboratório de Patologia Molecular que foi essencial para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos funcionários do laboratório de Pesquisa da UNINOVE, em especial Haryanne e Nubia por todo suporte.

Aos amigos do laboratório de Pesquisa da UNINOVE, Allan, Kaline, Ana Melissa, José Marcelo e Renata pelo convívio e apoio.

À Angela Molon por todo suporte, auxílio e parceria para conclusão desse trabalho.

Às minhas queridas alunas de iniciação científica Bárbara, Cassia, Haryadine, Larissa e Janaina por todo o suporte, dedicação e momentos de descontração durante todo o tempo que passamos juntas no laboratório.

Às minhas amigas do FFPS (Carolina, Danielle, Larissa e Thayane) que fazem parte da minha vida e dividem todas as minhas angústias e conquistas.

À minha família, a Deus e à Nossa Senhora Aparecida. Muito Obrigada!

Resumo

Dentre os vários tipos de câncer que afetam a cavidade bucal, o carcinoma epidermóide de boca (CEB) é a neoplasia maligna de maior prevalência. Apesar dos avanços no tratamento, os pacientes com CEB frequentemente apresentam metástases no momento do diagnóstico e recorrência, ambos associados com um prognóstico reservado. Estudos recentes têm demonstrado que a presença de células-tronco de câncer (CTC) são responsáveis pelo crescimento tumoral e resistência à terapia convencional. Uma alternativa para o tratamento do CEB é a Terapia Fotodinâmica (TFD). Porém, o efeito da TFD em CTC no CEB é pouco conhecido. Desta maneira, este estudo teve como objetivo avaliar *in vitro* o efeito da TFD mediada pelo fotossensibilizador ácido 5-aminolevulínico (5-ALA) na viabilidade celular, manutenção do fenótipo tronco, migração celular e expressão dos genes *Bmi1*, *Clagranulina*, *IVL* e *E-caderina* em duas linhagens celulares derivadas de CEB (Ca1 e Luc4). Todos os ensaios *in vitro* foram conduzidos com ambas linhagens celulares, as quais foram divididas nos seguintes grupos: Controle, 5-ALA, LED 6J/cm² e TFD (5-ALA+6J/cm²). A viabilidade celular foi avaliada por meio dos ensaios de MTT e Vermelho neutro e o fenótipo tronco foi avaliado por meio de citometria de fluxo para análise da expressão de CD44 e ESA para identificação das populações CD44^{high}/ESA^{high}, CD44^{high}/ESA^{low} e CD44^{low}, bem como pelos ensaios de formação de colônias e esferas tumorais. Adicionalmente, foi avaliada a produção de PpIX em cada população de CTC. A migração celular foi avaliada por meio do ensaio de ferida e a expressão gênica foi avaliada por meio de RT-qPCR. Ambas as linhagens mostraram redução significativa da viabilidade celular após a TFD. Foi observada redução na porcentagem de células CD44^{high}/ESA^{high} após a TFD quando comparada aos demais grupos, o que foi acompanhado por um aumento da porcentagem de células com fenótipo CD44^{low}, indicando indução da diferenciação celular. Adicionalmente, houve redução da capacidade de formação de colônias e formação de esferas tumorais após a TFD. A população CD44^{high}/ESA^{high} de ambas as linhagens mostraram maior produção de PpIX, indicando maior sensibilidade das mesmas à TFD. As células das linhagens Ca1 e Luc4 dos grupos 5-ALA e TFD mostraram menor capacidade de migração em relação aos demais grupos. A análise da expressão gênica mostrou que após TFD, houve diminuição da expressão de *Bmi1* e aumento da expressão de *Clagranulina* na linhagem Ca1, confirmando a perda do potencial tronco e indução da diferenciação celular. Desta maneira, os resultados aqui demonstrados indicam que a TFD-5-ALA é capaz de diminuir a viabilidade e migração celular de linhagens celulares derivadas de CEB, bem como reduz a porcentagem de células com fenótipo tronco, induzindo sua diferenciação.

Palavras-chave: Carcinoma epidermóide de boca, Terapia Fotodinâmica, 5-ALA, células-tronco de câncer.

Abstract

Among the various types of cancer that affect the oral cavity, squamous cell carcinoma of the mouth (OSCC) is the most prevalent malignant neoplasm. Despite advances in treatment, patients with OSCC often present metastasis at diagnosis and recurrence, both associated with a poor prognosis. Recent studies have shown that the presence of cancer stem cells (CTC) are responsible for tumor growth and resistance to conventional therapy. An alternative for the treatment of CEB is Photodynamic Therapy (PDT). However, the effect of PDT on CTC in the CEB is unknown. Thus, this study aimed to evaluate in vitro the effect of PDT mediated by the photosensitizer 5-aminolevulinic acid (5-ALA) on cell viability, maintenance of the stem cells phenotype, cell migration and expression of the genes *Bmi1*, *Clagranulin*, *IVL* and *E-cadherin* in two cell lines derived of OSCC (Ca1 and Luc4). All in vitro assays were conducted with both cell lines, which were divided into the following groups: Control, 5-ALA, LED 6J/cm² and PDT (5-ALA+6J/cm²). Cell viability was assessed by MTT and Neutral Red assays and the stem phenotype was assessed by flow cytometry to analyze the expression of CD44 and ESA to identify the CD44^{high}/ESA^{high}, CD44^{high}/ESA^{low} and CD44^{low} populations, as well as by colony and tumor sphere formation assays. Additionally, the PpIX production in each CTC population was evaluated. Cell migration was analyzed by wound healing assay and gene expression was analyzed by RT-qPCR. Both cell lines showed a significant reduction in cell viability after PDT. A percentage reduction of CD44^{high}/ESA^{high} cells was observed after PDT when compared to the other groups, which was followed by an increase in the percentage of cells with the CD44^{low} phenotype, indicating cell differentiation induction. Additionally, reduced colony formation capacity and tumoral sphere formation after PDT. A CD44^{high} / ESA^{high} population of both cell lines had greater production of PpIX, indicating greater sensitivity of them to PDT. Cells from the Ca1 and Luc4 cell lines of the 5-ALA and PDT groups had less capacity to migrate compared to the other groups. An analysis of gene expression after PDT, showed a decrease in *Bmi1* expression and increased *Calgranulin* expression in the Ca1 cell line, confirming the loss of the stem potential and induction of cell differentiation. Thus, the results shown here, indicate that a 5-ALA-PDT is capable of decreasing the cell viability and cell lines migration derived from OSCC, as well as reducing the percentage of cells with stem phenotype, inducing their differentiation.

Keywords: Oral squamous cell carcinoma, photodynamic therapy, 5-ALA, cancer stem cell.

Lista de Ilustrações

- Figura 1:** Diagrama de Jablonski. O Fs é administrado e incubado por um período de tempo determinado. Após a incubação, o Fs é excitado pela irradiação, absorvendo-a, saindo de seu estado basal FS_0 para o estado excitado FS_1 . No estado FS_1 , o FS pode perder parte de sua energia absorvida por um fenômeno denominado Fluorescência, no qual luz visível é emitida pelo Fs, ou o Fs pode passar pelo cruzamento de intersistemas, chegando à um estado capaz de estimular moléculas em sua proximidade. O Fs pode fazer a transferência de um elétron para uma molécula presente no tecido alvo resultando em uma espécie reativa de oxigênio (reação do tipo I), ou pode fazer uma transferência de elétron diretamente ao oxigênio presente, tornando-o mais reativo (reação do tipo II). O dano promovido por ambas as reações resulta em diferentes efeitos locais, induzindo autofagia, apoptose e necrose das células alvo, bem como ativação do sistema imunológico. 22
- Figura 2:** Via metabólica do grupo heme para produção endógena de 5-ALA. 25
- Figura 3:** Equipamento LedBOX utilizado para irradiação **(A)** e imagem representativa da placa de 96 poços sendo irradiada para realização da TFD **(B)**. 33
- Figura 4:** Análise da viabilidade celular por MTT após 24h **(A)** e **(C)** na linhagem Ca1 e Luc4, respectivamente, bem como após 48h **(B)** e **(D)** da incubação com as diferentes concentrações de 5-ALA. 40
- Figura 5:** Análise da viabilidade por MTT da linhagem CA1 submetida à irradiação com $3J/cm^2$ **(A)**, $6J/cm^2$ **(B)** e $9J/cm^2$ **(C)**. 41
- Figura 6:** Análise da viabilidade por MTT da linhagem Luc4 submetida à irradiação com $3J/cm^2$ **(A)**, $6J/cm^2$ **(B)** e $9J/cm^2$ **(C)**. & Diferença significativa em relação aos grupos Controle e 5-ALA. **** Diferença significativa em relação aos grupos Controle, 5-ALA e LED. 42
- Figura 7:** Aspecto morfológico das células da linhagem CA1 no grupo Controle **(A)**, 5-ALA **(B)**, LED $6J/cm^2$ **(C)** e TFD **(D)** após 24h da TFD. Pode ser observada a presença de células esféricas mostrando fragmentação do núcleo e inúmeros grânulos no citoplasma (seta preta) e células “fantasma” (*). 43

- Figura 8:** Aspecto morfológico das células da linhagem CA1 no grupo Controle **(A)**, 5-ALA **(B)**, LED 6J/cm² **(C)** e TFD **(D)** após 48h da TFD. Pode ser observada a presença de células “fantasmas” (*) e fragmentação nuclear (seta vermelha). **44**
- Figura 9:** Aspecto morfológico das células da linhagem Luc4 no grupo Controle **(A)**, 5-ALA **(B)**, LED 6J/cm² **(C)** e TFD **(D)** após 24h da TFD. Pode ser observada perda de adesão celular, a presença de células esféricas com grânulos citoplasmáticos (seta preta) e células apoptóticas (seta azul). **45**
- Figura 10:** Aspecto morfológico das células da linhagem Luc4 no grupo Controle **(A)**, 5-ALA **(B)**, LED 6J/cm² **(C)** e TFD **(D)** após 48h da TFD. Pode ser observada perda de adesão celular, contração celular, células com morfologia arredondada (seta preta) e células “fantasma” (asterisco). **46**
- Figura 11:** Análise da viabilidade celular por VN após 24h e 48h da TFD na linhagem CA1 **(A)** e **(B)**, respectivamente, Luc4 **(C)** e **(D)** (**p<0,001). **47**
- Figura 12:** Análise da expressão de CD44 e ESA nas linhagens CA1 e Luc4 por citometria de fluxo **(A)** e avaliação da porcentagem de células com o fenótipo CD44^{high}/ESA^{high}, CD44^{high}/ESA^{low} e CD44^{low} em ambas as linhagens nos diferentes grupos **(B)** (*p<0,05 e **p<0,001). **48**
- Figura 13:** Análise da produção de PplX na linhagem CA1 **(A e B)** e Luc4 **(C e D)** por citometria de fluxo. Quantificação da porcentagem de células positivas para PplX nas linhagens CA1 e Luc4 **(E)** e nas subpopulações CD44^{high}/ESA^{high}, CD44^{high}/ESA^{low} e CD44^{low} **(F)**. Avaliação da média de intensidade de fluorescência de PplX nas subpopulações CD44^{high}/ESA^{high}, CD44^{high}/ESA^{low} e CD44^{low} das linhagens Ca1 e Luc4 **(G)**. **50**
- Figura 14:** Formação de colônias na linhagem Ca1 nos grupos Controle, 5-ALA, LED 6J/cm² e TFD **(A)**. Aspecto microscópico das colônias formadas após os diferentes tratamentos **(B)**. Quantificação do número de colônias na linhagem Ca1 nos diferentes grupos estudados **(C)** (**p<0,001). **52**
- Figura 15:** Formação de colônias na linhagem Luc4 nos grupos Controle, 5-ALA, LED 6J/cm² e TFD **(A)**. Aspecto microscópico das colônias formadas após os diferentes tratamentos **(B)**. Quantificação do número de colônias na linhagem Ca1 nos diferentes grupos estudados **(C)** (**p<0,001). **53**
- Figura 16:** Formação de esferas na linhagem Ca1 nos grupos Controle **(A)**, 5-ALA **(B)**, LED 6J/cm² **(C)** e TFD **(D)**. Quantificação do número de esferas na linhagem Ca1 nos diferentes grupos estudados **(E)** (*p<0,05). **54**
- Figura 17:** Formação de esferas na linhagem Luc4 nos grupos Controle **(A)**, 5-ALA **(B)**, LED 6J/cm² **(C)** e TFD **(D)**. Quantificação do número de esferas na linhagem Luc4 nos diferentes grupos estudados **(E)** (**p<0,0001). **55**
- Figura 18:** Análise da capacidade de migração das células da linhagem Ca1 **(A)** e Luc4 **(B)** nos grupos Controle, 5-ALA, LED 6J/cm² e TFD após 24h do tratamento. Quantificação da porcentagem de fechamento da área da ferida na **57**

linhagem Ca1(C) e Luc4 (D). ** $p < 0,001$ em relação ao grupo Controle, *** $p < 0,0001$ em relação ao grupo Controle.

Figura 19: Análise da expressão dos genes *Bmi1*, *Calganulina*, *IVL* e *E-caderina* na linhagem Ca1 (A, C, E e G) e na linhagem Luc4 (B, D, F e H) nos diferentes grupos. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,001$.

Lista de Tabelas

Tabela 1: Genes utilizados para amplificação por qPCR nas linhagens CA1 e LUC4 nos grupos controle, 5-ALA, LED e TFD. Condições de reações segundo número de acesso no GenBank, sequência dos primers, temperatura de anelamento (T_m), concentração dos *primers* e tamanho do produto amplificado. **37**

Lista de abreviaturas e siglas

5-FU 5- Fluoracetil

AIF – Fator de Indução de Apoptose

ALA - Ácido Aminulevulínico

ALDH1 - Aldeído desidrogenase 1

APC - Aloficocianina

ATP - Adenosina Tri-fosfato

CEB - Carcinoma Epidermóide de Boca

CTC - Células Tronco de Câncer

DAMPS - Padrões moleculares associados a danos

DMEM - Meio Modificado Enriquecido Dulbeco

DOK - Queratinócitos Displásicos Oral

DPD - dihidropirimidina desidrogenase

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

JNK - c-Jun N-terminal quinase

LDL - Lipoproteína de baixa densidade

LED - Laser emissão diiodo

LMA - Leucemia Mielóide Aguda

MiR 145 – Micro RNA 145

MTT - 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-

Diphenyltetrazolium Bromide

NF-κB – Fator Nuclear Kappa B

PPIX -Protoporfirina 9

RIP1 – Receptor de Interação de proteína 1

SFB - Soro Fetal Bovino

TEM - Transição Epitélio Mesenquima

TFD - Terapia Fotodinâmica

VN - Vermelho Neutro

Sumário

1.Introdução	16
1.1 Carcinoma epidermóide de boca	16
1.2 Terapia fotodinâmica	22
1.3 Terapia fotodinâmica no CEB	27
2.Justificativa	31
3. Objetivo Geral	32
3.1 Objetivos específicos	32
4.Metodologia.....	33
4.1 Cultivo celular.....	33
4.2 Grupos experimentais	33
4.3 Terapia fotodinâmica.....	34
4.4Análise da viabilidade celular.....	35
4.4.1 Ensaio de MTT	35
4.4.2 Ensaio de Vermelho Neutro	35
4.5 Análise da capacidade de formação de colônia e esferas tumerais.....	36
4.6 Análise da expressão de CD44 e ESA	36
4.7 Extração de RNA, síntese do cDNA e PCR em tempo real para análise da expressão de genes associados com o fenótipo de CTC e diferenciação celular.....	37
4.8 Análise da capacidade de migração celular	38
4.9 Análise estatística	39
5.Resultados	40
5.1 Determinação da concentração do FS.....	40
5.2 Determinação dos parâmetros da irradiação para a TFD	41

5.3 Análise da morfologia celular após a TFD	43
5.4 Análise da viabilidade celular por incorporação de vermelho Neutro	47
5.5 Análise da expressão de CD44 e ESA	48
5.6 Análise da produção de PpIX	50
5.7 Análise da formação de colônias	52
5.8 Análise da formação de esferas	55
5.9 Análise da capacidade de migração celular	57
5.10 Análise da expressão dos genes <i>Bmi1</i> , <i>Calgranulina</i> , <i>Involucrina</i> e <i>E-caderina</i>	59
6.Discussão	61
7.Conclusões.....	69
8. Referências Bibliográficas	70

1.Introdução

1.1 Carcinoma epidermóide de boca

O carcinoma epidermóide de boca (CEB) é a neoplasia maligna mais frequente da cavidade oral, representando cerca de 90% dos casos (Markopoulos, 2012). No Brasil representa o quinto tipo mais frequente de câncer que ocorre no sexo masculino (Markopoulos, 2012). O desenvolvimento do CEB está associado a fatores etiológicos como tabagismo, consumo de álcool, exposição prolongada à luz ultravioleta e infecção pelo vírus HPV (Retiig, 2015).

Geralmente, o diagnóstico do CEB é realizado em estágio avançado da doença e cerca de 21% dos pacientes apresentam-se com metástases cervicais no momento do diagnóstico (Siegel et al., 2017). A presença dos tumores metastáticos compromete a sobrevida dos pacientes, sendo responsável por mais de 90% da mortalidade associada aos pacientes com CEB (Marcato et al., 2011; INCA, 2018; Ferguson et al., 2017).

O tratamento para o CEB consiste em cirurgia associada à radioterapia e/ou quimioterapia (Kademani et al., 2005; Goda et al., 2010). Entretanto, apesar dos avanços em relação ao tratamento, aproximadamente 50% dos pacientes desenvolvem recidivas (Greenberg et al., 2003). O prognóstico dos pacientes com CEB depende do tamanho, infiltração e localização da lesão, disseminação metastática e grau de diferenciação da neoplasia (Prince et al., 2007). 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 (Mackenzie, 2006). Com o objetivo de auxiliar os médicos e pesquisadores, foi estabelecido pela UICC (União Internacional Contra o Câncer) um parâmetro para se referir ao tumor, no qual (T) refere-se ao tamanho do tumor, (N) envolvimento de linfonodos regionais e (M) metástases à distância (Bonnet, Dick, 1997).

Alguns estudos apontam que o CEB possui uma subpopulação de células, denominadas células-tronco de câncer (CTC), as quais possuem capacidade de auto-renovação e proliferação, sendo responsável por sustentar o crescimento tumoral bem como pelo desenvolvimento de recorrências e resistência à terapia convencional (Al-Hajj et al., 2003). Adicionalmente, a recorrência local e metástase estão associadas com a disseminação precoce dessas células e, desta maneira, estratégias terapêuticas que tenham como alvo as CTC são necessárias para o sucesso do tratamento oncológico (Singh, 2013).

As CTC foram identificadas inicialmente em leucemia mieloide aguda (LMA) por meio da expressão dos marcadores CD34 e CD38, que são característicos de células-tronco hematopoiéticas. As células neoplásicas com o fenótipo CD34⁺CD38⁻ foram capazes de iniciar a LMA humana em camundongos imunodeficientes e ainda, reconstituir a heterogeneidade tumor (Wang et al., 2014).

Em 2003, Al-Haji et al. identificaram uma pequena população de células com o fenótipo CD44⁺/CD24⁻ em câncer de mama, a qual apresentava potencial tumorigênico *in vivo* e capacidade de auto-renovação. Posteriormente, vários estudos identificaram diferentes populações de CTC em tumores sólidos, como por exemplo, tumores gástricos, pulmão e ovário (Lupatov et al., 2013; Sahlberg et al., 2014; Perez-Losada et al., 2003).

As CTC têm sido identificadas em tumores sólidos por meio da expressão de diferentes marcadores de superfície celular, incluindo CD44, CD24 e CD133, atividade da enzima ALDH1 e habilidade em auxiliar a bombear corantes celulares como *Hoescth* para o meio extracelular (Biddle et al., 2013; Biddle et al., 2011).

O estudo de Prince et al. (Prince et al., 2007) demonstrou que em carcinomas de cabeça e pescoço existe uma população de células com propriedades de CTC que apresentam alta expressão de CD44, uma molécula de adesão que atua em processos celulares, como proliferação, migração e invasão. Quando inoculadas em animais imunodeficientes, estas células apresentaram capacidade de auto-renovação, sendo tumorigênicas *in vivo* e capazes de reconstituir a heterogeneidade tumoral. Em contrapartida, células que apresentaram baixa expressão de CD44, mesmo quando inoc

uladas em animais imunodificientes, não foram capazes de formar tumores. Outras populações de CTC já foram identificadas baseado-se na expressão de outros marcadores, os quais foram encontrados com alta expressão no CEB, incluindo o EGFR (receptor do fator de crescimento epidérmico) ESA (antígeno de superfície epitelial), CD24 e atividade da enzima ALDH. (Biddle et al., 2013; Biddle et al., 2011; Torres, Allan, 2016).

O marcador ESA, denominado EpCAM (Molécula de adesão celular epitelial) é uma glicoproteína transmembrana do tipo I, que é expressa em alguns tipos de epitélio normal, células-tronco adultas e células-tronco embrionárias (CTE). É uma molécula essencial para a manutenção da auto-renovação e fenótipo pluripotente em CTE, e no controle da proliferação celular, migração e diferenciação durante a morfogênese (Bauerle et al., 2007; Kuechlin et al., 2017).

Em 2011, Biddle et al (2013), identificaram dois fenótipos distintos nas CTC de CEB utilizando a combinação da expressão de CD44 e ESA. Uma subpopulação de CTC apresenta o fenótipo CD44^{high}/ESA^{high}, e possui perfil proliferativo e características de células epiteliais, essa subpopulação é capaz de originar células que podem assumir dois padrões distintos de diferenciação, sendo o primeiro, caracterizado pelo fenótipo CD44 low que consiste em células com baixa expressão de CD44 e que não são capazes de se auto-renovarem, formam paraclones, apresentam alterações morfológicas e estão associadas à diferenciação epitelial terminal, além de limitada capacidade proliferativa. O outro fenótipo, identificado como CD44^{high}/ESA^{low}, possui morfologia mesenquimal, capacidade migratória e características da transição epitélio-mesenquimal (TEM), sendo responsável pelo desenvolvimento de metástases (Gammon et al., 2013).

Em relação às subpopulações de CTC descritas anteriormente, já foi demonstrado que as células CD44^{high}/ESA^{low} (perfil migratório) possuem elevados níveis de HIF-1 α , redução da massa mitocondrial, menor potencial de membrana mitocondrial, consumo de oxigênio, menor produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e elevados níveis de SOD2, culminando com um estado mais quiescente em relação à população de CTC com fenótipo CD44^{high}/ESA^{high} e devido aos níveis aumentados de hipóxia, são provavelmente, associados ao aumento da

resistência à radioterapia de oxigênio possuem uma menor resposta à radioterapia (Gammon et al., 2013). Adicionalmente, os achados indicam que o HIF-1 α tem um papel funcional na indução e manutenção das subpopulações de CTC com fenótipo migratório (CD44^{high}/ESA^{low}) que é composta por células que apesar de consumirem mais glicose, utilizam menos oxigênio, sugerindo uma dependência reduzida de obtenção de energia por meio da fosforilação oxidativa e, portanto, possuem menor atividade metabólica, essas células permanecem em fase G1 do ciclo celular e aliada à redução da atividade mitocondrial, impactam diretamente na apoptose induzida tanto pela radiação quanto quimioterapia. (Gammon et al., 2013). Sendo assim, foi descrito que o aumento ou estabilidade de HIF-1 α foram capazes de aumentar essa subpopulação, levando a uma maior capacidade de crescer em suspensão e formação de esferas (Gammon et al., 2013).

Avaliando vias de sinalização envolvidas com o fenótipo tronco, foi observado que a fosforilação de GSK3 β é essencial na determinação, manutenção e comportamento das CTC no CEB (Shigeishi et al., 2013). Adicionalmente, a inibição de GSK3 β induz a transição das células CD44^{high}/ESA^{low} para o fenótipo CD44^{high}/ESA^{high} bem como aumenta a expressão de marcadores de diferenciação epitelial nestas células. Células CD44^{high}/ESA^{low} exibem elevada resistência ao quimioterápico 5-FU, comumente utilizado no tratamento do CEB (Shigeishi et al., 2013). Entretanto, esta resistência pode ser revertida com o uso do 5-FU (5-fluorouracil) associado ao inibidor da enzima dihidropirimidina desidrogenase (DPD), superexpressa nesta população de CTC. Ainda, células CD44^{high}/ESA^{low} são capazes de invasão em modelo de cultura organotípica tridimensional e apresentam resistência a elevadas doses de radiação ionizante (Gemenetzidis et al., 2015). Isso se deve à alta capacidade de correção dos danos de DNA induzido pela radiação ionizante, possivelmente pelo aumento de expressão de proteínas envolvidas com a maquinaria de reparo como algumas proteínas DDR (Gemenetzidis et al., 2015). Recentemente, Biddle et al (2013) demonstraram que existe uma subpopulação de células na população CD44^{high}/ESA^{low} caracterizada pelo fenótipo CD44^{high}/ESA^{low}/CD24⁺, com elevada plasticidade e responsável por

conferir resistência à quimioterapia e terapia com alvo nas CTC, sendo esta plasticidade um desafio para o estabelecimento de terapias eficazes no CEB.

Outras moléculas relacionadas às células-tronco como o gene BMI1, que foi apontado anteriormente por estar desregulado nas CTC, conferindo maior resistência terapêutica e manutenção da auto renovação celular, sendo esse um gene atuante na proliferação e manutenção de células-tronco e células progenitoras, estimulando a ativação de telomerasas e prevenindo a senescência celular, além disso, atua reduzindo p53/p21, que participa do controle das fases G1/G2 do ciclo celular (Siddique et al.,2012).

Adicionalmente a molécula E-caderina responsável pela adesão celular e supressão da habilidade de invasão das células tumorais, também está relacionada às CTC e foi apontada por estar associada à transição epitelial mesenquimal quando inibida (Ya,2011).

Um outro importante fator de transcrição crucial para regulação do processo de embriogênese e diferenciação celular é o *OCT4*, expresso em células tronco adultas e células tronco embrionárias, no entanto, não é expresso em células adultas diferenciadas (Babaie et al.,2006). A ausência desse fator interfere diretamente na diferenciação celular e favorece a transformação maligna e resistência à radioterapia (Chiou et al., 2008).

Locke et al. (2005) estudando células derivadas de CEB incluindo as linhagens SCC4, SCC9, SCC15 e SCC25, identificaram colônias celulares com morfologia de holoclones exibindo níveis significativamente mais elevados de moléculas relacionadas às células-tronco, como integrina- β 1, E-caderina, β -catenina, antígeno epitelial específico (ESA) e CD44 (Locke et al., 2005). Recentemente, Kokko et al. (2011) mostraram que a superexpressão do marcador CD44 em amostras de câncer de cabeça e pescoço está associada com maior agressividade tumoral e menor taxa de sobrevida (Kokko et al., 2011). Além disso, CTC isoladas de tumores primários por meio da expressão de CD44 estão relacionadas com a diferenciação tumoral, e desta maneira, tumores pobremente diferenciados apresentam maior porcentagem de células CD44⁺ e ao contrário, tumores bem diferenciados apresentam menor expressão deste marcador (Al-Hajj

et al., 2013). Adicionalmente, alta frequência destas células no CEB está também associada com invasão perineural, vascular e linfática, maior taxa de recorrência local e menor sobrevida (Joshua et al., 2012; Rodrigues et al., 2018).

Outros marcadores associados à diferenciação epitelial S100A9 (Calgranulina B) e IVL (Involucrina), apresentaram-se aumentados em células SCC9 quando transfectadas com o fator de transcrição *GLI3*, o qual foi identificado como sendo um alvo importante para erradicação das CTC no CEB. Esse aumento pode indicar uma mudança em direção à diferenciação terminal (Rodrigues et al., 2018).

Okamoto et al. (2013) isolaram CTC a partir de linhagem celular derivada de carcinoma epidermóide de hipofaringe por meio da expressão de CD44 e observaram que esta população celular, apesar de constituir uma pequena fração, é capaz de formar esferas tumorais, apresenta maior potencial proliferativo, bem como maior capacidade de migração, invasão e resistência à quimioterapia. Observou-se ainda que estas células apresentam alta expressão de genes associados com o complexo de moléculas de transporte intracelular ABC, o qual já foi demonstrado como desregulado em células-tronco tumorais derivadas de diferentes neoplasias, podendo ser um dos mecanismos pelo qual as CTC escapam da ação de agentes quimioterápicos (Okamoto et al., 2013).

O CEB é uma neoplasia extremamente agressiva, caracterizada por elevada taxa de recorrência local, metástases para linfonodos e prognóstico ruim. Acredita-se que a presença das CTC atue não somente no desenvolvimento desta neoplasia, mas também nos mecanismos de progressão tumoral e metástase. Vale ressaltar que diferentes subpopulações de CTC já identificadas no CEB desempenham funções biológicas distintas e estão associadas com o crescimento tumoral, invasão, disseminação metastática e resistência à terapia. Assim, novas terapias que tenham como alvo as CTC e suas respectivas subpopulações são necessárias para o sucesso do tratamento dos pacientes com CEB.

1.2 Terapia fotodinâmica

A TFD pode ser definida pelo uso de uma droga ou corante, denominado fotosensibilizador (FS), administrado de forma endovenosa ou tópica, que após incubação é capaz de promover a formação de espécies reativas de oxigênio caso seja excitada por um comprimento de onda específico sob a dependência da presença de oxigênio no tecido alvo para promover um dano dependente de especificidade e seletividade do alvo e FS (Fang et al., 2018).

Para que a TFD possa ocorrer, é fundamental que ocorra a interação entre o FS, com a luz e o oxigênio, sendo que cada fator requer suas próprias particularidades. Os FS podem ser subdivididos em categorias, de acordo com sua origem, sendo os mais comuns aqueles derivados de porfirina, clorinas, ftalocianinas, e porfírenos ou taloporfirinas (Yu, 2014).

Um FS ideal deve ser uma molécula pura, com alta seletividade para células tumorais, alta estabilidade química e física, com tempo pequeno de administração e máxima acumulação, com ativação em feixes luminosos de maior penetração tecidual e rápida excreção pelo corpo humano (Goda et al., 2010).

A luz a ser absorvida pelo FS deve ser compatível com a molécula em questão, preferencialmente deve ser capaz de penetrar no tecido sem sofrer espalhamento, para que o efeito da TFD seja contido no local irradiado e deve ser capaz de gerar espécies reativas de oxigênio o suficiente para que o efeito citotóxico no alvo ocorra (Yu, 2014).

Após a administração de um Fs, as células ou tecido deve ser irradiado com um comprimento de onda específico para o mesmo. Após a absorção da luz (fótons), o Fs assume um estado singleto excitado (S₂), em seguida, essa excitação apresenta uma leve diminuição e o Fs assume o estado de excitação menor (S₁), esse último evento tem curta duração e ocorre em nanossegundos. Em S₁, pode ocorrer perda de energia e as moléculas podem voltar ao estado fundamental emitindo luz fluorescente. O estado excitado singleto também pode sofrer um processo conhecido como cruzamento intersistemas e então o Fs assume o estado tripleto que possui um tempo de vida relativamente longa (microssegundos) e pode interagir com moléculas de oxigênio por meio de duas reações (tipo I e tipo II). Na

reação do tipo I, o Fs pode reagir diretamente com um substrato, como a membrana celular ou uma molécula, e transferir um elétron para formar radicais podem ainda reagir com oxigênio para produzir espécies reativas de oxigênio, radicais de ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxilas. Em uma reação Tipo 2, o Fs pode transferir sua energia diretamente para o oxigênio molecular em estado fundamental, para formar oxigênio singlete. As reações podem ocorrer simultaneamente, e o direcionamento desses processos depende do tipo de Fs utilizado, as concentrações de substrato e oxigênio disponível (Castano et al., 2006) (Figura 1).

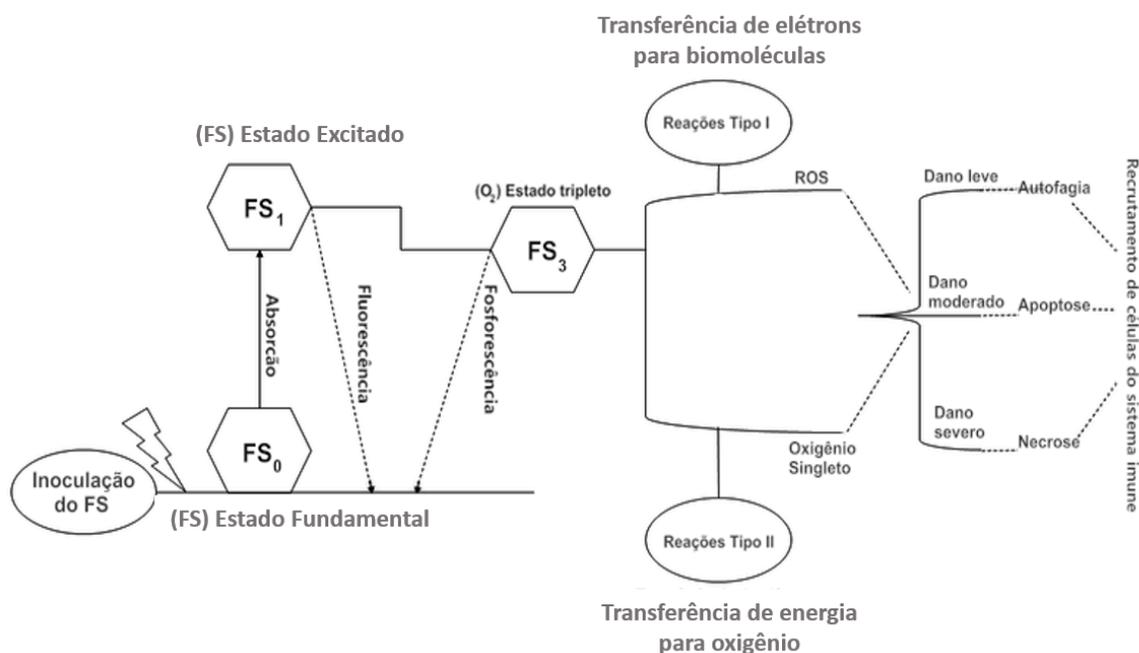


Figura 1: Diagrama de Jablonski. O Fs é administrado e incubado por um período de tempo determinado. Após a incubação, o Fs é excitado pela irradiação, absorvendo-a, saindo de seu estado basal FS_0 para o estado excitado FS_1 . No estado FS_1 , o Fs pode perder parte de sua energia absorvida por um fenômeno denominado Fluorescência, no qual luz visível é emitida pelo Fs, ou o Fs pode passar pelo cruzamento de intersistemas, chegando à um estado capaz de estimular moléculas em sua proximidade. O Fs pode fazer a transferência de um elétron para uma molécula presente no tecido alvo resultando em uma espécie reativa de oxigênio (reação do tipo I), ou pode fazer uma transferência de elétron diretamente ao oxigênio presente, tornando-o mais reativo (reação do tipo II). O dano promovido por ambas as reações resulta em diferentes efeitos locais, induzindo autofagia, apoptose e necrose das células alvo, bem como ativação do sistema imunológico.

As espécies reativas de oxigênio (EROs) originadas a partir da interação entre os fotorreceptores e a luz atuam promovendo alterações na expressão gênica de células alvo, em vias de sinalização celular, no metabolismo celular bem como na secreção de citocinas, favorecendo a ativação da resposta imune e a vigilância imunológica (Heiskanen, Hamblin, 2018; Castano et al., 2006). Adicionalmente, ocorre a ativação de mecanismos de morte celular, os quais são dependentes do tipo de dano ocorrido na célula alvo e local de acúmulo do Fs. Desta maneira, pode ocorrer autofagia, apoptose ou necrose.

Fs localizado em lisossomos ou mitocôndria tendem a promover morte celular por apoptose, com liberação de padrões moleculares associados ao dano (DAMPS – Damage Associated Molecular Patterns) e sinais para reconhecimento de células fagocitárias. FS acumulado no retículo endoplasmático promove morte autofágica com indução da formação de autofagossomos. O acúmulo do FS preferencialmente em membrana plasmática irá resultar em morte celular por necrose, com a liberação de diversos DAMPS.

A apoptose é uma modalidade importante de morte celular que ocorre por meio da permeabilização da membrana externa das mitocôndrias após a exposição à TFD, sendo geralmente controlada por membros da família Bcl-2 e p53-independente (Buytaert et al., 2007). Após a exposição da mitocôndria à TFD, ocorre a liberação de ativadores da via de sinalização das caspases, como o citocromo C e Smac/DIABLO, ou outras moléculas pró apoptóticas, incluindo o fator indutor de apoptose (AIF) (Buytaert et al., 2007).

Os mecanismos de ativação da necrose incluem ativação da proteína de interação com o receptor (RIP1) da família das proteínas quinases, produção excessiva de espécies reativas de oxigênio mitocondrial, lesão lisossomal e acúmulo de cálcio intracelular que pode promover aumento da permeabilidade mitocondrial, que pode favorecer a ocorrência de morte por necrose em vez de apoptótico (Buytaert et al., 2007; Nakagawa et al., 2007).

A autofagia pode ser estimulada por vários sinais de estresse, incluindo o estresse oxidativo (Dewaele et al., 2010). Esse processo pode ter um papel citoprotetor e de ativação após tratamentos quimioterápicos de câncer, incluindo

aqueles que envolvem liberação de espécies reativas de oxigênio. Alguns estudos apontam a autofagia como um mecanismo para preservar a viabilidade celular após exposição à TFD ((Dewaele et al., 2010).

A TFD depende de vários parâmetros, incluindo a escolha do Fs, fluência de luz, a localização intracelular do FS, a concentração de oxigênio e o tipo de célula que será utilizado (Agostinis et al., 2011). Dentre os vários tipos existentes de Fs, o ácido 5-aminolevulínico (5-ALA) é um pré-fotossensibilizador que induz a formação endógena de protoporfirina IX (PpIX). A formação endógena da PpIX ocorre dentro da mitocôndria a partir do grupo heme (Agostinis et al., 2011).

A primeira reação para a síntese do grupo heme ocorre na mitocôndria pela união de uma molécula de succinil-CoA e uma molécula de glicina através da reação catalisada pela enzima aminolevulinato sintetase (ALA sintetase). Esta reação gera aminocetoadipato, que é então descarboxilado a aminolevulinato. O aminolevulinato é transportado para o citosol havendo dimerização catalisada pela enzima ALA desidratase (também chamada porfobilinogênio sintetase) para produzir porfobilinogênio. Após, ocorre a condensação de quatro moléculas de porfobilinogênio para produzir o intermediário pré-uroporfirinogênio (Champeau et al., 2019).

A enzima que catalisa esta condensação é a porfobilinogênio desaminase (PBG desaminase), também chamada uroporfirinogênio I sintetase. O preuroporfirinogênio terá dois destinos: isômeros I e III do uroporfirinogênio. O isômero I é uma molécula não metabolizável e o isômero III se forma pela ação conjunta da uroporfirinogênio sintetase e da 3 uroporfirinogênio III cosintase. O uroporfirinogênio é descarboxilado pela enzima uroporfirinogênio descarboxilase e no produto resultante há substituição de grupos acetil por grupos metil, passando a ser chamado de coproporfirinogênio (Champeau et al., 2019).

O coproporfirinogênio III é o intermediário mais comum na síntese do heme. O coproporfirinogênio III é transportado novamente para o interior da mitocôndria, onde dois grupos propiônicos são descarboxilados passando a grupos vinil por ação da coproporfirinogênio oxidase. O produto desta reação é o protoporfirinogênio IX, um composto incolor. Logo, este é convertido em

protoporfirina IX pela protoporfirinogênio IX oxidase. A etapa final da síntese do heme envolve a inserção de um átomo de ferro no anel tetrapirólico catalisada pela enzima ferroquelatase. (Champeau, 2019) (Figura 2).

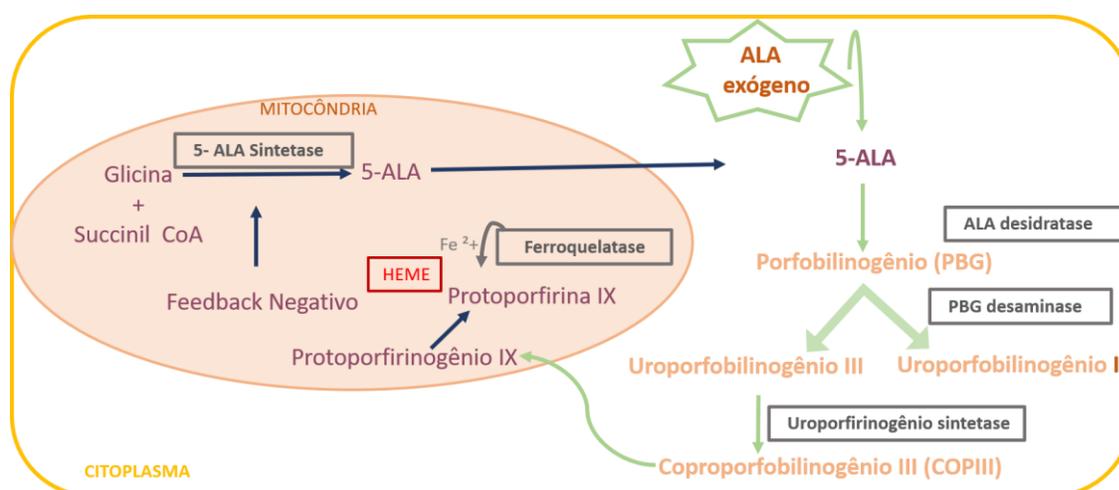


Figura 2: Via metabólica do grupo heme para produção endógena de 5-ALA.

Duas vias a respeito dos mecanismos de morte celular ativados por 5-ALA-TFD foram propostas na literatura, a via mitocondrial e a via induzida pelo estresse do retículo endoplasmático (Grebenová et al., 2003). Estudos demonstraram que em células derivadas de leucemia, a 5-ALA-TFD promoveu alterações morfológicas sugestivas de apoptose, tais como condensação da cromatina e formação de corpos apoptóticos (Grebenová et al., 2003). Na linhagem K562, derivada de leucemia mielóide crônica, as células tratadas com 5-ALA-TFD apresentaram sinais de apoptose precoce, incluindo dissipação do potencial de membrana mitocondrial e liberação mitocondrial de citocromo c, sendo estes eventos primário após a TFD, precedendo a ativação das caspases 3 e 9. Estes experimentos foram conduzidos utilizando-se os parâmetros de 18J/cm², 1h de exposição a luz azul e potência de 2,3W/cm² e 1 mM de 5-ALA (Kuzelová et al., 2004).

Outras evidências corroboram para elucidar o mecanismo de morte celular ativado por ALA-TFD. Após a irradiação, o acúmulo endógeno de PpIX contribui para a perda do potencial de membrana mitocondrial e conseqüentemente, redução da produção de ATP e perda da homeostase de cálcio, levando à morte celular por

necrose através de danos na membrana plasmática (Krammer, Plaetzer, 2008). Adicionalmente, a PpIX sensibiliza as células à apoptose quando esta se acumula de maneira endógena, principalmente na mitocôndria, enquanto que a necrose ocorre quando a mesma se acumula na membrana plasmática (Krammer, Plaetzer, 2008).

Atualmente, o 5-ALA é usado em aplicações clínicas para o tratamento do câncer de bexiga, queratose actínica e carcinoma basocelular (Agostinis et al., 2011). Além disso, vários estudos implicam a TFD mediada por 5-ALA como um tratamento promissor para câncer de mama, próstata, ovário, rins e pulmão (Nokes et al., 2013). A captação de 5-ALA e o metabolismo ocorrem na maioria das células e tecidos humanos; no entanto, o 5-ALA é preferencialmente absorvido por células com atividade metabólica aumentada, levando ao aumento do acúmulo intracelular de PpIX basocelular (Agostinis et al., 2011).

Muitas hipóteses foram propostas para explicar o acúmulo do FS nas células tumorais, incluindo a presença de vasos sanguíneos irregulares, ausência de drenagem linfática conhecida como efeito de permeabilidade e retenção aumentados, alterações no potencial de membrana mitocondrial, alterações no consumo de oxigênio e níveis de ATP após irradiação, alterações na homeostase do cálcio e ligação à lipoproteína de baixa densidade (LDL) (Kessel, 2011). A presença do soro fetal bovino pode inibir o acúmulo de FS, assim como a presença de genes que atuam auxiliando no mecanismo de bomba de efluxo como o ABCG2 (Transportador de ligação a ATP- G2) e FECH (Ferroquelatase) (Yamamoto et al., 2013).

1.3 Terapia fotodinâmica no CEB

A TFD possui algumas vantagens em relação ao tratamento convencional do câncer, incluindo o CEB. 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 anteriores apontam a TFD como uma importante ferramenta para o tratamento do CEB *in situ* ou com estadiamento T1 (Biel, 2007; Hopper et al., 2004). Em uma meta-análise, Cerrati et al. (2015) concluíram que a TFD em tumores com estadiamento T1 e T2 sem presença de nódulos adjacentes ou metástases é tão eficaz quanto a cirurgia, oferecendo maior preservação do tecido e das funções da cavidade oral. Além da eficácia no tratamento de carcinomas *in situ* da cavidade oral, a TFD-5-ALA também se mostrou eficaz em lesões potencialmente malignas (Tsai et al., 2011).

Em linhagens celulares derivadas de CEB (HSC-4 e HSC-2), a TFD-5-ALA induziu a apoptose por perda da função mitocondrial e aumento da peroxidação lipídica (Yamamoto et al., 2013). Um outro estudo demonstrou o envolvimento significativo das vias de sinalização NF- κ B e JNK induzidas por TFD-5-ALA em linhagem celular derivada de CEB (Qiao et al., 2016).

Qiao et al. (2016) 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, inibindo a via JAK-STAT, a qual está associada à proliferação, diferenciação e migração celular. Adicionalmente, a TFD-5-ALA inibiu significativamente a proliferação celular (Qiao et al., 2016).

Na linhagem celular SAS (carcinoma de células escamosas de língua) e GNM (metástase cervical de carcinoma gengival), a TFD-5-ALA exerceu seu efeito supressor tumoral por meio da modulação do miR-145 (Fang et al., 2018). Esse RNA não codificado foi descrito como inibidor da transição epitelial-mesenquimal sendo esta crucial no processo de resistência e metástase tumoral (Yu, 2014). O estudo de Fang et al. (2018), demonstrou que o aumento da expressão de miR-145 via TFD-5-ALA levou a uma inibição das células tumorais e do fenótipo tronco, como menor capacidade de auto renovação, invasão e expressão de CD44.

Nas células derivadas de queratinócitos displásicos orais (DOK) e derivadas de carcinoma epidermóide de língua (CAL -27), a TFD-5-ALA foi capaz de inibir a proliferação celular após 12 horas de incubação com o Fs a 1mM. Além disso, por meio da análise por citometria de fluxo, utilizando-se o marcador de apoptose Anexina V, foi possível observar que tanto para DOK como para Cal-27

houve aumento da morte celular por apoptose. As mesmas linhagens apresentaram produção excessiva de espécies reativas de oxigênio induzidas pela TFD-5-ALA (Wang et al., 2019).

O aumento da morte celular por apoptose após TFD-5-ALA também foi observado nas linhagens A431 derivadas de carcinoma epidermoide humano e na linhagem A375, derivada de melanoma (Zhang et al., 2019). Foi observado aumento da taxa de apoptose após a TFD-5-ALA e ainda, aumento na expressão dos genes *Bax* e *Bcl2* e diminuição da expressão do gene *BIRC5* (Survivina). Guo e colaboradores também avaliaram a expressão de Bax/Bcl2, e demonstraram que a TFD-5-ALA é eficaz na redução desses genes associadas à morte celular por apoptose. Além disso, observaram também, redução da viabilidade celular após 24h da TFD. (Guo et al., 2016).

Alguns estudos demonstraram que linhagens de CEB podem desenvolver resistência à TFD após repetidos ciclos de tratamento, possivelmente devido a alterações genéticas e epigenéticas (Rosin et al., 2018; Casas et al., 2006). Acredita-se que o aumento da densidade mitocondrial, redução da expressão da PpIX endógena e aumento da regulação de proteínas relacionadas à inibição do apoptose e aumento da proliferação e migração celular estejam envolvidos com a resistência à PDT (Rosin et al., 2018).

Poucos trabalhos na literatura já avaliaram o efeito da TFD nas CTC isoladas de diferentes tipos de tumores (Lin et al., 2015). Em um estudo realizado com a linhagem HT29 derivada de câncer colon retal, após o isolamento de CTC com base na expressão do marcador CD133, foi analisado o efeito da TFD em células CD133⁺ e CD133⁻ usando o 5-ALA (PpIX) e um LED (diodo emissor de luz) a 632 nm e exposição irradiante de 2 e 5 J/cm² (Wei et al., 2014). Foi observada redução na viabilidade das células CD133⁺ quando a exposição radiante de 5J/cm² foi utilizada (Wei et al., 2014). Os autores também observaram que a TFD-5-ALA exerce um papel inibitório nas características de CTC e invasão celular por meio da regulação de miR-145.

Um estudo com linhagens celulares derivadas de glioblastoma demonstrou que CTC isoladas a partir do crescimento de neuroesferas acumulam PpIX, sendo

este acúmulo dependente da concentração e tempo de incubação com o 5-ALA. Além disso, após a TFD-5-ALA com 5J/cm², houve diminuição da viabilidade das CTC, a qual foi variável nas diferentes linhagens celulares e associada ao acúmulo de PpIX (Schimanski et al., 2016). Entretanto, os mecanismos relacionados com o acúmulo de PpIX bem como na metabolização e sensibilidade das CTC ao 5-ALA permanecem ainda desconhecidos na literatura.

Poucos estudos na literatura se propuseram a avaliar o papel da TFD em câncer de cabeça e pescoço. Kofler et al. (2018) avaliaram o efeito da TFD utilizando o azul de metileno como FS em duas linhagens celulares derivadas de CEB. Os autores observaram uma redução significativa na capacidade clonogênica e na viabilidade celular de ambas linhagens tratadas somente com o azul de metileno, sendo esta redução maior quando a TFD foi aplicada. Yu et al. (2014) demonstraram que a TFD-5-ALA é capaz de inibir a atividade da enzima ALDH1, reduzir a expressão de *CD44*, *OCT4* e *NANOG*, aumentar a susceptibilidade das CTC à cisplatina e ainda, reduzir a expressão de ABCG2. Foi observado também que a TFD-5-ALA potencializa o efeito da cisplatina, resultando na diminuição da capacidade clonogênica e invasão das CTC. Vale ressaltar que neste estudo, o fenótipo tronco foi enriquecido cultivando-se as células em placas de baixa adesão, que favorece a formação de esferas. Nenhum marcador fenotípico das CTC foi utilizado no seu isolamento tampouco o efeito da TFD em diferentes subpopulações de CTC foi investigado.

2. Justificativa

A terapia fotodinâmica representa uma alternativa terapêutica minimamente invasiva para o tratamento do CEB, com a vantagem de apresentar baixa toxicidade. Entretanto, pouco se sabe a respeito dos efeitos da TFD nas CTC em diferentes tipos de neoplasias malignas, incluindo o CEB. Devido à relevância que estas células possuem no desenvolvimento tumoral, resistência à terapia convencional e ainda, na progressão tumoral e desenvolvimento de metástases, estudos que tenham como foco o entendimento dos efeitos da TFD nas CTC no CEB são necessários.

3. Objetivo Geral

O objetivo deste estudo foi avaliar *in vitro* os efeitos da TFD-5-ALA em linhagens celulares derivadas de CEB.

3.1 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito da TFD-5-ALA na viabilidade de linhagens celulares de CEB.
- Avaliar o efeito da TFD-5-ALA na porcentagem de células CD44^{high}/ESA^{high}, CD44^{High}/ESA^{low} e CD44^{low} em linhagens celulares derivadas de CEB.
- Avaliar o efeito da TFD-5-ALA na capacidade clonogênica e formação de esferas tumorais em linhagens celulares derivadas de CEB.
- Avaliar a produção de PpIX em linhagens celulares de CEB bem como nas subpopulações CD44^{high}/ESA^{high}, CD44^{High}/ESA^{low} e CD44^{low}.
- Avaliar o efeito o efeito da TFD-5-ALA na capacidade de migração de linhagens celulares derivadas de CEB
- Avaliar a expressão de genes associados com o fenótipo tronco e diferenciação epitelial após a TFD-5-ALA.

4. Metodologia

4.1 Cultivo celular

Foram utilizadas duas linhagens celulares derivadas de carcinoma epidermóide oral CA1 e Luc4, gentilmente cedidas pelo Prof. Ian Mackenzie (Instituto Blizard, Queen Mary University of London), a CA1 apresenta células mais arredondadas e que crescem em pequenas colônias, e a linhagem LUC4 apresenta morfologia mais semelhante às células epiteliais. (Mackenzie, 2004). Ambas 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.

4.2 Grupos experimentais

As linhagens celulares de CEB foram divididas nos seguintes grupos experimentais:

- a) **Grupo controle** – células das linhagens CA1 e Luc4 mantidas sob as mesmas condições experimentais dos outros grupos, porém sem nenhum tratamento.
- b) **Grupo 5-ALA** – células das linhagens CA1 e Luc4 expostas somente ao Fs 5-ALA sem irradiação.
- c) **Grupo LED 6J/cm²** – células das linhagens CA1 e Luc4 expostas somente à irradiação com LED.
- d) **Grupo TFD** – células das linhagens CA1 e Luc4 expostas ao 5-ALA e à irradiação com LED.

4.3 Terapia fotodinâmica

A terapia fotodinâmica foi realizada utilizando-se o Fs 5-ALA (Sigma-Aldrich). As células das linhagens CA1 e Luc4 foram incubadas com 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. Diferentes concentrações do Fs foram avaliadas (0,25 mM; 0,5 mM; 1,0 mM; 1,5 mM e 2,0 mM). Após a incubação do Fs, o meio foi removido, as células foram lavadas com solução tampão fosfato (PBS, pH 7,4). Em seguida, as células pertencentes aos grupos LED e TFD foram irradiadas utilizando-se o equipamento BioLambda (LedBOX) com comprimento de onda de 660nm, exposição radiante 6J/cm², irradiância 49,4mW/cm², 122s (Figura 3). Este parâmetro de irradiação foi selecionado baseando-se no estudo de Rosin et al., 2018.

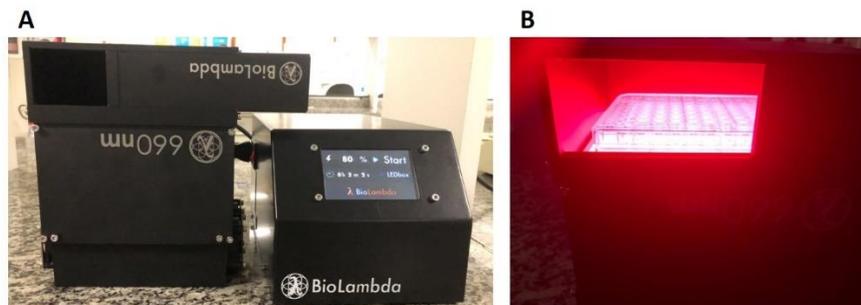


Figura 3: Equipamento LedBOX utilizado para irradiação **(A)** e imagem representativa da placa de 96 poços sendo irradiada para realização da TFD **(B)**.

4.4 Análise da viabilidade celular

4.4.1 Ensaio de MTT

Para o ensaio de redução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium (MTT), 1×10^4 células das linhagens CA1 e Luc4 foram semeadas em placas de 96 poços e após 24h, realizou-se o tratamento com 5-ALA e a irradiação nos diferentes grupos. Após 24h e 48h do tratamento, o meio foi removido, as células foram lavadas com PBS e foi adicionado 75ug/mL de MTT diluído em meio de cultura em cada poço. Após incubação por 3h a 37°C, o meio foi removido e os cristais de formazan foram solubilizados por meio da adição de 100uL de isopropanol. Em seguida, foi realizada a análise da absorbância no espectrofotômetro Anthos 2020 (Biochrom, UK) com filtro de 595 nm. Os valores de absorbância foram transformados em porcentagem em relação ao grupo controle para cada período avaliado. Um mínimo de três experimentos independentes em quintuplicata foram realizados.

4.4.2 Ensaio de Vermelho Neutro

O ensaio de Vermelho Neutro (VN), é baseado no fato de que células viáveis incorporam o VN, o qual fica retido nos lisossomos devido ao pH ácido lisossomal.⁶⁵

Após 24h e 48h após a TFD, as células foram lavadas com solução tampão fosfato (PBS 1x, pH 7,4) e incubadas com 40ug/mL de VN diluído em meio de cultura por 3h a 37°C. Após este período, o VN foi removido, as células foram lavadas com PBS e foram adicionados 150 uL de uma solução contendo 50% de etanol absoluto, 49% água deionizada e 1% de ácido acético para solubilização. Em seguida, a placa foi agitada no equipamento TS-2000A VDRL SHAKER (BiomiXer, Alemanha) por 10min e a quantificação da viabilidade celular foi realizada em um espectrofotômetro (Anthos2020, Biochrom, UK) em comprimento de onda de 492nm. Os valores de absorbância foram transformados em porcentagem em relação ao grupo controle para cada período avaliado. Três experimentos independentes em quintuplicata foram realizados.

4.5 Análise da capacidade de formação de colônia e esferas tumorais

Para avaliar a capacidade clonogênica das linhagens CA1 e Luc4, 24h após a TFD 5-ALA, as células foram cultivadas em placas de 6 poços em densidade de 100 células/poços e mantidas em cultura por 10 dias. Após este período, as células foram fixadas com paraformaldeído a 4% por 15 min, lavadas em PBS e coradas com cristal violeta 1,5% por 5 min. As colônias medindo 2mm ou mais foram contadas independentemente por 2 investigadores.

Para avaliar a capacidade de crescer em suspensão e formar esferas tumorais, 1×10^3 células da linhagem CA1 e 1×10^2 células da linhagem Luc4 foram cultivadas em placas de baixa adesão de 24 poços por 7 dias. Após este período, as esferas tumorais foram visualizadas em microscópio óptico, fotografadas e contadas utilizando-se o software Image J.

4.6 Análise da expressão de CD44 e ESA

Para avaliar o efeito da TFD-5-ALA na porcentagem de células CD44^{high}/ESA^{high}, CD44^{High}/ESA^{low} e CD44^{low}, 24h após os diferentes tratamentos, as células das linhagens CA1 e Luc4 dos diferentes grupos foram incubadas com os anticorpos anti-CD44-FITC (1:25, clone G4-26, BD Biosciences) e anti-ESA-APC (1:800, Miltenyi Biotec) por 30 min no escuro e em temperatura ambiente, bem como com os controles isotípicos FITC e APC (Biolegend). Após este período, as células foram lavadas com solução tampão fosfato (PBS pH 7,4) e ressuspendidas em PBS contendo 2% de albumina de soro bovino e 100ng/mL de DAPI. Em seguida, a expressão de CD44 e ESA foi avaliada utilizando-se o citômetro FACSCanto II do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Foram coletados 100.000 eventos e os dados foram avaliados utilizando-se o software FloJo (versão 10.0.7, FlowJo LLC).

Para identificação da população CD44^{high}/ESA^{high}, foi selecionada 5% da população com maior intensidade de marcação de CD44 e ESA. O fenótipo CD44^{high}/ESA^{low} foi identificado por meio da elevada expressão de CD44 e baixa

expressão de ESA, sendo este número variável de acordo com a linhagem utilizada. Adicionalmente, as células com fenótipo não tronco foram determinadas selecionando-se os 5% de células que apresentaram menor expressão de CD44, correspondendo às células epiteliais diferenciadas.

4.7 Extração de RNA, síntese do cDNA e PCR em tempo real para análise da expressão de genes associados com o fenótipo de CTC e diferenciação celular

Um total de 2×10^4 células das linhagens CA1 e Luc4 foram plaqueadas em placas de 6 poços e posteriormente submetidas aos tratamentos descritos anteriormente. Após 24h, as células foram lavadas com PBS gelado e incubadas com 1mL de TRIzol (ThermoFisher) por 5 minutos. Após a lise celular, as amostras foram coletadas e transferidas para tubos de polipropileno livres de RNase e DNase e em cada amostra foi adicionado 0,2 mL de clorofórmio. Após a centrifugação, a fase aquosa contendo o RNA foi transferida para tubos limpos juntamente com a adição de 0,5mL de álcool isopropanol. Após centrifugação e lavagem com etanol 75%, o RNA foi eluído em água livre de DNase/RNA e a concentração determinada pelo espectrofotômetro em comprimento de onda de 260 e 280nm. A pureza e integridade do RNA isolado foram determinadas por um gel de agarose 1%. Posteriormente, 1 μ g de RNA total foi reversamente transcrito em DNA complementar (cDNA) por meio do kit High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (ThermoFisher), de acordo com as instruções do fabricante.

As reações de qPCR foram realizadas utilizando-se o termociclador 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems Carlsbad, CA, USA), o fluoróforo SYBR® Green I (SYBR Green Master Mix®, Applied Biosystems) e primers específicos para os genes *Bmi-1*, *Calgranulina B*, *Involucrina*, *E-caderina* e o gene constitutivo *GAPDH*. Os primers foram desenhados utilizando-se o software Gene Tool 2.0 (Bitools Incorporated, Edmonton, Alberta, Canada). As reações foram realizadas utilizando-se 5 μ l de Sybr Green Master Mix® (Applied Biosystems), 400 nM de cada *primer*, cDNA (1 μ L) e água. As amostras foram

levadas ao termociclador e submetidas à desnaturação inicial a 95°C por 10 min, seguido por quarenta ciclos de amplificação a 95°C por 10 seg e 60°C por 1 min, seguido por quarenta ciclos de amplificação a 95°C por 10 seg, 60°C por 30 seg e 72 °C por 40 seg. Após o término do último ciclo, todas as amostras foram submetidas à análise da curva de dissociação, conferindo-se a ausência de qualquer curva bimodal ou sinal anormal de amplificação. Para cada par de *primers* foi realizada qPCR utilizando-se água estéril (blank) para avaliação de sua possível contaminação. As sequências dos primers utilizados e as condições das reações de qPCR estão descritas na Tabela 1.

A análise quantitativa da expressão foi realizada de acordo com o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$. As reações de qPCR foram realizadas em duplicata e as amostras de cDNA em cada reação foram analisadas em triplicata, sendo consideradas para quantificação somente àquelas com desvio padrão $\leq 0,05$ entre os valores de C_t .

Tabela 1 - Genes utilizados para amplificação por qPCR nas linhagens CA1 e LUC4 nos grupos Controle, 5-ALA, LED 6J/cm² e TFD. Condições de reações segundo número de acesso no GenBank, sequência dos *primers*, temperatura de anelamento (T_m), concentração dos primers e tamanho do produto amplificado.

Gene	Acesso GenBank	Primers 5' → 3'	T_m (°C)	Concentração (nM)
<i>Bmi1</i>	NM_005180.8	F: gctgccaatggctctaatagaa R: tgctgggcatcgtaagtatctt	60	400
<i>IVL</i> (<i>Involucrina</i>)	NM_005547.3	F: caagacattcaaccagccct R: agcggaccggaaataagtg	60	400
<i>S100A9</i> (<i>Calgranulina</i>)	NM_002965.3	F: aagagctggtgcgaaaaga R: ggtgccaggtcctccatgat	60	400
<i>E-caderina</i>	NM_004360.5	F: ccatcccaccacgtacaag R: tcacatcctacactgcccag	60	400
<i>GAPDH</i>	NM_001256799.2	F: gtgaaccatgagaagtatgacaac R: catgagtcctccacgatacc	60	400

4.8 Análise da capacidade de migração celular

Para avaliação da capacidade de migração, as células das linhagens CA1 e Luc4 dos diferentes grupos de estudo foram colocadas em confluência em placas de cultivo celular de 24 poços. Após 24 horas, foi feita uma “ferida” na monocamada

com a ponteira da pipeta de 200uL com a finalidade de descontinuar a monocamada. Imediatamente após a realização da ferida e após 24h, foram realizadas fotos da área da ferida utilizando o equipamento Nikon eclipse TS100 (Nikon). O software NIS- Elements D foi usado para quantificar a área da ferida nos diferentes períodos. Para análise da porcentagem de fechamento da ferida, o seguinte cálculo foi realizado: $(A_{t_{0h}} - A_{t_{24h}}) / A_{t_{0h}} \times 100$; onde $A_{t_{0h}}$ equivale à medida da área da ferida imediatamente após a realização da ferida e $A_{t_{24h}}$ corresponde à medida da área da ferida após 24h (Grada et al., 2016).

4.9 Análise estatística

Um mínimo de três experimentos independentes em quintuplicata foram realizados para o ensaio de MTT e VN. Os demais experimentos foram realizados em triplicata e três experimentos independentes foram feitos para obtenção dos dados. Os resultados foram submetidos a análise de variância ANOVA seguido pelo Teste de Tukey. Os dados foram analisados utilizando-se o software GraphPad Prism versão 7.0 e o nível de significância adotado foi $p < 0,05$.

5.Resultados

5.1 Determinação da concentração do FS

Para determinação da concentração do Fs, as células das linhagens CA1 e Luc4 foram incubadas com as concentrações 0,25mM, 0,5mM, 0,75 mM, 1,0mM, 1,5mM e 2,0 mM de 5-ALA por 4h a 37°C. Após 24h e 48h da incubação com 5-ALA, foi realizada a análise da viabilidade celular por MTT. Como demonstrado na Figura 4, não foi observada alteração na viabilidade celular em ambas as linhagens tratadas com as diferentes concentrações de 5-ALA quando comparado com o grupo controle ($p>0,05$).

Desta maneira, foi selecionada a concentração de 1mM para a realização dos demais experimentos uma vez que esta mesma concentração já foi utilizada em estudos *in vitro* que avaliaram o efeito da TFD no CEB (Rosin et al., 2018).

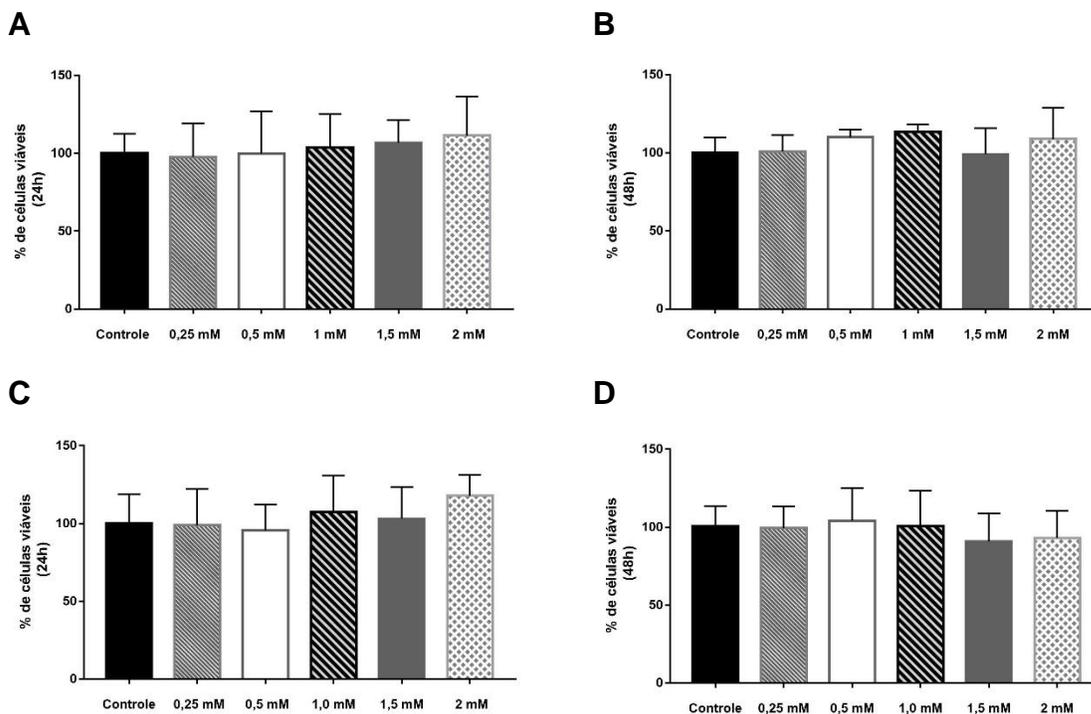


Figura 4: Análise da viabilidade celular por MTT após 24h (A) e (C) na linhagem Ca1 e Luc4, respectivamente, bem como após 48h (B) e (D) da incubação com as diferentes concentrações de 5-ALA.

5.2 Determinação dos parâmetros da irradiação para a TFD

As células das linhagens CA1 e Luc4 foram submetidas à irradiação com $3\text{J}/\text{cm}^2$, $6\text{J}/\text{cm}^2$ e $9\text{J}/\text{cm}^2$ para determinação da exposição radiante necessária para induzir uma diminuição da viabilidade celular em 50%.

Na linhagem CA1, não houve diferença significativa em relação à viabilidade celular entre os grupos quando as células foram irradiadas com o parâmetro $3\text{J}/\text{cm}^2$ (Figura 5A). Nos parâmetros $6\text{J}/\text{cm}^2$ e $9\text{J}/\text{cm}^2$, redução significativa da viabilidade celular foi observada no grupo TFD quando comparado com os demais grupos (58,24% e 38,2%, respectivamente, $p < 0,001$) (Figura 5B e 5C).

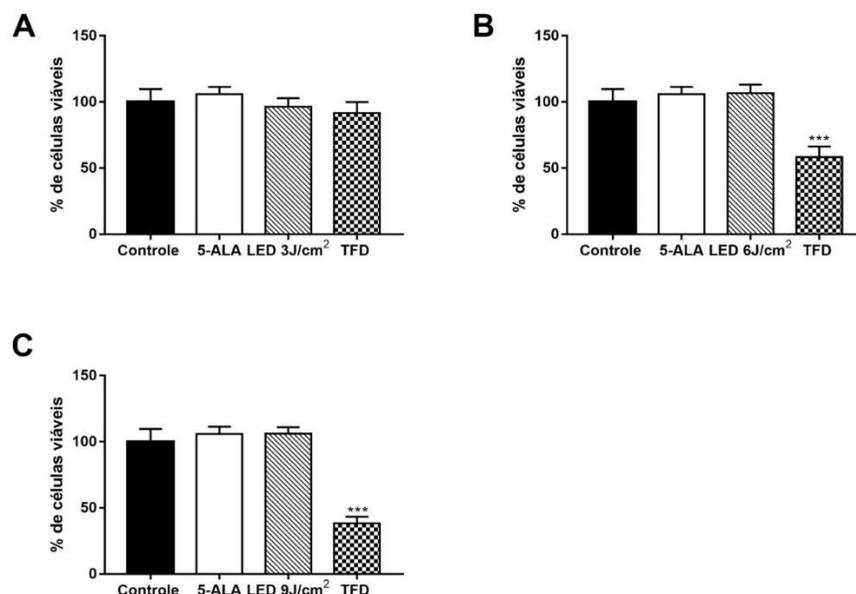


Figura 5: Análise da viabilidade por MTT da linhagem CA1 submetida à irradiação com 3J/cm² (A), 6J/cm² (B) e 9J/cm² (C).

Na linhagem Luc4, foi observada redução significativa da viabilidade celular do grupo LED 3J/cm² e TFD quando ambos foram comparados com os grupos Controle e 5-ALA ($p < 0,0001$). O grupo TFD não mostrou diferença significativa quando comparado com o grupo LED 3J/cm² (Figura 6A). Em relação ao parâmetro LED 6J/cm², o grupo TFD mostrou redução significativa da viabilidade quando comparado com os demais grupos (54,50%, $p < 0,0001$, ANOVA seguido de teste de Tukey). Foi observado também, diminuição da viabilidade celular no grupo LED 6J/cm² em relação aos grupos Controle e 5-ALA (Figura 6B). No parâmetro 9J/cm², o grupo TFD mostrou diminuição significativa na porcentagem de células viáveis em relação aos demais grupos (37,19%, $p < 0,0001$) (Figura 6C).

Baseando-se nestes resultados, o parâmetro de irradiação LED 6J/cm² foi selecionado para a TFD mediada pelo 5-ALA nas linhagens CA1 e Luc4.

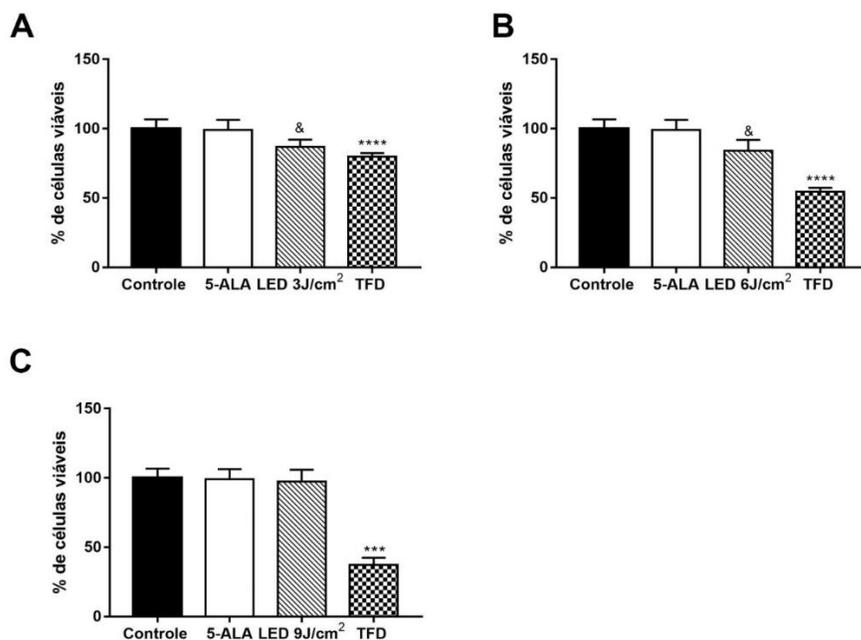


Figura 6: Análise da viabilidade por MTT da linhagem Luc4 submetida à irradiação com 3J/cm² (A), 6J/cm² (B) e 9J/cm² (C). & Diferença significativa em relação aos grupos Controle e 5-ALA. **** Diferença significativa em relação aos grupos Controle, 5-ALA e LED.

5.3 Análise da morfologia celular após a TFD

Após 24h e 48h da TFD, as células das linhagens CA1 e Luc4 foram avaliadas em relação à morfologia. Como pode ser observado nas Figuras 7 e 8, as células das linhagens CA1 dos grupos controle, LED 6J/cm² e 5-ALA apresentaram predominantemente morfologia poligonal, núcleos esféricos com nucléolo evidente e presença de adesão entre as células. Após 24h e 48h da TFD, foi observada contração celular, presença de células esféricas, perda de adesão entre as células, fragmentação do núcleo e inúmeros grânulos citoplasmáticos, característico de morte celular por apoptose. Adicionalmente, foi observada a presença de células “fantasmas”, nas quais o núcleo estava ausente. Interessantemente, todas as células com morfologia alterada após 24h e 48h da TFD estavam aderidas ao frasco, sem rompimento de membrana, sendo necessária a utilização de tripsina para sua remoção.

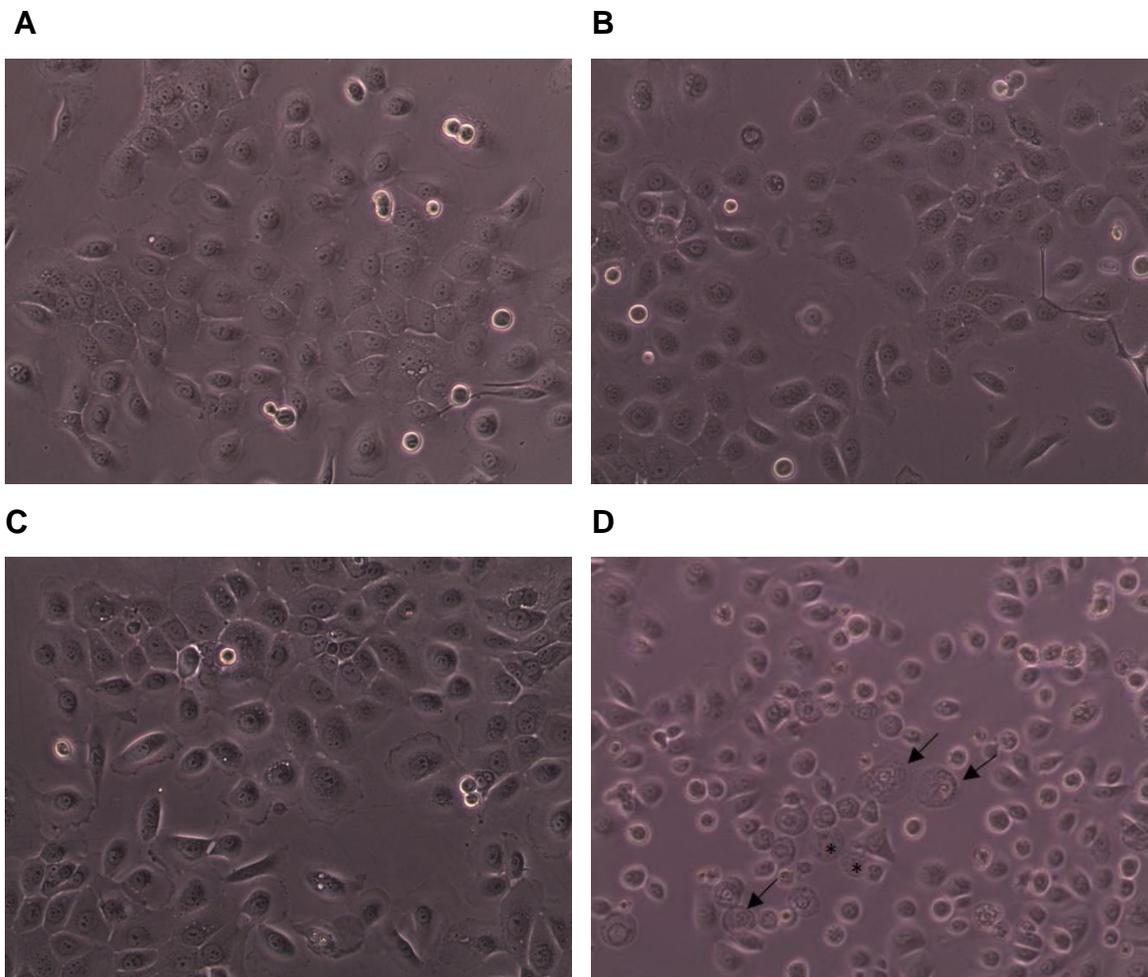


Figura 7: Aspecto morfológico das células da linhagem CA1 no grupo Controle **(A)**, 5-ALA **(B)**, LED 6J/cm² **(C)** e TFD **(D)** após 24h da TFD. Pode ser observada a presença de células esféricas mostrando fragmentação do núcleo e inúmeros grânulos no citoplasma (seta preta) e células “fantasma” (*).

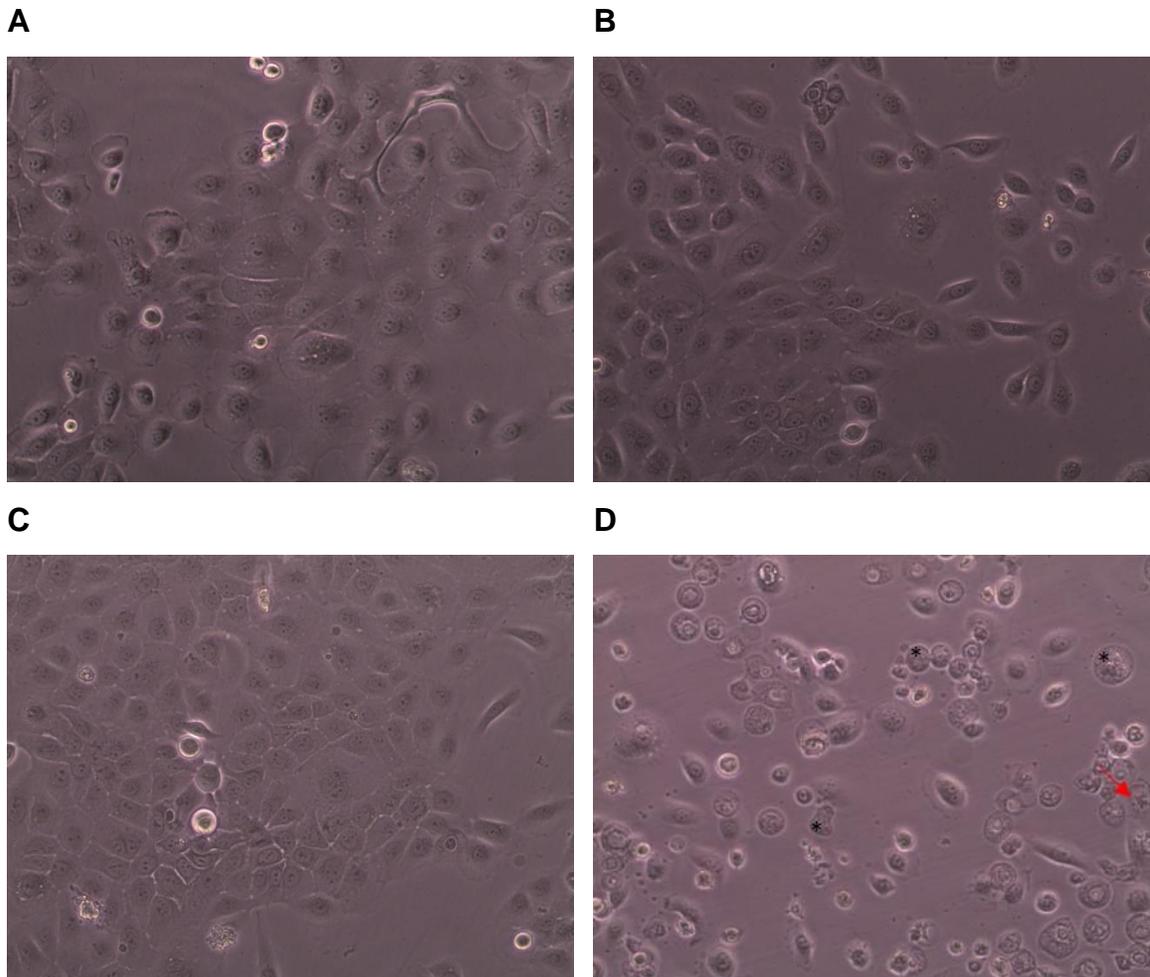


Figura 8: Aspecto morfológico das células da linhagem CA1 no grupo Controle **(A)**, 5-ALA **(B)**, LED 6J/cm² **(C)** e TFD **(D)** após 48h da TFD. Pode ser observada a presença de células “fantasmas” (*) e fragmentação nuclear (seta vermelha).

Após 24h e 48h da TFD, as células da linhagem Luc4 dos grupos Controle, 5-ALA e LED 6J/cm² apresentaram aspecto morfológico predominantemente poligonal, núcleo e nucléolos evidentes e adesão umas às outras (Figura 9 e 10). Células com morfologia fusiforme foram também evidenciadas, uma vez que esta linhagem apresenta uma população mista de células com características epiteliais e mesenquimais. No grupo TFD, assim como observado para a linhagem CA1, pode ser observada alteração da morfologia celular, perda de adesão entre as células epiteliais, fragmentação do núcleo, corpos apoptóticos e células sem núcleo, indicando morte celular por apoptose. Vale ressaltar que não foi observada ruptura da membrana celular após a TFD.

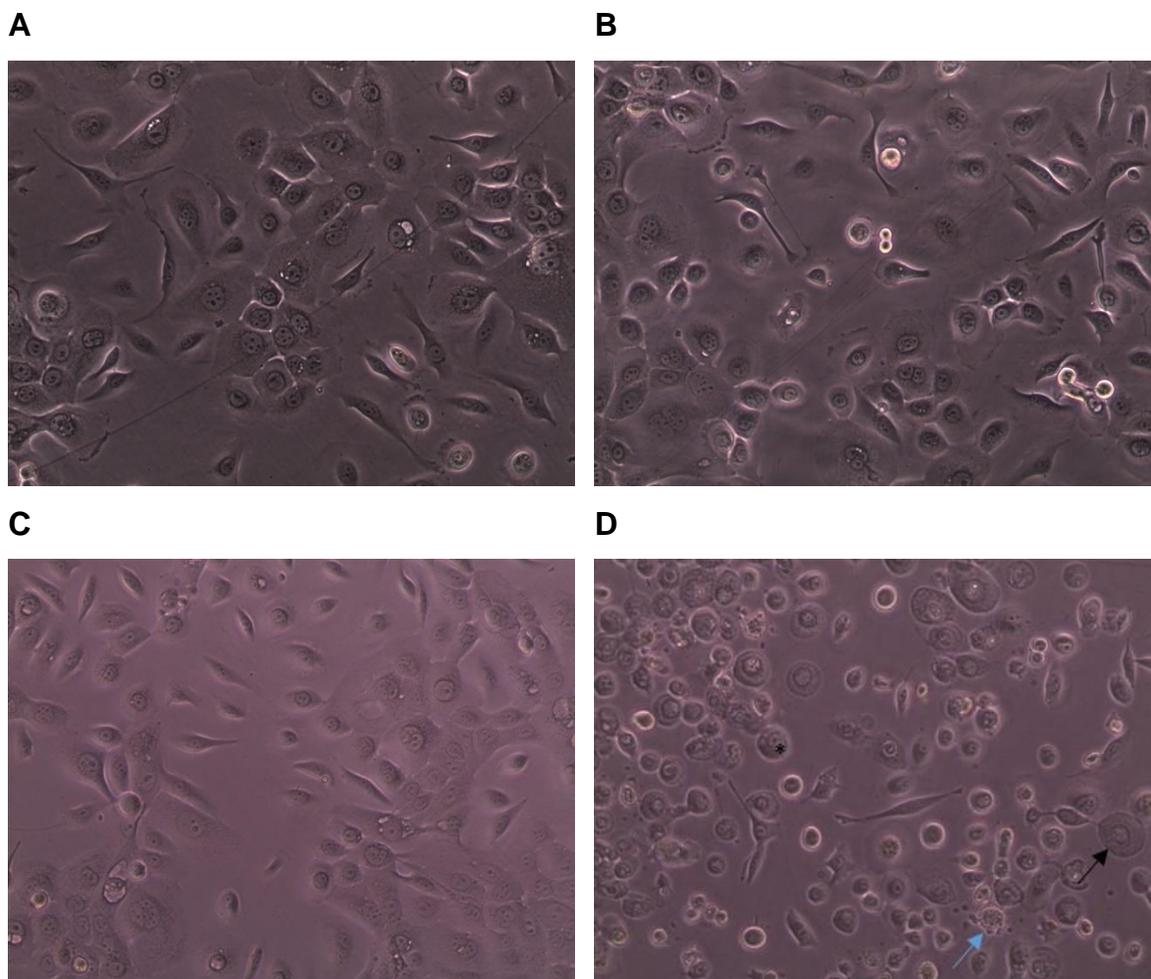


Figura 9: Aspecto morfológico das células da linhagem Luc4 no grupo Controle **(A)**, 5-ALA **(B)**, LED 6J/cm² **(C)** e TFD **(D)** após 24h da TFD. Pode ser observada perda de adesão celular, a presença de células esféricas com grânulos citoplasmáticos (seta preta) e células apoptóticas (seta azul).

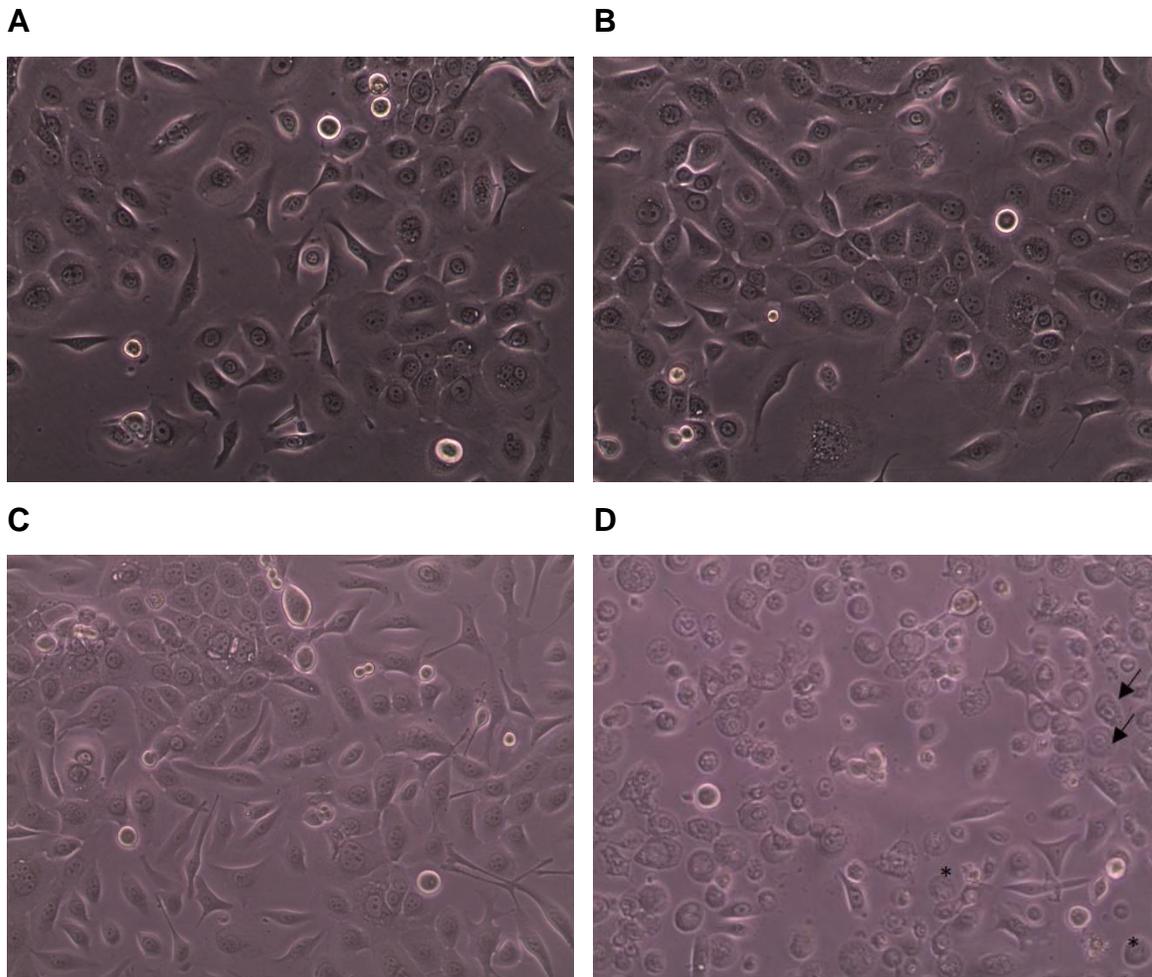


Figura 10: Aspecto morfológico das células da linhagem Luc4 no grupo Controle **(A)**, 5-ALA **(B)**, LED 6J/cm² **(C)** e TFD **(D)** após 48h da TFD. Pode ser observada perda de adesão celular, contração celular, células com morfologia arredondada (seta preta) e células “fantasma” (asterisco).

5.4 Análise da viabilidade celular por incorporação de vermelho Neutro

Na análise da viabilidade celular por incorporação de VN, as células do grupo TFD das linhagens celulares CA1 e Luc4 mostraram redução significativa da viabilidade celular quando comparado com os grupos controle, LED 6J/cm² e 5-ALA ($p < 0,001$) após 24h e 48h da TFD (Figura 11).

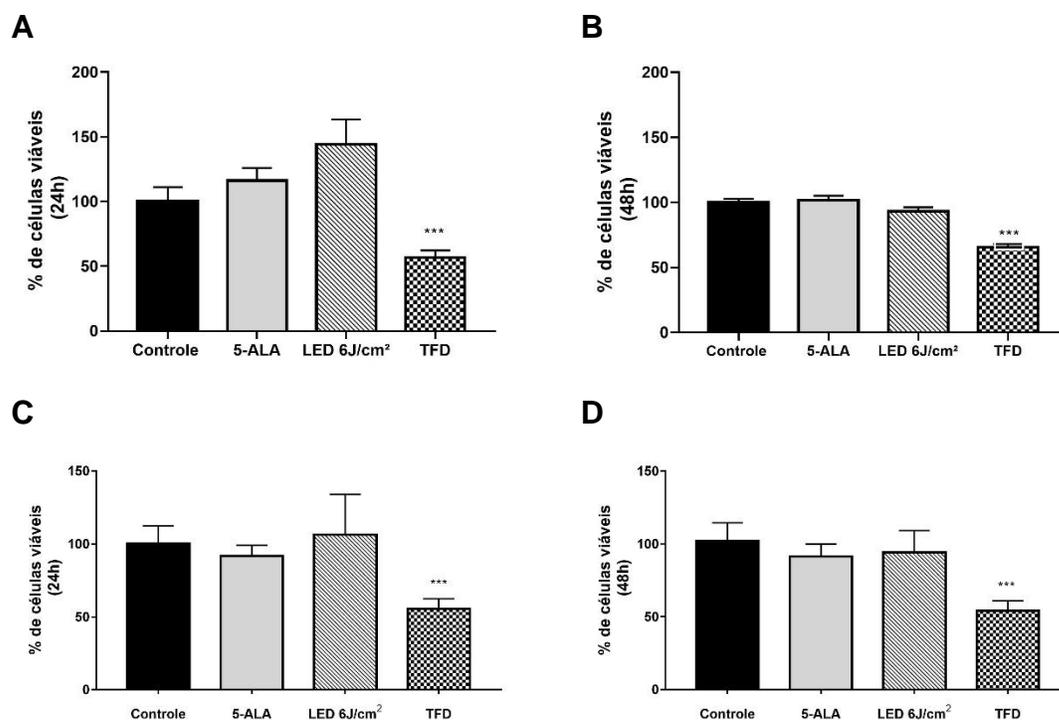


Figura 11: Análise da viabilidade celular por VN após 24h e 48h da TFD na linhagem CA1 **(A)** e **(B)**, respectivamente, Luc4 **(C)** e **(D)** (***) $p < 0,001$).

Também foi observada redução significativa da viabilidade celular após análise por MTT no grupo TFD, tanto na linhagem CA1 quanto na linhagem Luc4, após 24h, em relação aos demais grupos ($p < 0,0001$) (Figura 11).

5.5 Análise da expressão de CD44 e ESA

Corroborando com os dados de formação de colônias, tanta na linhagem Ca1 quanto na linhagem Luc4 foi observada redução significativa na porcentagem de células com fenótipo CD44^{high}/ESA^{high} no grupo TFD em relação aos demais grupos estudados ($p < 0,05$ e $p < 0,001$). A diminuição da população CD44^{high}/ESA^{high} no grupo TFD foi acompanhado pelo aumento significativo na porcentagem de células CD44^{low} quando comparado com os grupos Controle, 5-ALA e LED 6J/cm², indicando um aumento da diferenciação celular. Adicionalmente, não houve diferença significativa na porcentagem de células com o fenótipo CD44^{high}/ESA^{low} em ambas as linhagens no grupo TFD em relação aos demais grupos, embora tenha sido observada redução na capacidade de formação de esferas (Figura 12).

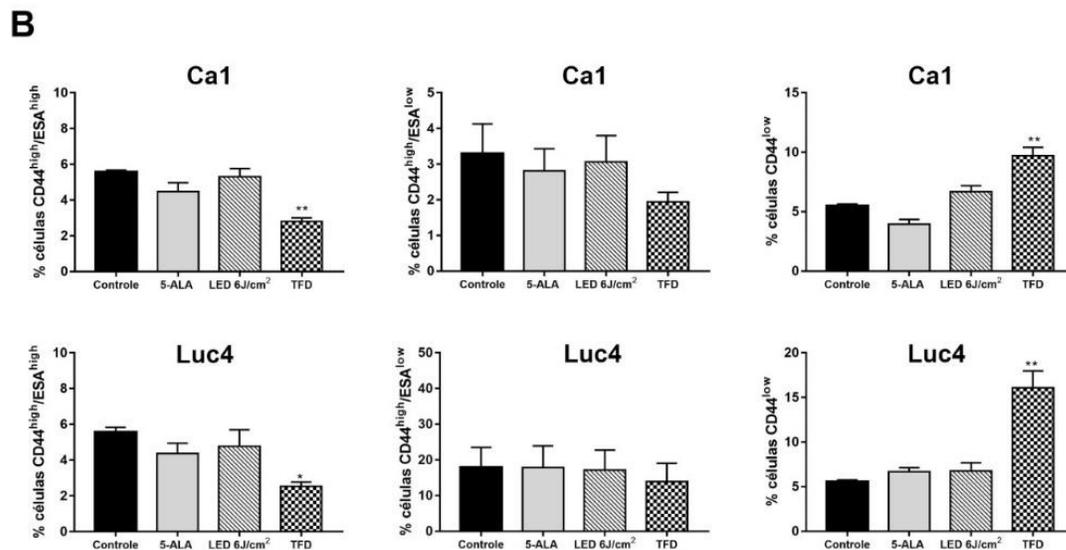
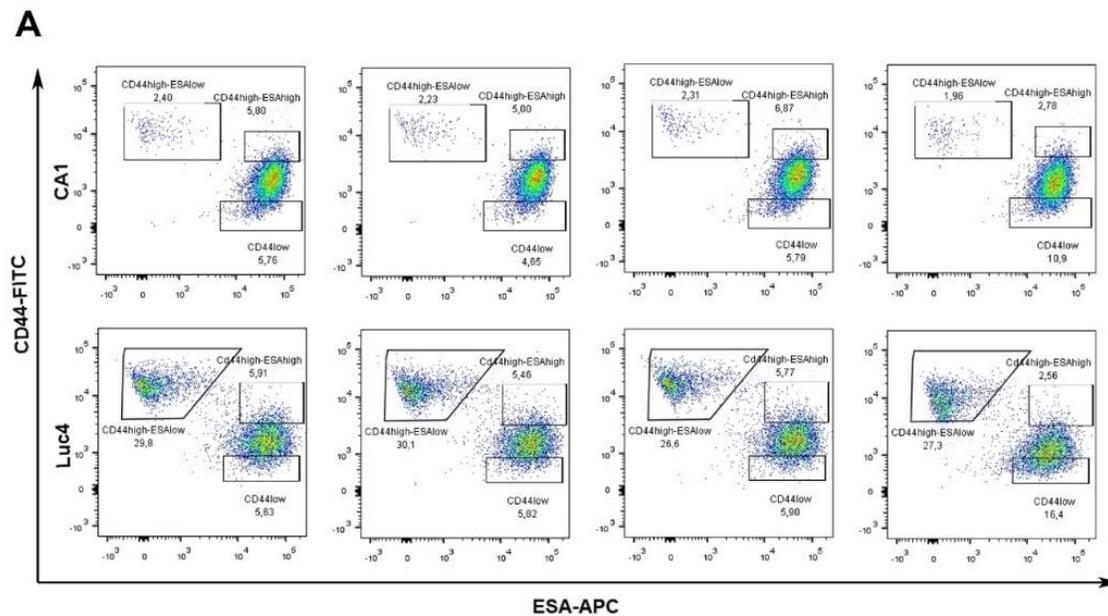


Figura 12: Análise da expressão de CD44 e ESA nas linhagens CA1 e Luc4 por citometria de fluxo (**A**) e avaliação da porcentagem de células com o fenótipo CD44^{high}/ESA^{high}, CD44^{high}/ESA^{low} e CD44^{low} em ambas as linhagens nos diferentes grupos (**B**) (*p<0,05 e **p<0,001).

5.6 Análise da produção de PpIX

Para avaliação da produção de PpIX pelas linhagens celulares CA1 e Luc4 bem como pelas subpopulações CD44^{high}/ESA^{high}, CD44^{high}/ESA^{low}, imediatamente após a incubação com 5-ALA por 4h, as células foram marcadas com os anticorpos anti-CD44 e anti-ESA e analisadas por citometria de fluxo.

Como demonstrado nas Figuras 13A-F, ambas as linhagens CA1 e Luc4 mostraram aumento significativo na produção da PpIX quando comparado com o grupo Controle ($p < 0,0001$), sendo este aumento maior na linhagem Luc4.

Na linhagem CA1, as subpopulações CD44^{high}/ESA^{high} e CD44^{high}/ESA^{low} apresentaram maior produção de PpIX em relação à subpopulação CD44^{low} ($p < 0,0001$ e $p < 0,05$). Na linhagem Luc4, somente a subpopulação CD44^{high}/ESA^{high} apresentou maior produção de PpIX quando comparado com a subpopulação CD44^{low} ($p < 0,05$) (Figura 13E e 13F). Desta maneira, estes resultados sugerem que as subpopulações de CTC identificadas pelo fenótipo CD44^{high}/ESA^{high} e CD44^{high}/ESA^{low} são mais susceptíveis à PDT uma vez que apresentam maior produção de PpIX.

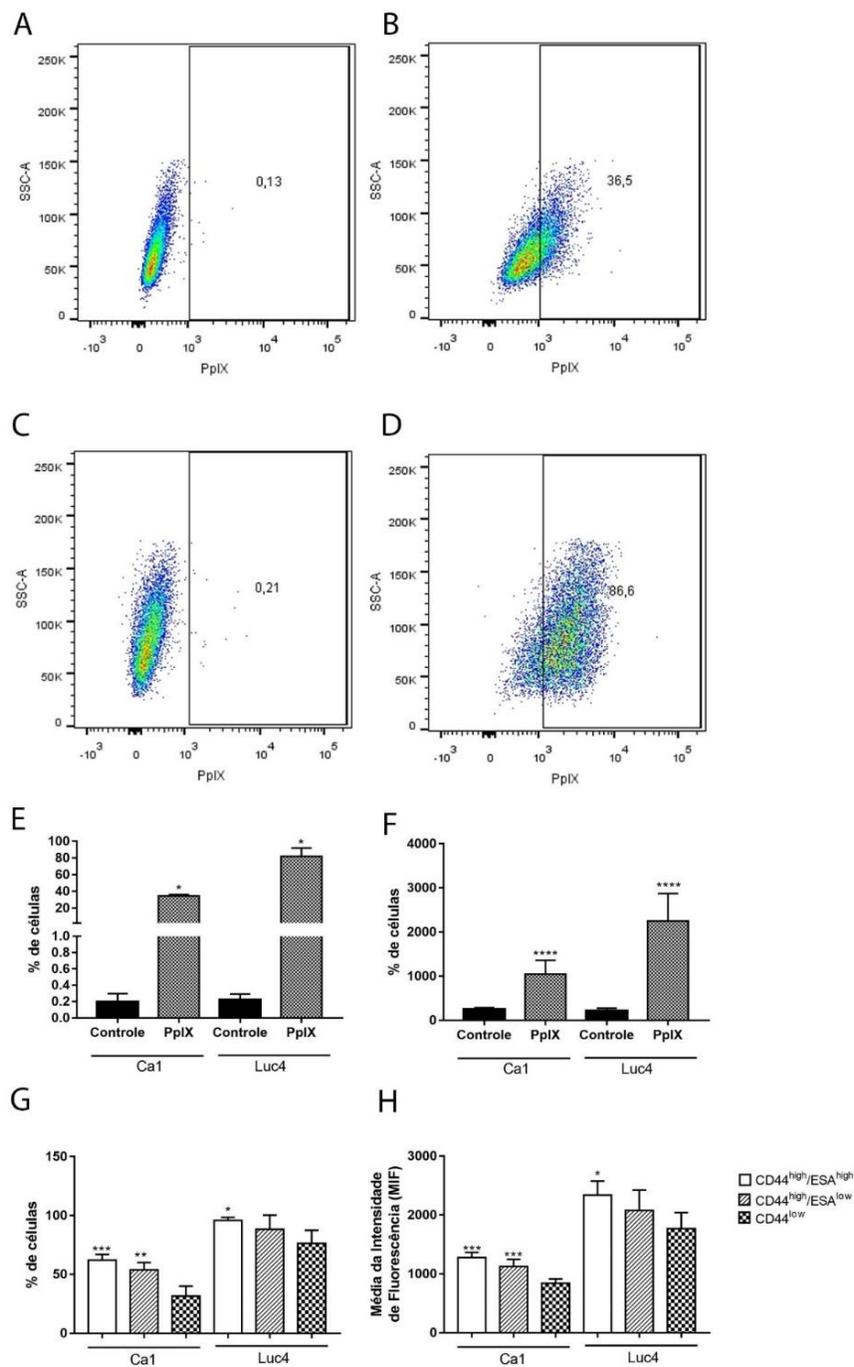


Figura 13: Análise da produção de PpIX na linhagem CA1 (A e B) e Luc4 (C e D) por citometria de fluxo. Quantificação da porcentagem de células positivas para PpIX nas linhagens CA1 e Luc4 (E) e nas subpopulações CD44^{high}/ESA^{high}, CD44^{high}/ESA^{low} e CD44^{low} (G). Avaliação da média de intensidade de fluorescência de PpIX nas subpopulações CD44^{high}/ESA^{high}, CD44^{high}/ESA^{low} e CD44^{low} das linhagens Ca1 e Luc4.

5.7 Análise da formação de colônias

Na linhagem CA1 e Luc4 foi observada redução significativa no número de colônias no grupo TFD (Figuras 14 e 15, respectivamente) em relação aos grupos Controle, 5-ALA e LED 6J/cm² ($p < 0,001$). Além disso, avaliando-se a morfologia das colônias, foi observado que após a TFD, tanto as células da linhagem CA1 quanto Luc4 formaram colônias com morfologia de paraclones, caracterizados pela presença de células com citoplasma mais abundante, indicando diferenciação terminal e perda do potencial de auto-renovação (Figura 14B e 15B).

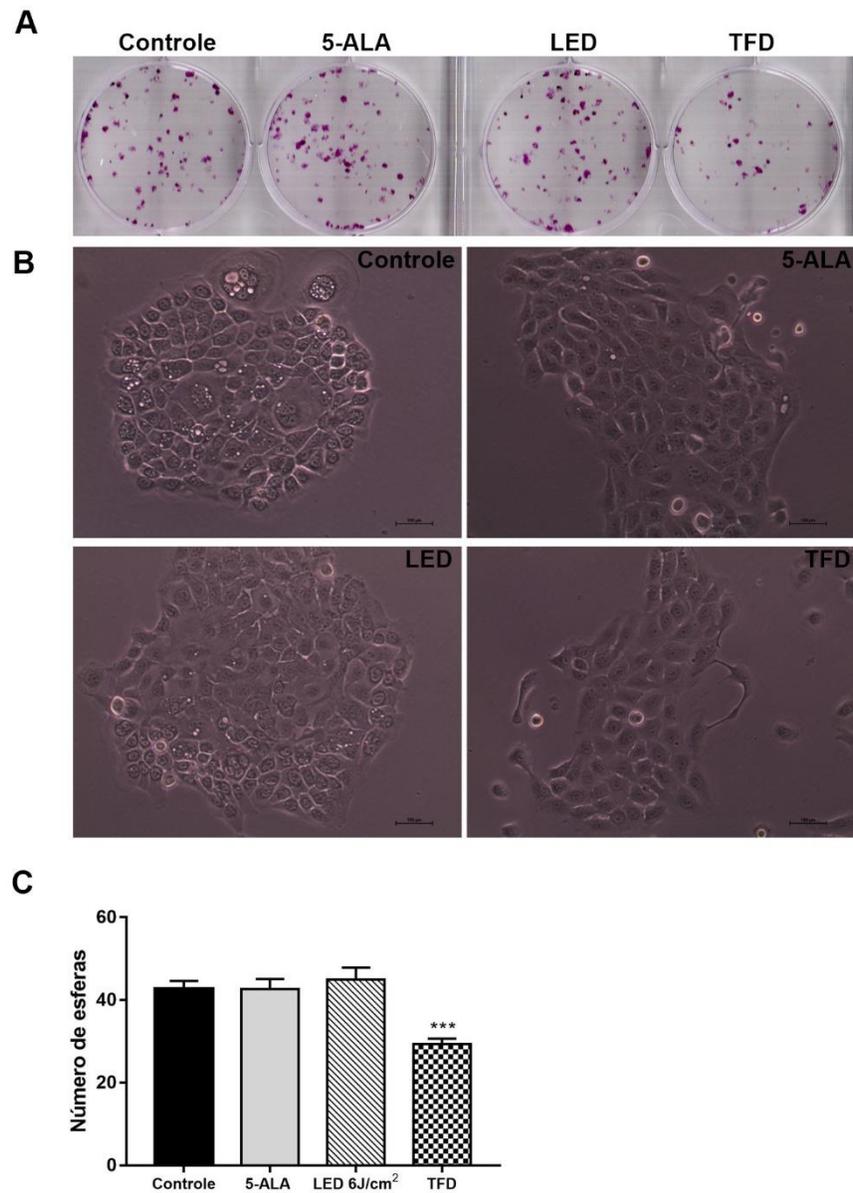


Figura 14: Formação de colônias na linhagem Ca1 nos grupos Controle, 5-ALA, LED 6J/cm² e TFD **(A)**. Aspecto microscópico das colônias formadas após os diferentes tratamentos **(B)**. Quantificação do número de colônias na linhagem Ca1 nos diferentes grupos estudados **(C)** (**p<0,001).

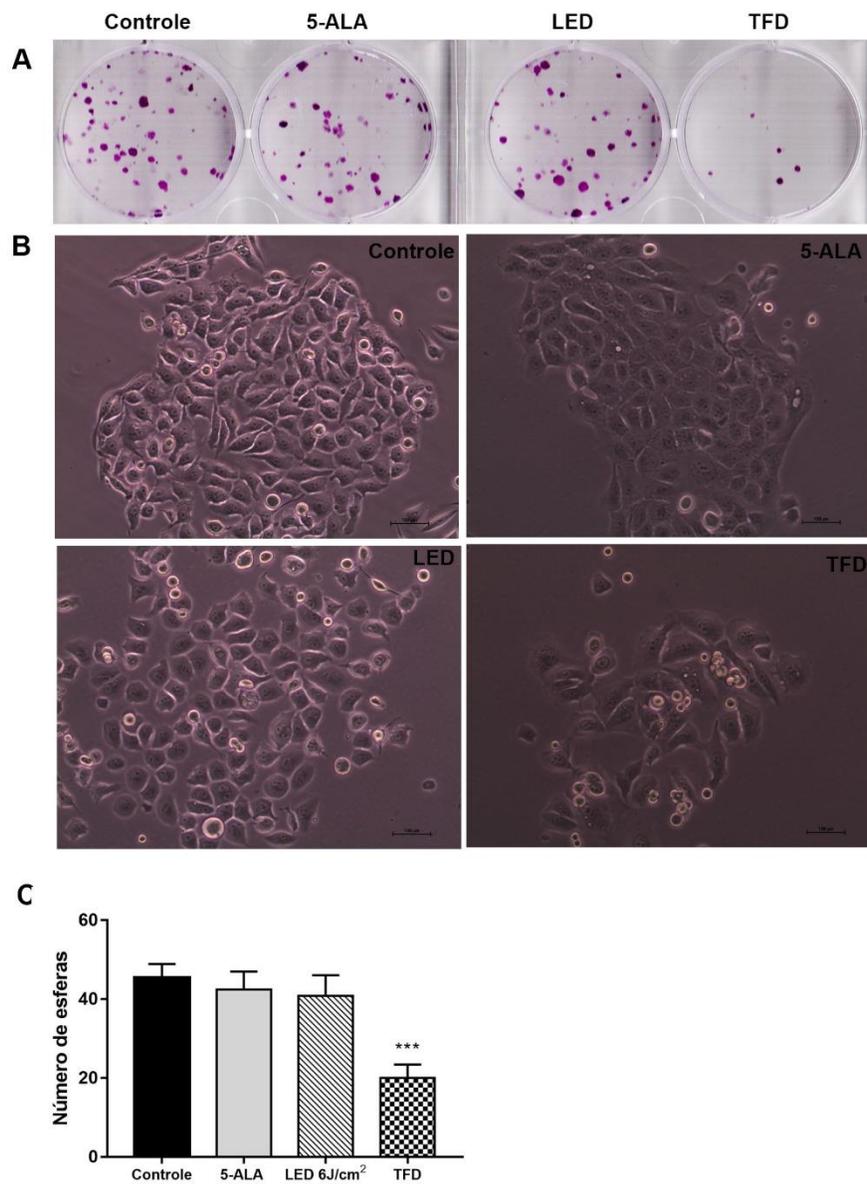


Figura 15: Formação de colônias na linhagem Luc4 nos grupos Controle, 5-ALA, LED 6J/cm² e TFD **(A)**. Aspecto microscópico das colônias formadas após os diferentes tratamentos **(B)**. Quantificação do número de colônias na linhagem Ca1 nos diferentes grupos estudados **(C)** (***) $p < 0,001$).

5.8 Análise da formação de esferas

Na linhagem Ca1 e Luc4 foi observada redução significativa no número de esferas no grupo TFD (Figuras 16 e 17, respectivamente) em relação aos grupos Controle, 5-ALA e LED 6J/cm² (CA1 p<0,005 e Luc4 p<0,001).

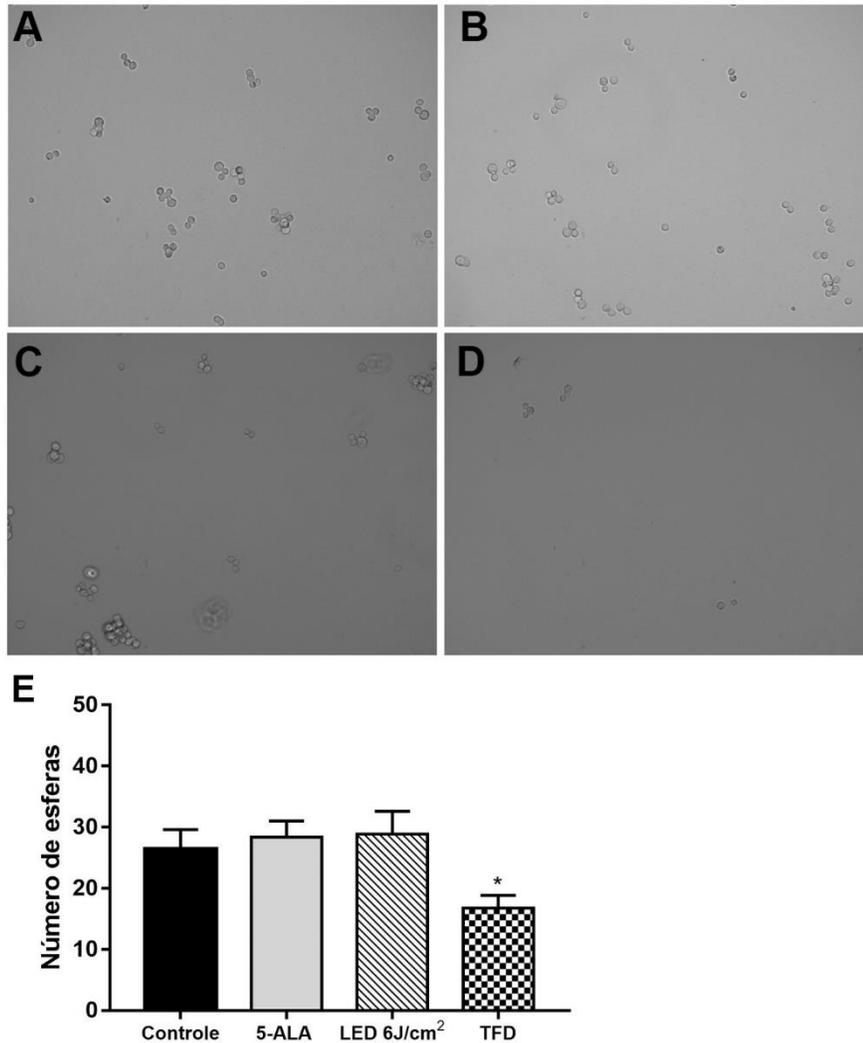


Figura 16: Formação de esferas na linhagem Ca1 nos grupos Controle (A), 5-ALA (B), LED 6J/cm² (C) e TFD (D). Quantificação do número de esferas na linhagem Ca1 nos diferentes grupos estudados (E) (*p<0,05).

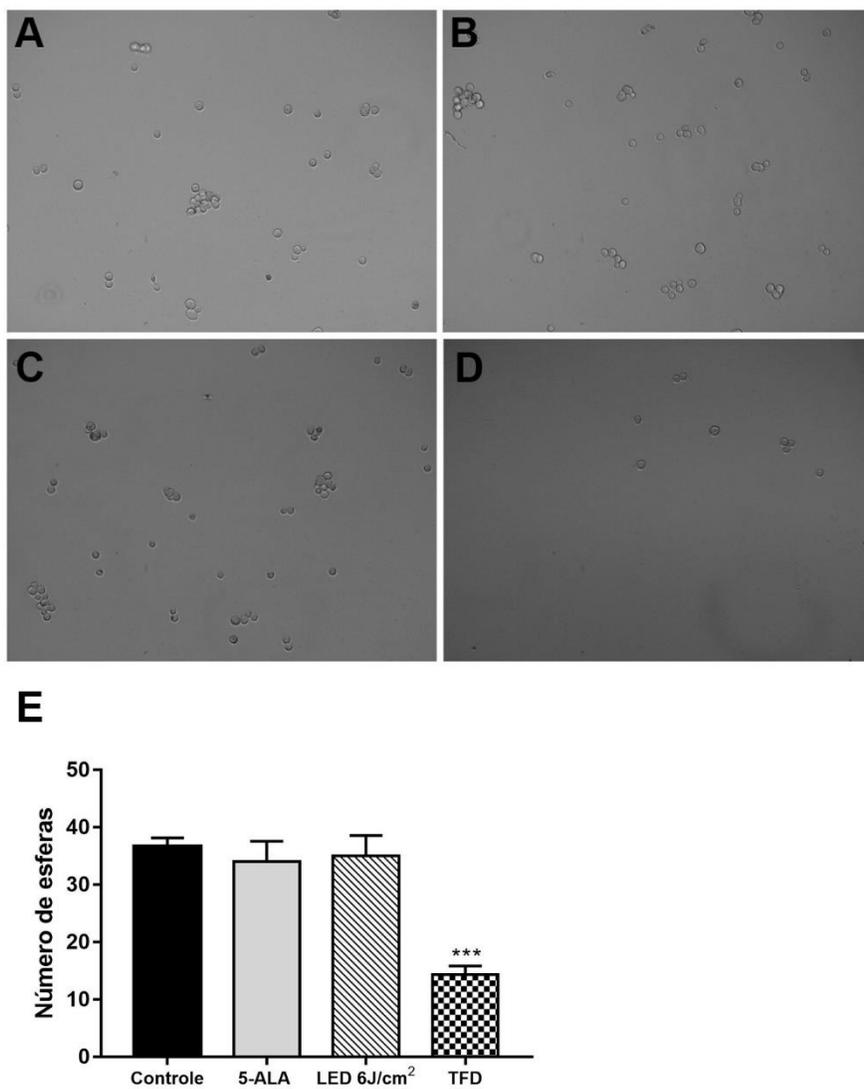


Figura 17: Formação de esferas na linhagem Luc4 nos grupos Controle (A), 5-ALA (B), LED 6J/cm² (C) e TFD (D). Quantificação do número de esferas na linhagem Luc4 nos diferentes grupos estudados (E) (**p<0,0001).

5.9 Análise da capacidade de migração celular

Na linhagem Ca1 foi observada uma redução significativa na porcentagem de fechamento da área da ferida nos grupos 5-ALA e TFD quando comparado com o grupo Controle ($p < 0,0001$) e no grupo TFD quando comparado com o grupo LED $6\text{J}/\text{cm}^2$ ($p < 0,0001$). Adicionalmente, foi observada que as células do grupo LED $6\text{J}/\text{cm}^2$ mostraram maior capacidade migratória, evidenciada pela maior porcentagem de fechamento da área da ferida após 24h do tratamento ($p < 0,0001$) (Figura 18 A e C).

Na linhagem Luc4 foi observada uma redução significativa na porcentagem de fechamento da área da ferida nos grupos 5-ALA e TFD quando comparado com o grupo Controle ($p < 0,001$) e no grupo TFD quando comparado com o grupo LED $6\text{J}/\text{cm}^2$ ($p < 0,0001$). Adicionalmente, foi observada que as células do grupo LED $6\text{J}/\text{cm}^2$ mostraram maior capacidade migratória, evidenciada pela maior porcentagem de fechamento da área da ferida após 24h do tratamento ($p < 0,001$) (Figura 18 B e D).

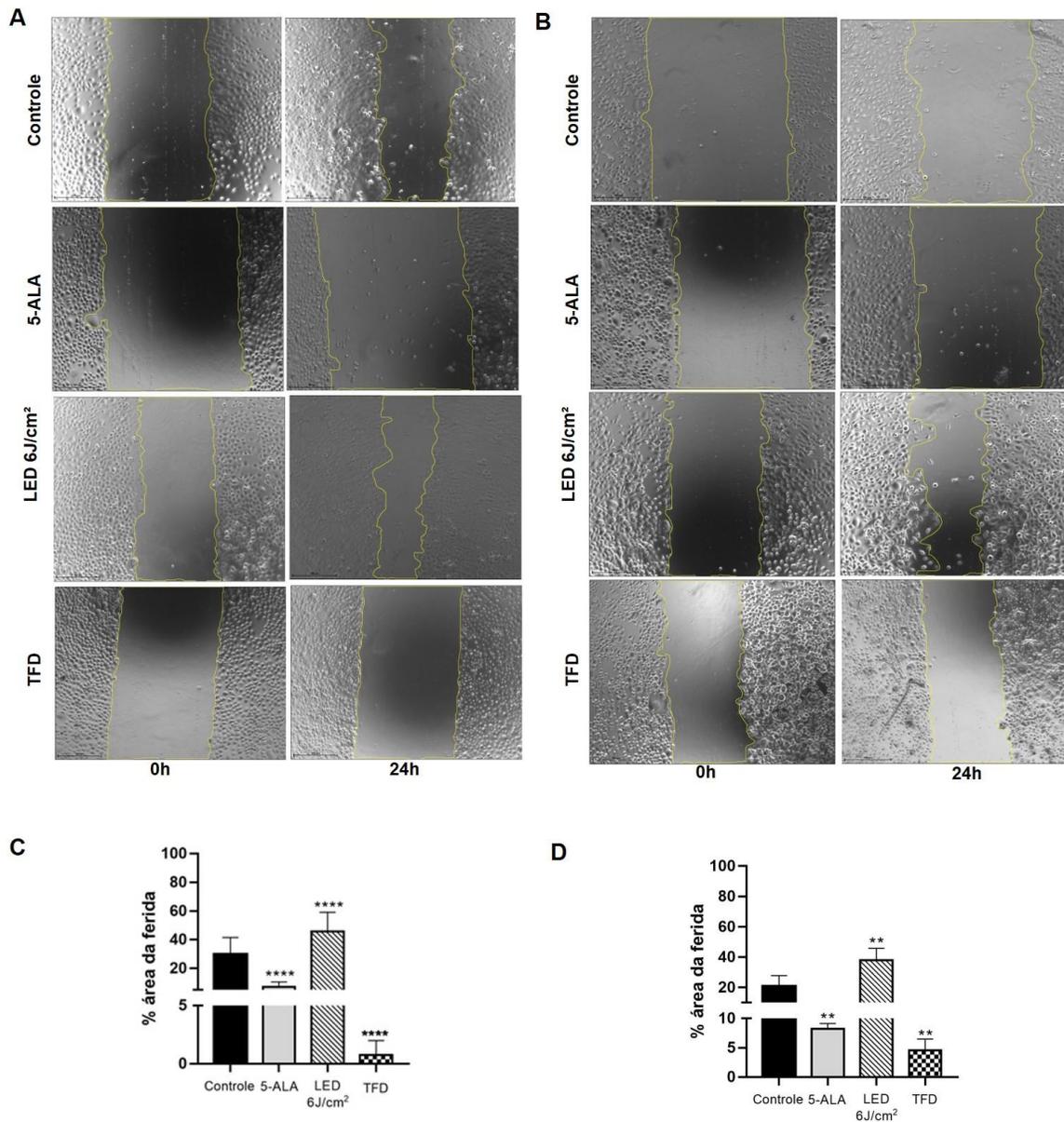


Figura 18: Análise da capacidade de migração das células da linhagem Ca1 **(A)** e Luc4 **(B)** nos grupos Controle, 5-ALA, LED 6J/cm² e TFD após 24h do tratamento. Quantificação da porcentagem de fechamento da área da ferida na linhagem Ca1 **(C)** e Luc4 **(D)**. **p<0,001 em relação ao grupo Controle, *** p<0,0001 em relação ao grupo Controle.

5.10 Análise da expressão dos genes *Bmi1*, *Calgranulina*, *Involucrina* e *E-caderina*

Foi observada redução nos níveis de expressão do gene *Bmi1* no grupo TFD da linhagem Ca1 quando comparado com os grupos Controle, 5-ALA e LED 6J/cm² ($p < 0,05$) (Figura 19A). Adicionalmente, no grupo TFD, houve um aumento significativo da expressão de *Calgranulina* em relação aos demais grupos ($p < 0,001$), indicando indução da diferenciação celular na linhagem Ca1 (Figura 19C). Na linhagem Luc4, não foi observada alteração da expressão dos genes *Bmi1* e *Calgranulina* nos grupos avaliados (Figura 19B e 19D).

Tanto na linhagem Ca1 quanto na linhagem Luc4, não houve modulação da expressão do gene *IVL*, associado à diferenciação celular (Figura 19E e 19F). Somente na linhagem Luc4, o grupo TFD apresentou diminuição da expressão do gene *E-caderina* quando comparado com os demais grupos ($p < 0,05$) (Figura 19G e 19H).

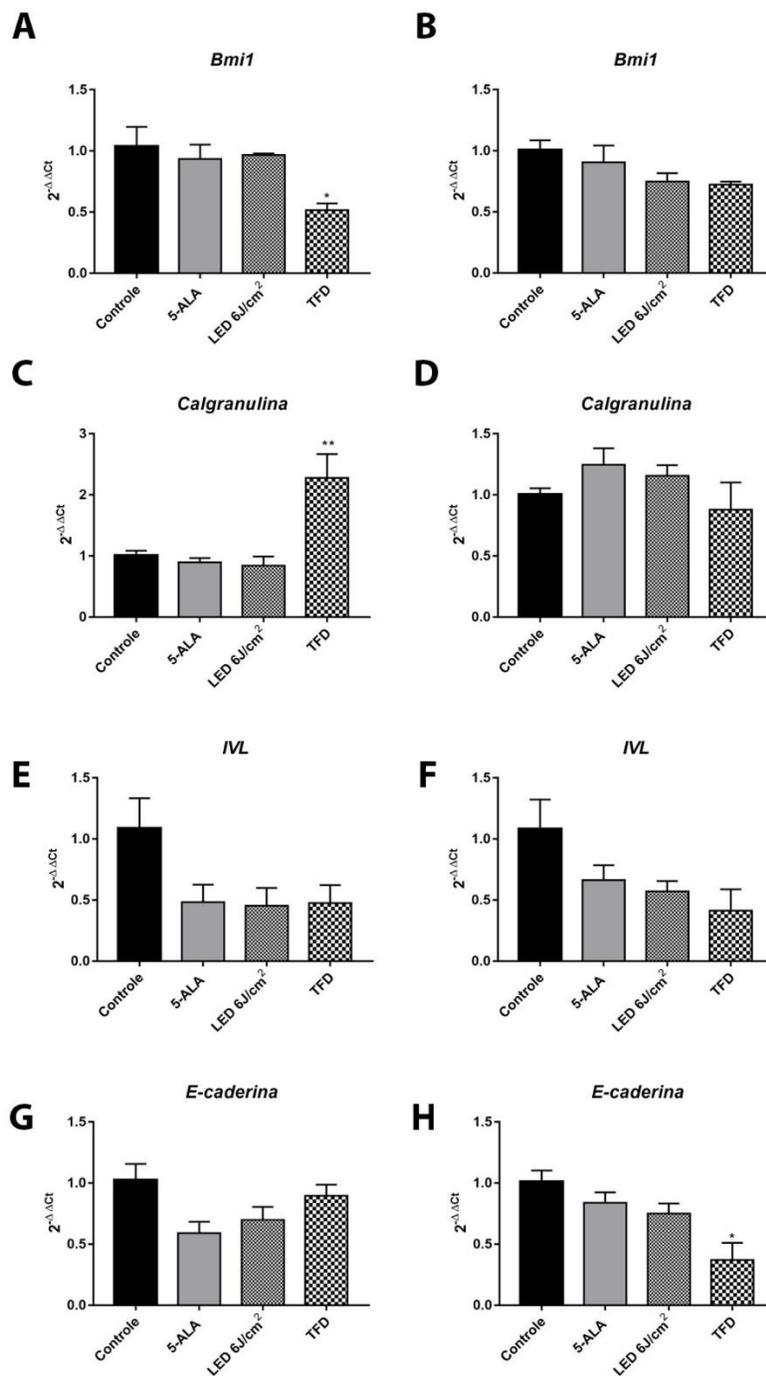


Figura 19: Análise da expressão dos genes *Bmi1*, *Calgranulina*, *IVL* e *E-caderina* na linhagem Ca1 (**A**, **C**, **E** e **G**) e na linhagem Luc4 (**B**, **D**, **F** e **H**) nos diferentes grupos. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,001$.

6. Discussão

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que a TFD mediada pelo 5-ALA é capaz de reduzir a viabilidade celular de linhagens celulares derivadas de CEB e ainda, a capacidade de formação de colônias e esferas tumorais. Adicionalmente, após a TFD, houve uma diminuição da porcentagem de células com o fenótipo CD44^{high}/ESA^{high}, responsável pela auto-renovação das CTC. Esta diminuição foi acompanhada pelo aumento da população com o fenótipo CD44^{low}, caracterizado por elevada diferenciação celular e potencial limitado de proliferação. Assim, a TFD, nas condições experimentais utilizadas neste estudo *in vitro*, foi capaz de reduzir as CTC no CEB, diminuindo sua capacidade de auto-renovação e induzindo sua diferenciação.

A TFD-5-ALA vem sendo estudada como alternativa para o tratamento de lesões orais potencialmente malignas e CEB, principalmente aqueles em estágio precoce (T1). Além disso, para pacientes com tumores recorrentes ou diagnosticados em estágio avançado, em que a cirurgia não é possível ou houve insucesso no tratamento com radioterapia e/ou quimioterapia, a TFD também tem sido indicada (Tan et al., 2019). Neste contexto, é de extrema relevância a avaliação do efeito da TFD em CTC, uma vez que as mesmas se mostram intrinsecamente resistentes ao tratamento oncológico convencional (Prieto-Vila et al., 2017).

Neste estudo, observamos redução significativa da viabilidade celular após 24h e 48h da TFD, em ambas as linhagens celulares, corroborando achados prévios da literatura (Raschpichler et al., 2020). Adicionalmente, após 24h e 48h da TFD, alterações morfológicas significantes foram evidenciadas, indicando apoptose e necrose precoce. Assim, o período de 24h foi selecionado para avaliação do efeito da TFD nas CTC.

A literatura em relação aos efeitos da TFD em CTC em diferentes tipos de câncer é bastante escassa. No CEB, o estudo de Yu et al. (2014), demonstrou que após a TFD-5-ALA, houve diminuição em CTC caracterizadas pelo fenótipo ALDH1⁺ bem como na capacidade de formação de esferas tumorais, além de

redução na expressão dos genes *Nanog* e *Oct4*, ambos envolvidos na manutenção do fenótipo tronco. Adicionalmente, a TFD foi capaz de sensibilizar as células derivadas de CEB ao tratamento com cisplatina, e ainda, de reduzir a expressão de ABCG2, uma molécula transportadora envolvida com resistência a drogas, indicando que a TFD tem efeito inibitórios nas CTC do CEB. Entretanto, uma das falhas deste estudo consiste em seu desenho experimental, sendo utilizado somente o grupo 5-ALA para comparação com a TFD. Sabe-se que só o FS tem efeito no metabolismo celular e pode alterar o seu comportamento e ainda, existe o efeito isolado da irradiação que não pode ser descartado (Ibarra et al., 2020).

Corroborando estes achados e utilizando a expressão de CD44 e ESA para identificação das CTC no CEB, de acordo com Biddle et al. (2011), observamos que a TFD reduz a porcentagem de células com o fenótipo CD44^{high}/ESA^{low}, o qual é caracterizado por uma morfologia epitelial, com elevada capacidade de formação de colônias com morfologia de holoclones (elevado potencial de proliferação) e expressão de genes associados com o fenótipo tronco. Essa diminuição foi acompanhada por uma redução significativa na capacidade de formação de colônias no grupo TFD, sendo ainda observadas colônias com morfologia de paraclones, caracterizadas por células diferenciadas com limitado potencial proliferativo. De fato, essa diminuição na porcentagem de células com fenótipo CD44^{high}/ESA^{low} foi ainda acompanhada por um aumento na população com fenótipo CD44^{low}, confirmando novamente que a TFD induz a diferenciação das CTC. De acordo com Rodrigues et al. (2018), a indução da diferenciação celular pode ser uma alternativa e estratégia terapêutica para eliminação das CTC, uma vez que as células mais diferenciadas se tornam alvos mais susceptíveis à radioterapia e quimioterapia

Embora tenha sido observada uma redução na capacidade de formação de esferas tumorais após a TFD, essa diminuição não foi acompanhada da redução na porcentagem de células com o fenótipo CD44^{high}/ESA^{low}, caracterizado por células com morfologia mesenquimal, elevada capacidade migratória e invasiva, resistência ao tratamento convencional, sendo responsável pelo desenvolvimento de metástases. Vale ressaltar que o ensaio de formação de esferas tumorais foi

realizado após 24h da TFD. Porém, as esferas tumorais foram cultivadas por 7 dias e posteriormente contadas. Assim, é possível que no momento da análise da expressão de CD44 e ESA por citometria de fluxo, após 24h da TFD, estas células não tenham sido afetadas, uma vez que são as mais resistentes à terapia. Entretanto, após 7 dias em cultivo celular, notamos que funcionalmente as células não apresentavam a mesma capacidade de formar esferas tumorais, demonstrando que a TFD tem efeito nas células com fenótipo CD44^{high}/ESA^{low}, porém, tardiamente.

Fang et al. (2018) observaram que a TFD-5-ALA induz a expressão de miR-145 em linhagens derivadas de CEB, estando este aumento associado com menor capacidade de auto-renovação e invasão das células tumorais, bem como redução na expressão de CD44. Desta maneira, um dos mecanismos possíveis de atuação da TFD em CTC no CEB seria por meio modulação da expressão de miR-145, e consequentemente, redução das propriedades tronco das células tumorais.

Em outros tipos de tumores sólidos, foi observado que as CTC possuem elevada expressão de ABCG2 e consequentemente, há menor acúmulo de PpIX, de maneira que o bloqueio desta molécula aumenta a eficácia da TFD-5-ALA nas CTC. (Kawai et al., 2019). Adicionalmente, Morgan et al. (2010) observaram que CTC com elevada expressão de ABCG2 podem apresentar resistência à PDT na dependência do tipo de Fs utilizado, sendo que esta resistência pode ser revertida após a utilização de um inibidor tirosina quinase que inibe a atividade ATPase de ABCG2, prevenindo assim o efluxo de substratos. No CEB, já foi demonstrado que linhagens celulares podem desenvolver resistência à TFD após repetidos ciclos de tratamento, possivelmente devido a alterações genéticas e epigenéticas (Rosin et al., 2018). Acredita-se que isso ocorra devido ao aumento da densidade mitocondrial, redução da produção de PpIX endógena e aumento da regulação de proteínas relacionadas à inibição do apoptose bem como aumento da proliferação e migração celular (Rosin et al., 2018). Neste estudo, as subpopulações de CTC identificadas pelo fenótipo CD44^{high}/ESA^{high} (perfil proliferativo) e CD44^{high}/ESA^{low} (perfil migratório) apresentaram maior susceptibilidade à TFD, possivelmente associada à maior produção de PpIX. Schimanski et al. (2018) mostraram que

células tronco de glioblastoma também apresentam aumento do acúmulo de PpIX quando expostos ao fotossensibilizador 5-ALA ficando mais sensíveis à TFD. Além disso, Kawai et al. (2019) também relacionou o acúmulo de PpIX à eficácia da TFD em clones de células pancreáticas de câncer. Rodriguez et al. (2006) apontam que a eficácia da TFD associada ao aumento dos níveis de PpIX tem relação com o aumento da expressão de peptídeos transportadores que podem assumir o papel de importar o 5-ALA para o meio intracelular.

Outros achados que podem influenciar diretamente na produção da PpIX foram apontados por Fujishiro et al. (2018), os quais demonstraram que nas células-tronco de glioblastoma ocorre uma superexpressão de FECH (ferroquetalase), uma enzima terminal que atua na biossíntese do grupo heme catalisando a inserção de ferro ferroso em PpIX, mostrando que a inibição dessa enzima pode aumentar a eficácia da TFD-5-ALA (Fujishiro et al., 2018). Muller et al. (2020) mostraram também que células derivadas de glioblastoma e com alta expressão de ABCG2 acumulam menos PpIX e requerem doses mais altas de luz para serem eliminadas (Muller et al., 2020).

A capacidade de migração representa uma habilidade essencial para promover invasão e metástase (Friedl et al., 2011). O processo de migração celular depende da desmontagem do complexo de adesão focal, os quais são ligados à integrina e representam os principais locais de adesão entre as células e a matriz celular circundante (Friedl et al., 2011). Nossos resultados mostraram que as células do grupo LED foram capazes de migrar para a área da ferida e reestabelecer quase 50% da monocamada após 24h da realização do ensaio. Em células tronco de câncer de pulmão também foi apontado que o LED promoveu aumento da proliferação e capacidade de migração celular (Crous et al., 2015).

O efeito proliferativo do LED e o aumento da capacidade de promover o aumento da migração celular podem ser explicados conforme (Huang et al., 2009), onde foi descrito que um estímulo fraco de fotobiomodulação (em relação ao tempo de irradiação e dose) aumentam a atividade fisiológica, um estímulo moderado inibe a atividade a um estímulo muito intenso bloqueia a atividade fisiológica.

Adicionalmente, nossos resultados confirmaram uma inibição da capacidade de migração de ambas as linhagens após 24h da TFD. Rodrigues et al. (2018) demonstraram que células mais diferenciadas são mais susceptíveis às terapias convencionais (Rodrigues et al., 2018). Assim, é possível que a indução da diferenciação celular após a TFD tenha contribuído para a inibição na capacidade de migração observada em ambas as linhagens Fang et al. (2018) mostraram que houve 50% de redução da capacidade de migração e invasão das células de carcinoma epidermóide de língua, submetidas à TFD-5-ALA. Outro estudo, desta vez utilizando células de linhagem de carcinoma de mama, mostrou que no grupo TFD, o fechamento da área da ferida foi menor em relação ao grupo controle, o qual demonstrou fechamento completo após 24h, indicando que a TFD inibe a capacidade migratória das células tumorais (Zduniak et al., 2020).

Ainda sobre a invasão celular, é interessante apontar que as células que receberam apenas o 5-ALA foram capazes de migrar e promover fechamento de 20% da área da ferida, esse resultado é importante para indicar que o FS isoladamente não promove diminuição da viabilidade celular, porém pode interferir nas características de CTC, já que é capaz de promover inibição da invasão. Essa inibição pode ser justificada devido ao aumento de PpIX, que pode promover alterações mitocondriais por promover acúmulo de metabólitos, além de influenciar no metabolismo energético, especificamente no aumento da glicólise.(Yang et al.,2015).

Bmi1 é um gene membro do complexo Polycomb (PRC1) que desempenha um papel importante na autorrenovação e na atividade tumorigênica das CTC isoladas de CEB (Scully et al., 2008). Um estudo recente, que teve como objetivo a inibição de *Bmi1* no CEB, demonstrou diminuição da capacidade de autorrenovação das CTC, resistência à cisplatina, metástase e formação de tumor *in vivo* (Hayry et al., 2010). Nossos resultados mostraram redução na expressão de Bmi-1 na linhagem Ca1, indicando uma perda do fenótipo tronco, o que corrobora com os resultados da citometria de fluxo, os quais demonstraram uma diminuição da população CD44^{high}/ESA^{high} no grupo TFD, acompanhado pelo aumento significativo na porcentagem de células CD44^{low}. Além disso, nessa mesma

linhagem celular, houve um aumento da *Calgranulina*, indicando indução da diferenciação celular após a TFD. A calgranulina é uma proteína de ligação ao cálcio (S100) que atua como um sensor para os níveis intracelulares de cálcio. Está envolvida com a ativação de vias de sinalização que regulam vários processos celulares, incluindo a progressão do ciclo celular, sobrevivência, proliferação, diferenciação e migração celular. (Shabani et al., 2018). Além disso, está associada à fosforilação de proteínas, interação específica com componentes do citoesqueleto, como microtúbulos, filamentos de vimentina, queratina e actina (Chen et al., 2014). Em altas concentrações intracelulares, a calgranulina não induz apoptose, mas exerce um papel importante estimulando a transição mesenquimal-epitelial, sendo determinante para promover redução na capacidade de invasão de células tumorais (Srikrishna, 2012).

Rodrigues et al. (2018) demonstraram que as linhagens celulares Ca1 e Luc4 quando expostas ao Cetuximab, apresentaram redução da subpopulação CD44^{high}/ESA^{high} e aumento da população CD44^{low}, além da redução na capacidade de formação de colônias e aumento da expressão dos marcadores de diferenciação epitelial *Calgranulina* e *Involucrina*, demonstrando que a diminuição da CTC com fenótipo CD44^{high}/ESA^{high} ocorreu devido à indução da diferenciação celular nesta subpopulação.

Um outro gene associado à diferenciação celular terminal de queratinócitos, é a *Involucrina*, expresso no final da camada espinhosa da pele e mucosas, bem como em toda a camada granular, formando um envelope cornificado (Silva et al., 2013). Apresenta baixa expressão em tecidos de biópsia em leucoplasia associada à displasia epitelial quando comparada com células da mucosa oral expostas ou não a carcinógenos (Silva et al., 2013). Nesse estudo, não foi observada alteração na expressão da *Involucrina* nas linhagens estudadas, sugerindo que a diferenciação celular terminal, apesar de apresentar indícios de que esteja sendo induzida, pode ser mais tardia e devido ao tempo de análise da expressão gênica, não tenha sido possível perceber nenhuma alteração significativa. Uma outra hipótese é que pode haver uma redução de cálcio intracelular, que inibe a

transcrição de genes associados à diferenciação celular, como a *Involucrina* (Murata et al., 2018).

A família das caderinas é um dos principais marcadores de células epiteliais. Essa família é constituída de moléculas de ancoragem do citoesqueleto que formam complexos entre as membranas celulares, chamadas junções aderentes, uma das mais importantes estruturas de adesão (Coopmam et al., 2016). A *E-caderina* é a caderina epitelial, uma glicoproteína envolvida na adesão célula-célula (Coopmam et al., 2016). No CEB, a perda de E-caderina, durante o processo de evolução da displasia celular para o carcinoma, sugerindo seu papel como um gene supressor de tumor. (Gupta et al., 2018).

Nossos resultados mostraram que houve diminuição da expressão de *E-caderina* na linhagem Luc4. Entretanto, é possível que esta redução possa estar associada ao fato de que, após a TFD, as células epiteliais perdem a sua adesão umas com as outras, juntamente com a redução da viabilidade. Além disso, mesmo com menor expressão de *E-caderina*, as células de ambas as linhagens do grupo TFD não foram capazes de migrar indicando que a perda de *E-caderina* se deve provavelmente a alterações no citoesqueleto induzidas pela TFD. Mudanças na morfologia celular e alterações no citoesqueleto foram apontados após 5-ALA-TFD para vários tipos de células tumorais, incluindo adenocarcinomas mamários e pulmonares, melanomas e glioblastomas (Casas et al., 2008; Tsai et al., 2009). Adicionalmente, foram observadas mudanças induzidas pela TFD na adesão de células de carcinoma epidermóide, as quais foram acompanhadas da remodelação do citoesqueleto, sendo observado um maior número de células com longas projeções de citoplasma, acompanhado de longos filamentos de α -tubulina de actina (Milla et al., 2011).

Desta maneira, os resultados aqui demonstrados indicam que a TFD-5-ALA reduziu o número e o fenótipo tronco das CTC no CEB, além disso, promoveu redução da viabilidade celular, capacidade de formação de colônias e esferas; e inibiu a capacidade de migração celular que são características das CTC. Adicionalmente houve um aumento da expressão dos genes associados à diferenciação celular, indicando que a TFD-5-ALA pode ser uma ferramenta

importante para a erradicação tumoral visto que tem ação determinante nas subpopulações de CTC.

7. Conclusões

- Os resultados indicam que a TFD-5-ALA é capaz de diminuir viabilidade de linhagens celulares derivadas de CEB.
- A TFD-5-ALA foi capaz de diminuir a porcentagem de células com o fenótipo CD44^{high}/ESA^{high}, as quais apresentaram maior capacidade de produção de PpIX, indicando maior susceptibilidade das mesmas à TFD.
- A diminuição das células com fenótipo CD44^{high}/ESA^{high} no grupo TFD foi acompanhado por um aumento na porcentagem de células CD44^{low} indicando indução da diferenciação celular.
- A TFD-5-ALA foi capaz de reduzir a capacidade clonogênica e a formação de esferas de linhagens celulares derivadas de CEB, diminuindo, portanto, o fenótipo tronco das mesmas.
- A TFD-5-ALA assim como o 5-ALA foram capazes de inibir a capacidade migratória de linhagens celulares derivadas de CEB. Por outro lado, o tratamento com LED 6J/cm² induziu a migração celular.
- Houve diminuição da expressão do gene *Bmi1* e aumento da expressão do gene *Calgranulina* do grupo TFD na linhagem Ca1. Na linhagem Luc4, a TFD induziu uma diminuição na expressão de *E-caderina*. Não houve modulação na expressão do gene *IVL* após a TFD.

8. Referências Bibliográficas

Agostinis P, Berg K, Cengel KA, Foster TH, Girotti AW, Gollnick SO. et al. Photodynamic therapy of cancer: an update. *CA Cancer J Clin.* 2011; 61 (4): 25081. Ahmed N, Abubaker K, Findlay JK. Ovarian cancer stem cells: Molecular concepts and relevance as therapeutic targets. *Mol Aspects Med.* 2014; 39: 110-25.

Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Cell Biology Proc Natl Acad Sci USA.* 2003; 100(7): 3983–3988.

and Chemoresistance: 2012 Preclinical and Clinical Evidences STEM CELLS and Nanog in oral cancer stem-like cells and high-grade oral squamous cell
Babaie Y, Herwig F, Greber B., et.al. Analysis of Oct4-Dependent Transcriptional Networks Regulating Self-Renewal and Pluripotency in Human Embryonic Stem Cells. 2007 Feb;25(2):500-10.

Baeuerle PA, Gires O. EpCAM (CD326) finding its role in cancer. *Br J Cancer [Internet].* 2007 Feb 12;96(3):417–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17211480>

Biddle A, Gammon L, Fazil B, Mackenzie IC. CD44 Staining of Cancer Stem-Like Cells Is Influenced by Down-Regulation of CD44 Variant Isoforms and Up-Regulation of the Standard CD44 Isoform in the Population of Cells That Have Undergone Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *PLoS ONE.* 2013; 8(2): e57314.

Biddle A, Liang X, Gammon L, et al. Cancer Stem Cells in Squamous Cell Carcinoma Switch between Two Distinct Phenotypes That Are Preferentially Migratory or Proliferative. *Cancer Res.* 2011; 71(15); 5317–26.

Biel AM. Photodynamic Therapy Treatment of Early Oral and Laryngeal Cancers. *Photochemistry and Photobiology,* 2007; 83: 1063–1068.

Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med.* 1997; 3(7): 730.

Buytaert E, Dewaele M, Agostinis P. Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy. *Biochim Biophys Acta.* 2007; 1776 (1): 86-107. carcinoma. 2008. *Clin Cancer Res.* 13:4085-95

Casas A, Perotti C, Ortel B, et al. Tumor cell lines resistant to ALA-mediated photodynamic therapy and possible tools to target surviving cells. *Int J Oncol.* 2006; 29(2):397-405.

Castano AP, Mroz P, Hamblin MR. Photodynamic therapy and anti-tumor immunity. *Nat Rev Cancer*. 2006; 6 (7):535-45.

Cerrati EW, Nguyen SA, Farrar JD, Lentsch EJ. The efficacy of photodynamic therapy in the treatment of oral squamous cell carcinoma: A meta-analysis. *ENT-Ear, Nose & Throat Journal*. 2015; 153: 429-434.

Champeaua M B, Vignouda S, Mortierb L, Mordonb S. Photodynamic therapy for skin cancer: How to enhance drug penetration? *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology*. 2019;197: 111-594

Chen HM, Liu CM, Yang H, Chou HY, Chiang CP, Kuo MY. 5-aminolevulinic acid induce apoptosis via NF- κ B/JNK pathway in human oral cancer Ca9-22 cells. *J Oral Pathol Med*. 2011;40(6):483-9.

Chiou SH, Yu CC, Huang CY, Lin SC, Liu CJ, et.al. Positive correlations of Oct-4 Coopman P, Djiane A. Adherens Junction and E-Cadherin complex regulation by epithelial polarity. *Cell Mol Life Sci*. 2016 Sep;73(18):3535-53. doi: 10.1007/s00018-016-2260-8. Epub 2016 May 5.

Crous A, Abrahamse H. Low-Intensity Laser Irradiation at 636 nm Induces Increased Viability and Proliferation in Isolated Lung Cancer Stem Cells 2016 *Photomed Laser Surg* 34:525-532.

Dewaele M, Maes H, Agostinis P. ROS-mediated mechanisms of autophagy stimulation and their relevance in cancer therapy. *Autophagy*. 2010; 6: 838-854.

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;117(8):738-742.

Ferguson BL, Barber S, Asher IH, Wood CR. Role of Oral Microbial Infections in Oral Cancer. *Journal Dental Clinics of North America*. 2017; 61 (2): 425-434

Fujishiro T, Nonoguchi N, Pavliukov M, Ohmura N, Kawabata S, Park Y, Kajimoto Y, Ishikawa T, Nakano I, Kuroiwa T. 5-Aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy can target human glioma stem-like cells refractory to antineoplastic agents. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2018 Dec;24:58-68.

Gammon L, Biddle A, Heywood HK, Johannessen AC, Mackenzie IC. Sub-Sets of Cancer Stem Cells Differ Intrinsically in Their Patterns of Oxygen Metabolism. *PLoS One*. 2013; 8(4): e62493.

Gemenetzidis E, Gammon L, Biddle A, Emich H, Mackenzie IC. Invasive oral cancer stem cells display resistance to ionising radiation. *Oncotarget*. 2015; 6(41): 43964-77.

Gilaberte Y, Carrasco E, Rivarola A, Juarranz A, Isolation and characterization of Goda T, Shimo T, Yoshihama Y, Hassan NM, Ibaragi S, Kurio N. et al. Bone destruction by invading oral squamous carcinoma cells mediated by the transforming growth factor-beta signalling pathway. *Anticancer Res*. 2010; 30(7): 2615-23.

Grada A, Otero-Vinas M, Prieto-Castrillo F, Obagi Z, Falanga V.. Research Techniques Made Simple: Analysis of Collective Cell Migration Using the Wound Healing Assay. *Research Techniques Made Simple: Analysis of Collective Cell Migration Using the Wound Healing Assay*.

Grebenová D, Kuzelová K, Smetana K, Pluskalová M, Cajthamlová H, Marinov I, et al. Mitochondrial and endoplasmic reticulum stress-induced apoptotic pathways are activated by 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy in HL60 leukemia cells. *J Photochem Photobiol B*. 2003; 69(2): 71-85.

Greenberg JS, El Naggat AK, Mo V, Roberts D, Myers JN. Disparity in pathologic and clinical lymph node staging in oral tongue carcinoma. Implication for therapeutic decision making. *Cancer*. 2003; 98(3): 508-15.

Gupta A, Sharma S, Batra M, Abidullah M, Bhuvinder S, Katragadda P. Role of E-cadherin in Progression of Oral Squamous Cell Carcinoma: A Retrospective Immunohistochemical Study. *J Contemp Dent Pract*. 2018 Sep 1;19(9):1105-111 Hamblin MR. Mechanisms and Mitochondrial Redox Signaling in Photobiomodulation. *Photochem Photobiol*. 2018; 94(2): 199–212.

Harper LJ, Piper K, Common J, Fortune F, Mackenzie IC. Stem cell patterns in cell lines derived from head and neck squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 2007; 36(10):594-603.

Hayry V, Mañkinen LK, Atula T, Sariola H, Makitie A et.al. Bmi-1 expression predicts prognosis in squamous cell carcinoma of the tongue. 2010 *British Journal of Cancer* 102, 892–897.

Heiskanen V, Hamblin MR. Photobiomodulation: lasers vs. light emitting diodes? *Photochem Photobiol Sci*. 2018; 17: 1003-1017

Hopper C, Kübler A, Lewis H, Tan IB, Putnam G. Mthpc-mediated photodynamic therapy for early oral squamous cell carcinoma. *Int. J. Cancer*: 2004; 111: 138-146.

Huang YY, Chen ACH, Carroll JD, Hamblin MR. Biphasic Dose Response in Low Level Light Therapy. 2009 *Dose Response* 7:358-383

Ibarra AMC, Garcia MP, Ferreira M, de Fátima Teixeira da Silva D, Pavani C, Mesquita-Ferrari RA, Fernandes KPS, Nunes FD, Rodrigues MFSD. Effects of photobiomodulation on cellular viability and cancer stem cell phenotype in oral squamous cell carcinoma. Springer-Verlag London Ltd., part of Springer Nature 2020 Lasers Med Sci. 2021 Apr;36(3):681-690.

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. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/estimativa-2018.pdf>

Iyer AK, Greish K, Seki T, Okazaki S, Fang J, Takeshita K. et al. Polymeric micelles of zinc protoporphyrin for tumor targeted delivery based on EPR effect and singlet oxygen generation. J Drug Target. 2007; 15: 496-506.

Joshua B, Kaplan MJ, Doweck I, Pai R, Weissman IL, Prince ME et al. Frequency of cells expressing CD44, a head and neck cancer stem cell marker; Correlation with tumor aggressiveness. Head & Neck 2012; 34 (1) 42-49.

Kademani D, Bell RB, Bagheri S, Holmgren E, Dierks E, Potter B, et al. Prognostic factors in intraoral squamous cell carcinoma: the influence of histologic grade. J Oral Maxillofac Surg. 2005; 63(11):1599-605.

Karu T. Mitochondrial Mechanisms of Photobiomodulation in Context of New Data About Multiple Roles of ATP. Photomedicine and Laser Surgery 2010, 28 (2): 159-160.

Kawai N, Hirohashi Y, Ebihara Y, Saito T, Murai A, Saito T, Shirotsuki T, Kubo T, Nakatsugawa M, Kanaseki T, Tsukahara T, Shichinohe T, Li L, Hirano S, Torigoe T. ABCG2 expression is related to low 5-ALA photodynamic diagnosis (PDD) efficacy and cancer stem cell phenotype, and suppression of ABCG2 improves the efficacy of PDD. Plos one 14(5) e0216503.

Kessel D. The role of low-density lipoprotein in the biodistribution of photosensitizer. CA CANCER J CLIN. 2011; 61: 250-281.

Kofler B, Romani A, Pritz C, Steinbichler TB, Scharfetter VH, Riechelmann H, Dudas J. Photodynamic Effect of Methylene Blue and Low Level Laser Radiation in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Cell Lines. Int J Mol Sci. 2018; 7;19(4). pii: E1107.

Kokko LL, Hurme S, Maula SM, Alanem K, Grénman R, Kinnunen I, Ventela S. Significance of site-specific prognosis of cancer stem cell marker CD44 in head and neck squamous-cell carcinoma. Oral Oncology. 2011; 47(6): 510-6.

Krammer B, Plaetzer K. ALA and its impact, from bench to bedside. *Photochem Photobiol Sci.* 2008; 7(3): 283-9.

Kuechlin S, Schoels M, Slanchev K., et al. EpCAM controls morphogenetic programs during zebrafish pronephros development. *2017 Biochem Biophys Res Commun.* 27:209-215.na

Kuzelová K, Grebenová D, Pluskalová M, Marinov I, Hrkal Z. Early apoptotic features of K562 cell death induced by 5-aminolaevulinic acid-based photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B.* 2004; 73(1-2):67-78. *Lasers Surg. Med.* 41 (4) (2009) 305–315.

Lin YH, Huang YC, Chen LH, Chu PM. Autophagy in cancer stem/progenitor cells. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2015; n75(5):879-86.

Locke M, Heywood M, Fawell S, Mackenzie IC. Retention of intrinsic stem cell hierarchies in carcinoma-derived cell lines. *Cancer Res.* 2005; 65(19): 8944-50.

Lupatov Y; A. M. Gisina; P. A. Karalkin; K. N. Yarygin. Identification of "side population" associated with cancer stem cells by flow cytometry with violet laser. *Biomed Khim.* 2013; 59(3):339-48.

Marcato P, Dean CA, Giacomantonio CA, Lee PW. Aldehyde dehydrogenase its role as a cancer stem cell marker comes down to the specific isoform. *Cell Cycle.* 2011; 10(9):1378–84.

Markopoulos AK. Current Aspects on Oral Squamous Cell Carcinoma. *Open Dent J.* 2012; 6: 126–130.

Milla L, Cogno I.S.,Rodríguez M.E, Sanz-Rodríguez F, Zamarrón A, Morgan J, Jackson JD, Zheng X, Pandey SK, Pandey RK. Substrate Affinity of Photosensitizers Derived from Chlorophyll-a: The ABCG2 Transporter Affects the Phototoxic Response of Side Population Stem Cell-like Cancer Cells to Photodynamic Therapy. *Molecular Pharmaceutics* 7(5), 1789-1804.

Müller P, Abdel Gaber SA, Zimmermann W, Wittig R, Stepp H. ABCG2 influence on the efficiency of photodynamic therapy in glioblastoma cells. *J Photochem Photobiol B.* 2020 Sep;210:111963.

Murata T, Honda T, Egawa G, Yamamoto Y, Ichijo R, Toyoshima F, et al. Transient elevation of cytoplasmic calcium ion concentration at a single cell level precedes morphological changes of epidermal keratinocytes during cornification. *Sci Rep.* 2018;8(1):6610.

Nakagawa T, Shimizu S, Watanabe T, Yamaguchi O. et al. Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. *Nature.* 2005; (7033): 652-8.

Nokes B, Apel M, Jones C. et al. Aminolevulinic acid (ALA): photodynamic detection and potential therapeutic applications. *J Surg Res.* 2013; 181: 262–271.

Okamoto A, Chikamatsu K, Sakakura K. et al. Expansion and characterization of cancer-like cells in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oral Oncology.* 2009; 45: 633-943.

Perez-Losada J, Balmain A. Stem-cell hierarchy in skin cancer. *Nat Rev Cancer.* 2003; 3(6):434-43.

Prieto-Vila M, Takahashi RU, Usuba W, Kohama I, Ochiya T. Drug Resistance Driven by Cancer Stem Cells and Their Niche. *International Journal of Molecular Sciences.* 2017, 18(12), 2574.

Prince ME, Sivanandan R, Kaczorowski A, Wolf GT et al. Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007; 104(3): 973-8.

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; 14: 66-73.

Raschpichler M, Preis E, Pinnapireddy SR, Baghdan E, Pourasghar M, Schneider M, Bakowsky U.. Photodynamic inactivation of circulating tumor cells: An innovative approach against metastatic cancer. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.* 2020; 157:38-46.

Retiig EM. Epidemiology of Head and Neck cancer. *Surg. Oncol. Clin. N. Am;* 2015; 24(3): 379-96.

Rodrigues MFSD, Gammon L, Rahman MM, Biddle A, Nunes FD, Mackenzie IC. Effects of Cetuximab and Erlotinib on the behaviour of cancer stem cells in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget.* 2018; 9(17):13488-13500.

Rosin FCP, Teixeira MG, Pelissari C, Corrêa L. Resistance of oral cancer cells to 5-ALA mediated photodynamic therapy. *J Cell Biochem.* 2018; 119(4):3554-3562.

Sahlberg SH, Spiegelberg D, Glimelius B, Stenerlöv B, Nestor M. Evaluation of Cancer Stem Cell Markers CD133, CD44, CD24: Association with AKT Isoforms and Radiation Resistance in Colon Cancer Cells. *PLoS One.* 2014; 9(4): e94621.

Sahlberg SH, Spiegelberg D, Glimelius B, Stenerlöv B, Nestor M. Evaluation of Cancer Stem Cell Markers CD133, CD44, CD24: Association with AKT Isoforms and Radiation Resistance in Colon Cancer Cells. *PLoS One.* 2014; 9(4): e94621.

Schimanski A, Ebbert L, Sabel MC, Finocchiaro G, Lamszus K, Ewelt C. et al. Human glioblastoma stem-like cells accumulate protoporphyrin IX when subjected

to exogenous 5aminolaevulinic acid, rendering them sensitive to photodynamic treatment. *J Photochem Photobiol B*. 2016; 163:203-10.

Scully C, Bagan J. Oral squamous cell carcinoma: overview of current understanding of aetiopathogenesis and clinical implications. 2009 *Oral Dis*. (6):388-99.

Shigeishi H, Biddle A, Gammon L, Emich H, Rodini CO, Gemenetzidis E. et al. Maintenance of stem cell self-renewal in head and neck cancers requires actions of GSK3 β influenced by CD44 and RHAMM. *Stem Cells*. 2013; 31(10): 2073-83.

Siddique RH, Saleem M. Role of BMI1, a Stem Cell Factor, in Cancer Recurrence Siegel RL, Miller KD, Jemal A. *Cancer Statistics*. -CA Cancer J Clin. 2017; 67(1): 73.

Silva AD, Maraschin BJ, Laureano NK, Daroit N, Brochier F, Bündrich L, Visioli F, Rados PV. Expression of E-cadherin and involucrin in leukoplakia and oral cancer: an immunocytochemical and immunohistochemical study. *Braz Oral Res*. 2017 Mar 6;31:e19. doi: 10.1590/1807-3107BOR-2017.vol31.0019.

Singh SR. Gastric cancer stem cells: a novel therapeutic target. *Cancer Lett*. 2013 ; 338 (1): 110-119. squamous carcinoma cells resistant to photodynamic therapy, *J. Cell Biochem*. Srikrishna G. S100A8 and S100A9: new insights into their roles in malignancy. *J Innate Immun*. 2012;4(1):31–40.

Tan IB, Dolivet G, Ceruse P, Vander Poorten V, Roest G, Rauschnig W. Temoporfin-mediated photodynamic therapy in patients with advanced, incurable head and neck cancer: a multicenter study. *Head & neck*. 2019, 32 (12), 1597-1604.

Torres MR, Allan AL. Aldehyde dehydrogenase as a marker and functional mediator of metastasis in solid tumors. *Clin Exp Metastasis*. 2016; 33: 97-113.

Tsai LL, Yu CC, Chang YC, Yu CH, Chou MY. Markedly increased Oct4 and Nanog expression correlates with cisplatin resistance in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 2011; 40(8): 621-8.

Visscher JG, van der Meij EH, Schepman KP. Oral medicine 10. Pigmented lesions of the oral mucosa. *Ned Tijdschr Tandheelkd*. 2013;120(10):555-61.

Wang J, Li ZH, White J, Zhang LB. Lung cancer stem cells and implications for future therapeutics. *Cell Biochem Biophys*. 2014; 69(3): 389-98.

Wei MF, Chen MW, Chen KC, Lou PJ, Lin SY, Hung SC. et al. Cell death of colorectal cancer stem-like cell was induced by photodynamic therapy with protoporphyrin IX. *Autophagy*. 2014;10(7):1179-92.

Yamamoto M, Fujita H, Katase N, Inoue K, Nagatsuka H, Utsumi K. et al. Improvement of the Efficacy of 5-aminolevulinic Acid-mediated Photodynamic Treatment in Human Oral Squamous Cell Carcinoma HSC-4. *Acta Med.* 2013; 67(3): 153-164.

Yang TH, Chen CT, Wang CP, Lou PJ..Photodynamic therapy suppresses the migration and invasion of head and neck cancer cells in vitro. *Oral Oncol.* 2007 Apr;43(4):358-65. doi: 10.1016/j.oraloncology.2006.04.007. Epub 2006 Aug 22.

Yang X, Palasuberniam P, Kraus D, Chen B. Aminolevulinic Acid-Based Tumor Detection and Therapy: Molecular Mechanisms and Strategies for Enhancement. *Int J Mol Sci.* 2015 Oct 28;16(10):25865-80. doi: 10.3390/ijms161025865.

Yoo YA, Kang MH, Lee HJ, Kim BH, Park JK, Kim HK, Kim JS and Oh SC: Sonic hedgehog pathway promotes metastasis and lymphangiogenesis via activation of Akt, EMT, and MMP-9 pathway in gastric cancer. *Cancer Res* 71: 7061-7070, 2011.

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; 9(1): e87129.

Zduniak K, Gdesz-Birula K, Woźniak M, Duś-Szachniewicz K, Ziółkowski P. The Assessment of the Combined Treatment of 5-ALA Mediated Photodynamic Therapy and Thalidomide on 4T1 Breast Carcinoma and 2H11 Endothelial Cell Line. *Molecules.* 2020 Nov 7;25(21):5184. doi: 10.3390/molecules25215184.