



UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA -
BIOFOTÔNICA

ANA PAULA MARIANO SANTOS GINEZ

**EFEITOS DA FOTOBIMODULAÇÃO COM LED AZUL NO
COMPORTAMENTO MALIGNO E FENÓTIPO TRONCO DE
CÂNCER EM LINHAGENS CELULARES DERIVADAS DE
CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE BOCA.**

São Paulo, SP

2025



ANA PAULA MARIANO SANTOS GINEZ

**EFEITOS DA FOTOBIMODULAÇÃO COM LED AZUL NO
COMPORTAMENTO MALIGNO E FENÓTIPO TRONCO DE
CÂNCER EM LINHAGENS CELULARES DERIVADAS DE
CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE BOCA.**

**Dissertação apresentada à Universidade Nove de Julho,
para obtenção do título de Mestre(a) em Medicina - Biofotônica.
Orientador(a): Prof.^a Dr.^a Maria Fernanda Setúbal Destro Rodrigues**

São Paulo, SP

2025



FICHA CATALOGRÁFICA

Ginez, Ana Paula Mariano Santos.

Efeitos da fotobiomodulação com led azul no comportamento maligno e fenótipo tronco de câncer em linhagens celulares derivadas de carcinoma epidermóide de boca. / Ana Paula Mariano Santos Ginez. 2025.

52 f.

Dissertação (Mestrado)- Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2025.

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

1. Carcinoma epidermóide de boca. 2. Fotobiomodulação. 3. Células-tronco do câncer. 4. Luz azul. 5. Agente antitumoral.

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

CDU 615.831

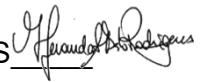
São Paulo, 16 de dezembro de 2025.

TERMO DE APROVAÇÃO

Aluno (a): Ana Paula Mariano Santos Ginez

Título da Dissertação: “Efeitos da fotobiomodulação com Led azul no comportamento maligno e fenótipo tronco de câncer em linhagens celulares derivadas de carcinoma epidermóide de boca”.

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



Membro: PROF. DR. RODRIGO LABAT MARCOS



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

Maria Stella Moreira

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus, pela sabedoria e força concedidas em todos os momentos desta jornada. Ao meu marido, pelo amor, paciência e apoio incondicional ao longo do caminho. Aos meus pais, por sempre acreditarem que o estudo é o melhor caminho para a realização dos sonhos.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Maria Fernanda Setúbal Destro Rodrigues, pela orientação cuidadosa, apoio constante e pelas valiosas contribuições científicas ao longo de todo o trabalho.

À Universidade Nove de Julho, pela estrutura acadêmica e pelo ambiente que possibilitou o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Biofotônica, pela formação sólida, suporte e acolhimento durante todo o projeto.

Ao Prof. Fabio Daumas Nunes (FOUSP), por disponibilizar o laboratório de Patologia Molecular e contribuir para o avanço das análises experimentais.

À pós-doutoranda Rebeca Barros, pela assistência técnica, troca de conhecimentos e colaboração fundamental no desenvolvimento dos experimentos.

Aos colegas e professoras do Programa pós-graduação em Medicina Biofotônica, pelo apoio, pelas discussões enriquecedoras e pelo convívio que tornou a jornada mais leve.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES), pelo financiamento que viabilizou a execução desta pesquisa.

FINANCIAMENTOS

O PRESENTE TRABALHO FOI REALIZADO COM APOIO:

- DA UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO (UNINOVE) - PROGRAMA DE BOLSAS PARA A FORMAÇÃO DO PESQUISADOR.

- E DA COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DE PESSOAL DE NÍVEL SUPERIOR (CAPES) – PROCESSO: 88887.085032/2024-00.

RESUMO

O carcinoma epidermóide de boca (CEB) é uma neoplasia maligna altamente agressiva, caracterizada por prognóstico ruim e resistência a terapias convencionais. Estudos demonstraram que os tumores no CEB contêm uma subpopulação de células-tronco do câncer (CTCs), responsáveis por sustentar o crescimento tumoral, metastatizar e contribuir para a falha do tratamento. Recentemente, a fotobiomodulação com LED azul demonstrou efeitos antitumorais; no entanto, seu impacto no CEB, particularmente na população com CTC, permanece amplamente inexplorado. O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito da fotobiomodulação com LED azul no comportamento tumoral e nas propriedades das CTCs no CEB. Duas linhagens celulares de CEB, SCC9 e HSC3, foram irradiadas com LED azul (460 nm, 350 mW, 105, 168 e 210 J/cm²). Após 24 horas, a viabilidade celular foi avaliada usando ensaios de MTS e cristal violeta. A necrose e a apoptose foram analisadas por coloração com Anexina V e DAPI por citometria de fluxo; A capacidade de migração foi avaliada por meio de um ensaio de cicatrização de feridas; e as propriedades das CTCs foram examinadas pelos ensaios de formação de colônias e esferas, RT-qPCR para biomarcadores de CTCs (*BMI1*, *CD44*, *OCT4* e *NANOG*) e citometria de fluxo para expressão de CD44 e ESA. Observou-se que a viabilidade celular em ambas as linhagens celulares foi reduzida após a irradiação com LED azul. A apoptose aumentou nas células SCC9 com a exposição ao LED azul, mas permaneceu a mesma nas células HSC3. Por outro lado, o LED azul reduziu significativamente a capacidade de migração de ambas as linhagens celulares. Em relação às propriedades das CTCs, o LED azul diminuiu o número de colônias apenas nas células SCC9, tanto nos parâmetros de irradiação de 105 J/cm² quanto de 210 J/cm², enquanto o número de esferas diminuiu em ambas as linhagens celulares. A expressão dos genes *BMI1*, *OCT4*, *NANOG* e *CD44* não foi alterada após a irradiação com LED azul. O LED azul também não afetou a frequência de células CD44^{high}/ESA^{high} em ambas as linhagens celulares; no entanto, a 210 J/cm², a frequência de células CD44^{low} em SCC9 foi maior, o que está associado a um fenótipo mais diferenciado. Desta maneira, os resultados indicam que a fotobiomodulação com LED azul exerce efeitos antitumorais no CEB, reduzindo a viabilidade, migração e a auto-renovação das células tumorais, além de aumentar a apoptose. Também diminuiu a formação de esferas e colônias, especialmente na linhagem celular SCC9. Esses achados sugerem que o LED azul pode modular o comportamento tumoral no CEB sem alterar significativamente a expressão gênica associada as CTCs, destacando seu potencial como terapia complementar no controle da progressão do CEB e justificando investigações adicionais em ambientes pré-clínicos e clínicos.

Palavras-chave: Carcinoma Epidermóide de boca, Fotobiomodulação, células-tronco do câncer, luz azul, Agente antitumoral, metástase.

ABSTRACT

Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is a highly aggressive malignant neoplasm characterized by poor prognosis and resistance to conventional therapies. Studies have demonstrated that OSCC tumors contain a subpopulation of cancer stem cells (CSCs), which are responsible for sustaining tumor growth, metastasis, and contributing to treatment failure. Recently, photobiomodulation with blue light has demonstrated antitumor effects; however, its impact on OSCC, particularly on the CSC population, remains largely unexplored. The aim of this study was to evaluate the effect of blue LED photobiomodulation on tumor behavior and CSC properties in OSCC. Two OSCC cell lines, SCC9 and HSC3, were irradiated with blue LED (460 nm, 350 mW, 105, 168, and 210 J/cm²). After 24 hours, cell viability was evaluated using MTS and crystal violet assays. Necrosis and apoptosis were analyzed through Annexin V and DAPI staining by flow cytometry; migration capacity was assessed through a wound-healing assay; and CSC properties were examined through colony and sphere formation assays, RT-qPCR for CSC biomarkers (*BMI1*, *CD44*, *OCT4*, and *NANOG*), and flow cytometry for CD44 and ESA expression. Cell viability in both cell lines was reduced after blue LED irradiation. Apoptosis increased in SCC9 cells after blue LED exposure but remained unchanged in HSC3 cells. Conversely, blue LED significantly reduced the migratory capacity of both cell lines. Regarding CSC-related properties, blue LED decreased the number of colonies only in SCC9 cells at both irradiation parameters (105 J/cm² and 210 J/cm²), whereas sphere formation was reduced in both cell lines. The expressions of *BMI1*, *OCT4*, *NANOG* and *CD44* remained unchanged after blue LED irradiation. Blue LED also did not affect the frequency of CD44^{high}/ESA^{high} cells in either cell line; however, at 210 J/cm², the frequency of CD44^{low} cells in SCC9 increased, which is associated with a more differentiated phenotype. Altogether, the results indicate that blue LED photobiomodulation exerts antitumor effects in OSCC by reducing viability, migration, and tumor cell self-renewal, in addition to increasing apoptosis. It also decreased sphere and colony formation, particularly in the SCC9 cell line. These findings suggest that blue LED may modulate tumor behavior in OSCC without significantly altering CSC-associated gene expression, highlighting its potential as a complementary therapy for controlling OSCC progression and supporting further investigation in preclinical and clinical settings.

Keywords: Oral squamous cell carcinoma, photobiomodulation, cancer stem cells, Blue Light, metastasis

DESTAQUES

1. O estudo foi conduzido em duas linhagens celulares derivadas de carcinoma epidermóide de boca, com comportamentos distintos, o que reforça a relevância do estudo.
2. Não existem estudos prévios que relacione o LED azul em células-tronco do câncer em carcinoma epidermóide de boca, contribuindo de forma inédita na compreensão dos mecanismos do LED azul nessa subpopulação.
3. Os resultados indicam que o LED azul não induz um perfil tronco nas linhagens avaliadas, indicando uma terapia complementar segura.
4. O LED azul reduziu características de células-tronco do câncer, como a capacidade de formação de colônias na SCC9 e a formação de esferas em ambas as linhagens, evidenciando um impacto direto na auto-renovação.
5. Com o parâmetro de irradiação 210 J/cm², o LED azul aumentou a proporção de células CD44^{low} na linhagem SCC9, induzindo um fenótipo mais diferenciado, menos agressivo e potencialmente menos tumorigênico, reforçando a segurança e a relevância do LED azul no CEB.

HIGHLIGHTS

1. The study was conducted using two oral squamous cell carcinoma–derived cell lines with distinct biological behaviors, which reinforces the relevance of the investigation.
2. There are no previous studies evaluating the effects of blue light on cancer stem cells in oral squamous cell carcinoma, making this work an unprecedented contribution to understanding blue light mechanisms in this subpopulation.
3. The results indicate that blue light does not induce a stem-like profile in the evaluated cell lines, supporting its potential as a safe complementary therapy.
4. Blue light reduced cancer stem–cell–associated features, such as colony-forming ability in SCC9 and sphere formation in both cell lines, demonstrating a direct impact on self-renewal capacity.
5. At the 210 J/cm² irradiation parameter, blue light increased the proportion of CD44^{low} cells in the SCC9 lineage, inducing a more differentiated, less aggressive, and potentially less tumorigenic phenotype, further reinforcing the safety and relevance of blue light in OSCC.

RESUMO PARA LEIGOS

O câncer de boca é uma doença agressiva e difícil de tratar, em grande parte porque contém um tipo especial de célula chamado célula-tronco do câncer. Essas células são mais resistentes aos tratamentos e conseguem fazer o tumor crescer novamente, espalhar e voltar depois da terapia. Nos últimos anos, o LED azul, utilizado em uma técnica chamada fotobiomodulação, tem mostrado efeitos capazes de prejudicar células tumorais. Porém, ainda não se sabia como essa luz influenciava especificamente essas células-tronco do câncer.

Neste estudo, avaliamos como o LED azul afeta as células-tronco do câncer de boca em laboratório. Duas linhagens diferentes de células tumorais foram expostas ao LED azul, e depois analisamos vários aspectos importantes: se continuavam vivas, se conseguiam se movimentar, se morriam mais, e se ainda tinham características de células-tronco do câncer.

E os resultados mostraram que o LED azul diminuiu a sobrevivência das células tumorais; aumentou a morte celular em uma das linhagens; reduziu a capacidade de migração, que é um comportamento ligado à metástase; diminuiu a formação de colônias e esferas, que são estruturas típicas de células-tronco do câncer; não aumentou genes ligados ao comportamento de células-tronco, mostrando que não torna o tumor mais resistente; gerou células com características mais diferenciadas (menos agressivas) em uma das linhagens, especialmente na dose mais alta.

Essas descobertas reforçam que tecnologias simples, como o LED azul, podem no futuro ajudar a tornar as terapias do câncer de boca mais eficazes e acessíveis. Novas pesquisas em modelos animais e, mais tarde, em pacientes, poderão confirmar esse potencial e transformar essa abordagem em uma ferramenta real no combate à doença.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.	Possíveis mecanismos de ação do LED azul em células tumorais já descritos na literatura.	25
Figura 2.	Delineamento experimental do estudo com irradiação por LED azul e análises realizadas.	27
Figura 3.	Aspectos morfológicos das células da linhagem celular HSC3 (A) e SCC9 (B) em cultivo celular.	27
Figura 4.	Imagem representativa do equipamento ECCO Quantum-EccoFibras (A) e posicionamento da fonte de luz na placa de cultura celular de 6 poços com película adesiva preta com múltiplas perfurações (B).	28
Figura 5.	Avaliação da viabilidade celular nas linhagens celulares HSC3 e SCC9 após irradiação com LED azul, avaliada pelos ensaios MTS (A e B) e Cristal Violeta (C e D). Observou-se uma redução significativa na viabilidade celular após a irradiação com LED azul em comparação com o grupo controle. Os asteriscos acima das barras indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo controle. Os dados são expressos pela média $\pm$ DP. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,001$.	35
Figura 6.	Avaliação da morte celular após irradiação nas linhagens celulares HSC3 (A) e SCC9 (B). Observou-se uma diminuição significativa na porcentagem de células apoptóticas em ambos os parâmetros de irradiação com LED azul em relação ao grupo controle em SCC9. Os dados são expressos pela média $\pm$ DP. * $p < 0,05$.	36
Figura 7.	Imagens representativas do “ensaio de ferida” nas linhas celulares HSC3 nos tempos 0 e 12 horas (A) e SCC9 nos tempos 0 e 9 horas (B) após irradiação com LED azul (ampliação de 40x). Quantificação da % de fechamento da ferida após exposição ao LED azul em ambas, HSC3 (C) e SCC9 (D). A migração celular foi significativamente inibida após irradiação com 168J/cm ² na linhagem celular HSC3 e após 210J/cm ² na linhagem celular SCC9. Os dados são expressos pela média $\pm$ DP. ** $p < 0,01$.	37
Figura 8.	Imagens representativas do ensaio de formação de colônias na linhagem HSC3 (A) e SCC9 (C) após 10 dias e quantificação do número de colônias na linhagem HSC3 (B) e SCC9 (D). O LED azul não alterou de maneira significativa a capacidade clonogênica da linhagem HSC3, mas houve redução na linhagem SCC9, especialmente em doses mais elevadas. Dados expressos como média $\pm$ DP. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.	38
Figura 9.	Avaliação da quantificação do número de esferas formadas após irradiação com LED azul nas linhagens celulares HSC3 (A) e SCC9 (B). O LED azul foi efetivo na redução da capacidade de crescer em suspensão nos grupos irradiados da linhagem HSC3, em relação ao grupo controle. Enquanto na linhagem SCC9, houve efeito significativo apenas na maior dose 210 J/cm ² . Dados expressos como média $\pm$ DP. * $p < 0,05$	39
Figura 10.	Avaliação por RT-qPCR de genes <i>BMI1</i> , <i>OCT4</i> , <i>NANOG</i> e <i>CD44</i> após 24 horas da irradiação com LED azul na linhagem	40

HSC3 **(A)** e SCC9 **(B)**. Não foi observada nenhuma modulação significativa dos genes *BMI1*, *OCT4*, *NANOG* e *CD44* após a irradiação com LED AZUL com todos os parâmetros avaliados. Dados apresentados como média $\pm$ DP.

Figura 11. Imagens representativas da análise de citometria de fluxo para detectar a frequência de CTCs com base na expressão de CD44 e ESA nas linhagens celulares HSC3 **(A)** e SCC9 **(B)**, e quantificação da porcentagem de células CD44^{high}/ESA^{high} e CD44^{low} após 24 horas de tratamento com LED azul nas linhagens HSC3 **(C)** e SCC9 **(D)**. Apenas em SCC9, a dose de 210 J/cm² aumentou a proporção de células CD44^{low}, sugerindo um efeito de diferenciação nessa linhagem. Dados expressos como média $\pm$ DP *p < 0,05. 41

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Descrição dos parâmetros dosimétricos utilizados para irradiação. 29
- Tabela 2.** Sequência, concentração e temperatura de anelamento dos *primers* utilizados na reação de qPCR. 32

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AJCC	American Joint Committee on Cancer
ALDH1	Aldeído desidrogenase 1
Anti-PD-1	Inibidor de checkpoint imunológico que bloqueia a proteína PD-1
ATCC	American Type Culture Collection
BSA	Bovino soro albumina
<i>BMI-1</i>	Proteína pertencente ao complexo repressivo policombo 1
cDNA	DNA complementar
CEB	Carcinoma epidermóide de boca
cm	Centímetros
CHOP	Proteína associada à apoptose, no processo de estresse do retículo endoplasmático
CTCs	Células-tronco do câncer
CV	Cristal Violeta
DMEM	Meio Modificado Enriquecido Dulbecco
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EGFR	Receptor de Fator de Crescimento Epitelial
EROs	Espécies Reativas de oxigênio
ESA	Antígeno Epitelial de Superfície
FBM	Fotobiomodulação
GRP78	Proteína regulada pela glicose 78, presente no retículo endoplasmático
HPV	Papiloma Vírus Humano
IMRT	Radioterapia de intensidade modulada (Intensity Modulated Radiotherapy)
J	Joules
LED	Diodo Emissor de Luz
LMA	Leucemia mieloide aguda
M	Metros
MHC-1	Complexo principal de histocompatibilidade classe 1
nm	Nanômetros
NOD	Camundongo diabético não-obeso (Non-Obese Diabetic)
PBS	Tampão Fosfato
PERK	Proteína atuante no retículo endoplasmático, durante o estresse celular
pH	Potencial Hidrogênico
PTEN	Gene e proteína supressora de tumor
s	Segundos
SCID	Camundongo imunodeficiente (Severe Combined Immunodeficiency)
SFB	Soro Fetal Bovino
TEM	Transição Epitélio Mesenquimal
TLS	Cirurgia a laser transoral (Transoral Laser Surgery)
TNM	Tumor, Nódulo e Metástase
TORS	Cirurgia Robótica Transoral (Transoral Robotic Surgery)
UICC	Union for International Cancer Control
um	Microlitros
UNINOVE	Universidade Nove de Julho
W	Watts

SUMÁRIO

1. CONTEXTUALIZAÇÃO	17
1.1 CÂNCER DE CAVIDADE ORAL	17
1.2 CÉLULAS-TRONCO DO CÂNCER	18
1.3 FOTOBIMODULAÇÃO COM LED AZUL	22
2. OBJETIVOS	26
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
3. METODOLOGIA	27
3.1 CULTIVO CELULAR	27
3.2. GRUPOS EXPERIMENTAIS	27
3.3. IRRADIAÇÃO COM LED AZUL	28
<i>Tabela 1: Descrição dos parâmetros dosimétricos utilizados para irradiação.</i>	29
3.4 ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR POR MTS E CRISTAL VIOLETA	29
3.5 ANÁLISE DA TAXA DE APOPTOSE E NECROSE POR CITOMETRIA DE FLUXO	30
3.6 ANÁLISE DA CAPACIDADE DE MIGRAÇÃO	30
3.7 ENSAIO DE FORMAÇÃO DE COLÔNIAS	30
3.8 ENSAIO DE FORMAÇÃO DE ESFERAS TUMORAIS	31
3.9 EXTRAÇÃO DE RNA, SÍNTESE DO CDNA E PCR EM TEMPO REAL PARA ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE GENES ASSOCIADOS COM O FENÓTIPO DE CTC E DIFERENCIAÇÃO CELULAR	31
3.10 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE CD44 E ESA POR CITOMETRIA DE FLUXO	32
3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA	33
4. RESULTADOS	34
4.1 ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR POR MTS E CRISTAL VIOLETA.	34
4.2 ANÁLISE DA TAXA DE APOPTOSE E NECROSE POR CITOMETRIA DE FLUXO	35
4.3 ANÁLISE DA CAPACIDADE DE MIGRAÇÃO	36
4.4 ENSAIO DE FORMAÇÃO DE COLÔNIAS	38
4.5 ENSAIO DE FORMAÇÃO DE ESFERAS TUMORAIS	39
4.6 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS GENES <i>BMI1</i> , <i>OCT4</i> , <i>NANOG</i> E <i>CD44</i>	40
4.7 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE CD44 E ESA POR CITOMETRIA DE FLUXO	41
5. DISCUSSÃO	43
6. CONCLUSÃO	47
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

1. CONTEXTUALIZAÇÃO

1.1 Câncer de cavidade oral

O carcinoma Epidermoide de boca (CEB), também conhecido como carcinoma espinocelular ou carcinoma de células escamosas, é um tumor maligno proveniente do tecido epitelial da mucosa oral (Johnson et al., 2020; Markopoulos, 2012). O CEB é o tipo histológico mais comum dos cânceres que acometem a cavidade oral, orofaringe, hipofaringe e laringe, representando mais de 90% dos casos (Bray et al., 2024; Johnson et al., 2020). No mundo, o câncer de cavidade oral e lábios está entre os 20 tipos de câncer mais comuns, foram estimados cerca de 389,485 novos casos e 188,230 óbitos, para ambos os sexos em 2022, sendo mais prevalente em homens do que em mulheres, principalmente em países subdesenvolvidos (Bray et al., 2024). No Brasil, ocupa a oitava posição dentre os tipos de câncer mais frequentes, sendo estimado para cada ano, do triênio de 2023 a 2025, 15.100 novos casos (Santos et al., 2023).

Os fatores de risco mais importantes para o desenvolvimento do câncer de cavidade oral são o uso do tabaco (em suas diferentes formas), consumo de álcool, infecção pelo Papiloma Vírus Humano (HPV) - especialmente nos cânceres de orofaringe - e o consumo de noz de bétel/areca observado em países do sul e sudeste da Ásia onde situa-se as maiores taxas de incidência de câncer de cavidade oral (Bray et al., 2024; Johnson et al., 2020; Pfister et al., 2020).

O tratamento do CEB é determinado de acordo com o estágio da doença, considerando basicamente tamanho, padrão de invasão, localização e envolvimento linfonodal (Arboleda et al., 2023; Johnson et al., 2020; Pfister et al., 2020). Consistindo em cirurgia e/ou radioterapia, quimioterapia e imunoterapia, com base do sistema de estadiamento TNM (8ª edição), disponibilizado pela Union for International Cancer Control (UICC) e American Joint Committee on Cancer (AJCC). Para o carcinoma epidermoide de boca, os estádios I e II indicam tumores primários relativamente pequenos, sem envolvimento linfonodal, enquanto os estádios III e IV abrangem tumores maiores, com invasão de estruturas adjacentes e/ou metástases regionais. Metástases à distância são menos comuns na apresentação inicial do que em cânceres de pulmão e esôfago. (Arboleda et al., 2023; Pfister et al., 2020). É recomendada o uso de terapias de modalidade única para casos em estágios iniciais e terapias conjuntas para maioria dos casos mais avançados, devendo ser planejado

por uma equipe multidisciplinar (Pfister et al., 2020). Em tratamentos de quimioterapia combinado com radioterapia, a Cisplatina é a droga mais comumente utilizada, quando contraindicado, o cetuximabe é uma alternativa indicada. E nos quadros avançados, recorrentes ou metastáticos, o cetuximabe é indicado como parte de combinações sistêmicas, geralmente com quimioterapia, especialmente em esquemas de tratamento duplos ou triplos. (Pfister et al., 2020; Szturz et al., 2019). O cetuximabe é um anticorpo monoclonal que bloqueia o EGFR (receptor de fator de crescimento epitelial), reduzindo a proliferação tumoral e modulando subpopulações celulares. Esse bloqueio diminui a expressão de CD44 (molécula de adesão celular), favorece a diferenciação e induz mudanças fenotípicas que reduzem a invasão e aumentam a sensibilidade a outras terapias, como a cisplatina (Setúbal et al., 2018).

O tratamento do CEB tem evoluído e avanços recentes têm demonstrado abordagens menos invasivas, como cirurgia a laser transoral (TLS), a cirurgia robótica transoral (TORS), a radioterapia de intensidade modulada (IMRT), terapias baseadas em luz, incluindo terapias fotodinâmica e sonodinâmica (Arboleda et al., 2023). Além disso, a imunoterapia também tem ganhado destaque como estratégia terapêutica especialmente em casos recorrentes ou metastáticos refratários à quimioterapia convencional, com o uso de inibidores de checkpoint imunológico, os anticorpos anti-PD-1, como o nivolumabe e o camrelizumabe, apresentaram boas respostas quando usados antes da cirurgia, com redução do tumor e poucos efeitos colaterais. Além disso, o estudo mostra que anticorpos anti-EGFR, como o nimotuzumabe, exercem efeitos imunomodulatórios relevantes ao estimular células NK, favorecer a maturação de células dendríticas e restaurar a expressão de MHC-I nas células tumorais, potencializando a resposta imune antitumoral. (Imbesi Bellantoni et al., 2023; Johnson et al., 2020).

Sobrevida dos pacientes com CEB, vai depender do estadiamento TNM, em estágios iniciais I-II, tumores menores, sem linfonodos têm bom prognóstico, com altas taxas de controle local, enquanto estágios III-IV, apresentam tumores maiores, invasivos e/ou com linfonodos apresentam pior sobrevida. (Pfister et al., 2020).

1.2 Células-tronco do câncer

A principal determinante da mortalidade em câncer de boca é a resistência terapêutica, que favorece a persistência tumoral, a recidiva local, a disseminação para linfonodos cervicais e, eventualmente, a ocorrência de metástases à distância. Esse

comportamento agressivo é amplificado pela heterogeneidade intratumoral e pela presença de células-tronco cancerígenas (CTCs), que contribuem para maior capacidade metastática e para a redução da resposta aos tratamentos convencionais, impactando negativamente o prognóstico. (Siqueira et al., 2023).

Dentro dessa heterogeneidade, as células-tronco do câncer (CTCs) possuem um papel fundamental, pois possuem capacidade de autorrenovação, proliferação, diferenciação, formação de colônias e potencial para restabelecer a heterogeneidade tumoral in vivo, apresentam elevada plasticidade para alternar entre estados tronco e não tronco, habilidade para evadir a morte celular, alto potencial metastático e a capacidade de permanecer em dormência por longos períodos, tornando-se particularmente resistentes à terapia (Amôr et al., 2021; Tahmasebi et al., 2020).

A partir dos estudos iniciais com as CTC, um conceito hierárquico da carcinogênese foi proposto, no qual sugere que as células-tronco do câncer (CTCs) ocupam o topo de uma pirâmide celular heterogênea presente no tumor, apresentando características de células-tronco e capacidade de divisão assimétrica (Mallika et al., 2024).

Algumas hipóteses apontam mecanismos que podem originar as CTCs como a fusão celular, união entre células-tronco e diferenciadas, resultando em células com potencial de autorrenovação e transformação maligna; a transferência horizontal de genes, em que o DNA de células apoptóticas é incorporado por células normais, levando à reprogramação genética; instabilidade genômica, caracterizada por aneuploidia e perda de heterozigosidade, também aumenta a suscetibilidade à transformação neoplásica e o microambiente inflamatório que pode induzir a conversão de células-tronco normais em CTCs (Mallika et al., 2024). As CTCs possuem propriedades de célula-tronco e da célula tumoral, podendo ser herdada quando mutações em células-tronco normais levam à formação das CTCs, ou adquirida, quando células diferenciadas readquirem características de células-tronco por de-diferenciação. (Mallika et al., 2024)

Para identificar e isolar CTCs, é comumente usados marcadores fenotípicos de superfície isolados ou em combinação. Mais de 40 marcadores de superfície são conhecidos por identificar CTCs em tumores sólidos, e a maioria é derivada de células-tronco embrionárias ou adultas. Em geral, a alta positividade de CD44, CD24, CD133, CD90, EpCAM e Aldeído Desidrogenase 1 (ALDH1) e a eliminação do corante

Hoechst 3334 por meio de transportadores ABC são os marcadores mais usados. (Siqueira et al., 2023).

No CEB, vários marcadores já foram utilizados para identificar as CTC em linhagens celulares e em amostras tumorais, incluindo *CD44*, *ALDH1*, *CD133*, c-Met e *BMI-1*, foram descritos na literatura. Embora nenhum marcador isolado seja capaz de identificar todas as CTC, uma vez que elas apresentam diferentes subpopulações com fenótipos e propriedades biológicas distintas (Baillie et al., 2017; Tahmasebi et al., 2020). Assim, uma combinação de marcadores de superfície é indicada para o isolamento destas células.

O marcador de superfície celular CD44 é uma molécula de adesão cujo principal ligante é o ácido hialurônico, estando envolvido com o controle e ativação de processos celulares importantes para a transformação maligna e progressão tumoral, incluindo proliferação, migração, invasão e resistência à terapia (Mallika et al., 2024; Mesrati et al., 2021). Foi inicialmente utilizado por Prince et al. 2007 para a identificação de CTC no CEB, no qual as células tumorais com alta expressão de CD44 (*CD44^{high}*) representam as CTC e as células com baixa expressão de CD44 (*CD44^{low}*) representam a população de células tumorais não tronco (Prince et al., 2007).

Outros trabalhos identificaram diferentes populações com características de CTC baseando-se em diferentes marcadores de superfície celular, *ALDH1*, *ESA*, *SOX2*, *OCT4*, *NANOG*, *ZEB1/2*, MMPs e receptores como EGFR, HER2, c-MET., em associação com o *CD44* (Mesrati et al., 2021; Yaghobi et al., 2021). A enzima ALDH1 é uma isoenzima citosólica intracelular, que pode ser encontrada no fígado, células positivas para ALDH apresentam resistência a radioterapia e a medicamentos das células-tronco pela oxidação de aldeídos intracelulares (Chute et al., 2006). A expressão do gene *BMI-1*, associado à manutenção do fenótipo tronco, em subpopulações ALDH1+ está associada a maior crescimento tumoral, migração, invasão e metástase em câncer de cabeça e pescoço, sugerindo seu potencial como marcador prognóstico. (Baillie et al., 2017; Patel AD; Rotenberg S; Messer RL, 2014) Os fatores *OCT3/4*, *SOX2* e *NANOG* atuam de forma conjunta na manutenção da autorrenovação e pluripotência das células-tronco. Em câncer de cabeça e pescoço, a expressão de OCT-4 está associada à regulação positiva de ALDH1+ e, em conjunto ao TRA1-60, indica maior capacidade de invasão. Esses marcadores apresentam maior expressão em carcinomas pouco diferenciados, sugerindo relação com agressividade tumoral (Loh et al., 2006; Mallika et al., 2024)

No CEB, as CTC apresentam fenótipos distintos e de particular interesse, Biddle et al. (2011) demonstraram que a população de CTC CD44^{high} no CEB apresenta pelo menos dois fenótipos, os quais diferem entre si em relação à motilidade celular, morfologia, proliferação, capacidade clonogênica e formação de esferas. As CTC com fenótipo CD44^{high}/ESA^{high} (células com morfologia epitelial) apresentam alta capacidade proliferativa e são responsáveis por sustentar o crescimento tumoral. As CTC com fenótipo CD44^{high}/ESA^{low} (células com morfologia mesenquimal) apresentam um perfil migratório e sofrem o processo de TEM, sendo assim responsáveis pela invasão tumoral, desenvolvimento de metástases e resistência à terapia convencional (Biddle et al., 2011). Interessantemente, essas duas populações celulares são plásticas e podem transitar entre um fenótipo e outro de acordo com estímulo do microambiente, sofrendo assim a transição epitélio-mesenquimal (TEM) bem como o processo reverso de transição mesenquimal-epitelial (TME), essenciais para a disseminação e colonização metastática. (Mallika et al., 2024)

A Transição epitélio-Mesenquimal consiste em um processo fisiológico que ocorre durante o desenvolvimento embrionário e no reparo de feridas no qual as células epiteliais adquirem um fenótipo mesenquimal. As células tumorais que sofrem a TEM adquirem características de CTC, habilidade migratória e invasiva bem como são altamente resistentes à apoptose (Dongre & Weinberg, 2019). As mudanças fenotípicas associadas com a TEM dependem de mecanismos epigenéticos, do microambiente tumoral e da reprogramação da expressão gênica, a qual é classicamente caracterizada pela ativação dos fatores de transcrição Snail/Slug, Twist e ZEB (Dongre & Weinberg, 2019).

Atualmente, sabe-se que tanto a radioterapia quando a quimioterapia, comumente utilizados no tratamento do CEB, resultam com frequência no enriquecimento das CTC, o que justifica a elevada taxa de recorrência e metástases para linfonodos (Biddle et al., 2011; Gemenetzidis et al., 2015). Mecanismos como elevada expressão de bombas de efluxo de drogas, alta eficiência da maquinaria de reparo do DNA e interação das CTC com o microambiente são exemplos de mecanismos associados à resistência destas células ao tratamento convencional (Atashzar et al., 2020).

Sabe-se que as terapias convencionais têm como alvo células tumorais mais maduras, que constituem a maior parte do tumor, mas não têm foco nas CTCs, (Mallika et al., 2024). Assim, devido à importância das CTCs e suas subpopulações

nos mecanismos de invasão, metástase e resposta à terapia, o desenvolvimento de estratégias terapêuticas que atuem nas CTCs ou até mesmo, não enriqueçam essa população de células, são desejáveis no contexto do tratamento do paciente oncológico, especialmente às terapias convencionais.

1.3 Fotobiomodulação com LED azul

A FBM consiste na interação da luz com tecidos biológicos, sendo capaz de modular o processo inflamatório, o sistema imunológico e a microcirculação vascular e linfática, também sendo capaz de promover a proliferação celular, reduzir a dor e acelerar o processo de reparação tecidual representando uma nova metodologia terapêutica a qual vem sendo abordada em diversas áreas da saúde (Glass, 2021).

A FBM utiliza fontes de luz monocromáticas de baixa intensidade, como os Lasers (Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation) e os LEDs (Light Emitting Diode), tanto o laser de baixa intensidade quanto o LED podem ser utilizados para a FBM, a diferença entre os equipamentos é dada pela coerência do feixe luminoso emitido, onde os equipamentos de Laser são capazes de emitir a luz de forma monocromática, em fase colimada, portando, de forma coerente, mas os equipamentos de LED não são capazes de emitir a luz de forma colimada, portanto não são coerentes. A eficácia do uso do Laser e/ou LED no processo de reparação tecidual já foi avaliada em estudos *in vivo* e *in vitro*, sendo observado que ambos os equipamentos são capazes de promover a proliferação de fibroblastos, produção de colágeno e angiogênese, favorecendo o processo de reparo, portanto, ambos os equipamentos podem ser utilizados para a FBM (Glass, 2021). Além disso, a FBM independe de sensibilizadores externos ou de um cromóforo específico nos tecidos, tendo uma ampla aplicação. (Wang et al., 2025)

No câncer, a maioria dos estudos têm focado na utilização da FBM em comprimento de onda vermelho e infra-vermelho, uma vez que correspondem aos parâmetros utilizados para o tratamento dos efeitos adversos associados ao tratamento oncológico (Hamblin et al., 2018). Entretanto, recentemente, a literatura tem mostrado evidências de que a FBM utilizando a luz azul no comprimento de onda azul (450-470 nm), tem se mostrado uma possível estratégia terapêutica para inibir o comportamento maligno e a progressão tumoral. (He et al., 2020, 2021; Xia et al., 2021)

No estudo realizado por Oh et al. (2015), foi observado efeito anti-proliferativo e pro-apoptótico do LED azul a 450nm e 15,6 mW/cm² na linhagem de melanoma B16F10, sendo que após 4 horas da irradiação, o efeito inibitório do LED azul na viabilidade foi de quase 80%. Adicionalmente, houve aumento do potencial de membrana mitocondrial, da expressão de proteínas pró-apoptóticas como citocromo c e caspase 3, produção de EROs e inibição *in vivo* do crescimento tumoral após 9 sessões de terapia com LED azul (Oh et al., 2015). Além disso, Kim et al. (2020) também demonstraram maior taxa de apoptose após a FBM com LED azul 460nm, 5 e 10 mW/cm² e 12J/cm² por meio da inibição da via de sinalização Akt/mTOR, sendo o efeito inibitório também observado na proliferação celular e no desenvolvimento e progressão tumoral *in vivo*. (Kim et al., 2021)

A apoptose induzida pela FBM foi também avaliada por He et al (2020), o qual demonstrou os efeitos do LED azul 470 nm em células de hepatocarcinoma humano com diferentes exposições radiantes (0-288J/cm²). Foi observado aumento significativo do apoptose no grupo 144J/cm², possivelmente por aumento do dano no DNA causado pelo LED azul, além da diminuição da capacidade de formação de esferas tumorais, invasão e migração celular (He et al., 2020). Neste contexto, Oh et al. (2017) avaliaram os efeitos da FBM com o LED azul na migração e na invasão em células de câncer de colón animal (CT-26) e células de fibrossarcoma humano (HT-1080), utilizando comprimento de onda de 450 nm e 6.3 mW/cm². Houve redução da viabilidade celular e efeitos anti-metastáticos foram associados à inibição da expressão de MMP-2 e MMP-9 bem como da fosforilação de P38 e MAPK após a irradiação (Oh et al., 2017).

Xia et al. (2021) também avaliaram os efeitos da irradiação com o LED azul na progressão de células de câncer de mama e TEM, utilizando 450 nm, 100 mW/cm² e diferentes exposições radiantes. Os parâmetros 4 J/cm² e 8 J/cm² promoveram uma significativa redução na viabilidade celular bem como na migração, proliferação e no processo de TEM via inibição da via de sinalização MAPK/MEK/ERK. (Xia et al., 2021)

Além da indução do apoptose, a FBM com LED azul também foi associada com indução da autofagia em células tumorais no estudo realizado por He et al. (2021). Após a irradiação a 470nm, 100mW/cm² e exposição radiante entre 180-1080J/cm², foi observado aumento da expressão de marcadores de autofagia como Beclin-1, LC3-II/LC3-I e p62 em células de osteossarcoma. Interessantemente, o bloqueio da

autofagia foi associado com uma significativa diminuição do efeito antitumoral mediado pela irradiação com LED azul (He et al., 2021).

No estudo Yoshimoto et al. (2018) também foi observada indução da autofagia e presença de elevada quantidade de autofagossomos após a FBM com LED azul 465 nm e 30 mW/cm² (Yoshimoto et al., 2018).

O estudo de Mo et al. (2021) investigou os efeitos da fotobiomodulação com LED azul de 470 nm sobre células-tronco cancerígenas CD133⁺ derivadas de câncer colorretal humano. A irradiação foi realizada com 10 mW/cm², duração de 5 minutos, resultando em doses de 3, 9 e 15 J/cm², sendo 3 J/cm² o parâmetro mais eficaz e seletivo para inibir CTCs. O LED azul reduziu de forma significativa a viabilidade, proliferação e invasão das células CD133⁺, com supressão acentuada das atividades de MMP-2 e MMP-9. O estudo demonstrou que a luz azul diminui a expressão de COX-2 e a síntese de PGE₂, inibindo a via COX-2/PGE₂, responsável por regular migração, invasão e fenótipo pró-metastático de CTCs. (Mo et al., 2021)

No CEB, Jiang e Fu (2024), investigaram a luz azul no comprimento de onda de 420 nm na linhagem SCC-25, em doses entre 3 e 84 J/cm². Os autores observaram que a irradiação com luz azul reduziu a viabilidade e a migração celular, além de promover bloqueio do ciclo celular. Também desencadeou aumento sustentado de espécies reativas de oxigênio, ativando vias clássicas de estresse do retículo endoplasmático, incluindo PERK, IRE1 α , ATF4, ATF6 e CHOP. Concomitantemente, induziu disfunção mitocondrial, caracterizada por redução do potencial de membrana, diminuição de ATP, alterações morfológicas e modulação de proteínas pró- e antiapoptóticas ($\downarrow$ Bcl-2, $\uparrow$ Bax, $\uparrow$ caspase-3 clivada). (Jiang, Fu, et al., 2024)

Outro estudo de Jiang et al. (2024) avaliou os efeitos da luz azul também em linhagem de SCC-25, utilizando outros parâmetros de LEDs: 457 nm e 475 nm. A irradiância de 25 mW/cm² (30 J/cm²) foi selecionada para os experimentos. Os autores demonstraram que ambos os comprimentos de onda reduziram a viabilidade e aumentaram a produção de EROs, mas o 457 nm exerceu efeito mais potente e sustentado, inibindo a proliferação tumoral por meio do aumento de espécies reativas de oxigênio, indução de estresse de retículo endoplasmático, bloqueio de ciclo em G2/M e ativação da via AHR, sem induzir apoptose nas condições testadas. (Jiang, Yang, et al., 2024)

Diante disso, as evidências científicas indicam que a luz azul apresenta potencial para modular o comportamento de células tumorais, promovendo apoptose, inibindo

a proliferação, migração e invasão celular (Figura 1). Entretanto, seu efeito na manutenção do fenótipo tronco e em CTCs é ainda escasso na literatura, especialmente no CEB.

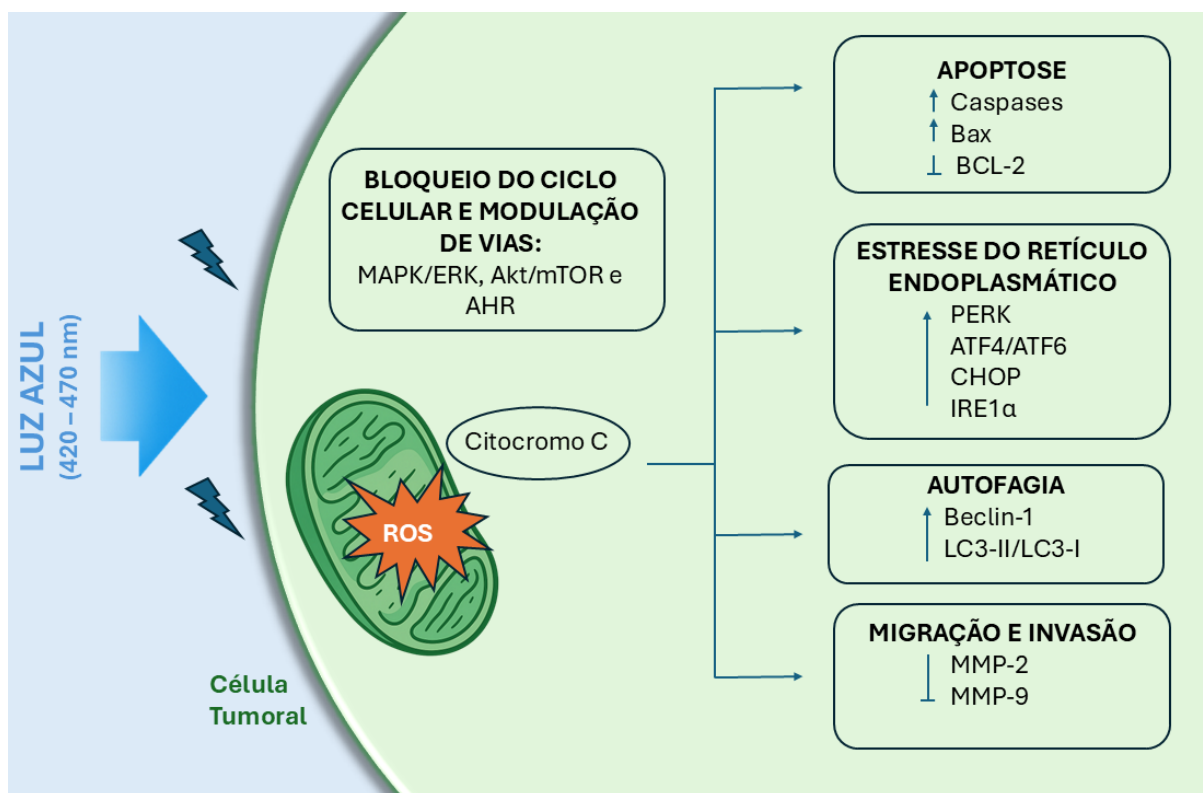


Figura 1: Possíveis mecanismos de ação do LED azul em células tumorais já descritos na literatura.

2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi avaliar *in vitro* os efeitos da fotobiomodulação com LED azul em linhagens celulares derivadas de carcinoma epidermóide de boca com o enfoque no comportamento maligno e nos efeitos desta terapia em subpopulações de células-tronco de câncer.

2.1 Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos do LED azul na viabilidade celular de linhagens celulares derivadas de carcinoma epidermóide de boca por meio do ensaio de MTS e Cristal Violeta;
- Avaliar taxa de apoptose e necrose, com anexina V, nas linhagens celulares derivadas de carcinoma epidermóide de boca submetidas ao LED azul, por meio de citometria de fluxo;
- Avaliar os efeitos do LED azul na capacidade de migração celular em linhagens celulares derivadas de carcinoma epidermóide de boca;
- Avaliar os efeitos do LED azul na capacidade clonogênica de linhagens de carcinoma epidermóide de boca.
- Avaliar os efeitos do LED azul na formação de esferas tumorais de linhagens de carcinoma epidermóide de boca.
- Avaliar a expressão de genes associados com o fenótipo tronco e diferenciação epitelial em linhagens celulares derivadas de carcinoma epidermóide de boca submetidas ao LED azul.
- Avaliar os efeitos do LED azul em linhagens celulares derivadas de carcinoma epidermóide de boca na expressão de CD44 e ESA, por meio de citometria de fluxo;

3. METODOLOGIA

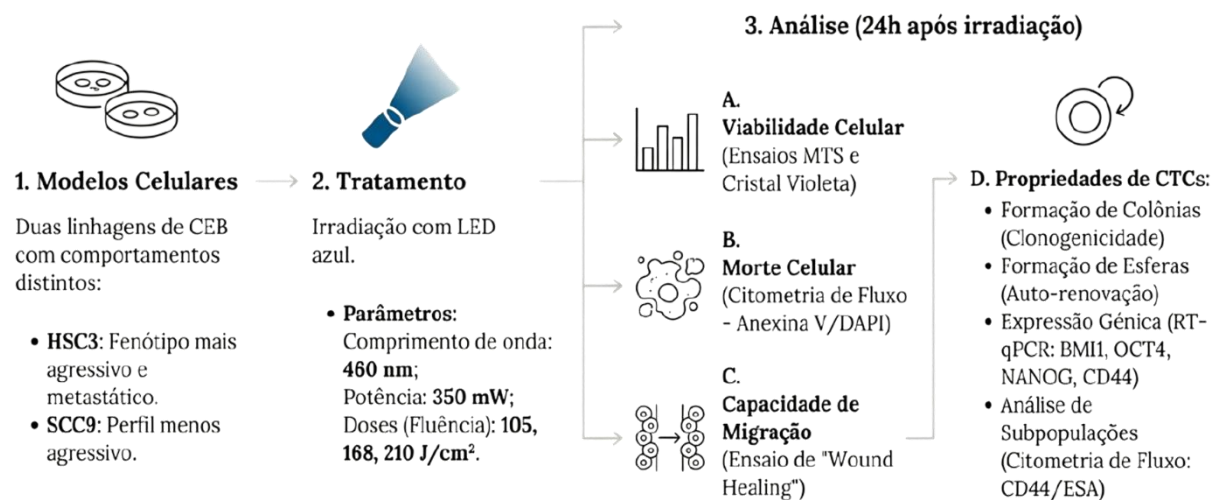


Figura 2: Delineamento experimental do estudo com irradiação por LED azul e análises realizadas.

3.1 Cultivo celular

A linhagem celular derivada de carcinoma epidermóide de boca HSC3 (Figura 2A) e SCC9 (Figura 2B) (American Type Culture Collection- ATCC) foram cultivadas em meio DMEM/F12 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 1% de antibiótico/antimicótico e hidrocortisona (400ng/mL). Todas as linhagens celulares foram mantidas a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO₂ e 95% de umidade.

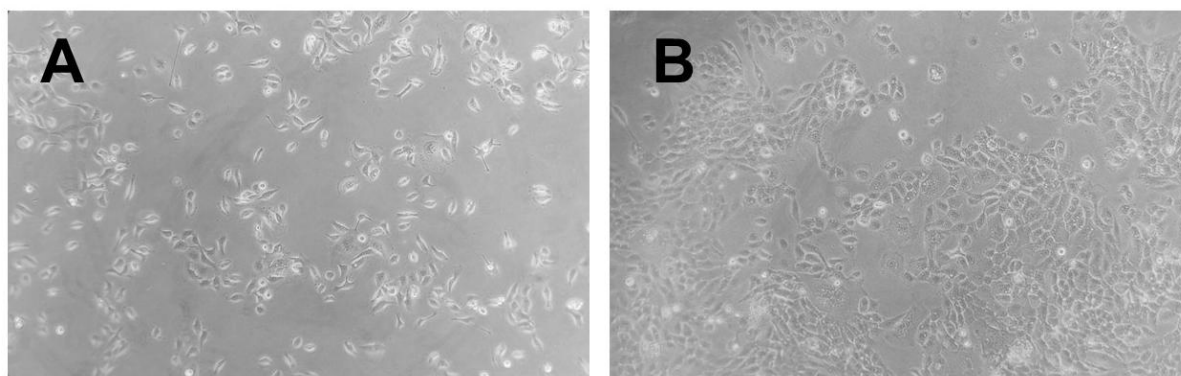


Figura 3: Aspectos morfológicos das células da linhagem celular HSC3 (A) e SCC9 (B) em cultivo celular.

3.2. Grupos experimentais

- Grupo controle- Células das linhagens HSC3 e SCC9, não irradiadas e mantidas sob as mesmas condições experimentais dos grupos irradiados.
- Grupo LED- Células das linhagens HSC3 e SCC9 que foram irradiadas com exposição radiante de 105 J/cm², 168 J/cm² e 210 J/cm².

3.3. Irradiação com LED Azul

A irradiação foi realizada utilizando-se o equipamento ECCO Quantum-EccoFibras (Figura 2A) em comprimento de onda 460nm, 0,7 W/cm² e exposições radiantes de 105, 168 e 210 J/cm² (Tabela 1). A perda estimada de energia causada pelo plástico dos frascos de cultivo foi descontada de acordo com Silva et al. (2012). (Silva et al., 2012). Para garantir que a irradiação fosse aplicada igualmente em cada grupo e em todos os experimentos, foram feitas películas adesivas pretas ajustadas para cada poço das placas, nas quais foram feitas múltiplas perfurações com o diâmetro equivalente ao da ponta do LED (Figura 2B).

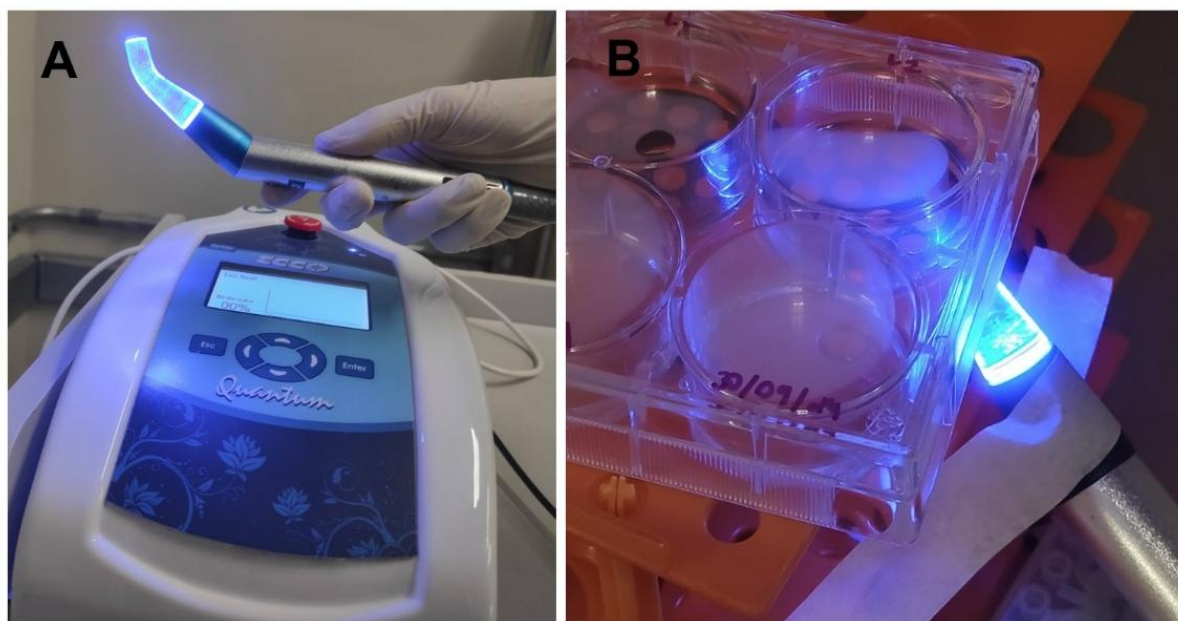


Figura 4: Imagem representativa do equipamento ECCO Quantum- EccoFibras (A) e posicionamento da fonte de luz na placa de cultura celular de 6 poços com película adesiva preta com múltiplas perfurações (B).

Tabela 1: Descrição dos parâmetros dosimétricos utilizados para irradiação.

Parâmetros	
Comprimento de onda [nm]	460
Modo de operação	Contínuo
Potência [mW]	350
Diâmetro da abertura [cm]	0,8
Irradiância na abertura [W/cm ²]	0,7
Área do feixe [cm ²]	0,50
Tempo de exposição [s]	150; 240; 300
Exposição radiante (fluência) [J/cm ²]	105; 168; 210
Número de pontos irradiados	1
Energia total irradiada [J]	52,5; 84; 105
Técnica de aplicação	Contato direto

3.4 Análise da viabilidade celular por MTS e Cristal Violeta

A análise de viabilidade celular foi feita pelos ensaios de MTS e Cristal Violeta. Desta maneira, 9×10^3 células por poço foram semeadas em placas de 96 poços e após 24 horas, foi feita a irradiação nos parâmetros descritos acima. A viabilidade celular foi avaliada após 24 horas da irradiação do LED azul. No ensaio de MTS, o meio de cultura foi removido e as células foram lavadas com solução tampão fosfato (PBS, pH 7,4). Posteriormente, foi adicionado meio de cultura sem soro contendo 5 μ L de MTS (Promega) e as células foram incubadas a 37°C por 2 horas. Após esse período, foi realizada a leitura da absorbância no comprimento de onda de 490 nm utilizando o equipamento Synergy H1 (BioTek).

Para avaliação da viabilidade celular pelo ensaio de coloração com Cristal Violeta, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% por 15 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, as células foram lavadas com PBS e coradas com cristal violeta (CV) a 0,5% por 20 minutos, lavadas em água corrente e deixadas em temperatura ambiente por 24 horas para secagem. Por fim, o CV foi solubilizado em metanol por 20 minutos em agitação no equipamento Red Rocker (Hoefer). A análise da viabilidade celular foi avaliada por meio de absorbância em comprimento de onda

de 570 nm, utilizando-se o equipamento Synergy H1 (BioTek). A viabilidade celular foi calculada em porcentagem de células viáveis em relação ao grupo controle.

3.5 Análise da taxa de apoptose e necrose por citometria de fluxo

Para avaliação dos efeitos do LED azul na taxa de apoptose e necrose, as linhagens celulares HSC3 e SCC9, pertencentes aos diferentes grupos, foram cultivadas em placa de 6 poços, na densidade de $1,5 \times 10^5$ células por poço, e incubadas por 24 horas. Após 24 horas da irradiação, as células foram coletadas e incubadas com o anticorpo anti-Anexina V-PE (1:200, BD Biosciences) por 30 minutos em tampão de ligação para Anexina V. Após este período, as células foram lavadas e ressuspensas no mesmo tampão contendo 200ng/mL de DAPI e analisadas no citômetro FACS Canto (BD Biosciences). As células positivas para Anexina V foram identificadas como apoptóticas, positivas para DAPI como necróticas, positivas para Anexina V e DAPI em apoptose tardia e negativa para ambos representaram as células viáveis. Um mínimo de 10.000 eventos foi analisado no equipamento FACS Canto utilizando-se o software FlowJo v.9.0.

3.6 Análise da capacidade de migração

Para avaliação da capacidade de migração, células das linhagens HSC3 e SCC9, pertencentes aos grupos controle e LED, foram cultivadas em placas de 12 poços, a uma densidade de $2,5 \times 10^5$ células por poço. Após 24 horas, as células foram irradiadas e imediatamente foi realizada uma “ferida” na monocamada com a ponteira da pipeta de 200uL com a finalidade de descontinuar a monocamada. Logo após a realização da ferida (Tempo 0) e 9 horas depois para a linhagem celular SCC9 e 12 horas depois para a linhagem HSC3 (Tempo 1), a área foi fotografada utilizando-se o equipamento Nikon eclipse TS100 (Nikon). O software Image J foi usado para quantificar a área da ferida nos diferentes períodos. Para análise da porcentagem de fechamento da ferida, o seguinte cálculo foi realizado: $(A - B) / A \times 100$; onde A equivale à medida da área da ferida imediatamente após a realização da ferida (tempo 0) e B corresponde à medida da área da ferida após 9 horas e 12 horas (tempo 1).

3.7 Ensaio de formação de colônias

Para a análise do potencial clorogênico, as linhagens celulares HSC3 e SCC9 foram cultivadas em placas de 6 poços, na densidade de $1,5 \times 10^5$ células por poço, incubadas por 24 horas e submetidas à irradiação com LED azul com os parâmetros descritos acima e previamente estabelecidos. Após 24 horas da irradiação com LED azul foi feita por meio do plaqueamento de 250 células de cada grupo experimental em placas de 6 poços, as quais foram mantidas em cultura por 10 dias. Após este período, as células foram fixadas com paraformaldeído a 4% por 15 minutos, lavadas em PBS e coradas com cristal violeta 1,5% por 5 minutos. A análise foi feita por meio da avaliação das colônias medindo 2mm ou mais, contadas independentemente por 2 investigadores.

3.8 Ensaio de formação de esferas tumorais

Para avaliação da capacidade de crescer em suspensão e formar esferas tumorais, as linhagens celulares HSC3 e SCC9 foram cultivadas em placas de 6 poços, na densidade de $1,5 \times 10^5$ células por poço, incubadas por 24 horas e submetidas à irradiação com LED azul com os parâmetros descritos acima e previamente estabelecidos. Após 24 horas da irradiação, 250 células de cada grupo experimental foram semeadas em placas de baixa adesão de 24 poços por 10 dias. Após este período, as esferas tumorais foram visualizadas em microscópio óptico, fotografadas e contadas utilizando-se o software Image J.

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

As linhagens celulares HSC3 e SCC9, pertencentes aos diferentes grupos experimentais, foram cultivadas em placas de 6 poços, na densidade de $1,5 \times 10^5$ células por poço, e incubadas por 24 horas. Após 24 horas da irradiação, o RNA de cada grupo foi extraído, utilizando-se o reagente Trizol, de acordo com as instruções do fabricante. Posteriormente, 1µg de RNA total foi reversamente transcrito em DNA complementar (cDNA) por meio do kit RevertAid RT Reverse Transcription Kit (Thermo Scientific™). As reações de PCR quantitativo em tempo real foram realizadas no QuantStudio 1 utilizando o reagente SYBR Green (Applied Biosystems) e primers específicos para os genes associados com o fenótipo tronco (*BMI1*, *CD44*, *OCT4*, *NANOG*) (Tabela 2). O gene constitutivo *RPL41* foi utilizado para normalização dos

dados e a análise da expressão gênica será feita de acordo com método Pfaffl (Pfaffl, 2001).

Tabela 2: Sequência, concentração e temperatura de anelamento dos *primers* utilizados na reação de qPCR.

Gene	Primers 5' → 3'	Concentração (nM)	T _m (°C)
BMI1	F: gctgccaatggctctaatgaa	400	60
	R: tgctgggcatcgtaagtatctt		
CD44	F: caaccgttggaacataacc	400	60
	R: caagtgggaactggaacgat		
OCT4	F: acttcactgcactgtactcctc	200	60
	R: acttcactgcactgtactcctc		
NANOG	F: catcctgaacctcagctacaaaca	400	60
	R: ttgctattcttcggccagttgt		
RPL41	F: ccatgagagccaagtggaggaa	400	60
	R: tggacctctgcctcatctttc		

3.10 Análise da expressão de CD44 e ESA por citometria de fluxo

Para avaliar o efeito do LED azul em relação à porcentagem de células CD44^{high}/ESA^{high} e CD44^{low}, as linhagens celulares HSC3 e SCC9 dos grupos controle e irradiado, foram cultivadas em placas de 6 poços, na densidade de $1,5 \times 10^5$ células por poço, e incubadas por 24 horas. Após 24 horas da irradiação foram incubadas com os anticorpos anti-CD44-FITC (1:50, BD Biosciences) e anti-ESA-APC (1:800, Mylteni) por 30 minutos no escuro a 4°C. Após a incubação, as células foram ressuspensas em PBS contendo 1% de albumina sérica bovina (BSA) suplementada com DAPI (200ng/mL) e analisadas no citômetro FACS Canto (BD Biosciences). Um mínimo de 10.000 eventos foram analisados utilizando-se o software FlowJo v.9.0. Para realizar a identificação da população CD44^{high}/ESA^{high}, foi selecionada 5% da população com maior intensidade de marcação de CD44 e ESA. Adicionalmente, as células com fenótipo não tronco foram determinadas selecionando-se os 5% de

células que apresentaram menor expressão de CD44, correspondendo às células epiteliais diferenciadas (Rodrigues et al., 2018).

3.11 Análise estatística

Um mínimo de três experimentos independentes em quintuplicata, foram realizados para o ensaio de viabilidade celular. Os demais ensaios foram realizados em triplicata com três experimentos independentes. Os dados obtidos foram submetidos aos testes de normalidade de Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov. Para os conjuntos de dados que apresentaram distribuição normal, foi aplicada a análise de variância de uma via (one-way ANOVA), seguida pelo teste de Tukey. Para os dados que não apresentaram distribuição normal, foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn para comparações múltiplas. As análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism, versão 9.0, adotando-se um nível de significância de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Análise da viabilidade celular por MTS e Cristal Violeta.

Na linhagem HSC3, a viabilidade celular da linhagem HSC3 foi avaliada pelos ensaios de MTS e cristal violeta após irradiação com LED azul nas doses de 105, 168 e 210 J/cm². A análise de variância (ANOVA one-way) revelou redução significativa entre os grupos em ambos os testes ($p < 0.0001$). No ensaio de MTS, todas as doses de LED azul reduziram significativamente a viabilidade celular em relação ao controle ($p < 0.0001$), sem diferenças entre as doses irradiadas, indicando que o efeito citotóxico se manifesta mesmo na menor intensidade de energia (Figura 2A). No ensaio de cristal violeta, observou-se também redução significativa da viabilidade celular nas doses de 105, 168 e 210 J/cm², sendo o efeito mais pronunciado nas maiores doses (Figura 2C).

A viabilidade celular da linhagem SCC9 foi avaliada por meio dos ensaios de MTS e cristal violeta após irradiação com LED azul nas doses de 105, 168 e 210 J/cm². A análise de variância (ANOVA one-way) revelou diferença significativa entre os grupos para o ensaio de MTS e CV ($p < 0,0001$). No ensaio de MTS, todas as doses de LED azul promoveram redução significativa da viabilidade celular em comparação ao grupo controle ($p < 0,0001$), sem diferença estatística entre as doses irradiadas, indicando que o efeito inibitório ocorre mesmo nos menores parâmetros (Figura 2B). Já no ensaio de cristal violeta, observou-se uma redução progressiva da viabilidade, com diferenças significativas a partir de 168 J/cm² ($p < 0,0001$), e maior efeito na dose de 210 J/cm². Em relação à comparação entre diferentes parâmetros de irradiação, 210J/cm² foi associado à diminuição da viabilidade celular em relação ao 105 J/cm² e a 168 J/cm² (Figura 2D). Baseando-se nestes resultados, os parâmetros de irradiação 105 J/cm² e 168 J/cm² para células HSC3 e 105 J/cm² e 210 J/cm² para células SCC9 foram selecionadas para experimentos subsequentes.

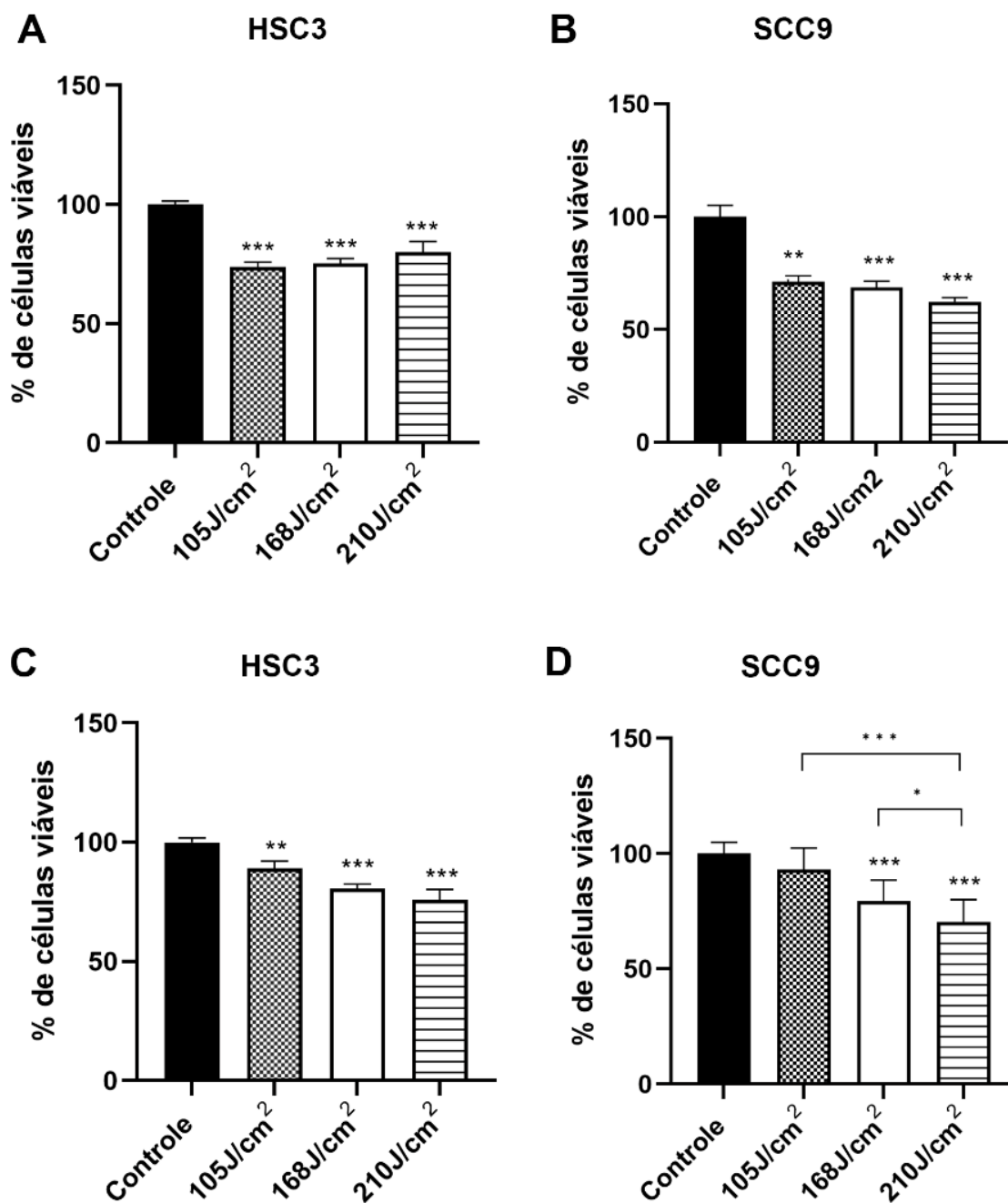


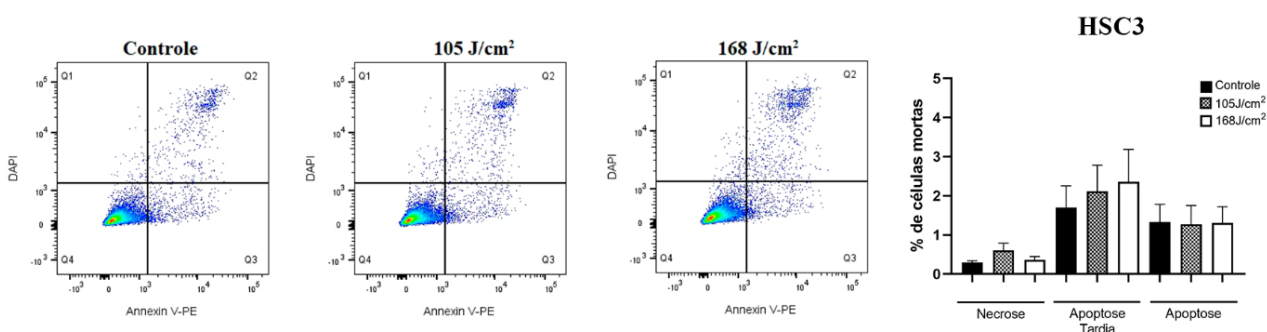
Figura 5: Avaliação da viabilidade celular nas linhagens celulares HSC3 e SCC9 após irradiação com LED azul, avaliada pelos ensaios MTS (**A e B**) e Cristal Violeta (**C e D**). Observou-se uma redução significativa na viabilidade celular após a irradiação com LED azul em comparação com o grupo controle. Os asteriscos acima das barras indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo controle. Os dados são expressos pela média $\pm$ DP. *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001.

4.2 Análise da taxa de apoptose e necrose por citometria de fluxo

A análise da taxa de apoptose e necrose na linhagem HSC3, realizada 24 horas após a irradiação com LED azul, não revelou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos experimentais (controle, 105 J/cm² e 168 J/cm²). Esses achados indicam que, na linhagem HSC3, as doses de 105 J/cm² e 168 J/cm² de LED azul não induziram aumento mensurável da morte celular por necrose ou apoptose no intervalo de 24 horas após a irradiação (Figura 3A).

A exposição das células SCC9 ao LED azul resultou em alterações significativas no padrão de morte celular após 24 horas, conforme determinado por citometria de fluxo. Houve um aumento significativo na taxa de apoptose nos grupos irradiados em comparação ao grupo controle ($p < 0,05$). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos em relação à porcentagem de células em necrose ou apoptose tardia ($p > 0,05$) (Figura 3B).

A



B

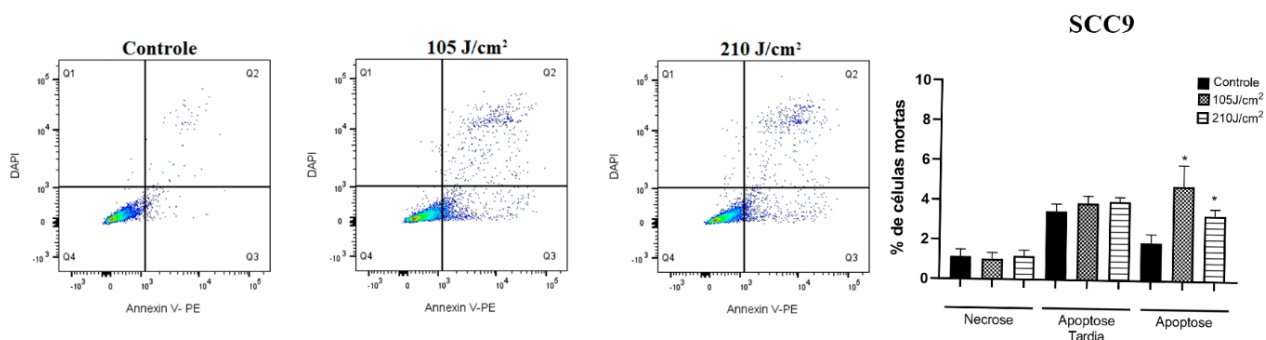


Figura 6: Avaliação da morte celular após irradiação nas linhagens celulares HSC3 (A) e SCC9 (B). Observou-se uma diminuição significativa na porcentagem de células apoptóticas em ambos os parâmetros de irradiação com LED azul em relação ao grupo controle em SCC9. Os dados são expressos pela média $\pm$ DP. * $p < 0,05$.

4.3 Análise da capacidade de migração

Na linhagem HSC3, houve redução significativa da capacidade de migração no grupo irradiado com 168 J/cm^2 quando comparado com o grupo controle ($p < 0,001$) (Figura 4A e 4C). Na linhagem SCC9, a irradiação com 210 J/cm^2 reduziu significativamente a migração celular em relação ao grupo controle ($P < 0,001$) (Figura 4B e 4D). Não houve diferença entre o grupo irradiado com 105 J/cm^2 e o grupo controle na linhagem HSC3 e SCC9, bem como entre ambos os parâmetros de irradiação utilizados.

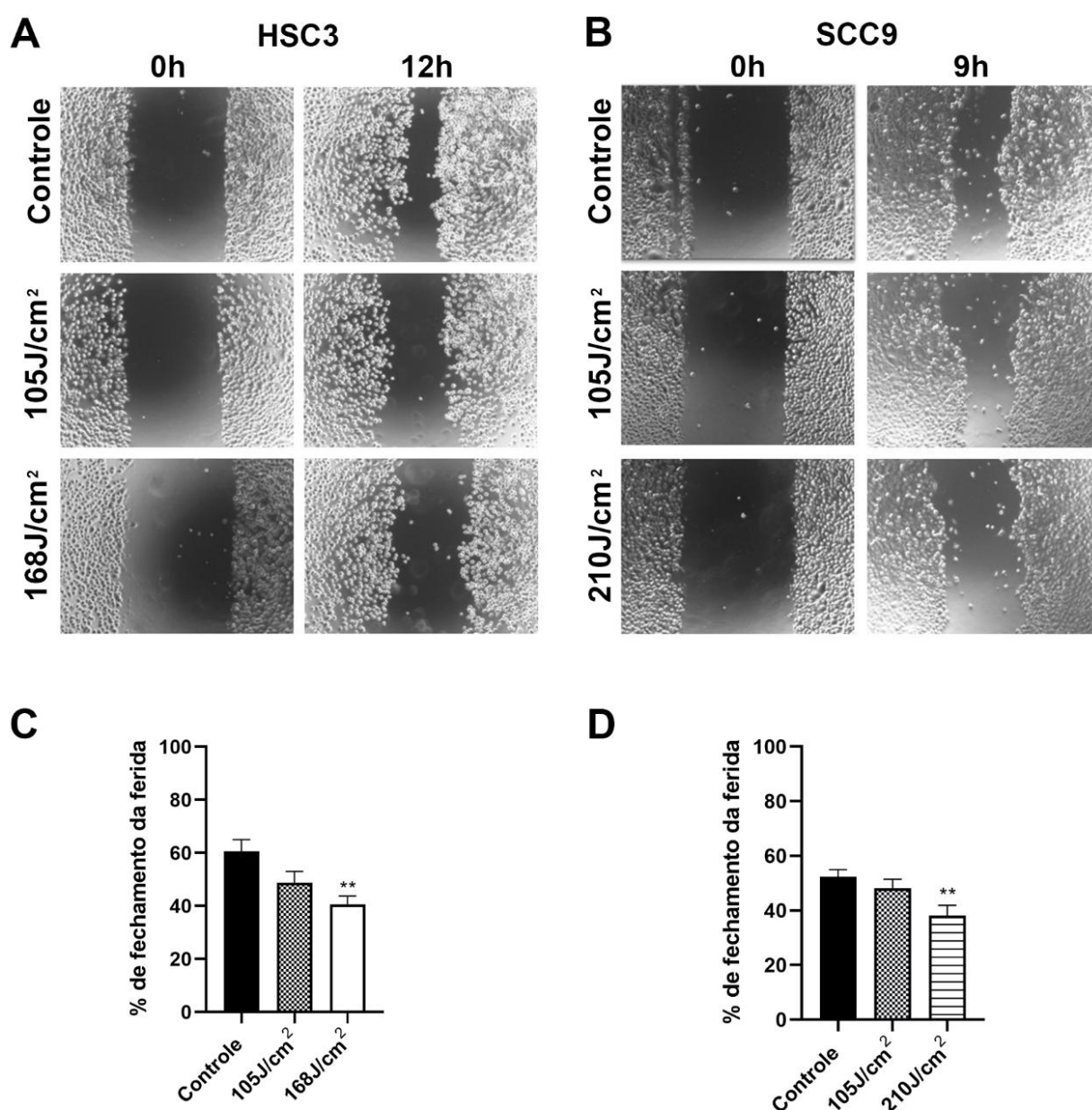


Figura 7: Imagens representativas do “ensaio de ferida” nas linhas celulares HSC3 nos tempos 0 e 12 horas (**A**) e SCC9 nos tempos 0 e 9 horas (**B**) após irradiação com LED azul (ampliação de 40x). Quantificação da % de fechamento da ferida após

exposição ao LED azul em ambas, HSC3 **(C)** e SCC9 **(D)**. A migração celular foi significativamente inibida após irradiação com $168\text{J}/\text{cm}^2$ na linhagem celular HSC3 e após $210\text{J}/\text{cm}^2$ na linhagem celular SCC9. Os dados são expressos pela média $\pm$ DP. $**p < 0,01$.

4.4 Ensaio de formação de colônias

Na linhagem HSC3, não houve redução do potencial clonogênico após a irradiação com LED azul em ambos os parâmetros em relação ao grupo controle (Figura 5A e 5B).

Na linhagem SCC9, houve redução significativa do número de colônias formadas após a irradiação com LED azul com $105\text{ J}/\text{cm}^2$ ($p < 0,0001$) e $210\text{ J}/\text{cm}^2$ ($p < 0,0001$). Além disso, observou-se diferença significativa entre os dois grupos irradiados, com menor formação de colônias em $210\text{ J}/\text{cm}^2$ ($p < 0,05$) em relação ao grupo $105\text{ J}/\text{cm}^2$ (Figura 5C e 5D).

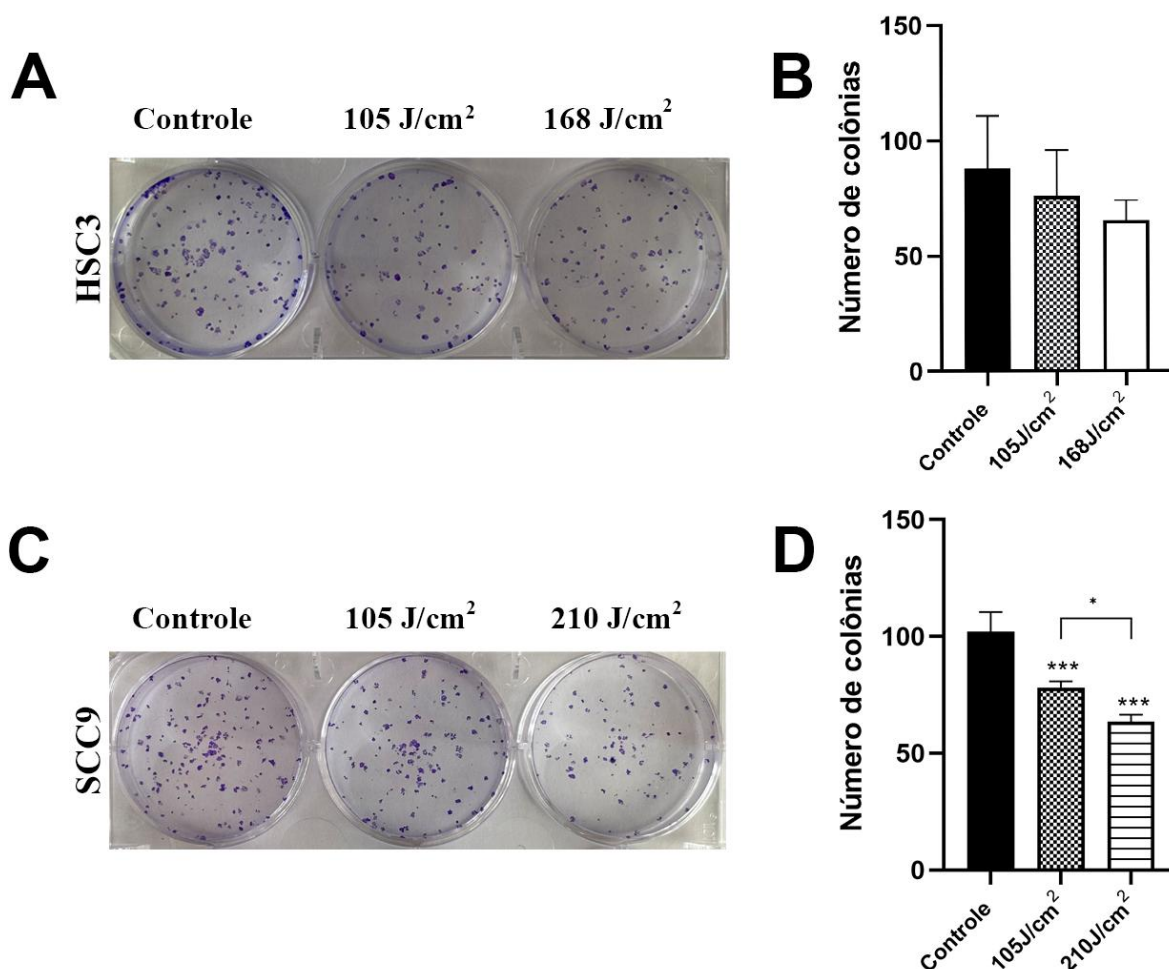


Figura 8: Imagens representativas do ensaio de formação de colônias na linhagem HSC3 **(A)** e SCC9 **(C)** após 10 dias e quantificação do número de colônias

na linhagem HSC3 (**B**) e SCC9 (**D**). O LED azul não alterou de maneira significativa a capacidade clonogênica da linhagem HSC3, mas houve redução na linhagem SCC9, especialmente em doses mais elevadas. Dados expressos como média $\pm$ DP. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

4.5 Ensaio de formação de esferas tumorais

Na linhagem HSC3, a avaliação da capacidade de crescimento em suspensão demonstrou que a irradiação com LED azul reduziu significativamente a formação de esferas tumorais em ambos os parâmetros avaliados ($p < 0,05$) quando comparado com o grupo controle (Figura 6A).

Na linhagem SCC9, a avaliação da formação de esferas tumorais após irradiação com LED azul demonstrou que apenas o parâmetro 210 J/cm² resultou em uma diminuição acentuada na formação de esferas, com diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,05$) (Figura 6B).

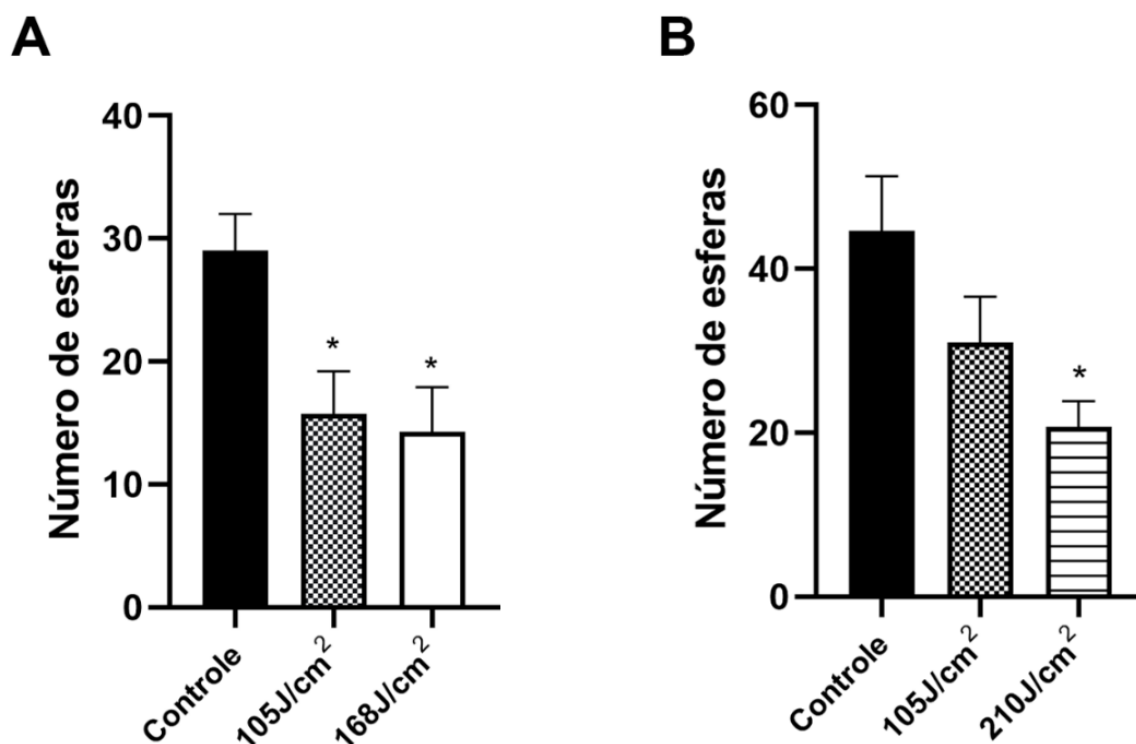


Figura 9: Avaliação da quantificação do número de esferas formadas após irradiação com LED azul nas linhagens celulares HSC3 (**A**) e SCC9 (**B**). O LED azul foi efetivo na redução da capacidade de crescer em suspensão nos grupos irradiados da linhagem HSC3, em relação ao grupo controle. Enquanto na linhagem SCC9,

houve efeito significativo apenas na maior dose 210 J/cm². Dados expressos como média $\pm$ DP. *p < 0,05

4.6 Análise da expressão dos genes *BMI1*, *OCT4*, *NANOG* e *CD44*

Na linhagem HSC3 e SCC9, a avaliação da expressão gênica dos marcadores associados ao fenótipo tronco *BMI1*, *OCT4*, *NANOG* e *CD44*, realizada 24 horas após a irradiação com LED azul, não demonstrou efeito na modulação dos níveis de mRNA dos genes avaliados. demonstrou ausência de alterações significativas entre os grupos experimentais (Figura 7A e 7B).

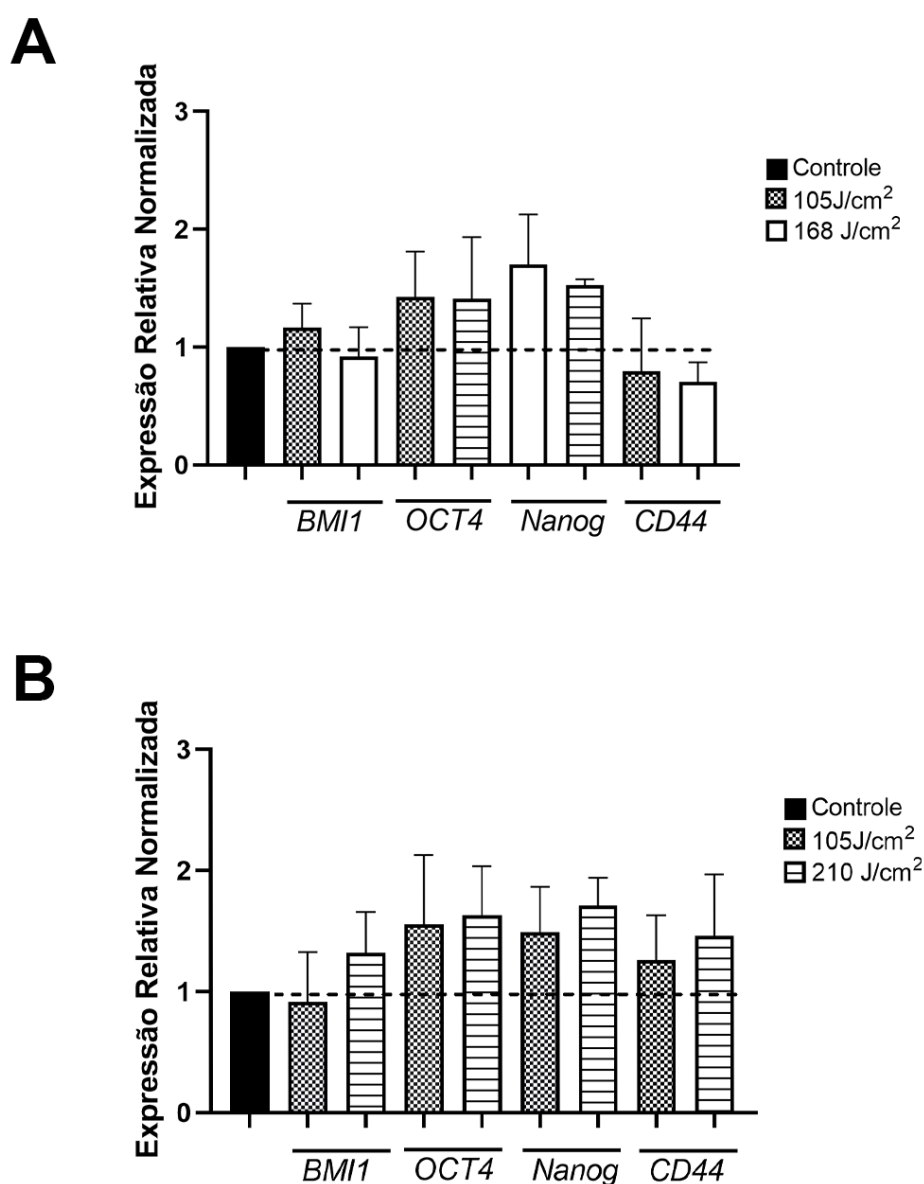


Figura 10: Avaliação por RT-qPCR de genes *BMI1*, *OCT4*, *NANOG* e *CD44* após 24 horas da irradiação com LED azul na linhagem HSC3 (**A**) e SCC9 (**B**). Não

foi observada nenhuma modulação significativa dos genes *BMI1*, *OCT4*, *NANOG* e *CD44* após a irradiação com LED AZUL com todos os parâmetros avaliados. Dados apresentados como média $\pm$ DP.

4.7 Análise da expressão de CD44 e ESA por citometria de fluxo

Na linhagem HSC3, a análise por citometria de fluxo das subpopulações CD44^{high}/ESA^{high} e CD44^{low} demonstrou que a irradiação com LED azul não promoveu alterações significativas na distribuição fenotípica das células após 24 horas (Figura 8A e 8C).

Na linhagem SCC9, a análise por citometria de fluxo revelou que a irradiação com LED azul não alterou significativamente a proporção de células CD44^{high}/ESA^{high}, população associada ao fenótipo de células-tronco do câncer. Por outro lado, a população CD44^{low}, correspondente a células epiteliais mais diferenciadas, apresentou aumento significativo apenas no grupo irradiado com 210 J/cm² em comparação ao controle ($p < 0,05$).

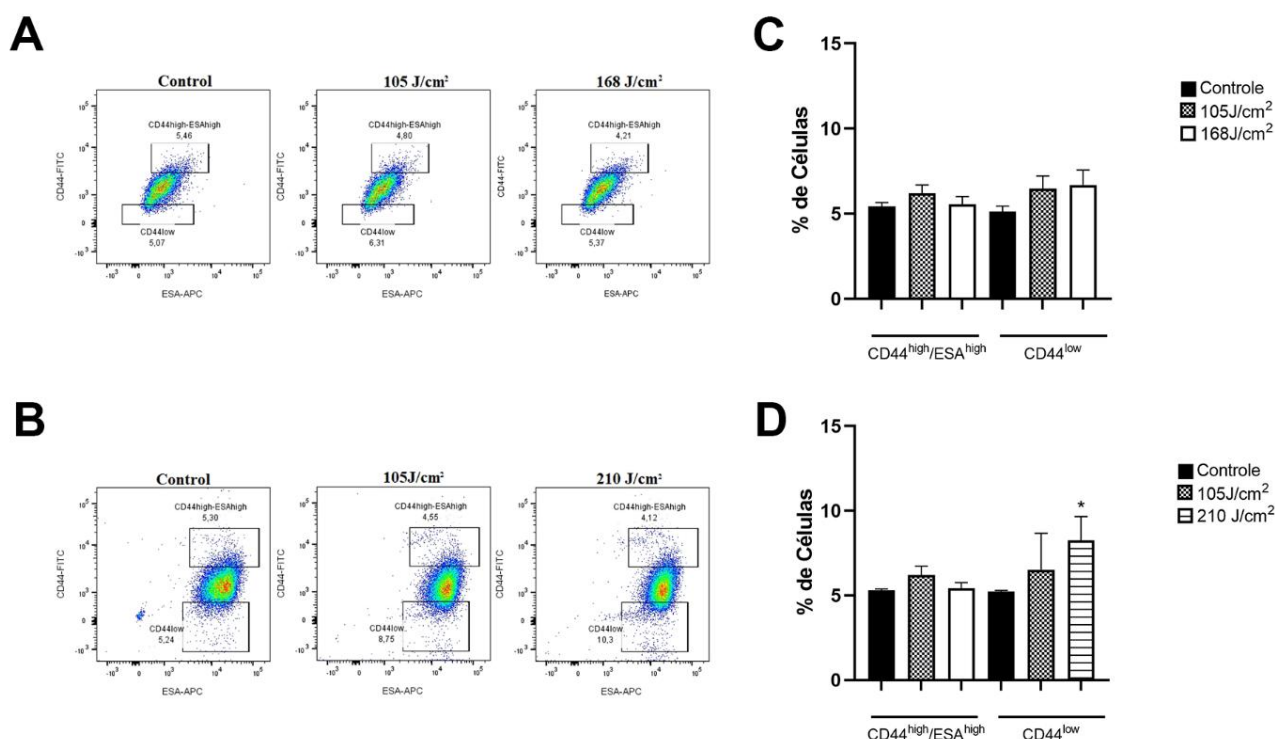


Figura 11: Imagens representativas da análise de citometria de fluxo para detectar a frequência de CTCs com base na expressão de CD44 e ESA nas linhagens celulares HSC3 **(A)** e SCC9 **(B)**, e quantificação da porcentagem de células CD44^{high}/ESA^{high} e CD44^{low} após 24 horas de tratamento com LED azul nas linhagens

HSC3 **(C)** e SCC9 **(D)**. Apenas em SCC9, a dose de 210 J/cm² aumentou a proporção de células CD44^{low}, sugerindo um efeito de diferenciação nessa linhagem. Dados expressos como média $\pm$ DP *p < 0,05.

5. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que a fotobiomodulação com LED azul no comprimento de onda de 460 nm foi capaz de modular de maneira significativa diferentes aspectos do comportamento tumoral nas linhagens derivadas de CEB, SCC9 e HSC3, incluindo viabilidade, morte celular, migração e propriedades associadas às células-tronco do câncer (CTCs).

Observou-se redução significativa da viabilidade e da migração nas maiores doses (168 J/cm² e 210 J/cm²) em ambas as linhagens celulares, também houve um aumento na apoptose apenas em SCC9 sugerindo que a irradiação com LED azul ativa predominantemente vias apoptóticas, sem aumento relevante na necrose, indicando um possível efeito seletivo e regulado sobre a viabilidade das células SCC9. Além da redução da capacidade de formação de esferas nas duas linhagens e de colônias apenas na SCC9 evidenciando um possível efeito na autorrenovação. Entretanto, no que se refere ao fenótipo de CTCs, não foram observadas alterações nos marcadores genéticos avaliados, e a frequência da população CD44^{high}/ESA^{high} permaneceu inalterada; porém, na SCC9 irradiada com 210 J/cm² houve aumento da população CD44^{low}, sugerindo de um fenótipo mais diferenciado.

Com relação a escolha dos parâmetros dosimétricos eficazes do LED azul nas células tumorais, não se tem uma padronização definida na literatura, principalmente no que diz respeito ao carcinoma epidermoide de boca. Estudos relacionando o CEB e o LED azul, como em Jiang et al. (2024a, 2024b) demonstraram que o LED azul reduziu a viabilidade e a proliferação em linhagem SCC-25 após irradiação com 457–475 nm a 30 J/cm², mediada principalmente por estresse oxidativo, aumento de EROs e modulação de vias de estresse do retículo endoplasmático. (Jiang, Fu, et al., 2024; Jiang, Yang, et al., 2024) No entanto, alguns parâmetros não foram relatados ou necessitavam de mais detalhes, limitando a comparabilidade com nossos achados. Os parâmetros utilizados no presente estudo (105, 168 e 210 J/cm²; 460 nm) foram selecionados para determinar as condições que reduzissem de forma eficaz a viabilidade, de acordo com a literatura (de Lima et al., 2025). Ao contrário do padrão dependente da dose descrito por Jiang et al (2024a; 2024b), o aumento da exposição radiante não reduziu proporcionalmente a viabilidade celular após 24 horas. Essa

diferença pode refletir vários fatores: comprimentos de onda mais curtos (por exemplo, 420 nm) têm maior energia de fótons, podendo causar danos celulares diretos; variações na irradiância e na energia total podem produzir respostas bifásicas, nas quais doses baixas estimulam e doses mais altas inibem ou danificam as células; e diferenças intrínsecas entre as linhagens celulares, incluindo perfil genético e agressividade, que podem influenciar a resposta celular ao LED azul. De fato, a 210 J/cm², as células SCC9 exibiram menor viabilidade do que a linhagem HSC3. Dado que as células HSC3 apresentam um fenótipo mais agressivo e metastático, sua resistência relativamente maior ao LED azul pode refletir mecanismos adaptativos associados ao potencial metastático, como tolerância ao estresse aumentada ou vias de sinalização celular alteradas envolvidas na sobrevivência e reparo.

No que diz respeito à morte celular, os resultados evidenciaram aumento significativo de apoptose apenas na SCC9, enquanto a linhagem HSC3 não apresentou diferença significativa. Este resultado contrasta parcialmente com estudos usando a linhagem SCC25 não metastática, nos quais o LED azul desencadeia apoptose associada a disfunção mitocondrial, aumento de Bax, redução de Bcl-2, ativação de CHOP - proteínas associadas à apoptose no processo de estresse do retículo endoplasmático - e colapso do potencial de membrana mitocondrial (Jiang, Fu, et al., 2024). Uma possível explicação para a ausência desse efeito na linhagem HSC3 é o fato de essa linhagem apresentar perfil mais agressivo, mais resistente e maior capacidade de adaptação ao estresse. Além disso, como limitação do presente estudo, não foram avaliados mecanismos intracelulares envolvidos na morte celular, como produção de EROs, estresse do retículo endoplasmático e disfunção mitocondrial, dificultando a interpretação direta dos mecanismos envolvidos. É possível que a dose empregada, embora suficiente para modular viabilidade e migração, tenha sido insuficiente para desencadear cascatas de morte em HSC3. É necessário que estudos futuros avaliem a produção de EROs para esclarecer se as alterações na viabilidade e morte celular derivam do estresse oxidativo induzido pelo LED azul ou de outros mecanismos acionados pela exposição luminosa.

Em relação à migração celular, observamos redução significativa em ambas as linhagens celulares. No estudo de Jiang et al. (2024) com SCC-25, o tratamento com 420 nm reduziu a migração, efeito atribuído à combinação de estresse oxidativo, dano mitocondrial e interferência na homeostase de cálcio intracelular (Jiang, Fu, et al., 2024). No presente estudo, a redução de migração acompanha a diminuição da

formação de esferas e da clonogenicidade (na SCC9), sugerindo que os efeitos do LED azul convergem para a redução de fenótipos associados à auto-renovação, motilidade e agressividade tumoral. A literatura reconhece que migração e formação de esferas compartilham vias comuns, como EMT parcial, plasticidade fenotípica e sinalização PI3K/AKT, reforçando a coerência dos nossos achados. (de Lima et al., 2025)

O contexto das propriedades associadas às CTCs, nossos resultados revelam que o LED azul não aumentou genes associados ao fenótipo tronco (*BMI1*, *OCT4*, *NANOG*, *CD44*), nem alterou a população $CD44^{high}/ESA^{high}$. Este é um ponto importante, pois não há estudos na literatura avaliando o LED azul especificamente sobre células-tronco do câncer em CEB, tornando este estudo pioneiro. A ausência de indução de fenótipos tronco é altamente relevante, uma vez que diversas terapias, quimioterapia, radioterapia, anti-EGFR, podem inadvertidamente selecionar populações $CD44^{high}$, contribuindo para resistência terapêutica. Aqui, ao contrário, observamos que o LED azul não enriquece CTCs e ainda aumenta a população $CD44^{low}$ em SCC9 na dose de 210 J/cm², o que sugere um efeito de diferenciação, associado a menor agressividade tumoral e maior sensibilidade a terapias convencionais. A redução de colônias e esferas reforça que o LED azul atinge diretamente características de auto-renovação, especialmente em SCC9.

O conjunto dos resultados aponta para a possibilidade de que o LED azul seja utilizado como terapia complementar, podendo potencializar o efeito de outras modalidades, sobretudo as que dependem de dano oxidativo ou interferência em vias de estresse celular. Estudos prévios já sugeriram que combinações entre LED azul e agentes farmacológicos podem ser benéficas, especialmente em modelos onde a luz modula vias como AHR, estresse do retículo endoplasmático e metabolismo mitocondrial (de Lima et al., 2025; Jiang, Yang, et al., 2024)

Por fim, este estudo apresenta limitações importantes. O modelo experimental foi baseado em cultura bidimensional (2D), que não reproduz de forma integral a complexidade espacial, mecânica e celular do microambiente intratumoral. Modelos 3D, como esferoides, são essenciais para validar se os efeitos observados, principalmente a não indução de CTCs e o aumento de células $CD44^{low}$, se mantêm sob condições mais fisiológicas. Além disso, não foram avaliados mecanismos moleculares nas alterações fenotípicas, impedindo a elucidação das vias responsáveis pelos achados observados. Outra limitação importante para a tradução

clínica da terapia com LED azul, é a profundidade de penetração do comprimento de onda azul (aproximadamente 1 a 3 mm) demonstrando que tumores mais superficiais, em estágios iniciais e de localização facilitada serão ideais para essa terapia.

Os resultados demonstram que o LED azul exerce efeitos antitumorais consistentes em CEB, reduzindo viabilidade, migração e propriedades de auto-renovação, ao mesmo tempo em que não promove enriquecimento da subpopulação de CTCs, e até favorece a diferenciação em SCC9. Estes achados reforçam o potencial translacional da fotobiomodulação com LED azul como abordagem segura e promissora para modular o comportamento tumoral no CEB, justificando novas investigações em modelos mais complexos e em estudos pré-clínicos.

6. CONCLUSÃO

- O LED azul reduziu significativamente a viabilidade celular em ambas as linhagens celulares. Na linhagem HSC3, todas as doses promoveram redução da viabilidade em relação ao grupo controle e na linhagem SCC9, observou-se redução progressiva, com maior efeito em 210 J/cm².
- Na avaliação da taxa de necrose e apoptose, não houve diferença significativa na linhagem HSC3 nos grupos irradiados com LED azul em relação ao grupo controle. Entretanto, na linhagem SCC9, houve aumento significativo da porcentagem de células em apoptose, especialmente no grupo 105 J/cm², sem aumento de necrose.
- A migração celular foi significativamente reduzida nos grupos 168 J/cm² na linhagem HSC3 e no grupo 210 J/cm² na linhagem SCC9 em relação ao grupo controle.
- A irradiação com LED azul não foi capaz de alterar a formação de colônias na linhagem HSC3, e na linhagem SCC9, promoveu redução significativa no potencial clonogênico no grupo 210 J/cm².
- A irradiação com LED azul reduziu a capacidade de formação de esferas tumorais nos grupos irradiados da linhagem HSC3 em relação ao grupo controle. Entretanto, na linhagem SCC9, a redução do número de esferas foi observada somente no grupo 210 J/cm².
- A irradiação com LED azul não foi capaz de modular os níveis de mRNA dos genes *BMI1*, *OCT4*, *NANOG* ou *CD44* em ambas as linhagens celulares avaliadas.
- Na expressão de CD44 e ESA por citometria de fluxo, a irradiação com LED azul, não houve alteração na porcentagem de células CD44^{high}/ESA^{high} e CD44^{low} na linhagem HSC3. Na linhagem SCC9, o LED azul não alterou a frequência da população CD44^{high}/ESA^{high}, mas aumentou a porcentagem de células com fenótipo CD44^{low} no grupo 210 J/cm², indicando possível efeito indutor da diferenciação celular.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amôr, N. G., Buzo, R. F., Ortiz, R. C., Lopes, N. M., Saito, L. M., Mackenzie, I. C., & Rodini, C. O. (2021). In vitro and in vivo characterization of cancer stem cell subpopulations in oral squamous cell carcinoma. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, 50(1), 52–59. <https://doi.org/10.1111/jop.13101>
- Arboleda, L. P. A., de Carvalho, G. B., Santos-Silva, A. R., Fernandes, G. A., Vartanian, J. G., Conway, D. I., Virani, S., Brennan, P., Kowalski, L. P., & Curado, M. P. (2023). Squamous Cell Carcinoma of the Oral Cavity, Oropharynx, and Larynx: A Scoping Review of Treatment Guidelines Worldwide. In *Cancers* (Vol. 15, Issue 17). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/cancers15174405>
- Atashzar, M. R., Baharlou, R., Karami, J., Abdollahi, H., Rezaei, R., Pourramezan, F., & Zoljalali Moghaddam, S. H. (2020). Cancer stem cells: A review from origin to therapeutic implications. In *Journal of Cellular Physiology* (Vol. 235, Issue 2, pp. 790–803). Wiley-Liss Inc. <https://doi.org/10.1002/jcp.29044>
- Baillie, R., Tan, S. T., & Itinteang, T. (2017). Cancer stem cells in oral cavity squamous cell carcinoma: A review. In *Frontiers in Oncology* (Vol. 7, Issue JUN). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fonc.2017.00112>
- Biddle, A., Liang, X., Gammon, L., Fazil, B., Harper, L. J., Emich, H., Costea, D. E., & Mackenzie, I. C. (2011). Cancer stem cells in squamous cell carcinoma switch between two distinct phenotypes that are preferentially migratory or proliferative. *Cancer Research*, 71(15), 5317–5326. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-1059>
- Bray, F., Laversanne, M., Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Soerjomataram, I., & Jemal, A. (2024). Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 74(3), 229–263. <https://doi.org/10.3322/caac.21834>
- Chute, J. P., Muramoto, G. G., Whitesides, J., Colvin, M., Safi, R., Chao, N. J., & McDonnell, D. P. (2006). Inhibition of aldehyde dehydrogenase and retinoid signaling induces the expansion of human hematopoietic stem cells. In *PNAS August 1* (Vol. 103). www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0603806103
- de Lima, B. E. S., Nascimento, R. B., Ginez, A. P. M. S., Moreira, M. S., Cecatto, R. B., Marcos, R. L., & Rodrigues, M. F. S. D. (2025). Harnessing blue light photobiomodulation for cancer therapy: Evidence from a systematic review. In *Photochemistry and Photobiology*. John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1111/php.70025>

- Dongre, A., & Weinberg, R. A. (2019). New insights into the mechanisms of epithelial–mesenchymal transition and implications for cancer. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 20, Issue 2, pp. 69–84). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0080-4>
- Gemenetzidis, E., Gammon, L., Biddle, A., Emich, H., & Mackenzie, I. C. (2015). *Invasive oral cancer stem cells display resistance to ionising radiation* (Vol. 6, Issue 41). www.impactjournals.com/oncotarget
- Glass, G. E. (2021). Photobiomodulation: A review of the molecular evidence for low level light therapy. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery*, 74(5), 1050–1060. <https://doi.org/10.1016/j.bjps.2020.12.059>
- Hamblin, M. R., Nelson, S. T., & Strahan, J. R. (2018). Photobiomodulation and Cancer: What Is the Truth? In *Photomedicine and laser surgery* (Vol. 36, Issue 5, pp. 241–245). <https://doi.org/10.1089/pho.2017.4401>
- He, M., Li, G., He, X., Wang, Y., Lei, H., Wang, Q., Yan, G., Gong, R., Liu, G., Li, T., Cai, B., Li, L., & Yuan, Y. (2020). Blue LED causes cell death in human hepatoma by inducing DNA damage. *Research Square*. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-54193/v1>
- He, M., Yan, G., Wang, Y., Gong, R., Lei, H., Yu, S., He, X., Li, G., Du, W., Ma, T., Gao, M., Yu, M., Liu, S., Xu, Z., Idiatullina, E., Zagidullin, N., Pavlov, V., Cai, B., Yuan, Y., & Yang, L. (2021). Blue LED causes autophagic cell death in human osteosarcoma by increasing ROS generation and dephosphorylating EGFR. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 25(11), 4962–4973. <https://doi.org/10.1111/jcmm.16412>
- Imbesi Bellantoni, M., Picciolo, G., Pirrotta, I., Irrera, N., Vaccaro, M., Vaccaro, F., Squadrito, F., & Pallio, G. (2023). Oral Cavity Squamous Cell Carcinoma: An Update of the Pharmacological Treatment. In *Biomedicines* (Vol. 11, Issue 4). MDPI. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11041112>
- Jiang, H., Fu, Q., Yang, J., Qin, H., Li, A., Liu, S., & Liu, M. (2024). Blue light irradiation suppresses oral squamous cell carcinoma through induction of endoplasmic reticulum stress and mitochondrial dysfunction. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 257. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2024.112963>
- Jiang, H., Yang, J., Fu, Q., Li, A., Qin, H., & Liu, M. (2024). Induction of Endoplasmic Reticulum Stress and Aryl Hydrocarbon Receptor Pathway Expression by Blue LED Irradiation in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Journal of Biophotonics*, 17(10). <https://doi.org/10.1002/jbio.202400226>
- Johnson, D. E., Burtneiss, B., Leemans, C. R., Lui, V. W. Y., Bauman, J. E., & Grandis, J. R. (2020). Head and neck squamous cell carcinoma. In *Nature Reviews*

- Disease Primers* (Vol. 6, Issue 1). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41572-020-00224-3>
- Kim, Y. M., Ko, S. H., Shin, Y. Il, Kim, Y., Kim, T., Jung, J., Lee, S. Y., Kim, N. G., Park, K. J., & Ryu, J. H. (2021). Light-emitting diode irradiation induces AKT/mTOR-mediated apoptosis in human pancreatic cancer cells and xenograft mouse model. *Journal of Cellular Physiology*, 236(2), 1362–1374. <https://doi.org/10.1002/jcp.29943>
- Loh, Y. H., Wu, Q., Chew, J. L., Vega, V. B., Zhang, W., Chen, X., Bourque, G., George, J., Leong, B., Liu, J., Wong, K. Y., Sung, K. W., Lee, C. W. H., Zhao, X. D., Chiu, K. P., Lipovich, L., Kuznetsov, V. A., Robson, P., Stanton, L. W., ... Ng, H. H. (2006). The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nature Genetics*, 38(4), 431–440. <https://doi.org/10.1038/ng1760>
- Mallika, L., Rajarathinam, M., & Thangavel, S. (2024). Cancer stem cells in head and neck squamous cell carcinoma and its associated markers: A review. In *Indian Journal of Pathology and Microbiology* (Vol. 67, Issue 2, pp. 250–258). Wolters Kluwer Medknow Publications. https://doi.org/10.4103/ijpm.ijpm_467_23
- Markopoulos, A. K. (2012). Current Aspects on Oral Squamous Cell Carcinoma. In *The Open Dentistry Journal* (Vol. 6).
- Mesrati, M. H., Syafruddin, S. E., Mohtar, M. A., & Syahir, A. (2021). CD44: A multifunctional mediator of cancer progression. In *Biomolecules* (Vol. 11, Issue 12). MDPI. <https://doi.org/10.3390/biom11121850>
- Mo, S., Ku, H. J., Choi, S. H., Jeong, H. J., Park, D. G., Oh, M. H., & Ahn, J. C. (2021). 470 nm LED Irradiation inhibits the invasiveness of CD133-positive human colorectal cancer stem cells by suppressing the cyclooxygenase-2/prostaglandin E2 pathway. *Anticancer Research*, 41(3), 1407–1420. <https://doi.org/10.21873/anticanres.14898>
- Oh, P. S., Kim, H. S., Kim, E. M., Hwang, H., Ryu, H. H., Lim, S. T., Sohn, M. H., & Jeong, H. J. (2017). Inhibitory effect of blue light emitting diode on migration and invasion of cancer cells. *Journal of Cellular Physiology*, 232(12), 3444–3453. <https://doi.org/10.1002/jcp.25805>
- Oh, P. S., Na, K. S., Hwang, H., Jeong, H. S., Lim, S., Sohn, M. H., & Jeong, H. J. (2015). Effect of blue light emitting diodes on melanoma cells: Involvement of apoptotic signaling. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 142, 197–203. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2014.12.006>
- Patel AD; Rotenberg S; Messer RL, W. J. O. K. M. V. L. P. H. S. L. J. (2014). Blue Light Activates Phase 2 Response Proteins and Slows Growth of A431 Epidermoid Carcinoma Xenografts. *Anticancer Research*.

- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. In *Nucleic Acids Research* (Vol. 29, Issue 9).
- Pfister, D. G., Spencer, S., Adelstein, D., Adkins, D., Anzai, Y., Brizel, D. M., Bruce, J. Y., Busse, P. M., Caudell, J. J., Cmelak, A. J., Dimitrios Colevas, A., Eisele, D. W., Fenton, M., Foote, R. L., Galloway, T., Gillison, M. L., Haddad, R. I., Hicks, W. L., Hitchcock, Y. J., ... Darlow, S. D. (2020). Head and neck cancers, version 2.2020. *JNCCN Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 18(7), 873–898. <https://doi.org/10.6004/jnccn.2020.0031>
- Rodrigues, M. F. S. D., Xavier, F. C. de A., Andrade, N. P., Lopes, C., Miguita Luiz, L., Sedassari, B. T., Ibarra, A. M. C., López, R. V. M., Kliemann Schmerling, C., Moyses, R. A., Tajara da Silva, E. E., & Nunes, F. D. (2018). Prognostic implications of CD44, NANOG, OCT4, and BMI1 expression in tongue squamous cell carcinoma. *Head and Neck*, 40(8), 1759–1773. <https://doi.org/10.1002/hed.25158>
- Santos, M. de O., Lima, F. C. da S. de, Martins, L. F. L., Oliveira, J. F. P., Almeida, L. M. de, & Cancela, M. de C. (2023). Estimativa de Incidência de Câncer no Brasil, 2023-2025. *Revista Brasileira de Cancerologia*, 69(1). <https://doi.org/10.32635/2176-9745.rbc.2023v69n1.3700>
- Setúbal, M. F., Rodrigues, D., Gammon, L., Rahman, M. M., Biddle, A., Nunes, F. D., & Mackenzie, I. C. (2018). Effects of Cetuximab and Erlotinib on the behaviour of cancer stem cells in head and neck squamous cell carcinoma. In *Oncotarget* (Vol. 9, Issue 17). www.impactjournals.com/oncotarget
- Siqueira, J. M., Heguedusch, D., Rodini, C. O., Nunes, F. D., & Destro Rodrigues, M. F. S. (2023). Mechanisms involved in cancer stem cell resistance in head and neck squamous cell carcinoma. In *Cancer Drug Resistance* (Vol. 6, Issue 1, pp. 116–137). OAE Publishing Inc. <https://doi.org/10.20517/cdr.2022.107>
- Szturz, P., Cristina, V., Gómez, R. G. H., Bourhis, J., Simon, C., & Vermorken, J. B. (2019). Cisplatin eligibility issues and alternative regimens in locoregionally advanced head and neck cancer: Recommendations for clinical practice. In *Frontiers in Oncology* (Vol. 9, Issue JUN). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00464>
- Tahmasebi, E., Alikhani, M., Yazdanian, A., Yazdanian, M., Tebyanian, H., & Seifalian, A. (2020). The current markers of cancer stem cell in oral cancers. In *Life Sciences* (Vol. 249). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117483>
- Wang, Q., Oh, P. S., & Jeong, H. J. (2025). From molecular mechanisms to clinical applications: A comprehensive review of photobiomodulation in cancer treatment. In *Photochemistry and Photobiology*. John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1111/php.14107>

- Xia, Y., Yu, W., Cheng, F., Rao, T., Ruan, Y., Yuan, R., Ning, J., Zhou, X., Lin, F., & Zheng, D. (2021). Photobiomodulation With Blue Laser Inhibits Bladder Cancer Progression. *Frontiers in Oncology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.701122>
- Yaghobi, Z., Movassaghpour, A., Talebi, M., Abdoli Shadbad, M., Hajiasgharzadeh, K., Pourvahdani, S., & Baradaran, B. (2021). The role of CD44 in cancer chemoresistance: A concise review. In *European Journal of Pharmacology* (Vol. 903). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2021.174147>
- Yoshimoto, T., Morine, Y., Takasu, C., Feng, R., Ikemoto, T., Yoshikawa, K., Iwahashi, S., Saito, Y., Kashiwara, H., Akutagawa, M., Emoto, T., Kinouchi, Y., & Shimada, M. (2018). Blue light-emitting diodes induce autophagy in colon cancer cells by Opsin 3. *Annals of Gastroenterological Surgery*, 2(2), 154–161. <https://doi.org/10.1002/ags3.12055>