

UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO

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

Efeito da citotoxicidade mediada por células *Natural Killer* em células-tronco de câncer derivadas de carcinoma epidermóide oral e sua associação com a terapia fotodinâmica

ANA MELISSA CCOPA IBARRA

**São Paulo, SP
2022**

UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO

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

Efeito da citotoxicidade mediada por células *Natural Killer* em células-tronco de câncer derivadas de carcinoma epidermóide oral e sua associação com a terapia fotodinâmica

Tese apresentada à Universidade Nove de Julho, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Biofotônica Aplicada à Ciências da Saúde

Orientadora: Profa. Dra. Maria Fernanda Setúbal Destro Rodrigues

São Paulo, SP
2022

Ibarra, Ana Melissa Ccopa.

Efeito da citotoxicidade mediada por células Natural Killer em células-tronco de câncer derivadas de carcinoma epidermóide oral e sua associação com a terapia fotodinâmica. / Ana Melissa Ccopa Ibarra. 2022.

91 f.

Tese (Doutorado) - Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2022.

Orientador (a): Profª. Drª. Maria Fernanda Setúbal Destro Rodrigues

1. Carcinoma epidermóide oral. 2. Células tronco de câncer. 3. Células Natural Killer. 4. Terapia fotodinâmica. 5. 5-ALA.

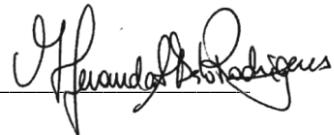
I. Destro, Maria Fernanda Setúbal . II. Título.

São Paulo, 20 de junho de 2022.

TERMO DE APROVAÇÃO

Aluno (a): Ana Melissa Ccopa Ibarra

Título da Tese: “Efeito da citotoxicidade mediada por células natural killer em células-tronco de câncer derivadas de carcinoma epidermóide oral e sua associação com a terapia fotodinâmica”.

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

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

Membro: PROF^a. DR^a. KATIUCIA BATISTA DA SILVA PAIVA 

Membro: PROF. DR. RENATO ARAUJO PRATES 

Membro: PROF. DR. HUMBERTO DELLE 

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho à minha família,
Ao meu avô, Cipriano, que esteja em paz.*

AGRADECIMENTOS

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

Agradeço a Ângela Molon, por sua colaboração e parceria para a realização desta pesquisa.

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

À professora Adriana Lino dos Santos Franco por fornecer equipamentos que permitiram a realização desta pesquisa.

Aos professores Ian Mackenzie, José Belizário e Maria da Glória Martins Teixeira, por fornecer linhagens celulares necessárias para a realização desta pesquisa.

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

Às agências de fomento Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo.

Aos meus irmãos Luis Augusto e Luis Alberto, pela paciência e suporte durante todos estes anos.

Aos meus pais por todo o carinho e dedicação, todos os dias que precisei, estavam presentes.

EPÍGRAFE

Eu não sei onde diabos estarei daqui a cinco anos. Talvez eu esteja produzindo filmes, talvez eu esteja em uma esquina vendendo maçãs. Eu não sei, mas estou me divertindo muito.

- Stan Lee

RESUMO

INTRODUÇÃO: O carcinoma epidermóide oral (CEO) é uma neoplasia agressiva com altas taxas de recidiva, a progressão desta neoplasia leva à imunossupressão do paciente. A terapia fotodinâmica (TFD) é uma terapia promissora por promover estimulação do sistema, porém, sua efetividade é limitada na ausência de células T e NK (*Natural Killer*). Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar *in vitro* o papel das células NK na eliminação de células tronco de câncer (CTC) no CEO bem como sua atividade após a TFD.

METODOLOGIA: As linhagens NK92-MI, Ca1 e Luc4 foram caracterizadas por citometria de fluxo e RT-qPCR, a citotoxicidade de NK92-MI no CEO foi avaliada por liberação de CalceínaAM, a capacidade tronco das células tumorais foram avaliadas por ensaio de esfera e colônia, Ca1 e Luc4 foram submetidas à TFD, sendo a dosimetria estabelecida pela avaliação de viabilidade por MTS. Após TFD a capacidade citotóxica de NK92-MI no CEO foi avaliada novamente.

RESULTADOS: A linhagem NK92-MI apresentou fenótipo CD45⁺/CD3⁻/CD56⁺. As células das linhagens Ca1 e Luc4 apresentaram três diferentes subpopulações definidas pelo fenótipo citometria de CD44/ESA, sendo a população ameboide definida por CD44^{high}/ESA^{low}. A expressão genética de ligantes NKG2D variou entre as subpopulações, a subpopulação ameboide apresenta redução de *ULBPs*, HLA e aumento de MICA/B. **CONCLUSÃO:** A capacidade citotóxica de NK variou entre as subpopulações, células ameboïdes apresentam-se mais sensíveis ao ataque de NK. A capacidade tronco das subpopulações foi afetada pela atividade citotóxica de NK, por meio da redução de esferas e colônias formadas, bem como por meio da alteração de disposição das subpopulações, onde populações CD44^{high}/ESA^{low} foram reduzidas e CD44^{high} foram elevadas. A TFD induziu morte celular de forma crescente ao aumento de energia radiante entregue, e não afeta a atividade citotóxica de NK nas subdoses entregues na presente pesquisa de 1,5J/cm² e 3J/cm².

Palavras-Chave: Carcinoma Epidermóide Oral, Células Tronco de Câncer, células Natural Killer, Terapia Fotodinâmica, 5-ALA.

ABSTRACT:

INTRODUCTION: Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is an aggressive neoplasm with high rates of recurrence, the progression of this neoplasm leads to immunosuppression of the patient. Photodynamic therapy (PDT) is a promising therapy for promoting stimulation of the immune system mediated by stress signals after its interaction with the target, however, its effectiveness is limited in the absence of T and NK cells (Natural Killer). Thus, the objective of this work was to evaluate in vitro the role of NK cells in the elimination of cancer stem cells (CTC) in CEO as well as their activity after PDT. **METHODS:** The NK92-MI, Ca1 and Luc4 cells were characterized by flow cytometry and RT-qPCR, the cytotoxicity of NK92-MI in CEO was evaluated by CalceinAM release, the stem capacity of tumor cells were evaluated by sphere and colony; Ca1 and Luc4 were subjected to PDT, the dosimetry was established by assessing viability by MTS. After PDT the cytotoxic capacity of NK92-MI in CEO was evaluated again.

RESULTS: The NK92-MI cells presented a CD45+/CD3-/CD56+ phenotype. Cells from the Ca1 and Luc4 lineages showed three different subpopulations defined by the CD44/ESA cytometry phenotype, with the amoeboid population defined by CD44^{high}/ESA^{low}. The gene expression of NKG2D ligands varied among the subpopulations, the amoeboid subpopulation shows a reduction in ULBPs, HLA and an increase in MICA/B. **CONCLUSION:** The cytotoxic capacity of NK varied among subpopulations, amoeboid cells are more sensitive to NK attack. The stem capacity of the subpopulations was affected by the cytotoxic activity of NK, through the reduction of spheres and colonies formed as well as alterations in the subpopulation phenotypes, reducing the CD44^{high}/ESA^{low} population meanwhile CD44^{low} population increased. PDT induced cell death increasingly with increased radiant energy delivered and did not affect the cytotoxic activity of NK at the subdoses of 1.5J/cm² and 3J/cm² evaluated here.

Keywords: Oral Epidermoid Carcinoma, Photodynamic Therapy, 5-ALA, Cancer Stem Cells, Natural Killer Cells

Lista de Ilustrações

	Página
Figura 1: Representação esquemática das características fundamentais de uma CTC.	18
Figura 2: Ilustração esquemática com diferentes fenótipos que as CTC derivadas de carcinoma epidermóide oral podem assumir.	21
Figura 3: Diagrama de Jablonski.	24
Figura 4: Mecanismos de morte celular após a TFD.	25
Figura 5. Ciclo de imunidade do câncer	31
Figura 6: Efeito imunológico da terapia fotodinâmica em neoplasias.	32
Figura 7: Efeito imunológico promovido pela TFD no decorrer do tempo	34
Figura 8: Isolamento e caracterização de células tumorais nos fenótipos migratório, epitelial e ameboide.	43
Figura 9: Irradiação com LED-Saber	49
Figura 10: Avaliação do fenótipo da linhagem NK92-MI por citometria de fluxo.	52
Figura 11: Avaliação da expressão dos receptores ativadores das células NK92-MI.	53
Figura 12: Aspecto morfológico das células das linhagens	54
Figura 13: Análise da expressão de CD44 e ESA nas linhagens	56
Figura 14: Análise da expressão gênica	57
Figura 15: Ensaio de liberação de calceína para avaliação da citotoxicidade das células NK92-MI nas células tumorais	58
Figura 16: Ensaio de liberação de calceína-AM para avaliação da citotoxicidade das células NK92-MI na linhagem K562 cultivadas com o meio condicionado	58
Figura 17: Análise da expressão dos genes <i>ULBP1</i> , <i>ULBP2</i> , <i>ULBP3</i> e <i>ULBP4</i> por RT-qPCR	60
Figura 18: Análise da expressão de HLA-ABC e MICA/B por citometria de fluxo.	61
Figura 19: Aspecto morfológico da linhagem Ca1 cultivada em diferentes proporções com as células NK92-MI por 4h e 24h	62
Figura 20: Aspecto morfológico da linhagem Luc4 cultivada em diferentes proporções com as células NK92-MI por 4h	63
Figura 21: Análise da porcentagem de células mortas (positivas para DAPI) e expressão de CD44 e ESA	64
Figura 22: Análise da formação do número de colônias e esferas	65
Figura 23: Curva de viabilidade de densidades de energia crescentes de células tratadas com LED e TFD pelo ensaio MTS.	66

- Figura 24:** Figuras representativas da morfologia da linhagem Ca1 67
- Figura 25:** Ensaio de liberação de calceína-AM para avaliar a citotoxicidade de 68 células NK92-MI em Ca1 24 horas após TFD
- Figura 26:** Análise da expressão de CD44 e ESA por citometria de fluxo 24 horas 69 após TFD com 1.5J/cm² e 3J/cm²
- Figura 27:** Intensidade de fluorescência e quantificação da porcentagem de 70 células positivas e para HLA-ABC de Ca1 após TFD.
- Figura 28:** Ensaio de liberação de calceína-AM para avaliar a citotoxicidade de 71 células NK92-MI em K562 cultivadas por 24 horas no meio condicionado

Lista de Tabelas

	Pág
Tabela 1: Revisão da literatura, o efeito da terapia fotodinâmica nas CTCs	26
Tabela 2: Revisão de literatura, interação de NK sob tumores tratados com TFD	38
Tabela 3: Anticorpos utilizados para avaliação da expressão dos receptores das células NK92-MI.	42
Tabela 4: Parâmetros dosimétricos utilizados para a irradiação.	45
Tabela 5: Sequência dos primers e temperatura de anelamento utilizada na reação de qPCR.	48

Lista de Abreviaturas e Siglas

Abreviatura	Significado
5-ALA	5-ácido aminolevulinico
β	Betta
BMI1	<i>Polycomb complex protein</i>
CEO	Carcinoma epidermóide oral
CD44	<i>Homing cell adhesion molecule HCAM</i>
CD8	Cluster de diferenciação 8
CD4	Cluster de diferenciação 4
CTC	Célula tronco de câncer
cm ²	Centímetros quadrados
DNA	ácido desoxirribonucleico
ESA	Antígeno de superfície epitelial
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico
Gy	Greys
IFNy	Interferon Gamma
IL	Interleucina
J	Joules
LMA	Leucemia mieloide aguda
mTHPC	5,10,15,20-Tetrakis(3-hydroxyphenyl)chlorin; Temoporfin
nm	Nanômetros
NK	<i>Natural Killer</i>
OCT4	<i>Octamer-binding transcription factor 4</i>
PpIX	Protoporfirina IX
ROS	Espécie reativa de oxigênio
RNA	ácido ribonucleico
STAT3	<i>signal transducers and activators of transcription</i>
TFD	Terapia Fotodinâmica
TGFb	<i>Transforming growth factor beta</i>
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor alpha</i>
Wnt	<i>Wingless-related integration site</i>

Sumário

	Pág.
1. CONTEXTUALIZAÇÃO	Pág.
1. 1 Carcinoma Epidermóide Oral	14
1. 2 Células Tronco de Câncer	17
1. 3 Terapia Fotodinâmica	23
1. 4 Influência da TFD na Resposta Imunológica	30
1. 5 Células <i>Natural Killer</i> e interação com TFD	34
2. JUSTIFICATIVA	39
3. OBJETIVOS	40
3.1 Objetivo Direto	40
3.2 Objetivo Específico	40
4. METODOLOGIA	41
4. 1 Cultivo Celular	41
4. 2 Caracterização da linhagem NK92-MI	42
4. 3 4.3. Caracterização da expressão dos receptores da linhagem NK92-MI	42
4. 4 Isolamento e Caracterização das células amebóides	42
4. 5 Citometria de fluxo: CD44, ESA, Anexina V e DAPI	42
4. 6 Citometria de fluxo: HLA-ABC nas subpopulações CD44/ESA	43
4. 7 Extração de RNA, síntese do DNA complementar e qPCR	44
4. 8 Ensaio de citotoxicidade	44
4. 9 Co-cultivo direto	46
4. 10 Formação de Colônia	47
4. 11 Formação de Esfera	47
4. 12 Terapia fotodinâmica	47
4. 13 Ensaio de viabilidade celular	47
4. 14 Avaliação de Morfologia Celular	49
4. 15 Ensaio de citotoxicidade com meio condicionado	50
4.16. Análise Estatística	50
5. RESULTADOS	51
5.1 Caracterização da linhagem NK92-MI	51
5.2 Caracterização das populações de células tronco tumorais e células amebóides	51

5.3 Citotoxicidade mediada pelas células NK92-MI	58
5.4 Análise da expressão de ligantes para NKG2D e HLA-ABC nas linhagens celulares Ca1 e Luc4 e suas respectivas populações de células amebóides	59
5.5 Co-cultivo das linhagens celulares Ca1 e Luc4 com as células NK92-MI	62
5.6 Análise das subpopulações CD44 ^{high} /ESA ^{high} , CD44 ^{high} /ESA ^{low} e CD44 ^{low} da linhagem Ca1 após o co-cultivo com as células NK92-MI	63
5.7 Análise do potencial clonogênico e capacidade de formação de esferas das linhagens Ca1 e Luc4 após o co-cultivo com as células NK92-MI	64
5.8 Análise da viabilidade e morfologia após TFD	66
5.9 Citotoxicidade das células NK92-MI após a TFD	67
5.10 Expressão de CD44/ESA e HLA-ABC após TFD no CEO	68
5.11.Citotoxicidade após cultivo das células NK92-MI com meio condicionado da linhagem Ca1 submetido à TFD	70
6. DISCUSSÃO	72
7. CONCLUSÃO	81
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82
Apêndice: Artigos publicados	90

1. CONTEXTUALIZAÇÃO

1.1 Carcinoma Epidermóide Oral

O câncer é a maior causa de morte mundial, afetando países com todos os níveis socioeconômicos com elevada e crescente taxa de mortalidade. Atualmente, o câncer da cavidade oral é um dos mais prevalentes tipos de câncer no mundo, com uma expectativa de 354.864 novos casos, com número de mortes de 177.384 mortes (1). No Brasil, o câncer oral chega a ser o quinto tipo de câncer mais frequente entre os homens, sendo estimados 11.200 novos casos para os anos de 2020-2022 no país (2).

O carcinoma epidermóide oral (CEO) é uma neoplasia maligna de alta prevalência, que abrange mais de 90% dos casos diagnosticados entre os cânceres de cabeça e pescoço (3-5). Dentre os fatores de risco para o desenvolvimento do CEO, o tabagismo corresponde ao fator etiológico mais prevalente (42% dos casos), sendo este valor elevado a 90% quando correlacionado juntamente ao consumo de bebidas alcoólicas (3). Outros fatores que também contribuem para a incidência do CEO são exposições prolongadas à luz ultravioleta, infecção com Papiloma Vírus Humano e deficiências do sistema imune (4).

Um fator crucial para a determinação do prognóstico e tratamento do CEO é o estágio no qual a neoplasia é diagnosticada. Aproximadamente 30% dos pacientes diagnosticados com CEO apresentam metástases regionais ou cervicais devido ao extenso sistema de linfonodos localizados na proximidade, facilitando a disseminação de células metastáticas (6).

A sobrevida dos pacientes diagnosticados com CEO, mesmo com os avanços tecnológicos e terapêuticos, permaneceu nas últimas décadas em uma média de 5 anos em 50% dos casos (3, 4, 6) e quando o comprometimento do linfonodo local é confirmado, a taxa de sobrevida destes pacientes é reduzida para 25 a 30%, sendo agravada para os casos diagnosticados com metástases à distância (6).

Apesar do avanço tecnológico e funcional das terapias disponíveis para o tratamento de CEO, técnicas cirúrgicas, novos compostos quimioterápicos e imunoterapia, bem como o aprimoramento das técnicas de imagem e radioterapia, a taxa de sobrevivência dos pacientes diagnosticados com CEO

não é satisfatória, cerca de 50% dos pacientes sofrem com recorrência do caso após a radioterapia (5, 7). Este fato ocorre pelo perfil de comportamento do tumor, que se apresenta resistente aos tratamentos disponíveis (8).

Para compreender o fundamento da resistência terapêutica do CEO é necessário compreender o processo de desenvolvimento do CEO, que envolve tanto a aquisição progressiva de mutações celulares, proliferação celular bem como a formação de um microambiente tumoral, no qual, as células tumorais e suas interações com outras populações celulares promovem a manutenção deste microambiente e seu crescimento (8, 9).

A exposição contínua do tecido epitelial a carcinógenos promove danos genéticos, os quais progressivamente se acumulam na célula, culminando com a transformação maligna. Neste processo, para que a célula tumoral não seja reconhecida pelos mecanismos de defesa do organismo, a mesma adquire capacidades que promovem sua sobrevivência (10).

Primeiramente, as células tumorais devem ser capazes de sustentar seu próprio crescimento por meio da produção de fatores de crescimento ou pela indução indireta destes fatores provindos do microambiente tumoral; superar os estímulos de sinais supressores de crescimento ou de processo de morte programada; induzir aumento da expressão da telomerase; induzir angiogênese e invadir tecidos adjacentes, adequando seu microambiente por meio do recrutamento de células inflamatórias, fibroblastos e células mieloides mesenquimais (11). Adicionalmente, as células tumorais são capazes de se adaptar ao microambiente tumoral de maneira que não sejam reconhecidas por linfócitos e células *natural killer* (NK) (9).

Avaliando a condição imunológica de pacientes diagnosticados com CEO em estadiamentos avançados é possível observar grande distúrbio no sistema imunológico. A quantidade de leucócitos nestes pacientes é reduzida, bem como ocorre redução do perfil citotóxico celular com aumento do perfil regulador (12).

Bose e colaboradores isolaram células mononucleares periféricas do sangue de pacientes com CEO e observaram que estas células tinham sua capacidade citotóxica e viabilidade comprometidas (12). Neste estudo, os autores relatam que as populações de células T CD4+ e CD8+ são reduzidas, juntamente à redução de IFNy e IL-12 bem como a redução de GranzimaB e FasL nos pacientes (12).

Um estudo com modelo *in vivo* de CEO demonstrou que a quantidade de células CD4 nos animais com tumores formados foi reduzida em relação ao controle, no qual a população CD4⁺Foxp3⁺ foi elevada de forma significativa (13)

No estudo desenvolvido por Gasparoto e colaboradores, não houve diferença entre a quantidade de linfócitos presentes nos pacientes controle e com CEO, porém, quando as populações de linfócitos CD4⁺ foram avaliadas, foi possível observar um aumento de células CD25⁺, no qual 80% destas células apresentavam o fenótipo CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺. Adicionalmente, as células CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺, bem como células CD4⁺CD25⁻Foxp3⁺ mostraram reduzida produção de IFNy, com aumento significante de IL10 e TGFβ (14).

Com base nestes estudos, é possível observar que os pacientes diagnosticados com CEO podem apresentar alterações em seus componentes imunológicos, impossibilitando a correta eliminação tumoral e propiciando um microambiente tumoral capaz de resistir à vigilância imunológica. Neste contexto, terapias que atuem promovendo maior infiltração e ativação do sistema imunológico são fundamentais para contornar esta resistência imunológica do CEO.

As células tumorais de CEO são capazes de resistir aos sinais de supressão e sobrevivência, proliferar indeterminadamente, e promover o recrutamento de células para suprir sua sobrevivência bem como resistir aos mecanismos de defesa e resposta imunológica além de resistir ao tratamento radioterápico por meio de seus mecanismos de sobrevivência. Interessantemente, são poucas as células tumorais com todas estas capacidades, e a literatura demonstra que em diferentes neoplasias malignas, incluindo o CEO, existe uma população rara de células denominadas como células tronco de câncer (CTC) a qual será explanada no seguinte capítulo, bem como seu impacto nos mecanismos de progressão tumoral.

1.2 Células Tronco de Câncer

O tecido epitelial da mucosa oral, é composto por camadas celulares e em sua camada basal existem células responsáveis pela manutenção do epitélio, denominadas células-tronco. Estão presentes em diversos outros tecidos do organismo adulto, atuando na homeostase tecidual e no processo de reparo (15). No câncer, uma população rara de células foi identificada e isolada com características semelhantes, sendo denominada como célula-tronco de câncer (15, 16).

A origem destas células é proposta por duas vertentes, uma na qual as células-tronco regulatórias ou progenitoras do tecido de origem sofreram diversas mutações dando origem às CTC, justificando portanto as similaridades moleculares entre as CTC e células-tronco normais; e a outra vertente propõe que células diferenciadas podem adquirir características de células-tronco no decorrer de diversas mutações e sofrer um processo de des-diferenciação, adquirindo portanto as características de uma célula tronco (17).

As características fundamentais de uma CTC constituem elevado potencial tumorigênico quando inoculadas em camundongos imunodeficientes, identificação por meio da expressão de marcadores de superfície específicos, são capazes de reconstituir a heterogeneidade tumoral em baixa densidade, e por fim podem ser transplantadas em série, demonstrando sua capacidade de auto-renovação (Figura 1) (17).

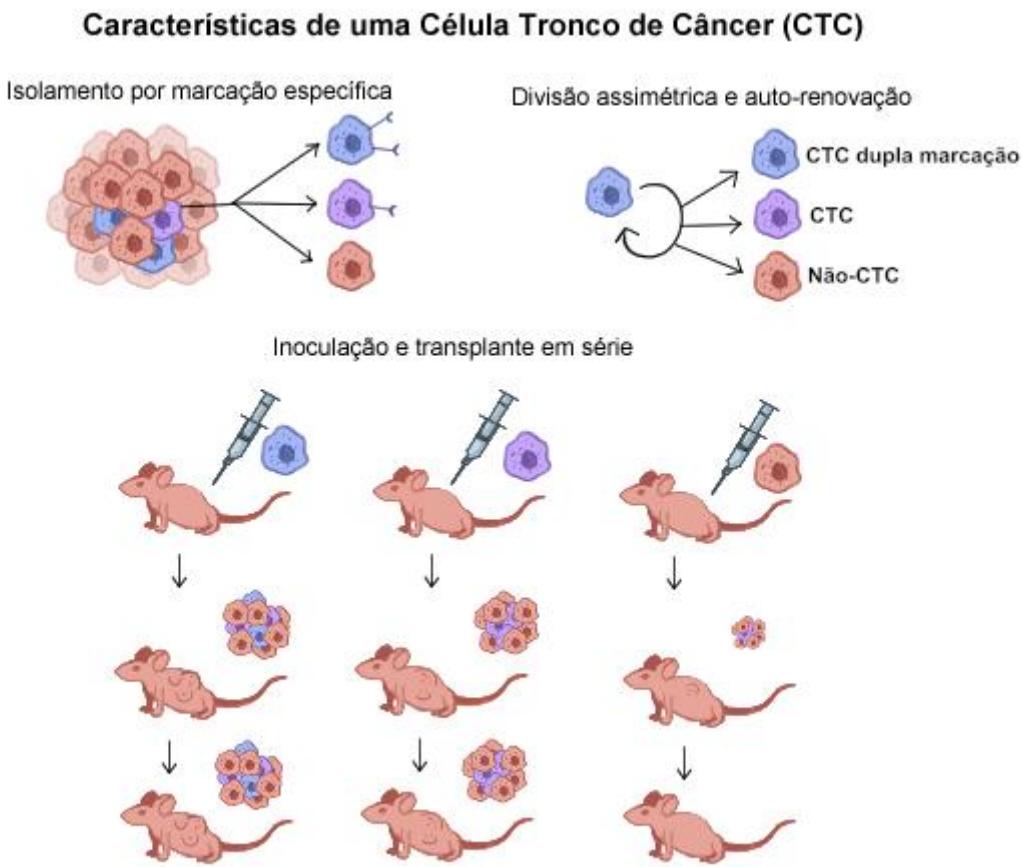


Figura 1: Representação esquemática das características fundamentais de uma CTC. As células tronco de câncer (CTC) são capazes de formar tumores quando isoladas e inoculadas em animais imunodeficientes, podendo ser transplantadas em série. As CTC podem ser identificadas e isoladas por marcação específica e alta capacidade de auto-renovação. (Figura de elaboração do autor).

A primeira descrição da presença das CTC no câncer foi em 1997, em um modelo de leucemia mielóide aguda (LMA), na qual uma pequena população foi isolada pela expressão de marcadores característicos de células hematopoiéticas, CD34 e CD38. Em seguida estas células isoladas foram inoculadas em camundongos imunodeficientes NOD/SCID, e apenas as células CD34⁺D38⁻ foram capazes de reconstituir a LMA nos animais, das quais, após reimplante, foram capazes de reconstituir a heterogenicidade tumoral. (18)

Nos tumores sólidos, o primeiro relato de CTC foi descrito em 2003, em tumores de mama, no qual uma população de células foi isolada a partir da expressão de CD44⁺/CD24⁻, sendo capaz de ser transplantada em série em

animais imunodeficientes (19). No CEO, esta população foi identificada por Prince e colaboradores, por meio da expressão de CD44. Neste estudo, os autores observaram que apenas 10% das células tumorais correspondiam ao perfil de CTC, sendo estas células capazes de reconstruir a heterogeneidade tumoral quando inoculadas, mesmo em baixas concentrações, além de expressarem o gene *BMI1*, associado à capacidade de auto-renovação das células tronco (20). Adicionalmente, foi observado que as células CD44⁺ possuíam as características descritas de uma CTC enquanto células CD44⁻ não eram capazes de reconstituir o tumor e expressavam maiores níveis do marcador de diferenciação epitelial Involucrina, sugerindo que as células CD44⁺ corresponderiam às CTC e as células CD44⁻, células bem diferenciadas com potencial reduzido de proliferação (20).

Em 2011, Biddle e colaboradores observaram que as células CTC de CEO são capazes de assumir dois diferentes fenótipos celulares com base na expressão combinada de CD44 e ESA. A população caracterizada pelo perfil CD44^{high}/ESA^{high} possui morfologia epitelial, com maior capacidade proliferativa, capaz de formar holoclones. A população com o fenótipo CD44^{high}/ESA^{low} possui células com menor capacidade de proliferação, maior motilidade e, portanto, maior capacidade migratória, com elevada expressão de marcadores e genes associados com a transição epitelial-mesenquimal (TEM). Adicionalmente, as células CD44^{low} foram consideradas células não-tronco, com baixa ou ausente taxa de proliferação, caracterizadas morfologicamente por células bem diferenciadas (21).

A transição epitelio-mesenquimal (TEM) é um processo dinâmico reversível pelo qual células epiteliais alteram sua polaridade e morfologia (22). Em tecidos adultos, a TEM é ativada durante o processo de reparo, participando inclusive de processos patológicos do reparo como a fibrose e também no desenvolvimento tumoral (23). Este processo ocorre naturalmente durante o desenvolvimento embrionário, guiado pelas vias de sinalização Wnt, Notch e STAT3, sendo correlacionado no tumor como fator de resistência terapêutica e promoção de metástase (24).

A capacidade das células epiteliais alterarem sua polaridade é denominada como plasticidade celular e está diretamente relacionada com a TEM (22-25). Nos tumores epiteliais, a plasticidade celular pode ser observada pela alteração

morfológica, na qual células epiteliais poligonais perdem sua polaridade apical e assumem uma forma alongada com pontos de adesão focais (25). Este processo ocorre com a perda da expressão de E-caderina e desregulação da via Wnt, aumento de sensibilidade celular à EGFR bem como aumento da expressão de N-caderina, vimentina, Snail1 e Snail2 (23-25).

A TEM é regulado por diversas vias de sinalização celulares, citam-se as vias Wnt/β-catenina/Snail, Notch/NICD/Snail1, Shh/Gli/Snail, TGF-β/SMAD/Snail ou ZEB, TGF-β/non-SMAD/EMT-TFs, além de sua interação com fatores de crescimento epiteliais (26). A presença de TEM em neoplasias é um fator impactante para o prognóstico do paciente devido sua direta atuação na progressão tumoral, invasão e metástase (26).

Estudos recentes demonstram que células tumorais são capazes de exercer outra modificação em sua morfologia, denominada como transição mesenquimal-amebóide (TMA), caracterizada pela ativação da via de sinalização Rho quinase e uma morfologia celular arredondada (27, 28). A migração celular amebóide é caracterizada por um movimento celular sem aderência, de forma propulsiva ou com leve aderência que promove a formação de 'dedos' ou 'filamentos alongados' também denominados como *blebbing* ao redor da célula, ricos em actina e filopódia, que se assemelha ao movimento de leucócitos (28, 29). Estas células são capazes de se movimentar entre os tecidos em uma velocidade de 1 a 5 μ m/min em modelos *in vivo*, e ainda, podem ser observadas em menor densidade quando comparadas com outras populações celulares tumorais, correspondendo de 1 a 5 % das células neoplásicas dotadas de motilidade (28).

A literatura sobre eventos moleculares envolvidos no processo que promove a TMA é escassa, mas acredita-se que estas células possuem características de CTC, exibindo genes associados com o fenótipo tronco além de elevada capacidade migratória (27). Devido a sua reduzida polaridade, é proposto que a TMA ocorra devido a alterações nos mecanismos e complexos de polaridade, incluindo *Par*, *Scribble*, *Crumbs*, *Rho* e *GTPases* (30).

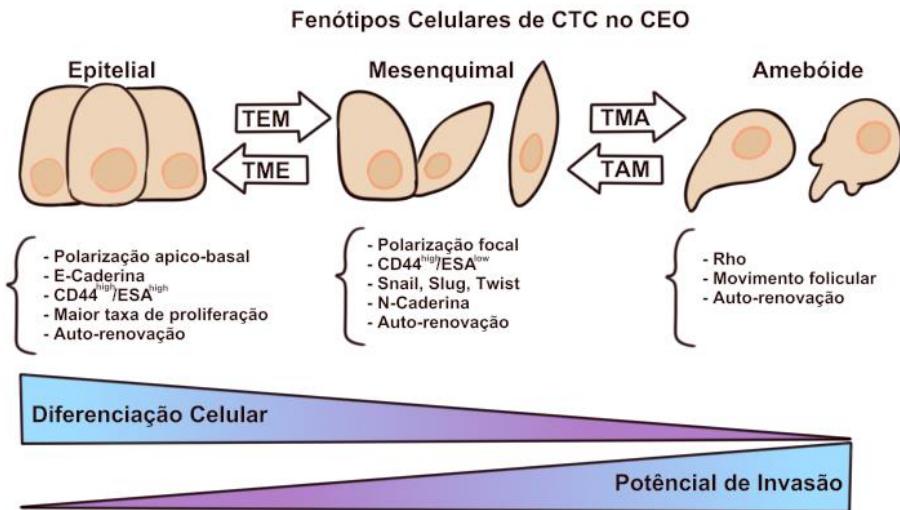


Figura 2: Ilustração esquemática com diferentes fenótipos pelos quais CTC derivadas de carcinoma epidermóide oral podem assumir. Fenômenos envolvidos, mas não completamente elucidados. (Figura de elaboração do autor).

Outra característica das CTC que confere maior resistência e progressão tumoral é sua capacidade de auto-renovação, um processo natural realizado por células tronco para promover a formação de tecidos com heterogenicidade a partir da ativação de vias de complexos embrionários como OCT4 e BMI1 (15).

Em pacientes diagnosticados com CEO, a expressão de marcadores embrionários varia de intensidade em relação ao local avaliado. As margens não tumorais apresentam baixas expressões de BMI1, Nanog, OCT4 e CD44, enquanto os tumores T1 e T2 demonstram maior expressão de Nanog e tumores mais agressivos apresentam elevada expressão de BMI1 e OCT4 (31).

A presença de marcadores de fenótipo tronco em pacientes diagnosticados com CEO, sendo estes fumantes ou não fumantes, representa um fator de avanço do estadiamento, onde tumores mais agressivos apresentam maior expressão dos marcadores quando comparado com tumores em estadiamento inicial (31). Adicionalmente, pacientes com alta expressão de SOX2 e comprometimento dos linfonodos obtiveram significativa redução da taxa de sobrevida, demonstrando o impacto das CTC no prognóstico do CEO (32).

Em relação à taxa de sobrevida, a expressão de CD44 apresentou-se como fator correlacionado com pior prognóstico e redução de sobrevida no CEO (31, 33). Margens não-tumorais bem como tumores com baixa expressão de CD44

não foram correlacionados com o agravamento do caso, contudo, tumores com a elevada expressão de CD44 foram correlacionados com significante redução da sobrevida, e, portanto, pior prognostico (33).

No CEO, a avaliação de marcadores para fenótipo tronco e CTC é frequentemente realizada, por meio de avaliação das populações e sua capacidade de expressar marcadores de fenótipo tronco, sua capacidade de formação de colônias e esferas tumorais, capacidade de maior bombeamento de corante Hoescht para o exterior, bem como a presença do marcador em amostras obtidas de pacientes. Dentre os marcadores específicos de CTC no CEO presentes na literatura atual, citam-se CD44, CD24, EGFR, ALDH1 (21, 32, 34, 35).

As CTC estão associadas à imunossupressão dos pacientes com câncer (36). Em um estudo *in vitro*, células de carcinoma de faringe isoladas por marcação de CD44⁺ foram co-cultivadas com células T em duas condições, ativadas e inativadas. Dentre os resultados observados frente à presença de células T inativadas, as células CD44⁺ expressavam ambos os marcadores HLA-I e HLA-II, com expressões elevadas de IL8, G-CSF e TGFβ. Adicionalmente, as células CD44⁻ não expressavam HLA-II. Quando as células tumorais foram cultivadas com linfócitos T ativos, as células tumorais CD44⁺ induziram a redução da proliferação de células T, bem como sua diferenciação em linfócitos T reguladores (Treg), com maior porcentagem de células CD4/Foxp3 presentes na co-cultura. Além disso, houve aumento de IL10 e inibição de IFNy e IL2, com consequente redução do perfil Th1 e promoção da imunossupressão (36).

As CTC no CEO são células com alta resistência terapêutica. Em relação aos quimioterápicos, já foi demonstrada resistência à cisplatina, metotrexato, doxorrubicina, salinonucina e paclitaxel bem como terapias anti-EGFR (35, 37). A resistência à radioterapia também foi observada para as CTC e pode ser atribuída a uma maior atividade de vias de reparo de DNA, conforme observado por Gemenetz e colaboradores (38). Neste estudo, as células receberam gradativas doses de radiação e após 1Gy, as células não-tronco (CD44^{low}) foram as mais afetadas com alta sensibilização e promoção de apoptose em relação às CTC. (38).

A resistência terapêutica aos tratamentos convencionais (quimioterapia e radioterapia), representa um grande obstáculo para o tratamento oncológico e,

neste contexto, avaliar novas possibilidades terapêuticas ou vias e terapias que promovam maior sensibilização destas células ao tratamento convencional é essencial.

1. 3 Terapia fotodinâmica

A luz é um fenômeno recorrente na história, seu uso como uma fonte terapêutica é citado por civilizações antigas do Egito, China, Índia, entre outras. Apesar do misticismo que nebula a visão dos mais céticos, a luz foi relatada e fundamentada cientificamente desde meados de 1900, quando Oscar Raab relatou os efeitos citotóxicos da luz em bactérias, seguido pelos relatos de Nield Finsen que tratou pacientes diagnosticados com tuberculose e varíola com comprimentos de onda selecionados (39).

Todavia, houve um significante atraso no desenvolvimento da luz como terapia devido à primeira e segunda guerra mundial. Felizmente em 1970, a terapia com fontes luminosas foi retomada nos centros acadêmicos devido aos esforços de Thomas Dougherty que sintetizou o primeiro fotossensibilizador (FS) (FS), uma mistura de porfirinas derivadas de haematoporfirina (HpD) e que com o decorrer dos anos foi purificada e é conhecida atualmente como Photofrin (40).

Apesar de ser o FS mais extensamente avaliado, Photofrin é um FS de primeira geração, que possui diversas desvantagens como extenso período de foto-sensibilização e maior risco de desenvolver reações cutâneas desagradáveis (40). O desenvolvimento do primeiro FS levou ao início de uma nova modalidade terapêutica conhecida como terapia fotodinâmica (TFD). Esta terapia se baseia no uso de uma droga ou corante (denominada FS), administrada de forma endovenosa ou tópica, que após um período de incubação é capaz de promover a formação de espécies reativas de oxigênio após excitada por um comprimento de onda específico na presença de oxigênio (41).

Um FS ideal deve ser uma molécula pura, com alta seletividade para células tumorais, alta estabilidade química e física, reduzido tempo de administração e máxima acumulação, com ativação em feixes luminosos de maior penetração tecidual e rápida eliminação (42). Os FS podem ser subdivididos dentre suas cadeias de origem em três gerações, sendo a primeira o composto de origem, a segunda e terceira geração seus derivados com complementos para a

estabilização e aprimoramento de entrega da molécula, dos quais, as cadeias mais comuns são derivadas de porfirina, clorinas, ftalocianinas, e porfírenos ou taloporfirinas (42).

O mecanismo de ação da TFD pode ser definido como uma cadeia de mecanismos biofísicos deve ocorrer em simetria para que o dano ao alvo ocorra. Conforme observado no diagrama da Figura 3, as partículas emitidas pela luz (fótons) são absorvidas pelo FS, estes fótons de um determinado comprimento de onda devem ser compatíveis com a molécula em questão, preferencialmente devem ser capazes de penetrar no tecido sem sofrer espalhamento, para que o efeito da TFD seja contido no local irradiado, em seguida o FS deve ser capaz de gerar espécies reativas de oxigênio o suficiente para que o efeito citotóxico no alvo ocorra (42). O acúmulo tecidual do FS e a taxa de oxigenação resultante são fatores chave para esta reação (43).

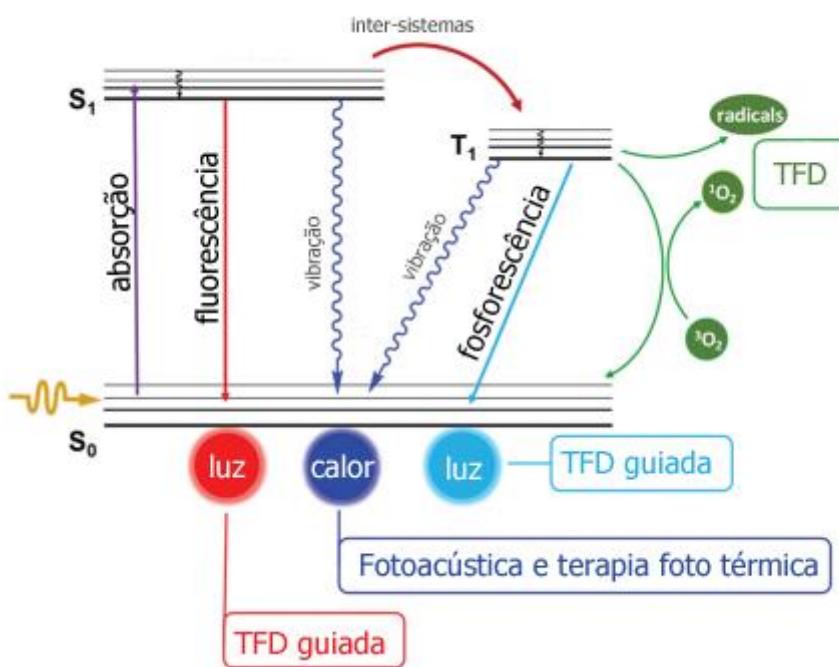


Figura 3: Diagrama de Jablonski. Adaptado de Feng e colaboradores; O FS é administrado e incubado por um período determinado. Após incubação o FS é excitado pela luz absorvendo-a, saindo de seu estado basal S0 para o estado excitado S1. No estado S1, o FS pode perder parte de sua energia absorvida por um fenômeno denominado Fluorescência, no qual luz visível é emitida pelo FS, ou o FS pode passar por cruzamento de inter-sistemas, 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 tipo II. O dano promovido pelas reações resulta em diferentes efeitos locais dependente da intensidade do dano causado. Caso a energia não seja utilizada, o FS pode perdê-la em Fosforescência, emitindo luz visível (44).

A intensidade do dano resultante do FS irá determinar qual tipo de morte celular será induzida: autofagia, apoptose ou necrose (40-43). A severidade do dano após a TFD também depende da localização preferencial do FS na célula. 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 (40, 45).

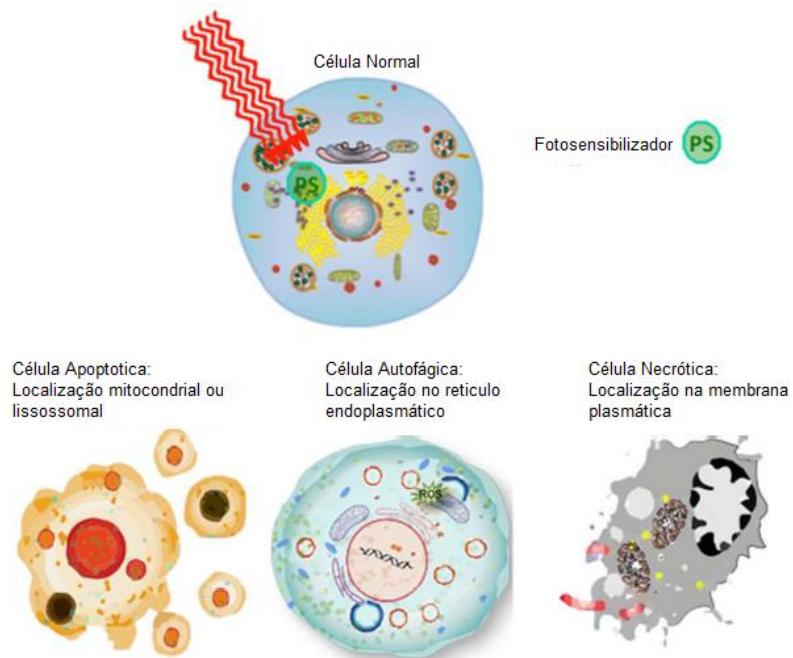


Figura 4: Mecanismos de morte celular, adaptado de Abrahamse & Hamblin 2016. A localização subcelular do FS em diferentes organelas contribui para a determinação do mecanismo de morte celular desencadeado pela célula alvo. Vale ressaltar que a concentração do FS e energia administrada também irá impactar no mecanismo de morte ativado após a TFD (40).

O 5-ALA é um precursor da protoporfirina IX (PpIX), a qual representa um FS endógeno. A administração do ALA pode ser feita via oral, intravenosa ou intradermal, todavia a via oral é a mais recomendada (46). Em relação aos

efeitos adversos do 5-ALA, relatam-se foto-sensitividade (irritação cutânea em exposição a luz), náuseas e alterações de pressão, sendo estas reduzidas em 24 horas (47). A eliminação do 5-ALA ocorre por meio de bombas de transporte como a família de transportadores ABC e suas as proteínas da família ABCG2 (48), bem como atividade de ferroquetalase (FECH) (49). Este processo representa uma das maiores limitações terapêuticas do 5-ALA, pois sua eliminação precoce pode ocorrer devido ao aumento da atividade de transportadores ABC nas células tumorais (48).

No CEO, a TFD mediada por 5-ALA apresenta resultados positivos em tumores em estágios iniciais, apesar da literatura clínica ser escassa (50).

Neste contexto, a TFD apresenta-se como uma possível opção terapêutica para eliminar as CTCs. Na tabela 1 são descritos os estudos em que o efeito da TFD nas CTC de diferentes tipos de tumores foi avaliado.

Tabela 1: Efeito da terapia fotodinâmica nas CTCs em diferentes tumores sólidos.

Autor	Tumor	FS	CTC isoladas por	Achados
Selbo et al. 2012 (51)	mama	PhA (feoforbideA)	Side Population Expressão de ABCG2	CTC apresentam alta expressão de ABCG2. FS acumulou nas CTC independentemente da expressão de ABCG2.
Hu et al. 2018 (52)	mama	fVII-SnCe6 (composto recombinante de fator VII, clorina e6 e amino ácidos)	CD24 CD44 CD133	TFD mediada por alvo (Tissue Factor targeted chlorin e6-PDT) foi efetiva em CTCs, induzindo apoptose e necrose.
Gaio et al. 2020 (53)	mama	TPCS _{2a} (Nano composto de meso-tetrafenil cloro dissulfonato com ácido hialurônico)	CD44	Doxatol (DTX) não foi efetivo contra as CTCs. PDT+DTX foi citotóxico para CTCs.

Raschipichler et al. 2020 (54)	mama	CUR-NP (Nanoparticula de Curcuma com poli-glico ácidos)	Células circulantes em um sistema de válvulas	Curcuma foi efetiva em CTCs no sangue. Análise morfológica sugere promoção de apoptose e necrose.
Schmidt et al. 1991 (55)	cervical	Azul de metileno, indigocarmina, IR-132 (lambdachrome), Sulfo-Al-Pc (sulfo-aluminio-ftalocianina) e sulfo-fitalicoanina	Formação de esferas	Azul de metileno e Sulfo-Al-Pc foram citotóxicos e reduziram formação de esferas.
Chizenga et al. 2019 (56)	cervical	AlPcS _{mix} (mix de sulfo-aluminio ftalocianica)	Side population CD133 CD49f	Baixas doses de AlPcS promoveram formação de dedos 'bebbing' e desadesão celular. Doses altas de AlPcS promoveram alteração morfológica e altos níveis de LDH.
Wei et al. 2009 (57)	colorretal	ALA (δ -ácido aminolevulinico)	CD133	Acúmulo de PpIX foi maior em CTC porém apresentaram menor resposta ao tratamento. Aumento de apoptose após a TFD para células CD133+.
Bostad et al. 2013 (58)	colorretal	TPCS2a (Dissulfonato de meso-tetrafenil clorina)	CD133	TPCS2a foi capaz de acumular nas CTCs. Formação de vesículas ácidas foram elevadas após a TFD.
Wei et al. 2014 (59)	colorretal	Protoporfirina IX dissolvida em DMSO.	CD133 PROM1	As CTC foram resistentes à TFD e apresentaram aumento de LC3-II e atividade de auto fagossomos. Inibição de autofagia (por cloroquina) aumentou citotoxicidade e reduziu formação de esferas <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> em CTC.

Cogno et al. 2020 (60)	colorretal	Antraquinonas (<i>rubiadin</i> , <i>soranjidiol</i> , compostos purificados de <i>H.pustulata</i> e <i>T.flavicans</i>)	Formação de esferas	Cultura em monocamada foi mais sensível ao tratamento em comparação às esferas tumorais. Indução de apoptose após TFD para células em geral (sem isolar fenótipo).
Mao et al. 2021 (61)	colorretal	Curcumina	LGR5	Eficácia terapêutica de curcumina variou com o grau de autofagia promovido pela TFD. Redução dos genes <i>GP1BB</i> , <i>COL9A3</i> , <i>COMP</i> , <i>AGRN</i> , <i>ITGB4</i> , <i>LAMA5</i> , <i>COL2A1</i> , <i>ITGB6</i> , <i>ITGA1</i> e <i>TNC</i> . <i>TFAP2A</i> foi correlacionado com menor sobrevida e prognóstico ruim.
Yu et al. 2014 (62)	cabeça e pescoço	ALA (5-acido aminolevulinico)	Formação de esferas	Redução de formação de esferas, potencial de invasão, expressão de CD44, Oct4, Nanog, e aumento da sensibilidade à cisplatina quando combinada à TFD.
Peng et al. 2017 (63)	cabeça e pescoço	Polyhematoporfirina	CD44	TFD não foi citotóxica nas CTC. TFD + lovastatina aumentou a citotoxicidade e reduziu formação de esferas.
Fang et al. 2018 (64)	cabeça e pescoço	ALA (5-ácido aminolevulinico)	Formação de esferas CD44	Aumento da expressão de miR- 145 após TFD. Células miR-145+ foram mais sensíveis à terapia, com redução de formação de esfera e potencial de invasão.

Schimanski et.al. 2016 (65)	cérebro	ALA (5-ácido aminolevulínico)	Formação de esferas	Resistencia terapêutica à TFD variou de acordo com a linhagem celular. CTC demonstraram acúmulo reduzido de PpIX.
Wang et al. 2017 (66)	cérebro	ALA (5-ácido aminolevulínico)	<i>Side population</i> ABCG2	As CTC apresentam aumento de oxygenase-1. Resistência terapêutica de CTC não foi mediada por ABCG2 e pode estar associada à maior eliminação de PpIX.
Fujishiro et al. 2018 (67)	cérebro	ALA (5-ácido aminolevulínico)	CD133 Sox2	CTC apresentam maior acúmulo de PpIX bem como aumento de genes relacionados ao transporte endógeno (<i>ALAS1</i> , <i>ALAS2</i>) exógeno (<i>PEPT1</i> , <i>PEPT2</i>) e metabolização de PpIX (<i>UROS</i> , <i>UROD</i> , <i>CPOX</i> , <i>FECH</i> , <i>ABCB6</i> e <i>ABCG2</i>). CTC foram mais resistentes à TFD quando cultivados em meio de cultura sem soro.
Kawai et al. 2019 (68)	pâncreas	ALA (5-ácido aminolevulínico)	<i>Side population</i> ABCG2	Silenciamento de ABCG2 aumentou acúmulo de PpIX e reduziu a <i>side population</i> , mas não afetou a formação de esferas.

Com base na revisão de literatura, podemos observar que o efeito da TFD nas CTC varia de acordo com a linhagem celular e metodologia utilizada para seu isolamento. Além disso, respostas distintas são observadas nas CTC, de maneira que alguns estudos demonstram ineficácia e ativação de mecanismos de resistência e outros mostram resposta terapêutico satisfatória nas CTC e quando associadas a outras terapias.

1. 4 A influência da TFD na resposta imunológica

O sistema imunológico consiste na interação entre células, tecidos e órgãos criando mecanismos de defesa capazes de detectar e se adaptar frente a diferentes estímulos bem como desenvolver memória (69). A adaptação é um processo reversível, não específico, dependente de comunicação por sinalizações e receptores celulares(69). A intensidade e frequência do estímulo afetam diretamente qual via do sistema imune será ativada, imunidade inata ou adaptativa. Quando estímulos de alta frequência ou dose são emitidos, as células imunes podem entrar em estado de exaustão ou hipo-responsividade, limitando em parte sua capacidade efetora e assim, criando tolerância ao estímulo (69).

Classicamente, a imunidade inata é uma resposta não específica que não promove a formação de memória celular, caracterizada por células do sistema inato capazes de interagir com patógeno ou antígeno por meio de receptores para promover sua fagocitose e degradação enquanto a resposta adaptativa é uma resposta estimulada por antígenos apresentados via MHC, que ocorre de forma específica e resulta em memória celular (70).

A apresentação do antígeno é um passo necessário para a determinação do balanço entre ativação e diferenciação de linfócitos T entre seu fenótipo regulador e/ou citotóxico. Após sua ativação, as linfócitos T efetoras se locomovem para o local da neoplasia, onde devem ser capazes de penetrar e infiltrar a neoplasia. No sítio da neoplasia, as linfócitos T fazem o reconhecimento de antígenos tumorais ligados ao MHC-I de células apresentadoras de antígenos por meio de receptores específicos (TCR).

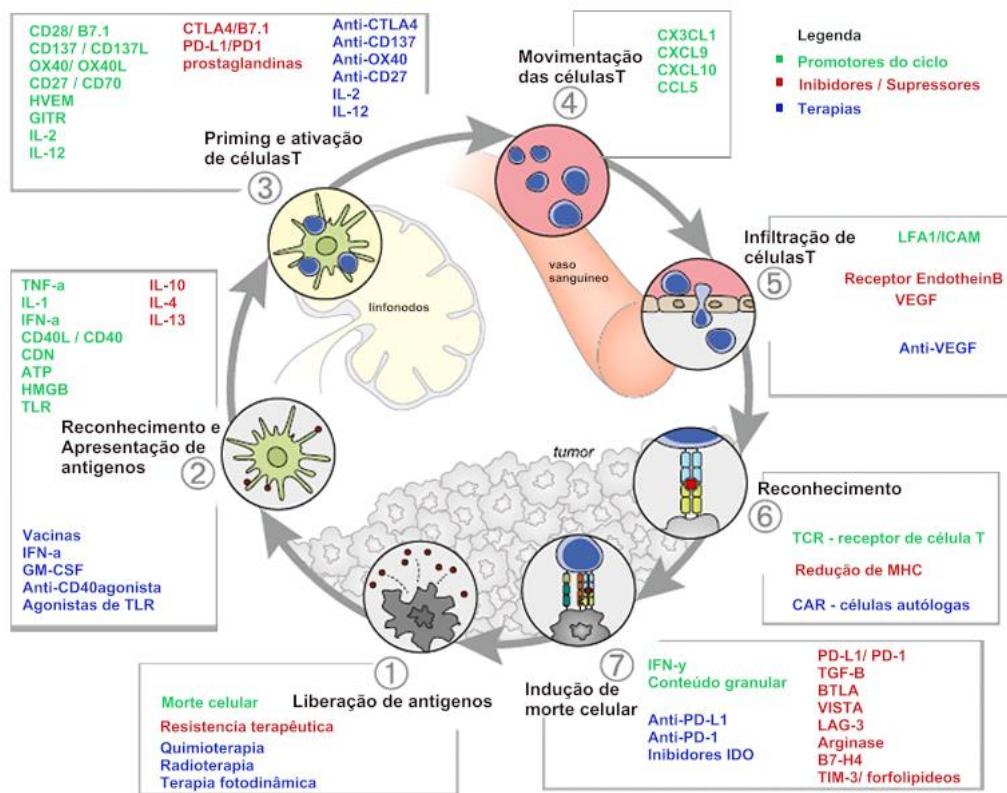


Figura 5: Ciclo de imunidade do câncer, adaptado de Chen e colaboradores (71). (1) Antígenos são liberados por morte celular, liberando fatores pró-inflamatórios e antígenos que são processados pelas células dendríticas (2) e apresentados aos linfócitos T (3). Os linfócitos T são estimuladas para o perfil citotóxico (4) e migram para o sítio neoplásico guiados por quimiocinas (5), infiltrando o tumor (6). Em seguida, ocorre o reconhecimento da célula alvo e a ativação da citotoxicidade (secreção de IFN γ e liberação dos grânulos). Fatores estimuladores e inibitórios envolvidos em cada etapa estão representados em verde e vermelho, respectivamente. Em azul, estão destacadas possíveis intervenções terapêuticas.

A TFD no âmbito tumoral favorece a resposta sistêmica imunológica anti-tumoral, porém sua efetividade depende da capacidade imune do hospedeiro (72, 73). O efeito promovido pela TFD está completamente relacionado com a liberação de DAMPS e subsequente ativação do sistema imunológico (74). Conforme explanado por Gollnick e colaboradores (2012) a inflamação promovida pela TFD pode ser separada em duas etapas: infiltração de neutrófilos e a liberação de citocinas (73). Sugere-se que a ação de IL-6 modula a resposta local, afetando a extensão do dano promovido, infiltração de macrófagos bem como o dano vascular e por conseguinte a oxigenação tecidual (73).

Efeito imunológico da TFD: Morte imunológica celular

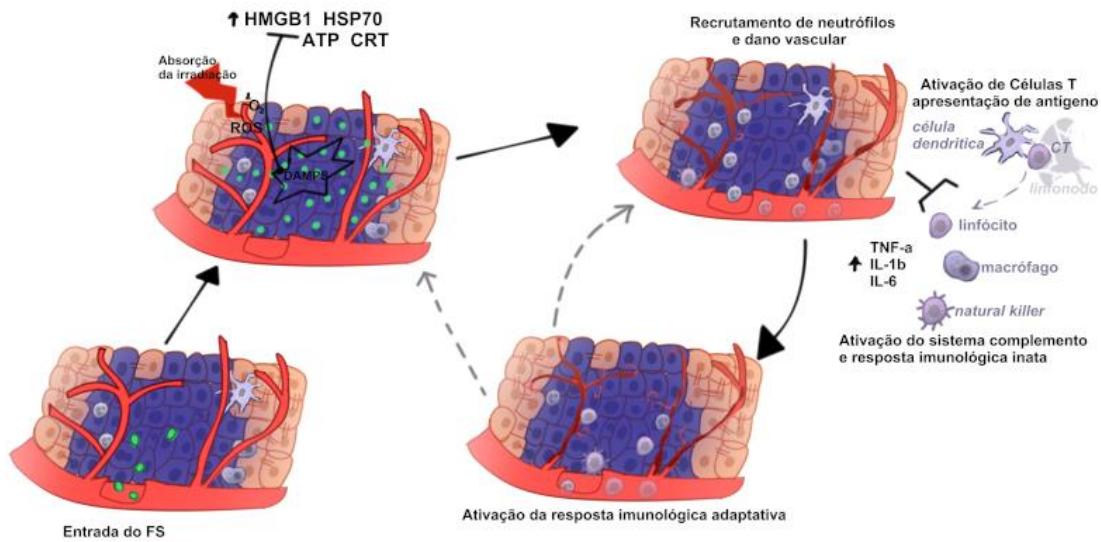


Figura 6. Efeito imunológico da terapia fotodinâmica em neoplasias. Após a TFD, os neutrófilos infiltram o tumor por possuírem maior afinidade pelo tecido vascular, acumulando-se no mesmo e causando destruição de vasos sanguíneos e resposta inflamatória aguda. Consequentemente, há maior infiltração de mastócitos e macrófagos bem como células dendríticas, resultando em maior apresentação de antígeno e ativação da resposta imune adaptativa. A resposta imune inata ocorre por meio da ativação do complemento e das células *Natural Killer*. A resposta adaptativa por consequência promove a diferenciação e recrutamento de linfócitos T para perfil citotóxico. Ao término deste processo, os linfócitos T assumem perfil regulador e linfócitos B proliferam secretando anticorpos (74). (Figura de elaboração do autor).

Para demonstrar a direta dependência da imunidade na TFD, animais induzidos para um perfil imunossuprimido por meio de bloqueio de linfócitos e células NK não foram responsivos ao tratamento com TFD e novos tumores foram formados (72), sendo este resultados também observados por Kabingu et al. (2006) (75). Um estudo clássico desenvolvido por Hendrazak et al. (1999) foi observado que na ausência de linfócitos T CD8 e células NK, a recidiva tumoral é aumentada (76).

A morte celular imunogênica promovida pela TFD é o resultado de eventos promovidos em cadeia para a promoção da resposta imunológica de maneira sistêmica e não apenas local (77). Define-se pela ativação do sistema imune a partir da liberação de DAMPs (HSP90, HSP70, ATP extracelular circulante e HMGB1) gerados pela TFD a partir de células em processo de morte celular (77).

Adicionalmente, a TFD promove alterações vasculares que estão diretamente correlacionadas com o mecanismo de morte imunológica e a

efetividade terapêutica. Neste contexto, TNF- α produzido por macrófagos locais após a TFD tem efeito anti-vascular e a liberação de IL-1 β atua no recrutamento de neutrófilos, afetando o endotélio (78). O dano vascular é acompanhado de contração vascular, contribuindo para a formação de um edema local, agregação plaquetária que por conseguinte gera um processo isquêmico local (79). Com a constrição do fluxo vascular, o sistema complemento é ativado e funciona como um estímulo para a resposta imune inata via liberação de fatores quimiotáticos por células endoteliais, atraindo neutrófilos, mastócitos, macrófagos e linfócitos T no local do tumor submetido à TFD (78, 79). Com a ativação da resposta adaptativa, a TFD promove uma resposta imune sistêmica, com aumento de neutrófilos e linfócitos T circulantes bem como formação de células de memória. Caso a resposta adaptativa seja bloqueada, o controle da terapia é perdido e a susceptibilidade para recidiva e metástase é maior (76, 79).

Todos estes mecanismos culminam para o enriquecimento da resposta imunológica de forma gradativa após a realização do tratamento, permitindo que ocorra um efeito a longo prazo local, tal efeito foi proposto e detalhadamente descrito por Hernandes e colaboradores, conforme observado na Figura 7, a terapia fotodinâmica no âmbito da oncologia pode ser avaliada em uma linha de tempo de eventos imunológicos desencadeados pela liberação de DAMPs (80).

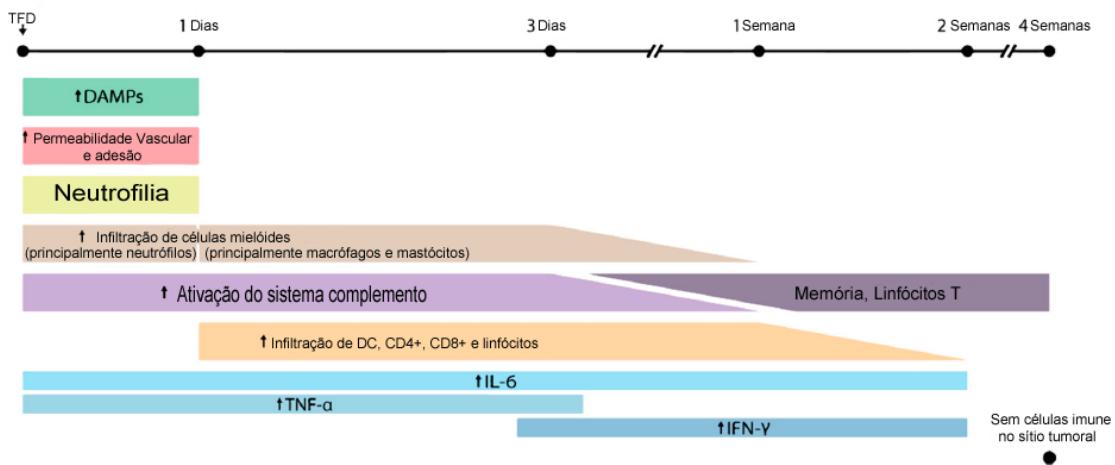


Figura 7: Efeito imunológico promovido pela TFD no decorrer do tempo. Inicia-se por meio da liberação de DAMPs e ativação do sistema complemento, levando ao aumento da permeabilização e neutrofilia no sítio tumoral por 24 horas. Em seguida com o aumento pronunciado da atividade dos neutrófilos, demais células imunológicas permeiam o tecido dentro de 72 horas. No dia seguinte após a TFD, células dendríticas e linfócitos começam a se acumular no tumor, iniciando um processo adaptativo que pode ser observado por duas semanas, acompanhado por níveis elevados de IL-6, TNF- α , IFN γ e sistema complemento. Após quatro semanas, as células presentes no sítio tumoral não são perceptíveis, porém é possível identificar a presença de linfócitos T na circulação ou órgãos linfoides da proximidade (80) (Figura adaptada e traduzida para o Português de Hernández e colaboradores 2020).

1.5 Células *Natural Killer* e interação com TFD

As células *Natural Killers* (NK), são uma pequena população de linfócitos capazes de promover lise de seu alvo sem sensibilização prévia (77, 81). Representam 5 à 15% dos linfócitos circulantes e são caracterizadas por sua origem e função efetora de potente capacidade citotóxica (82). Nos tecidos orais não-neoplásicos, a presença de células NK é baixa, cerca de 10 células por mm². Em lesões orais potencialmente malignas, a concentração é escassa em comparação ao CEO, tendo a presença de 10 à 20 células por mm². No CEO, as células NK se distribuem pelo estroma, sendo observadas em média, 30 células por mm², concentrando-se principalmente no fronte tumoral e em regiões peritumorais, onde apresentam-se entre 100 e 130 células por mm² (83).

As NK são classicamente definidas como linfócitos CD3⁻CD56 nos humanos, possuem diferentes fenótipos baseados na expressão de CD56, onde células com a expressão de CD56^{bright} possuem um perfil imunoregulatório,

enquanto células CD56^{dim} exercem maior função citotóxica (81, 84). O processo de diferenciação aos diferentes fenótipos ocorre por meio de diferentes estímulos recebidos no processo de sua maturação(84). Na presença de TGF-β e IL-10, as células NK tornam-se tolerantes, apresentando redução do receptor ativador NKG2D; na presença de IL-2, IL-12, IL-15, IL-21 IGF-1 e STAT3, as células possuem perfil citotóxico, com elevada produção de IFN-γ e liberação de grânulos citoplasmáticos. Sob influência de TGF-β, IL-7 e IL-15, as células NK assumem um perfil NK regulador com produção de IFN-γ e IL10 (84).

Conforme descrito por Cheng et al. (2013), as células NK possuem papel crucial na vigilância imunológica, reconhecendo as células tumorais por meio de sinais de *stress* e perigo, eliminando seu alvo por meio da liberação de grânulos citoplasmáticos contendo perforina e granzima B, indução de receptores de apoptose (FasL, TRAIL, TNF-alfa), secreção de moléculas efetoras (IFN-γ) e citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC). Adicionalmente, por produzir IFN-γ, as NK induzem a diferenciação de linfócitos T para um perfil Th1 citotóxico e estimulam a atividade de linfócitos B (85).

Para que ocorram os mecanismos acima citados, as células NK devem receber estímulos por seus receptores; o receptor transmembrana NKG2D é um receptor de domínio curto, atuando de forma conjunta com proteínas adaptadoras DAP10, fazendo o reconhecimento de ligantes MHC de classe I, proteínas relacionadas A e B (MICA, MICB), bem como proteínas ligantes-UL (ULBP1-6) (86). Além de NKG2D, outros receptores ativadores das células NK se destacam: receptores de citotoxicidade natural (NCRs), NKp46 (também denominado NCR1, CD335), receptor NKp44 (NCR2, CD336) e receptor NKp30 (NCR3, CD337), os quais atuam na ativação das células NK e estimulação da secreção de IFN-γ (86).

O tumor é capaz de contornar a ação de NK por mecanismos de resistência, como o aumento da expressão de MHC-I ou a liberação de ligantes solúveis de NKG2D para a redução de sua expressão (86), pela secreção de IL-10 e TGF-β (87), pela inibição de CD16 (88), por células apresentadoras de antígeno associadas ao tumor (81) ou pela expressão de PD-1 e seu ligante (PD-L1) (89). A expansão de linfócitos Treg CD4⁺CD25⁺ também pode influenciar negativamente na capacidade citotóxica das células NK por meio da supressão da proliferação e aumento de IFN-γ (90).

Para o desenvolvimento de estudos *in vitro*, a linhagem NK92 bem como sua descendente NK92-MI foram obtidas a partir de um estudo clássico desenvolvido por Gong e Maki (1994), no qual avalia-se um caso de um paciente portador de um linfoma não-Hodgkin (91). Como células NK92 são dependentes de IL-2, Tam et. al. (1999) desenvolveu o subtipo NK92-MI capaz de produzir IL-2 de forma independente, possibilitando a expansão do uso desta linhagem (92).

Neste contexto, as células NK teriam um papel crucial no controle da progressão tumoral (72, 75), e possivelmente seus mecanismos de ação podem ser amplificados por meio da TFD, a qual poderia sensibilizar o tumor para que NK possa identificar seu alvo, eliminando-o efetivamente. São poucos os achados na literatura que avaliam o papel de células NK após a TFD, dos quais dados são compilados na Tabela 2.

Estudos avaliando o efeito da TFD sob células NK obtiveram inicialmente o intuito de avaliar a capacidade das células NK serem usadas como uma terapia adoptiva juntamente com a TFD, na qual o paciente receberia ambos os tratamentos. No estudo desenvolvido por Korbelik et al. (2001), camundongos NOD-SID foram tratados com mTHPC e injeções de células NK92-MI (93). Após atingir o volume adequado, os tumores foram tratados com mTHPC de forma intravenosa, com 0.1 ou 0.15mg/kg. O grupo tratado com TFD+terapia adoptiva com células NK peri-tumoral obteve maior sobrevida livre de tumor e foi capaz de prevenir a recorrência tumoral em 25% dos animais, enquanto os demais grupos apresentaram 100% de recorrência. Contudo este efeito foi perdido quando a proporção célula efetora:alvo foi reduzida ou apenas a inoculação de células NK foi realizada (93). Adicionalmente, os autores também avaliaram a concentração de células NK 2 horas e 18 horas após a TFD. Nas primeiras horas não foi possível observar aumento de células NK intratumoral, porém, após 18 horas, foi observada maior concentração de células NK no tumor tratado com TFD (93). Os autores sugerem que a TFD é capaz de promover a maior penetração de células NK e maior controle da lesão, sendo, portanto, interessante o uso de ambas as terapias. Vale ressaltar que neste estudo não foram avaliados as presenças dos ligantes e mecanismos de ativação imunológicos, sendo sugerido que o aumento de citocinas inflamatórias produzidas no pico de inflamação após a TFD, possa contribuir para o maior recrutamento das células NK (93).

Um estudo publicado por Park et al. (2011) avaliou a relação dos ligantes NKG2D após a TFD mediada por Hematoporfirinas em duas linhagens celulares tumorais, SNU-1 (adenocarcinoma estomacal) e SW-900 (carcinoma pulmonar). Neste estudo os autores irradiaram células em placas de cultivo com uma lâmpada de projetor de 400W por 3 min e 10J/cm² (94). Após a irradiação, foi feita a análise dos ligantes de NKG2D (MICA, MICB, ULBP1, ULBP2, ULBP3) por meio de RT-qPCR, enquanto a expressão de ligantes de superfície para NKG2D foi mensurada por citometria de fluxo. Os resultados variaram entre as linhagens e entre os ligantes avaliados (94). Em resumo, houve aumento da expressão de *ULBP1*, *ULBP2*, *ULBP3* e *MICA/B* num intervalo de 3 a 12h após a TFD. Adicionalmente, houve redução na expressão de MHC-I após a TFD bem como maior citotoxicidade mediada pelas células NK. Com base nestes resultados, os autores sugerem que o aumento de ligantes para NKG2D juntamente com a redução de MHC-I promovida pela TFD contribua para a citotoxicidade mediada pelas células NK após a TFD.

Belicha-Villanueva et al (2012) avaliaram a expressão do complexo de histocompatibilidade MHC-I em amostras celulares de tumores derivados de colón humanos (linhagem Colo205) e murinos (linhagem CT26) após a TFD mediada por HPPH (95). Os autores relataram aumento de NKG2DL e citotoxicidade das células NK após a TFD em 24 horas *in vitro* (95). Com base nestes resultados, os autores sugerem que a TFD é capaz de modular a resposta mediada por células NK, sendo proposto que o estresse oxidativo mediado pela emissão de EROs após a TFD seja capaz de elevar a expressão de NKG2DL e não de MHC-I, promovendo o aumento da atividade citotóxica das células NK. Além disso, a presença de HPPH seria capaz de mediar o aumento da citotoxicidade das células NK via expressão de MICA, o que sugere diferentes repostas imunológicas mediante ao FS de escolha (95).

Tabela 2: Revisão de literatura, interação de NK em tumores tratados com TFD.

Autor	Tumor	TFD	Achados
Korbelik et al. 2001(93)	Cervical Colorretal Mamário	FS: mTHPC Incubação de 24horas 120-130mW/cm ² Modelo <i>in vivo</i>	Terapia adoptiva com NK realizada imediatamente após TFD, de forma peritumoral promoveu melhor controle tumoral e sobrevida livre de tumor
Park et al. 2011 (94)	Estomacal Pulmonar	FS: HPD 3 minutos 10J/cm ² Modelo <i>in vitro</i>	Aumento progressivo de NK dentro do tumor sugere maior penetração de NK mediada pela TFD (aumento de 5% em 2h, 10% em 18h em comparação com controle)
Belicha-Villanueva et al. 2012 (95)	Colón	FS: HPPH 0.4~0.8umol/kg Modelo <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	Para SNU-1 Aumento expressão genética de ULBP1, aumento expressão de superfície ULBP1 e ULBP2. Redução de MHC-I Para SW-900 Aumento expressão genético e superfície de MICB, ULBP1, ULBP2, ULBP3. Redução de MHC-I. Aumento de Citotoxicidade de NK após TFD foi dependente de ligantes NKG2D.

2 JUSTIFICATIVA

Com base nos capítulos descritos acima, o CEO é composto por uma complexa interação de células tumorais com a imunidade do hospedeiro. A TFD possui grande impacto na resposta imune do hospedeiro, sendo, por conseguinte, uma possibilidade para combinação terapêutica com terapias convencionais e adoptivas. Todavia, a efetividade da TFD pode ser comprometida por mecanismos de escape e resistência do tumor alvo, que se sugere ocorrer por meio de ausência de oxigênio e inativação de células T e NK do hospedeiro. Portanto compreender os mecanismos envolvidos na resposta imunológica após a terapia fotodinâmica é fundamental para promover novas metodologias que permitam o melhor controle da doença e prognóstico terapêutico.

3 OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

O objetivo deste trabalho é avaliar *in vitro* a ação de células *Natural Killer* sob células derivadas de carcinoma epidermóide oral submetidas ao tratamento com terapia fotodinâmica.

3.2. Objetivos específicos

- Caracterizar a linhagem NK92-MI por meio de citometria de fluxo;
- Avaliar e caracterizar a expressão gênica de *ULBPs* e *HLA-ABC* por citometria de fluxo em linhagens celulares derivadas de CEO e subpopulações de CTC;
- Avaliar a capacidade citotóxica da linhagem NK92-MI contra linhagens celulares derivadas de CEO e subpopulações de CTC por meio do ensaio de liberação Calceína-AM;
- Avaliar a capacidade de formação de colônias e esferas tumorais de linhagens celulares de CEO após o co-cultivo com células NK92-MI;
- Avaliar o efeito da TFD no CEO, por meio do ensaio de MTS;
- Avaliar o efeito da TFD na citotoxicidade das células NK92-MI em uma linhagem de CEO, bem como na expressão de ligantes para células NK92-MI e em subpopulações de CTC.

4 METODOLOGIA

4.1. Cultivo Celular

A linhagem celular derivada de carcinoma epidermóide oral Ca1 e Luc4 foram gentilmente cedidas pelo Prof. Ian Mackenzie (Instituto Blizzard, Queen Mary University of London) foi cultivada 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+ (96) e mantidas a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO₂ e 95% de umidade. Para os experimentos realizados as linhagens foram descongeladas em baixa passagem (p7) e todos os experimentos foram realizados em triplicata em passagens seguidas.

Ambas as linhagens foram obtidas por meio da cultura primária de amostras isoladas de carcinoma epidermóide oral, sendo estas células isoladas, purificadas e marcadas para subsequentemente serem expandidas in-vitro e ex-vivo (cultura de matriz e fibroblastos para mimetizar um tecido epitelial), cinco linhagens foram estabelecidas das quais Ca1 provém de uma subpopulação de maior diferenciação, capaz de formar camas de epitélio em uma constante taxa de proliferação, enquanto Luc4 apresenta-se menos diferenciada com menor taxa proliferativa tendo predominância de células que compõe a camada basal do epitélio (96).

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

A linhagem celular K562 derivada de leucemia mielóide crônica (CCL-243, ATCC) foi gentilmente cedida pelo Prof. José Belizário, do Instituto de Biociências da USP. Esta linhagem é usada como controle positivo para os ensaios de citotoxicidade das células NK, uma vez que a mesma não apresenta MHC de classe I. Esta linhagem foi cultivada em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de SFB e 200nM de L-glutamina.

4.2. Caracterização da linhagem NK92-MI

As células da linhagem NK92-MI foram caracterizadas por citometria de fluxo, pelos anticorpos: anti-CD45-FITC, anti-CD3-PE, anti-CD56-APC Cy7, Isotipo IgG1 FITC, Isotipo IgG2a PE, Isotipo IgG1 APC Cy7. Os anticorpos foram incubados por 30 minutos no escuro em temperatura ambiente. Em seguida, as células foram lavadas em PBS, centrifugadas e ressuspensas em 200µL de PBS. As células foram caracterizadas por meio do fenótipo CD45+/CD56+/CD3- utilizando-se o equipamento FACSCanto II, do Departamento de Imunologia do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Um mínimo de 10.000 eventos foi adquirido por meio do software FACS Diva utilizando-se o software FlowJo v10.0.

4.3. Caracterização da expressão dos receptores da linhagem NK92-MI

A expressão dos receptores Nkp30, Nkp44, Nkp46 e NKG2D, associados com a ativação das células NK92-MI, foi avaliada após o co-cultivo de NK92-MI com células da linhagem Ca1; as células foram coletadas imediatamente após 24h de co-cultivo. Em seguida, as células foram centrifugadas, contadas e 1x10⁵ células foram incubadas com os anticorpos primários descritos na Tabela 3, bem como com seus respectivos controles isotípicos por 30 min a 4°C no escuro. Após este período, as células foram lavadas com PBS+BSA1%, centrifugadas e ressuspensas em PBS+BSA1% contendo 200ng/mL de DAPI para exclusão das células mortas. A análise foi feita no equipamento FACS Canto II e um mínimo de 10.000 eventos foi adquirido por meio do software FACS Diva. A análise da porcentagem de células bem como da intensidade fluorescência de cada marcador foi feita utilizando-se o software FlowJo v10.0. Foi realizado um experimento em triplicata.

Tabela 3: Anticorpos utilizados para avaliação da expressão dos receptores das células NK92-MI.

Anticorpo	Marca/Clone	Diluição
anti-Nkp30 PE Cy7	Biolegend/P30-15	1:500
anti-Nkp44 PerCP 5.5	Biolegend/P44-8	1:100
anti-Nkp46 PE Cy7	Biolegend/9E2	1:100
Anti-NKG2D PerCP 5.5	Biolegend1D11	1:100
Isotipo IgG1 PE Cy7	Biolegend/MOPC-21	1:500
Isotipo IgG1 PerCP 5.5	Biolegend/ MOPC-21	1:400

4.4. Isolamento e Caracterização das células amebóides

Para caracterizar as células amebóides derivadas das linhagens Ca1 e Luc4, foi inicialmente realizado o cultivo celular e isolamento destas células com base nos protocolos desenvolvidos pelo Prof. Ian Mackenzie (21). O sobrenadante celular contendo células flutuantes foi coletado, centrifugado e as células foram colocadas em novo frasco para acompanhamento e expansão. Este procedimento foi repetido três vezes até que somente células com morfologia amebóides quando aderidas ao frasco ou células flutuantes representassem 80-90% da população celular (Figura 8)

A caracterização das células amebóides foi realizada por meio da análise morfológica, citometria de fluxo para análise da expressão de citomeria de fluxo de CD44 e ESA; e RT-qPCR para os genes *RTNX1*, *CLGB*, *CTN1* e *IVL*.

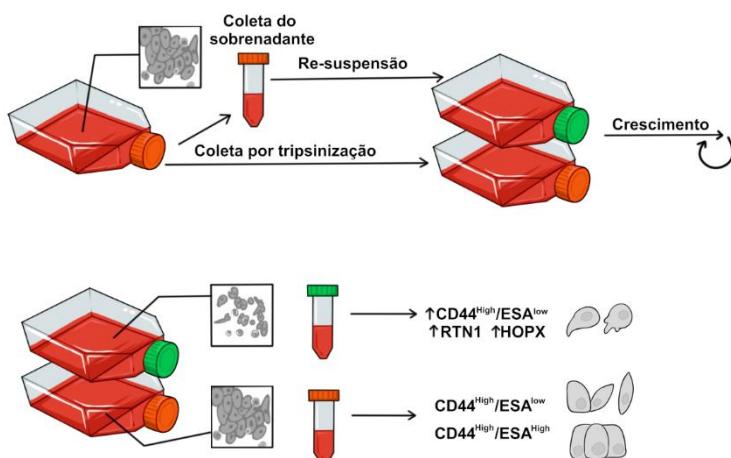


Figura 8: Isolamento e caracterização de células amebóides tumorais derivadas das linhagens Ca1 e Luc4 (Figura de elaboração do autor).

4.5. Citometria de fluxo: CD44, ESA, Anexina V e DAPI

As células da linhagem Ca1 e Luc4 foram plaqueadas na densidade de 2×10^5 e $2,5 \times 10^5$ células/poço, respectivamente, em placas de 6 poços. Após 24h, o meio foi removido e as células NK92-MI foram adicionadas nos poços da linhagem Ca1 na proporção 12:1 e 6:1 e da linhagem Luc4 na proporção 6:1. Células cultivadas somente com o meio das células NK92-MI serviram como controle. Após 4h de co-cultivo, as células das linhagens Ca1 e Luc4 foram tripsinizadas, contadas e marcadas com os anticorpos anti-CD44-FITC (BD

Biosciences, 1:50), anti-ESA-APC (Myleni, 1:800) e anti-Anexina V (BD Biosciences, 1:100) no escuro por 30 min a 4°C. Após lavagem com PBS+BSA1%, as células foram incubadas com esta solução contendo 200ng/mL de DAPI para exclusão de células mortas. A análise das subpopulações CD44^{high}/ESA^{high}, CD44^{High}/ESA^{low} e CD44^{low} bem como da porcentagem de células positivas para Annexina V e DAPI foi feita no equipamento FACS Canto II do Departamento de Imunologia do Instituto de Biociências da USP. Um mínimo de 10.000 eventos foi adquirido por meio do software FACS Diva e a análise da porcentagem de células foi realizada utilizando-se o software FlowJo v10.0.

4.6. Citometria de fluxo: HLA-ABC nas subpopulações CD44/ESA

Para identificação da expressão de HLA-ABC nas linhagens Ca1 e Luc4 e em suas subpopulações CD44^{high}/ESA^{high}, CD44^{high}/ESA^{low}, CD44^{low} e ameboides, as células foram incubadas com os anticorpos anti-CD44-FITC, anti-ESA-APC e anti-HLA-PE Cy7 (Biolegend, clone W6-32, 1:800) por 30 min a 4°C, bem como com seu respectivo controle isotípico (Biolegend, Isotipo IgG2a, clone MOPC-173, 1:2400). Após este período, as células foram lavadas com PBSA, centrifugadas, ressuspensas em PBS+BSA1% contendo 200ng/mL de DAPI e analisadas no equipamento FACS Canto II. Um mínimo de 10.000 eventos foi adquirido por meio do software FACS Diva. A análise da porcentagem de células positivas para HLA-ABC bem como da intensidade fluorescência nas linhagens celulares Ca1 e Luc4 e ameboides, bem como dentro de cada subpopulação foi avaliada utilizando-se o software FlowJo v10.0. Foram realizados três experimentos independentes em triplicata.

4.7. Extração de RNA, síntese do DNA complementar e qPCR

O RNA total foi extraído utilizando-se o reagente Trizol (ThermoFisher), de acordo com as instruções do fabricante. Posteriormente, 1µg de RNA total foi reversamente transcrito em DNA complementar (cDNA) por meio do kit High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (ThermoFisher). As reações de PCR em tempo real foram realizadas em um termociclador ABI7500 utilizando o reagente SYBR Green (Applied Biosystems) e primers específicos para os genes

RTN1, CLGB, INV, CTN1, ULBP1, ULBP2, ULBP3, ULBP4, MICA/B e GAPDH (Tabela 4). Os produtos da RT serviram de molde para a amplificação por qPCR, sendo todas as reações realizadas num volume final de 10 µL em tubos óticos com os seguintes reagentes: *primers sense* e *antisense* para cada gene, 5 µL de SYBR Green Master Mix® (Applied Biosystems), 1 µL de cDNA e água. O processo de ciclagem térmica consistiu em desnaturação inicial a 95°C por 10 min, seguido por quarenta ciclos de amplificação a 95°C por 10 seg e 60-62°C por 1 min para os genes *RTN1, CLGB* e *CTN1* e quarenta ciclos de amplificação a 95°C por 10 seg, 62°C por 30 seg e 72°C por 40 seg para os genes *ULBP1, ULBP2, ULBP3, ULBP4, MICA/B* e *GAPDH*.

Após o término do último ciclo, 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 para avaliação de sua possível contaminação. A análise quantitativa da expressão foi obtida de acordo com o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. As reações de qPCR foram realizadas em duplicata e três amostras de cDNA de cada linhagem foram utilizadas, sendo consideradas para quantificação da expressão gênica somente aquelas com desvio padrão $\leq 0,05$ entre os valores de Ct. Os dados de expressão relativa foram demonstrados utilizando-se a linhagem parental como amostra calibradora.

Tabela 4: Sequência dos *primers* e temperatura de anelamento utilizada na reação de qPCR.

Gene	Primers 5' → 3'	Tm (°C)
RTN1	F: ctgcctgcagttctacgtga R: cgtaggtcaggagccacatc	60
CLGB	F: aaagagctggcgaaaaga R: aaagagctggcgaaaaga	62
CDH1	F: gaacgcattgccacatacac R: agcaccttccatgacagacc	60
ULBP1	F: cagtccctggagccttctca R: caggaccaggaccaggctaa	62
ULBP2	F: gcaaggatgtctgtgagca R: ggccacaaccctgtcattct	62
ULBP3	F: caggaccaggaccaggctaa	62

	R: gctcagtgtcagccagttcc	
ULBP4	F: atggtaaaacctctggcct R: cccacttctcccagcgttt	62
GAPDH	F: gtgaaccatgagaagtatgacaac R: catgagtcctccacgatacc	62

4.8. Ensaio de citotoxicidade

A citotoxicidade da linhagem NK92-MI quando cultivadas com as células das linhagens Ca1 e Luc4 e suas respectivas populações de células amebóides foi avaliada pelo método de liberação de calceína AM, de acordo com Neri et al. (2001)(97). Em resumo, 5×10^5 células foram incubadas com $1 \mu\text{M}$ de calceína AM (Biolegend) diluída em PBS por 20 min a 37°C . Em seguida, as células foram lavadas com PBS e centrifugadas, sendo ressuspensas na concentração de 105 células/mL. Em seguida, 10^4 células tumorais marcadas foram incubadas com diferentes concentrações (25:1; 12,5:1; 6,25:1; 3,125:1) de células da linhagem NK92-MI em placas de 96 poços com fundo em U. As células foram centrifugadas a 250 xg por 5 min e mantidas a 37°C por 4h. Após este período, a placa foi novamente centrifugada a 250 xg por 5 min, o sobrenadante foi coletado e transferido para placas de 96 poços de fundo chato pretas. A intensidade de fluorescência foi avaliada utilizando-se o equipamento Biotek Synergy HTX, com excitação da calceína AM em 488nm e emissão em 520nm. A liberação espontânea (LE) de calceína AM foi obtida por meio da liberação de calceína AM no meio na ausência de células NK92-MI e a liberação máxima (LM) foi obtida por meio da lise das células tumorais marcadas com calceína AM em meio contendo 2% de Triton X-100. Posteriormente, a seguinte fórmula foi utilizada para obtenção da porcentagem de citotoxicidade:

$$C = [(valor-MLE) / MLT-MLE] \times 100$$

Onde:

C = Citotoxicidade

MLE = Média da Liberação Espontânea

MLT = Média da Liberação Total

Para avaliar o efeito do meio condicionado das linhagens Ca1 e Luc4 na citotoxicidade das células NK92-MI, estas foram incubadas por 24h com o meio condicionado das linhagens tumorais e em seguida, submetidas ao ensaio de

citotoxicidade por liberação de calceína-AM, utilizando-se a linhagem K562 como alvo. Essa análise foi incluída uma vez que as células tumorais secretam moléculas imunossupressoras como TGF β e IL-10, as quais impedem a ativação das células NK92-MI.

4.9. Co-cultivo direto

Para a realização do co-cultivo, as linhagens celulares Ca1 e Luc4 foram plaqueadas em placas de 6 poços na densidade de 2×10^5 células. Após 24h, as células da linhagem NK92-MI em diferentes proporções foram adicionadas nos poços por 4 e 24h. Após estes períodos, as células foram avaliadas morfológicamente utilizando-se o microscópio Nikon Eclipse (Nikon Instruments Inc. USA) e submetidas aos ensaios de formação de colônias e esferas.

4.10. Formação de Colônia

Para avaliar a capacidade de formação de colônia, as células das linhagens Ca1 e Luc4 foram cultivadas em baixa densidade (200 células por poço) em placas de 6 poços e incubadas por 7 dias. Após este período, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% e coradas com cristal violeta 1,5% diluído 40 vezes em água por 5 min. As colônias foram fotografadas para análise da morfologia e as placas foram digitalizadas para contagem do número de colônias com o auxílio do software ImageJ (Versão 1.4, Fiji, 2012). Foram consideradas colônias celulares os agregados contendo mais de 50 células ou 2mm. Os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados representam os dados obtidos de três experimentos independentes.

4.11. Formação de Esfera

Para avaliar a capacidade de formação de esferas tumorais, as células das linhagens Ca1 e Luc4 após o co-cultivo com as células NK92-MI por 24h e 4h, respectivamente, foram plaqueadas em placas de 24 poços de baixa adesão em densidade de 100 células/poço e mantidas em cultura por 10 dias. Após este período, as esferas tumorais foram contadas independentemente por dois investigadores. Os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados representam os dados obtidos de três experimentos independentes.

4.12. Terapia fotodinâmica

As células da linhagem Ca1 foram divididas nos seguintes grupos de estudo:

- Grupo Controle: células da linhagem Ca1 sem nenhum tratamento, mantidas sob as condições experimentais descritas anteriormente.
- Grupo 5-ALA: células da linhagem Ca1 incubadas somente com o FS 5-ALA (mesma concentração utilizada no grupo TFD).
- Grupo LED: células da linhagem Ca1 submetidas somente à irradiação com LED (mesmo protocolo de irradiação utilizado no grupo TFD).
- Grupo TFD: células da linhagem Ca1 submetidas à TFD.

Para a realização da TFD, as células Ca1 foram incubadas no escuro por 4h com o ácido aminolevunílico (5-ALA) na concentração de 1mM em meio DMEM-F12 sem SFB. Em seguida, o meio foi removido, as células foram lavadas com solução tampão fosfato (pH 7,4) e irradiadas com o equipamento LED-Saber (BioLambda, Brasil), em comprimento de onda de 660±9nm (Figura 9).

A dose selecionada para posteriores análises foi definida por meio de uma curva de viabilidade quantificada pelos ensaios de MTS.

A dose de escolha foi de 1,5J/cm² e 3J/cm² realizada com base na literatura, onde sub-doses foram administradas para avaliar o efeito da TFD nas células NK (95, 98). Todas as doses foram ajustadas para garantir a entrega efetiva de energia, a perda estimada de energia causada pelo plástico dos frascos de cultivo foi descontada de acordo com Silva et al. (99). Todas as irradiações foram realizadas em PBS para reduzir a perda promovida pelos meios de cultivo.

Tabela 5: Parâmetros dosimétricos utilizados para a irradiação.

Perda estimada %	Potência (mW)	Irradiância (W/cm ²)	Exposição radiante (J/cm ²)	Tempo (s)	Energia Total (J)
22	100	0,0355	1,5	51	5,1
22	100	0,0355	3	101	10,1
22	100	0,0355	6	202	20,2
22	100	0,0355	9	303	30,3
22	100	0,0355	12	404	40,4
22	100	0,0355	15	505	50,5
22	100	0,0355	18	606	60,6

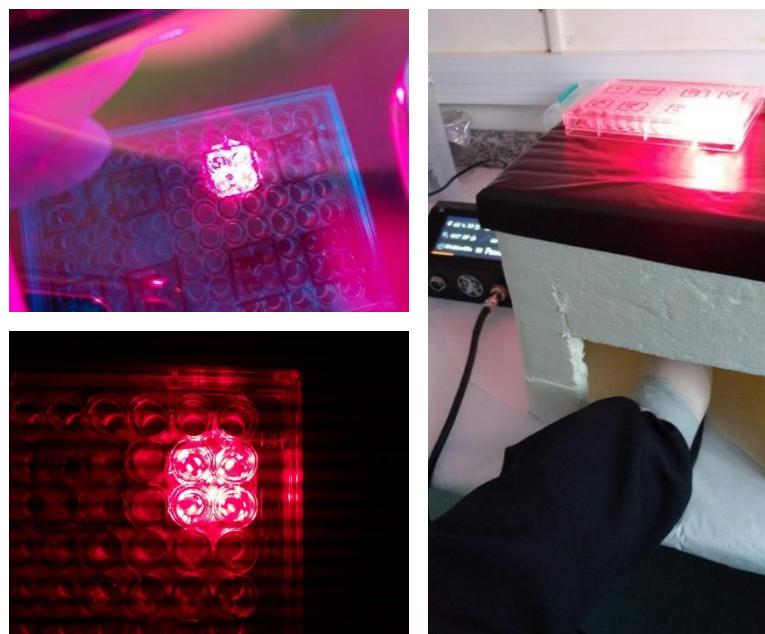


Figura 9: Irradiação com LED Saber (Figura de elaboração do autor).

4.13. Ensaio de viabilidade celular

A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium] (Promega, Brasil). Resumidamente, as células da linhagem Ca1 foram plaqueadas na densidade de 9×10^3 por poço e incubadas por 24 horas. No dia seguinte, uma solução de 5-ALA 1mM em meio puro foi preparada e as células foram incubadas por 4 horas. Após este período, as células foram lavadas com PBS e irradiadas com exposições radiantes crescentes (1,5 – 18 J/cm²). Após 24 horas da irradiação, as células foram lavadas duas vezes com 100ul de PBS e foi adicionado 95uL de meio puro contendo 5uL de MTS. Os valores de absorbância foram transformados em porcentagem em relação ao grupo controle. A quantificação da viabilidade celular foi realizada em espectrofotômetro Biotek Synergy HTX no comprimento de onda de 490nm. Foram realizados quatro experimentos independentes em quadruplicata.

A viabilidade celular foi também posteriormente avaliada utilizando-se o Deep Blue Viability Kit (Biolegend). Resumidamente, as células da linhagem Ca1 foram plaqueadas na densidade de 9×10^3 por poço e incubadas por 24 horas. No dia seguinte, uma solução de 5-ALA 1mM em meio puro foi preparada e as células foram incubadas por 4 horas. A seguir, as células foram lavadas com

PBS e irradiadas com 1,5 e 3 J/cm². Após 24h da irradiação, as células foram lavadas com PBS e foram incubadas por 2h com 90uL de meio puro contendo 10% (10uL) de Alamar Blue. Os valores de fluorescência foram transformados em porcentagem em relação ao grupo controle. A quantificação da viabilidade celular foi realizada em espectrofotômetro Biotek Synergy HTX no comprimento de onda de 590nm. Foram realizados quatro experimentos independentes em quadruplicata.

4.14. Avaliação de Morfologia Celular

Para a avaliação da morfologia celular após 0, 3, 6, 12 e 24 h da TFD, as células foram fotografadas e visualizadas em microscópio óptico no aumento de 100x no microscópio Nikon Eclipse.

4.15. Ensaio de citotoxicidade com meio condicionado

A citotoxicidade foi avaliada pelo método de liberação de calceína-AM (descrito anteriormente) utilizando meio DMEMF12 condicionado provindo de células tratadas pela TFD e as células K562 como células alvo.

Em resumo, o meio das células da linhagem Ca1 dos grupos Controle, 5-ALA, LED 3J/cm² e TFD 3J/cm² foi coletado após 12h após a realização da TFD. Posteriormente, as células da linhagem NK92-MI foram incubadas por 24h com o meio condicionado dos diferentes grupos descritos acima e a citotoxicidade foi realizada utilizando-se as proporções de (25:1; 12,5:1; 6,25:1; 3,125:1) de células efetoras (NK92-MI) e alvo (K562).

Como controle, células NK92-MI foram cultivadas como de costume no meio MEM- α , como controle positivo as células NK92-MI foram cultivadas em MEM- α diluído 1:1 no meio de cultura de Ca1 (DMEM/F12).

4.16. Análise Estatística

Para verificar a distribuição dos dados, o teste de normalidade Shapiro-Wilk foi utilizado. Com a confirmação de normalidade de dados a comparação entre os grupos foi realizada pelo teste ANOVA, caso dados coletados não passem pelo teste de normalidade, foi realizado o teste de Kruskal Wallis. Para a comparação entre dois grupos, os dados foram analisados por teste T seguido

de correção de Welch utilizando-se do software GraphPad Prism (Versão 8, Graphpad, USA). O nível de significância utilizado foi de $p<0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. Caracterização da linhagem NK92-MI

A linhagem imortalizada NK92-MI foi inicialmente caracterizada em relação à expressão de CD3/CD56 bem como em relação ao perfil de expressão dos receptores ativadores Nkp30, Nkp44, Nkp46 e DNAM-1, para posterior utilização nos experimentos de citotoxicidade e co-cultura.

No ensaio de citometria de fluxo, primeiramente foi realizada a seleção da população de células baseando-se nos parâmetros SSC e FSC. Em seguida, as células negativas para DAPI (viáveis) foram selecionadas para a posterior avaliação dos marcadores descritos anteriormente. Todos os experimentos de citometria de fluxo foram realizados e padronizados previamente em relação à titulação do anticorpo primário e respectivos controles isotípicos.

Como demonstrado na Figura 10, as células da linhagem NK92-MI apresentam o fenótipo $CD45^+/CD3^-/CD56^+$, confirmado desta maneira, o fenótipo característico das células NK. Em relação à expressão dos receptores ativadores, foi observado que a média de expressão dos receptores Nkp30, Nkp46, NKG2D e DNAM-1 nas células NK92-MI foi 88,45%, 75,3%, 41,02% e 16,95%, respectivamente (Figura 11). O receptor Nkp44, presente somente em células NK ativadas, foi expresso em 59,18% das células.

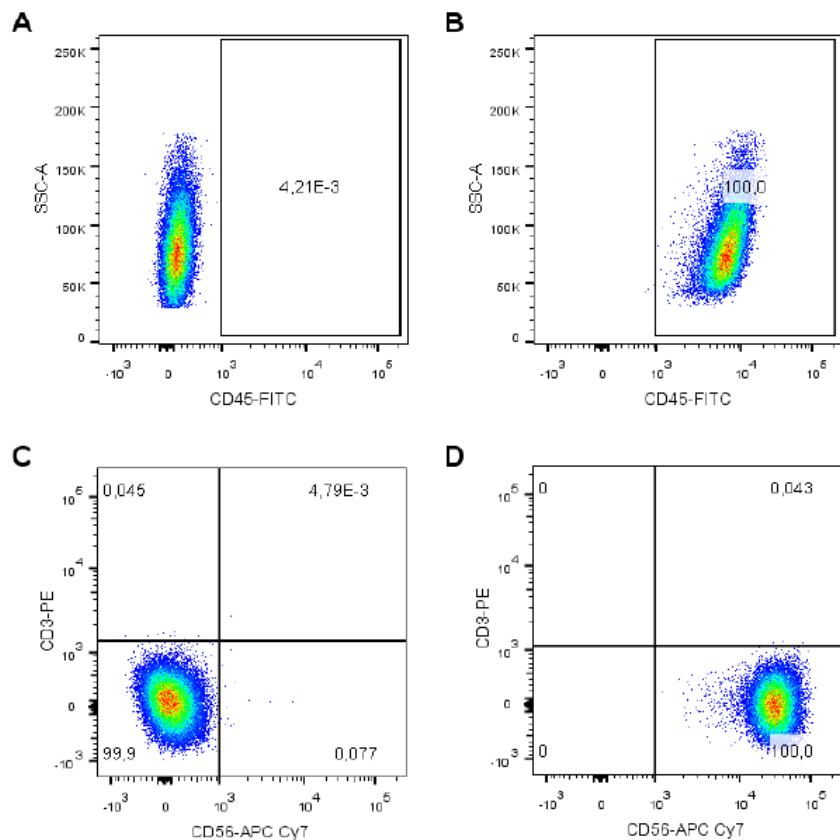


Figura 10: Avaliação do fenótipo da linhagem NK92-MI por citometria de fluxo. **(A)** Controle IgG-FITC na população celular DAPI negativa. **(B)** Identificação das células NK92-MI positivas para CD45. **(C)** Controle isotópico IgG para PE e APC Cy7. **(D)** Identificação da população CD3-/CD56+.

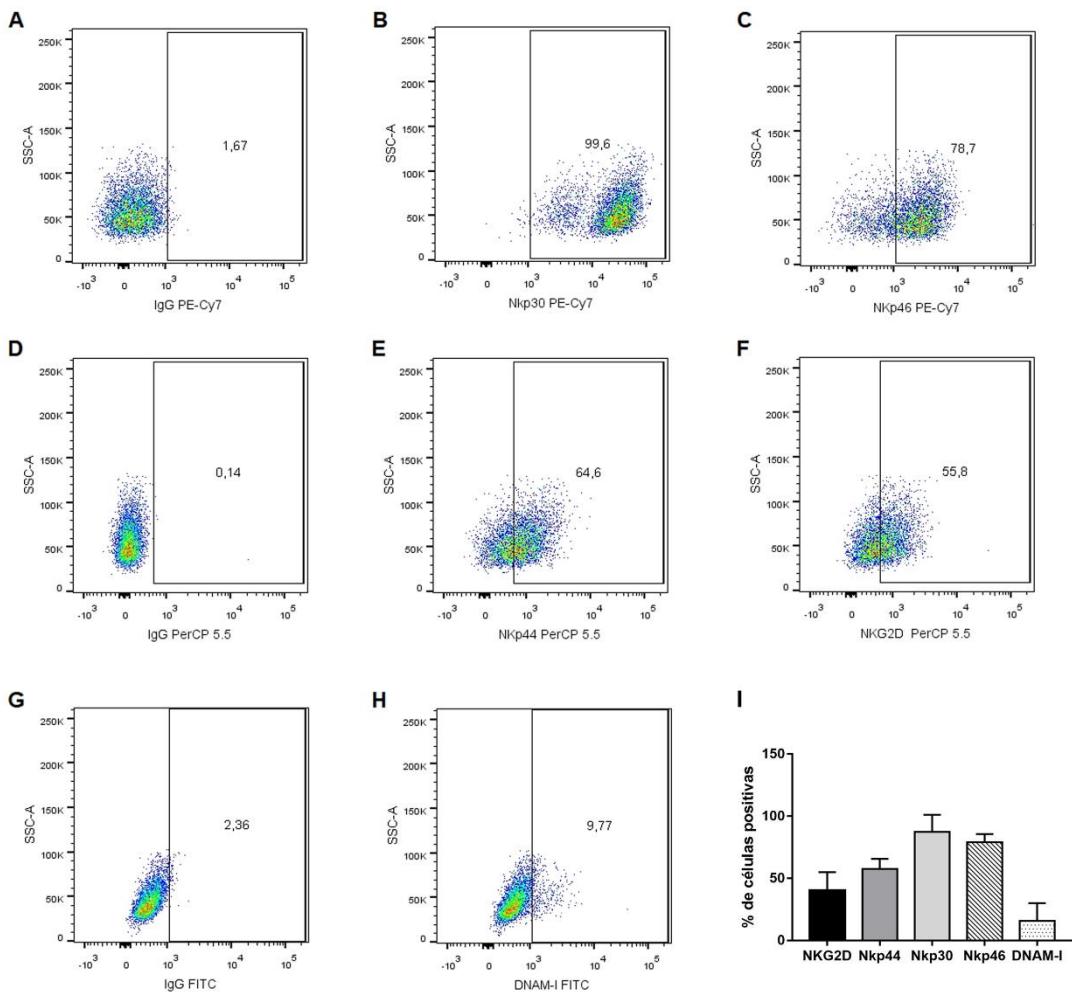


Figura 11: Avaliação da expressão dos receptores ativadores das células NK92-MI. **(A)** Controle IgG PE-Cy7 e **(D)** controle IgG PerCP 5.5 na população celular DAPI negativa. **(B)** Expressão de Nkp30, **(C)** Nkp46, **(E)** Nkp44, **(F)** NKG2D e **(H)** DNAM-I na linhagem NK92-MI. **(I)** Quantificação da porcentagem de células positivas para os marcadores avaliados (resultados representativos de quatro experimentos independentes).

5.2. Caracterização das populações de células-tronco tumorais e células amebóides

Para caracterização das células amebóides, as mesmas foram avaliadas em relação a sua morfologia e expressão de CD44 e ESA para identificação das subpopulações $CD44^{\text{high}}/ESA^{\text{high}}$, $CD44^{\text{high}}/ESA^{\text{low}}$ e $CD44^{\text{low}}$. Como demonstrado na Figura 12, as células amebóides isoladas das linhagens Ca1 e Luc4 são caracterizadas por uma população de células flutuantes, as quais não aderem ao frasco e possuem morfologia oval ou redonda e uma população de células aderidas fracamente ao frasco, uma vez que dispensam a utilização de tripsina. Estas, são caracterizadas por apresentarem protrusões citoplasmáticas na forma de bolhas quando aderidas ao frasco, o que facilita seu deslocamento. Notamos também a presença de células com morfologia fusiforme, as quais representam as células que sofreram transição epitelio-mesenquimal e que irão sofrer a transição mesenquimal-amebóide.

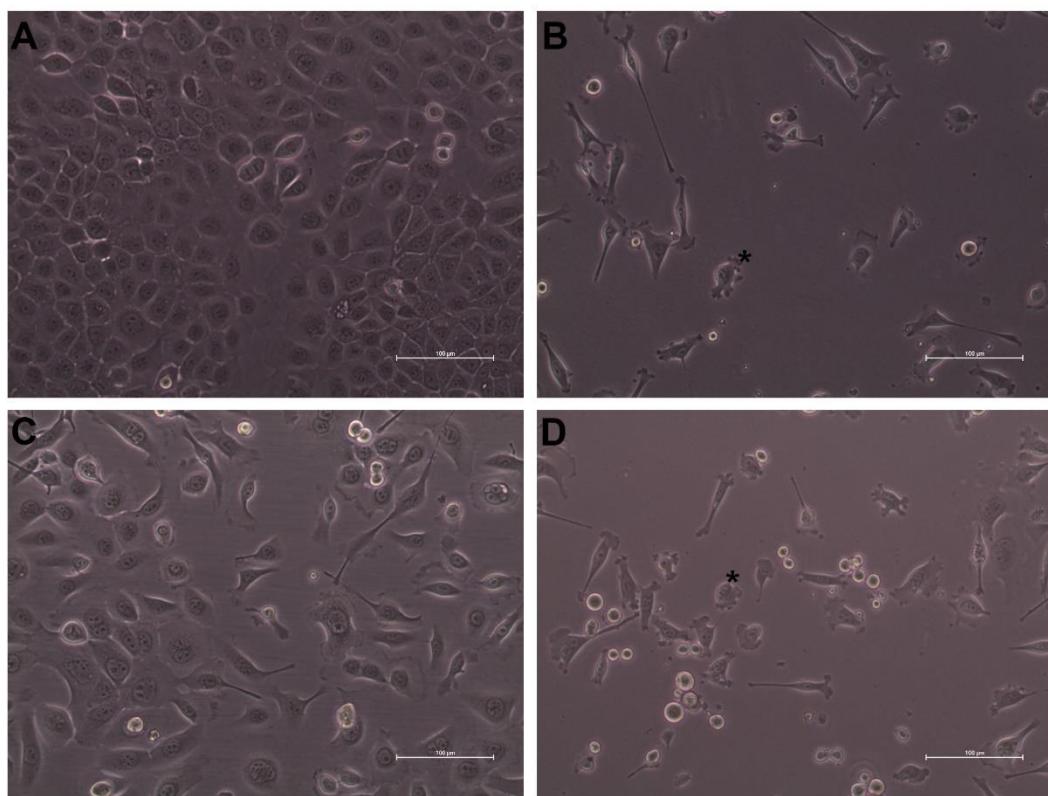


Figura 12: Aspecto morfológico das células das linhagens Ca1 (**A**) e Luc4 (**C**) bem como de suas respectivas populações de células amebóides (**B** e **D**). As células amebóides flutuantes são redondas e refringentes à microscopia de luz e as células amebóides aderidas mostram pequenas protrusões citoplasmáticas na forma de bolhas (asterisco) (aumento 100x).

De acordo com o grupo de pesquisa do Prof. Ian Mackenzie (The Barts and London School of Medicine and Dentistry), as células amebóides apresentam o fenótipo CD44^{high}/ESA^{low} e podem transitar entre o fenótipo amebóide e mesenquimal por meio da transição mesenquimal-amebóide e amebóide-mesenquimal. Desta maneira, para caracterização fenotípica das mesmas, foi realizada citometria de fluxo para avaliação da expressão de CD44 e ESA. Ambas as células amebóides isoladas das linhagens Ca1 e Luc4 foram caracterizadas pelo fenótipo CD44^{high}/ESA^{low} em aproximadamente 100% das células. Quando comparada com a população parental, observamos um aumento significante na porcentagem de células CD44^{high}/ESA^{low} nas células amebóides (Figura 13).

As CTC com morfologia epitelial, caracterizadas pelo fenótipo CD44^{high}/ESA^{low} representam aproximadamente 5% da população tanto na linhagem Ca1 quanto na linhagem Luc4. Já a população de células com morfologia mesenquimal, caracterizadas pelo fenótipo CD44^{high}/ESA^{low} representam 5% e 50% nas linhagens Ca1 e Luc4, respectivamente (Figura 13).

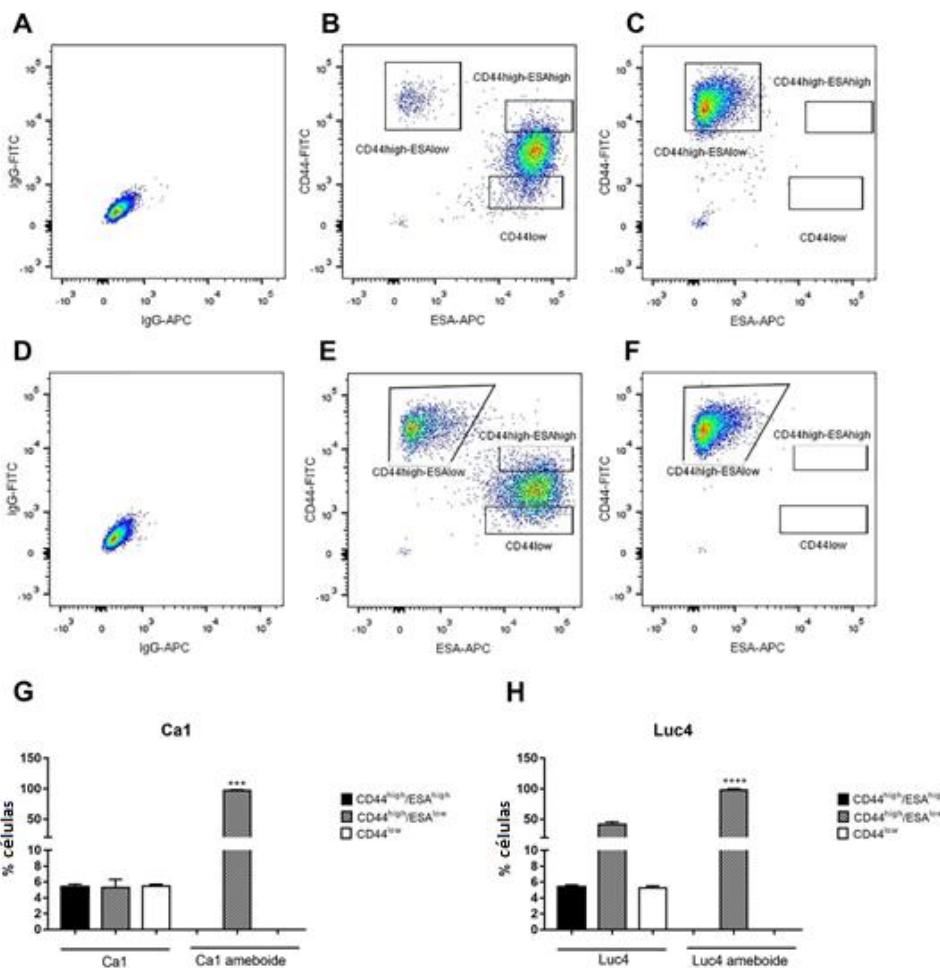


Figura 13: Análise da expressão de CD44 e ESA nas linhagens Ca1 (A-C) e Luc4 (D-F) por citometria de fluxo. (A e D) Controles isotípicos IgG-FITC e IgG-APC. Identificação das subpopulações CD44^{high}/ESA^{high}, CD44^{high}/ESA^{low} e CD44^{low} na linhagem Ca1 parental (B), Ca1 amebóide (C), Luc4 parental (E) e Luc4 amebóide (F). Quantificação da porcentagem das subpopulações das linhagens Ca1 (G) e Luc4 (H). ***p<0,001 e ****p<0,00001 em relação à subpopulação na linhagem parental (Resultado representativo de três experimentos independentes realizados em triplicata).

Dados preliminares e ainda não publicados do Prof. Ian Mackenzie demonstraram que as células amebóides apresentam aumento na expressão dos genes *RTN1* e *HOPX* quando comparado com as células parentais. Assim, células das linhagens Ca1 e Luc4 bem como de suas respectivas populações amebóides, provenientes de três passagens diferentes, foram utilizadas para análise da expressão dos referidos genes. A análise da expressão gênica demonstrou um aumento significante dos níveis de mRNA do gene *RTNX1* nas células amebóides de ambas as linhagens em relação às células parentais (p<0,0001, fold-change 29,05 e 6,06 nas células amebóides das linhagens Ca1 e Luc4, respectivamente) (Figura 14A). Em relação ao gene *HOPX*, somente as

células amebóides da linhagem Luc4 mostraram um aumento significante nos níveis de mRNA quando comparado com as células parentais ($p<0,05$, *fold-change* 1,39) (Figura 14B).

Adicionalmente, a expressão dos genes *CLGB* (Claganulina B) e *CDH1* (E-caderina), associados com a diferenciação e adesão epitelial foi avaliada nas linhagens Ca1 e Luc4 e em suas populações amebóides. Foi observada uma redução significante na expressão de ambos os genes nas células amebóides, indicando perda da diferenciação celular e adesão celular (Figura 14C e 14D).

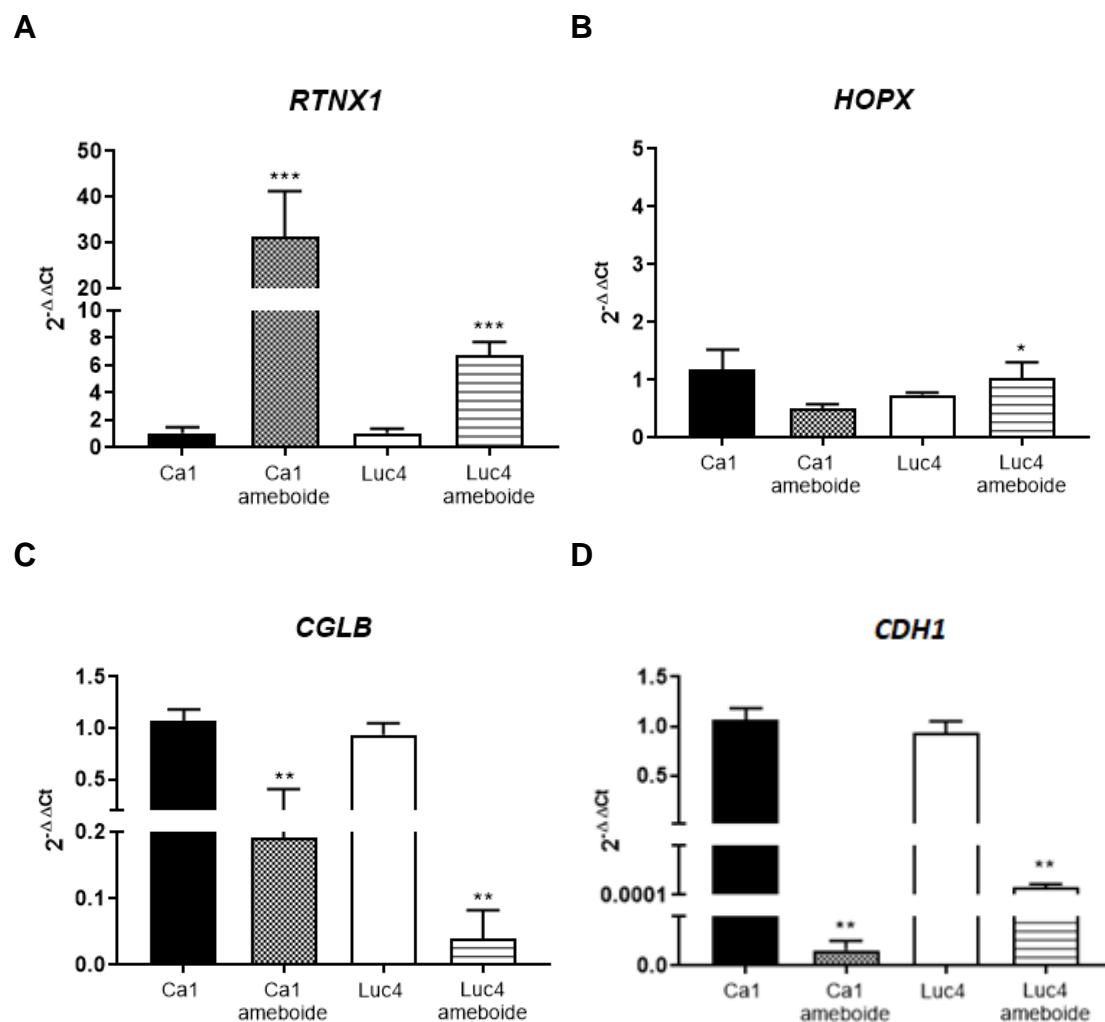


Figura 14: Análise da expressão gênica de *RTNX1* (A), *HOPX* (B), *CLGB* (C) e *CDH1* (D) nas linhagens celulares Ca1 e Luc4 bem como em suas respectivas populações de células amebóides. * $p<0,05$ e ** $p<0,001$.

5.3 Citotoxicidade mediada pelas células NK92-MI

Para avaliar a citotoxicidade das células NK92-MI contra as células das linhagens celulares Ca1 e Luc4 bem como de suas respectivas populações de células amebóides, foi realizado o ensaio de liberação de calceína-AM. Em todos os ensaios, a linhagem K562 foi utilizada como controle positivo, uma vez que não possui MHC classe I.

Em todas as proporções célula efetora:alvo avaliadas, as células amebóides da linhagem Ca1 e Luc4 mostraram maior susceptibilidade à citotoxicidade mediada pelas células NK92-MI, sendo esta semelhante à observada na linhagem K562 (Figura 15). Estes resultados indicam que as células amebóides são mais suscetíveis às células NK92-MI.

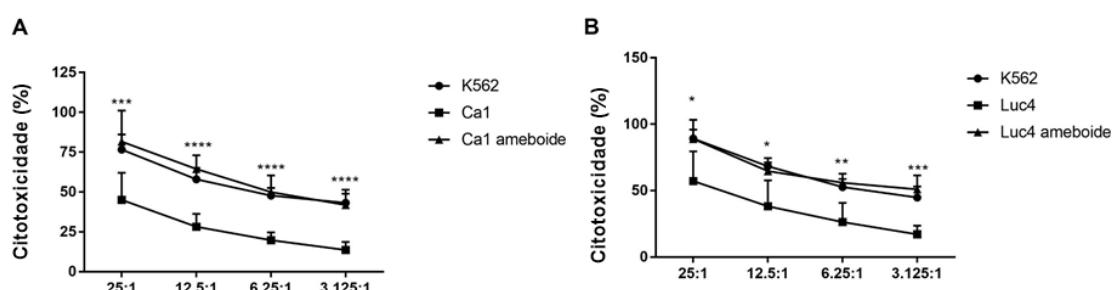


Figura 15: Ensaio de liberação de calceína para avaliação da citotoxicidade das células NK92-MI nas células Ca1 (A) e Luc4 (B) e suas respectivas populações de células amebóides. As células da linhagem K562 foram utilizadas como controle positivo. *p<0,05, **p<0,001 e ***p<0,0001.

Como demonstrado na Figura 16, o meio condicionado de ambas as linhagens tumorais foi capaz de inibir significantemente a citotoxicidade das células NK92-MI, mesmo na proporção 25:1 (célula efetora:célula alvo).

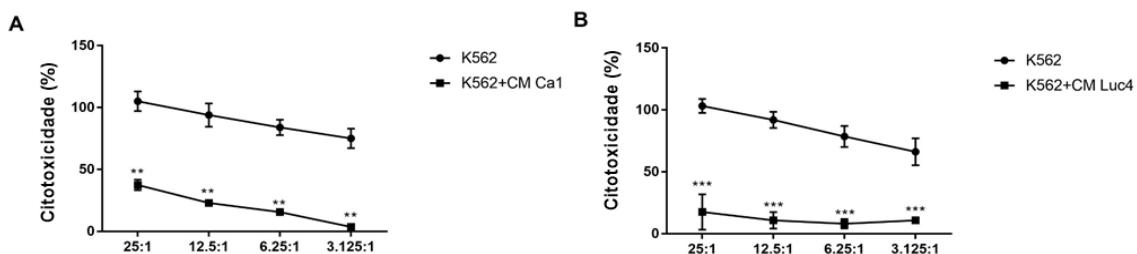


Figura 16: Ensaio de liberação de calceína-AM para avaliação da citotoxicidade das células NK92-MI na linhagem K562 cultivadas com o meio condicionado da linhagem Ca1 (A) e Luc4 (B). **p<0,001 e ***p<0,0001.

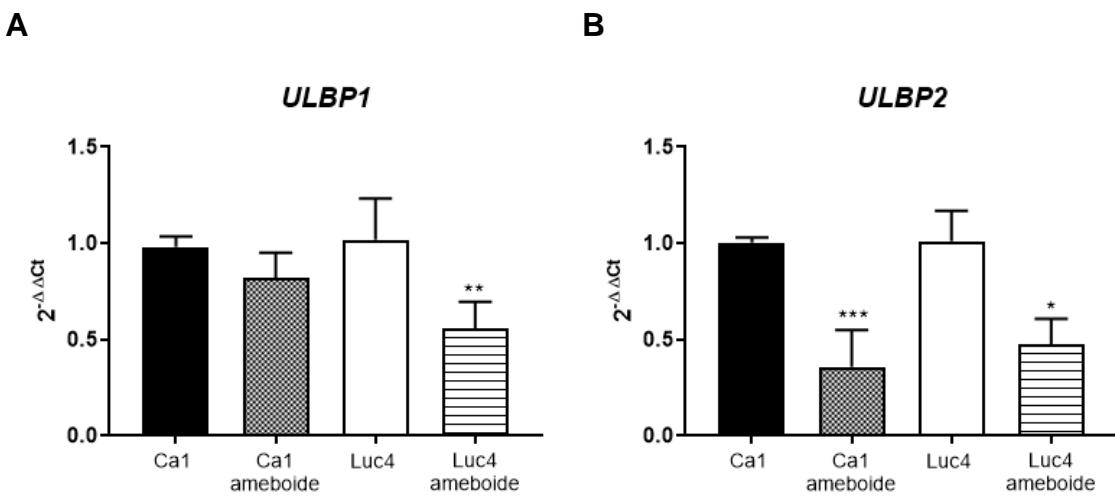
5.4 Análise da expressão de ligantes para NKG2D e HLA-ABC nas linhagens celulares Ca1 e Luc4 e suas respectivas populações de células amebóides

Para avaliar se a maior susceptibilidade das células amebóides às células NK92-MI se deve à maior expressão de ligantes para NKG2D, um dos receptores de ativação das células NK92-MI, a expressão gênica dos ligantes *ULBP1*, *ULBP2*, *ULBP3* e *ULBP4* foi avaliada por RT-qPCR (Figura 16) e a expressão de MICA/B e HLA-ABC por citometria de fluxo.

Foi observada uma redução significante da expressão do gene *ULBP1* somente nas células amebóides da linhagem Luc4 quando comparada com as células parentais (Figura 17A).

Adicionalmente, os genes *ULBP2* e *ULBP4* também mostraram menores níveis de mRNA nas células amebóides das linhagens Ca1 e Luc4 em relação às células parentais (Figura 17B e 17D). Não foi observada alteração na expressão do gene *ULBP3* em ambas as linhagens quando comparada com as células amebóides.

Em conjunto, estes resultados demonstram que a maior susceptibilidade das células amebóides às células NK92-MI não ocorre por meio da superexpressão dos genes *ULBP1*, *ULBP2*, *ULBP3* e *ULBP4*.



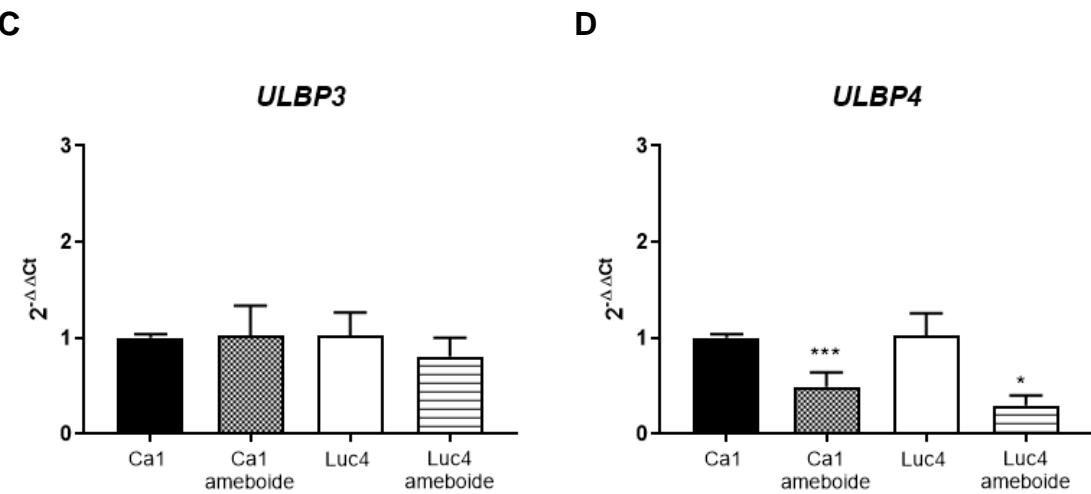


Figura 17: Análise da expressão dos genes *ULBP1* (A), *ULBP2* (B), *ULBP3* (C) e *ULBP4* (D) por RT-qPCR nas células das linhagens Ca1 e Luc4 bem como em suas respectivas populações de células amebóides. * $p<0,05$, ** $p <0,001$ e *** $p<0,0001$.

Como um dos mecanismos de ativação das células NK92-MI ocorre na ausência de HLA-ABC (MHC classe I clássico), a expressão desta molécula foi avaliada por citometria de fluxo nas subpopulações $CD44^{\text{high}}/\text{ESA}^{\text{high}}$, $CD44^{\text{high}}/\text{ESA}^{\text{low}}$ e $CD44^{\text{low}}$ bem como nas células amebóides das linhagens Ca1 e Luc4 (Figura 18A-F).

Foi observada uma redução significante da porcentagem de células positivas para HLA-ABC bem como na intensidade de fluorescência para este marcador nas células amebóides de ambas as linhagens quando comparado com a população parental, indicando um possível mecanismo envolvido na maior susceptibilidade das mesmas às células NK92-MI (Figura 18G e 18H).

Adicionalmente, notamos que as células $CD44^{\text{high}}/\text{ESA}^{\text{low}}$ da linhagem Ca1 e Luc4 mostraram menor expressão de HLA-ABC em relação à população $CD44^{\text{high}}/\text{ESA}^{\text{high}}$ e desta maneira, são mais susceptíveis às células NK92-MI (Figura 18I). Na linhagem Ca1, também foi observada uma menor porcentagem de células positivas para HLA-ABC na população $CD44^{\text{low}}$ quando comparado à população $CD44^{\text{high}}/\text{ESA}^{\text{high}}$.

Nas células amebóides das linhagens Ca1 e Luc4, foi observado aumento da porcentagem de células positivas para MICA/B, indicando que além da menor expressão de HLA-ABC, o aumento da expressão deste ligante para NKG2D pode estar envolvido na maior susceptibilidade das células amebóides às células NK92-MI (Figura 18J).

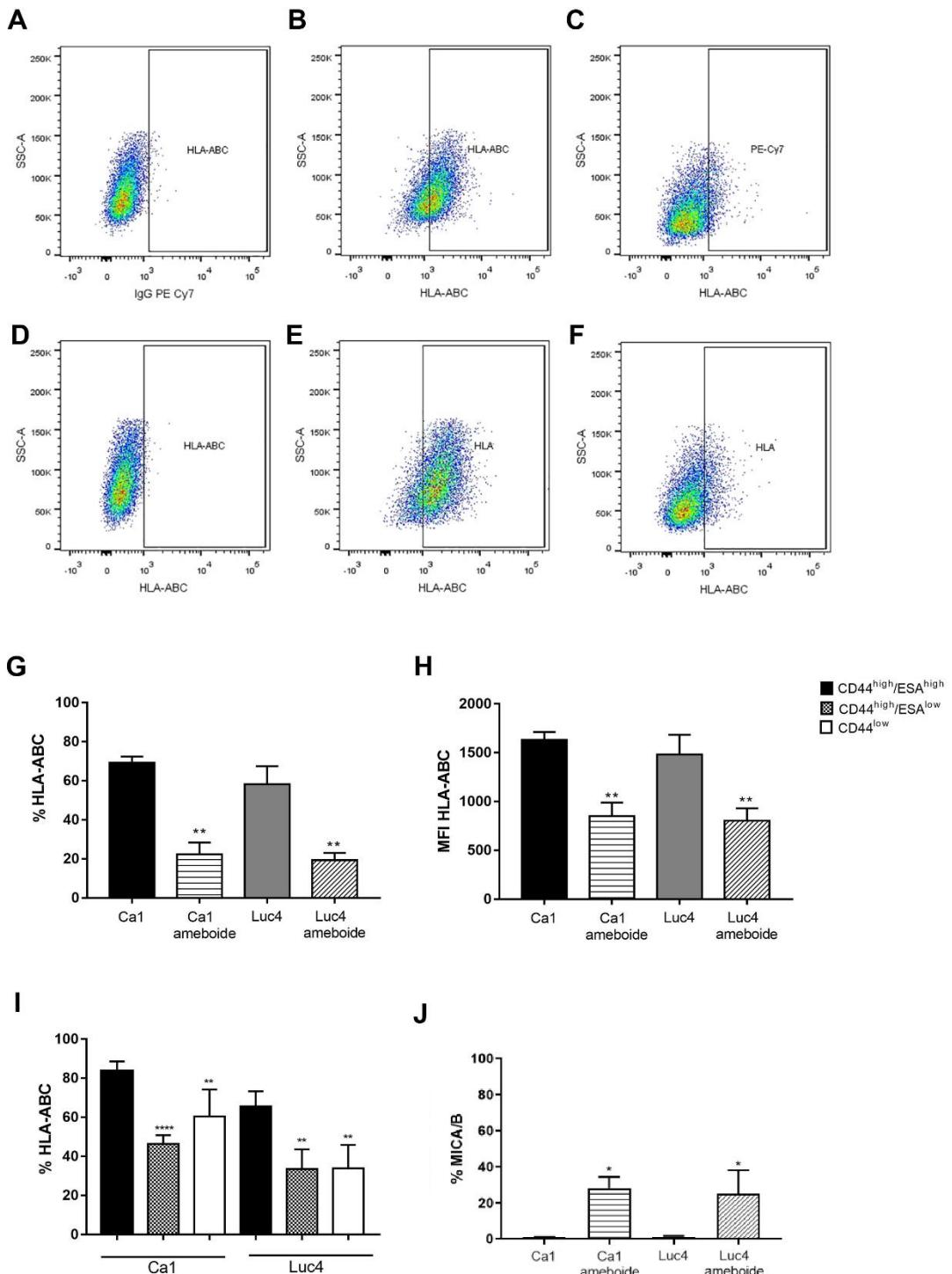


Figura 18: Análise da expressão de HLA-ABC e MICA/B por citometria de fluxo. **(A)** e **(D)** controles isotípicos para HLA-ABC PECy7, **(B)** Ca1, **(C)** Ca1 amebóide, **(E)** Luc4, **(F)** Luc4 amebóide nas linhagens Ca1 e Luc4. **(G)** Quantificação da porcentagem de células positivas e **(H)** intensidade de fluorescência para HLA-ABC nas linhagens Ca1 e Luc4 e suas respectivas populações de células amebóides. **(I)** Quantificação da porcentagem de células positivas para HLA-ABC dentro das subpopulações CD44^{high}/ESA^{high}, CD44^{high}/ESA^{low} e CD44^{low} de ambas as linhagens. **(J)** Quantificação da porcentagem de células positivas para MICA/B. * $p<0,05$, ** $p<0,001$ e *** $p<0,0001$.

5.5 Co-cultivo das linhagens celulares Ca1 e Luc4 com as células NK92-MI

Para a realização dos ensaios de co-cultivo, primeiramente, as células das linhagens Ca1 e Luc4 foram incubadas com as células NK92-MI em diferentes proporções e posteriormente foram avaliadas em relação ao aspecto morfológico nos períodos de 4h e 24h. Selecionamos os referidos períodos baseando-se no ensaio de citotoxicidade (4h) e em estudos da literatura.

Na linhagem Ca1, após 4h de co-cultivo, foi observada uma redução no número de células e alteração morfológica da linhagem Ca1 quando foi cultivada com as células NK92-MI nas proporções 6:1 e 12:1, sendo mais evidente nesta última. Notamos perda de adesão entre as células, presença de células com tamanho reduzido bem como de restos celulares, indicando morte celular por apoptose e necrose. Vale ressaltar que estas alterações foram mais pronunciadas no período de 24h (Figura 19).

Desta maneira, selecionamos a proporção 6:1 após 4h de co-cultivo para os ensaios de citometria de fluxo e análise das subpopulações $CD44^{\text{high}}/\text{ESA}^{\text{high}}$, $CD44^{\text{high}}/\text{ESA}^{\text{low}}$ e $CD44^{\text{low}}$, colônias e esfera.

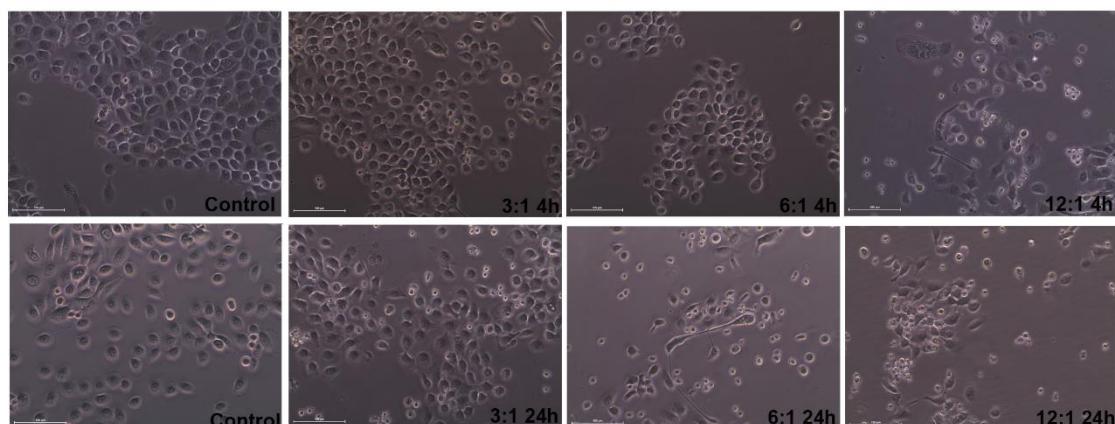


Figura 19: Aspecto morfológico da linhagem Ca1 cultivada em diferentes proporções com as células NK92-MI por 4h e 24h (aumento 100X).

Na linhagem Luc4, foi possível observar células viáveis somente após 4h de co-cultivo, sendo que no período de 24h, todas as células tumorais morreram na presença das células NK92-MI, independente da proporção utilizada. Na Figura 19 podemos observar que as células da linhagem Luc4 são mais sensíveis às células NK92-MI, uma vez que as mesmas alterações morfológicas observadas na Ca1 foram notadas a partir da proporção 3:1 na linhagem Luc4, sendo bastante pronunciadas na proporção 6:1. Desta maneira, selecionamos a proporção 6:1 e

período de 4h de co-cultivo para a realização dos ensaios de formação de colônias e esferas.

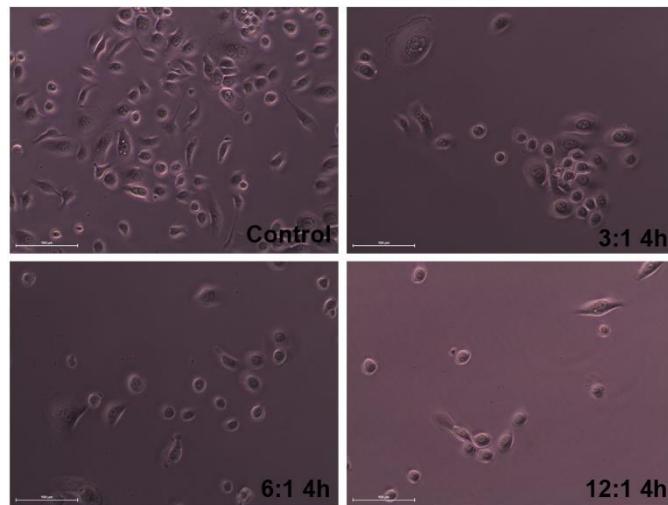


Figura 20: Aspecto morfológico da linhagem Luc4 cultivada em diferentes proporções com as células NK92-MI por 4h (aumento 100X).

5.6 Análise das subpopulações $CD44^{\text{high}}/\text{ESA}^{\text{high}}$, $CD44^{\text{high}}/\text{ESA}^{\text{low}}$ e $CD44^{\text{low}}$ da linhagem Ca1 após o co-cultivo com as células NK92-MI

Para avaliação das subpopulações $CD44^{\text{high}}/\text{ESA}^{\text{high}}$, $CD44^{\text{high}}/\text{ESA}^{\text{low}}$ e $CD44^{\text{low}}$ na linhagem Ca1 após o co-cultivo com as células NK92-MI, as mesmas foram co-cultivadas por 4h e em seguida, submetidas à análise da expressão de CD44 e ESA por citometria de fluxo.

Inicialmente avaliamos a porcentagem de células mortas após o co-cultivo, indicada pela positividade para DAPI. Como demonstrado na Figura 21, houve um aumento significante na porcentagem de células mortas após 4h de co-cultivo com as células NK92-MI.

Para avaliação da expressão de CD44 e ESA nas células da linhagem Ca1, as células positivas para DAPI foram excluídas. Desta maneira, notamos que na presença das células NK92-MI, houve uma redução significante das subpopulações $CD44^{\text{high}}/\text{ESA}^{\text{high}}$ e $CD44^{\text{high}}/\text{ESA}^{\text{low}}$, demonstrando que as células NK92-MI preferencialmente têm como alvo as células com fenótipo tronco. Adicionalmente, foi observado que a diminuição da população $CD44^{\text{high}}/\text{ESA}^{\text{high}}$ foi acompanhada por um aumento na porcentagem das células $CD44^{\text{low}}$, indicando

que as células NK92-MI induzem a diferenciação das células da linhagem Ca1 (Figura 21).

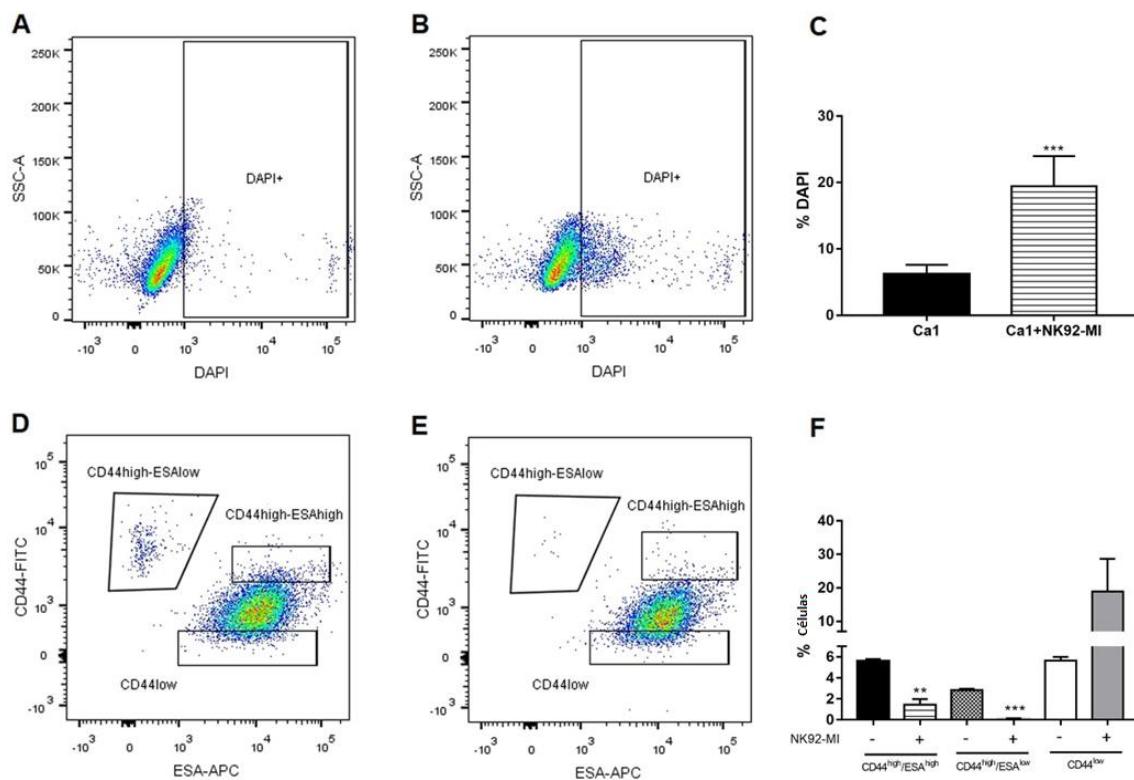


Figura 21: Análise da porcentagem de células mortas (positivas para DAPI) e expressão de CD44 e ESA na linhagem Ca1 após 4h do co-cultivo com as células NK92-MI. **(A)** Ca1, **(B)** Ca1+NK92-MI e **(C)** quantificação da porcentagem de células mortas. **(D)** Identificação das subpopulações CD44^{high}/ESA^{high}, CD44^{high}/ESA^{low} e CD44^{low} na linhagem Ca1 e após o co-cultivo com as células NK92-MI **(E)**. Quantificação das subpopulações após o co-cultivo. **p<0,001 e ***p<0,0001.

5.7 Análise do potencial clonogênico e capacidade de formação de esferas das linhagens Ca1 e Luc4 após o co-cultivo com as células NK92-MI

Após o co-cultivo das linhagens Ca1 e Luc4 por 24h e 4h, respectivamente, com as células NK92-MI, foi avaliada a capacidade clonogênica das células tumorais por meio do ensaio de formação de colônias e a capacidade de formação de esferas.

Estudos prévios já demonstraram que a capacidade clonogênica está diretamente associada com a presença das CTC com fenótipo CD44^{high}/ESA^{high} e a capacidade de crescer e formar esferas tumorais está associado com as CTC de fenótipo mesenquimal, caracterizado pelo perfil CD44^{high}/ESA^{low} (21, 31).

Assim, corroborando com os achados obtidos na citometria de fluxo para a linhagem Ca1, foi observada uma redução significante no número de colônias bem como no número de esferas tumorais após o co-cultivo com as células NK92-MI (Figura 22).

Estes resultados demonstram que a diminuição na porcentagem das populações CD44^{high}/ESA^{high} e CD44^{high}/ESA^{low} foi acompanhado por uma diminuição funcional das propriedades de células-tronco na linhagem Ca1. Redução na capacidade de formação de colônias e esferas tumorais também foi observada na linhagem Luc4 após o co-cultivo com as células NK92-MI (Figura 22).

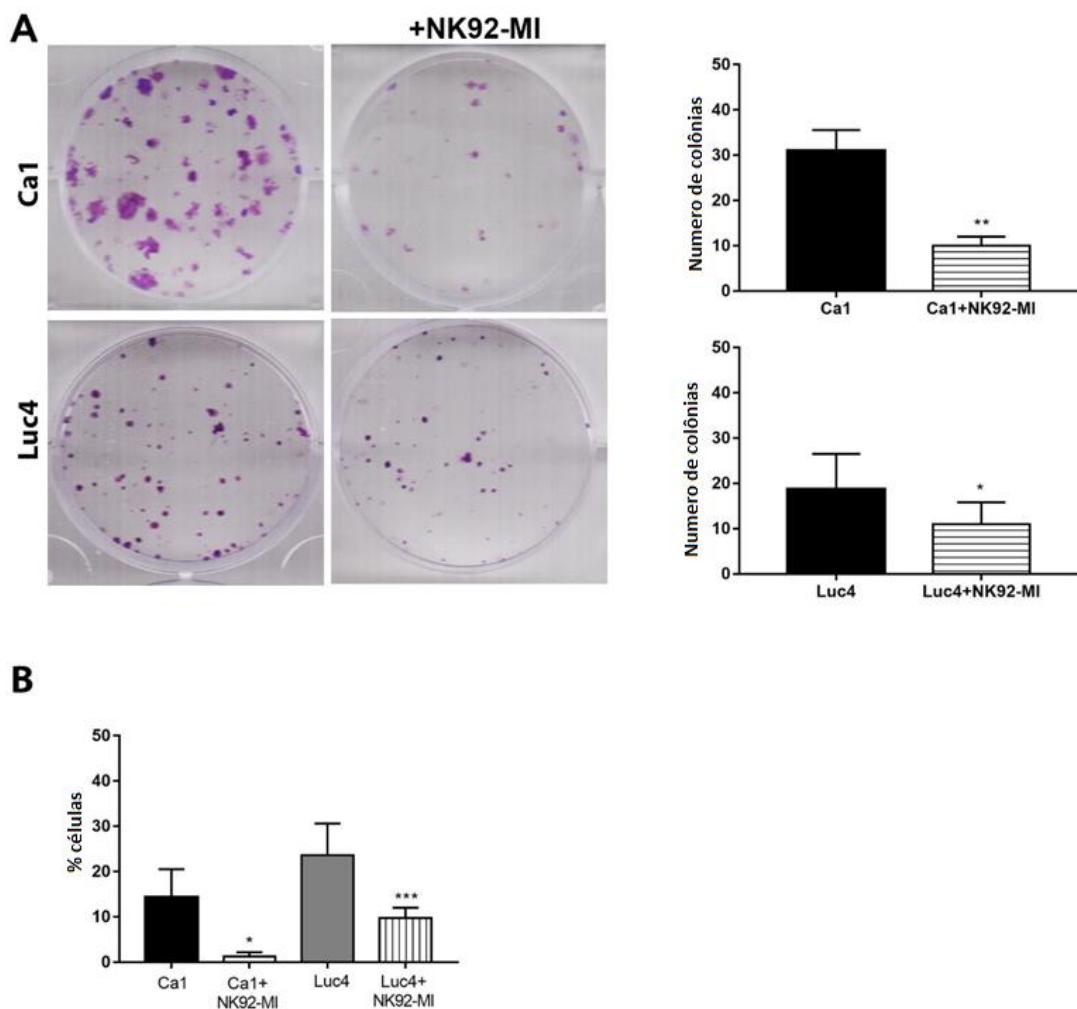


Figura 22: (A) Análise da formação do número de colônias e (B) esferas nas linhagens Ca1 e Luc4 após o co-cultivo com as células NK92-MI por 24h e 4h, respectivamente. * $p<0,05$, ** $p<0,001$ e *** $p<0,0001$.

5.8. Avaliação da viabilidade e morfologia celular após a TFD

Para avaliar a efetividade do ácido aminolevulinico (5-ALA) sob as células tumorais, realizamos uma curva de viabilidade com diferentes exposições radiantes a fim de identificar uma subdose para avaliar o efeito da TFD na susceptibilidade das células tumorais às células NK92-MI (65, 95). A linhagem tumoral Ca1 foi selecionada para os experimentos com a TFD uma vez que foi menos resposiva às células NK92-MI.

Conforme resultados obtidos em trabalhos prévios do grupo, o 5-ALA foi utilizado na concentração de 1mM e a exposição radiante variou de 1,5 a 18J/cm². Não houve diferença estatística significante entre o grupo Controle e 5-ALA. O grupo LED 3J/cm² apresentou menor viabilidade celular em relação aos grupos Controle e 5-ALA ($p=0,0006$ e $p=0,0183$, respectivamente). Em relação aos grupos TFD, a viabilidade celular diminuiu significantemente em todas as energias avaliadas quando comparado com os grupos Controle e 5-ALA ($p<0.0001$), de maneira proporcional ao aumento da exposição radiante, com exceção do grupo 9J/cm² (Figura 23).

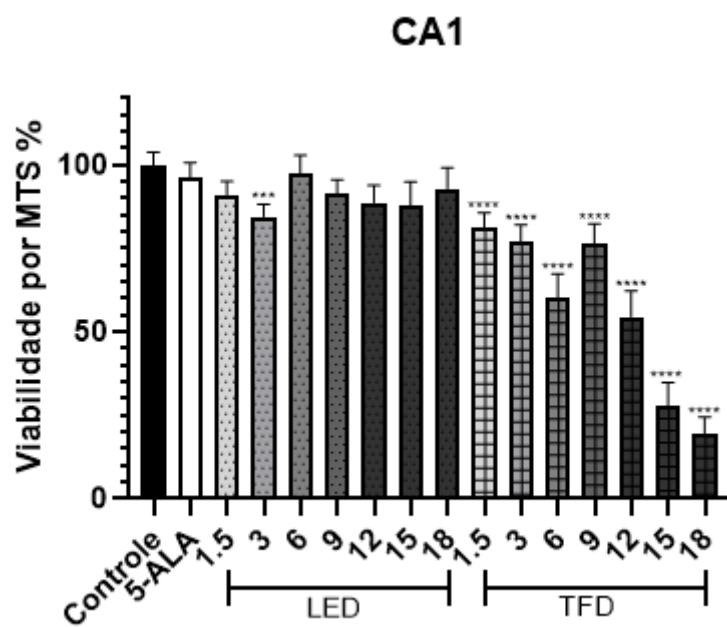


Figura 23: Curva de viabilidade de densidades de energia crescentes de células tratadas com LED e TFD pelo ensaio MTS. Dados coletados em quatro experimentos independentes. *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ em relação ao controle.

Analizando a morfologia celular 24 horas após a TFD, apenas os grupos 1,5, 3 e 6J/cm^2 apresentaram células com morfologia preservada (Figura 24). Nos grupos 12, 15 e 18J/cm^2 , as células apresentaram perda de adesão celular, ausência de núcleo e sinais evidentes de morte por necrose e apoptose. Uma vez que a literatura indica efeito benéfico da TFD nas células NK com sub-dose de tratamento (95), a irradiação com 1,5 e 3J/cm^2 foram selecionadas para a realização dos demais experimentos.

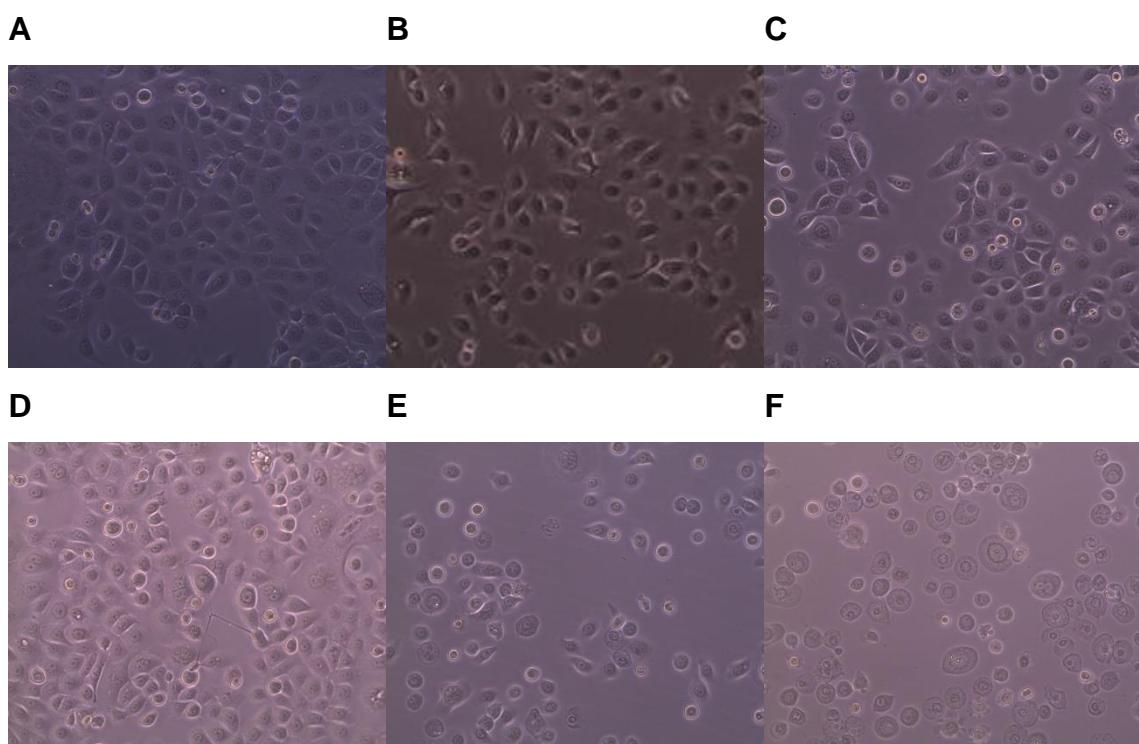


Figura 24: Figuras representativas da morfologia das células da linhagem Ca1 nos grupos Controle (A), TFD 1.5J/cm^2 (B), TFD 3J/cm^2 (C), TFD 6J/cm^2 (D), TFD 9J/cm^2 (E) e TFD 12J/cm^2 (F), 24 horas após a TFD.

5.9. Citotoxicidade das células NK92-MI após a TFD

A citotoxicidade das células NK92-MI foi avaliada após 24h na linhagem Ca1 dos grupos Controle, 5-ALA, LED 1,5J/cm², LED 3J/cm², TFD 1,5J/cm² e TFD 3J/cm² e ainda, após 12h nos grupos Controle, 5-ALA, LED 3J/cm² e TFD 3J/cm². Como demonstrado na Figura 25 a TFD não foi capaz de aumentar a susceptibilidade da linhagem Ca1 à citotoxicidade das células NK92-MI em nenhum dos parâmetros e períodos avaliados.

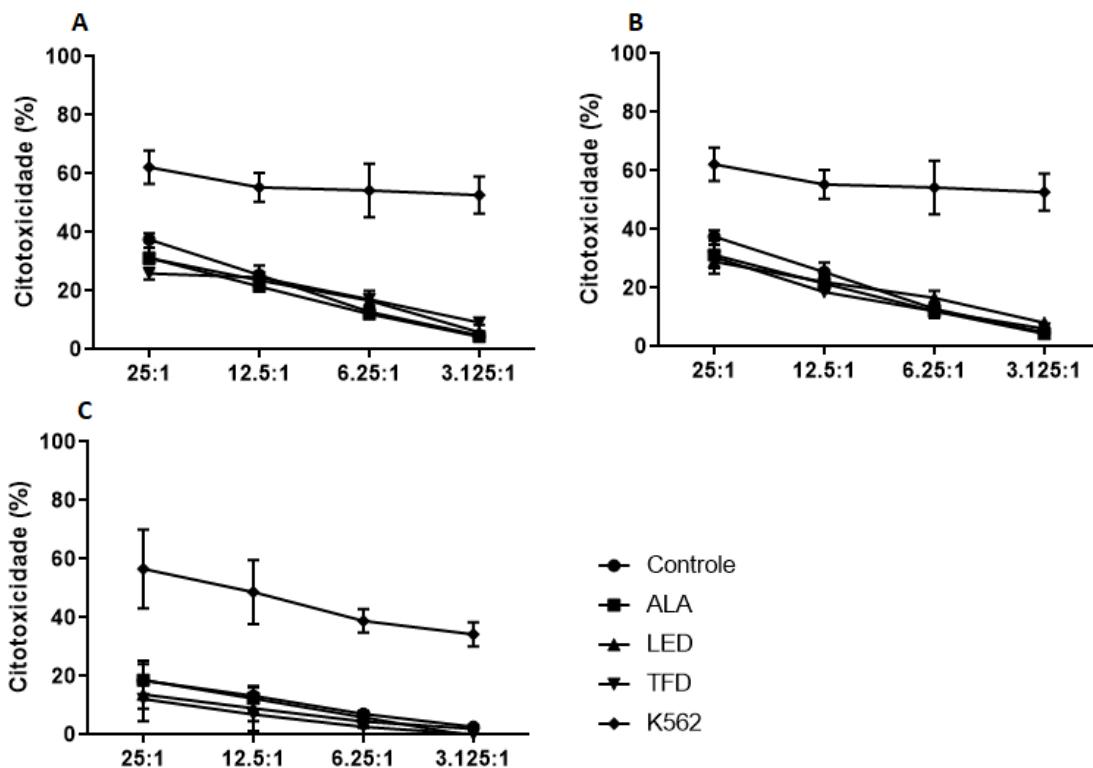


Figura 25: Ensaio de liberação de calceína-AM para avaliar a citotoxicidade de células NK92-MI na linhagem Ca1 24 horas após TFD nos grupos Controle, 5-ALA, LED 1,5J/cm² e TFD 1,5J/cm² **(A)**, nos grupos Controle, 5-ALA, LED 3J/cm² e TFD 3J/cm² **(B)** e após 12 horas nos grupos Controle, 5-ALA, LED 3J/cm² e TFD 3J/cm² **(C)**.

5.10. Expressão de CD44 e ESA e HLA-ABC após a TFD no CEO

Para avaliar o efeito da TFD com sub-doses de irradiação nas subpopulações de CTC, foi realizada citometria de fluxo para avaliação da expressão de CD44 e ESA. Como demonstrado na Figura 26, não houve diferença significante na porcentagem de células CD44^{high}/ESA^{high},

CD44^{high}/ESA^{low}, CD44^{low} nos grupos Controle, 5-ALA, LED 1,5J/cm², LED 3J/cm², TFD 1,5J/cm², TFD 3J/cm².

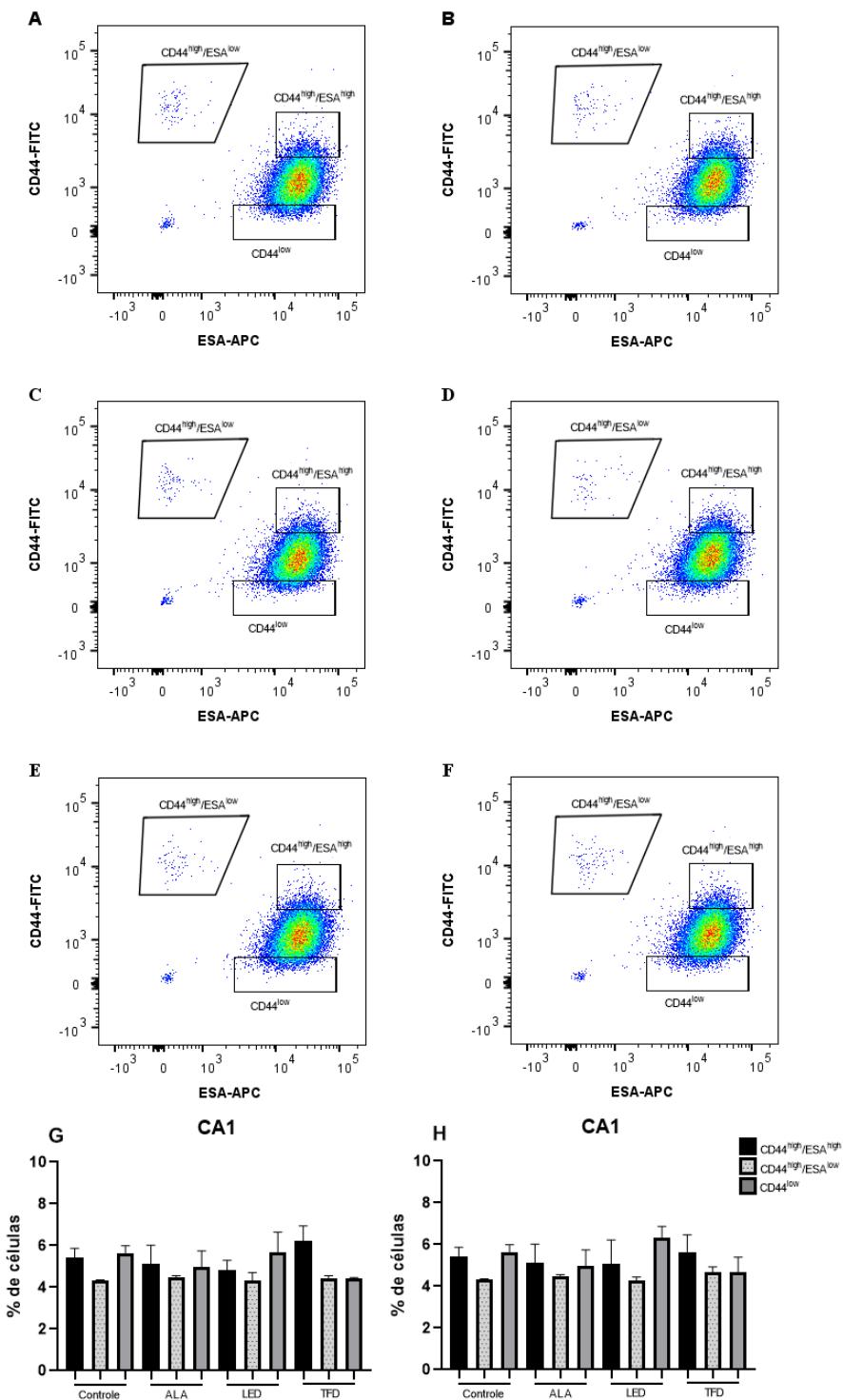


Figura 26: Análise da expressão de CD44 e ESA por citometria de fluxo 24 horas após a TFD nos grupos Controle (A) ALA (B) LED 1,5J/cm² (C) LED 3J/cm² (D) TFD 1,5J/cm² (E) TFD 3J/cm² (F). Quantificação da porcentagem de células positivas para os fenótipos

$CD44^{\text{high}}/\text{ESA}^{\text{high}}$, $CD44^{\text{high}}/\text{ESA}^{\text{low}}$ e $CD44^{\text{low}}$ com o parâmetro de irradiação $1,5\text{J}/\text{cm}^2$ (G) e $3\text{J}/\text{cm}^2$ (H).

A expressão de HLA-ABC foi também avaliada por citometria de fluxo para analisar se a TFD, com os parâmetros selecionados poderiam promover a redução da expressão desta molécula, o que poderia aumentar a susceptibilidade das células da linhagem Ca1 às células NK92-MI(95, 100). Entretanto, não foi observada alteração da expressão de HLA-ABC nos grupos 5-ALA, LED $1,5\text{J}/\text{cm}^2$, LED $3\text{J}/\text{cm}^2$, TFD $1,5\text{J}/\text{cm}^2$, TFD $3\text{J}/\text{cm}^2$ após a TFD em comparação ao controle.

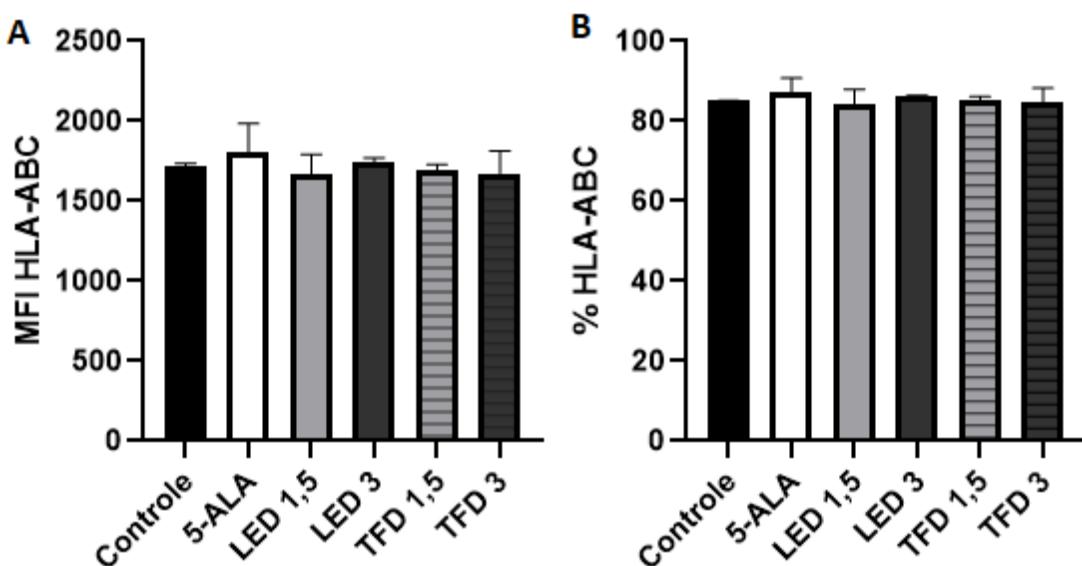


Figura 27: Intensidade de fluorescência (A) e quantificação da porcentagem de células positivas e para HLA-ABC (B) na linhagem Ca1 nos grupos Controle, 5-ALA, LED $1,5\text{J}/\text{cm}^2$, LED $3\text{J}/\text{cm}^2$, TFD $1,5\text{J}/\text{cm}^2$, TFD $3\text{J}/\text{cm}^2$ após a TFD em comparação ao controle.

5.11 Citotoxicidade após cultivo das células NK92-MI com meio condicionado da linhagem Ca1 submetido à TFD.

Uma vez que não foi observado efeito direto da TFD em relação à citotoxicidade mediada pelas células NK92-MI, decidimos avaliar se moléculas secretadas pelas células tumorais após a TFD poderiam influenciar a citotoxicidade das células NK92-MI, uma vez que alguns estudos demonstraram

que moléculas como IL-6 (73), TNF- α (79), INF- γ (80) podem ser liberadas após a TFD e ativar a resposta imunológica.

Desta maneira, o meio condicionado das células da linhagem Ca1 submetidas à TFD foi coletado após 12h da terapia. Em seguida, as células NK92-MI foram incubadas por 12h com o meio condicionado e submetidas ao ensaio de citotoxicidade utilizando-se a linhagem K562 como alvo. Como demonstrado na Figura 28, o meio condicionado das células da linhagem Ca1 dos grupos Controle, ALA, LED 3J/cm 2 , TFD 3J/cm 2 não alterou a citotoxicidade das células NK92-MI quando diluído na proporção 1:1 quando comparados com o grupo controle (MEM- α puro) e controle positivo (MEM- α diluído 1:1 com DMEM/F12).

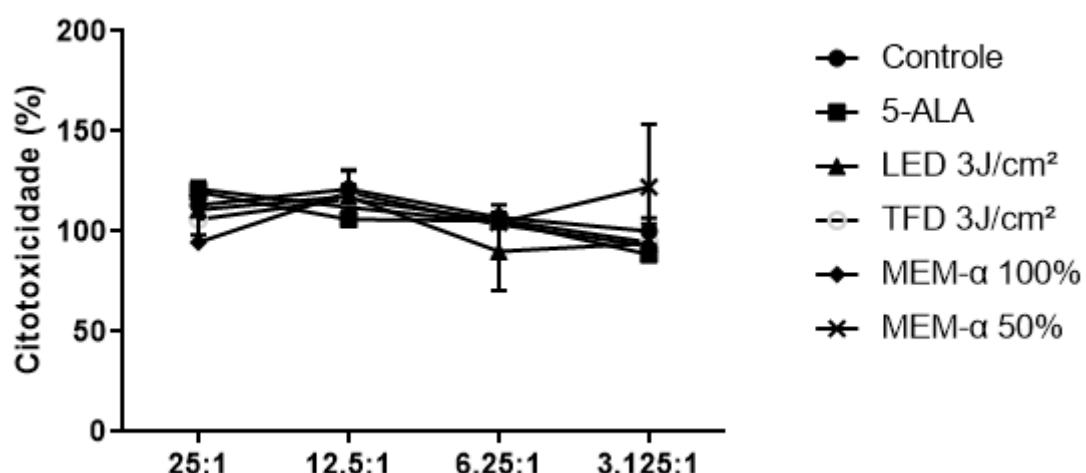


Figura 28: Ensaio de liberação de calceína-AM para avaliar a citotoxicidade de células NK92-MI cultivadas por 24 horas no meio condicionado da linhagem Ca1 dos grupos Controle, 5-ALA, LED 3J/cm 2 , TFD 3J/cm 2 , MEM- α 100% e 50%.

6. DISCUSSÃO

A linhagem NK92-MI caracteriza-se pelo fenótipo CD45+/CD3-/CD56+, apresentou-se apta ao reconhecimento de seu alvo por expressão positiva de receptores ativadores NKG2D, NKp30, NKp44, NKp46 bem como foi capaz de eliminar células derivadas de CEO nos ensaios de citotoxicidade e co-cultivo. As células das linhagens Ca1 e Luc4 apresentaram três diferentes subpopulações; CD44^{high}/ESA^{high}, CD44^{high}/ESA^{low} e CD44^{low}, sendo a população ameboide definida em sua totalidade por CD44^{high}/ESA^{low}. A população ameboide apresentou-se mais sensibilizada à citotoxicidade de NK92-MI, que pode ocorrer por meio do aumento de MICA/B em relação às populações parentais. A expressão genética de ligantes *ULBP1*, *ULBP2*, *ULBP3* e *ULBP4* variou entre as subpopulações, a subpopulação ameboide apresenta redução de *ULBPs*, HLA e aumento de MICA/B. A curva de viabilidade após TFD demonstra crescente morte celular com o aumento do tempo de exposição. A associação de TFD com células NK92-MI não promoveu maior citotoxicidade no alvo.

Neste trabalho procuramos avaliar a ação das células *Natural Killer* no CEO, iniciando pela caracterização das linhagens abordadas no estudo, uma vez que as células NK podem assumir diferentes funções de forma dependente de seu fenótipo ativo (84). As células NK92-MI são células NK derivadas de um tumor de linfoma não-Hodgkin autossuficientes de IL-2, utilizadas frequentemente pela literatura para avaliar o efeito de células NK ativadas frente à célula alvo sendo a linhagem K562, derivada de leucemia mieloide crônica, um alvo padronizado (92).

Esta linhagem foi proposta como uma linhagem capaz de atuar de forma similar à células NK de origem primárias, apresentando os mesmos mecanismos de citotoxicidade bem como uma vantagem de ser facilmente expandida in-vitro, possibilitando seu uso para a imunoterapia adoptiva e combinações terapêuticas (101), além do mais, a imunoterapia adoptiva de células NK possibilita maior controle local e à distância, contribuindo para um melhor prognóstico (102).

Após a realização da citometria de fluxo, observamos que as células NK92-MI apresentam o fenótipo característico CD45+/CD3-/CD56+, este

resultado nos aponta que as células se apresentam em um estado maturado (CD56⁺), purificado de células T (CD3⁻) o que vai de acordo com a literatura presente (84, 103). Em continuidade observamos que a linhagem NK92-MI apresenta expressão de receptores ativadores NKG2D, NKp30, NKp44, NKp46 e DNAM-1.

O receptor NKG2D atua no reconhecimento de ligantes MICA/B (MHC-I) e subsequentemente no reconhecimento das ULBPs, sendo estes ligantes elevados sob condições de stress, infecção e tumorigênese, ao reconhecer a superexpressão de seus ligantes, NKG2D atua diretamente na ativação da capacidade citotóxica de NK (104). Os receptores de citotoxicidade natural NKp30, NKp44, NKp46 são fundamentais para a ação de NK por atuarem de forma complementar ou sinérgica à NKG2D (105), dos quais NKp46 participa do sinal cruzado para mobilização de cálcio celular e liberação de fatores citotóxicos; NKp44 expresso exclusivamente em células ativas por IL-2; NKp30 que atua de forma similar à NKp44 porém abrange diferentes ligantes e pode estar presente em células imaturas (106). Neste contexto, as células NK92-MI apresentam-se aptas ao reconhecimento de seu alvo.

Além do mais, pacientes com aumento dos receptores ativadores e subsequente aumento de citotoxicidade de NK apresentam melhor controle local e sobrevida livre de tumor (102). Paralelamente, nos tumores de cabeça e pescoço a presença de células NK com balanço entre a expressão de seus receptores ativadores e inibidores apresenta um prognóstico favorável e maior sobrevida (107).

As células tumorais derivadas de CEO podem apresentar diferentes fenótipos conforme observado por Biddle et.al. (2011) (21). Com base nesta literatura, avaliamos a disposição das populações dos fenótipos por CD44/ESA nas linhagens Ca1 e Luc4, onde observamos que Ca1 apresenta as populações CD44^{high}/ESA^{high}, CD44^{high}/ESA^{low}, CD44^{low} de forma homogênea, enquanto Luc4 apresenta maior população de CTC de perfil migratório CD44^{high}/ESA^{low}, sendo esta diferença refletida na morfologia celular observada na cultura.

Adicionalmente, com base em resultados preliminares do grupo de pesquisa do profº Ian Mackenzie, avaliamos a presença de um terceiro fenótipo no CEO, as células ameboides. Com base em nossos resultados, após sua expansão, as células ameboides representam em aproximadamente sua

totalidade o fenótipo CD44^{high}/ESA^{low} em cultura, definido previamente por Biddle e.tal. (2011) como um fenótipo migratório (21), que confere maior capacidade metastática à estas células. Em relação à sua morfologia, observamos que sua morfologia se apresenta equivalente aos relatos da literatura, com formação de filamentos e protusões *bebbing* (27, 28), que permitem maior motilidade e comportamento em suspensão na cultura.

Dados preliminares do grupo de pesquisa do Prof. Ian Mackenzie relatam que células ameboides apresentam aumento da expressão dos genes *RTN1* e *HOPX*. Estes genes são expressos em subpopulações de neurônios e progenitores intermediários, atuando no processo de formação embrionária, sendo portanto genes de fenótipo tronco (108). Em nossa pesquisa, observamos o aumento de *RTN1* em ambas as populações ameboides isoladas das linhagens Ca1 e Luc4, porém apenas as células ameboides derivadas da linhagem de Luc4 apresentou aumento de *HOPX*.

Nos tumores orais, *HOPX* atua como fator de transcrição, regulando o processo de diferenciação, angiogênese, ciclo celular e metástase, sendo sua superexpressão ambígua, correlacionada com pior prognóstico em tumores neurais e melhor prognóstico nos tumores orais (109). Seria possível que o aumento de *HOPX* em células ameboides Luc4 em comparação à Ca1, promovesse a supressão de sua atividade e/ou esteja correlacionado com o aumento da população de perfil mesenquimal. Vale ressaltar que genes regulados por *HOPX*, nomeadamente *NCAM*, *FOXG1* e *ITGA4*, regulam a motilidade e metástase celular (110), o aumento de *HOPX* em células ameboides Luc4 pode promover maior capacidade metastática à esta célula, abrindo possibilidade para uma nova via de estudo para terapias alvo.

Além de apresentarem elevada expressão de genes relacionados com o fenótipo tronco, observamos que células ameboides apresentam redução dos genes *CLGB* e *CDH1* (CATNA1 ou E-caderina), associados ao processo de adesão celular (111). Este resultado sugere que células ameboides possuem menor adesão celular o que justifica sua morfologia em suspensão em cultura, consequentemente poderia levar à uma maior capacidade metastática desta linhagem.

Em continuidade a este pensamento, sugere-se que as protusões formadas em células ameboides, sejam formadas a partir da focalização de

actomiosina mediada por E-caderina, sendo a expressão de E-caderina reduzida no processo de alongamento destas protusões (112), esta proposta vai de acordo com os dados observados na presente pesquisa.

Analizando os dados de forma conjunta, podemos compreender pontos fundamentais para a diferenciação dos fenótipos, que aponta a alta capacidade metastática como ponto crucial para células ameboïdes; apesar dos mecanismos envolvidos não estarem completamente elucidados, células ameboïdes de CEO apresentam aumento de sua capacidade tronco, desregulação de complexos de adesão, associados com a expressão anormal de vias que modulam sua morfologia para amplificar sua capacidade móvel, permitindo sua locomoção pelo tecido, o que confere uma maior capacidade de sobrevivência à esta população celular.

Para compreender como as NK92-MI atuam frente os diferentes fenótipos de CTC, realizamos o ensaio de citotoxicidade por liberação de calceínaAM, e observamos que células ameboïdes apresentaram maior sensibilidade às células NK92-MI sendo este efeito similar ao observado com as células da linhagem K562 (97). Resultados semelhantes foram observados por Tseng et.al. (2010), que observou aumento da citotoxicidade das células NK em CTC caracterizadas por $CD44^{\text{bright}}CD133^+$, na linhagem UCLA-OSCC de CEO (113). Todavia os autores não observam neste estudo se as células UCLA-OSCC representam o fenótipo ameboïde ou migratório, apenas observam que esta linhagem CTC exibe taxa proliferativa acentuada com baixa expressão de B7HI e EGF-R.

Para investigar os mecanismos envolvidos com a maior susceptibilidade das células ameboïdes à linhagem NK92-MI, avaliamos a expressão de *ULBPs* nas células parentais e ameboïdes. Foi observado que as células ameboïdes apresentaram redução de *ULB1, 2 e 4*; sugerindo que a ativação das células NK92-MI não ocorreu via receptor NKG2D e seus ligantes *ULBPs*.

Seria possível que a baixa expressão de *ULBPs* tenha ocorrido pela liberação dos ligantes de forma solúvel como um mecanismo de escape acentuado, um estudo observou que uma população resistente de células tumorais gástricas apresentou solubilização de *ULBPs* em co-cultura com NK, o que reduziu a capacidade citotóxica de NK por inibição de NKG2D, além do mais, neste estudo as *ULBPs* moduladas por meio da inibição de proteínas que clivam

estes ligantes, levou ao aumento de *ULBP1, 2 e 4* (114); das quais encontram-se reduzidos em nosso estudo.

Posteriormente, foi avaliada a expressão de MHC-I e MICA/B, observando a ocorrência do mecanismo clássico de reconhecimento nas linhagens por meio da redução de HLA e aumento de MICA/B, sendo este mais predominante em células CTC de fenótipo migratório e ameboide por apresentarem aumento de MICA/B, um dos ligantes para NKG2D. Nossos resultados entram em conflito em parte com os resultados apresentados por Kaur et.al. (2021), que sugerem ocorrer menor expressão de MICA/B em CTCs derivadas de CEO, porém apesar da diferença na expressão de MICA/B os autores observaram maior citotoxicidade direta de NK para com as CTCs, neste estudo os autores sugerem que a atividade de NK pode ser alterada frente ao grau de diferenciação de seu alvo (115). A diferença do comportamento de NK pode ser relevante para o desenvolvimento de futuras terapias alvo para tumores com aumento de uma subpopulação específica.

Realizamos um ensaio de citotoxicidade no qual as células NK92-MI foram cultivadas no meio onde células tumorais foram cultivadas previamente e observamos um fenômeno de inibição da atividade citotóxica de NK92-MI mediado por fatores presentes no meio de cultura condicionado. Considerando nossos resultados obtidos previamente sob a redução de *ULBPs* em células ameboïdes, seria possível sugerir que as células tumorais liberam formas solúveis de *ULBPs* que poderiam reduzir a atividade de NK por inibição do reconhecimento de NKG2DLs, uma vez que neste ensaio o alvo de NK, nomeadamente K562, representa uma célula negativa para HLA-I e HLA-II (MHC-I, MHC-II), com seu reconhecimento sendo realizado por meio de ULBPs (114).

Além do mais, as células tumorais de CEO podem secretar fatores imunosupressivos no microambiente tumoral; por meio da modulação de prostaglandina E₂ (PGE₂), TGF β , IL-10 os receptores naturais de citotoxicidade de NK são bloqueados, IL-6 secretado promoveria interferências na sinalização cruzada de IFN- γ , que subsequentemente induz a diferenciação do perfil Th2 em células T presentes, inibindo a maturação de células dendríticas (116).

Com base nestes resultados, foi avaliada a citotoxicidade direta das células da linhagem NK92-MI nas linhagens Ca1 e Luc4. As células da linhagem

Ca1 apresentaram-se evidentemente mais resistentes em comparação as células da linhagem Luc4 após a co-cultura com diferentes concentrações célula efetora:alvo. As células da linhagem Ca1 apresentaram sinais de morte após 4 horas, gradativamente elevado com o tempo e concentração de NK e em 24 horas células viáveis ainda foram observadas. Todavia, na linhagem Luc4, após 24h, independentemente da proporção célula efetora:alvo utilizada, as células foram mortas pela atividade citotóxica das células da linhagem NK982-MI. Seria possível sugerir que a diferença observada entre as populações ocorreu pela diferença de subpopulações presentes em cada linhagem, na qual as células Ca1 apresentam-se mais diferenciadas, com aumento de populações CD44^{high}/ESA^{high} quando comparado com as células Luc4 que apresentam aumento da subpopulação de perfil mesenquimal e migratório CD44^{high}/ESA^{low}.

Nosso resultado entra em acordo com os resultados descritos na literatura (113, 117, 118); nos quais foi observado uma maior citotoxicidade das células NK contra células com perfil tronco e mesenquimal acentuado, bem como, as células NK foram mais citotóxicas contra CT de polpa e células-tronco embrionárias, demonstrando uma maior afinidade desta célula para células tronco (113, 117).

A ação de NK mediou redução da capacidade tronco das linhagens de CEO, após o co-cultivo por 4 horas, foi observado alteração na proporção de subpopulações na linhagem Ca1, houve redução da subpopulação CD44^{high}/ESA^{high}, completa eliminação da subpopulação CD44^{high}/ESA^{low} e aumento de diferenciação celular para a subpopulação não-tronco CD44^{low}. Avaliando as capacidades tronco desta linhagem, foi notado redução significante de sua capacidade clonogênica e de formação de esferas tumorais.

Jewett e Tseng (2013) propuseram que o microambiente tumoral é capaz de modelar a função e fenótipo das células NK, bem como as células NK são capazes de induzir a diferenciação de células tumorais (119). Nossos resultados vão de acordo com o fenômeno proposto, seria possível que células NK atuem tanto no reconhecimento de CTCs quanto no controle da expansão desta população, mediando controle local após a realização de um determinado tratamento, possivelmente atuando diretamente no controle de metástase (120).

É possível que as NK tenham maior predisposição ao reconhecimento das células de perfil migratório e ameboide devido à um aumento da expressão de

MICA/B em conjunto à redução de HLA. Em relação aos ligantes NKG2D, não foram observadas diferenças na expressão dos ligantes entre as populações migratórias e epiteliais, porém foi observado uma redução de *ULBP2* e *ULBP4* para as populações amebóides que poderia contribuir para a maior sensibilidade desta população para o ataque de NK.

As células de perfil migratório elevam o risco de metástases no CEO (26) neste contexto, as NK seriam células recomendadas para terapias com a finalidade de tratar tumores com aumento de CTC de maior perfil migratório, mesenquimal ou metastáticos, sendo recomendado o acompanhamento para uma possível indução de um estado tolerante de NK mediado pelas mesmas.

A TFD pode promover modificações no sistema imunológico de forma inversamente correlacionada com a exposição radiante administrada, como descrito por Gollnick e Kousi (98, 121). Ao se utilizar altas doses de TFD o dano vascular resultante pode limitar a permeabilidade celular do infiltrado inflamatório no tecido alvo com subsequente perda de imunidade e doses baixas promovem maior penetração do infiltrado inflamatório e consequente reconhecimento do alvo (100). Além do mais, a densidade do tumor pode afetar a energia administrada, sendo preconizado o estudo do efeito de baixas-doses para que possam ser analisados os fenômenos em casos mais avançados (122).

A atividade citotóxica esperada a ser desencadeada por TFD nos tumores é dependente de sua capacidade de produzir espécies reativas de oxigênio, conforme observado por Zhao et. al. (2011), baixas doses são capazes de estimular maior atividade mitocondrial que resulta na liberação de espécies reativas de oxigênio e apoptose celular, ambos perdidos quando altas doses são administradas (123).

A viabilidade de CEO foi modulada de forma que o aumento da dose levou à uma maior lise celular. Observou-se que com 1,5J/cm² a viabilidade é afetada, e ao aumentar o tempo de irradiação, a energia elevada exibe aumento da citotoxicidade de 5-ALA com exceção do grupo TFD 9J/cm², o qual a viabilidade reduzida apresentou-se inferior ao grupo 6J/cm². Ma et.al (2020) observam de forma similar que o aumento da dose correlaciona-se com o aumento da morte após 5-ALA-TFD em células derivadas de CEO (124).

Em relação ao grupo LED, no qual as células não foram inoculadas com 5-ALA, a fotobiomodulação modulou negativamente a viabilidade do CEO com

3J/cm². Previamente nosso grupo de pesquisa observou redução de viabilidade do CEO modulada após a fotobiomodulação de Ca1 com 6J/cm², da qual redução de viabilidade foi acentuada após três irradiações (125).

Nossos resultados demonstram que a morte celular é exacerbada com o aumento da energia radiante e/ou tempo. A morfologia celular apresenta sinais característicos de necrose celular, com o rompimento da membrana e extravasamento do conteúdo citoplasmático para os grupos TFD 12J/cm², 15J/cm² e 18J/cm². Conforme observado previamente, a intensidade do dano promoverá alterações nos mecanismos de morte desencadeados após a TFD (41, 43).

Resultados preliminares de nosso grupo mostraram que a TFD mediada por 5-ALA foi capaz de induzir morte celular em diferentes densidades de energia (3 à 9J/cm²), sendo 6J/cm² capaz de inibir a migração celular por meio do ensaio de fechamento de ferida, redução da população epitelial (CD44^{high}ESA^{high}) que apresentou redução em sua capacidade formadora de colônia e esfera com o aumento de células não-tronco (CD44^{low}). Yu et.al. (2014) demonstrou que TFD mediada por 5-ALA modulou negativamente as CTCs por meio da supressão da população ALDH1+, que por conseguinte exibiu redução em suas capacidades formadoras de esfera e redução nos níveis genéticos de *Nanog* e *Oct4* (62).

Nossos resultados obtidos após 5-ALA-TFD nos grupos 1,5J/cm² e 3J/cm² demonstram que a TFD não promoveu alterações na expressão de HLA-ABC nas populações de CTC derivadas do CEO, outro estudo que observou um fenômeno similar foi desenvolvido por Belicha-Villanueva e colaboradores, no qual apenas *in vivo* foi possível observar o aumento de MICA após TFD mediada por HPPH (95).

No estudo desenvolvido por Park e colaboradores, a TFD mediada por HPD 10J/cm² irradiadas por uma lâmpada branca por um período de três minutos, foi capaz de estimular a expressão de ULBPs e MICB de células derivadas de tumores estomacais e pulmonares *in vitro*, de forma que a citotoxicidade de NK foi dependente da atividade destes ligantes (94).

É possível que não observamos redução dos mecanismos de reconhecimento de NK após a TFD devido à ausência de outras células participantes do microambiente tumoral. A TFD promove estimulação em cadeia do sistema imunológico por meio da morte imunogênica (77); a qual apresenta-

se como uma limitação em nosso estudo *in vitro*, devido ao mecanismo limitado à interação de NK com o CEO. Belicha-Villanueva observou alterações de MICA *in vivo* com uma fluência de 100J/cm², enquanto *in vitro* não foram observadas alterações de MICA após a irradiação com uma fluência de 0.2 à 1J/cm² (95).

Estes resultados são interessantes levando em consideração que HLA não é apenas reconhecido por NK, o complexo de histocompatibilidade são moléculas reconhecidas por macrófagos, células T CD4+ e CD8+ (126), além de que células NK e células T são fundamentais para o controle local do tumor de forma conjunta (75). A TFD pode promover o efeito citotóxico ao tecido alvo sem comprometer a atividade de reconhecimento de NK, e possivelmente de outras populações celulares da imunidade.

Seguindo este ponto, a TFD mediada por CAGE (derivado de clorina e6 carregado com complexo imunoterapêutico GpG, (Ce6)-doped-azobenzene-glycol chitosan (GC)-PEG mesoporous silica nanoparticle), foi capaz de promover o recrutamento e maturação de células dendríticas *in vivo*, em tecidos com alto nível de hipóxia, após o tratamento o nível de MHC-II foi elevado no grupo conjugado com 100% de sobrevivência dos animais ao término do estudo, diferentemente dos animais apenas tratados com a TFD que apresentaram 40% de sobrevida (127).

Nossos resultados demonstram que o meio condicionado de células tumorais não foi capaz de inibir ou alterar a ação citotóxica de NK após seu contato prolongado por meio do cultivo em meio condicionado após a TFD. Seria possível sugerir que células submetidas à TFD mediada por 5-ALA não liberam fatores que poderiam afetar a ação de NK. Adicionalmente, o cultivo de NK em DMEM/F12, diferente do padronizado, por 24 horas não afetou sua atividade. Um estudo recente avaliou a possibilidade de cultivar células NK-92 em meio RPMI devido aos altos custos do meio padronizado, e observou que esta célula não apresenta sua capacidade citotóxica afetada sob condições de cultura alteradas (128).

Desta maneira, não observamos alterações mediadas diretamente pela TFD dentro dos parâmetros avaliados, mas sim pelo meio condicionado com fatores excretados pelas células tumorais. Compreender os mecanismos de escape envolvidos na inibição do sistema imunológico mediado por CTC e

terapias que contornem esta resistência são fundamentais para futuras pesquisas.

7. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos nesta pesquisa, chegamos às seguintes conclusões:

- Células NK92-MI apresentam fenótipo $CD45^+CD3^-CD56^+$ com expressão dos receptores NKG2D, NKp30, NKp44, NKp46.
- Foi identificado uma subpopulação ameboide no CEO, caracterizada pela expressão de $CD44^{\text{high}}/\text{ESA}^{\text{low}}$, bem como expressão genética elevada de *RTN1*, *HOPX* e redução de *CLGB* e *CTN1*, conferindo maior capacidade metastática.
- As subpopulações CTC epiteliais ($CD44^{\text{high}}/\text{ESA}^{\text{high}}$) e mesenquimais ($CD44^{\text{high}}/\text{ESA}^{\text{low}}$) apresentam variação na expressão dos ligantes *ULBP1*, *ULBP2*, *ULBP3*, *ULBP4*, MICA/B e HLA para o receptor NKG2D; populações ameboides apresentam redução de *ULBP1*, 2 e 4, HLA e aumento de MICA/B.
- A capacidade citotóxica da linhagem NK92-MI foi maior nas células com perfil ameboide.
- A citotoxicidade das células da linhagem NK92-MI em K562 foi inibida quando NK92-MI foram cultivadas com meio condicionado provindo de células tumorais.
- O co-cultivo de NK92-MI mediou redução da capacidade tronco de Ca1, por meio da redução de populações CTC epiteliais ($CD44^{\text{high}}/\text{ESA}^{\text{high}}$), inibição de população mesenquimais ($CD44^{\text{high}}/\text{ESA}^{\text{low}}$), expansão da população não-tronco ($CD44^{\text{low}}$), redução de capacidade clonogênica e formadora de esfera.
- A TFD mediada por 5-ALA é capaz de promover morte celular no CEO, sendo esta crescente com o aumento da exposição radiante. O LED é capaz de modular a viabilidade do CEO no grupo 3J/cm².
- A capacidade citotóxica de NK92-MI não é afetada pela TFD em condições de sub dose, nos parâmetros avaliados de 1,5J/cm² e 3J/cm².

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2018;68(6):394-424.
2. Câncer INd. Estimativa 2020 2020 [Available from: <https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil>].
3. Mehanna H, Paleri V, West CML, Nutting C. Head and neck cancer—Part 1: Epidemiology, presentation, and prevention. *Bmj*. 2010;341:c4684.
4. Rivera C. Essentials of oral cancer. *Int J Clin Exp Pathol*. 2018;8(9):10.
5. Muzaffar J, Bari S, Kirtane K, Chung CH. Recent Advances and Future Directions in Clinical Management of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Cancers*. 2021;13(2):338.
6. Sano D MJ. Metastasis of squamous cell carcinoma of the oral tongue. *Cancer and Metastasis Reviews*. 2007.
7. Begg AC, editor Predicting recurrence after radiotherapy in head and neck cancer. *Seminars in radiation oncology*; 2012: Elsevier.
8. Ausoni S, Boscolo-Rizzo P, Singh B, Mosto MCD, Spinato G, Tirelli G, et al. Targeting cellular and molecular drivers of head and neck squamous cell carcinoma: current options and emerging perspectives. *Cancer and Metastasis Reviews*. 2016;35(3):13.
9. Douglas Hanahan, Robert A. Weinberg. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. 2011;144:13.
10. Irimie AI, Ciocan C, Gulei D, Mehterov N, Atanasov AG, Dudea D, et al. Current Insights into Oral Cancer Epigenetics. *International journal of molecular sciences*. 2018;19(3):670.
11. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery*. 2022;12(1):31-46.
12. Bose A, Chakraborty T, Chakraborty K, Pal S, Baral R. Dysregulation in immune functions is reflected in tumor cell cytotoxicity by peripheral blood mononuclear cells from head and neck squamous cell carcinoma patients. *Cancer Immun*. 2008;8:10-.
13. De Costa A-MA, Schuyler CA, Walker DD, Young MRI. Characterization of the evolution of immune phenotype during the development and progression of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2012;61(6):927-39.
14. Gasparoto TH, de Souza Malaspina TS, Benevides L, de Melo EJF, Costa MRSN, Damante JH, et al. Patients with oral squamous cell carcinoma are characterized by increased frequency of suppressive regulatory T cells in the blood and tumor microenvironment. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2010;59(6):819-28.
15. Rodini CO, Lopes NM, Lara VS, Mackenzie IC. Oral cancer stem cells - properties and consequences. *J Journal of Applied Oral Science*. 2017;25:708-15.
16. Beck B, Blanpain C. Unravelling cancer stem cell potential. *Nature Reviews Cancer*. 2013;13:727.
17. Nassar D, Blanpain C. Cancer Stem Cells: Basic Concepts and Therapeutic Implications. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. 2016;11(1):47-76.
18. Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nature Medicine*. 1997;3(7):730-7.

19. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003;100(7):3983-8.
20. Prince ME, Sivanandan R, Kaczorowski A, Wolf GT, Kaplan MJ, Dalerba P, et al. Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. 2007;104(3):973-8.
21. Biddle A, Liang X, Gammon L, Fazil B, Harper LJ, Emich H, et al. Cancer Stem Cells in Squamous Cell Carcinoma Switch between Two Distinct Phenotypes That Are Preferentially Migratory or Proliferative. *J Cancer Research*. 2011;71(15):5317-26.
22. Persa O-D, Niessen CM. Epithelial polarity limits EMT. *Nature Cell Biology*. 2019;21(3):299-300.
23. Thiery JP, Acloque H, Huang RYJ, Nieto MA. Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease. *Cell*. 2009;139(5):871-90.
24. Cai Z, Cao Y, Luo Y, Hu H, Ling H. Signalling mechanism (s) of epithelial–mesenchymal transition and cancer stem cells in tumour therapeutic resistance. *J Clinica Chimica Acta*. 2018;483:156-63.
25. Ye X, Weinberg RA. Epithelial–Mesenchymal Plasticity: A Central Regulator of Cancer Progression. *Trends in Cell Biology*. 2015;25(11):675-86.
26. Cho ES, Kang HE, Kim NH, Yook JI. Therapeutic implications of cancer epithelial–mesenchymal transition (EMT). *J Archives of pharmacal research*. 2019;42(1):14-24.
27. Taddei ML, Giannoni E, Morandi A, Ippolito L, Ramazzotti M, Callari M, et al. Mesenchymal to amoeboid transition is associated with stem-like features of melanoma cells. *Cell Communication and Signaling*. 2014.
28. PINNER S, SAHAI E. Imaging amoeboid cancer cell motility in vivo. *Journal of microscopy*. 2008;231(3):441-5.
29. Friedl P, Wolf K. Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model. *The Journal of cell biology*. 2010;188(1):11-9.
30. Brábek AGTVDRJ. Cell polarity signaling in the plasticity of cancer cell invasiveness. *Oncotarget*. 2016;7(7):25022-49.
31. Rodrigues MFSD, Xavier FCdA, Andrade NP, Lopes C, Miguita Luiz L, Sedassari BT, et al. Prognostic implications of CD44, NANOG, OCT4, and BMI1 expression in tongue squamous cell carcinoma. *Head & neck*. 2018;40(8):1759-73.
32. Huang C-F, Xu X-R, Wu T-F, Sun Z-J, Zhang W-F. Correlation of ALDH1, CD44, OCT4 and SOX2 in tongue squamous cell carcinoma and their association with disease progression and prognosis. *Journal of Oral Pathology & Medicine*. 2014;43(7):492-8.
33. Boxberg M, Götz C, Haidari S, Dorfner C, Jesinghaus M, Drecoll E, et al. Immunohistochemical expression of CD44 in oral squamous cell carcinoma in relation to histomorphological parameters and clinicopathological factors. *Histopathology*. 2018;73(4):559-72.
34. Ghuwalewala S, Ghatak D, Das P, Dey S, Sarkar S, Alam N, et al. CD44highCD24low molecular signature determines the Cancer Stem Cell and EMT phenotype in Oral Squamous Cell Carcinoma,. *Stem Cell Research*. 2016;16(2):405 - 17.
35. Wang SJ, Bourguignon LYW. Hyaluronan and the Interaction Between CD44 and Epidermal Growth Factor Receptor in Oncogenic Signaling and Chemotherapy Resistance in Head and Neck Cancer. *JAMA Otolaryngology–Head & Neck Surgery*. 2006;132(7):771-8.
36. Sakakura KCGTK, Masuyama SFK. IMMUNOREGULATORY PROPERTIES OF CD44+ CANCER STEM-LIKE CELLS IN SQUAMOUS CELL CARCINOMA OF THE HEAD AND NECK. *Head Neck*. 2011;33:208 - 15.

37. Biddle A, Gammon L, Liang X, Costea DE, Mackenzie IC. Phenotypic Plasticity Determines Cancer Stem Cell Therapeutic Resistance in Oral Squamous Cell Carcinoma. *EBioMedicine*. 2016;4:138-45.
38. Gemenetzidis E, Gammon L, Biddle A, Emich H, Mackenzie IC. Invasive oral cancer stem cells display resistance to ionising radiation. *Oncotarget*. 2015;22:43964-77.
39. Dolmans DEJGJ, Fukumura D, Jain RK. Photodynamic therapy for cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2003;3(5):380-7.
40. Abrahamse H, Hamblin Michael R. New photosensitizers for photodynamic therapy. *J Biochemical Journal*. 2016;473(4):347-64.
41. Robertson CA, Evans DH, Abrahamse H. Photodynamic therapy (PDT): a short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT. *Journal of Photochemistry Photobiology B: Biology*. 2009;96(1):1-8.
42. Castano AP, Demidova TN, Hamblin MR. Mechanisms in photodynamic therapy: part one—photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis photodynamic therapy*. 2004;1(4):279-93.
43. Castano AP, Demidova TN, Hamblin MR. Mechanisms in photodynamic therapy: part three—photosensitizer pharmacokinetics, biodistribution, tumor localization and modes of tumor destruction. *Photodiagnosis photodynamic therapy*. 2005;2(2):91-106.
44. Feng G, Zhang GQ, Ding D. Design of superior phototheranostic agents guided by Jablonski diagrams. *Chemical Society reviews*. 2020;49(22):8179-234.
45. Plaetzer K, Kiesslich T, Verwanger T, Krammer B. The Modes of Cell Death Induced by PDT: An Overview. *Medical Laser Application*. 2003;18(1):7-19.
46. Loh CS, MacRobert AJ, Bedwell J, Regula J, Krasner N, Bown SG. Oral versus intravenous administration of 5-aminolaevulinic acid for photodynamic therapy. *Br J Cancer*. 1993;68(1):41-51.
47. Nokes B, Apel M, Jones C, Brown G, Lang JE. Aminolevulinic acid (ALA): photodynamic detection and potential therapeutic applications. *Journal of Surgical Research*. 2013;181(2):262-71.
48. Baglo Y, Liang BJ, Robey RW, Ambudkar SV, Gottesman MM, Huang H-C. Porphyrin-lipid assemblies and nanovesicles overcome ABC transporter-mediated photodynamic therapy resistance in cancer cells. *Cancer Letters*. 2019;457:110-8.
49. Yamamotoa M, Fujitaa H, Kataseb N, Inouec K, Nagatsukab 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 Okayama*. 2013;67(3):153 - 64.
50. Ibarra AMC, Cecatto RB, Motta LJ, dos Santos Franco AL, de Fátima Teixeira da Silva D, Nunes FD, et al. Photodynamic therapy for squamous cell carcinoma of the head and neck: narrative review focusing on photosensitizers. *Lasers in Medical Science*. 2021.
51. Selbo PK, Weyergang A, Eng MS, Bostad M, Mælandsø GM, Høgset A, et al. Strongly amphiphilic photosensitizers are not substrates of the cancer stem cell marker ABCG2 and provides specific and efficient light-triggered drug delivery of an EGFR-targeted cytotoxic drug. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2012;159(2):197-203.
52. Hu Z, Xu J, Cheng J, McMichael E, Yu L, Carson WE, 3rd. Targeting tissue factor as a novel therapeutic oncotarget for eradication of cancer stem cells isolated from tumor cell lines, tumor xenografts and patients of breast, lung and ovarian cancer. *Oncotarget*. 2017;8(1):1481-94.
53. Gaio E, Conte C, Esposito D, Reddi E, Quaglia F, Moret F. CD44 Targeting Mediated by Polymeric Nanoparticles and Combination of Chlorine TPCS(2a)-PDT and Docetaxel-

Chemotherapy for Efficient Killing of Breast Differentiated and Stem Cancer Cells In Vitro. *Cancers (Basel)*. 2020;12(2).

54. Raschpichler M, Preis E, Pinnapireddy SR, Baghdan E, Pourasghar M, Schneider M, et al. Photodynamic inactivation of circulating tumor cells: An innovative approach against metastatic cancer. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2020;157:38-46.
55. Schmidt S, Schultes B, Wagner U, Oehr P, Decleer W, Lubaschowski H, et al. Photodynamic laser therapy of carcinomas—effects of five different photosensitizers in the colony-forming assay. *Archives of gynecology obstetrics*. 1991;249(1):9-14.
56. Chizenga EP, Chandran R, Abrahamse H. Photodynamic therapy of cervical cancer by eradication of cervical cancer cells and cervical cancer stem cells. *Oncotarget*. 2019;10(43):4380-96.
57. Wei M-F, Han S-Y, Yang S-J, Lin F-H, Hung S-C, Shieh M-J. Cell death of colorectal cancer stem-like cell was induced by photodynamic therapy with protoporphyrin IX. 20th Asia. 2009:Pacific-c.
58. Bostad M, Berg K, Høgset A, Skarpen E, Stenmark H, Selbo PK. Photochemical internalization (PCI) of immunotoxins targeting CD133 is specific and highly potent at femtomolar levels in cells with cancer stem cell properties. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2013;168(3):317-26.
59. Wei MF, Chen MW, Chen KC, Lou PJ, Lin SY, Hung SC, et al. Autophagy promotes resistance to photodynamic therapy-induced apoptosis selectively in colorectal cancer stem-like cells. *Autophagy*. 2014;10(7):1179-92.
60. Cogno IS, Gilardi P, Comini L, Núñez-Montoya SC, Cabrera JL, Rivarola VA. Natural photosensitizers in photodynamic therapy: In vitro activity against monolayers and spheroids of human colorectal adenocarcinoma SW480 cells. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2020;31:101852.
61. Mao X, Zhang X, Zheng X, Chen Y, Xuan Z, Huang P. Curcumin suppresses LGR5(+) colorectal cancer stem cells by inducing autophagy and via repressing TFAP2A-mediated ECM pathway. *Journal of natural medicines*. 2021.
62. 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.
63. Peng Y, He G, Tang D, Xiong L, Wen Y, Miao X, et al. Lovastatin Inhibits Cancer Stem Cells and Sensitizes to Chemo- and Photodynamic Therapy in Nasopharyngeal Carcinoma. *J Cancer*. 2017;8(9):1655-64.
64. Fang CY, Chen PY, Ho DC, Tsai LL, Hsieh PL, Lu MY, et al. miR-145 mediates the anti-cancer stemness effect of photodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid (ALA) in oral cancer cells. *Journal of the Formosan Medical Association = Taiwan yi zhi*. 2018;117(8):738-42.
65. 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 5-aminolevulinic acid, rendering them sensitive to photodynamic treatment. *Journal of photochemistry and photobiology B, Biology*. 2016;163:203-10.
66. Wang W, Tabu K, Hagiya Y, Sugiyama Y, Kokubu Y, Murota Y, et al. Enhancement of 5-aminolevulinic acid-based fluorescence detection of side population-defined glioma stem cells by iron chelation. *Scientific reports*. 2017;7:42070.
67. Fujishiro T, Nonoguchi N, Pavliukov M, Ohmura N, Kawabata S, Park Y, et al. 5-Aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy can target human glioma stem-like cells refractory to antineoplastic agents. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2018;24:58-68.
68. Kawai N, Hirohashi Y, Ebihara Y, Saito T, Murai A, Saito T, et al. 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*. 2019;14(5):e0216503.

69. Natoli G, Ostuni R. Adaptation and memory in immune responses. *Nature Immunology*. 2019;20(7):783-92.
70. Lanier LL. Shades of grey—the blurring view of innate and adaptive immunity. *2013;13(2):73.*
71. Chen Daniel S, Mellman I. Oncology Meets Immunology: The Cancer-Immunity Cycle. *Immunity*. 2013;39(1):1-10.
72. Korbelik M, Dougherty GJ. Photodynamic therapy-mediated immune response against subcutaneous mouse tumors. *J Cancer research*. 1999;59(8):1941-6.
73. Gollnick SO. Photodynamic therapy and antitumor immunity. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network : JNCCN*. 2012;10 Suppl 2(0 2):S40-S3.
74. Denis TGS, Aziz K, Waheed AA, Huang Y-Y, Sharma SK, Mroz P, et al. Combination approaches to potentiate immune response after photodynamic therapy for cancer. *Photochem Photobiol Sci*. 2011;10:792-801.
75. Kabingu E, Vaughan L, Owczarczak B, Ramsey KD, Gollnick SO. CD8+ T cell-mediated control of distant tumours following local photodynamic therapy is independent of CD4+ T cells and dependent on natural killer cells. *British Journal Of Cancer*. 2007;96:1839.
76. Hendrzak-Henion JA, Knisely TL, Cincotta L, Cincotta E, Cincotta AH. Role of the immune system in mediating the antitumor effect of benzophenothiazine photodynamic therapy. *Photochem Photobiol*. 1999;69(5):575-81.
77. Nath S, Obaid G, Hasan T. The Course of Immune Stimulation by Photodynamic Therapy: Bridging Fundamentals of Photochemically Induced Immunogenic Cell Death to the Enrichment of T-Cell Repertoire. *J Photochemistry photobiology*. 2019;95(6):1288-305.
78. Evans S, Matthews W, Perry R, Fraker D, Norton J, Pass HI. Effect of photodynamic therapy on tumor necrosis factor production by murine macrophages. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. 1990;82(1):34-9.
79. Nowis D, Stokłosa T, Legat M, Issat T, Jakóbisiak M, Gołab J. The influence of photodynamic therapy on the immune response. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2005;2(4):283-98.
80. Beltrán Hernández I, Yu Y, Ossendorp F, Korbelik M, Oliveira S. Preclinical and Clinical Evidence of Immune Responses Triggered in Oncologic Photodynamic Therapy: Clinical Recommendations. *Journal of clinical medicine*. 2020;9(2):333.
81. Guillerey C, Huntington ND, Smyth MJ. Targeting natural killer cells in cancer immunotherapy. *Nat Immunol*. 2016;17(9):1025-36.
82. Malmberg K-J, Bryceson YT, Carlsten M, Andersson S, Björklund A, Björkström NK, et al. NK cell-mediated targeting of human cancer and possibilities for new means of immunotherapy. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2008;57(10):1541-52.
83. Zancope E, Costa NL, Junqueira-Kipnis AP, Valadares MC, Silva TA, Leles CR, et al. Differential infiltration of CD8+ and NK cells in lip and oral cavity squamous cell carcinoma. *Journal of Oral Pathology & Medicine*. 2010;39(2):162-7.
84. Fu B, Tian Z, Wei H. Subsets of human natural killer cells and their regulatory effects. *Immunology*. 2014;141(4):483-9.
85. Cheng M, Chen Y, Xiao W, Sun R, Tian Z. NK cell-based immunotherapy for malignant diseases. *Cellular And Molecular Immunology*. 2013;10:230.
86. Marcus A, Gowen BG, Thompson TW, Iannello A, Ardolino M, Deng W, et al. Recognition of tumors by the innate immune system and natural killer cells. *Advances in immunology*. 2014;122:91-128.
87. Sungur CM, Murphy WJ. Positive and negative regulation by NK cells in cancer. *J Critical Reviews in Oncogenesis*. 2014;19(1-2).

88. Jewett A, Man YG, Tseng HC. Dual functions of natural killer cells in selection and differentiation of stem cells; role in regulation of inflammation and regeneration of tissues. *J Cancer*. 2013;4(1):12-24.
89. Chiossone L, Dumas P-Y, Vienne M, Vivier E. Natural killer cells and other innate lymphoid cells in cancer. *Nature Reviews Immunology*. 2018;18(11):671-88.
90. Smyth MJ, Teng MW, Swann J, Kyriakisoudis K, Godfrey DI, Hayakawa Y. CD4+CD25+ T regulatory cells suppress NK cell-mediated immunotherapy of cancer. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2006;176(3):1582-7.
91. Gong JH, Maki G, Klingemann HG. Characterization of a human cell line (NK-92) with phenotypical and functional characteristics of activated natural killer cells. *Leukemia*. 1994;8(4):652-8.
92. Tam YK, Maki G, Miyagawa B, Hennemann B, Tonn T, Klingemann HG. Characterization of genetically altered, interleukin 2-independent natural killer cell lines suitable for adoptive cellular immunotherapy. *Human gene therapy*. 1999;10(8):1359-73.
93. Korbelik M, Sun J. Cancer treatment by photodynamic therapy combined with adoptive immunotherapy using genetically altered natural killer cell line. *J International journal of cancer*. 2001;93(2):269-74.
94. Park M-J, Bae J-H, Chung JS, Kim S-H, Kang C-D. Induction of NKG2D ligands and increased sensitivity of tumor cells to NK cell-mediated cytotoxicity by hematoporphyrin-based photodynamic therapy. *J Immunological investigations*. 2011;40(4):367-82.
95. Belicha-Villanueva A, Riddell J, Bangia N, Gollnick SO. The effect of photodynamic therapy on tumor cell expression of major histocompatibility complex (MHC) class I and MHC class I-related molecules. *J Lasers in surgery medicine*. 2012;44(1):60-8.
96. Mackenzie IC. Growth of malignant oral epithelial stem cells after seeding into organotypical cultures of normal mucosa. *Journal of oral pathology & medicine*. 2004;33(2):71-8.
97. Neri S, Mariani E, Meneghetti A, Cattini L, Facchini A. Calcein-acetyoxymethyl cytotoxicity assay: standardization of a method allowing additional analyses on recovered effector cells and supernatants. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2001;8(6):1131-5.
98. Gollnick SO, Brackett CM. Enhancement of anti-tumor immunity by photodynamic therapy. *Immunologic research*. 2010;46(1-3):216-26.
99. Silva DFT, Mesquita-Ferrari RA, Fernandes KPS, Ralee MP, Wetter NU, Deana AM. Effective Transmission of Light for Media Culture, Plates and Tubes. *Photochemistry and photobiology*. 2012;88(5):1211-6.
100. Kabingu E, Oseroff AR, Wilding GE, Gollnick SO. Enhanced systemic immune reactivity to a Basal cell carcinoma associated antigen following photodynamic therapy. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2009;15(13):4460-6.
101. Zhu Y, Huang B, Shi J. Fas ligand and lytic granule differentially control cytotoxic dynamics of natural killer cell against cancer target. *Oncotarget*. 2016;7(30):47163-72.
102. Pasero C, Gravis G, Granjeaud S, Guerin M, Thomassin-Piana J, Rocchi P, et al. Highly effective NK cells are associated with good prognosis in patients with metastatic prostate cancer. *Oncotarget*. 2015;6(16):14360-73.
103. Freud AG, Mundy-Bosse BL, Yu J, Caligiuri MA. The Broad Spectrum of Human Natural Killer Cell Diversity. *Immunity*. 2017;47(5):820-33.
104. González S, López-Soto A, Suárez-Alvarez B, López-Vázquez A, López-Larrea C. NKG2D ligands: key targets of the immune response. *Trends Immunol*. 2008;29(8):397-403.
105. Moretta A, Bottino C, Vitale M, Pende D, Cantoni C, Mingari MC, et al. Activating Receptors and Coreceptors Involved in Human Natural Killer Cell-Mediated Cytolysis. *Annual Review of Immunology*. 2001;19(1):197-223.

106. Moretta A, Biassoni R, Bottino C, Mingari MC, Moretta L. Natural cytotoxicity receptors that trigger human NK-cell-mediated cytolysis. *Immunology Today*. 2000;21(5):228-34.
107. Bisheshar SK, De Ruiter EJ, Devriese LA, Willems SM. The prognostic role of NK cells and their ligands in squamous cell carcinoma of the head and neck: a systematic review and meta-analysis. *Oncoidimmunology*. 2020;9(1):1747345.
108. Pollen Alex A, Nowakowski Tomasz J, Chen J, Retallack H, Sandoval-Espinosa C, Nicholas Cory R, et al. Molecular Identity of Human Outer Radial Glia during Cortical Development. *Cell*. 2015;163(1):55-67.
109. Liu Y, Zhang W. The role of HOPX in normal tissues and tumor progression. *Bioscience Reports*. 2020;40(1):BSR20191953.
110. Kovářová D, Plachý J, Kosla J, Trejbalová K, Čermák V, Hejnar J. Downregulation of HOPX Controls Metastatic Behavior in Sarcoma Cells and Identifies Genes Associated with Metastasis. *Molecular Cancer Research*. 2013;11(10):1235-47.
111. Ren Z-H, Lin C-Z, Cao W, Yang R, Lu W, Liu Z-Q, et al. CD73 is associated with poor prognosis in HNSCC. *Oncotarget*. 2016;7(38):61690-702.
112. Grimaldi C, Schumacher I, Boquet-Pujadas A, Tarbashevich K, Vos BE, Bandemer J, et al. E-cadherin focuses protrusion formation at the front of migrating cells by impeding actin flow. *Nature Communications*. 2020;11(1):5397.
113. Tseng H-C, Arasteh A, Paranjpe A, Teruel A, Yang W, Behel A, et al. Increased lysis of stem cells but not their differentiated cells by natural killer cells; de-differentiation or reprogramming activates NK cells. *PloS one*. 2010;5(7):e11590.
114. Song H, Kim J, Cosman D, Choi I. Soluble ULBP suppresses natural killer cell activity via down-regulating NKG2D expression. *Cellular Immunology*. 2006;239(1):22-30.
115. Kaur K, Safaie T, Ko M-W, Wang Y, Jewett A. ADCC against MICA/B Is Mediated against Differentiated Oral and Pancreatic and Not Stem-Like/Poorly Differentiated Tumors by the NK Cells; Loss in Cancer Patients due to Down-Modulation of CD16 Receptor. *Cancers*. 2021;13(2).
116. Jewett A, Head C, Cacalano NA. Emerging Mechanisms of Immunosuppression in Oral Cancers. *Journal of Dental Research*. 2006;85(12):1061-73.
117. Jewett A, Arasteh A, Tseng H-C, Behel A, Arasteh H, Yang W, et al. Strategies to rescue mesenchymal stem cells (MSCs) and dental pulp stem cells (DPSCs) from NK cell mediated cytotoxicity. *PloS one*. 2010;5(3):e9874.
118. Jewett A, Cacalano NA, Teruel A, Romero M, Rashedi M, Wang M, et al. Inhibition of nuclear factor kappa B (NF κ B) activity in oral tumor cells prevents depletion of NK cells and increases their functional activation. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2006;55(9):1052-63.
119. Jewett A, Tseng H-C. Tumor Microenvironment may Shape the Function and Phenotype of NK Cells Through the Induction of Split Anergy and Generation of Regulatory NK Cells. In: Shurin MR, Umansky V, Malyguine A, editors. *The Tumor Immunoenvironment*. Dordrecht: Springer Netherlands; 2013. p. 361-81.
120. Jewett A, Kos J, Fong Y, Ko M-W, Safaei T, Perišić Nanut M, et al. NK cells shape pancreatic and oral tumor microenvironments; role in inhibition of tumor growth and metastasis. *Seminars in Cancer Biology*. 2018;53:178-88.
121. Kousis PC, Henderson BW, Maier PG, Gollnick SO. Photodynamic therapy enhancement of antitumor immunity is regulated by neutrophils. *Cancer Res*. 2007;67(21):10501-10.
122. Bulin A-L, Broekgaarden M, Simeone D, Hasan T. Low dose photodynamic therapy harmonizes with radiation therapy to induce beneficial effects on pancreatic heterocellular spheroids. *Oncotarget*. 2019;10(27):2625.
123. Zhao H, Xing D, Chen Q. New insights of mitochondria reactive oxygen species generation and cell apoptosis induced by low dose photodynamic therapy. *European Journal of Cancer*. 2011;47(18):2750-61.

124. Ma Y, Qu S, Xu L, Lu H, Li B. An in vitro study of the effect of 5-ALA-mediated photodynamic therapy on oral squamous cell carcinoma. *BMC Oral Health*. 2020;20(1):1-6.
125. Ibarra AMC, Garcia MP, Ferreira M, de Fátima Teixeira da Silva D, Pavani C, Mesquita-Ferrari RA, et al. Effects of photobiomodulation on cellular viability and cancer stem cell phenotype in oral squamous cell carcinoma. *Lasers Med Sci*. 2021;36(3):681-90.
126. Spierings E, Fleischhauer K. Histocompatibility. In: Carreras E, Dufour C, Mohty M, Kröger N, editors. *The EBMT Handbook: Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Cellular Therapies*. Cham: Springer International Publishing; 2019. p. 61-8.
127. Im S, Lee J, Park D, Park A, Kim Y-M, Kim WJ. Hypoxia-Triggered Transforming Immunomodulator for Cancer Immunotherapy via Photodynamically Enhanced Antigen Presentation of Dendritic Cell. *ACS Nano*. 2019;13(1):476-88.
128. Kotzur R, Duev-Cohen A, Kol I, Reches A, Mandelboim O, Stein N. NK-92 cells retain vitality and functionality when grown in standard cell culture conditions. *PloS one*. 2022;17(3):e0264897.

Apêndice:

Artigos Publicados

Lasers in Medical Science
<https://doi.org/10.1007/s10103-021-03462-3>

REVIEW ARTICLE



Photodynamic therapy for squamous cell carcinoma of the head and neck: narrative review focusing on photosensitizers

Ana Melissa Ccopa Ibarra¹ · Rebeca Boltes Cecatto^{2,3} · Lara Jansiski Motta¹ · Adriana Lino dos Santos Franco¹ · Daniela de Fátima Teixeira da Silva¹ · Fabio Daumas Nunes⁴ · Michael R Hamblin^{5,6} · Maria Fernanda Setúbal Destro Rodrigues¹

Received: 1 June 2021 / Accepted: 4 November 2021
 © The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag London Ltd, part of Springer Nature 2021

Abstract

This narrative review aimed to evaluate the effectiveness of PDT in early or advanced squamous cell carcinoma of the head and neck (SCCHN). Scopus, MEDLINE/PubMed, and Embase were searched electronically following the PRISMA protocol. Quality assessment was performed according to JBI, NIH, and AMSTAR protocols. The main outcomes evaluated were treatment response, recurrence, survival, and adverse effects. A total of 49 articles met the search criteria: 43 case series, two cohort studies, two prospective before-after clinical trials, one systematic review, and one meta-analysis. Data from 2121 SCCHN patients were included. The response to PDT was variable according to the type of photosensitizer, tumor location, and tumor stage. In general, higher complete responses rated were observed in T1/T2 SCCHN, mainly with mTHPC-mediated PDT. With regard to T3/T4 or advanced SCCHN tumors, there is no compelling evidence suggesting the effectiveness of PDT. Any adverse effects reported were well tolerated by patients. The present review suggests that PDT is a promising treatment modality for early-stage SCCHN. Although there are limitations due to the low level of evidence of the included studies, we believe that the present review could help to design robust clinical trials to determine the efficacy of PDT in SCCHN.

Keywords Squamous cell carcinoma of the head and neck · Oral cancer · Photodynamic therapy, Tumor response · Photosensitizer