

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

CAMILLA DOS SANTOS COSTA

Efeitos da fotobiomodulação na terapia fotodinâmica em células de carcinoma
epidermóide oral

São Carlos

2021

CAMILLA DOS SANTOS COSTA

Efeitos da fotobiomodulação na terapia fotodinâmica em células de carcinoma
epidermóide oral

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao
Programa de Graduação em Física do Instituto de
Física de São Carlos da Universidade de São Paulo,
para obtenção do título de Bacharela em Física
Biomolecular.

Orientador: Prof. Dr. Vanderlei S. Bagnato
Colaboradora: Dra. Clara Maria G. de Faria

São Carlos

2021

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Costa, Camilla dos Santos

Efeitos da fotobiomodulação na terapia fotodinâmica em células de carcinoma epidermóide oral / Camilla dos Santos Costa; orientador Vanderlei Salvador Bagnato; co-orientadora Clara Maria G. de Faria -- São Carlos, 2021. 28 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (Física Aplicada Biomolecular) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2021.

1. Fotobiomodulação. 2. Terapia fotodinâmica. 3. Carcinoma epidermóide oral. I. Bagnato, Vanderlei Salvador, orient. II. Faria, Clara Maria G. de , co-orient. III. Título.

RESUMO

A Terapia Fotobiomoduladora (PBMT - *Photobiomodulation Therapy*) consiste na aplicação de laser ou LED de baixa potência, abaixo de 500 mW, tendo como alvo tecidos biológicos variados. Trata-se de uma técnica não carcinogênica e não mutagênica com diversas aplicações, como reparação tecidual e redução de inflamação, por promover a Fotobiomodulação (PBM - *Photobiomodulation*). A Terapia Fotodinâmica (PDT - *Photodynamic Therapy*), por sua vez, é uma técnica que utiliza um fotossensibilizador (PS - *Photosensitizer*) ativado por luz de comprimento de onda específico, a partir do qual, na presença de oxigênio, são geradas espécies reativas de oxigênio (ROS - *Reactive Oxygen Species*) que, a níveis tóxicos, levam à morte celular e, portanto, regressão tumoral. O objetivo do estudo é investigar os efeitos da PBMT precedida de PDT em linhagens de carcinoma epidermóide de língua, SCC-25 e SCC-4. O carcinoma epidermóide oral (OSCC - *Oral squamous cell carcinoma*) apresenta cerca de 270 mil novos casos por ano, sendo a língua o sítio mais acometido por OSCC e tendo um prognóstico baixo. O tratamento para OSCC pode incluir cirurgia, radioterapia (RT) e quimioterapia (CT), sendo a aplicação da PDT amplamente estudada para este fim. O propósito do estudo é, então, avaliar o potencial da combinação PBMT-PDT para melhorar o resultado da PDT aumentando a toxicidade celular. Ensaio de viabilidade celular indicaram que a PBMT melhorou a ação da PDT em células SCC-25, e análises de fluorescência mostraram que houve um aumento da captação de PS e produção de ROS. O equivalente não foi visto em células SCC-4. A análise de proliferação celular mostrou que a PBMT não provocou alteração para nenhuma linhagem, ou seja, os efeitos observados na viabilidade foram devido às alterações metabólicas e não à proliferação celular. Além disso, ensaios de viabilidade com ácido ascórbico (antioxidante), preveniram os efeitos da PBMT na PDT, o que mostra que as ROS apresentam papel importante na ativação dos mecanismos iniciais da PBMT que desencadeiam a cascata de processos que promovem os efeitos observados. Portanto, elucidar a combinação PBMT-PDT é interessante, uma vez que pode ser uma técnica segura, de baixo custo com protocolos simples e com possibilidade de melhora significativa no resultado do tratamento. A tendência de diminuição na captação de PS e produção de ROS para SCC-4, no entanto, deve ser mais investigada juntamente com a compreensão de quais mecanismos da PBM modulam esses resultados.

Palavras-chave: Fotobiomodulação. Terapia fotodinâmica. Carcinoma epidermóide oral.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	7
1.1	Terapia Fotobiomoduladora - PBMT	7
1.2	Terapia Fotodinâmica - PDT	8
1.3	Carcinoma epidermóide oral	10
2	MATERIAIS E MÉTODOS	11
2.1	Cultivo celular	11
2.2	Terapia Fotobiomoduladora - PBMT	11
2.3	Terapia Fotodinâmica - PDT	11
2.4	Viabilidade celular	12
2.5	Proliferação celular	12
2.6	Captação de fotossensibilizador	12
2.7	DCFH-DA: formação de ROS na PDT	13
2.8	Ácido ascórbico: papel das ROS na PBMT	13
2.9	Análise estatística	13
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	15
3.1	Viabilidade celular: PBMT 660/780nm - PDT	15
3.2	Viabilidade celular: PBMT 780nm - PDT	16
3.3	Proliferação celular	17
3.4	Captação de fotossensibilizador	18
3.5	DCFH-DA: formação de ROS na PDT	19
3.6	Ácido ascórbico: papel das ROS na PBMT	20
4	CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS	23
	REFERÊNCIAS	25

1 INTRODUÇÃO

1.1 Terapia Fotobiomoduladora - PBMT

A Terapia Fotobiomoduladora (PBMT, do inglês *Photobiomodulation Therapy*), também conhecida por Terapia de LED/Laser de Baixa Potência, consiste na aplicação de laser ou LED de potências abaixo de 500 mW, geralmente de comprimentos de onda entre 600 nm e 850 nm, que correspondem ao vermelho visível e infravermelho próximo, tendo como alvo tecidos biológicos variados. (1) Trata-se de uma técnica não carcinogênica e não mutagênica, com diversas aplicações por promover a Fotobiomodulação (PBM, do inglês *Photobiomodulation*), ou seja, modular o metabolismo celular e tecidual, estimular a síntese de DNA e RNA, promover a proliferação celular e reduzir a resposta inflamatória, dentre outros efeitos. (2-3) Por isso, algumas aplicações da PBMT são: reparação tecidual e muscular, redução de inflamação, como mucosite, e analgesia. (4-7)

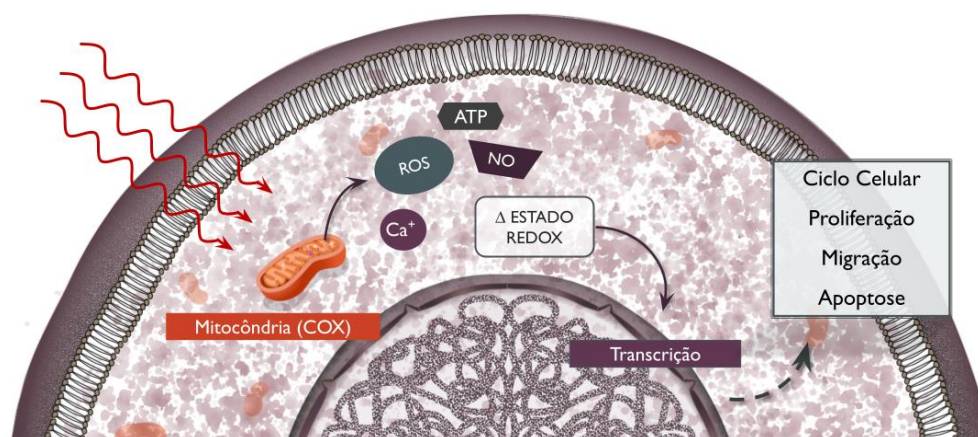


Figura 1- Descrição esquemática dos efeitos da PBM: primeiro ocorre a interação da luz com fotorreceptores, principalmente a COX, que leva ao aumento das concentrações de ATP, Ca²⁺, NO e ROS na mitocôndria, que ativam vias de sinalização. Ocorre a modulação da transcrição gênica tendo como consequência os efeitos mencionados, como modulação do ciclo celular e aumento da proliferação.

Fonte: Elaborada pela colaboradora.

A maioria dos fotorreceptores localiza-se na mitocôndria e por isso, a interação luz-célula pode ser compreendida principalmente uma interação luz-mitocôndria. Em células eucarióticas, os principais fotorreceptores são os componentes da cadeia transportadora de elétrons, como a citocromo c oxidase (COX) e NADH-desidrogenases. (8-9) Ao absorver os fótons incidentes, esses fotorreceptores sofrem alterações nas suas propriedades bioquímicas, tendo como consequências o aumento da síntese de ATP, alterações nas concentrações de Ca²⁺, NO e espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *Reactive Oxygen Species*). Sabe-se

que na PBM há aumento nos níveis de ROS, mas em pequenas quantidades, que atuam como mediadores que iniciam uma cascata de processos celulares, modulando o ciclo celular, .

1.2 Terapia Fotodinâmica - PDT

Terapia Fotodinâmica (PDT, do inglês *Photodynamic Therapy*) é uma técnica que consiste na ação de um fotossensibilizador (PS, do inglês *Photosensitizer*) ativado por luz de comprimento de onda específico, a partir do qual, na presença de oxigênio, são geradas ROS a níveis que causam estresse oxidativo e podem provocar morte celular e, portanto, regressão tumoral com possível erradicação, figura 2. (12)

O processo de geração de ROS por fotossensibilizadores é conhecido e bem descrito pela literatura. (13-18) O fóton incidente faz com que um elétron do PS salte do estado singlete fundamental (S_0) para um estado singlete excitado (S_1). Em seguida, os elétrons podem voltar ao estado fundamental por emissão de fluorescência ou processos não-radiativos, como relaxação vibracional e conversão interna, ou ainda, sofrer cruzamento intersistema, numa conformação denominada estado tripleto (T_1). Para que este último processo ocorra, um dos elétrons emparelhados no estado singlete fundamental é excitado por um fóton para um nível singlete de maior energia, preservando o spin do estado anterior ($S_0 \rightarrow S_1$). (13-17) Em seguida, o elétron deve sofrer alteração do spin, para uma orientação oposta, atingindo o estado tripleto ($S_1 \rightarrow T_1$). (13-14) Nesse estado os spins dos elétrons encontram-se em sentidos paralelos, diferentemente do estado singlete, onde as orientações são antiparalelas. (13) O estado tripleto é mais estável que o anterior, apresenta tempo de vida mais longo e é capaz de interagir com moléculas próximas gerando espécies citotóxicas. (13-18) Existem dois tipos de geração de ROS:

1. Mecanismo I: Reação do PS tripleto com um substrato celular (como proteínas, fosfolipídios, colesterol, dentre outros). O PS transfere um próton ou um elétron para a molécula alvo, com geração de cátions ou ânions (íons radicais livres), respectivamente, capazes de interagir com oxigênio, levando à formação de ROS. (14-17)

2. Mecanismo II: Interação direta do PS tripleto com o oxigênio molecular, que é tripleto no seu estado fundamental, pois apresenta dois orbitais ocupados com apenas um elétron, os dois desemparelhados com o mesmo spin, de acordo com a regra de Hund. (13) A interação ocorre através da transferência de energia tripleto-tripletto, gerando oxigênio no estado singlete excitado, altamente reativo. (15) Essa transferência acontece pela troca

concomitante de dois elétrons dos orbitais ocupados com apenas um elétron, de cada uma das espécies envolvidas: um elétron do PS e outro do oxigênio. (13) Esse processo é conhecido como transferência de energia de Dexter e respeita a conservação de spin, assim como requer a sobreposição espacial das funções de onda eletrônicas das duas espécies, o que só pode ser alcançado se as duas moléculas entrarem em contato próximo, cerca de 10 Å. (13-18)

Entretanto, devido a alta reatividade dos produtos gerados em ambos mecanismos, somente são afetadas pela PDT as estruturas próximas aos sítios de geração das ROS. O oxigênio singleto, por exemplo, tem um tempo de vida entre 0,01 μ s e 0,04 μ s e um raio de difusão na célula de cerca de 20 nm, partindo ponto de localização do PS *i.e.* o local de geração das ROS. (19)

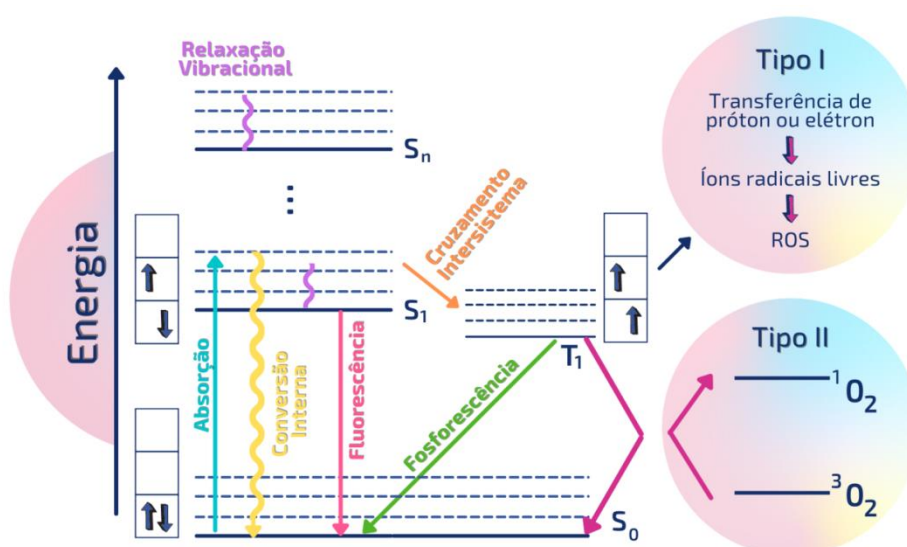


Figura 2 - Diagrama de Jablonski da excitação do PS com seu mecanismo de ação.
Fonte: Adaptada de SILVA *et al.* (20)

Os derivados de hematoporfirinas (HpD) estão entre os fotossensibilizadores mais utilizados em tratamentos por PDT, considerados de primeira geração. São constituídos por misturas de monômeros, dímeros e oligômeros de até oito unidades de porfirinas unidas por ligações éter ou éster. (21) Esses HpDs são transportados no sangue principalmente por lipoproteínas de baixa densidade (LDL), capazes de liberá-los no tecido por meio de receptores específicos. É conhecido que algumas linhagens de células neoplásicas expressam maiores quantidades de receptores de LDL do que linhagens saudáveis, o que confere certa seletividade, ainda que baixa, à captação de PS por células tumorais. (22) Além disso, devido ao curto tempo de vida das ROS e consequentemente, sua baixa difusão, existe também a seletividade local, uma vez que só há geração de ROS por PDT em áreas iluminadas, ou seja, onde há incidência de

fótons. A PDT se mostra segura, de fácil aplicação e algumas de suas vantagens frente às terapias convencionais como quimioterapia e radioterapia são o baixo custo, efeitos colaterais mínimos e resultados estéticos satisfatórios. (23-25)

1.3 Carcinoma epidermóide oral

Carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço (HNSCC, do inglês *Head and Neck Squamous Cell Carcinoma*) é um tipo de câncer que surge nas camadas externas das mucosas bucal, nasal ou da garganta. Especificamente, os carcinomas podem afetar a cavidade oral, cavidade nasal, seios paranasais, orofaringe, nasofaringe, hipofaringe, laringe e glândulas salivares. De acordo com a *National Library of Medicine*, o HNSCC é o sétimo câncer mais frequente no mundo, com 600 mil novos casos por ano, sendo mais incidente em homens entre 50 e 60 anos. (26) Um tipo de HNSCC é o carcinoma epidermóide oral (OSCC, do inglês *Oral Cell Carcinoma*), com cerca de 270 mil novos casos por ano no mundo, e 130 mil mortes anuais. (27) A língua é o sítio mais acometido por OSCC e tem um prognóstico baixo, com taxa de sobrevida em cinco anos inferior a 50%. (28-29) O tratamento para OSCC pode incluir cirurgia, radioterapia (RT) e quimioterapia (TC), sendo a aplicação da PDT amplamente estudada para este fim. (30) Foi observado que os protocolos de RT e quimiorradioterapia (CRT) estão associados a toxicidades agudas que induzem mucosite oral. (31-33) Nesse contexto, a PBMT é utilizada para prevenir e reduzir a mucosite oral induzida por CRT. (34) Neste trabalho, propõe-se avaliar o potencial da combinação PBMT-PDT para melhorar o resultado da PDT aumentando a toxicidade celular em células de carcinoma epidermóide de língua.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Cultivo celular

Foram utilizadas linhagens celulares de carcinoma epidermóide de língua humana SCC-25 (ATCC® CRL-1628™) e SCC-4 (ATCC® CRL-1624™) que crescem por adesão em meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM)/ *Ham's*, suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino, antibióticos e hidrocortisona na concentração de 400 ng/mL. As células foram mantidas em estufa a 37°C sob atmosfera umidificada a 5% de CO₂. O meio celular era trocado três vezes por semana e células eram sub-cultivadas quando atingiam entre 80% e 100% de confluência, seguindo o protocolo padrão de lavagem das células com tampão PBS (*phosphate-buffered saline*) pH 7,3, seguido da desadesão, com 0,25% de tripsina e 0,53 mM de EDTA, durante cerca de 10 min e, então, a adição de meio de cultura contendo soro fetal bovino, inibidor da tripsina. A razão de sub-cultura foi mantida entre 1:3 e 1:10, conforme recomendado pelo fabricante. Os experimentos foram realizados durante a fase exponencial de crescimento. A contagem de células para preparo dos experimentos foi realizada em câmara de Neubauer com método de exclusão pelo corante azul de tripan.

2.2 Terapia Fotobiomoduladora - PBMT

A PBMT foi realizada nas condições: sem iluminação-PBMT, 660 nm (5J/cm² - 20,94 mW/cm²) e 780 nm (5 J/cm² - 28,90 mW/cm²). Os comprimentos de onda para a PBMT foram determinados com base em estudos que mostraram uma resposta positiva frente à exposição à iluminação fotobiomoduladora na faixa do espectro que continha esses valores. (35)

2.3 Terapia Fotodinâmica - PDT

Para cada condição de PBMT, foram estabelecidas duas condições de PDT: sem iluminação-PDT e iluminação de 630 nm (15 J/cm² - 30,00 mW/cm²). Utilizou-se o fotossensibilizador Photogem®, um derivado de hematoporfirina, na concentração 5 µg/mL em meio de cultura DMEM com 1% de soro fetal bovino e sem fenol. O PS foi incubado imediatamente após PBMT, durante 4 horas. Em seguida, os poços foram lavados com PBS pH 7,3 e as células foram expostas a iluminação-PDT.

2.4 Viabilidade celular

A viabilidade celular foi quantificada pelo método MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) que consiste na redução do MTT em cristais de formazan, por oxirredutases dependentes de NAD(P)H presentes em células viáveis. Portanto, quanto mais viáveis as células e/ ou quanto maior o número de células viáveis, mais intensa é a coloração e maior a intensidade do sinal obtido. Para essa análise, as células foram inoculadas em placas de 96 poços, na densidade de 1×10^4 células/poço, 24h antes da iluminação-PBM. As células com MTT a 0,5mg/mL em meio DMEM sem fenol e com 1% de soro fetal bovino foram incubadas 21h após iluminação-PDT, por 3h. Após esse período, os cristais de formazan foram diluídos com DMSO e as medidas de absorbância foram realizadas (570nm e 690nm) com o leitor de placas Multiskan GO (Thermo Fisher Scientific), somando 24h após iluminação-PDT. Foram realizados dois experimentos independentes PBMT 660/780nm - PDT para cada linhagem celular, com três colunas de seis poços para cada grupo. Os demais experimentos de viabilidade foram realizados em três dias distintos, com três fileiras de cinco poços para cada grupo, para cada linhagem.

2.5 Proliferação celular

Para analisar os efeitos da PBM na proliferação celular, as células foram contadas 24h após iluminação-PBM. Para isso, as células foram inoculadas em placas de 24 poços, com 5×10^4 células/poço. A iluminação-PBMT (780nm - 5 J/cm²) foi realizada 24h após o plaqueamento e as células foram mantidas por mais 24h em estufa. Depois, as células foram lavadas com PBS, tripsinizadas, filtradas para remover aglomerados celulares e contadas por citometria de fluxo (excitação 488 nm, detecção 695/40 nm, BD Accuri C6 Plus, BD Biosciences). Dois experimentos independentes foram realizados, com triplicatas para cada grupo.

2.6 Captação de fotossensibilizador

A captação de PS também foi analisada. Nesse experimento, as células foram inoculadas em placas de 24 poços, com 5×10^4 células/poço 24h antes da incubação do PS. Então, a PBMT foi realizada (780nm - 5 J/cm²) e logo em seguida o PS foi incubado por 4h. Em seguida, os poços foram lavados duas vezes com PBS, as células foram tripsinizadas e a fluorescência do PS foi medida por citometria de fluxo (excitação 488 nm, detecção 695/40 nm, BD Accuri C6

Plus, BD Biosciences). Foram realizados dois experimentos independentes em triplicata para cada grupo experimental.

2.7 DCFH-DA: formação de ROS na PDT

DCFH-DA (diacetato de 2,7-diclorofluorescina) é um marcador de estresse oxidativo que pode ser oxidado por ROS e RNS tornando-se DCF (2,7-diclorofluorescina), um composto fluorescente [36]. As células foram inoculadas em placas de 24 poços a uma densidade de 5×10^4 células/poço, 24h antes da incubação com DCFH-DA. Foi realizada a iluminação-PBMT (780nm - 5J/cm²) e imediatamente após, o PS foi incubado por 4h. Após incubação e lavagens com PBS, as células foram tripsinizadas e foi adicionado DCFH-DA a 25 µM em Ham's DMEM sem fenol. A Iluminação-PDT foi então realizada e as células incubadas por mais 20 min em estufa. A fluorescência do DCF foi medida por citometria de fluxo em 488 excitação e 533/30 emissão (BD Accuri C6 Plus, BD Biosciences). Dois experimentos independentes foram realizados em triplicata.

2.8 Ácido ascórbico: papel das ROS na PBMT

O ácido ascórbico (AA) é um antioxidante capaz de eliminar ROS, evitando danos celulares causados por essas espécies. (37) O AA foi dissolvido em PBS para uma solução estoque de 10 mM. Essas soluções foram preparadas em cada experimento. Em seguida, a solução foi diluída em DMEM Ham's sem fenol contendo 5% de SFB a uma concentração de 100 µM, que foi adicionada às células 2h antes da Iluminação-PBMT. Depois, o meio foi trocado e o protocolo PBMT-PDT foi performedo conforme descrito anteriormente. Foram realizados três experimentos independentes e para cada linhagem, foram estabelecidas três fileiras de cinco poços.

2.9 Análise estatística

Todos os dados quantitativos foram descritos como média $\pm$ desvio padrão. As análises estatísticas foram realizadas com o software Origin (versão 2018, Originlab, EUA), com teste ANOVA seguido do teste de Tukey para estimar as diferenças entre duas médias de conjunto de dados com distribuição normal. O teste ANOVA de Kruskal-Wallis foi usado quando os resultados rejeitaram normalidade. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados apresentados e discutidos no presente trabalho foram publicados em um artigo intitulado “Photobiomodulation effects on photodynamic therapy in HNSCC cell lines”, no periódico **Journal of Photochemistry and Photobiology B: biology**, volume 217, em abril de 2021. (38)

3.1 Viabilidade celular: PBMT 660/780nm - PDT

Existem alguns estudos sobre PDT com as linhagens SCC-4 e SCC-25 com foco no aumento da eficiência da PDT por diferentes métodos. (39-42). D.-F. Yang *et al.* estudaram calcipotriol e metotrexato associados ao protocolo PDT-ALA em células SCC-4. Com relação ao SCC-25, Bhuvaneswari *et al.* avaliaram o potencial antiangiogênico de nimotuzumabe e cetuximabe em PDT-Chlorin e6. Além disso, Kelley *et al.* mostraram um aumento no efeito do PDT-Photofrin pela propriedade pró-oxidante do ferro e ascorbato. Embora esses artigos compartilhem semelhanças com o estudo atual, em relação à PDT, linhagem celular e PS (principalmente Kelley *et al.*), nenhum deles correlaciona PBMT e PDT. Na verdade, existem poucos estudos abordando essa combinação em qualquer configuração de linhagem celular e protocolo.

A viabilidade celular relativa aos controles 24h após iluminação-PDT, com duas condições para PBMT: 660 nm e 780 nm; é mostrada nas figuras 3.a. e 3.b., para SCC-25 e SCC-4, respectivamente. Para a SCC-25, a PBMT 660-PDT apresentou uma tendência de aumento da viabilidade de 15% em relação ao grupo PDT, enquanto a PBMT 780nm-PDT mostrou uma tendência de decréscimo de viabilidade de 29%. Para a linhagem SCC-4, os dois parâmetros de iluminação indicaram uma tendência de aumento de viabilidade, com 24% e 36% para os grupos PBMT 660nm-PDT e PBMT 780nm-PDT, respectivamente, em comparação com o grupo PDT. Dessa forma, observa-se que a iluminação 780nm antes da PDT provocou efeitos opostos nas duas linhagens, com tendência de potencializar os efeitos da PDT para a SCC-25 e redução de toxicidade para a SCC-4.

Portanto, a fim de investigar as diferentes respostas das linhagens frente ao protocolo combinado proposto, todos os demais experimentos foram realizados com um único parâmetro de iluminação-PBMT, de 780 nm, mantendo a dose de 5 J/cm² - 28,90 mW/cm².

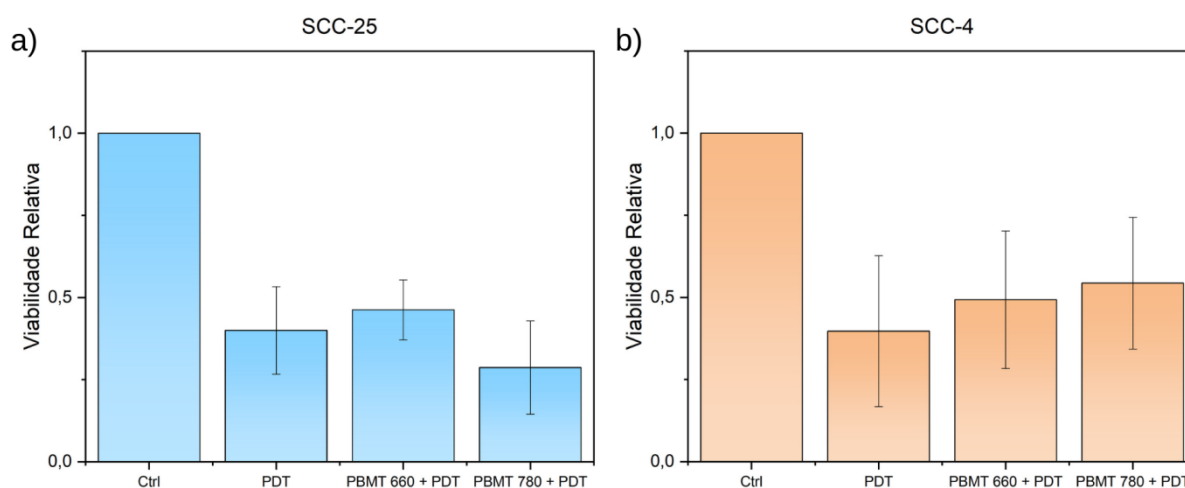


Figura 3 - Viabilidade celular relativa em SCC-25 (a) e SCC-4 (b) com iluminação-PBMT a 660nm e 780nm.
Fonte: Elaborada pela autora.

3.2 Viabilidade celular: PBMT 780nm - PDT

Viabilidade celular relativa aos controles 24h após iluminação-PDT das linhagens SCC-25 e SCC-4 é mostrada nas figuras 4.a. e 4.b., respectivamente. Para a SCC-25, a viabilidade do grupo PBMT foi estatisticamente diferente do controle, apesar de não ser muito expressiva, correspondente a um aumento de cerca de 8%. Já os efeitos da PBMT na SCC-4 não foram significativos.

Os grupos PDT resultaram em uma decréscimo de 64% na viabilidade celular em células SCC-25 e de 32% em SCC-4. Ou seja, a SCC-25 se mostrou mais sensível a PDT do que a outra linhagem. Em relação ao efeito da PBM na PDT, observamos um aumento na morte celular para SCC-25 com uma diferença estatisticamente significativa. A viabilidade PBMT-PDT nessas células foi de cerca de 70% do grupo PDT e representou uma redução adicional de 10% na viabilidade em comparação com o controle. Em relação às células SCC-4, o efeito da PBMT na PDT não foi estatisticamente significativo. Entretanto na combinação das técnicas, PBMT-PDT, nenhuma linhagem apresentou aumento de atividade metabólica em relação ao grupo PDT.

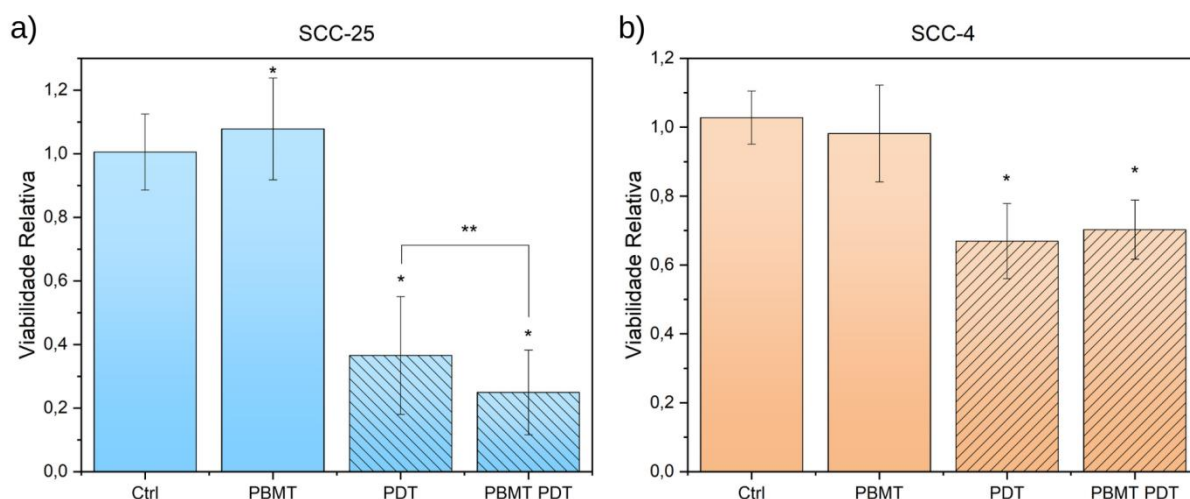


Figura 4 - Viabilidade celular relativa em SCC-25 (a) e SCC-4 (b). Diferença estatística significativa do controle representada por (*) e entre os grupos representada por (**).

Fonte: Elaborada pela autora.

3.3 Proliferação celular

A contagem de células foi realizada 24 horas após a PBMT para investigar os efeitos do protocolo de iluminação na proliferação celular (figura 5). Foi observado que a PBMT não provocou alteração na proliferação para nenhuma linhagem, pois não houve diferença estatística entre os grupos. Portanto, entende-se que os resultados de viabilidade por MTT ocorreram devido a diferenças no metabolismo e não a alterações no número de células ou proliferação. Além disso, o resultado de contagem endossa a evidência que indica a segurança da PBMT em células cancerosas. (43)

Na aplicação clínica da PBMT, como prevenção e redução de morbidades por quimio-radioterapia em pacientes com HNSCC, especialmente mucosite, a iluminação da área tumoral é evitada. No entanto, a preocupação dos profissionais em oncologia em relação aos efeitos da PBM em tumores é válida, pois observamos que a PBMT pode alterar o metabolismo de células de tumores do mesmo tecido de maneiras diferentes. Portanto, é importante realizar estudos pré-clínicos abordando os efeitos e mecanismos da PBM em células tumorais e, em seguida, ensaios clínicos. Os efeitos distintos da PBM nas linhagens celulares testadas são a primeira indicação das diferenças entre eles. Observamos também que as linhagens diferem entre si quanto à sensibilidade à PDT e que a PBMT induz um incremento na morte celular em SCC-25 que não é observado em SCC-4. Na sequência serão abordadas outras diferenças.

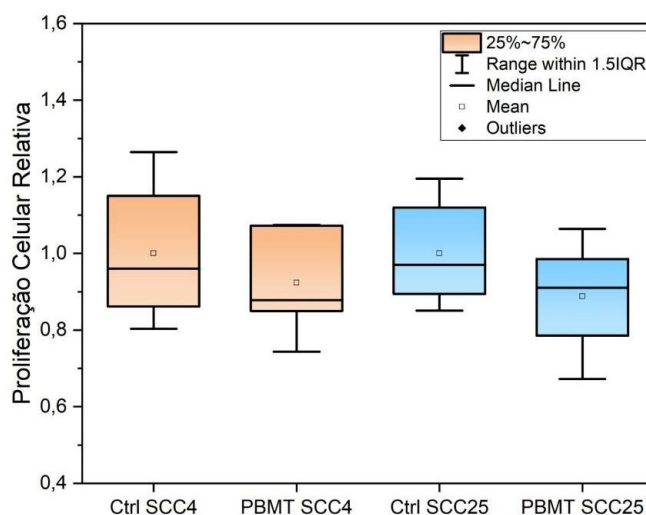


Figura 5 - Contagem de células 24h após PBMT em relação ao seu grupo de controle correspondente. Nenhuma diferença estatística é observada entre os grupos.

Fonte: Elaborada pela autora.

3.4 Captação de fotossensibilizador

A captação de PS após PBMT é mostrada na figura 6. Observamos que a PBMT induziu um aumento de 5% na captação em SCC-25, mas provocou uma diminuição da concentração de PS de 4% em SCC-4. Este resultado não explica completamente o impacto da PBMT na alteração da toxicidade da PDT, uma vez que é responsável por apenas uma fração desse efeito. A hipótese é que, além da captação, a PBM pode alterar a localização subcelular de PS para locais mais sensíveis. Sabe-se que o Photofrin®, um análogo do Photogem, é um fotossensibilizador hidrofóbico, frequentemente localizado no plasma e nas membranas intracelulares. (42) Uma vez que as ROS são **altamente** reativas, apresentando uma meia-vida curta, os locais mais sensíveis são aqueles onde as ROS são geradas, ou seja, onde o PS tende a se localizar. (19) Outra hipótese é que a PBM poderia modular a permeabilidade celular ao PS. Sommer *et al.* mostraram que laser de 670nm foi capaz de alterar a densidade e a viscosidade das camadas de água nanoscópicas contidas entre as superfícies hidrofílicas em células HeLa, promovendo um efeito de convecção transmembrana, forçando as células a internalizar fármacos citostáticos. (44)

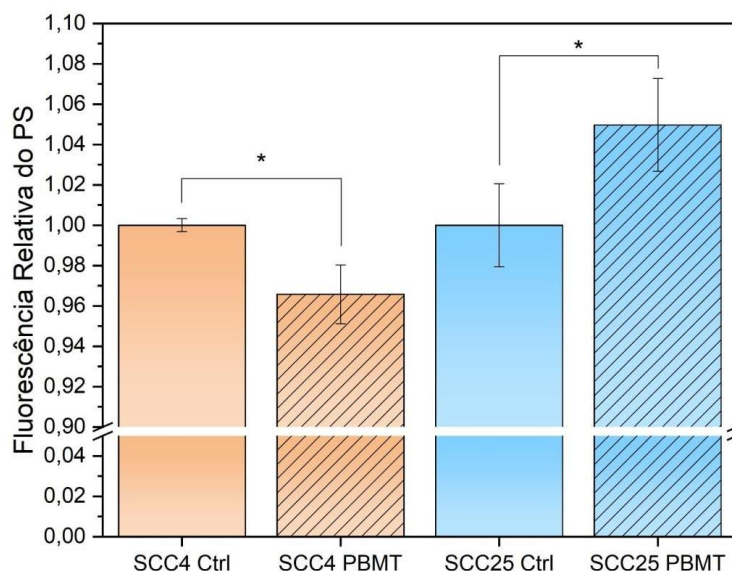


Figura 6 - Fluorescência relativa de PS após 4 h de incubação, medida por citometria de fluxo. Os grupos PBMT foram iluminados imediatamente antes da incubação. A significância estatística entre os grupos mostrados ($p < 0,05$) é representada por (*).

Fonte: Elaborada pela autora.

3.5 DCFH-DA: formação de ROS na PDT

A produção relativa de ROS por PDT foi analisada pela intensidade de fluorescência do DCF, medida por citometria de fluxo (figura 7) logo após iluminação-PDT. O DCFH-DA oxidado é um dos métodos mais amplamente usados para medir diretamente o estado redox de uma célula. (45) Apesar de ser um marcador de ROS inespecífico, pode ser usado para acompanhar mudanças nas ROS após a PDT, uma vez que o tratamento gera diversas espécies reativas. Com essa análise, observou-se que a PBMT induziu um aumento de mais de 20% na produção de ROS em SCC-25. Para as células SCC-4 houve uma tendência de diminuição, mas sem diferença estatística significativa. Esse resultado também explica em parte as diferentes respostas das linhagens frente PBMT-PDT, uma vez que a geração de ROS está relacionada à letalidade da PDT e também se relaciona a captação de PS, pois a concentração de ROS geradas é diretamente dependente de sua concentração de PS no interior das células. No entanto, em SCC-25, o aumento de ROS (20%) é maior do que o incremento de PS (5%), essa diferença pode ser devido a mudanças na localização subcelular de PS, uma vez que alguns locais são mais sensíveis a danos.

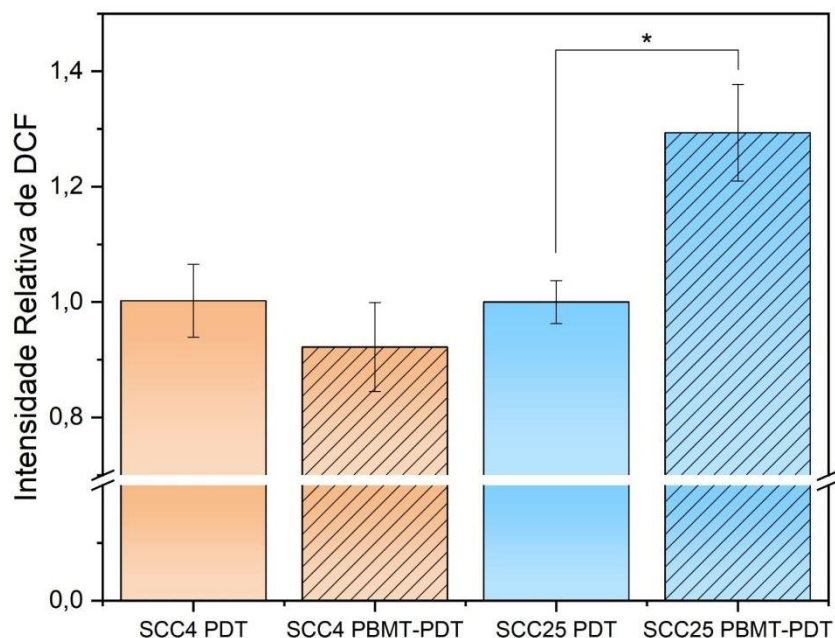


Figura 7 - Fluorescência de DCF em relação ao controle imediatamente após PDT, medida por citometria de fluxo. A significância estatística ($p < 0,05$) é mostrada por (*).

Fonte: Elaborada pela autora.

3.6 Ácido ascórbico: papel das ROS na PBMT

O ácido ascórbico, um potente antioxidante, foi incubado 2h antes da iluminação-PBMT e, em seguida, os protocolos PBMT e PDT foram realizados conforme descrito. O efeito da incubação com ácido ascórbico foi avaliado devido ao seu potencial para prevenir os efeitos da PBMT na PDT. Propõe-se que a cascata de eventos da PBM comece pela absorção de energia pela citocromo c oxidase e, em seguida, por mudanças na concentração de alguns mediadores, incluindo ROS. Seu aumento após PBMT é relatado por vários grupos. (10,46-52) Portanto, se a presença de um agente antioxidante reduz ou suprime o efeito do PBMT, pode-se concluir que as ROS são fundamentais para o início das vias que levam aos efeitos observados. Os resultados são mostrados na figura 8. Este composto não teve efeito significativo nos controles e nos grupos PDT, no entanto, para SCC-25 (figura 8.a.) ele impediu os efeitos da PBM na diminuição da viabilidade do grupo PBMT-PDT. Comparando os grupos correspondentes, nota-se que a viabilidade do PBMT foi a mesma que no controle e o PBMT-PDT também não teve diferença significativa em relação ao PDT. Para SCC-4 (figura 8.b.), observamos que AA não reverteu completamente o efeito da PBM em comparação com o controle, ainda que o tenha reduzido, já o grupo PBMT-PDT permaneceu comparável ao PDT.

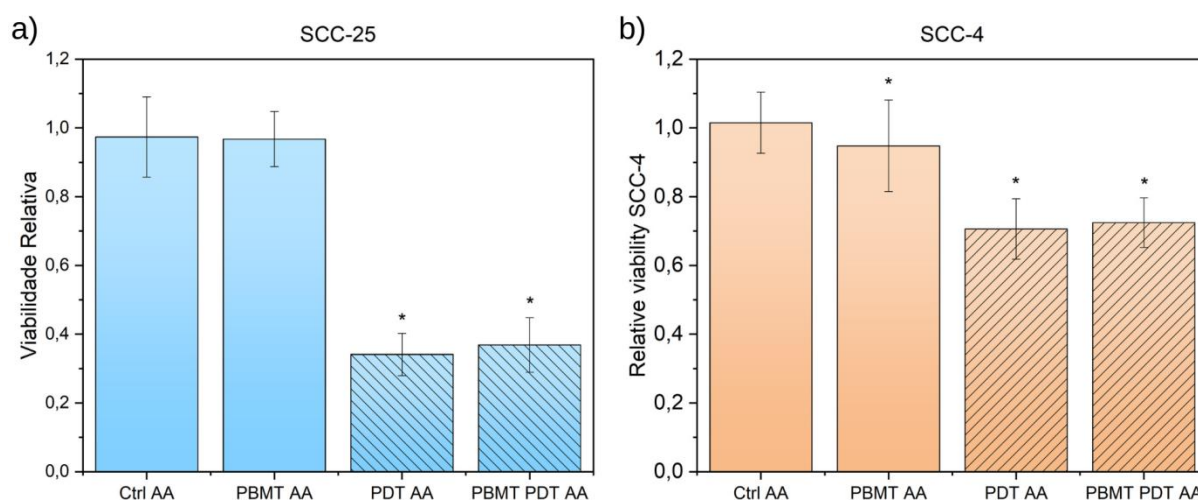


Figura 8 - Efeito do ácido ascórbico (AA) na viabilidade de SCC-25(a) e SCC-4 (b), mostrando que os efeitos da PBMT em PDT em células SCC-25 são mediados por ROS. A significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao controle é mostrada por (*).

Fonte: Elaborada pela autora.

A capacidade do ácido ascórbico em prevenir os efeitos da PBM, por meio da sua ação antioxidante, foi explorada em alguns estudos, com o objetivo de entender o papel das ROS nos mecanismos iniciais que provocam a cascata de efeitos observados. Zhang *et al.* relataram que a ativação por PBM de tirosina quinases Src é mediada por ROS e que a presença de AA diminuiu suas concentrações quase ao nível basal. (51) Chen *et al.* observaram que a presença de AA, na mesma concentração e tempo de incubação utilizados no presente estudo, anulou o aumento de ROS e ativação de NF- κ B por PBM, mas não o aumento de ATP. (10) Nos resultados do presente estudo, verificou-se que o AA eliminou os efeitos do PBMT em todos os seus grupos de células SCC-25, resultando em valores semelhantes aos dos grupos não submetidos a PBMT. Portanto, podemos concluir que as ROS desempenham um papel importante nos mecanismos iniciais do efeito do PBM na PDT. Em células SCC-4, no entanto, AA não inibiu o efeito da PBM para o grupo PBMT, apresentando uma tendência de diminuição na viabilidade celular, nem teve qualquer efeito no grupo PBMT-PDT, que permaneceu comparável ao PDT. A hipótese é que as vias de PBM em SCC-4 e SCC-25 podem ser diferentes, produzindo os resultados distintos observados neste estudo.

4 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados apresentados demonstram o efeito da combinação de iluminação PBMT 780nm antes da PDT em células de carcinoma epidermóide de língua. Apesar das evidências indicando que a PBMT induz o metabolismo celular de forma a potencializar a ação fotodinâmica (aumentando a captação de PS e a produção de ROS), observamos efeitos distintos entre as linhagens celulares. É importante notar, entretanto, que a PBMT não reduziu o efeito da PDT em nenhum deles, o que pode ser um indício da segurança combinação. No entanto, novos experimentos são fundamentais para confirmá-lo, incluindo a investigação de outros tipos de tumor e protocolos de tratamento, utilizando modelos *in vitro* e *in vivo* que permitiriam o desenho de ensaios clínicos. A tendência de diminuição na captação de PS e produção de ROS para SCC-4, no entanto, deve ser mais investigada juntamente com a compreensão de quais mecanismos da PBM modulam esses resultados. Portanto, elucidar a combinação PBMT-PDT é interessante, uma vez que pode ser uma técnica segura e de baixo custo com protocolos simples, com possibilidade de melhora significativa no resultado do tratamento.

REFERÊNCIAS

- 1 PASSARELLA, S.; KARU, T. Absorption of monochromatic and narrow band radiation in the visible and near IR by both mitochondrial and non-mitochondrial photoacceptors results in photobiomodulation. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: biology*, v. 140, p. 344–358, 2014. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2014.07.021.
- 2 ANDERS, J. J.; LANZAFAME, R. J.; ARANY, P. R. Low-level light/laser therapy versus photobiomodulation therapy. *Photomedicine and Laser Surgery*, v. 33, p. 183–184, 2015. DOI: 10.1089/pho.2015.9848.
- 3 POYTON, R. O.; BALL, K. A. Therapeutic photobiomodulation: nitric oxide and a novel function of mitochondrial cytochrome c oxidase. *Discovery Medicine*, v. 11, n. 57, p.154, 2011.
- 4 CHUNG, H. *et al.* The nuts and bolts of low-level laser (light) therapy. *Annals of Biomedical Engineering*, v.40, p. 516–533, 2012. DOI: 10.1007/s10439-011-0454-7.
- 5 FREITAS, L. F.; M.R. HAMBLIN, M. R. Proposed mechanisms of photobiomodulation or low-level light therapy. *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, v.22, p. 348–364, 2016. DOI: 10.1109/JSTQE.2016.2561201.
- 6 PANDESHWAR, P. *et al.* Photobiomodulation in oral medicine: a review. *Journal of Investigative and Clinical Dentistry*, v. 7, p. 114–126, 2016. DOI: 10.1111/jicd.12148.
- 7 HANNA, R. *et al.* Photobiomodulation therapy in oral mucositis and potentially malignant oral lesions: a therapy towards the future. *Cancers*, v. 12, n. 7, p. 1949, 2020. DOI: 10.3390/cancers12071949.
- 8 KARU, T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: biology*, v. 49, p.1–17, 1999. DOI: 10.1016/s1011-1344(98)00219-x.
- 9 KARU, T. I.; PYATIBRAT, L. V.; AFANASYEVA, N. I. A novel mitochondrial signaling pathway activated by visible-to-near infrared radiation. *Photochemistry and Photobiology* , v. 80, p. 366–372, 2007. DOI: 10.1111/j.1751-1097.2004.tb00097.x.
- 10 CHEN, A. C.-H. *et al.* Low-level laser therapy activates NF-kB via generation of reactive oxygen species in mouse embryonic fibroblasts. *PLoS ONE*, v. 6, p. e22453, 2011. DOI: 10.1371/journal.pone.0022453.
- 11 ZEIN, R.; SELTING, W.; HAMBLIN, M. R. Review of light parameters and photobiomodulation efficacy: dive into complexity. *Journal of Biomedical Optics*, v. 23, n. 12, p. 120901, 2018. DOI: 10.1117/1.jbo.23.12.120901.
- 12 ONISZCZUK, A.; WOJTUNIK-KULESZA, K. A.; ONISZCZUK, T.; KASPRZAK, K. The potential of photodynamic therapy (PDT)—experimental investigations and clinical use. *Biomedicine & Pharmacotherapy* , v. 83, p. 912–929, 2016. DOI: 10.1016/j.biopha.2016.07.058.
- 13 ABDEL-KADER, M. H. (ed.). *Photodynamic therapy: from theory to application*. Berlin Heidelberg: Springer, 2014. DOI: 10.1007/978-3-642-39629-8.

- 28 VASCONCELOS, M. G. *et al.* Squamous cell carcinoma of the tongue: clinical and morphological analysis of 57 cases and correlation with prognosis. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 50, n. 5, 2014. DOI: 10.5935/1676-2444.20140040.
- 29 RODRIGUES, P. C. *et al.* Clinicopathological prognostic factors of oral tongue squamous cell carcinoma: a retrospective study of 202 cases. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, v. 43, p. 795–801, 2014. DOI: 10.1016/j.ijom.2014.01.014.
- 30 NAUTA, J. M. *et al.* Photodynamic therapy of oral cancer a review of basic mechanisms and clinical applications. *European Journal Of Oral Sciences*, v. 104, p. 69–81, 1996. DOI: 10.1111/j.1600-0722.1996.tb00049.x.
- 31 SONIS, S. T. The pathobiology of mucositis. *Nature Reviews Cancer*, v. 4, p. 277–284, 2004. DOI: 10.1038/nrc1318.
- 32 SONIS, S. T. Mucositis: the impact, biology and therapeutic opportunities of oral mucositis. *Oral Oncology*, v. 45, p. 1015–1020, 2009. DOI: 10.1016/j.oraloncology.2009.08.006.
- 33 ZADIK, Y. *et al.* Systematic review of photobiomodulation for the management of oral mucositis in cancer patients and clinical practice guidelines. *Support Care Cancer*, v. 27, p. 3969–3983, 2019. DOI: 10.1007/s00520-019-04890-2.
- 34 PAGLIONI, M. P. *et al.* Patterns of oral mucositis in advanced oral squamous cell carcinoma patients managed with prophylactic photobiomodulation therapy—insights for future protocol development. *Lasers in Medical Science*, v. 36, p. 429–436, 2020. DOI: 10.1007/s10103-020-03091-2.
- 35 ALGHAMDI, K. M.; KUMAR, A.; MOUSSA, N. A. Low-level laser therapy: a useful technique for enhancing the proliferation of various cultured cells. *Lasers in Medical Science*, v. 27, p. 237–249, 2011. DOI: 10.1007/s10103-011-0885-2.
- 36 MYHRE, O.; ANDERSEN, J. M.; AARNES, H.; FONNUM, F. Evaluation of the probes 2',7'-dichlorofluorescein diacetate, luminol, and lucigenin as indicators of reactive species formation. *Biochemical Pharmacology*, v. 65, p. 1575–1582, 2003. doi:10.1016/s0006-2952(03)00083-2.
- 37 PUTCHALA, M. C. *et al.* Ascorbic acid and its pro-oxidant activity as a therapy for tumours of oral cavity – A systematic review. *Archives of Oral Biology*, v. 58, p. 563–574, 2013. DOI: 10.1016/j.archoralbio.2013.01.016.
- 38 DE FARIA, C. M. G.; COSTA, C. S.; BAGNATO, V. S. Photobiomodulation effects on photodynamic therapy in HNSCC cell lines. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology* v. 217, 2021. DOI:10.1016/j.jphotobiol.2021.112170
- 39 YANG, D.-F. *et al.* Improve efficacy of topical ALA-PDT by calcipotriol through up-regulation of coproporphyrinogen oxidase. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v. 11, n. 3, p. 331–341, 2014. DOI: 10.1016/j.pdpdt.2014.05.001
- 40 YANG, D.-F. *et al.* Methotrexate enhances 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy-induced killing of human SCC4 cells by upregulation of coproporphyrinogen oxidase. *Journal of the Formosan Medical Association*, v. 113, n. 2, p. 88–93, 2014. DOI: 10.1016/j.jfma.2013.12.005.

- 41 BHUVANESWARI, R. *et al.* Nimotuzumab increases the anti-tumor effect of photodynamic therapy in an oral tumor model. *Oncotarget*, v. 6, n. 15, p. 13487–13505, 2015. DOI: 10.18632/oncotarget.3622.
- 42 KELLEY, E. E. *et al.* Increased efficacy of in vitro Photofrin® photosensitization of human oral squamous cell carcinoma by iron and ascorbate. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: biology*, v. 40, p. 273–277, 1997. DOI: 10.1016/s1011-1344(97)00068-7
- 43 SCHALCH, T. D. *et al.* Photobiomodulation is associated with a decrease in cell viability and migration in oral squamous cell carcinoma. *Lasers in Medical Science*, v. 34, p. 629–636, 2018. DOI: 10.1007/s10103-018-2640-4.
- 44 SOMMER, A. P. *et al.* Biostimulatory windows in low-intensity laser activation: lasers, scanners, and NASA's light-emitting diode array system. *Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery*, v. 19, n. 1, p. 29–33, 2001. DOI: 10.1089/104454701750066910.
- 45 ERUSLANOV, E.; KUSMARTSEV, S. Identification of ROS using oxidized DCFDA and flow-cytometry. In: ARMSTRONG, D. (ed.). *Advanced protocols in oxidative stress II*. Totowa : Humana Press, 2009. p. 57-72. (Methods in molecular biology, v. 594). DOI: 10.1007/978-1-60761-411-1_4.
- 46 LUBART, R. *et al.* Low-energy laser irradiation promotes cellular redox activity. *Photomedicine and Laser Surgery*, v. 23, p. 3-9, 2005. DOI: 10.1089/pho.2005.23.3.
- 47 CALLAGHAN, G. A. *et al.* Reactive oxygen species inducible by low-intensity laser irradiation alter DNA synthesis in the haemopoietic cell line U937. *Lasers in Surgery and Medicine*, v. 19, n. 2, 201–206, 1996
- 48 GROSSMAN, N. *et al.* 780 nm low power diode laser irradiation stimulates proliferation of keratinocyte cultures: involvement of reactive oxygen species. *Lasers in Surgery and Medicine*, v. 22, n. 4, p. 212–218, 1998.
- 49 LAVI, R. *et al.* Low energy visible light induces reactive oxygen species generation and stimulates an increase of intracellular calcium concentration in cardiac cells. *Journal of Biological Chemistry*, v. 278, p. 40917–40922, 2003. DOI: 10.1074/jbc.m303034200.
- 50 YU, W. *et al.* Photomodulation of oxidative metabolism and electron chain enzymes in rat liver mitochondria. *Photochemistry and Photobiology*, v. 66, p. 866–871, 1997. DOI: 10.1111/j.1751-1097.1997.tb03239.x.
- 51 ZHANG, J.; XING, D.; GAO, X. Low-power laser irradiation activates Src tyrosine kinase through reactive oxygen species-mediated signaling pathway. *Journal of Cellular Physiology*, v. 217, p. 518–528, 2008. DOI: 10.1002/jcp.21529.
- 52 KARU, T. I.; PYATIBRAT, L. V.; KALENDO, G. S. Cell attachment modulation by radiation from a pulsed light diode ($\lambda=820$ nm) and various chemicals. *Lasers in Surgery and Medicine*, v. 28, p. 227–236, 2001. DOI: 10.1002/lsm.1043.