

**MARINA GABRIELA TEIXEIRA BUCK**

**Análise do fenótipo de células-tronco neoplásicas em células epiteliais  
displásicas orais e de carcinoma epidermóide oral resistentes à terapia  
fotodinâmica**

São Paulo

2018



**MARINA GABRIELA TEIXEIRA BUCK**

**Análise do fenótipo de células-tronco neoplásicas em células epiteliais  
displásicas orais e de carcinoma epidermóide oral resistentes à terapia  
fotodinâmica**

**Versão Corrigida**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas para obter o título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Patologia Oral e Maxilofacial e Pacientes Especiais

Orientador: Profa. Dra. Luciana Corrêa

São Paulo

2018

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.

Catálogo-na-Publicação  
Serviço de Documentação Odontológica  
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Buck, Marina Gabriela Teixeira.

Análise do fenótipo de células-tronco neoplásicas em células epiteliais displásicas orais e de carcinoma epidermóide oral resistentes à terapia fotodinâmica / Marina Gabriela Teixeira Buck ; orientador Luciana Corrêa. -- São Paulo, 2018.

117p. : fig., tab., graf., ; 30 cm.

Tese (Doutorado) -- Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas. Área de Concentração: Patologia Oral e Maxilofacial e Pacientes Especiais. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida

1. Terapia fotodinâmica. 2. Carcinoma de células escamosas. 3. Patologia bucal. I. Corrêa, Luciana. II. Título.

Buck MGT. Análise do fenótipo de células-tronco neoplásicas em células epiteliais displásicas orais e de carcinoma epidermóide oral resistentes à terapia fotodinâmica. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovado em: 17 / 10 / 2018

### **Banca Examinadora**

Prof(a). Dr(a). Marília Trierveiler Martins

Instituição: FO-USP

Julgamento: Aprovada

Prof(a). Dr(a). Juliana Ferreira Strixino

Instituição: UNIVAP

Julgamento: Aprovada

Prof(a). Dr(a). Maria Fernanda Setúbal Destro Rodrigues

Instituição: UNINOVE

Julgamento: Aprovada



*Dedico esta tese de doutorado a minha mãe, Sebastiana Aparecida Teixeira por todo o amor, dedicação e bons exemplos que me ofereceu ao longo desses 30 anos. Tais demonstrações de amor sempre me ajudaram a persistir em meus sonhos.*

*Obrigada mãe, te amo mais do que posso demonstrar.*

*Parabéns por esse título de doutora, ele é todo seu.*



## AGRADECIMENTOS

A minha Orientadora Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Luciana Corrêa, por sempre estar ao meu lado me ouvindo e discutindo comigo todas as dúvidas que surgiram no decorrer desses anos. Obrigada por ser uma orientadora presente, preocupada e amável, obrigada por ter embarcado comigo nesse mundo de células-tronco. Levo comigo uma admiração enorme da profissional e da pessoa que a senhora sempre foi.

Ao meu marido Daniel Buck, por toda a parceria nessa caminhada, sem o seu ombro amigo e a certeza que você estava lá para me ajudar nos momentos mais difíceis eu não chegaria até o dia de hoje, divido esse título de doutora com você meu amor.

Aos meus sogros Ana e Marco, por todo o amor, carinho e preocupação. Obrigada pelos almoços deliciosos que me salvaram em muitos momentos nos quais eu não tinha tempo de cozinhar, mas principalmente obrigada por terem me recebido de modo tão amável no seio dessa linda família que vocês formaram.

A Flávia Rosin, amiga e parceira de laboratório e profissão, amiga agradeço pelo ensinamento compartilhado, pelas inúmeras ajudas no laboratório, pela parceria na cultura celular e principalmente pela sua amizade. Meus dias ficavam muito mais leves com nossos cafés e nosso bate papo, para você desejo só o melhor, muito sucesso na vida profissional e mais ainda na vida pessoal. Te levo comigo no coração.

A Dani Carvalho, pela parceria e amizade. Por todas as deliciosas conversas e risadas que tivemos e por ser a minha parceira de prazos. Parabéns pelo seu título e que você conquiste muito mais na sua vida amiga.

Aos amigos, que por muitos momentos tiveram que entender a minha ausência em encontros e que sempre estiveram ao meu lado para me ajudar a continuar na caminhada por mais que o caminho estivesse complicado.

Aos professores da disciplina de Patologia Oral e Maxilofacial, com quem tive o prazer de conviver durante os anos de mestrado e doutorado, obrigada pelos conhecimentos compartilhados e por todas as conversas que alegravam nossos horários de almoço e de café.

Aos secretários da disciplina de Patologia Oral e Maxilofacial, por toda a colaboração e ajuda em dúvidas que surgiram durante esses anos, em especial ao secretário Vinícius por toda a paciência e solicitude em me ajudar nos problemas e dúvidas que surgiram.

A querida Cida, secretária da disciplina de Radiologia que se mostrou uma grande amiga e colega de corredor, muito obrigada pelos “bom dia” animados, pela preocupação e por todos os quitutes que você sempre fez questão de compartilhar comigo, você emana uma luz muito linda Cida, serei eternamente grata por nossos caminhos terem se cruzado.

Aos técnicos dos laboratórios, Adriana, Elisa e Juvani por todo o apoio em relação a técnicas e dúvidas laboratoriais e também pela amizade e convívio tão harmonioso.

As colegas de pós e professoras Maria Fernanda e Lucyene. Obrigada por compartilharem comigo informações sobre técnicas e pela troca de ideias. Desejo muito sucesso a vocês.

A Cibele, pela amizade e parceria nesses 6 anos de FOUSP. Desejo que você conquiste muito mais na sua vida profissional e pessoal.

A todos os meus colegas de pós-graduação com quem tive o prazer de conviver durante esses anos e com quem dividi momentos deliciosos, muito sucesso e vitórias para todos vocês, espero que nossos caminhos ainda se cruzem muito.

*“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.*  
*(Madre Teresa de Calcutá)*



## RESUMO

Buck MGT. Análise do fenótipo de células-tronco neoplásicas em células epiteliais displásicas orais e de carcinoma epidermóide oral resistentes à terapia fotodinâmica [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2018. Versão Corrigida.

O carcinoma epidermóide oral (CEO) tem alta incidência e mortalidade no mundo, sendo frequentes casos de recidivas em função da resistência aos tratamentos convencionais. Essa resistência tem sido associada à presença de células tronco tumorais (CTT). A terapia fotodinâmica (PDT) tem sido utilizada nos casos de desordens orais potencialmente malignas (DOPM) e CEOs superficiais, com relativo índice de sucesso. Contudo, são relatados casos de recidivas, que sugerem certa resistência à PDT. O objetivo do presente trabalho foi avaliar se células de DOPM desenvolvem resistência à PDT mediada pelo ácido 5-aminolevulínico (5-ALA), tal qual ocorre com células de CEO expostas ao mesmo tratamento, bem como verificar se as células displásicas e neoplásicas orais exibem um fenótipo sugestivo de células tronco tumoral. Foram cultivadas células epiteliais displásicas orais (linhagem DOK) e células de CEO de língua (linhagem SCC9), divididas nos seguintes grupos experimentais: Grupo Controle – células sem tratamento; Grupo ALA – células tratadas com 5-ALA, com concentração e tempo de incubação igual ao do grupo PDT; Grupo LED - células tratadas com LED, com dosimetria igual ao do grupo PDT; Grupo PDT – células tratadas com PDT mediada pelo 5-ALA, subdivididas em duas gerações: geração 1 – células expostas a somente um ciclo de PDT; geração 4 – células expostas a quatro ciclos de PDT e que exibiram resistência (maior viabilidade) à dose inicial aplicada para a geração 1. Para esses grupos, foram realizados ensaios de formação de colônias e de invasão, bem como citometria de fluxo para verificar a expressão de CD44, ESA e p75<sup>NTR</sup>. Observou-se que todos os grupos expostos à PDT contendo células da linhagem DOK exibiram resistência à dose inicial de PDT, porém em intensidade menor àquela observada para a linhagem SCC9. As células resistentes à PDT de ambas as linhagens exibiram maior potencial de formação de colônias, mas somente a primeira geração de células exibiu maior potencial de invasão. Na análise de citometria de fluxo, observou-se que as células resistentes à

PDT de ambas as linhagens exibiram superexpressão de CD44<sup>high</sup>/ESA<sup>high</sup>. A linhagem SCC9 exibiu ainda maior frequência de células CD44<sup>high</sup>/ESA<sup>low</sup> e CD44<sup>high</sup>/p75<sup>NTR+</sup>, sugerindo a presença de uma subpopulação com alto potencial de invasão e resistente aos tratamentos convencionais. Não houve diferenças significativas na frequência de células ESA<sup>high</sup>/p75<sup>NTR+</sup> em ambas as linhagens. Concluiu-se que as células displásicas orais desenvolvem resistência à PDT com intensidade menor se comparada às células SCC9. Em ambas as linhagens, as células resistentes exibiram um fenótipo sugestivo de células tronco tumorais. Esse fato deve ser considerado ao se instituir a PDT mediada pelo 5-ALA em lesões displásicas e neoplásicas orais que demandam múltiplos ciclos de tratamento.

Palavras-chave: Terapia fotodinâmica. Ácido 5-aminolevulínico. Lesões potencialmente malignas orais. Carcinoma epidermóide oral. Resistência tumoral.

## ABSTRACT

Buck MGT. Analysis of the tumor stem cell phenotype in oral dysplastic epithelial cells and oral squamous cell carcinoma resistant to photodynamic therapy [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2018. Versão Corrigida.

Oral squamous cell carcinoma (SCC) has a high incidence and mortality in the world. There are frequent cases of relapses due to its resistance to conventional treatments. This resistance has been associated with the presence of cancer stem cells (CSC). Photodynamic therapy (PDT) has been used in cases of potentially malignant oral lesions (PMOL) and superficial SCC's, with a relative success rate. However, relapses are reported, which suggest some resistance to PDT. The aim of the present study was to evaluate whether PMOL cells develop resistance to PDT mediated by the 5-aminolevulinic acid (5-ALA), as occurs with SCC cells exposed to the same treatment, as well as to verify if dysplastic and oral neoplastic cells exhibit a suggestive phenotype of CSC. Oral dysplastic epithelial cells (DOK lineage) and CSC cells of the tongue (SCC9 lineage) were divided into the following experimental groups: Control Group – cells with no treatment; Group ALA – 5-ALA treated cells, with concentration and incubation time equal to that of the PDT group; LED group – LED light treated cells, with dosimetry equal to that of the PDT group; PDT group – cells treated with PDT mediated by the 5-ALA, subdivided into two generations: Generation 1 – cells exposed to only one PDT cycle; Generation 4 – cells exposed to four PDT cycles and exhibiting resistance (greater viability) to the initial dose applied for Generation 1. Colony forming and invasion assays, as well as flow cytometry to verify the expression of CD44, ESA and p75<sup>NTR</sup> were performed to the experimental groups. It was observed that all groups exposed to PDT containing DOK lineage cells exhibited resistance to the initial dose of PDT, but at a lower intensity than those observed for the SCC9 lineage. PDT-resistant cells from both lineages exhibited increased potential for colony formation, but only the first generation of cells exhibited increased invasion potential. In flow cytometric analysis, PDT-resistant cells from both lineages exhibited overexpression of CD44<sup>high</sup> / ESA<sup>high</sup>. SCC9 lineage also exhibited higher frequency of CD44<sup>high</sup> / ESA<sup>low</sup> and CD44<sup>high</sup> / p75<sup>NTR+</sup> cells, suggesting the presence of a subpopulation with

high invasion potential and resistant to conventional treatments. There were no significant differences in the frequency of  $\text{ESA}^{\text{high}} / \text{p75}^{\text{NTR}+}$  cells in both lineages. It was concluded that the oral dysplastic cells develop resistance to PDT, with lower intensity when compared to SCC9 cells. In both lineages, the resistant cells exhibited a phenotype suggestive of CSC. This fact should be considered when establishing PDT mediated by the 5-ALA in oral dysplastic and neoplastic lesions that require multiple cycles of treatment.

Keywords: Photodynamic therapy. 5-aminolevulinic acid. Oral potentially malignant lesions. Oral squamous cell carcinoma. Tumor resistance.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	17
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	19
2.1	LESÕES POTENCIALMENTE MALIGNAS ORAIS.....	19
2.2	CARCINOMA EPIDERMÓIDE ORAL.....	20
2.3	TERAPIA FOTODINÂMICA ONCOLÓGICA .....	21
<b>2.3.1</b>	<b>Mecanismo de terapia fotodinâmica</b> .....	22
<b>2.3.2</b>	<b>A luz e sua função na terapia fotodinâmica</b> .....	23
<b>2.3.3</b>	<b>Fotossensibilizadores</b> .....	24
<b>2.3.4</b>	<b>Terapia fotodinâmica para lesões potencialmente malignas orais</b> .	26
<b>2.3.5</b>	<b>Terapia fotodinâmica para carcinoma epidermóide oral</b> .....	28
<b>2.3.6</b>	<b>Terapia fotodinâmica e resistência celular</b> .....	29
2.4	CÉLULAS-TRONCO TUMORAIS.....	31
<b>2.4.1</b>	<b>Resistência tumoral a terapias e células-tronco tumorais</b> .....	33
<b>2.4.2</b>	<b>Células-tronco tumorais e terapia fotodinâmica</b> .....	35
<b>2.4.3</b>	<b>Marcadores expressos em células-tronco tumorais de carcinoma epidermóide oral</b> .....	36
<b>3</b>	<b>PROPOSIÇÃO</b> .....	47
3.1	GERAL.....	47
3.2	ESPECÍFICAS .....	47
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	49
4.1	CULTIVO CELULAR E GRUPOS EXPERIMENTAIS .....	49
4.2	MODELO DE INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA À PDT MEDIADA PELO 5-ALA.....	50
4.3	VIABILIDADE CELULAR.....	52
4.4	FORMAÇÃO DE COLÔNIAS .....	52
4.5	ENSAIOS DE INVASÃO CELULAR POR MATRIGEL® .....	53
4.6	CITOMETRIA DE FLUXO.....	53
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	54
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	57
5.1	OBTENÇÃO DE LINHAGENS RESISTENTES À PDT .....	57
5.2	ENSAIO DE FORMAÇÃO DE COLÔNIAS.....	59

5.3	ENSAIO DE INVASÃO CELULAR .....	61
5.4	EXPRESSÃO DE CD44, ESA E P75 <sup>NTR</sup> .....	64
5.5	CO-EXPRESSÃO DE CD44 E ESA.....	68
5.6	CO-EXPRESSÃO DE CD44 e P5 <sup>NTR</sup> .....	75
5.7	CO-EXPRESSÃO DE ESA e P75 <sup>NTR</sup> .....	78
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>83</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>93</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>95</b>
	<b>ANEXOS</b> .....	<b>115</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O carcinoma epidermóide oral (CEO) é a quinta neoplasia maligna mais incidente em homens no Brasil, com frequência estimada em 5,2% dos casos de cânceres nesse sexo em 2018 (Instituto nacional de câncer, 2017). A cirurgia seguida de radioterapia é a modalidade terapêutica mais indicada para boa parte dos casos de CEO, porém são frequentes os casos inoperáveis ou com desenvolvimento de radorresistência, o que tem ensejado o desenvolvimento de novas terapias. Uma delas é a terapia fotodinâmica (PDT, do inglês “photodynamic therapy”), que tem sido utilizada para o tratamento de desordens orais potencialmente malignas (DOPM) e CEOs pouco invasivos (Wong et al., 2013; Maloth et al., 2016; Gondivkar et al., 2017). Na terapia fotodinâmica, aplica-se um fotossensibilizador (FS) (por via endovenosa ou por aplicação tópica) e, em seguida, ilumina-se a região tumoral (com LED ou laser). Esse procedimento gera alta produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), as quais induzem as células neoplásicas à morte por apoptose, necrose ou autofagia (Castano et al., 2006). Em DOPMs e CEOs, a terapia fotodinâmica tem demonstrado sucesso promissor, com alta frequência de remissões completas (Tsai et al., 2004; Jerjes et al., 2012). Porém, alguns casos recidivam, o que sugere que as células displásicas e neoplásicas orais também desenvolvem resistência à terapia fotodinâmica.

A resistência tumoral aos tratamentos antineoplásicos tem sido associada à presença de uma subpopulação denominada células troncos tumorais (CTTs). Essas células podem ser encontradas em tecidos saudáveis (denominadas como células-tronco -CTs), lesões potencialmente malignas e também em tecidos neoplásicos. O que chama mais atenção nas células tronco tumorais são suas características de auto-renovação, resistência a drogas e a sua capacidade de transição epitelial mesenquimal (TEM). Tais características fazem com que essas células sejam consideradas as responsáveis pela promoção, progressão e resistência tumoral (Monroe et al., 2011).

Tanto as células tronco como as células tronco tumorais expressam proteínas de adesão, receptores de membrana, enzimas e fatores de transcrição que ajudam na identificação e isolamento dessas células. Dentre alguns marcadores, pode-se citar

a glicoproteína transmembrânica CD44, o receptor de neurotrofinas p75<sup>NTR</sup> e a molécula de adesão intercelular ESA. Os três marcadores citados já tiveram suas expressões analisadas em DOPM e também no CEO, seja em separado ou em co-expressões, e demonstraram exercer um papel importante em invasão, metástases e resistência tumoral nessas lesões (Prince et al., 2007; Laimer et al., 2008; Kiyosue et al., 2013; Abdulmajeed et al., 2013; Dalley et al., 2013; Sen; Carnelio, 2016).

Poucos estudos avaliaram se a terapia fotodinâmica exerce efeito inibitório ou estimulatório sobre células tronco tumorais (Yu; Yu, 2014; Selbo et al., 2015; Wang et al., 2017). Em estudo anterior, demonstramos que células de CEO podem desenvolver resistência à terapia fotodinâmica mediada pelo ácido 5-aminolevulínico (5-ALA). Porém, não se sabe se essa resistência está atrelada a modificações no fenótipo de células tronco tumorais de DOPM e CEO. Assim, neste estudo propomos avaliar se as células de DOPM também podem desenvolver resistência à terapia fotodinâmica mediada pelo 5-ALA, e se essa resistência, bem como aquela das células de CEO, interfere no fenótipo de células tronco tumorais presentes nessas lesões.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Lesões potencialmente malignas orais

As desordens orais potencialmente malignas (DOPM) são um conjunto de manifestações com potencial de malignização na cavidade oral, tanto em um local já exibindo lesões precursoras, quanto na mucosa oral normal (Farah et al., 2014). Essas lesões exibem amplo espectro de manifestações clínicas, que incluem leucoplasia e eritroplasia (Warnakulasuriya, 2018). As leucoplasias são as mais comuns, e são definidas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como lesões brancas predominantes na mucosa oral que não podem ser caracterizadas como nenhum outro tipo de lesão (Woo, 2013). Ocorrem mais frequentemente na mucosa jugal, borda lateral e ventre da língua, assoalho, mucosa gengival e palato mole (Bouquot et al., 2006; Meiller et al., 2012).

Atualmente, a Organização Mundial de Saúde tem recomendado a utilização da expressão “desordens potencialmente malignas” para as lesões que exibem displasia epitelial (El-Naggar et al., 2017). Esta é caracterizada pela presença de células com atipia e desorganização da arquitetura normal do epitélio, com graus variados de intensidade; as lesões com displasia epitelial intensa têm sido associadas a maior risco de malignização (Warnakulasuriya et al., 2007; Van der waal, 2009; Speight et al., 2017).

O tratamento das lesões epiteliais com displasia discreta, em geral, é conservador, com preservação. Já para as lesões com displasia intensa, e que estejam associadas a outros fatores de risco, tais como fumo, sexo masculino, localização em borda lateral de língua e assoalho, demandam tratamento mais invasivo, em geral cirúrgico convencional (Awadallah et al., 2018). Eletrocauterização, criocirurgia ou ablação a laser também têm sido realizados. O acompanhamento por longo período após a remoção da lesão é sempre de extrema importância, já que a recorrência é frequente (Martorell-Calatayud et al., 2009; Bhattacharyya; Chehal, 2011).

A terapia fotodinâmica recentemente vem surgindo como uma alternativa no tratamento de LPMO, já que ela demonstra ser capaz de regredir totalmente ou parcialmente essas lesões apresentando poucos efeitos colaterais (Van der waal, 2009; Jerjes et al., 2012).

## **2.2 Carcinoma epidermóide oral**

O carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço é o sexto tipo de câncer mais comum no mundo e é composto por uma variedade de diferentes tipos de tumores. Cerca de 90% das malignidades de cabeça e pescoço são carcinomas epidermóides de superfície mucosa com origem a partir do epitélio estratificado do trato aereodigestivo superior, incluindo lábio, cavidade oral, cavidade nasal, seios paranasais, faringe e laringe (Walden; Aygun, 2013; Instituto nacional do câncer, 2017). No Brasil, o CEO é a quinta neoplasia maligna mais incidente em homens, com frequência estimada em 5,2% dos casos de cânceres nesse sexo em 2018 (Instituto nacional do câncer, 2017).

A presença de metástase é apontada como a principal causa de mortalidade do CEO. Fatores como microambiente do tumor, interação com células vizinhas, quimiocinas, vascularização, estratégia de invasão e o mecanismo de transição epitélio mesenquimal influenciam na habilidade do CEO em se metastatizar (Marcato et al., 2011).

Para os casos de CEO sem invasão, o tratamento em geral é cirúrgico, seguido ou não de radioterapia. Para os casos localmente invasivos, pode-se realizar o tratamento cirúrgico seguido de quimioterapia e radioterapia concomitantes, em geral utilizando cisplatina, carboplatina, 5- fluorouracil, mitomicina C, docetaxel e cetuximabe, e radioterapia com fracionamento convencional, acelerado ou hiperfracionamento, com dose total que varia de 70 a 76Gy (Iocca et al., 2018). Contudo, alguns casos de CEO podem desenvolver resistência à radioterapia (Yamamoto et al., 2018) e a quimioterapia (Han et al., 2018). Cerca de 1/3 dos casos tratados com os tratamentos convencionais (cirurgia, radioterapia ou quimioterapia)

podem apresentar recidivas locais, recidivas regionais ou até metástases (Greenberg et al., 2003).

A radiorresistência no CEO envolve vários mecanismos, incluindo evasão no dano de DNA, desenvolvimento de resistência diante de hipóxia, e ativação de vias de sinalização de sobrevivência celular, incluindo a via EGFR/PI3k/Akt/mTOR (Horn et al., 2015; Yamamoto et al., 2018). Já a resistência a quimioterapia está relacionada a mutações em receptores de fator de crescimento epidermal (EGFR), superexpressão da glutathione-S-transferase, expressão de proteína 1 associada a resistência a quimioterapia em câncer de língua (TCRP1), superexpressão da proteína ZEB1 (do inglês “Zinc finger E-box-binding homeobox 1”), redução de miR-491-3p e aumento de MiR-21, MiR-24, MiR-222 (Han et al., 2018). Em ambas as situações de resistência, as células tronco tumorais são frequentemente citadas como tendo um papel central nesse processo de sobrevivência aos tratamentos antineoplásicos (Yamamoto et al., 2018).

A terapia fotodinâmica tem sido indicada para o tratamento de CEOs pouco invasivos, inoperáveis ou cuja cirurgia acarretará níveis altos de mutilação.

### **2.3 Terapia fotodinâmica**

A terapia fotodinâmica ou em inglês, photodynamic therapy (PDT), consiste na administração de um fotossensibilizador, via endovenosa ou tópica, que é incorporado seletivamente nas células cancerígenas. Sua ativação ocorre devida sua interação com uma fonte de luz, resultando na maioria dos casos a danos fotodinâmicos e consequentemente a morte das células cancerígenas por meio de apoptose, autofagia ou necrose (Castano et al., 2004).

Se compararmos a terapia fotodinâmica com técnicas mais invasivas e tradicionais como a cirurgia, a quimioterapia e radioterapia é possível observar mínimos efeitos sistêmicos devido a baixa toxicidade dos fotossensibilizadores para os tecidos saudáveis, promovendo uma menor morbidade e uma redução de danos funcionais e estéticos. Além da baixa toxicidade, outro ponto positivo a se destacar é

a possibilidade da utilização da terapia fotodinâmica associada a outros tratamentos convencionais (Figueira; Veltrini, 2017).

A terapia fotodinâmica é minimamente invasiva e tem sido empregada, com relativo sucesso, na destruição e redução de lesões potencialmente malignas e lesões malignas em diversas partes do corpo como cabeça e pescoço, trato gastrointestinal, pulmões e pele (Jerjes et al., 2011). Particularmente à utilização da terapia fotodinâmica em lesões orais é empregada no tratamento de leucoplasias orais e de carcinoma epidermóide orais (CEOs) in situ ou em estadiamento T1 (Fan et al., 1996; Chen et al., 2004; Tsai et al., 2004; Chen et al., 2005; Biel, 2007; Chen et al., 2010; Jerjes et al., 2011).

### 2.3.1 Mecanismo da terapia fotodinâmica

Essa modalidade terapêutica se baseia na combinação de três fatores: o fotossensibilizador (FS), um estímulo de luz e a presença do oxigênio, que ao interagirem podem gerar a ativação de dois mecanismos dependentes de moléculas de oxigênio. A primeira etapa de ambos os mecanismos é semelhante, nela o fotossensibilizador após entrar na célula é irradiado com um comprimento de onda de luz que corresponde ao seu espectro de absorção, ao ser irradiado ocorre a absorção dos fótons e a conversão do fotossensibilizador de um estado singleto não excitado (S<sub>0</sub>) para um estado singleto excitado (S<sub>1</sub>). Esse fotossensibilizador pode retornar ao estado não excitado através da emissão de energia por fluorescência ou ainda sofrer um processo denominado cruzamento intersistemas, que consiste na inversão de spin e que o leva a assumir um estado tripleto excitado (T<sub>1</sub>) (de Oliveira et al., 2015; Kwiatkowski et al., 2018).

No estado tripleto excitado podem ocorrer dois mecanismos distintos, o primeiro é denominado mecanismo do tipo I e nele ocorrem reações de transferência de elétrons entre a molécula do FS e o substrato, resultando na formação de íons radicais que tendem a reagir instantaneamente com o oxigênio molecular, produzindo espécies radicais ou peróxidos, que são capazes de oxidar uma grande variedade de biomoléculas, essa cascata de reações iniciada leva ao estresse oxidativo resultando

na destruição das células cancerígenas. No mecanismo do tipo II ocorre a transferência de energia para o oxigênio molecular ( $O_2$ ) que é excitado pelo fotossensibilizador e passa para o estado singleto ( $SO_2$ ), caracterizada por apresentar propriedades oxidantes extremamente fortes. Nos dois mecanismos citados são geradas as chamadas espécies reativas de oxigênio (EROs) (ROS – do inglês Reactive Oxygen Species), que irão induzir a morte celular por diferentes vias (Castano et al., 2004; de Oliveira et al., 2015; Figueira; Veltrini, 2017).

Assume-se que o mecanismo do tipo II é o processo mais importante que condiciona a eficiência do PDT. No entanto, a proporção da contribuição de ambos os mecanismos depende de muitos fatores, incluindo: concentração de oxigênio, constante dielétrica do tecido e pH e estrutura do fotossensibilizador. À medida que o oxigênio se esgota, o primeiro tipo de mecanismo começa a prevalecer (Kwiatkowski et al., 2018).

Os componentes principais da terapia fotodinâmica (fotossensibilizador, luz e oxigênio) não são tóxicos individualmente, mas quando juntos desencadeiam a produção de EROs, as quais podem gerar a destruição do tumor mediante diferentes mecanismos: 1) apoptose, necrose e ou autofagia; 2) isquemia devido a alterações na microcirculação tumoral; 3) ativação da resposta imune antitumoral (Castano et al., 2006).

Essa citotoxicidade que ocorre nas células que sofrem PDT é seletiva e atinge as células com maior capacidade de proliferação, as quais, em um ambiente tumoral são definidas em grande parte como sendo as células cancerígenas (Green et al., 2013).

### 2.3.2 A luz e sua função na terapia fotodinâmica

A luz é tem a capacidade de provocar diversas modificações moleculares e biológicas no sistema humano, gerando resultados positivos ou negativos para diversas rotas metabólicas, o que irá diferenciar que tipo de resultados serão obtidos será a dosagem, frequência e intensidade de utilização.

Como já descrito anteriormente um dos componentes necessário para que ocorra a terapia fotodinâmica é a presença da luz em um comprimento de onda correto para que o estímulo ao fotossensibilizador seja efetivo, contudo, a luz não atua apenas no processo de excitação do fotossensibilizador, mas também pode promover benefícios que provocam uma recuperação mais rápida das áreas lesionadas.

Apesar de as atividades citotóxicas se concentrarem apenas nas células doentes, devido ao acúmulo dos fotossensibilizadores, as células saudáveis que se localizam em torno das lesões são estimuladas a se reproduzirem e recuperarem com mais rapidez as regiões lesionadas. Esse estímulo é devido ao processo denominado fotoestimulação, que é baseado na interação da luz com os tecidos adjacentes através da presença dos fotorreceptores, também denominados de cromóforos.

Os cromóforos após absorverem a energia gerada pela interação com a luz estimulam as mitocôndrias a acelerar o metabolismo celular. Além dessa aceleração metabólica ocorre também uma cascata de processos bioquímicos que resultam em efeitos terapêuticos para as células, como por exemplo ações anti-inflamatórias, regenerações de tecidos, proliferação de fibroblastos e produção de colágeno (de Oliveira et al., 2015).

### 2.3.3 Fotossensibilizadores

Como já descrito anteriormente a terapia fotodinâmica consiste na interação de três componentes, dentre eles o fotossensibilizador. Esse corante é definido como uma substância com capacidade de absorver luz em um comprimento de onda específico, desencadeando reações químicas ou físicas (Kwiatkowski et al., 2018).

Existem diversos tipos de fotossensibilizadores disponíveis para utilização na terapia fotodinâmica, dentre eles podemos destacar as porfirinas e as clorinas. As porfirinas são compostos tetrapirrólicos cíclicos que atuam como intermediários na biossíntese do grupo heme. As porfirinas formam compostos metabólicos importantes para o organismo, sendo a maioria delas, associadas a íons metálicos, chamadas metaloporfirinas. As porfirinas mais importantes na natureza são uroporfirina,

coproporfirina e protoporfirina, esta última forma o grupo heme que será detalhado logo mais.

Um fotossensibilizador deve apresentar características específicas que o definem como sendo ideal como por exemplo apresentar um alto grau de pureza, estabilidade em temperatura ambiente, um pico de absorção entre 600 a 800nm, uma baixa toxicidade na ausência de luz, uma rápida eliminação de tecidos normais e uma alta penetração em tecidos doentes (Agostinis et al., 2011).

Os fotossensibilizadores são categorizados em dois grupos, os de primeira geração e os de segunda geração. Dentre os de primeira geração podemos citar o primeiro grupo de substâncias produzidas para aplicação da terapia fotodinâmica, os derivados de hematoporfirina (HpD) que levaram a produção do fármaco Photofrin<sup>®</sup> e seus análogos Photogem<sup>®</sup> e Photosan<sup>®</sup> (Cavalcante et al., 2009; de Oliveira et al., 2015; Kwiatkowski et al., 2018).

O pico de absorção dos fotossensibilizadores ocorre entre 600 e 800nm; essa irradiação é feita com LEDs e lasers dos mais variados tipos. O intervalo entre a administração do fotossensibilizadores de primeira geração e a irradiação tende a ser mais longo do que quando se utiliza os fotossensibilizadores de segunda geração e isso se deve a maior capacidade desses últimos de eliminação residual nos tecidos (Figueira; Veltrini, 2017).

Apesar do sucesso da terapia fotodinâmica ao se usar os HpD, existem desvantagens como o acúmulo dos FS em células epiteliais e a baixa penetração de luz, que levaram a necessidade da uma nova pesquisa de compostos mais efetivos, os chamados fotossensibilizadores de segunda geração. Estes apresentam um menor tempo de permanência nos tecidos, suas absorções ocorrem em bandas de comprimentos maiores do que os de primeira geração possibilitando desse modo o uso de fontes de luz com maior poder de penetração nos tecidos e um menor efeito colateral (de Oliveira et al., 2015). Podemos citar como fotossensibilizadores de as metaloporfirinas (Lutrin<sup>®</sup> e Lutex<sup>®</sup>), as purinas (Purlytin<sup>®</sup>), as clorinas (Foscan<sup>®</sup>) e os precursores de protoporfirina IX (ácido 5-aminolevulínico) (Zhang et al., 2018), sendo este último o fotossensibilizador usado nesse estudo e detalhado a seguir.

O ácido 5-aminolevulínico (5-ALA), ele é pré-fotossensibilizador, que induz a formação de protoporfirina IX (PpIX) dentro das células através da via do grupo heme (Castano et al., 2004; Krammer; Plaetzer, 2008), esse mecanismo ocorre naturalmente nas células humanas uma vez que existe a síntese de 5-ALA endógeno no organismo (Castano et al., 2004; Agostinis et al., 2011).

O ALA é formado na mitocôndria animal mediante a união de uma molécula de succinil-CoA e uma molécula de glicina que são catalisadas através da enzima aminolevulinato sintetase (ALA sintetase). Após algumas etapas enzimáticas que ocorrem no exterior da mitocôndria um sistema com 4 anéis pirrólicos é sintetizado a partir de 8 moléculas de ALA, produzindo a protoporfirina (PpIX) dentro da mitocôndria e para que ocorra a formação do grupo heme ocorre a adição do íon de ferro no anel pirrólico pela enzima ferroquelatase. A síntese de protoporfirina é controlada através de um mecanismo de resposta negativa que desencadeia uma reação entre o grupo heme sintetizado e os sítios da enzima ALA sintetase, essa reação impede que a enzima entre na mitocôndria e mantenha o ciclo de síntese das porfirinas. Ainda assim o 5-ALA de origem exógena, ou seja, o que não é produzido pelo organismo, tem a capacidade de ultrapassar esse sistema de resposta não permitindo portanto que o grupo heme exerça a função inibitória sobre o 5-ALA sintetase e dessa forma permitindo que ocorra o acúmulo de protoporfirina dentro da célula (Krammer; Plaetzer, 2008) e conseqüentemente uma alta produção de espécies reativas de oxigênio (Castano et al., 2004; Agostinis et al., 2011).

#### 2.3.4 Terapia fotodinâmica para lesões potencialmente malignas orais

As lesões potencialmente malignas orais (LPMO) muitas vezes são tratadas com excisão da área afetada, contudo, a terapia fotodinâmica vem sendo apontada como outra opção que produz morte celular local do tecido, levando à cura com cicatrizes notavelmente pequenas e sem toxicidade acumulativa (Jerjes et al., 2011).

O uso da terapia fotodinâmica em LPMO foi avaliado por meio de revisão sistemática analisando mais de um fotossensibilizador e comprimentos de onda luminosos diferentes. Vohra et al. (2015) observaram a eficácia da terapia

fotodinâmica em LPMO em treze estudos. Houve remissão completa das lesões em 27 a 100%, parcial em 0 a 25% e ausência de resposta em 1 a 25% das lesões. Além disso, a taxa de recorrência foi de até 36%. Com isso o grupo concluiu que a terapia fotodinâmica é eficaz no manejo global das LPMO.

Outra revisão sistemática também avaliou a eficácia da terapia fotodinâmica no tratamento de LPMO e de cânceres de cabeça e pescoço. Os autores sugerem que vários fatores, incluindo grau da displasia, tipo, tamanho e características superficiais da lesão, poderiam determinar a eficácia da terapia fotodinâmica no manejo da LPMO e das neoplasias malignas em cabeça e pescoço. Além disso, também ponderam com relação ao tempo de irradiação e ao fotossensibilizador utilizado; ambos os parâmetros influenciam nos resultados da terapia fotodinâmica no tratamento dessas lesões. Os autores concluem que futuros estudos sobre a relevância desses fatores no manejo bem-sucedido de tais lesões pela terapia fotodinâmica são necessários (Gondivkar et al., 2017).

A aplicação da terapia fotodinâmica como ferramenta para combater as displasias epiteliais já foi demonstrado no trabalho de Grant et al. (1993). Nesse estudo, 11 pacientes foram tratados e, após 6-8 semanas, 10 pacientes mostraram uma resposta positiva a essa terapia. Resultado semelhante foi observado no trabalho de Fan et al. (1996), no qual os pacientes com LPMOs foram submetidos a terapia fotodinâmica com o fotossensibilizador 5-ALA e, em biopsias posteriores, demonstraram uma melhora das lesões, bem como uma ausência de cicatrizes nas áreas tratadas.

O uso da terapia fotodinâmica mediada pelo 5-ALA também foi descrito em outros trabalhos. Por exemplo, Maloth et al. (2016) avaliaram o uso da terapia fotodinâmica associada ao LED e ao fotossensibilizador 5-ALA em 13 pacientes com leucoplasias orais e observaram ao final do tratamento que 6,6% dos pacientes mostraram remissão completa, 66,6% demonstraram resposta parcial e 16,6% não apresentaram resposta ao tratamento. Baseados nos resultados, o grupo concluiu que a terapia fotodinâmica em associação com os outros parâmetros aparenta ser uma alternativa viável a ser aplicada nesses tipos de lesões em contrapartida às terapias convencionais.

A eficácia na utilização do fotossensibilizador 5-ALA no tratamento de LPMO também foi verificada no estudo de Tsai et al. (2004). Os autores analisaram 33 lesões orais (24 leucoplasias, cinco hiperplasias verrucosas, duas eritroleucoplasias e um carcinoma verrucoso), sendo que todas as lesões foram submetidas ao 5-ALA em associação com LED. Dessas lesões orais, três leucoplasias e quatro hiperplasias verrucosas responderam totalmente ao tratamento; já as duas eritroleucoplasias e o carcinoma verrucoso responderam parcialmente.

A terapia fotodinâmica com 5-ALA para leucoplasia oral mostrou efeitos promissores na regressão das lesões, ainda assim a dose de luz ideal para o tratamento desse tipo de lesão não foi totalmente determinada vista a complexidade e a dependência de diversos fatores, como diferenças entre tecidos tratados. Por isso, Wong et al. (2013) realizaram um estudo para determinar a dose máxima tolerada pela célula em pacientes com lesões leucoplásica e que passam pelo tratamento com terapia fotodinâmica mediada pelo ALA e demonstraram que essa terapia pode ser administrada com segurança nesse tipo de lesão em uma dose de até 4J/cm<sup>2</sup>. Contudo, os autores afirmam que maiores estudos são necessários para elucidar por completo qual a dose de luz ideal para gerar maior eficácia do tratamento.

### 2.3.5 Terapia fotodinâmica para carcinoma epidermóide oral

A terapia fotodinâmica, comparada às terapias convencionais para o CEO, tem a vantagem de ser uma técnica minimamente invasiva, que leva à destruição do tumor, preservando o tecido saudável ao redor (Biel, 2007). Ela vem sendo empregada com sucesso no tratamento de carcinomas em estágios iniciais da cavidade oral (Jerjes et al., 2012). Fan et al. (1996) submeteram seis pacientes diagnosticados com CEO à terapia fotodinâmica mediada pelo 5-ALA e observaram redução do tumor em cinco dos seis casos. Entretanto, apenas em dois casos foi observada a remissão do tumor, e isso se deve ao efeito de a terapia fotodinâmica ser considerada superficial para o tratamento de cânceres mais infiltrativos. Outro trabalho que compartilha da mesma conclusão foi o de Biel (2007). Nesse estudo, 276 pacientes diagnosticados com carcinomas iniciais da cavidade oral e laringe foram submetidos a terapia fotodinâmica. O autor afirma que a terapia é um modelo de

tratamento eficaz para câncer iniciais, visto que gerou taxas de cura de 91% e 94% para câncer de laringe inicial e CEO, respectivamente.

Outros autores já relataram em seus estudos que a terapia fotodinâmica não apresenta os mesmos resultados satisfatórios em cânceres mais infiltrativos ou que estejam em estágios mais avançados (Gluckman, 1991). O trabalho de de Visscher et al. (2013) descreve recidivas após o tratamento com a terapia fotodinâmica em casos de tumores de estadiamento T2.

### 2.3.6 Terapia fotodinâmica e resistência celular

É possível o desenvolvimento *in vitro* de células resistentes à terapia fotodinâmica, denominada resistência adquirida, mediante ciclos repetitivos de tratamento em que gradativamente se aumenta a concentração do fotossensibilizador e/ou o tempo de exposição a essa molécula, ou se mantém fixa a concentração do fotossensibilizador, ampliando-se a dose de luz (Casas et al., 2011).

O primeiro ciclo de terapia fotodinâmica elimina a maioria das células; contudo uma pequena porcentagem delas (1 a 10%) pode sobreviver, sendo estas responsáveis pelo repovoamento quando se analisam cultura de células. Após vários ciclos de terapia, em que gradativamente se aumenta a dose e se realiza o recultivo das células sobreviventes, é observada uma linhagem exibindo um fenótipo mais “agressivo”, provavelmente derivado de alterações genéticas ou epigenéticas que modificam os padrões de migração, proliferação e morte celular. Em geral, considera-se resistente uma população que exibe viabilidade 1,5 vezes maior do que sua parental após uma dose letal de 90% (DL90) (Singh et al., 2001; Zamarrón et al., 2015).

Acredita-se que o desenvolvimento de resistência a terapia fotodinâmica dependa de diversos fatores. Dentre eles, pode-se citar o tipo de fotossensibilizador e sua localização intracelular. Entretanto, até o momento não foi identificada nenhuma característica celular que possa ser considerada fundamental para o desenvolvimento de resistência à terapia fotodinâmica (Casas et al., 2011).

Um estudo utilizou uma linhagem celular de adenocarcinoma mamário murino e, a partir dela, foi possível desenvolver clones celulares resistentes à terapia fotodinâmica mediada pelo 5-ALA. Os clones resistentes foram isolados aplicando-se 5-ALA a 0,6mM e diferentes doses de luz, visando alcançar níveis de sobrevivência entre 5-10%. As células sobreviventes foram coletadas 24 horas depois do tratamento e foram novamente plaqueadas. Após 2 semanas de crescimento, as células foram submetidas novamente a outro ciclo de tratamento. A população final recebeu 13 ciclos de tratamento, e oito clones foram isolados. Analisando-se dois desses clones, os pesquisadores observaram um aumento de duas vezes no volume celular, uma morfologia mais fibroblástica, menor quantidade de PpIX, maior teor de proteínas e um aumento no número de mitocôndrias e no consumo de oxigênio (Casas et al., 2006).

O trabalho de Milla e colaboradores sugere que exista uma variação de resistência para um mesmo fotossensibilizador de acordo com a linhagem celular. Estudos já mostraram ser possível gerar populações resistentes utilizando o 5-ALA-PDT também em linhagem de carcinoma epidermóide cutâneo humano (Milla et al., 2011). Recentemente, Rosin et al. (2017) demonstrou que células de CEO também desenvolvem resistência à terapia fotodinâmica mediada pelo 5-ALA. Essas células exibiram superexpressão de proteínas relacionadas à sobrevivência celular, principalmente Akt, mTOR, iNOS e survivina, bem como maior potencial de migração, aumento da densidade mitocondrial e menor quantidade de PpIX. Outros estudos também induziram populações resistentes utilizando linhagem de câncer bucal (ATCC-KB) e linhagem celular de carcinoma de faringe (FADU); porém, essas células foram tratadas com hematoporfirina (Kim et al., 2013; Kim et al., 2014). Nenhum estudo avaliou ainda se a terapia fotodinâmica mediada pelo 5-ALA induz resistência em células displásicas, incluindo as da cavidade oral.

Algumas pesquisas também evidenciam um fenótipo mais invasivo de células sobreviventes à terapia fotodinâmica. Bhowmick e Girotti (2014) analisaram células de câncer de próstata humano (PC3) submetidas a terapia fotodinâmica mediada pelo 5-ALA e mostraram que as células de câncer de próstata PC-3 respondem prontamente ao estresse causado pela terapia, aumentando a expressão de NOS2 / NO, o que aumenta a resistência apoptótica e estimula a proliferação.

Um trabalho realizado posteriormente utilizou duas linhagens de câncer de próstata humano, a PC-3 e a DU145, sendo que ambas foram tratadas com a terapia fotodinâmica mediada pelo 5-ALA. Os autores verificaram que as células PC3 e DU145 sobreviventes à terapia fotodinâmica eram mais agressivas em termos de proliferação, migração e invasão. Essa transformação foi acompanhada por maiores modificações nos padrões de expressão de MMP-9, TIMP-1 e integrina  $\alpha 6$ , demonstrando que essas proteínas participariam então de processos de invasão e migração induzidos pela terapia aplicada (Fahey; Girotti, 2015).

A resistência à terapia fotodinâmica interfere em vias de sinalização relacionadas à sobrevivência celular, bem como em vias que regulam o metabolismo de oxigênio, permitindo maior proliferação dessas células. Contudo, não necessariamente esse fenótipo mais agressivo implica maior invasão. Uma investigação demonstrou que células da linhagem de adenocarcinoma mamário LM3 resistentes à terapia fotodinâmica mediada pelo 5-ALA podem reduzir seu potencial de invasão, por não adquirirem um fenótipo de transição epitelial-mesenquimal (TEM); essas células podem exibir ausência de vimentina, desorganização da actina e modificações na distribuição de vinculina, E-caderina e  $\beta$ -catenina. Assim, a terapia fotodinâmica afeta a adesão célula-célula e também o substrato celular por meio da reorganização de algumas proteínas do citoesqueleto e de proteínas de adesão, o que inibe o fenótipo de transição epitélio mesenquimal dessas células (Casas et al., 2008).

## **2.4 Células-tronco tumorais**

As células tronco tumorais (CTTs) são um subconjunto de células iniciadoras que constituem uma reserva de auto-sustentação, cuja função é renovar as populações celulares tumorais (Chen et al., 2009). As populações de células tronco tumorais são definidas por quatro características básicas: 1) somente uma pequena porção de células cancerígenas inicia a tumorigênese quando transplantadas em camundongos imunodeficientes; 2) marcadores de superfícies de células distinguem as células tronco tumorais das células tronco normais; 3) células tronco tumorais induzem o tumor a formar tanto células tumorigênicas como não tumorigênicas,

mantendo assim a heterogeneidade morfológica do tumor original; e 4) transplantes em série de várias gerações tumorais comprovam a capacidade de auto-renovação das populações de células tronco tumorais (Bhaijee et al., 2012).

De acordo com a “hipótese estocástica”, as células tumorais são homogêneas, isto é, têm a mesma probabilidade de iniciar e propagar tumores, bem como de gerar metástases. Mutações espontâneas levam a modificações no fenótipo celular, fato que explica a heterogeneidade nos tumores (Albers et al., 2012). Em função do desenvolvimento dos estudos moleculares, essa hipótese não tem sido mais confirmada em vários cânceres. Assim outra hipótese tem sido aventada, chamada de “hipótese das células tronco tumorais”. Nesta hipótese é defendida a teoria de que o tecido tumoral tem uma hierarquia celular distinta e que apenas uma pequena subpopulação de células dentro do tumor é capaz de iniciar o câncer, sendo essa população formada por células tronco tumorais (Reya et al., 2001; Sayed et al., 2011; Bhaijee et al., 2012; Krishnamurthy; nor, 2012).

A hipótese da heterogeneidade tumoral sustenta a participação das células tronco tumorais nesse processo. Por essa hipótese, nem todas as células neoplásicas presentes nos tumores sólidos possuem habilidade similar de direcionar a formação tumoral. Isso sugere que as células tronco tumorais, além de guiar a carcinogênese, também aumentariam a população de células progenitoras que formam a massa tumoral (Prince et al., 2007).

Há vários cenários possíveis nos quais o CEO poderia se originar de células tronco tumorais: o carcinoma pode se desenvolver diretamente das células tronco tumorais, bem como devido ao desvio de rotas que ocorre com as células diferenciadas levando a transformação em células malignas intraepiteliais e ainda pode ocorrer também a existência do estado Tis (tumor in situ) com a presença de células malignas intraepiteliais sem haver rompimento da membrana basal. A hipótese das células tronco tumorais também é sustentada pelo fato de as células tronco serem as únicas que permanecem tempo suficiente no epitélio para acumular mutações genéticas necessárias para que haja a transformação maligna em células tronco tumorais (Hombach-Klonisch et al., 2008).

Além desses aspectos, as células tronco tumorais têm sido associadas à transição epitélio-mesenquimal e ao processo reverso, denominado transição

mesenquimal-epitelial (TME). Ambos desempenham papéis centrais na embriogênese e no processo de metástase tumoral (Mani et al., 2008). A transição epitélio-mesenquimal é o processo que permite que uma célula epitelial polarizada assumira um fenótipo de célula mesenquimal, caracterizada por maior motilidade e invasividade (Biddle; Mackenzie, 2012; Zhang et al., 2012). Além de sua importância na embriogênese, a transição também participa do reparo de feridas, principalmente da reepitelização, permitindo a migração de células epiteliais no leito da ferida. Em neoplasias malignas, a transição epitélio-mesenquimal induz a migração de células tumorais do local primário e, conseqüentemente, participa de metástases; além disso, essas células que sofreram transição exibem resistência a terapias, estimulando a progressão tumoral (Biddle; Mackenzie, 2012).

#### 2.4.1 Resistência tumoral a terapias e células-tronco tumorais

O modelo das células tronco tumorais oferece explicações para as falhas nos tratamentos antineoplásicos, pois essas células parecem participar diretamente do mecanismo de sobrevivência às terapias (Qian et al., 2015). A capacidade de resistência a quimioterapia e radioterapia que as células tronco tumorais apresentam é apontada como característica chave para o aumento de recorrências e o aparecimento de células tumorais resistentes e mais agressivas (Birkeland et al., 2015; Méry et al., 2016). A radiorresistência das células tronco tumorais é oriunda de mecanismos que envolvem o rápido reparo do DNA, a neutralização eficiente de radicais livres, a regulação do ciclo celular e a interação com o estroma (Wang et al., 2013; Bertrand et al., 2014, Mery et al., 2016). A resistência à quimioterapia é gerada em parte pela ativação de proteínas localizadas na membrana que fazem o efluxo de drogas (ABCG, MDR1) e também pela regulação de genes envolvidos na neutralização da toxicidade de drogas (Nör et al., 2014).

Outro fator que auxilia na manutenção de características essenciais para células-tronco são as espécies reativas de oxigênio (EROs), já era conhecido que no caso de células-tronco hematopoiéticas o baixo nível de EROs ajuda na manutenção de características tronco (Jang; Sharkis, 2007).

Com base nisso Chang et al. (2014) estudaram a interação das EROs com o câncer de cabeça de pescoço, observando que células com baixo nível de EROs foram mais numerosas, expressavam mais marcadores de células iniciadoras de tumor e apresentavam quimioresistência e tumorigenicidade, entretanto quando houve uma restauração do nível das EROs ocorreu uma perda dessas propriedades de células tronco tumorais e um aumento da sensibilidade à cisplatina no carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço (Chang et al., 2014).

Kulsum et al. (2017) demonstraram a capacidade da ALDH1A1 de anular algumas características de células tronco tumorais presentes em linhagens do câncer de cabeça e pescoço resistentes a quimioterápicos. Os autores induziram linhagens celulares de câncer de cabeça e pescoço resistentes a cisplatina, docetaxel e 5-FU e observaram a expressão de marcadores de células tronco tumorais (CD44, CD133, NOTCH1, ALDH1A1, OCT4 e SOX2). Concluíram que o aumento da expressão desses marcadores foi associado ao aumento da formação de esferas, de colônias e do potencial de migração. Além disso, foi observado também que a inibição da ALDH1A1 em uma linhagem específica (Cal-27 CisR) levou à diminuição da expressão dos marcadores de células tronco tumorais e à redução da migração, do potencial tumorigênico e de auto-renovação, acompanhada de uma indução na sensibilidade à cisplatina.

Gemenetzidis et al. (2015) analisaram a resposta das células CEO à radiação ionizante e observaram que as células do tumor com propriedades de células tronco tumorais apresentaram resistência à radiação ionizante. As células que apresentaram um perfil de expressão mesenquimal (CD44<sup>high</sup>/ESA<sup>low</sup>) mostraram um maior nível de reparação do DNA após o tratamento com a radiação. Os autores concluíram que as células tronco tumorais mesenquimais compreendem a maioria das células tumorais invasivas e são capazes de resistir aos efeitos da radiação.

Os métodos convencionais de tratamento têm por meta levar as células a apoptose. No entanto, as células tronco tumorais apresentam diminuição no mecanismo apoptótico e alta resistência a apoptose. Chikamatsu et al. (2012) demonstraram que células tronco tumorais do câncer de cabeça e pescoço expressam altos níveis de genes anti-apoptóticos (BCL2 e IAP), levando a uma maior sobrevivência celular.

#### 2.4.2 Células-tronco tumorais e terapia fotodinâmica

Estudos envolvendo terapia fotodinâmica, células tronco tumorais e CEO são escassos, porém, cresce a literatura sobre o desenvolvimento de fotossensibilizadores que sejam alvo para células tronco tumorais (Lin et al., 2015). Um estudo recente mostrou que células tronco tumorais presentes em câncer de cabeça e pescoço não são resistentes à terapia com ALA-PDT. Esta, ao contrário, inibiu a migração e a quimiorresistência das células tronco tumorais. Os autores verificaram que houve redução da quantidade de células que expressaram os marcadores ALDH1 e CD44 isolados, mas não avaliaram a co-expressão desses e de outros marcadores (Yu; Yu, 2014).

Um ponto limitante desse trabalho foi o fato de não haver menção à dosimetria de terapia fotodinâmica utilizada, já que esse fator é crucial para se posicionar a terapia como letal ou subletal, e contextualizar os resultados obtidos. Doses letais são aquelas que provocam a morte de 98% a 100% das células; a dosimetria que acarreta em índices de viabilidade celular diferentes dos mencionados envolvem, em geral, doses subletais. As doses subletais de terapia fotodinâmica são aquelas relacionadas a resistência dos tumores à terapia. Em geral envolvem a indução de alterações no citoesqueleto celular e em sua capacidade de migração e proliferação, já que não provocam a apoptose de todas as células (Di Venosa et al., 2015). As células epiteliais em geral adquirem alta capacidade de migração e mantêm seu potencial proliferativo.

Um trabalho envolvendo células do câncer colorretal humano isolou células tronco tumorais usando a expressão de PROM1/CD133 e demonstrou que a terapia fotodinâmica mediada pela protoporfirina (PpIX) induziu a formação de autofagossomos em células PROM1/CD133+. Essa formação foi seguida da regulação positiva de proteínas relacionadas a autofagia. Quando o grupo inibiu a autofagia por intermédio de inibidores farmacológicos e do silenciamento do gene ATG5, ocorreu apoptose das células PROM1/CD133 e, posteriormente, diminuição da capacidade de formação de colônias e da tumorigênese in vivo. Os autores concluíram que a autofagia apresenta um papel protetor contra a terapia fotodinâmica e que o

direcionamento da autofagia pode ser usado para elevar a sensibilidade das células tronco tumorais a terapia fotodinâmica (Wei et al., 2014).

Outra explicação para a resistência das células tronco tumorais a terapia fotodinâmica mediada por porfirinas reside na análise da quantidade de protoporfirina (PpIX) dentro das células. Wang et al. (2017) demonstraram que, em células de glioblastoma expostas à terapia mediada pelo 5-ALA, as células tronco tumorais exibiam menor fluorescência derivada da PpIX do que células não-células tronco tumorais; as células que apresentaram baixa expressão de PpIX exibiram tumorigênese maior quando transplantadas em cérebros de camundongos com deficiência imunológica.

#### 2.4.3 Marcadores expressos em células-tronco tumorais de carcinoma epidermóide oral

São descritos na literatura diversos marcadores expressos em células com fenótipo tronco e que são considerados marcadores confiáveis em ensaios para caracterização de células tronco tumorais. No presente trabalho, utilizamos três marcadores que já foram descritos em diversos tipos de cânceres, inclusive no CEO.

O primeiro marcador e talvez o mais estudado é a glicoproteína CD44. Trata-se de uma glicoproteína transmembrana codificada pelo gene CD44, composto por 19 exons localizados no cromossomo 11 humano e no cromossomo 2 de camundongos. No gene CD44 humano, exons 1-5 e 16-20 produzem a forma padrão de CD44 (CD44s); o restante dos exons 6-15 são “splicing” alternativos e originam as formas variantes v1 a v10 (CD44v) (Patel et al., 2014).

O CD44 foi primeiramente descrito em 1983 como um receptor de linfócitos. No entanto, com o avanço das pesquisas, foi possível observar que essa glicoproteína apresenta um amplo papel em diversos comportamentos celulares, como adesão, migração, invasão e sobrevivência. Ela medeia interações célula-célula e célula-matriz em grande parte por conta de sua afinidade com o ácido hialurônico, que é um constituinte da matriz extracelular. A CD44 também apresenta afinidade com outros

ligantes, como a osteopontina e metaloproteinases da matriz (MMPs) (Cichy; Puré, 2003; Zhang et al., 2012; Emich et al., 2015).

Pesquisas já mostraram a associação da expressão de CD44 com vias de sinalização que influenciam o crescimento, propagação e resistência do CEO (Al-Hajj et al., 2003; Prince et al., 2007; Zhang et al., 2012; Emich et al., 2015). Isso ocorre devido à interação da CD44 e do ácido hialurônico no domínio extracelular, promovendo vias de sinalização que desempenham papéis importantes na progressão tumoral de diversos tipos de câncer (Thapa; Wilson, 2016).

Essa proteína já foi usada no isolamento e na caracterização das células tronco tumorais em carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço. Prince et al. (2007) observaram que tumores formados por meio de células CD44<sup>+</sup> reproduziam a heterogeneidade do tumor original e apresentavam características de auto-renovação e de diferenciação, ambas características de células tronco. Os autores também observaram que células CD44<sup>+</sup> expressavam diferentemente o gene BMI1, sendo esse correlacionado com a tumorigênese em diversos tipos de cânceres. Ao detectarem que esse gene é expresso no núcleo celular de populações tumorigênicas CD44<sup>+</sup> os autores afirmam que tal padrão permite a definição de microdomínios nos tumores primários e que essa definição pode ser útil para no diagnóstico do câncer (Prince et al., 2007).

Um estudo subsequente em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço mostrou que a população de células tronco tumorais CD44<sup>+</sup> possui não só a capacidade de formar esferas tumorais, proliferar, migrar e invadir *in vitro*, mas também adquire resistência a agentes quimioterápicos (Okamoto et al., 2009).

Células de CEO que expressam positividade para CD44 já foram relacionadas com a capacidade de a célula realizar transição epitélio-mesenquimal. Ghuwalewala et al. (2016) analisaram três linhagens celulares de CEO em diferentes ensaios laboratoriais, observando a expressão de alguns marcadores, dentre eles o CD44. Os autores observaram que células CD44<sup>high</sup>/CD24<sup>low</sup> expressavam genes relacionados a células tronco tumorais, exibiam características de células capazes de realizar transição e apresentavam características clássicas de células tronco tumorais como formação de colônias, formação de esferas, migração e invasão. Além dessas

características, essas células também superexpressavam moléculas transportadoras de fármacos, contribuindo para a quimiorresistência.

Além da glicoproteína CD44, um outro marcador de células tronco tumoral que vem ganhando destaque por conta de sua importância em diversas funções tronco é um receptor de neurotrofinas denominado p75<sup>NTR</sup>. As neurotrofinas são uma família de fatores de crescimento, composta por fator de crescimento nervoso (NGF), fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), neurotrofina 3 e neurotrofina 4/5. Esses fatores de crescimento foram inicialmente estudados quanto ao seu papel no desenvolvimento do sistema nervoso, porém foi observado que eles exercem também um papel importante em células não neuronais. As neurotrofinas e seus receptores são expressos em microambientes saudáveis e tumorais, e estão envolvidos no desenvolvimento de diversos cânceres. Têm a capacidade de influenciar o comportamento das células tronco tumorais e de outras células do microambiente (Tomellini et al., 2014; Chopin et al., 2016).

As neurotrofinas podem exercer suas funções principalmente por meio de dois tipos de receptores celulares de membrana, os receptores de tirosina quinase (Trk) e o receptor p75<sup>NTR</sup>, que apresenta afinidade para se ligar a neurotrofinas e pro-neurotrofinas (Skeldal et al., 2011). O p75<sup>NTR</sup> é um receptor comum de neurotrofinas que contém um domínio extracelular, um transmembrânico e um domínio citoplasmático. A presença de quatro domínios ricos em cisteína na região extracelular do p75<sup>NTR</sup>, a qual é associada a superfamília de receptores de TNF, é responsável pela conformação do receptor. A via de transdução de sinal do p75<sup>NTR</sup> é variável em função do tipo celular, do estado de diferenciação celular, da ligação ou não de neurotrofinas, da interação de co-receptores transmembrânicos e da modificação da expressão pós-translacional. Isso tudo leva a diferentes respostas celulares, como sobrevivência celular, apoptose, regulação do ciclo celular, migração e invasão celular (Tomellini et al., 2014).

O p75<sup>NTR</sup> vem sendo associado ao desenvolvimento tumoral em diversos tipos de câncer, dentre eles o câncer de cabeça e pescoço (Nakamura et al., 2007; Soland et al., 2008; Abdulmajeed et al., 2013; Kiyosue et al., 2013; Murillo-Sauca et al., 2014; Osman et al., 2015). Contudo, alguns pesquisadores sugeriram que esse receptor poderia atuar como um supressor de tumor em alguns tipos de câncer, como de

estômago, bexiga e próstata; essa supressão ocorreria mediante o bloqueio da progressão do ciclo celular, bem como pela indução de apoptose (Tabassum et al., 2003; Khwaja et al., 2006; Chopin et al., 2016).

Em relação a expressão desse receptor no epitélio oral normal, Nakamura et al. 2007 constaram que o p75<sup>NTR</sup> foi expresso apenas na camada basal do epitélio oral tanto da mucosa bucal como da gengiva, principalmente nas cristas mais profundas e nas pontas das papilas epiteliais e concluíram que o padrão de distribuição das células p75<sup>NTR+</sup> sugere uma organização em grupos (Nakamura et al., 2007).

Para o carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) a expressão desse marcador variou de acordo com o grau de diferenciação do tumor. Trabalho realizado com essa neoplasia observou que em tumores bem diferenciados a expressão estava na primeira ou segunda camada de distância da margem infiltrativa, que áreas com pérolas córneas foram negativas para esse marcador e que em tumores pouco diferenciados a expressão foi difusa em todo o tecido neoplásico (Okumura et al., 2006). Resultado semelhante também foi observado por outro grupo de pesquisa que analisou o mesmo marcador nesse mesmo tipo de câncer (Kojima et al., 2017).

Huang et al. 2009 analisaram a resistência à quimioterapia e a capacidade de auto-renovação de células p75<sup>NTR+</sup> no carcinoma epidermóide de esôfago através de ensaios imunohistoquímicos com tecidos humanos e com linhagens celulares, observando que a expressão em tecidos foi delimitada em células imaturas e ausentes em células que passavam por diferenciação, os resultados imunohistoquímicos foram bem parecidos com os observados por Okumura et al. (2006) e Kojima et al. (2007), os casos bem diferenciados e moderadamente diferenciados apresentavam expressão do marcador nas camadas adjacentes as margens infiltrativas do tumor, exceto nas pérolas córneas, já os casos pouco diferenciados a expressão era difusa por todo o tecido. Já nos ensaios com as linhagens celulares de carcinoma epidermóide de esôfago (Eca109, SHEC-1, SHEC-4 e SHEC-5) os autores concluíram que as células p75<sup>NTR+</sup> apresentavam características de células tronco tumorais, tais como a capacidade de auto renovação e resistência a quimioterapia.

A expressão desse marcador também foi alvo de estudo em epitélio normal de laringe e no carcinoma de laringe, sendo que os autores observaram expressão de

p75<sup>NTR</sup> localizada. Nos casos de displasia epitelial as células basais e suprabasais expressaram o marcador, entretanto a positividade foi diminuindo e ficando mais dispersa de acordo com o aumento da displasia epitelial, já em casos de carcinoma bem diferenciados houve uma forte expressão na região periférica das ilhas neoplásicas presentes na região de invasão e nas margens infiltrativas e uma ausência de expressão em áreas de pérolas córneas. Como já descrito anteriormente em outros trabalhos em casos pouco diferenciados a expressão foi disseminada, entretanto houve uma redução na intensidade de marcação observada, sendo que a frequência de células positivas para o marcador foi similar com as lesões displásicas e maior do que no epitélio normal da laringe (Li et al., 2012).

Estudo semelhante foi realizado em carcinoma epidermóide oral sendo observada uma expressão do p75<sup>NTR</sup> no epitélio normal e no epitélio displásico adjacente aos tumores. As células epiteliais basais foram p75<sup>NTR+</sup>, bem como as células localizadas na zona central dos tumores, entretanto com uma positividade leve a moderada, já nos tumores bem diferenciados as células localizadas nas zonas periféricas dos ninhos mostravam uma expressão intensa e por fim na frente invasiva a frequência de células positivas para o marcador foi menor do que na porção central do tumor e a intensidade de marcação observada foi leve a moderada (Soland et al., 2008).

Kiyosue et.al. (2013) avaliaram a expressão do p75<sup>NTR</sup> em leucoplasias e em CEO e observaram que, no epitélio normal, o p75<sup>NTR</sup> foi expresso na membrana celular de algumas células basais, já em leucoplasias, o p75<sup>NTR</sup> foi detectado apenas na camada basal, independentemente da extensão da displasia epitelial; nos casos de carcinoma, o p75<sup>NTR</sup> foi superexpresso em comparação com o epitélio normal. O padrão de expressão nos casos de carcinoma variou de acordo com o grau histológico, sendo que, em casos bem diferenciados, a expressão foi observada apenas nas áreas mais externas nas ilhotas epiteliais neoplásicas.

Resultado semelhante foi observado por Abdulmajeed et al. (2013) em casos de displasias epitelial e de carcinomas epidermóides orais, o grupo observou que tanto em mucosa oral normal como em lesões displásicas células p75<sup>NTR+</sup> se encontravam localizadas na camada basal do epitélio, já em casos de carcinoma epidermóide oral

as células p75<sup>NTR+</sup> eram localizadas na zona periféricas de ninhos e a expressão era negativa nas células centrais do tumor.

Dalley et al. (2013) estudaram a expressão do marcador p75<sup>NTR</sup> em associação com a glicoproteína CD44 em linhagens de queratinócitos orais normais (OKF6-TERT2), queratinócitos oral displásico (DOK, POE-9n) e no carcinoma epidermóide oral (PE/CA-PJ15), observando que na imunohistoquímica a expressão do p75<sup>NTR</sup> e da CD44 foi associada a camada basal nas linhagens dos queratinócitos normais e displásico e na linhagem do carcinoma epidermóide a expressão de ambos os marcadores foi amplamente distribuída por todo o epitélio neoplásico.

Outro marcador utilizado no presente estudo foi a molécula de adesão intercelular hemofílica independente de cálcio (EpCAM ou ESA). Ela foi descrita em 1979 como um antígeno dominante no tecido do carcinoma do cólon humano (Herlyn et al., 1979). É uma proteína glicosilada de membrana de tipo I, de 30 a 40 kDa, expressa em níveis baixos no epitélio normal e altamente expressa nos cânceres epiteliais (Munz et al., 2009).

A ESA humana é um polipeptídeo com 314 aminoácidos (aa) constituído por um domínio extracelular longo (N-terminal) de 242 aa, um domínio transmembrânico de 23 aa e um domínio citoplasmático curto de 26 aa (C-terminal); o gene que codifica essa molécula está localizado no cromossomo 2 (2p21) (Imrich et al., 2012; Schnell et al., 2013).

A ESA pode interferir com a adesão celular mediada pela e-caderina, sugerindo que ela desempenha um papel de antagonista na interação célula-célula nesses casos (Litvinov et al., 1997). Contudo, sua função não se limita à adesão celular, mas também a vários outros processos, tais como sinalização celular, diferenciação, proliferação e migração (Sen; Carnelio, 2016).

Em tecidos saudáveis, a ESA é expressa na membrana de células epiteliais indiferenciadas, estando ausente nas células epiteliais diferenciadas; os tecidos que apresentam a expressão dessa molécula tipicamente exibem alta taxa de proliferação e baixa presença de células diferenciadas. Em adultos, a ESA é expressa em quase todos os órgãos e glândulas, sendo que a expressão é mais intensa no cólon (Schnell et al., 2013).

O nível da ESA é elevado na maioria dos tumores epiteliais, e esse alto nível de expressão geralmente se associa a um prognóstico ruim, com exceção de casos de carcinoma renal e carcinoma tireoidiano, nos quais níveis elevados dessa molécula são relacionados a aumento da sobrevida; portanto, pode-se afirmar que a ESA pode desempenhar um duplo papel, promovendo ou reduzindo a progressão tumoral (Schnell et al., 2013).

A superexpressão de ESA foi demonstrada em vários carcinomas humanos. No entanto, essa expressão é relativamente menos explorada no câncer de cabeça e pescoço. Laimer et al. (2008) analisaram a expressão desse marcador por meio da técnica de imunohistoquímica em 77 amostras de pacientes diagnosticados com CEO, observando a expressão elevada de ESA em 17 (22,1%) das amostras tumorais. Os autores não observaram associação da superexpressão de ESA fatores prognósticos, incluindo sobrevida. Outro estudo avaliou esse marcador em 60 casos de CEO, observando a expressão em 51 casos do total; os autores concluíram que a ESA pode ser um potencial biomarcador prognóstico em CEOs (Sen; Carnelio, 2016).

Embora recentemente alguns estudos tenham avaliado a expressão de ESA em carcinomas de cabeça e pescoço, os resultados têm sido controversos e não definitivos. Grupos de pesquisas divergem em relação à extensão dessa expressão; alguns grupos afirmam que a ESA é expressa em tecidos normais (Yanamoto et al., 2007; Hwang et al., 2009), enquanto outros não observaram expressão em seus espécimes (Shiah et al., 2009; Sen; Carnelio, 2016).

A co-expressão dos marcadores citados parece ser mais sensível para identificar células tronco tumorais. Em função disso, Mohanta et al. (2017) estudaram a expressão de dois marcadores de células tronco tumorais, o CD44 e o CD147 (proteína indutora de metaloproteinases em diversos tipos de cânceres) em carcinoma epidermóide orais e observaram a associação da expressão desses dois marcadores com a diferenciação celular (aumento da auto-renovação, migração e invasão) e o prognóstico do paciente.

Biddle et al. (2011), analisando células de CEO, demonstraram a existência de subpopulações CD44<sup>high</sup>, ESA<sup>high</sup> e ESA<sup>low</sup> em ensaios de citometria de fluxo. Os autores verificaram morfologia, capacidade de auto-renovação e de transição epitélio-mesenquima diferentes para cada subpopulação analisada. As células

CD44<sup>high</sup>/ESA<sup>high</sup> exibiram potencial de formação de holoclones, típicas de células tronco tumorais. Já as células CD44<sup>high</sup>/ESA<sup>low</sup> cresceram mais lentamente, exibiram um formato mais alongado, de características mesenquimais, e tiveram maior capacidade de migração. As células CD44<sup>high</sup>/ESA<sup>low</sup> exibiram ainda um potencial 10X e 80X maior de formar holoclones no ensaio de esferas em comparação às CD44<sup>high</sup>/ESA<sup>high</sup> e CD44<sup>low</sup>, respectivamente. Na análise de expressão gênica de marcadores TEM, a subpopulação CD44<sup>high</sup>/ESA<sup>low</sup> exibiu superexpressão de vimentina, Twist, Snail e Axl, e baixa expressão de E-caderina, involucrina e citoqueratina 15. Os autores concluíram que a população CD44<sup>high</sup>/ESA<sup>high</sup> é sugestiva de células tronco tumorais, mas mantém suas características epiteliais e é proliferativa; já a CD44<sup>high</sup>/ESA<sup>low</sup> também é sugestiva de células tronco tumorais, porém é migratória e exibe características mesenquimais, típicas da transição epitelial-mesenquimal.

O mesmo grupo de pesquisa em 2016 demonstrou a presença de resistência de subpopulações CD44<sup>high</sup>/ESA<sup>low</sup>/CD24+ ao quimioterápico paclitaxel e da subpopulação CD44<sup>high</sup>/ESA<sup>high</sup>/CD24- à cisplatina. As células CD44<sup>high</sup>/ESA<sup>low</sup>/CD24+ exibem alta plasticidade, com potencial de modificar seu fenótipo de TEM para transição mesenquimal-epitelial, expressando agora CD44<sup>high</sup>/ESA<sup>high</sup> (Biddle et al., 2016).

Subpopulações de CD44 também foram avaliadas por Gemenetzidis et al. (2015) em ensaios expondo células de CEO à radiação ionizante. Os autores observaram que as células tronco tumorais mostraram, inicialmente, resistência a radiação, e evidenciando maior crescimento e menor apoptose quando irradiadas; a população CD44<sup>low</sup>/ESA<sup>high</sup> foi a mais sensível à radiação, e a população CD44<sup>high</sup>/ESA<sup>low</sup> foi a que mostrou maior capacidade de invasão em culturas organotípicas e também resistência a doses terapêuticas de radiação ionizante.

Shigeishi et al. (2015) demonstraram que a subpopulação CD44<sup>high</sup>/ESA<sup>low</sup> foi mais resistente à apoptose induzida pelo 5-FU do que a CD44<sup>high</sup>/ESA<sup>high</sup> e a CD44<sup>low</sup>. A inibição de GSK3 $\beta$  provocou a transformação de CD44<sup>high</sup>/ESA<sup>low</sup> para CD44<sup>high</sup>/ESA<sup>high</sup>, tornando essa população mais susceptível ao 5-FU. Resultados similares foram obtidos inibindo-se também a diidropirimidina desidrogenase na população CD44<sup>high</sup>/ESA<sup>low</sup>. Os autores concluíram que os inibidores de

diidropirimidina desidrogenase e de GSK3 $\beta$  podem constituir novas terapias para evitar a resistência dos carcinomas de cabeça e pescoço ao 5-FU.

Osman et al. (2015) investigaram o potencial do p75<sup>NTR</sup> como marcador de identificação e isolamento de células tronco tumorais no CEO, e também a associação desse receptor com diferentes marcadores de células tronco tumorais, dentre eles o CD44. Os autores descreveram que células p75<sup>+</sup> mostraram maior habilidade de formação de colônias e de esferas quando comparadas com células p75<sup>-</sup>; por isso selecionaram as células 5% mais positivas (p75<sup>high</sup>) e as 5% mais negativas (p75<sup>low</sup>). Com essa seleção, os autores afirmaram que ambas as populações são capazes de formar esferas e colônias, porém um potencial maior nessas atividades foi observado para a subpopulação p75<sup>high</sup>. Além disso, os autores detectaram que a população p75<sup>high</sup> é mais tumorigênica, expressa níveis maiores de CD44 e são mais resistentes a drogas quando comparada com a população p75<sup>low</sup>.

O grupo de pesquisa de Yamaguchi publicaram dois trabalhos nos quais analisaram o p75<sup>NTR</sup> e sua associação com diferentes marcadores, dentre eles o CD44 (Yamaguchi et al., 2016a) e ESA (Yamaguchi et al., 2016b). No primeiro trabalho, o grupo teve como objetivo desenvolver um método para identificar as células tronco tumorais quiescentes no carcinoma epidermóide de esôfago com base nos padrões de expressão dos marcadores p75<sup>NTR</sup>, CD44 e CD90; ao final do estudo, concluíram que células que expressavam p75<sup>NTR+</sup>/CD44<sup>-</sup> manifestavam fraca expressão de marcadores de diferenciação, alta resistência a drogas, capacidade de formação de colônias *in vitro* e capacidade de tumorigênese *in vivo*. Além disso, a maioria das células que apresentavam essas expressões citadas acima estavam em um estado quiescente; já as células que expressavam CD44<sup>+</sup> estavam ativamente proliferativas e exibiam menos marcadores de células tronco tumoral. O estudo demonstrou ainda a expressão de marcadores para transição epitélio-mesenquimal em células p75<sup>NTR+</sup>/CD44<sup>-</sup> e associou esse resultado ao fator de crescimento neural (NGF). O NGF já foi descrito como responsável pela transição em câncer de mama. Portanto, o p75<sup>NTR</sup> pode estar envolvido na regulação da transição epitélio-mesenquimal e na aquisição de propriedades de células tronco (Yamaguchi et al., 2016a).

No segundo trabalho Yamaguchi et al. (2016b), o objetivo foi detectar células tronco tumorais no sangue periférico de pacientes com carcinoma epidermóide de esôfago usando a expressão combinada de p75<sup>NTR</sup>, ESA e CD44. A expressão de ESA em células circulantes no sangue de pacientes oncológicos foi significativamente maior do que nos indivíduos saudáveis. Além disso, os resultados revelaram que o uso da combinação p75<sup>NTR</sup>+ /ESA+ para identificação de células neoplásicas circulantes constitui um diagnóstico mais apurado; essa co-expressão foi associada a maior potencial de metástases, fato não observado nas células p75<sup>NTR</sup>- /ESA+. Esses achados reafirmam o potencial invasivo e metastático de células tronco tumorais com expressão para o p75<sup>NTR</sup>. Com relação ao CD44, os resultados mostraram que quase todas as células positivas para ESA eram CD44+, indicando que a glicoproteína CD44 é equivalente ao ESA como marcador de células tronco tumoral; portanto, não seria útil na diferenciação de subpopulações no carcinoma epidermóide de esôfago.

A co-expressão do receptor p75<sup>NTR</sup> e da glicoproteína CD44 também foi estudada por Murillo-Sauca et al. (2014). Os autores avaliaram se células p75<sup>NTR</sup>+ /CD44+ tinham a capacidade de tumorigênese *in vivo*, confirmando esse potencial mesmo quando o número de células inoculadas foi inferior ao número de células de outras subpopulações. Além disso, observaram também que populações CD44+ apresentam uma maior capacidade de formação de tumor do que populações CD44- e maior resistência ao estresse oxidativo. Os autores concluem que a co-expressão de p75<sup>NTR</sup>+ /CD44+ deve abranger uma população mais resistente ao estresse oxidativo induzido pela radiação.



### **3 PROPOSIÇÃO**

#### **3.1 Geral**

Avaliar se células de displasia epitelial oral desenvolvem resistência à terapia fotodinâmica similar à observada anteriormente para células de CEO, e se nesse processo ocorre modificação da expressão de marcadores de células tronco tumorais em ambas as linhagens celulares.

#### **3.2 Específicas**

Verificar se células de displasia epitelial oral (linhagem DOK) desenvolvem resistência à terapia fotodinâmica mediada pelo 5-ALA, após múltiplos ciclos de tratamento.

Comparar a viabilidade dessas células displásicas com a de células de CEO (linhagem SCC9), após aplicação de modelo de indução de resistência à terapia fotodinâmica.

Verificar se células das duas linhagens, após aplicação de modelo de resistência à terapia fotodinâmica, exibem um fenótipo de células tronco tumorais, avaliado por intermédio de ensaio de colônias e ensaio de invasão.

Investigar a expressão individual e a co-expressão de CD44, ESA e p75<sup>NTR</sup>, em ambas as linhagens celulares, após aplicação de modelo de indução de resistência à terapia fotodinâmica.



## 4 MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia descrita a seguir foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa (Seres Humanos) da FOUSP (1.730.935) (Anexo A).

### 4.1 Cultivo celular e grupos experimentais

Foram utilizadas as linhagens de carcinoma epidermóide humano de língua SCC9 (ATCC® CRL-1629) e queratinócitos orais displásicos DOK (European Cell Culture Bank®). Células acondicionadas em criotubos no nitrogênio líquido foram descongeladas em banho-maria a 37°C e transferidas para frascos de cultivo contendo meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) / Nutriente Mixture HAM F12 (Gibco - Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) na proporção de 1:1, suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco - Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e 1% de antibiótico/ antimicótico (Gibco -Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) para a linhagem SCC9 e meio meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco - Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 1% de antibiótico/ antimicótico (Gibco -Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) para a linhagem DOK.

Os frascos de cultivo foram mantidos a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO<sup>2</sup>. A manipulação das células ocorreu em fluxo laminar e seu crescimento foi analisado diariamente em microscópio invertido com contraste de fase (Axio Vert®, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha). O meio de cultivo foi trocado de acordo com o metabolismo celular, em média a cada dois dias para a SCC9 e quatro dias para DOK.

Foram estabelecidos os seguintes grupos experimentais:

a) Grupo Controle – células SCC9/DOK sem nenhum tratamento, mantidas sob as condições experimentais descritas anteriormente.

b) Grupo terapia fotodinâmica (PDT) – células SCC9/DOK tratadas com um a quatro ciclos de 5-ALA-PDT. A cada ciclo de PDT foi originada uma geração de células, denominadas segundo a sequência dos tratamentos.

c) Grupo fotossensibilizador – células da linhagem SCC9/DOK submetidas somente à incubação com 5-ALA (mesmo protocolo de incubação utilizado para o Grupo PDT).

d) Grupo LED - células da linhagem SCC9/DOK submetidas somente à irradiação com LED (mesmo protocolo de irradiação utilizado no Grupo PDT).

#### **4.2 Modelo de indução de resistência à terapia fotodinâmica mediada pelo 5-ALA**

Em estudo anterior (Rosin et al., 2017), as células SCC9 foram submetidas ao modelo de indução de resistência à PDT mediada pelo fotossensibilizador 5-ALA, no qual se aumentou a dose de irradiação e se manteve constante a incubação com o fotossensibilizador 5-ALA (1mM / 4 horas). As doses utilizadas no estudo citado variaram de 5,86J/cm<sup>2</sup>, 150mW, 150s (dose inicial) a 9,38J/cm<sup>2</sup>, 150mW, 240s, sendo que ao final do trabalho foram isoladas sete gerações celulares. Duas gerações: geração 1 (5,86J/cm<sup>2</sup>) e geração 4 (9,38J/cm<sup>2</sup>) foram escolhidas para serem utilizadas no presente estudo. Para a linhagem DOK, foi realizado o mesmo protocolo experimental, o qual será descrito a seguir.

Com base nos modelos de resistência a PDT descritos na literatura, foi estabelecido que a primeira dose de PDT deve gerar pelo menos 90% de letalidade (DL90) (Milla et al., 2011; Zamarrón et al., 2015), para isso foram realizados ensaios variando apenas a dose de luz e mantendo-se fixos a concentração do FS (4mM) e o tempo de incubação do FS (4 horas). Estabeleceu-se, então que a dose de luz seria 5,86J/cm<sup>2</sup>, 150mW, 150s, a qual gerou dose letal de 95% das células DOK.

Com a dose inicial estabelecida as células DOK ( $1,5 \times 10^5$ ) foram cultivadas em placas de 12 poços por 24 horas em meio de cultivo normal. Após esse período o fotossensibilizador 5-ALA (A3785-1G - Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) foi

diluído em meio de cultivo específico para essa linhagem celular sem a presença do soro fetal bovino, em uma concentração de 1mM (Yamamoto et al., 2013; Chen et al., 2011). Após total dissolução o meio de cultivo normal foi substituído pelo meio com o 5-ALA e mantido por um período de 4 horas em total escuridão e a uma temperatura de 37°C.

Após esse período de incubação o meio foi substituído por um novo meio sem soro e as células foram irradiadas com LED 630±5nm (3N's Lasers, São Paulo, Brasil) posicionado perpendicularmente e abaixo das placas de cultivo, com área do spot de 3,84 cm<sup>2</sup>. Para que todas as células fossem irradiadas igualmente foram aplicados adesivos contendo furos com o diâmetro igual a área do spot do LED no fundo das placas, sendo que no total foram irradiados sete pontos por poço. Após esse procedimento, o meio sem o soro fetal bovino foi trocado por um novo meio de cultivo contendo 10% de soro fetal bovino e as células foram mantidas em estufa a 37°C por 24 horas. Posteriormente as células sobreviventes foram tripsinizadas, coletadas e novamente cultivadas até que exibissem 80% de confluência, sendo assim replaqueadas para dois ensaios distintos, o de viabilidade celular e o de um novo ciclo de PDT, sendo que para esse último ensaio as células foram submetidas a diferentes doses de irradiação como descrito na tabela 4.1.

Tabela 4.1 – Dosimetria de irradiação aplicada em cada geração celular da linhagem DOK seguindo o protocolo de 5-ALA-PDT

<b>Geração celular</b>	<b>Dose de irradiação</b>
Primeira	5,86J/cm <sup>2</sup> , 22,5J, 150mW, 150s
Segunda	5,86J/cm <sup>2</sup> , 22,5J, 150mW, 150s
Terceira	8,20 J/cm <sup>2</sup> , 31,5J, 150mW, 210s
Quarta	8,20 J/cm <sup>2</sup> , 31,5J, 150mW, 210s

Fonte: o autor

Antes de cada novo ciclo de PDT foi realizado um ensaio de viabilidade celular com o propósito de definir qual seria a nova dose de letalidade de 90% e também com o propósito de observar se as células apresentavam resistência a PDT. Para esse último critério foi adotado a definição descrita em Zamarrón et al, 2015 que determina que geração celular é resistente a PDT se essa apresentar uma viabilidade celular 1,5

vezes maior do que a geração 1 diante da dose inicial empregada, no caso de ambas linhagens estudadas as doses iniciais foi de 5,86J/cm<sup>2</sup>, 150mW, 150s.

### **4.3 Viabilidade celular**

Para verificarmos a viabilidade celular após os tratamentos, utilizamos o ensaio MTS (sal tetrazolium) sendo a reação baseada no princípio de que a quantidade de células viáveis é diretamente proporcional à absorbância obtida.

Células SCC9 e DOK foram cultivadas em placas de 96 poços de cor preta e fundo transparente (3.500 células por poço) com 200µl de meio de cultura suplementado com 10% de soro fetal bovino por 24h. Após esse período, as células foram submetidas ao tratamento com 5-ALA-PDT conforme descrito no item 4.2 sendo que sempre foi testada a dose inicial da linhagem (5,86J/cm<sup>2</sup>, 150mW, 150s), a dose utilizada na geração anterior e uma nova dose de irradiação maior em 30s.

O teste de viabilidade celular foi realizado com o MTS kit Cell Titer 96 (Promega, Madison, Wisconsin, EUA) após previa substituição do meio de cultivo (180µL), foram adicionados 20µL da solução Cell Titer 96, seguida por incubação por 180min em estufa com CO<sup>2</sup> a 37°C. Após esse período, foi quantificada a formação do sal em um espectrofotômetro (ELX 800 Biotek Instruments Inc., Winooski, VT, EUA) com filtro de 490 nm. Todos os experimentos de MTS foram realizados em sextuplicata para uma melhor análise dos resultados obtidos.

### **4.4 Formação de colônias**

Para se observar a capacidade de formação de colônias, foram utilizadas as linhagens SCC9 – Controle, ALA, LED, PDT geração 1 e PDT geração 4, e a linhagem DOK – Controle, ALA, LED, PDT geração 1 e PDT geração 4. Ambas as linhagens

foram previamente congeladas em nitrogênio líquido em passagens baixas e descongeladas posteriormente para a realização dos ensaios a seguir.

As células foram cultivadas em baixa densidade ( $10^3$  células em cada placa de  $9,6 \text{ cm}^2$  de área de cultivo) e, após sete dias em cultivo, foram fixadas com álcool metílico 100% a  $4^\circ\text{C}$  por 10 min, coradas com Azul de Toluidina por 10 min, fotografadas e contadas manualmente, utilizando ferramenta de contagem manual instalada no programa ImageJ (Schneider et al., 2012). Foram consideradas colônias os agregados celulares contendo mais de 50 células. O ensaio foi realizado em triplicata para todos os grupos.

#### **4.5 Ensaio de invasão celular por Matrigel®**

Para analisar a capacidade de invasão celular através do Matrigel® (Corning Matrigel Basement Membrane Matrix, NY, EUA), foram utilizadas as linhagens SCC9 e DOK (Controle, ALA, LED, PDT geração 1 e PDT geração 4). Para esse ensaio, usamos a matriz extracelular Matrigel® diluída em meio de cultura sem soro (1:12). O Matrigel® foi aplicado na quantidade de  $100\mu\text{l}$  no fundo de insertos, e ambos foram mantidos em estufa com  $\text{CO}_2$  a  $37^\circ\text{C}$  por 4h. Após esse período, foi adicionado aos poços meio de cultura com soro (SCC9- DMEM/F12; DOK-DMEM), e as células foram plaqueadas ( $1 \times 10^5$ ) dentro dos insertos em contato com o Matrigel®, onde permaneceram na estufa de  $\text{CO}_2$  a  $37^\circ\text{C}$  por 24h. Após esse período, os insertos foram lavados com PBS, fixados com paraformaldeído e metanol e corados com azul de toluidina. Para a contagem da frequência de células que invadiram a camada de Matrigel®, os insertos foram fotografados no microscópio (Leica DM 2500, Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha), e as células foram quantificadas manualmente, utilizando-se o programa ImageJ (Schneider et al., 2012). Todo o experimento foi realizado em triplicata.

#### **4.6 Citometria de fluxo**

Células da linhagem SCC9 e DOK dos grupos experimentais Controle, ALA, LED, PDT geração 1 e PDT geração 4 foram lavadas com PBS (1X), desaderidas das garrafas de cultivo com StemPro Accutase Cell Dissociation Reagent (Gibco, Califórnia, EUA) e inseridas em tubos ( $10^6$  células) nos quais foi adicionado somente um tipo de anticorpo ou dois tipos de anticorpos, para análise de co-expressão. Foram também criados tubos como controle negativo (sem anticorpo) e tubos contendo somente o anticorpo secundário, quando este não estava conjugado ao anticorpo primário.

As amostras foram processadas para incubação primeiramente com Human Fc Block (BD Pharmigen, Califórnia, EUA) por dez minutos e, posteriormente, com anticorpos primários por 30 minutos, conforme demonstrado na tabela 4.2.

Tabela 4.2 - Anticorpos utilizados na análise por citometria de fluxo

<b>Anticorpo</b>	<b>Marca</b>	<b>Diluição</b>	<b>Clone</b>
ESA conjugado com PE	Cell Signaling	1:200	VU1D9
CD44 conjugado com APC	Primário: Cell Signaling Secundário: BD Pharmigen	1:100	156-3C11
P75 <sup>NTR</sup> conjugado com FITC	Primário: Cell Signaling Secundário: Vector Laboratories	1:100	D4B3

Fonte: o autor.

As amostras foram analisadas nos aparelhos FACSCanto II e FACSAria II (BD Pharmigen, Califórnia, EUA). Os dados foram analisados pelo software FlowJo v10 (FlowJo, Oregon, EUA). O ensaio foi feito em triplicata.

#### 4.7 Análise estatística

Os dados foram apresentados em média e desvio-padrão. Para comparação entre os grupos Controle, ALA, LED, PDT geração 1 e PDT geração 4 nos ensaios de viabilidade celular, formação de colônias, invasão e citometria de fluxo, foi utilizada

análise de variância ANOVA, seguida do teste de Tukey. Para comparação entre a linhagem SCC9 e a DOK, foi utilizado o teste t de Student. O nível de significância adotado foi de 5%.

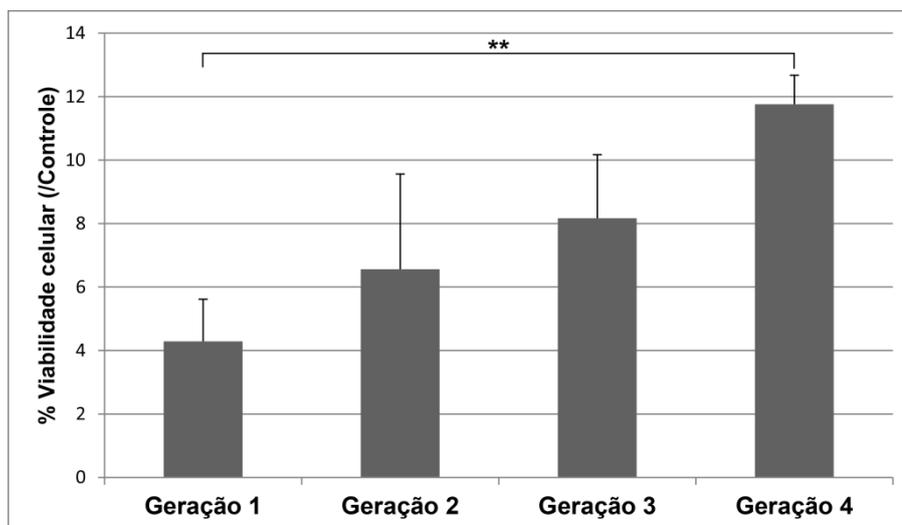


## 5 RESULTADOS

### 5.1 Obtenção de linhagens resistentes à terapia fotodinâmica

Para o presente estudo, foram desenvolvidas linhagens resistentes à terapia fotodinâmica (PDT) de células orais displásicas (linhagem DOK). A Figura 5.1 mostra a porcentagem de viabilidade celular de cada geração de células após tratamento com a dose aplicada para a geração 1 sendo que os valores foram normalizados pelos do controle sem tratamento. Na Geração 1, foi induzida uma média de viabilidade de 4,3%, adotando-se a dosimetria de 5,86J/cm<sup>2</sup>, indicando uma dose letal do tratamento acima de 90%, a figura ilustra a viabilidade celular quando as gerações 2 a 4 foram tratadas com a dose inicial de PDT (5,86J/cm<sup>2</sup>). Foi observado que ao invés de essa dose provocar uma dose letal igual a da geração 1, ela provocou viabilidade celular crescentemente maior, indicando que as células das gerações seguintes estavam mais resistentes à dose inicial empregada. Somente na geração 4 conseguiu-se observar maior homogeneidade dos dados em cada repetição do ensaio, indicando certa estabilidade na aquisição de resistência. Essa geração exibiu diferença significativa em relação à geração 1 ( $p < 0.01$ ).

Figura 5.1 – Média da porcentagem de viabilidade celular (obtida pela normalização com o controle sem tratamento) de células orais displásicas (DOK) quando tratadas com a dose inicial empregada na geração 1. \*  $p < 0.01$  (Análise de variância Anova seguida pelo teste de Tukey)



Fonte: o autor.

A tabela 5.1 mostra a média da razão de crescimento para as células SCC9 pré-estabelecidas em trabalho anterior do grupo de pesquisa (Rosin et al., 2017) e para as células DOK. A razão de crescimento foi obtida dividindo-se a viabilidade celular da geração em teste pela viabilidade celular da geração 1. Considerando-se o critério de que uma geração de células é resistente quando exibir viabilidade 1,5 vezes maior do que a primeira geração diante do mesmo tratamento (Singh et al., 2001; Zamarrón et al., 2015), todas as gerações de SCC9, a partir da segunda, exibiram resistência à PDT. A mesma tendência foi observada para a DOK, porém a razão de crescimento foi menor daquela observada para a linhagem SCC9.

Tabela 5.1 – Média ( $\pm$  desvio-padrão) da razão de crescimento (viabilidade celular da geração em teste dividida pela viabilidade celular da primeira geração) para células de carcinoma epidermóide bucal (SCC9) e células displásicas orais (DOK)

Geração de células	SCC9		DOK	
	Dose	Razão de crescimento	Dose	Razão de crescimento
Primeira	5,86J/cm <sup>2</sup> , 150mW, 150s	-	5,86J/cm <sup>2</sup> , 150mW, 150s	-
Segunda	7,03J/cm <sup>2</sup> , 150mW, 180s	3,6 $\pm$ 1,7	5,86J/cm <sup>2</sup> , 150mW, 150s	1,5 $\pm$ 1,0
Terceira	8,20J/cm <sup>2</sup> , 150mW, 210s	3,4 $\pm$ 1,3	8,20J/cm <sup>2</sup> , 150mW, 210s	1,9 $\pm$ 0,9
Quarta	8,20J/cm <sup>2</sup> , 150mW, 210s	4,2 $\pm$ 1,7	8,20J/cm <sup>2</sup> , 150mW, 210s	2,7 $\pm$ 0,2

Fonte dados: SCC9, Rosin et al. (2017, p 90). DOK: o autor

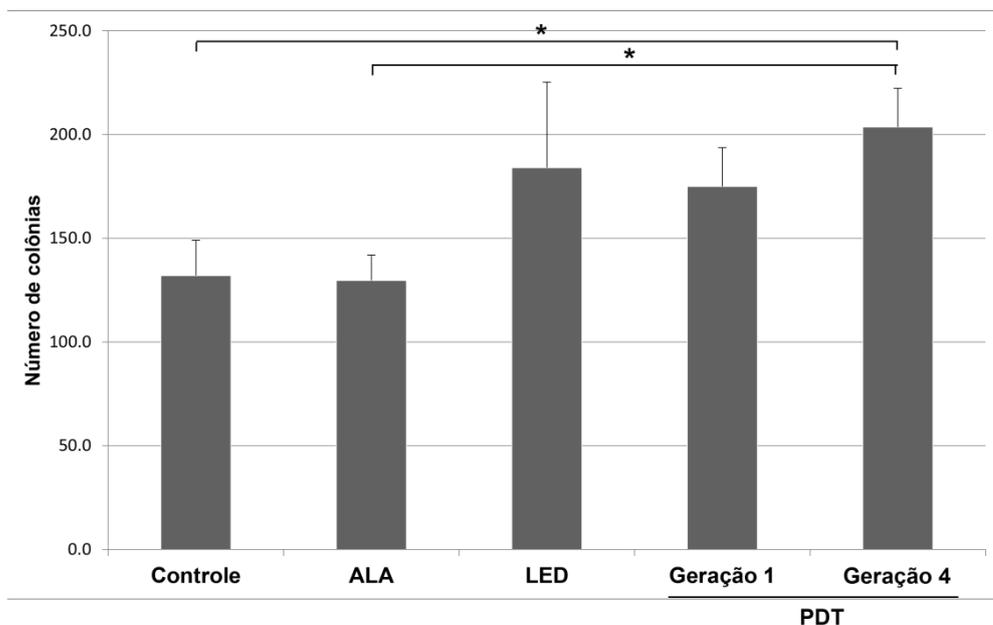
## 5.2 Ensaio de formação de colônias

Foi realizado o ensaio de formação de colônias para os grupos controles, ALA, LED e gerações resistentes para a linhagem celular SCC9 e DOK, tratando-se a Figura 5.2 da média de formação de colônias para a linhagem SCC9 e a Figura 5.3 demonstrando a média de formação para a linhagem DOK.

Foi possível observar nas duas linhagens de células que houve um maior aumento na formação de colônias nas gerações resistentes. Na linhagem SCC9, a geração 4 foi a que apresentou o maior aumento nesse potencial, exibindo diferenças significativas em relação ao Controle ( $p < 0.05$ ) e ao grupo ALA ( $p < 0.05$ ) (Figura 5.2).

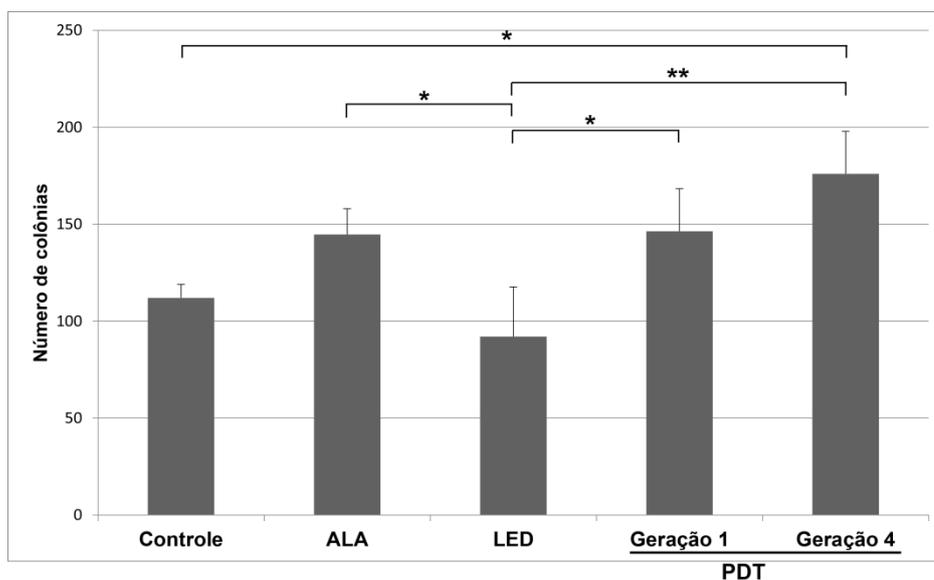
Na linhagem DOK a geração 4 também foi a que apresentou um maior aumento na formação de colônias, diferindo estatisticamente do grupo Controle ( $p < 0.05$ ), já o grupo LED exibiu a menor formação de colônias, com diferenças estatísticas em relação aos grupos ALA ( $p < 0.05$ ), PDT geração 1 ( $p < 0.05$ ) e PDT geração 4 ( $p < 0.01$ ) (Figura 5.3).

Figura 5.2 – Média ( $\pm$ desvio-padrão) do número de colônias observado em cada grupo de células de carcinoma epidermóide oral (SCC9). \*  $p < 0.05$  (Análise de variância Anova seguida pelo teste de Tukey)



Fonte: o autor.

Figura 5.3 – Média ( $\pm$ desvio-padrão) do número de colônias observado em cada grupo de células orais displásicas (DOK). \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  (Análise de variância Anova seguida pelo teste de Tukey)

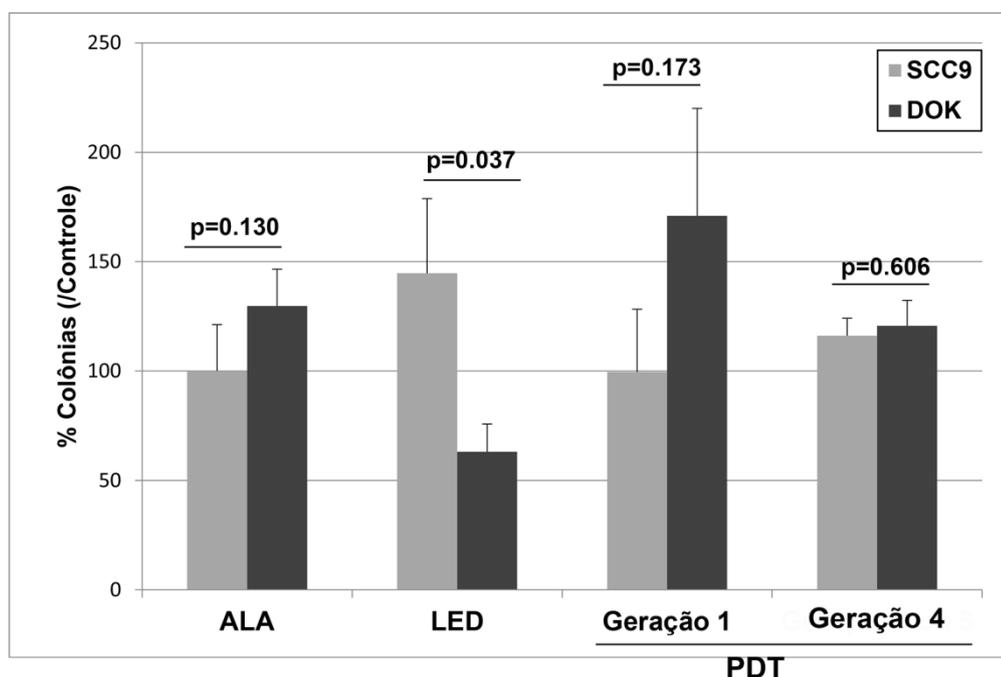


Fonte: o autor.

Comparando-se a porcentagem de formação de colônias entre as linhagens SCC9 e DOK (Figura 5.4), obtida a partir da normalização com os respectivos grupos

Controles, nota-se que o tratamento com LED gerou maior número de colônias na linhagem SCC9 ( $p=0.037$ ). Nos grupos ALA e PDT geração 1, a linhagem DOK exibiu maior porcentagem de colônias, porém sem diferenças significativas em relação à SCC9. Nos grupos PDT geração 4, a porcentagem de colônias foi similar entre as duas linhagens.

Figura 5.4 - Média ( $\pm$ desvio-padrão) da porcentagem de colônias (obtida pela normalização com o grupo Controle) nas linhagens de carcinoma epidermóide oral (SCC9) e células displásicas orais (DOK) (valores de p pelo teste t de Student)

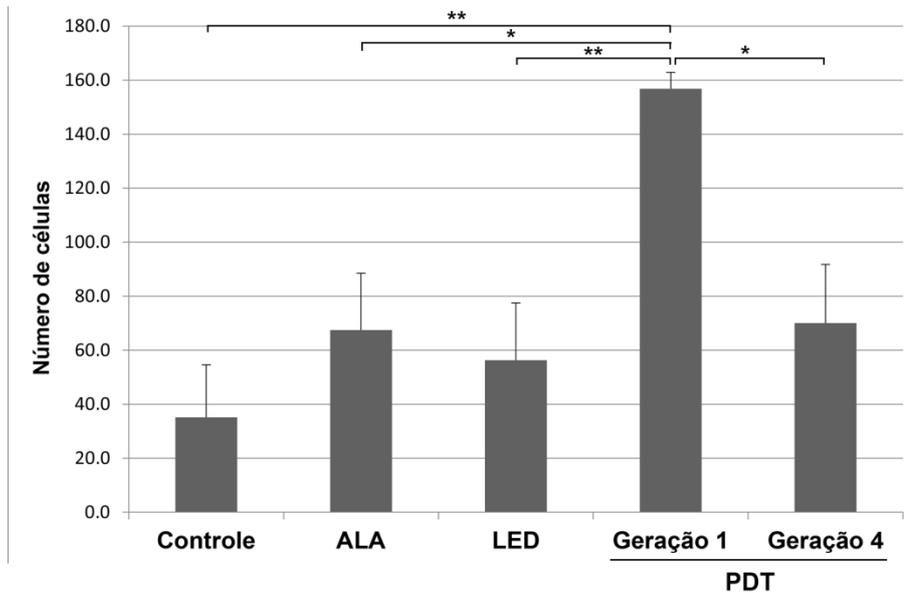


Fonte: o autor.

### 5.3 Ensaio de invasão celular

O ensaio de capacidade de invasão celular foi realizado nos grupos controles, ALA, LED e gerações resistentes para ambas as linhagens estudadas. Para a linhagem SCC9 (Figura 5.5), todos os grupos exibiram células com capacidade de invasão, contudo somente o grupo PDT geração 1 demonstrou aumento expressivo desse potencial, exibindo diferenças significativas em relação aos grupos Controle ( $p<0.01$ ), ALA ( $p<0.05$ ), LED ( $p<0.01$ ) e PDT geração 4 ( $p<0.05$ ), referindo-se a esse último grupo não foi observado um potencial invasivo aumentado em relação ao grupo Controle.

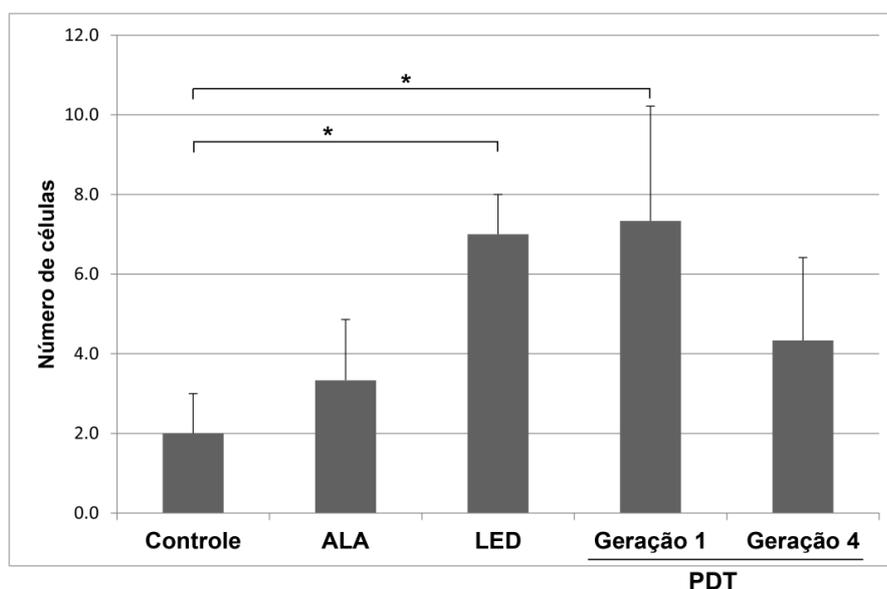
Figura 5.5 – Média ( $\pm$ desvio-padrão) do número de células exibindo invasão em cada grupo de células de carcinoma epidermóide oral (SCC9). \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  (Análise de variância Anova seguida pelo teste de Tukey)



Fonte: o autor.

Para a linhagem DOK (Figura 5.6), poucas células no grupo Controle mostraram capacidade de invasão celular. As gerações tratadas com PDT exibiram maior quantidade de células com capacidade de invasão em relação a esse grupo. Houve diferenças significativas entre PDT geração 1 e Controle ( $p < 0.05$ ). O grupo LED também exibiu maior quantidade de células com potencial de invasão em relação ao Controle ( $p < 0.05$ ), já o grupo PDT geração 4 não exibiu diferenças significativas com relação a nenhum grupo, apesar de ter valores maiores do que no Controle.

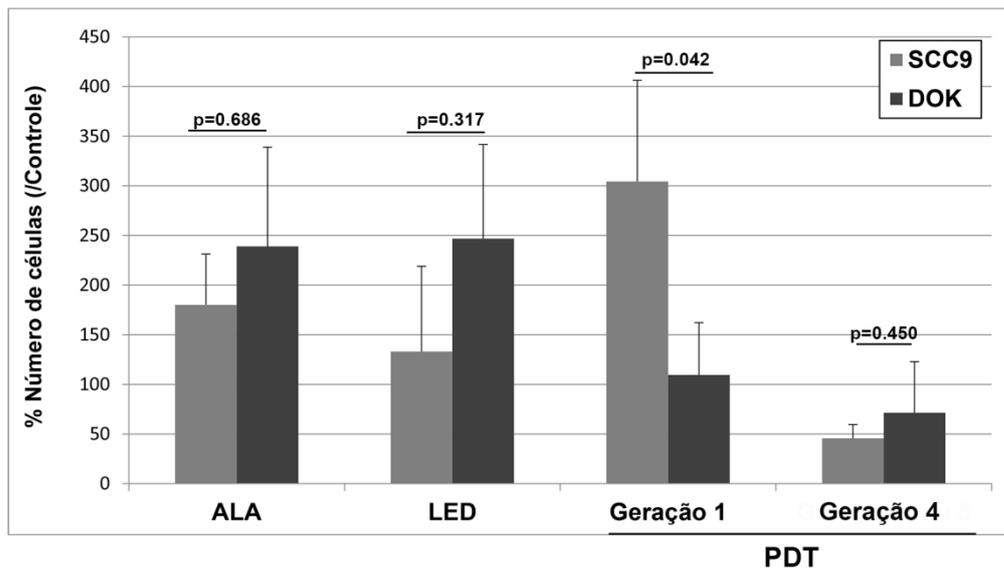
Figura 5.6 – Média ( $\pm$ desvio-padrão) do número de células exibindo invasão em cada grupo de células orais displásicas (DOK). \*  $p < 0.05$  (Análise de variância Anova seguida pelo teste de Tukey)



Fonte: o autor.

Comparando-se as linhagens SCC9 e DOK (Figura 5.7), a porcentagem de células com potencial de invasão, obtida a partir da normalização dos respectivos grupos Controles, foi significativamente maior na linhagem SCC9 considerando-se o grupo PDT geração 1. Já nos grupos ALA e LED, o efeito do tratamento sobre o potencial de invasão celular foi maior na linhagem DOK, embora não tenha havido diferenças significativas em relação à SCC9. Nos grupos PDT geração 4, o efeito da PDT foi similar entre as duas linhagens.

Figura 5.7 - Média ( $\pm$ desvio-padrão) da porcentagem de células com capacidade de invasão (obtida pela normalização com o grupo Controle) nas linhagens de carcinoma epidermóide oral (SCC9) e células displásicas orais (DOK) (valores de p pelo teste t de Student)



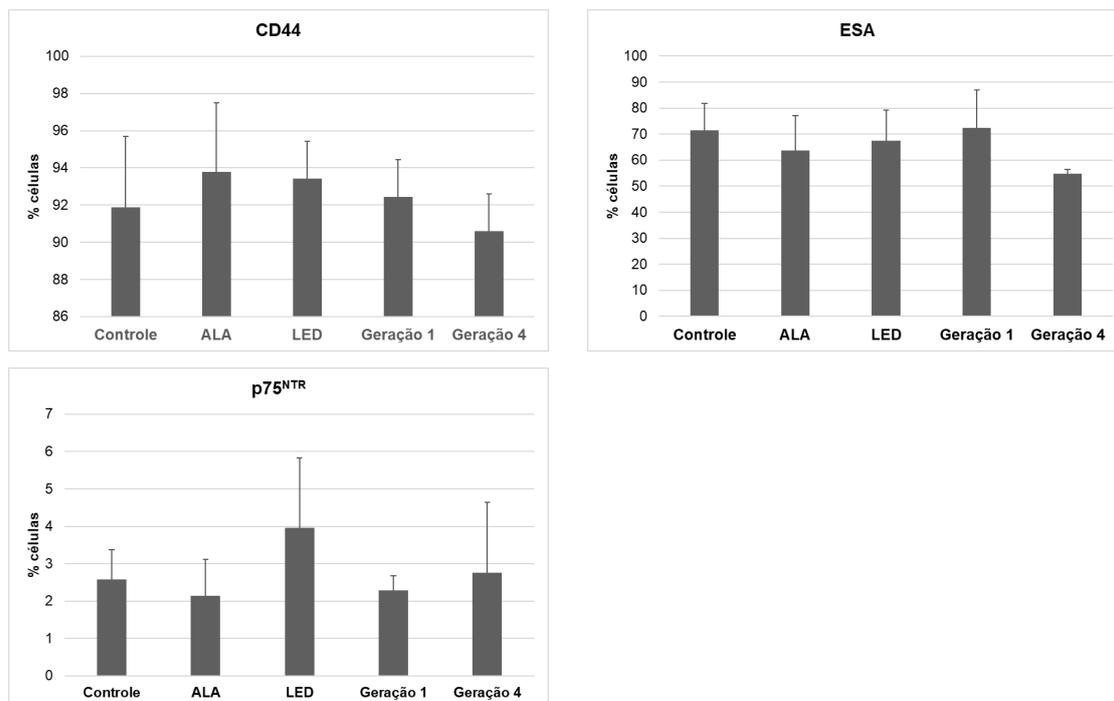
Fonte: o autor.

#### 5.4 Expressão de CD44, ESA e p75<sup>NTR</sup>

Ambas as linhagens tiveram seus grupos controles, ALA, LED e gerações resistentes analisadas por meio da expressão dos marcadores CD44, p75<sup>NTR</sup> e ESA por citometria de fluxo.

A Figura 5.8 ilustra a média da frequência de células positivas para esses marcadores na linhagem SCC9. Houve alta frequência de células CD44<sup>+</sup> em todos os grupos analisados, com uma tendência de redução no grupo PDT geração 4, porém sem diferenças estatísticas em relação aos demais grupos. As células ESA<sup>+</sup> também foram frequentes, com menor porcentagem no grupo PDT geração 4, porém sem diferenças estatísticas quando comparados com os demais grupos. A menor frequência observada foi para células p75<sup>NTR+</sup>, havendo certa tendência de redução no grupo PDT geração 1, porém sem diferenças significativas.

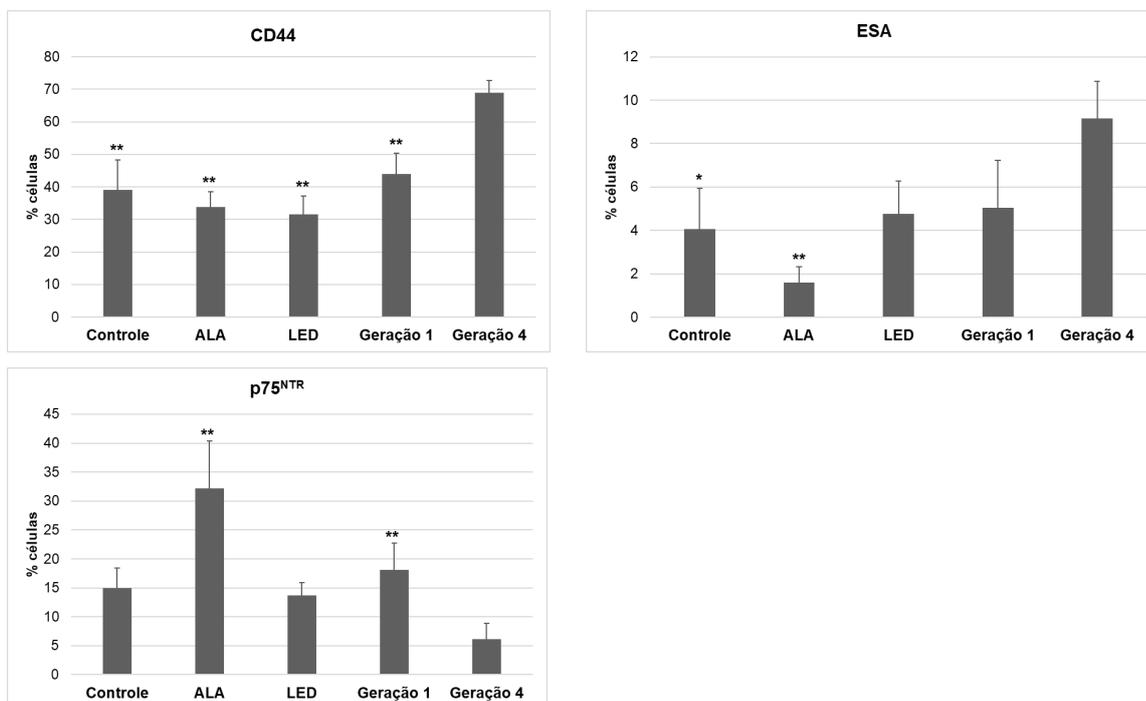
Figura 5.8 – Média ( $\pm$ desvio-padrão) da frequência de células positivas para CD44, ESA e p75<sup>NTR</sup> na linhagem SCC9



Fonte: o autor.

A Figura 5.9 ilustra a porcentagem das células positivas para CD44, ESA e p75<sup>NTR</sup> na linhagem DOK. Nota-se que, diferentemente da SCC9, na DOK houve aumento da frequência de células CD44+ no grupo PDT geração 4, com diferenças significativas em relação aos demais grupos ( $p < 0.01$  para todas as situações). A mesma tendência foi observada para ESA, quando o grupo PDT geração 4 exibiu maior frequência de células positivas para esse marcador em relação ao Controle ( $p < 0.05$ ) e a ALA ( $p < 0.01$ ). Já para p75<sup>NTR</sup>, houve redução significativa da expressão desse marcador no grupo PDT geração 4, exibindo diferenças significativas em relação a ALA ( $p < 0.01$ ) e PDT geração 1 ( $p < 0.01$ ).

Figura 5.9 – Média ( $\pm$ desvio-padrão) da frequência de células positivas para CD44, ESA e p75<sup>NTR</sup> na linhagem DOK. \* $p < 0.05$  e \*\* $p < 0.01$  em comparação a PDT geração 4 (análise de variância Anova seguida de teste de Tukey)

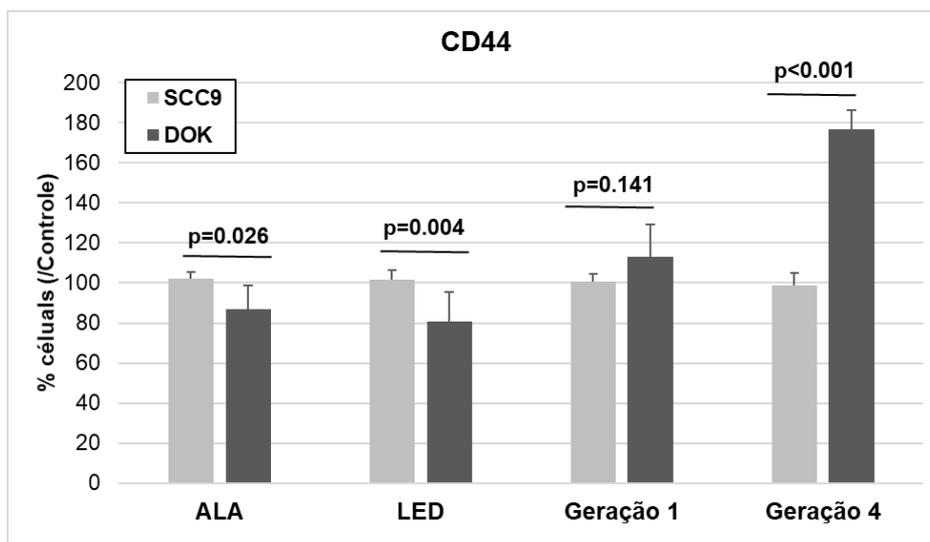


Fonte: o autor.

Foi realizada comparação entre as linhagens SCC9 e DOK quanto à expressão dos marcadores CD44, ESA e p75<sup>NTR</sup>. Para tanto, foi realizada normalização dos valores dos grupos tratados com os respectivos Controles.

A Figura 5.10 mostra a comparação da SCC9 com a DOK para o marcador CD44. Observa-se que nos grupos ALA e LED, houve aumento significativamente maior de células positivas para CD44 na linhagem SCC9 em comparação com a DOK. Contudo, nos grupos expostos a PDT, a linhagem DOK exibiu maior frequência de células CD44+, com diferenças significativas em relação à linhagem SCC9.

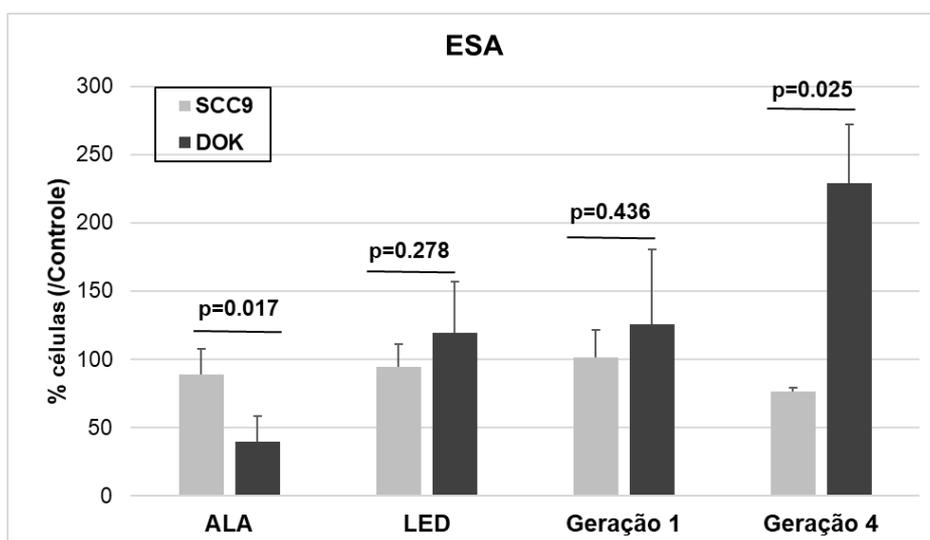
Figura 5.10 - Média ( $\pm$ desvio-padrão) da porcentagem de células CD44 positivas nos diferentes grupos (obtida pela normalização com o grupo Controle) das linhagens de carcinoma epidermóide oral (SCC9) e células displásicas orais (DOK) (valores de p pelo teste t de Student)



Fonte: o autor.

A Figura 5.11 ilustra a comparação entre as duas linhagens para o marcador ESA. Observa-se que a linhagem DOK produziu mais células ESA+ no grupo PDT geração 4, com diferenças significativas em relação à linhagem SCC9. O mesmo não foi observado após no grupo PDT geração 1, quando as duas linhagens exibiram frequência similar de células ESA+. O tratamento com ALA gerou maior frequência de células positivas para esse marcador na linhagem SCC9 em comparação à DOK.

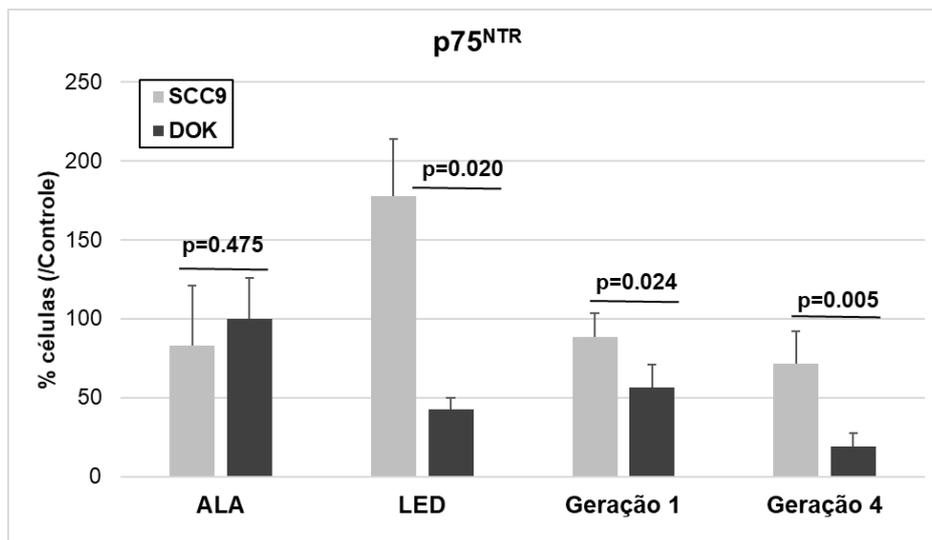
Figura 5.11 - Média ( $\pm$ desvio-padrão) da porcentagem de células ESA positivas nos diferentes grupos (obtida pela normalização com o grupo Controle) das linhagens de carcinoma epidermóide oral (SCC9) e células displásicas orais (DOK) (valores de p pelo teste t de Student)



Fonte: o autor.

A Figura 5.12 demonstra a comparação entre as duas linhagens com relação ao marcador p75<sup>NTR</sup>. Nos grupos tratados com PDT, a linhagem SCC9 gerou significativamente mais células p75<sup>NTR+</sup> em comparação à DOK. A mesma tendência foi observada quando houve tratamento com LED, com frequência de células p75<sup>NTR+</sup> muito mais alta na linhagem SCC9 do que na DOK.

Figura 5.12 - Média ( $\pm$ desvio-padrão) da porcentagem de células p75<sup>NTR</sup> positivas nos diferentes grupos (obtida pela normalização com o grupo Controle) das linhagens de carcinoma epidermóide oral (SCC9) e células displásicas orais (DOK) (valores de p pelo teste t de Student)



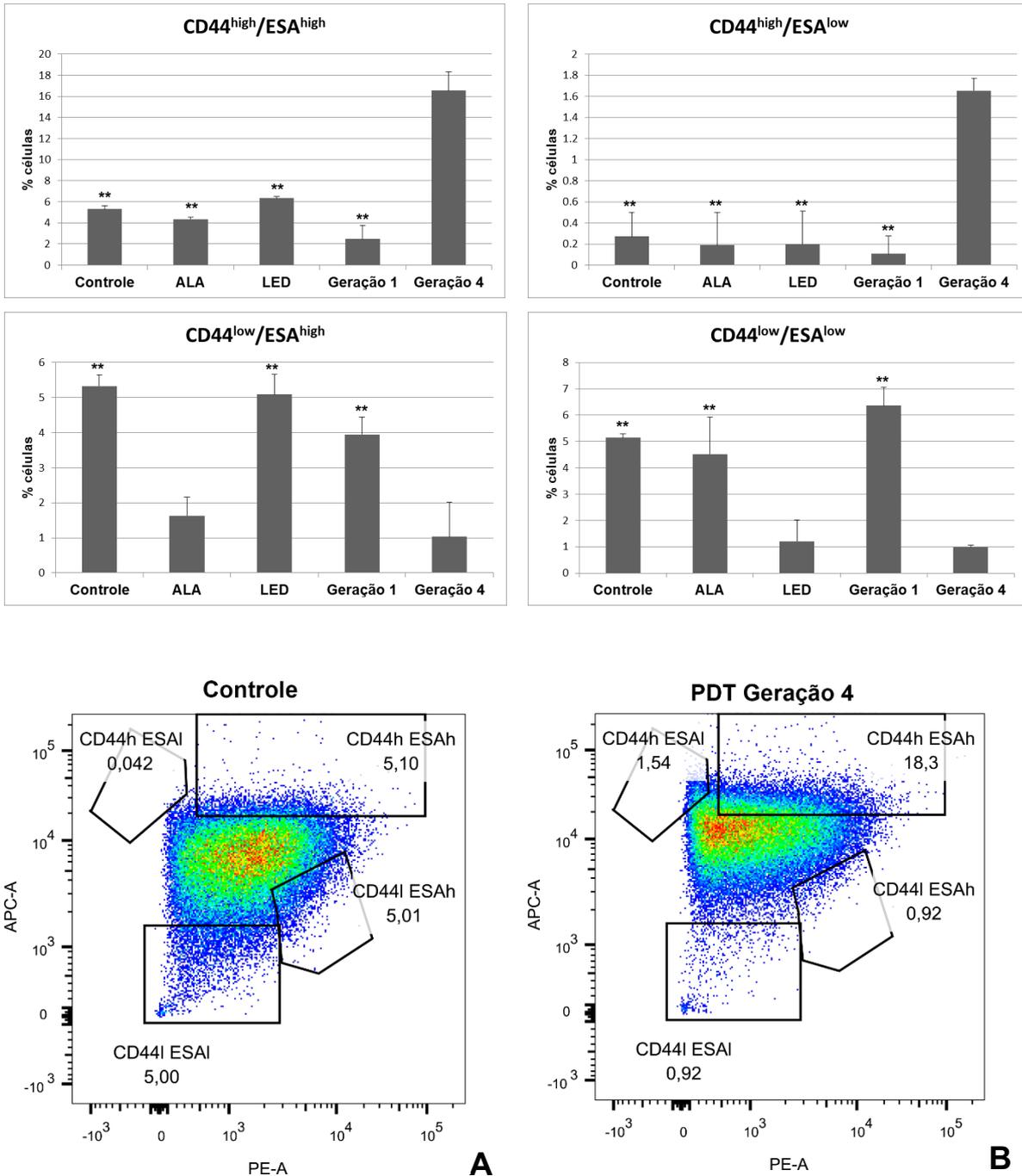
Fonte: o autor.

## 5.5 Co-expressão de CD44 e ESA

Com base em Biddle et al. (2011) e Biddle et al. (2016), analisamos a co-expressão de CD44 e ESA, distinguindo as subpopulações “high” e “low”. A Figura 5.13 ilustra a média da porcentagem de células para cada situação de co-expressão desses dois marcadores, analisada para a linhagem SCC9. A proporção de células CD44<sup>high</sup>/ESA<sup>high</sup> foi significativamente maior no grupo PDT geração 4 em relação aos demais grupos (para todos,  $p < 0.01$ ), sendo essa subpopulação de células a mais numerosa dentre as demais analisada nesse grupo. Já o grupo PDT Geração 1 exibiu menor porcentagem dessas células quando comparado ao Controle ( $p < 0.05$ ). Em todos os grupos, a proporção de células CD44<sup>high</sup>/ESA<sup>low</sup> foi bem pequena se comparada com as demais combinações dos dois marcadores. O grupo PDT Geração 4 exibiu maior frequência dessas células em relação aos demais grupos ( $p < 0.01$  para

todas as situações). Já para as subpopulações CD44<sup>low</sup>/ESA<sup>high</sup> e CD44<sup>low</sup>/ESA<sup>low</sup>, o grupo PDT Geração 4 exibiu os menores valores, com diferenças significativas em relação a Controle ( $p < 0.01$  para as duas subpopulações de células) e PDT geração 1 ( $p < 0.01$  para as duas subpopulações de células). Assim, em termos gerais, o grupo resistente à PDT tendeu a exibir maior frequência de células CD44<sup>high</sup>/ESA<sup>high</sup> e CD44<sup>high</sup>/ESA<sup>low</sup> em relação ao Controle.

Figura 5.13 – Média ( $\pm$ desvio-padrão) da porcentagem de células da linhagem SCC9 positivas para as diferentes situações de co-expressão entre CD44 e ESA. \*\*  $p < 0.01$  quando comparado ao grupo PDT Geração 4 (Análise de variância Anova seguida pelo teste de Tukey). A e B: Imagens representativas da distribuição das células positivas para a co-expressão de CD44 (eixo y) e ESA (eixo x) no grupo Controle e PDT Geração 4

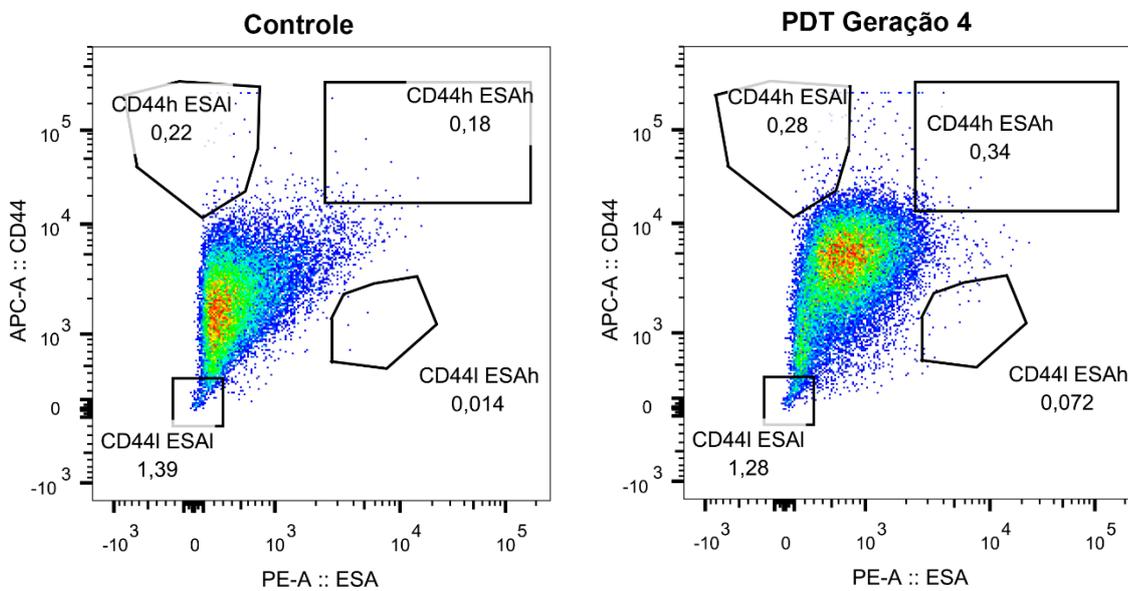
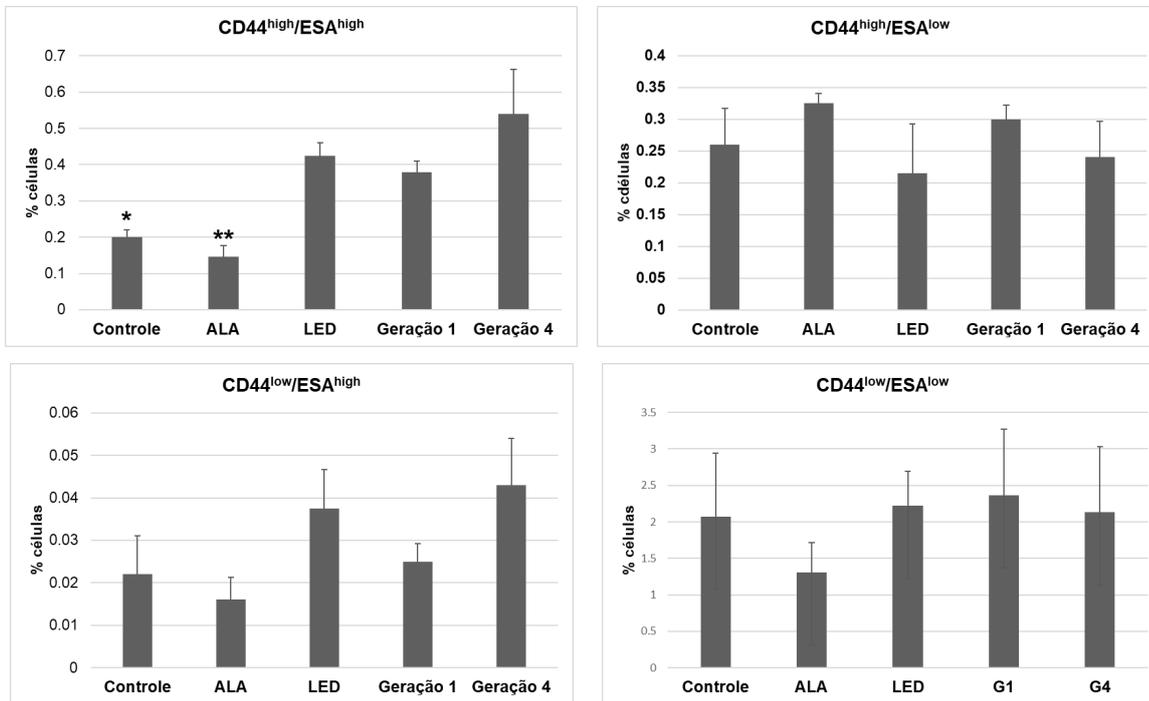


Fonte: o autor.

A Figura 5.14 mostra a média da frequência de células co-expressando CD44 e ESA na linhagem DOK. Nota-se que a subpopulação de células CD44<sup>high</sup>/ESA<sup>high</sup> foi

maior no grupo PDT Geração 4 em comparação aos grupos Controle ( $p < 0.05$ ) e ALA ( $p < 0.01$ ). Já para as subpopulações  $CD44^{high}/ESA^{low}$ ,  $CD44^{low}/ESA^{high}$  e  $CD44^{low}/ESA^{low}$  não se constataram diferenças significativas entre os grupos.

Figura 5.14 – Média ( $\pm$ desvio-padrão) da porcentagem de células da linhagem DOK positivas para as diferentes situações de co-expressão entre CD44 e ESA. \* $p < 0.05$  e \*\*  $p < 0.01$  quando comparado ao grupo PDT Geração 4 (Análise de variância Anova seguida pelo teste de Tukey). A e B: Imagens representativas da distribuição das células positivas para a co-expressão de CD44 (eixo y) e ESA (eixo x) no grupo Controle e PDT Geração 4



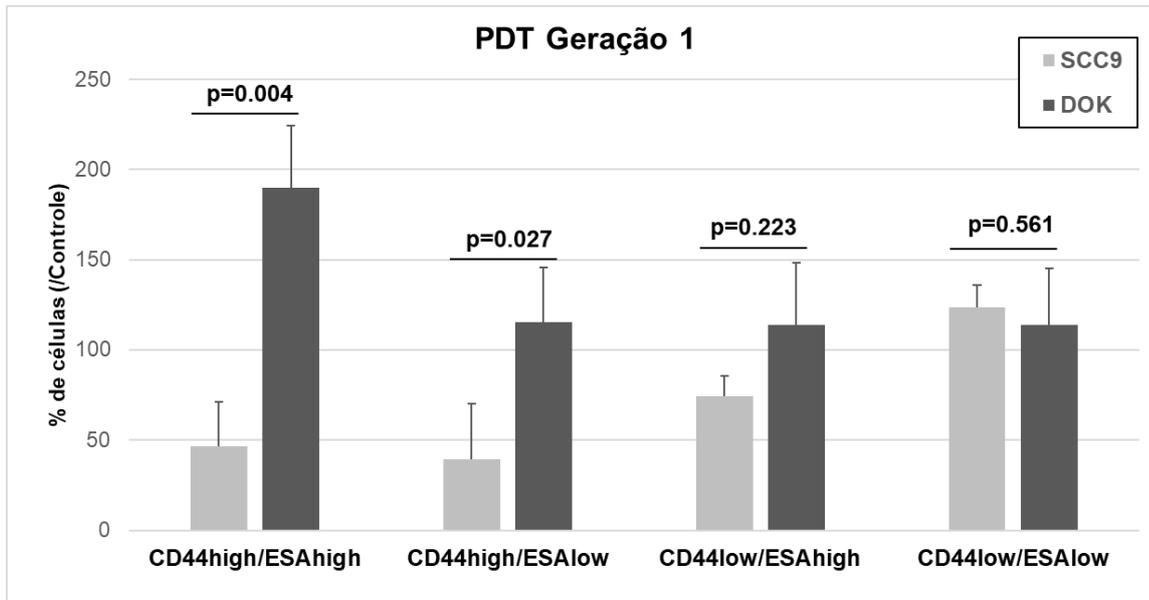
**A**

**B**

Fonte: o autor.

Realizamos uma comparação entre as linhagens SCC9 e DOK quanto ao efeito que a PDT exerceu sobre o grupo PDT geração 1 (Figura 5.15) no tocante à frequência de células co-expressando CD44 e ESA. Para tanto, os valores do grupo PDT geração 1 em ambas as linhagens foram normalizados com os valores dos respectivos Controles. Nota-se que um ciclo de PDT promoveu maior aumento de células positivas para CD44<sup>high</sup>/ESA<sup>high</sup> ( $p=0.004$ ) e CD44<sup>high</sup>/ESA<sup>low</sup> ( $p=0.027$ ) na linhagem DOK em comparação à linhagem SCC9. Para as demais subpopulações de células analisadas, não houve diferenças significativas entre as duas linhagens.

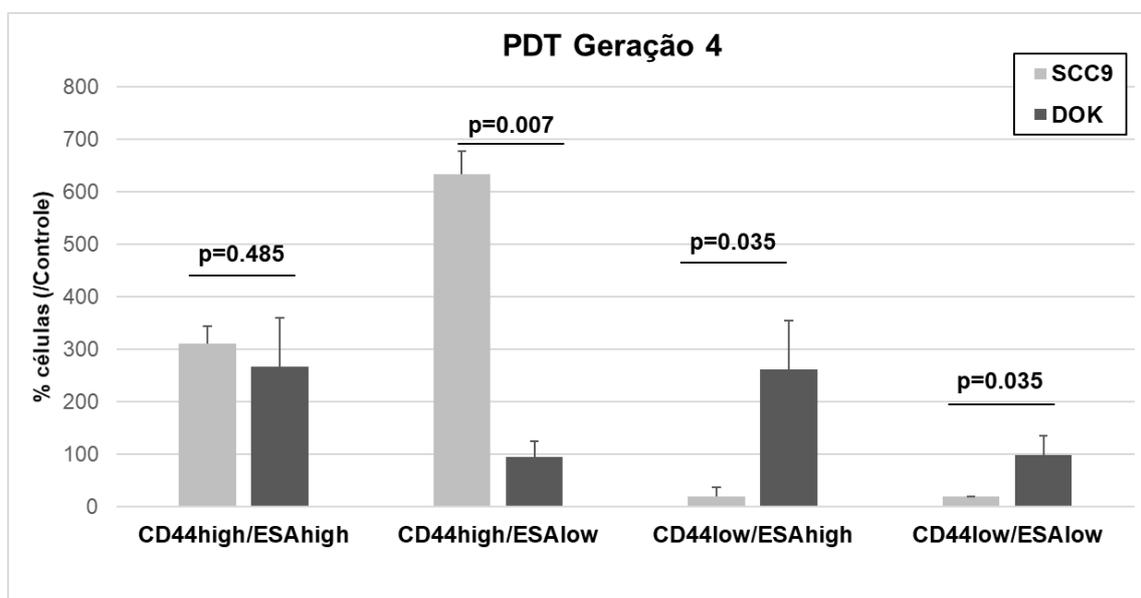
Figura 5.15 - Média ( $\pm$ desvio-padrão) da porcentagem de células co-expressando CD44 e ESA no grupo PDT geração 1 (obtida pela normalização com o grupo Controle) nas linhagens de carcinoma epidermóide oral (SCC9) e células displásicas orais (DOK) (valores de p pelo teste t de Student)



Fonte: o autor.

A mesma comparação foi realizada para o grupo PDT geração 4 (Figura 5.16). Nota-se que vários ciclos de PDT provocaram maior frequência de células CD44<sup>high</sup>/ESA<sup>low</sup> na linhagem SCC9 do que na linhagem DOK ( $p=0.007$ ). Por outro lado, esse mesmo tratamento provocou maior frequência de células CD44<sup>low</sup>/ESA<sup>high</sup> ( $p=0.035$ ) e CD44<sup>low</sup>/ESA<sup>low</sup> ( $p=0.035$ ) na linhagem DOK em comparação à linhagem SCC9. Para as células positivas para CD44<sup>high</sup>/ESA<sup>high</sup> não houve diferenças significativas entre as duas linhagens.

Figura 5.16 - Média ( $\pm$ desvio-padrão) da porcentagem de células co-expressando CD44 e ESA no grupo PDT geração 4 (obtida pela normalização com o grupo Controle) nas linhagens de carcinoma epidermóide oral (SCC9) e células displásicas orais (DOK) (valores de p pelo teste t de Student)



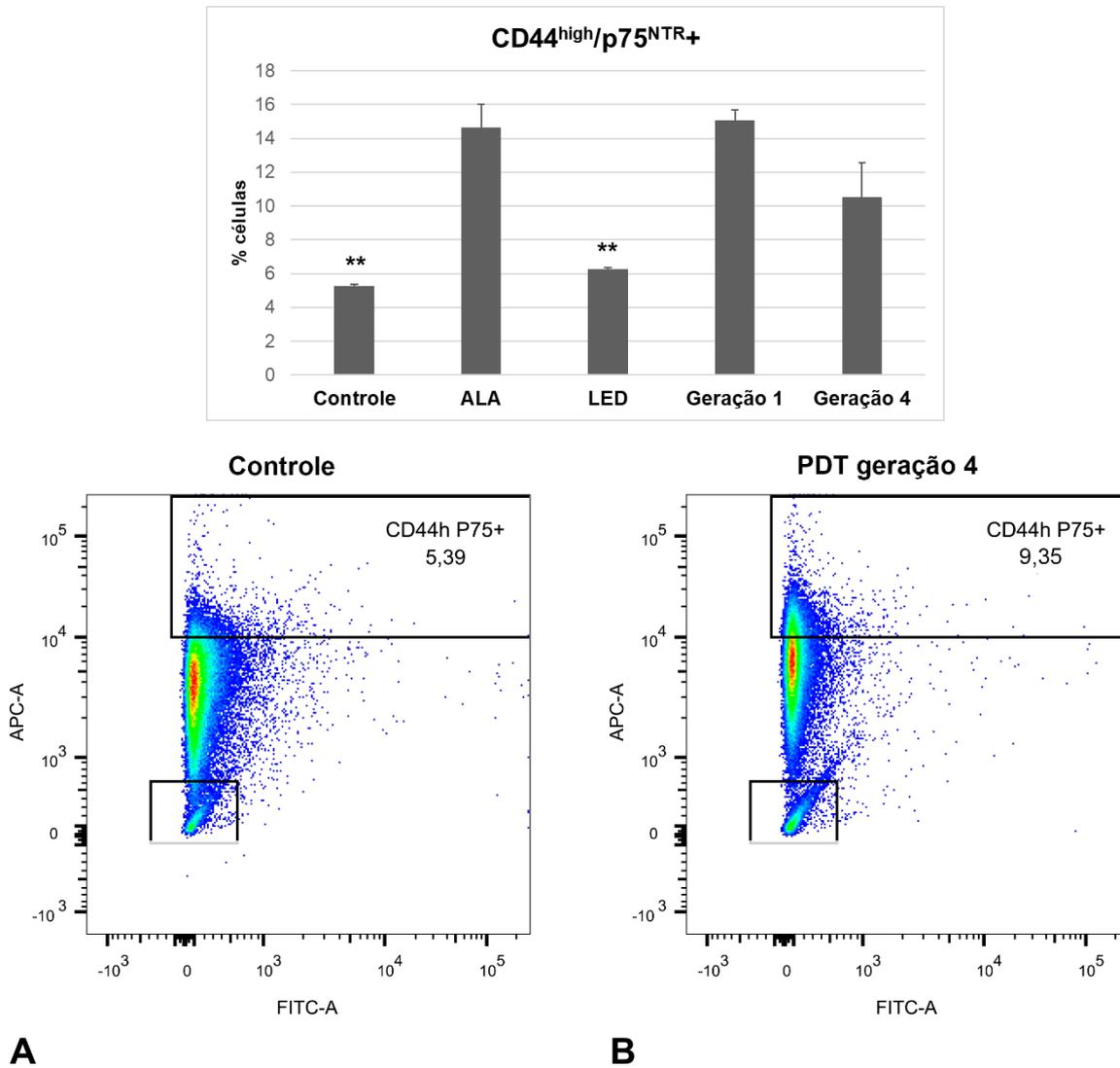
Fonte: o autor.

## 5.6 Co-expressão de CD44 e p75<sup>NTR</sup>

Com base em Murillo-Sauca et al. (2014), analisamos a co-expressão de CD44 e p75<sup>NTR</sup> em ambas as linhagens celulares. Como a frequência de células p75<sup>NTR</sup> foi pequena, principalmente na SCC9, optou-se em analisar esse marcador somente como positivo e negativo.

A Figura 5.17 mostra a média da frequência de células co-expressando CD44 e p75<sup>NTR</sup> nos diferentes grupos da linhagem SCC9. Nota-se que a frequência de células CD44<sup>high</sup>/p75<sup>NTR+</sup> nos grupos PDT geração 1 e geração 4 foi maior do que nos demais grupos. Houve diferenças significativas entre os grupos PDT geração 1 e 4 em relação ao Controle ( $p < 0.01$  para todas as situações) e LED ( $p < 0.01$  para todas as situações). Analisando a frequência de células p75<sup>NTR+</sup> na subpopulação CD44<sup>high</sup> (Tabela 5.2), o grupo PDT geração 4 exibiu frequência maior dessas células (6.53%) em comparação ao grupo Controle (3.77%), porém as diferenças foram significativas somente em relação ao grupo ALA (2.46%,  $p < 0.05$ ).

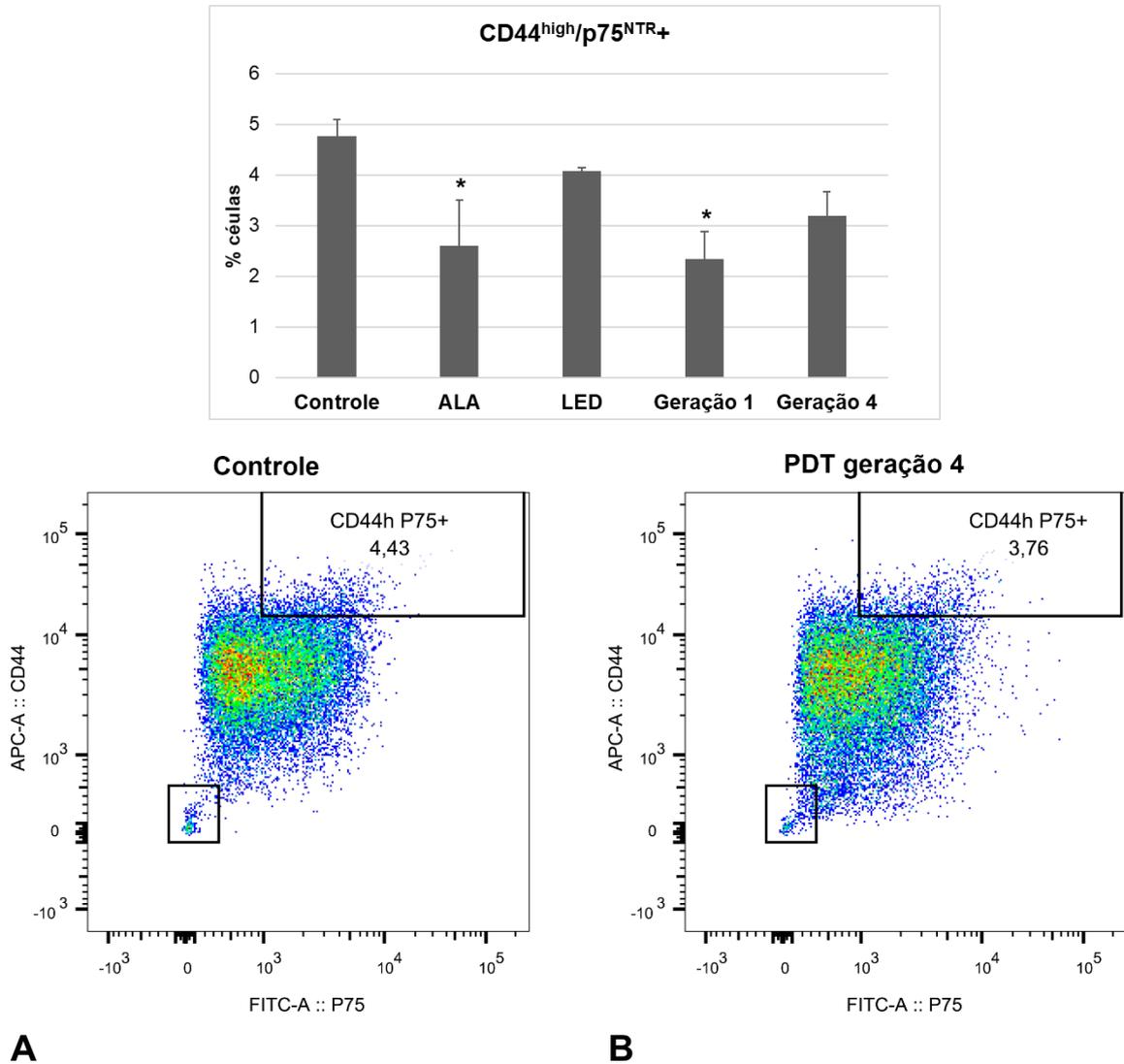
Figura 5.17 – Média ( $\pm$ desvio-padrão) da porcentagem de células da linhagem SCC9 positivas para as diferentes situações de co-expressão entre CD44 e p75<sup>NTR</sup>. \*\* p<0.01 quando comparado ao grupo PDT Geração 1 e Geração 4 (Análise de variância Anova seguida pelo teste de Tukey). A e B: Imagens representativas da distribuição das células positivas para a co-expressão de CD44 (eixo y) e p75<sup>NTR</sup> (eixo x) no grupo Controle e PDT Geração 4



Fonte: o autor.

Na Figura 5.18, têm-se as médias das frequências de células da linhagem DOK co-expressando CD44 e p75<sup>NTR</sup>. Nessa linhagem celular, ao contrário do que se observou na SCC9, a maior frequência de células CD44<sup>high</sup>/p75<sup>NTR</sup>+ foi no grupo Controle, havendo redução dessa frequência nos grupos PDT geração 1 e PDT geração 4. Houve diferenças significativas entre o grupo Controle e PDT geração 1 (p<0.05). Considerando a população CD44<sup>high</sup> isoladamente, notou-se alta frequência de células p75<sup>NTR</sup>+ em todos os grupos, sem diferenças significativas entre eles (Tabela 5.2).

Figura 5.18 – Média ( $\pm$ desvio-padrão) da porcentagem de células da linhagem DOK positivas para as diferentes situações de co-expressão entre CD44 e p75<sup>NTR</sup>. \*  $p < 0.05$  quando comparado ao grupo Controle (Análise de variância Anova seguida pelo teste de Tukey). A e B: Imagens representativas da distribuição das células positivas para a co-expressão de CD44 (eixo y) e p75<sup>NTR</sup> (eixo x) no grupo Controle e PDT Geração 4



Fonte: o autor.

Tabela 5.2 – Média ( $\pm$ desvio-padrão) da porcentagem de células p75<sup>NTR</sup> positivas presentes na população de células CD44<sup>high</sup> em ambas as linhagens analisadas

	Valores originais (%)			Valores normalizados pelo controle (%)		
	SCC9	DOK	Valor de p <sup>b</sup>	SCC9	DOK	Valor de p <sup>b</sup>
<b>CD44<sup>high</sup></b>						
Controle	3.7 $\pm$ 1.0	94.0 $\pm$ 3.2	<0.001	-	-	-
ALA	2.5 $\pm$ 0.6*	95.5 $\pm$ 2.0	<0.001	65.4 $\pm$ 16.6	101.6 $\pm$ 2.2	0.064
LED	4.9 $\pm$ 0.5	86.7 $\pm$ 9.7	0.004	132.0 $\pm$ 15.0	92.2 $\pm$ 10.4	0.019
PDT geração 1	3.9 $\pm$ 1.8	93.7 $\pm$ 0.8	<0.001	105.7 $\pm$ 49.0	99.8 $\pm$ 0.9	0.853
PDT geração 4	6.5 $\pm$ 0.4	90.5 $\pm$ 4.7	<0.001	173.2 $\pm$ 10.3	96.3 $\pm$ 5.1	<0.001
Valor de p <sup>a</sup>	0.008	0.302		-	-	

<sup>a</sup>Valor de p pelo teste de Anova. \*p<0.05 pelo teste de Tukey.

<sup>b</sup>Valor de p pelo teste t de Student.

Fonte: o autor.

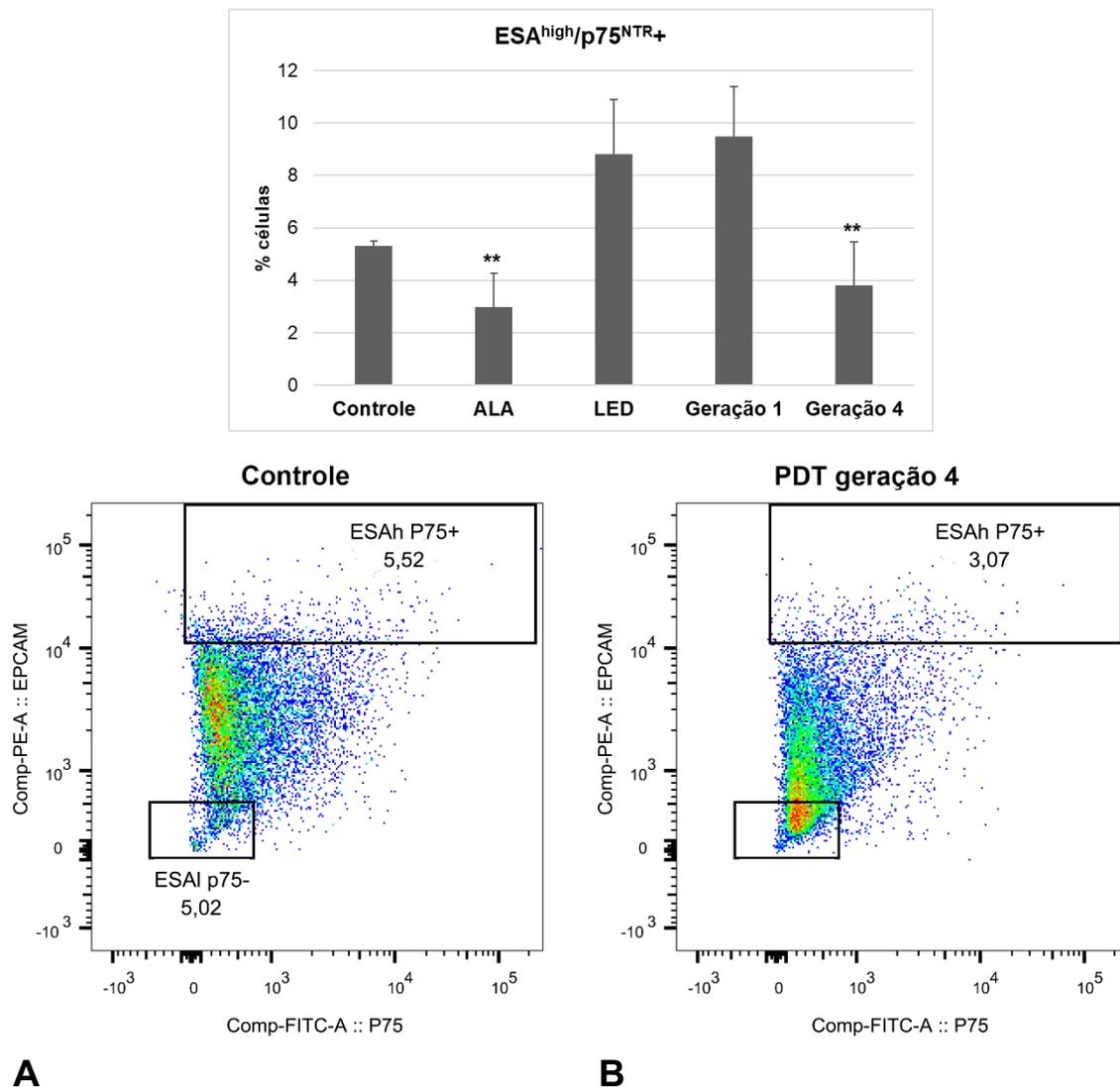
Na comparação entre a linhagem SCC9 com a DOK com relação à frequência de células p75<sup>NTR+</sup> dentro da subpopulação de células CD44<sup>high</sup>, observa-se que a linhagem DOK exibiu quantidade significativamente maior dessas células em todos os grupos analisados (Tabela 5.2). Contudo, ao se normalizarem os valores pelo grupo Controle, nota-se que múltiplos ciclos de PDT acarretaram maior frequência de células p75<sup>NTR+</sup> na linhagem SCC9 do que na DOK, com diferenças significativas entre elas (p<0.001). A irradiação LED também provocou frequência significativamente maior dessas células na linhagem SCC9 em comparação à DOK (p=0.019) (Tabela 5.2).

## 5.7 Co-expressão de ESA e p75<sup>NTR</sup>

Com base em Yamaguchi et al. (2016a), realizamos a quantificação da frequência de células co-expressando ESA e p75<sup>NTR</sup>. A Figura 5.19 mostra a frequência de células ESA<sup>high</sup>/p75<sup>NTR+</sup> na linhagem SCC9. Houve redução da frequência dessas células no grupo PDT geração 4, diferindo estatisticamente do

grupo PDT geração 1 ( $p < 0.01$ ) e LED ( $p < 0.01$ ). Contudo, dentro da população  $ESA^{high}$ , nota-se maior frequência de células  $p75^{NTR}$  no grupo PDT geração 4, porém sem diferenças estatísticas em relação aos demais grupos (Tabela 5.3).

Figura 5.19 – Média ( $\pm$ desvio-padrão) da porcentagem de células da linhagem SCC9 positivas para as diferentes situações de co-expressão entre ESA e  $p75^{NTR}$ . \*\*  $p < 0.01$  quando comparado ao grupo PDT geração 1 (Análise de variância Anova seguida pelo teste de Tukey). A e B: Imagens representativas da distribuição das células positivas para a co-expressão de ESA (eixo y) e  $p75^{NTR}$  (eixo x) no grupo Controle e PDT Geração 4

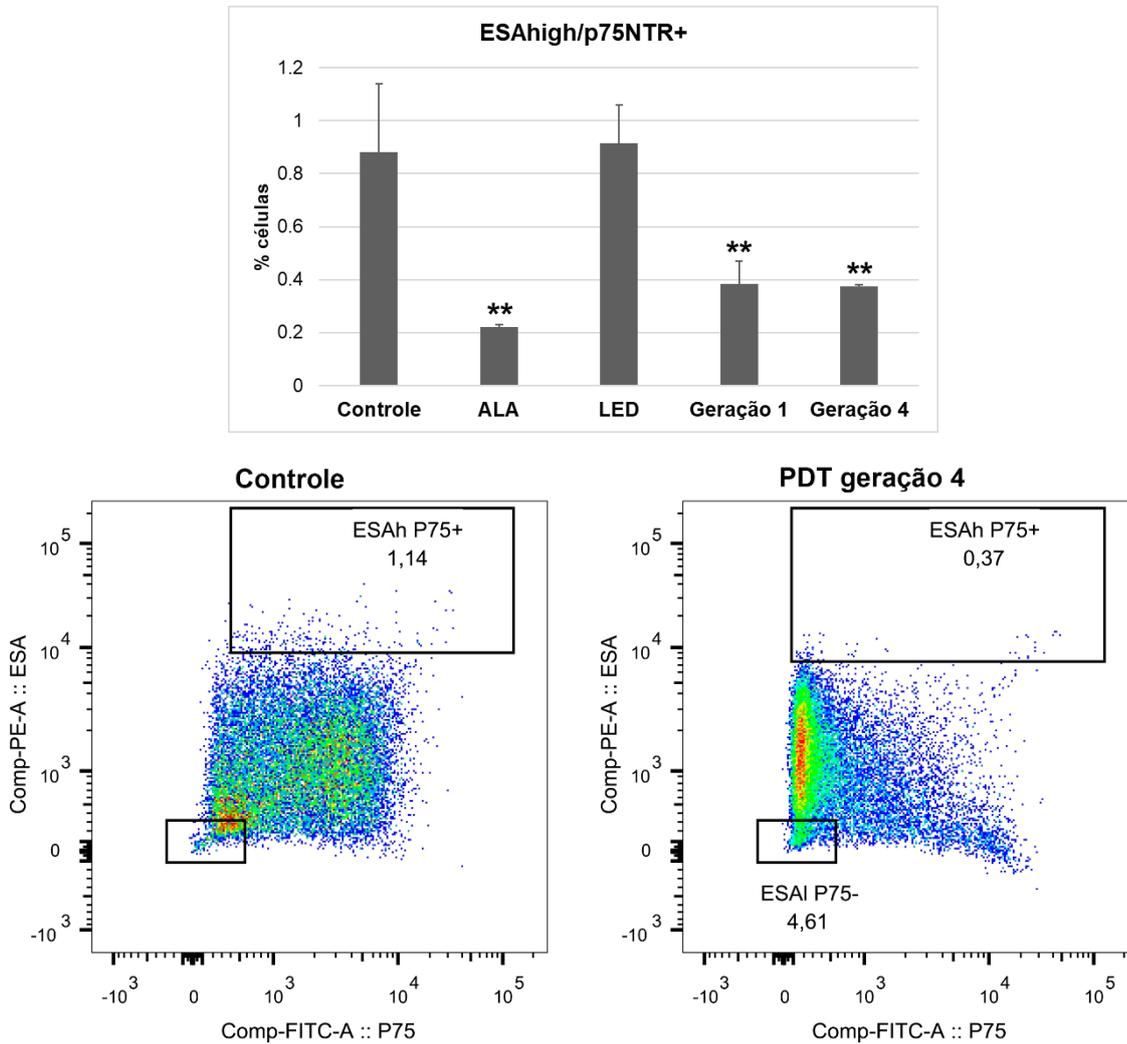


Fonte: o autor.

A Figura 5.20 ilustra a frequência de células co-expressando ESA e  $p75^{NTR}$  na linhagem celular DOK. Nota-se que, nessa linhagem, houve redução da frequência de células  $ESA^{high}/p75^{NTR+}$  em ambos os grupos tratados com PDT, com diferenças significativas entre Controle e PDT geração 1 ( $p < 0.01$ ) e geração 4 ( $p < 0.01$ ). Na população  $ESA^{high}$ , os grupos PDT geração 1 e geração 4 exibiram menor frequência

de células p75<sup>NTR</sup>+ em relação ao Controle ( $p < 0.01$ ), ALA ( $p < 0.01$ ) e LED ( $p < 0.01$ ) (Tabela 5.3).

Figura 5.20 – Média ( $\pm$ desvio-padrão) da porcentagem de células da linhagem DOK positivas para as diferentes situações de co-expressão entre ESA e p75<sup>NTR</sup>. \*\*  $p < 0.01$  quando comparado aos grupos Controle e LED (Análise de variância Anova seguida pelo teste de Tukey). A e B: Imagens representativas da distribuição das células positivas para a co-expressão de ESA (eixo y) e p75<sup>NTR</sup> (eixo x) no grupo Controle e PDT Geração 4



Fonte: o autor.

Tabela 5.3 – Média ( $\pm$ desvio-padrão) da porcentagem de células p75<sup>NTR</sup> positivas presentes na população de células ESA<sup>high</sup> em ambas as linhagens analisadas

	Valores originais (%)			Valores normalizados pelo controle (%)		
	SCC9	DOK	Valor de p <sup>b</sup>	SCC9	DOK	Valor de p <sup>b</sup>
<b>ESA<sup>high</sup></b>						
Controle	23.3 $\pm$ 5.8	75.5 $\pm$ 14.2**	0.004	-	-	-
ALA	34.1 $\pm$ 6.3	82.8 $\pm$ 10.7**	0.002	146.4 $\pm$ 27.2	109.6 $\pm$ 14.2	0.106
LED	29.0 $\pm$ 7.4	83.9 $\pm$ 5.7**	<0.001	124.7 $\pm$ 32.0	111.1 $\pm$ 7.5	0.512
PDT geração 1	21.6 $\pm$ 2.6	43.8 $\pm$ 7.1	0.007	92.8 $\pm$ 11.2	58.1 $\pm$ 9.5	0.007
PDT geração 4	31.1 $\pm$ 4.1	28.2 $\pm$ 2.5	0.360	133.7 $\pm$ 17.8	37.4 $\pm$ 3.4	<0.001
Valor de p <sup>a</sup>	0.092	<0.001		-	-	

<sup>a</sup>Valor de p pelo teste de Anova. \*p<0.05 pelo teste de Tukey.

<sup>b</sup>Valor de p pelo teste t de Student.

Fonte: o autor.

Na comparação entre a linhagem SCC9 com a DOK com relação à frequência de células p75<sup>NTR+</sup> dentro da subpopulação de células ESA<sup>high</sup>, observa-se que a linhagem DOK exibiu quantidade significativamente maior dessas células em todos os grupos analisados, com exceção do grupo PDT geração 4, no qual não houve diferenças significativas entre as duas linhagens (Tabela 5.3). Contudo, ao se normalizarem os valores pelo grupo Controle, nota-se que um ciclo de PDT (grupo PDT geração 1) provocou aumento significativamente maior de células p75<sup>NTR+</sup> dentro da subpopulação ESA<sup>high</sup> na linhagem SCC9 em comparação à DOK. O mesmo efeito foi observado após múltiplos ciclos de PDT (PDT geração 4) (Tabela 5.3).



## 6 DISCUSSÃO

O primeiro objetivo deste trabalho foi verificar se células displásicas epiteliais orais desenvolvem resistência à terapia fotodinâmica (PDT) mediada pelo fotossensibilizador 5-ALA. Essa proposta foi elaborada com base no fato de que a PDT tem sido considerada uma alternativa de tratamento para leucoplasias e eritroplasias orais, levando a índices de remissão bastante satisfatórios (Vohra et al., 2015; Gondivkar et al., 2018). Contudo, alguns trabalhos têm constatado recorrências (Vohra et al., 2015), o que pode sugerir o desenvolvimento de resistência à terapia. De fato, no presente trabalho demonstramos que essas células desenvolveram resistência à PDT, porém esta foi com uma taxa menor se comparada à constatada em estudo anterior envolvendo células de carcinoma epidermóide oral (CEO) (linhagem SCC9) (Rosin et al., 2017), sendo que ambas as linhagens foram expostas à mesma dose de luz inicial. Detectamos também que as células displásicas eram mais sensíveis ao tratamento do que as células neoplásicas, demonstrando taxa de viabilidade menor a cada ciclo de PDT instituído, se comparadas às detectadas para as células de CEO. Contudo, adotando-se o critério de que aumento de 1,5 vezes na viabilidade indica resistência (Singh et al., 2001; Zamarrón et al., 2015), todas as gerações expostas a ciclos de doses de luzes crescente de PDT exibiram resistência, indicando que o tratamento selecionou células com maior capacidade de sobrevivência à terapia.

O modelo de resistência adotado simula a situação clínica em que múltiplas sessões de PDT são utilizadas para se erradicar completamente as lesões leucoplásicas (Grant et al., 1993; Chen et al., 2005; Jerjes et al., 2012), variando-se ou não o protocolo inicialmente instituído. No presente estudo, optamos por aumentar a dose de irradiação a cada ciclo de tratamento, seguindo modelos anteriores testados e validados com outras linhagens celulares (Milla et al., 2011; Bhowmick; Girotti, 2014; Fahey; Girotti, 2015; Wang et al., 2017), decidimos também utilizar o 5-ALA como indutor de fotossensibilizador devida a sua utilização recorrente em lesões orais expostas à PDT (Fan et al., 1996; Tsai et al., 2004; Jerjes et al., 2011; Yu; Yu, 2014; Wang et al., 2017).

Após indução de gerações de células displásicas e neoplásicas orais resistentes à PDT, decidimos verificar se essas gerações exibiam padrões de

crescimento e de invasão diferentes da geração parental e do grupo controle, e se essas características poderiam sugerir modificações em populações de células tronco tumorais (CTTs).

Verificamos que a quarta geração de células, tanto da linhagem SCC9 quanto da linhagem DOK, exibiu maior potencial de formação de colônias em relação ao grupo Controle. Esse potencial foi similar entre as duas linhagens, sugerindo que a exposição crescente à PDT atuou de maneira similar em ambos os tipos celulares no tocante ao potencial de formação de colônias. Foi interessante observar, contudo, que o efeito dos elementos da PDT analisados isoladamente, ou seja, o efeito do ALA e do LED foi diferente nas linhagens celulares.

Na linhagem DOK, o ALA provocou aumento na taxa de formação de colônias, ao passo que na SCC9 não foi observado esse efeito. Já foi detalhado na revisão de literatura que a formação da protoporfirina IX ocorre dentro da mitocôndria através da via do grupo heme e que o ALA de origem exógena é capaz de ultrapassar o sistema de controle deste grupo, permitindo desse modo o acúmulo de protoporfirina IX dentro da célula, levando a um aumento na produção das EROs e conseqüentemente a morte celular.

O trabalho de Rosin et al., 2017 verificou a quantidade de protoporfirina em grupos resistentes a PDT da linhagem SCC9 e observou que a maior porcentagem de protoporfirina IX foi encontrada exatamente no grupo ALA (44,7%) e a menor porcentagem foi observada na Geração 4 (17,6%). Com base nesse resultado, o observado com a linhagem SCC9 em nosso trabalho vai de acordo com o esperado, visto que o grupo ALA apresentou a menor taxa de formação de colônias quando comparado ao grupo controle e aos outros grupos experimentais e que a Geração 4 foi o grupo que apresentou o maior aumento do potencial de formação de colônias. Portanto podemos supor que haja uma relação entre a quantidade de protoporfirina intracelular e a capacidade na formação de colônias para a linhagem SCC9.

Em contrapartida o mesmo comportamento não foi observado na linhagem de queratinócitos orais displásicos (DOK). O grupo ALA não foi o que apresentou menor potencial de formação de colônias e para essa linhagem celular não temos como parâmetro comparativo a quantificação de protoporfirina IX para verificar o acúmulo desse componente. Entretanto ao verificar a literatura observamos a discussão dos

possíveis mecanismos de resistência a PDT, como por exemplo a quantidade de fotossensibilizadores encontrados dentro das células, a localização dos fotossensibilizadores em sítios não propícios para que ocorra o processo de fotossensibilização e a possíveis alterações no mecanismo da síntese do grupo heme. Desse modo podemos especular que para a linhagem DOK o comportamento do elemento ALA não apresenta o mesmo efeito que na linhagem SCC9 quando observamos o potencial de formação de colônias e isso pode ser devido a sua localização intracelular bem como uma maior capacidade dessa linhagem em eliminar o FS mais rapidamente.

Por outro lado, ao observamos o elemento LED o comportamento das linhagens estudadas foi oposto, na SCC9 o LED acarretou um aumento substancial do potencial de formação de colônias, enquanto que, na DOK, esse potencial foi inibido após a irradiação. Analisando primeiramente os resultados obtidos na linhagem SCC9 observamos que o grupo LED apresentou um potencial de formação de colônias maior do que o grupo controle. O trabalho de Rosin et al., 2017 verificou que o grupo LED da linhagem SCC9 estudado demonstrou uma maior expressão de marcadores de sobrevivência celular e que as células proliferaram mais do que o grupo controle. Utilizando esses resultados como parâmetros podemos inferir que o grupo tratado apenas com o LED demonstra uma capacidade de formação de colônias maior do que o grupo controle, ALA e Geração 1 e isso pode ser justificado pela capacidade da luz de gerar a fotomodulação, ou seja o estímulo a proliferação celular em células que não foram sensibilizadas pelo FS.

O mesmo efeito de fotomodulação entretanto não foi visto no grupo LED da linhagem DOK, o que nos leva a estabelecer que talvez os parâmetros de irradiação utilizados na linhagem de queratinócitos não sejam os ideais para que ocorra esse processo de estímulo de proliferação celular.

Assim, provavelmente o efeito da PDT como um todo, similar entre as duas linhagens, foi resultado de diferentes ações dos elementos dessa terapia nas células estudadas. Essa diferença deve ser melhor investigada em estudos posteriores, pois provavelmente muito dos mecanismos que subjazem ao processo de aquisição de resistência à PDT devem estar atrelados a essas particularidades da irradiação e da ação do ALA em função do tipo celular exposto a esses tratamentos.

Apesar de sinalizar maior potencial de crescimento e formação de colônias, os grupos resistentes à PDT, tanto na linhagem SCC9 quanto na DOK, não exibiram maior potencial de invasão quando comparadas ao Controle. Esse resultado diferiu do estudo anterior em que demonstramos maior potencial de migração de células SCC9 resistentes à PDT (Rosin et al., 2017). Contudo, o ensaio de migração difere do de invasão, pois nesse último as células têm que migrar pelo Matrigel® após ultrapassar os poros; no ensaio de migração não há o obstáculo do Matrigel®, facilitando o deslocamento celular. Provavelmente a necessidade de degradação prévia do Matrigel® para o deslocamento celular anulou o potencial migratório adquirido no processo de resistência à PDT. O comportamento das células resistentes à PDT no tocante a migração e invasão é descrito de forma variada na literatura. Uma investigação envolvendo linhagem de carcinoma mamário resistente à PDT mediada pelo 5-ALA demonstrou menor potencial de invasão das células resistentes, a qual foi associada a modificações na distribuição de vinculina, E-caderina e  $\beta$ -catenina, sem alterar a quantidade dessas proteínas. Os autores discutiram que esses achados e outros, como ausência de expressão de vimentina e desorganização da actina, não sugerem que as células resistentes à PDT exibem um fenótipo de transição epitélio-mesenquimal, que poderia contribuir para um comportamento mais invasivo (Casas et al., 2008). Já outro estudo detectou maior capacidade de migração em células de carcinoma de pele resistentes à PDT mediada pelo 5-ALA (Milla et al., 2011).

Um fato interessante foi termos verificado que as células sobreviventes no grupo PDT geração 1, tanto na linhagem SCC9 quanto na DOK expostas a um ciclo de PDT, exibiram maior invasão, ao contrário daquelas da geração 4. No estudo anterior já tínhamos detectado que a PDT geração 1 de células SCC9 exibia alto potencial de migração (Rosin et al., 2017). Outros trabalhos também evidenciaram um fenótipo mais invasivo de células sobreviventes à PDT mediada pelo 5-ALA, o qual tem sido associado a maior produção de iNOS pelas células sobreviventes a um ciclo de PDT (Bhowmick; Girotti, 2014; Fahey; Girotti, 2015).

Verificamos também se as populações resistentes à PDT de ambas as linhagens celulares exibiam modificações no padrão de expressão de CD44, ESA e p75<sup>NTR</sup>. Esses marcadores já tinham sido previamente avaliados em estudos de displasias epiteliais orais e CEO (Biddle et al., 2011; Murillo-Sauca et al., 2014, Biddle et al., 2016, Yamaguchi et al., 2016a; Yamaguchi et al., 2016b). Nesses estudos,

esses marcadores identificaram uma subpopulação de células com potencial de auto-renovação e de resistência a quimioterapia e radioterapia, sugerindo identificar células tronco tumorais. No presente trabalho, detectamos que esses marcadores, quando analisados isoladamente, não exibiram alterações em sua expressão nos diferentes grupos analisados nas células SCC9. O perfil identificado foi similar àquele descrito na literatura para carcinomas de cabeça e pescoço, ou seja, grande quantidade de células CD44+ e ESA+ e pouca expressão de p75<sup>NTR</sup> (Yamaguchi et al., 2016a; Yamaguchi et al., 2016b).

Um fato interessante é não termos detectado redução dessas células após um ciclo de PDT (grupo PDT geração 1). Estudo anterior demonstrou que as células tronco tumorais presentes em linhagem de CEO, identificadas pelo marcador ALDH1 e CD44, são sensíveis à PDT mediada pelo 5-ALA, ou seja, entram em apoptose após um ciclo desse tratamento (Yu; Yu, 2014). Esses autores também demonstraram redução do potencial de formação de esferas e também redução na expressão de genes relacionados à assinatura de células-tronco (Oct-4 e Nanog). Já outra investigação com células tronco tumorais de linhagem de carcinoma de cólon, quando expostas à PDT mediada pela PpIX, acionaram um mecanismo de autofagia que protegeu essas células contra apoptose, limitando a taxa de mortalidade celular (Wei et al., 2014). Provavelmente as células com suposto fenótipo tronco na linhagem SCC9 exibem certa resistência à PDT já no primeiro ciclo de tratamento, manifesta pela manutenção dessa população após o tratamento.

Já na linhagem DOK, ao contrário, a geração resistente à PDT exibiu maior frequência de células CD44+ e ESA+, e menor frequência de células p75<sup>NTR+</sup>. Os estudos que avaliam a expressão desses marcadores em lesões displásicas e em CEO demonstram que, nas displasias, há aumento gradativo da expressão de CD44 e ESA à medida que se aumenta o grau de displasia (Laimer et al., 2008; AbdulMajeed et al., 2013; Huang et al., 2014; Sen; Carnelio, 2016), e diminuição da expressão de p75<sup>NTR</sup> em CEOs bem diferenciados (Okumura et al., 2006; Kiyosue et al., 2013; Murillo-Sauca et al., 2014; Kojima et al., 2017).

O trabalho de Dalley et al. (2013) avaliou os marcadores CD44 e p75<sup>NTR</sup> em 4 linhagens celulares de queratinócitos normais, displásicos e carcinoma epidermóide oral. O grupo utilizou a mesma linhagem de queratinócitos oral displásico (DOK) que

este trabalhou abordou e observaram que em relação as culturas organotípicas, todas as linhagens demonstraram maior expressão de CD44 do que p75<sup>NTR</sup>, resultado semelhante ao observado nesse presente trabalho. Entretanto nas análises de citometria de fluxo a CD44 não apresentou diferença de expressão comparando-se a linhagem DOK com a linhagem de CEO, já para o receptor p75<sup>NTR</sup>, houve uma diminuição da média ainda que não significativa (89.4-DOK ,53.6-PE/CA-PJ15) indicando resultados conflitantes com os resultados obtidos neste trabalho.

Assim, com base nesses relatos, temos a impressão de que o modelo adotado de indução de resistência à PDT acentuou um fenótipo mais agressivo das células displásicas no tocante a expressão desses marcadores. Não existem relatos na literatura acerca do efeito da PDT sobre células tronco tumorais em displasias epiteliais.

Além do fato de que células tronco tumorais podem desenvolver mecanismos de autofagia que são protetores contra a ação da PDT (Wei et al., 2014), outra explicação envolve a quantidade de fotossensibilizadores presentes nessas células. Em estudo envolvendo células de glioblastoma expostas à PDT mediada pelo 5-ALA, foi demonstrado que as células tronco tumorais exibiam menor fluorescência derivada da PpIX do que as células não-células tronco tumorais, provavelmente por não permitirem a entrada ou a atuação do 5-ALA no interior das células (Wang et al., 2017). As células tronco tumorais exibem as proteínas ABCG2, responsáveis pelo efluxo de drogas, incluindo porfirinas em situação de hipóxia; o 5-ALA é um substrato para ABCG2, sendo bloqueado por esse sistema em diversas condições (Selbo et al., 2015). Chang et al. (2014) já tinha demonstrado que no carcinoma epidermóide cabeça e pescoço o nível de EROs interfere na capacidade das células de expressarem características de células tronco tumorais, células que apresentavam baixos níveis de EROs eram correlacionadas com características pró-tumorais e que ao haver uma normalização no nível de EROs essas mesmas células perdiam tais propriedades e conseqüentemente ocorria um aumento de sensibilidade ao quimioterápico.

Assim, uma possível explicação para a manutenção das células tronco tumorais na linhagem SCC9, bem como pelo aumento das mesmas na linhagem DOK, seria a menor quantidade de PpIX induzida nessas células. Em estudo anterior,

constatamos essa redução nas células SCC9 resistentes à PDT (Rosin et al., 2017), mas não identificamos se essa redução estava presente nas células tronco tumorais. Nas células displásicas, não avaliamos se a quantidade de PpIX, por não ser o foco principal do presente trabalho. Em função dos resultados obtidos, julgamos essencial uma pesquisa mais abrangente acerca da PpIX nas células tronco tumorais, para melhor entendimento do mecanismo de resistência à PDT desenvolvido por essas células.

Como alguns estudos têm evidenciado que não são todas as células CD44<sup>+</sup> e ESA<sup>+</sup> isoladamente que exibem um fenótipo tronco, mas somente algumas frações “high” e “low” dessas proteínas, bem como a combinação delas, decidimos avaliar a co-expressão desses marcadores e suas diferentes frações. Detectamos que, tanto na linhagem SCC9 quanto na DOK, houve aumento significativo da subpopulação CD44<sup>high</sup>/ESA<sup>high</sup> na geração resistente à PDT. Essa subpopulação de células no CEO foi anteriormente descrita como sendo característica de células tronco tumorais epiteliais, com alto potencial de auto-renovação e pouco potencial de migração (Biddle et al., 2011; Biddle et al., 2016). Na linhagem SCC9 foi observado também um aumento da frequência de células CD44<sup>high</sup>/ESA<sup>low</sup> na geração resistente à PDT, apesar de essa subpopulação celular ser bastante reduzida em todos os grupos. Os mesmos estudos anteriores demonstraram que essas células exibem características de células tronco tumorais, com alto potencial de invasão, sendo associadas a metástases (Biddle et al., 2011, Biddle et al., 2016). Não detectamos esse potencial invasivo no ensaio de invasão provavelmente porque essa subpopulação celular era muito pequena, inclusive na geração resistente à PDT. Contudo, o modelo de indução de resistência à PDT adotado no presente estudo foi suficiente para comprovar a seleção dessa subpopulação após os tratamentos sucessivos.

O mesmo resultado não foi observado com a linhagem DOK, a qual não teve aumento da frequência de células CD44<sup>high</sup>/ESA<sup>low</sup> na geração resistente à PDT, exibindo menor seletividade para essa subpopulação celular em relação à SCC9. Nota-se, contudo, que na DOK a subpopulação CD44<sup>high</sup>/ESA<sup>low</sup> aumentou substancialmente no grupo PDT geração 1, com maior intensidade inclusive em relação à SCC9, o que corrobora com os achados encontrados para o potencial de invasão dessas células nesse grupo. Assim, pode-se dizer que a indução de resistência à PDT foi acompanhada de maior frequência de células CD44<sup>high</sup>/ESA<sup>high</sup>

em ambas as linhagens celulares, bem como de maior frequência de CD44<sup>high</sup>/ESA<sup>low</sup> na linhagem SCC9; um ciclo somente de PDT foi suficiente para selecionar a subpopulação CD44<sup>high</sup>/ESA<sup>low</sup> nas células displásicas sobreviventes ao tratamento. Esses resultados sugerem que a resistência à PDT pode estar atrelada ao aumento da população de células tronco tumorais.

Também avaliamos a expressão da proteína p75<sup>NTR</sup> combinada a CD44 e ESA. A p75<sup>NTR</sup> tem sido considerada um marcador de células indiferenciadas transitórias, presentes em momentos distintos da carcinogênese, e frequentemente ausente em CEOs bem diferenciados (Huang et al., 2009; Kiyosue et al., 2013).

De todos os marcadores de células tronco tumorais avaliados em CEO, é o menos conhecido, apesar de alguns estudos terem demonstrado ser um marcador prognóstico importante para o CEO (Li et al., 2012; Murillo-Sauca et al., 2014; Osman et al., 2015). Verificamos um aumento da subpopulação CD44<sup>high</sup>/p75<sup>NTR+</sup> nas células SCC9 expostas à PDT, o que corrobora os achados de que a PDT seleciona células tronco tumorais no CEO. Essa subpopulação foi descrita como tendo alta resistência ao estresse oxidativo induzido pelos tratamentos antineoplásicos convencionais (Murillo-Sauca et al., 2014), e parece que essa tendência também se aplica para a PDT. Não detectamos o mesmo efeito para a linhagem DOK, na qual o tratamento com PDT não acarretou aumento da população CD44<sup>high</sup>/p75<sup>NTR+</sup>. De fato, comparando com a linhagem SCC9, a DOK não foi tão sensível ao tratamento com PDT no tocante ao aumento da frequência de células p75<sup>NTR+</sup> dentro da subpopulação CD44<sup>high</sup>, apesar de exibir grande quantidade dessas células mesmo sem tratamento.

A análise ESA<sup>high</sup>/p75<sup>NTR+</sup> demonstrou que, em ambas as linhagens, houve redução dessas células após o tratamento da PDT. Não encontramos nenhum estudo que demonstrasse o papel dessa subpopulação no CEO. Somente em carcinoma epidermóide de esôfago as células ESA<sup>+</sup>/p75<sup>NTR+</sup> foram associadas a metástases a distância e embolização venosa, a partir da análise de células neoplásicas circulantes no sangue. Assim, pouco se conhece sobre o real papel dessa subpopulação no CEO. Provavelmente por serem pouco numerosas, e transitórias no processo de diferenciação das células epiteliais (Laimer et al., 2008; Huang et al., 2009; Dalley et al., 2013; Osman et al., 2015; Sen et al., 2016), o tratamento com PDT pode ter erradicado essa população do conjunto analisado.

Assim, os resultados do presente trabalho indicam que as células epiteliais displásicas orais desenvolvem resistência à PDT em intensidade menor que as células de CEO; nesse processo de resistência, ambos os tipos celulares adquirem maior potencial de formação de colônias. Tanto as células displásicas quanto as células neoplásicas resistentes à PDT exibiram maior frequência de células tronco tumorais. O risco de desenvolvimento de resistência tumoral à PDT mediada pelo 5-ALA, originando uma população rica de células tronco tumorais com potencial de invasão e resistência a outros tratamentos antineoplásicos, deve ser considerado ao se tratarem lesões displásicas orais e CEO que demandem múltiplos ciclos de PDT. Mais estudos são necessários para esclarecer o papel dessas células tronco tumorais em lesões displásicas e neoplásicas resistentes à PDT.



## 7 CONCLUSÕES

As células de displasia epitelial oral desenvolvem resistência à terapia fotodinâmica mediada pelo 5-ALA em intensidade menor à observada para células de carcinoma epidermóide oral.

A viabilidade celular das células displásicas aumentou após múltiplos ciclos de terapia fotodinâmica com dose de luz crescente, porém a taxa de aumento foi menor em relação à observada para as células de carcinoma epidermóide oral.

As células epiteliais displásicas e de carcinoma epidermóide oral resistentes à terapia fotodinâmica exibem maior potencial de formação de colônias e de invasão.

A co-expressão aumentada de CD44 e ESA nas células epiteliais displásicas e neoplásicas resistentes à terapia fotodinâmica sugere um aumento da população de células tronco tumorais.



**REFERÊNCIAS<sup>1</sup>**

AbdulMajeed A, Dalley A, Farah C. Putative cancer stem cell marker expression in oral epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 2013 Nov;42(10):755-60. doi:10.1111/jop.12073.

Agostinis P, Berg K, Cengel KA, et al. Photodynamic therapy of cancer an update. *CA Cancer J Clin*. 2011 Jul;61(4):250-81. doi:10.3322/caac.20114.

Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003 Apr;100(7):3983–8. doi:10.1073/pnas.0530291100.

Albers AE, Chao C, Koberlec B, et al. Stem cells in squamous head and neck cancer. *Crit. Rev. Oncol. Hematol*. 2012 Mar;81(3):224–40. doi:10.1016/j.critrevonc.2011.03.004.

Awadallah M, Idle M, Patel K, et al. Management update of potentially premalignant oral epithelial lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2018 Mar 23. pii: S2212-4403(18)30848-4. doi:10.1016/j.oooo.2018.03.010.

Bertrand G, Maalouf M, Boivin A, Battiston-Montagne P, Beuve M, Levy A, et al. Targeting head and neck cancer stem cells to overcome resistance to photon and carbon ion radiation. *Stem Cell Rev*. 2014 Feb;10(1):114-26. doi:10.1007/s12015-013-9467-y.

---

<sup>1</sup> De acordo com estilo Vancouver.

Bhajee F, Pepper D, Pitman K, et al. Cancer stem cells in head and neck squamous cell carcinoma: a review of current knowledge and future applications. *Head Neck*. 2012 Jun;34(6):894-9. doi:10.1002/hed.21801.

Bhattacharyya I, Chehal HK. White lesions. *Otolaryngol Clin N Am*. 2011 Feb;44(1):109-31. doi:10.1016/j.otc.2010.09.009.

Bhowmick R, Girotti A. Pro-survival and pro-growth effects of stress-induced nitric oxide in a prostate cancer photodynamic therapy model. *Cancer Lett*. 2014 Feb 1;343(1):115-22. doi:10.1016/j.canlet.2013.09.025.

Biddle A, Gammon L, Liang X, et al. Phenotypic plasticity determines cancer stem cell therapeutic resistance in oral squamous cell carcinoma. *EBioMedicine*. 2016 Jan 9;4:138-45. doi:10.1016/j.ebiom.2016.01.007.

Biddle A, Liang X, Gammon L, et al. Cancer stem cells in squamous cell carcinoma switch between two distinct phenotypes that are preferentially migratory or proliferative. *Cancer Res*. 2011 Aug 1;71(15):5317-26. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-1059.

Biddle A, Mackenzie IC. Cancer stem cells and EMT in carcinoma. *Cancer Metastasis Rev*. 2012 June;31:285-93. doi:10.1007/s10555-012-9345-0.

Biel M. Photodynamic therapy treatment of early oral and laryngeal cancers. *Photochem Photobiol*. 2007 Sep;83(5):1063-8. doi:10.1111/j.1751-1097.2007.00153.x.

Birkeland AC, Owen JH, Prince ME. Targeting Head and Neck Cancer Stem Cells: Current Advances and Future Challenges. *J Dent Res*. 2015 Nov;94(11):1516-23. Erratum in: *J Dent Res*. 2015 Jul;96(8):957. doi:10.1177/0022034517712234.

Bouquot JE, Speight PM, Farthing PM. Epithelial dysplasia of the oral mucosa- Diagnostic problems and prognostic features. *Curr Diagn Pathol*. 2006 Feb;12(1):11-21. doi:10.1016/j.cdip.2005.10.008.

Casas A, Di Venosa G, Hasan T, et al. Mechanisms of resistance to photodynamic therapy. *Curr Med Chem*. 2011;18(16):2486-515.

Casas A, Di Venosa G, Vanzulli S, et al. Decreased metastatic phenotype in cells resistant to aminolevulinic acid-photodynamic therapy. *Cancer Lett*. 2008 Nov;271(2):342-51. doi:10.1016/j.canlet.2008.06.023.

Casas A, Perotti C, Ortel B, et al. Tumor cell lines resistant to ALA-mediated photodynamic therapy and possible tools to target surviving cells. *Int J Oncol*. 2006 Aug;29(2):397-405. doi:10.3892/ijo.29.2.397.

Castano AP, Demidova TN, Hamblin MR. Mechanisms in photodynamic therapy: part one – photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagn Photodyn Ther*. 2004 Dec;1(4):279-93. doi:10.1016/S1572-1000(05)00030-X.

Castano AP, Mroz P, Hamblin MR. Photodynamic therapy and anti-tumor immunity. *Nat Rev Cancer*. 2006 Jul;6(7):535-45. doi:10.1038/nrc1894.

Cavalcante RS, Imasato H, Bagnato VS, Perussi JR. A combination of techniques to evaluate photodynamic efficiency of photosensitizers. *Laser Phys. Lett.* 2009 Aug;6(1):64-70. doi.org/10.1002/lapl.200810082.

Chang CW, Chen YS, Chou SH, et al. Distinct subpopulations of head and neck cancer cells with different levels of intracellular reactive oxygen species exhibit diverse stemness, proliferation, and chemosensitivity. *Cancer Res.* 2014 Nov 1;74(21):6291-305. doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-0626.

Chen H-M, Liu C-M, Yang H, et al. 5-aminolevulinic acid induce apoptosis via NF- $\kappa$ B/JNK pathway in human oral cancer Ca9-22 cells. *J Oral Pathol Med.* 2011 Jul;40(6):483-9. doi:10.1111/j.1600-0714.2010.00973.x.

Chen HM, Chen CT, Yang H. et al. Successful treatment of oral verrucous hyperplasia with topical 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy. *Oral Oncol.* 2004 Jul;40:630-37. doi:10.1016/j.oraloncology.2003.12.010.

Chen HM, Yu CH, Lin HP, et al. Successful treatment of an early invasive oral squamous cell carcinoma with topical 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy. *J Dent Sci.* 2010 Mar;5(1):36-40. doi:10.1016/S1991-7902(10)60006-2.

Chen HM, Yu CH, Tu PC, et al. Successful treatment of oral verrucous hyperplasia and oral leukoplakia with topical 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy. *Lasers Surg Med.* 2005 Aug;37(2):114-22. doi:10.1002/lsm.20214.

Chen YC, Chen YW, Hsu HS, et al. Aldehyde dehydrogenase 1 is a putative marker for cancer stem cells in head and neck squamous cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009 Jul;385(3):307-13-13. doi: 10.1016/j.bbrc.2009.05.048.

Chikamatsu K, Ishii H, Takahashi G, et al. Resistance to apoptosis-inducing stimuli in CD44+ head and neck squamous cell carcinoma cells. *Head Neck*. 2012 Mar;34(3):336-43. doi:10.1002/hed.21732.

Chopin V, Lagadec C, Toillon R, et al. Neurotrophin signaling in cancer stem cells. *Cell Mol Life Sci*. 2016 May;73(9):1859-70. doi:10.1007/s00018-016-2156-7.

Cichy J, Puré E. The liberation of CD44. *J Cell Biol*. 2003 Jun9;161(5):839-43. doi:10.1083/jcb.200302098.

Dalley A, AbdulMajeed A, Upton Z, et al. Organotypic culture of normal, dysplastic and squamous cell carcinoma-derived oral cell lines reveals loss of spatial regulation of CD44 and p75NTRin malignancy. *J Oral Pathol Med*. 2013 Jan;42(1):37-46. doi:10.1111/j.1600-0714.2012.01170.x.

de Oliveira KT, de Souza JM, Gobo NRS, de Assis FF, Brocksom TJ. Conceitos Fundamentais e Aplicações de Fotossensibilizadores do Tipo Porfirinas, Clorinas e Ftalocianinas em Terapias Fotônicas. *Rev. Virtual Quim*. 2015; 7(1): 310-335. doi: 10.5935/1984-6835.20150016.

de Visscher SA, Melchers LJ, Dijkstra PU, Karakullukcu B, Tan IB, Hopper C, et al. mTHPC-mediated photodynamic therapy of early stage oral squamous cell carcinoma: a comparison to surgical treatment. *Ann Surg Oncol*. 2013 Sep;20(9):3076-82. doi:10.1245/s10434-013-3006-6.

Di Venosa G, Perotti C, Batlle A, et al. The role of cytoskeleton and adhesion proteins in the resistance to photodynamic therapy. Possible therapeutic interventions. *Photochem Photobiol Sci*. 2015 Aug;14(8):1451-64. doi:10.1039/c4pp00445k.

El-Naggar A, Chan J, Grandis J, Takata T, Slootweg P. WHO classification of head and neck tumours. 4th edition. ed 2017.

Emich H, Chapiro D, Hutchison I, et al. The potential of CD44 as a diagnostic and prognostic tool in oral cancer. *J Oral Pathol Med.* 2015 Jul;44(6):393-400. doi:10.1111/jop.12308.

Fahey JM, Girotti AW. Accelerated migration and invasion of prostate cancer cells after a photodynamic therapy-like challenge: role of nitric oxide. *Nitric Oxide.* 2015 Sep 15;49:47-55. doi:10.1016/j.niox.2015.05.006.

Fan KF, Hopper C, Speight PM, et al. Photodynamic therapy using 5-aminolevulinic acid for premalignant and malignant lesions of the oral cavity. *Cancer.* 1996 Oct;78(7):1374-83. doi:10.1002/(SICI)1097-0142(19961001)78:7.

Farah CS, Woo S, Zain RB, et al. Oral cancer and oral potentially malignant disorders. *Int J Dent.* 2014;2014:853479. doi:10.1155/2014/853479.

Figueira JA, Veltrini VC. Photodynamic therapy in oral potentially malignant disorders-Critical literature review of existing protocols. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2017 Dec;20:125-29. doi:10.1016/j.pdpdt.2017.09.007.

Gemenetzidis E, Gammon L, Biddle A, et al. Invasive oral cancer stem cells display resistance to ionising radiation. *Oncotarget.* 2015;6(41):43964-77. doi:10.18632/oncotarget.6268.

Ghuwalewala S, Ghatak D, Das P, et al. CD44(high)CD24(low) molecular signature determines the cancer stem cell and EMT phenotype in oral squamous cell carcinoma. *Stem Cell Res.* 2016 Mar;16(2):405–417. doi:10.1016/j.scr.2016.02.028.

Gluckman J.L. Hematoporphyrin photodynamic therapy: Is there truly a future in head and neck oncology? Reflections on a 5-year experience. *Laryngoscope.* 1991; 101(1 Pt 1):36-42. doi:10.1288/00005537-199101000-00007.

Gondivkar SM, Gadbail AR, Choudhary MG, et al. Photodynamic treatment outcomes of potentially-malignant lesions and malignancies of the head and neck region: A systematic review. *J Investig Clin Dent.* 2017 Feb;9(1). doi:10.1111/jicd.12270.

Grant WE, Hopper C, Speight PM, et al. Photodynamic therapy of malignant and premalignant lesions in patients with ‘field cancerization’ of the oral cavity. *J Laryngol Otol* 1993;107(12):1140–5. doi:10.1017/S0022215100125496.

Green B, Cobb A, Hopper C. Photodynamic therapy in the management of lesions of the head and neck. *Br. J. Oral Maxillofacial Surg.* 2013;51(4):283–7. doi:10.1016/j.bjoms.2012.11.011.

Greenberg JS, El-Naggar AK, Mo V, et al. Disparity in pathologic and clinical lymph node staging in oral tongue carcinoma. Implication for therapeutic decision making. *Cancer.* 2003 Aug 1;98(3):508-15. doi:10.1002/cncr.11526.

Han G, Xu C, Yu D. Mechanisms correlated with chemotherapy resistance in tongue cancers. *J Cancer Res Ther.* 2018 Jan;14(1):1-5. doi:10.4103/jcrt.JCRT\_763\_17.

Herlyn D, Herlyn M, Steplewski Z, et al. Monoclonal antibodies in cell-mediated cytotoxicity against human melanoma and colorectal carcinoma. *Eur J Immunol* 1979 Aug;9(8):657–9. doi:10.1002/eji.1830090817.

Hombach-Klonisch S, Panigrahi S, Rashedi I, et al. Adult stem cells and their trans-differentiation potential—perspectives and therapeutic applications. *J Mol Med (Berl)*. 2008 Dec;86(12):1301-14. doi:10.1007/s00109-008-0383-6.

Horn D, Hess J, Freier K, et al. Targeting EGFR-PI3K-AKT-mTOR signaling enhances radiosensitivity in head and neck squamous cell carcinoma. *Expert Opin Ther Targets*. 2015 Jun;19(6):795-805. doi:10.1517/14728222.2015.1012157.

Huang CF, Xu XR, Wu TF, et al. Correlation of ALDH1, CD44, OCT4 and SOX2 in tongue squamous cell carcinoma and their association with disease progression and prognosis. *J Oral Pathol Med*. 2014 Aug;43(7):492-8. doi:10.1111/jop.12159.

Huang S-D, Yuan Y, Liu X-H, et al. Self-renewal and chemotherapy resistance of p75NTR positive cells in esophageal squamous cell carcinomas. *BMC Cancer*. 2009 Jan;9:9. doi:10.1186/1471-2407-9-9.

Hwang EY, Yu CH, Cheng SJ, et al. Decreased expression of EpCAM protein is significantly associated with the progression and prognosis of oral squamous cell carcinomas in Taiwan. *J Oral Pathol Med*. 2009 Jan;38(1):87-93. doi:10.1111/j.1600-0714.2008.00664.x.

Imrich S, Hachmeister M, Gires O. EpCAM and its potential role in tumor-initiating cells. *Cell Adh Migr*. 2012 Jan-Feb;6(1):30-8. doi:10.4161/cam.18953.

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2017: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. – Rio de Janeiro: INCA, 2016. 128 p.: il. color.

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. – Rio de Janeiro: INCA, 2017. 128 p.: il. color.

Iocca O, Farcomeni A, Di Rocco A, et al. Locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck: A systematic review and Bayesian network meta-analysis of the currently available treatment options. *Oral Oncol.* 2018 May;80:40-51. doi: 10.1016/j.oraloncology.2018.03.001.

Jang Y, Sharkis S. A low level of reactive oxygen species selects for primitive hematopoietic stem cells that may reside in the low-oxygenic niche. *Blood.* 2007;110(8):3056–3063. doi: 10.1182/blood-2007-05-087759

Jerjes W, Hamdoon Z, Hopper C. Photodynamic therapy in the management of potentially malignant and malignant oral disorders. *Head Neck Oncol.* 2012;4:16. doi:10.1186/1758-3284-4-16.

Jerjes W, Upile T, Hamdoon Z. Photodynamic therapy: the minimally invasive surgical intervention for advanced and/or recurrent tongue base carcinoma. *Lasers Surg Med.* 2011;43:283–92. doi:10.1002/lsm.21071.

Khawaja F, Tabassum A, Allen J, et al. The p75(NTR) tumor suppressor induces cell cycle arrest facilitating caspase mediated apoptosis in prostate tumor cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006 Mar;341(4):1184–92. doi:10.1016/j.bbrc.2006.01.073.

Kim J, Jung H, Lim W, et al. Down-regulation of heat-shock protein 27-induced resistance to photodynamic therapy in oral cancer cells. *J Oral Pathol Med.* 2013 Jan;42(1):9–16. doi:10.1111/j.1600-0714.2012.01155.x.

Kim J, Lim W, Kim S, et al. Photodynamic therapy (PDT) resistance by PARP1 regulation on PDT-induced apoptosis with autophagy in head and neck cancer cells. *J Oral Pathol Med.* 2014 Oct;43(9):675-84. doi:10.1111/jop.12195.

Kiyosue T, Kawano S, Matsubara R, et al. Immunohistochemical location of the p75 neurotrophin receptor (p75NTR) in oral leukoplakia and oral squamous cell carcinoma. *Int J Clin Oncol* 2013; 18(1):154–63. doi:10.1007/s10147-011-0358-4.

Kojima H, Okumura T, Yamaguchi T, et al. Enhanced cancer stem cell properties of a mitotically quiescent subpopulation of p75NTR-positive cells in esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Oncol.* 2017 Jul;51(1):49-62. doi:10.3892/ijo.2017.4001.

Krammer B, Plaetzer K. ALA and its impact, from bench to bedside. *Photochem Photobiol Sci.* 2008 Mar;7(3):283-9. doi:10.1039/b712847a.

Krishnamurthy S, Nör JE. Head and neck cancer stem cells. *J Dent Res.* 2012 Apr;91(4):334-40. doi:10.1177/0022034511423393.

Kulsum S, Sudheendra HV, Pandian R, et al. Cancer stem cell mediated acquired chemoresistance in head and neck cancer can be abrogated by aldehyde dehydrogenase 1 A1 inhibition. *Mol Carcinog.* 2017 Feb;56(2):694-71. doi:10.1002/mc.22526.

Kwiatkowski S, Knap B, Przystupski D, et al. Photodynamic therapy - mechanisms, photosensitizers and combinations. *Biomed Pharmacother.* 2018 Jul16; 106:1098-1107. doi: 10.1016/j.biopha.2018.07.049.

Laimer K, Fong D, Gastl G, et al. EpCAM expression in squamous cell carcinoma of the oral cavity: frequency and relationship to clinicopathologic features. *Oral Oncol.* 2008;44(1):72–7. doi:10.1016/j.oraloncology.2007.01.008.

Li X, Shen Y, Di B, et al. Biological and clinical significance of p75NTR expression in laryngeal squamous epithelia and laryngocarcinoma. *Acta Otolaryngol.* 2012 Mar;132(3):314- 24. doi:10.3109/00016489.2011.639086.

Lin Y-H, Huang Y-C, Chen L-H, et al. Autophagy in cancer stem/progenitor cells. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2015 May;75(5):879-86. doi:10.1007/s00280-014-2634-2.

Litvinov SV, Balzar M, Winter MJ, et al. Epithelial Cell Adhesion Molecule (Ep-CAM) Modulates Cell–Cell Interactions Mediated by Classic Cadherins. *J Cell Biol.* 1997 Dec 1;139(5):1337-48.

Maloth KN, Velpula N, Kodangal S, et al. Photodynamic therapy – a non-invasive treatment modality for precancerous lesions. *J Lasers Med Sci.* 2016 Winter;7(1):30-6. doi:10.15171/jlms.2016.07.

Mani SA, Guo W, Liao M-J, et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell.* 2008 May;133(4):704-715. doi:10.1016/j.cell.2008.03.027.

Marcato P, Dean CA, Giacomantonio CA, et al. Aldehyde dehydrogenase its role as a cancer stem cell marker comes down to the specific isoform. *Cell Cycle*. 2011;10:1378–84. doi: 10.4161/cc.10.9.15486.

Martorell-Calatayud A, Botella-Estrada R, Bagán-Sebastián JV, et al. Oral leukoplakia: clinical, histopathologic, and molecular features and therapeutic approach. *Actas Dermosifiliogr*. 2009 Oct;100(8):669–84. doi:10.1016/S0001-7310(09)72280-X.

Meiller TF, Garber K, Scheper M. A review of common oral pathology lesions, with a focus on periodontology and implantology. *J Evid Based Dent Pract*. 2012;12(3 Suppl):254-62. doi:10.1016/S1532-3382(12)70049-0.

Mery B, Rancoule C, Guy JB, et al. [Cancer stem cells: Radiotherapeutic features and therapeutic targets]. *Bull Cancer*. 2016 Jan;103(1):48–54. doi: 10.1016/j.bulcan.2015.10.018.French.

Milla LN, Cogno IS, Rodríguez ME, et al. Isolation and characterization of squamous carcinoma cells resistant to photodynamic therapy. *J Cell Biochem*. 2011 Sep;112(9):2266-78. doi:10.1002/jcb.23145.

Mohanta S, Siddappa G, Valiyaveedan SG, et al. Cancer stem cell markers in patterning differentiation and in prognosis of oral squamous cell carcinoma. *Tumor Biol*. 2017 Jun;39(6): 1010428317703656. doi:10.1177/1010428317703656.

Monroe, M, Anderson E, Clayburgh D, Wong M. Cancer stem cells in head and neck squamous cell carcinoma. *J Oncol*. 2011;2011:762780. doi:10.1155/2011/762780.

Münz M, Kieu C, Mack B, Schmitt B, Zeidler R, Gires O. The carcinoma-associated antigen EpCAM upregulate sc-myc and induces cell proliferation. *Oncogene*. 2009 Jul 29;23(34):5748-5758. doi: 10.1038/sj.onc.1207610.

Murillo-Sauca O, Chung MK, Shin JH, et al. CD271 is a functional and targetable marker of tumor-initiating cells in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget*. 2014 Aug;5(16):6854-66. doi:10.18632/oncotarget.2269.

Nakamura T, Endo K, Kinoshita S. Identification of human oral keratinocyte stem/progenitor cells by neurotrophin receptor p75 and the role of neurotrophin/p75 signaling. *Stem Cells*. 2007 Mar;25(3):628-38. doi:10.1634/stemcells.2006-0494.

Nör C, Zhang Z, Warner KA, et al. Cisplatin induces Bmi-1 and enhances the stem cell fraction in head and neck cancer. *Neoplasia*. 2014 Feb;16(2):137-46. doi: 10.1593/neo.131744.

Okamoto A, Chikamatsu K, Sakakura K, et al. Expansion and characterization of cancer stem-like cells in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oral Oncol*. 2009;45:633–9. doi: 10.1016/j.oraloncology.2008.10.003.

Okumura T, Tsunoda S, Mori Y, et al. The biological role of the low-affinity p75 neurotrophin receptor in esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2006 Sep;12(17):5096–103. doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-2852.

Osman TA, Parajuli H, Sapkota D, et al. The low-affinity nerve growth factor receptor p75NTR identifies a transient stem cell-like state in oral squamous cell carcinoma cells. *J Oral Pathol Med*. 2015 Jul;44(6):410-9. doi:10.1111/jop.12251.

Patel SS, Shah KA, Shah MJ, et al. Cancer stem cells and stemness markers in oral squamous cell carcinomas. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014;15(20):8549–56.

Prince ME, Sivanandan R, Kaczorowski A, et al. Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(3):973-8. doi:10.1073/pnas.0610117104.

Qian X, Ma C, Nie X, et al. Biology and immunology of cancer stem(-like) cells in head and neck cancer. *Critical Reviews in Oncology and Hematology*. 2015 Sep;95(3):337-45. doi:10.1016/j.critrevonc.2015.03.009.

Reya T, Morrison S, Clarke M, et al. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*. 2001;414(6859):105–111. doi:10.1038/35102167.

Rosin FCP, Teixeira MG, Pelissari C, Corrêa L. Resistance of oral cancer cells to 5-ALA-mediated photodynamic therapy. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2017;119:3554–3562. doi:10.1002/jcb.26541.

Sayed SI, Dwivedi RC, Katna R, et al. Implications of understanding cancer stem cell (CSC) biology in head and neck squamous cell cancer. *Oral Oncology*. 2011 Apr;47(4):237–43. doi:10.1016/j.oraloncology.2011.02.009.

Schneider C, Rasband W, Eliceiri K. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*. 2012 Jul;9(7):671-5.

Schnell U, Cirulli V, Giepmans BN. EpCAM: structure and function in health and disease. *Biochim Biophys Acta*. 2013 Aug;1828(8):1989–2001. doi: 10.1016/j.bbamem.2013.04.018.

Selbo P, Bostad M, Olsen C, et al. Photochemical internalisation, a minimally invasive strategy for light-controlled endosomal escape of cancer stem cell-targeting therapeutics. *Photochem Photobiol Sci*. 2015;14:1433–50. doi:10.1039/C5PP00027K.

Sen S, Carnelio S. Expression of epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) in oral squamous cell carcinoma. *Histopathology*. 2016 May;68(6):897-904. doi:10.1111/his.12870.

Shiah SG, Chang LC, Tai KY, et al. The involvement of promoter methylation and DNA methyltransferase-1 in the regulation of EpCAM expression in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*. 2009 Jan;45(1):e1-8. doi:10.1016/j.oraloncology.2008.03.003.

Shigeishi H, Biddle A, Gammon L, et al. Elevation in 5-FU-induced apoptosis in head and neck cancer stem cells by a combination of CDHP and GSK3 $\beta$  inhibitors. *J Oral Pathol Med*. 2015 Mar;44(3):201–7. doi: 10.1111/jop.12230.

Singh G, Espiritu M, Shen XY, et al. In vitro induction of PDT resistance in HT29, HT1376 and SK-N-MC cells by various photosensitizers. *Photochem Photobiol*. 2001 Jun;73(6):651-6. doi:10.1562/0031-8655(2001)0730651IVIOPR2.0.CO2.

Skeldal S, Matusica D, Nykjaer A, et al. Proteolytic processing of the p75 neurotrophin receptor: A prerequisite for signalling?: Neuronal life, growth and death signalling are crucially regulated by intra-membrane proteolysis and trafficking of p75(NTR). *Bioessays*. 2011;33(8):614–25. doi:10.1002/bies.201100036.

Soland TM, Brusevold IJ, Koppang HS, et al. Nerve growth factor receptor (p75 NTR) and pattern of invasion predict poor prognosis in oral squamous cell carcinoma. *Histopathology*. 2008 Jul;53(1):62–72. doi:10.1111/j.1365-2559.2008.03063.x.

Speight PM, Khurram SA, Kujan O. Oral potentially malignant disorders: risk of progression to malignancy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2017 Dec; pii: S2212-4403(17)31248-8. doi:10.1016/j.oooo.2017.12.011.

Sperandio FF. Análise da expressão e mecanismos de ação das proteínas Akt, Hsp90, mTOR e ciclina D1 em cultura de células de carcinoma epidermóide humano e células displásicas após irradiação com laser em baixa intensidade [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2012.

Tabassum A, Khwaja F, Djakiew D. The p75(NTR) tumor suppressor induces caspase-mediated apoptosis in bladder tumor cells. *Int J Cancer*. 2003 May;105(1):47–52. doi: 10.1002/ijc.11038.

Thapa R, Wilson GD. The importance of CD44 as a stem cell biomarker and therapeutic target in cancer. *Stem Cells Int*. 2016;2016:2087204. doi: 10.1155/2016/2087204.

Tomellini E, Lagadec C, Polakowska R, et al. Role of p75 neurotrophin receptor in stem cell biology: more than just a marker. *Cell Mol Life Sci*. 2014 Jul;71(13):2467-81. doi: 10.1007/s00018-014- 1564-9.

Tsai JC, Chiang CP, Chen HM, et al. Photodynamic therapy of oral dysplasia with topical 5-aminolevulinic acid and light-emitting diode array. *Lasers Surg Med*. 2004;34(1):18-24. doi:10.1002/lsm.10250.

van der Waal I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; terminology, classification and present concepts of management. *Oral Oncol.* 2009;45(4-5):317–323. doi:10.1016/j.oraloncology.2008.05.016.

Vohra F, Al-Kheraif A, Qadri T, et al. Efficacy of photodynamic therapy in the management of oral premalignant lesions. A systematic review. *Photodiagn Photodyn Ther.* 2015 Mar;12(1):150–9. doi:10.1016/j.pdpdt.2014.10.001.

Walden MJ, AYGUN N. Head and neck cancer. *Semin Roentgenol.* 2013;48:75–86. doi:10.1053/j.ro.2012.09.002.

Wang W, Tabu K, Hagiya Y, et al. Enhancement of 5-aminolevulinic acid-based fluorescence detection of side population-defined glioma stem cells by iron chelation. *Sci Rep.* 2017;7:42070. doi:10.1038/srep42070.

Wang X, Zhu Y, Ma Y, et al. The role of cancer stem cells in cancer metastasis: New perspective and progress. *Cancer Epidemiol.* 2013;37:60–3. doi:10.1016/j.canep.2012.07.007.

Warnakulasuriya S, Johnson NW, van der Waal I. Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. *J Oral Pathol Med.* 2007;36(10):575–80. doi:10.1111/j.1600-0714.2007.00582.x.

Warnakulasuriya S. Clinical features and presentation of oral potentially malignant disorders. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2018 Apr;pii: S2212-4403(18)30854-X. doi:10.1016/j.oooo.2018.03.011.

Wei M-F, Chen M-W, Chen K-C, et al. Autophagy promotes resistance to photodynamic therapy-induced apoptosis selectively in colorectal cancer stem-like cells. *Autophagy*. 2014;10(7):1179-92. doi:10.4161/auto.28679.

Wong SJ, Campbell B, Massey B, et al. A phase I trial of aminolevulinic acid-photodynamic therapy for treatment of oral leukoplakia. *Oral Oncol*. 2013;49(9):970-6. doi:10.1016/j.oraloncology.2013.05.011.

Woo SB. *Atlas de patologia oral*. Rio de Janeiro: Elsevier; 2013.

Yamaguchi T, Okumura T, Hirano K, et al. p75 neurotrophin receptor expression is a characteristic of the mitotically quiescent cancer stem cell population present in esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Oncol*. 2016a May;48(5):1943–54. doi:10.3892/ijo.2016.3432.

Yamaguchi T, Okumura T, Hirano K, et al. Detection of circulating tumor cells by p75NTR expression in patients with esophageal cancer. *World J Surg Oncol*. 2016b Feb;14(1):40. doi:10.1186/s12957-016-0793-9.

Yamamoto VN, Thylur DS, Bauschard M, et al. Overcoming radioresistance in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*. 2016 Dec;63:44-51. doi:10.1016/j.oraloncology.2016.11.002.

Yamamoto M, Fujita H, Katase N, et al. Improvement of the efficacy of 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic treatment in human oral squamous cell carcinoma HSC-4. *Acta Med Okayama*. 2013;67(3):153-64.

Yanamoto S, Kawasaki G, Yoshitomi I, et al. Clinicopathologic significance of EpCAM expression in squamous cell carcinoma of the tongue and its possibility as a potential target for tongue cancer gene therapy. *Oral Oncol.* 2007 Oct;43(9):869–77. doi:10.1016/j.oraloncology.2006.10.010.

Yu C-H, Yu C-C. Photodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid (ALA) impairs tumor initiating and chemo-resistance property in head and neck cancer-derived cancer stem Ccells. *Plos One* 2014 Jan;9(1):e87129. doi:10.1371/journal.pone.0087129.

Zamarrón A, Lucena SR, Salazar N, et al. Isolation and characterization of PDT-resistant cancer cells. *Photochem Photobiol Sci.* 2015;14:1378–89. doi:10.1039/C4PP00448E.

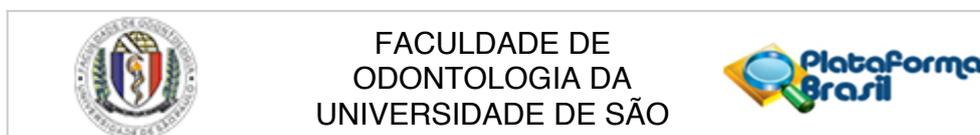
Zhang J, Chengshi J, Longo JPF, et al. An updated overview on the development of new photosensitizers for anticancer photodynamic therapy. *Acta Pharm Sin B.* 2018 Mar; 8(2):137-146. doi: 10.1016/j.apsb.2017.09.003.

Zhang Z, Filho MSA, Nör JE. The biology of head and neck cancer stem cells. *Oral Oncol.* 2012;48(1):1-9. doi:10.1016/j.oraloncology.2011.10.004.



## ANEXOS

### ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa (Seres Humanos)



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DA EMENDA

**Título da Pesquisa:** Terapia fotodinâmica e células-tronco presentes em linhagens celulares de carcinoma epidermóide e queratinócitos orais displásicos.

**Pesquisador:** Luciana Corrêa

**Área Temática:**

**Versão:** 3

**CAAE:** 46362815.7.0000.0075

**Instituição Proponente:** Universidade de São Paulo

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.730.935

##### Apresentação do Projeto:

A emenda apresentada se refere ao acréscimo da linhagem celular FADU e DOK à pesquisa, exclusão da parte experimental in vivo e troca do ensaio laboratorial de Western Blot pelo ensaio de Citometria de Fluxo. Como já dito em parecer anterior o estudo irá utilizar linhagens celulares comerciais.

##### Objetivo da Pesquisa:

O objetivo primário é verificar o efeito de dose subletal de PDT em linhagens comerciais de carcinoma humano.

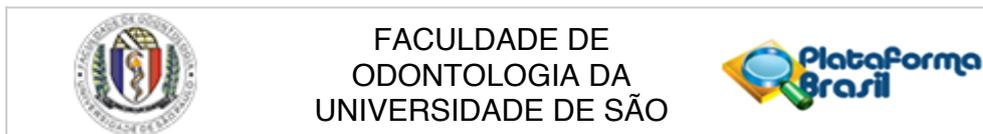
##### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não há riscos ou benefícios diretos aos participantes porque não há participantes. Existe risco mínimo aos pesquisadores desde que as medidas de biossegurança sejam seguidas. O estudo envolve o uso de células tumorais comerciais. A pesquisa pode trazer benefícios ao conhecimento do mecanismo de resistência tumoral e quanto ao contexto do uso da terapia fotodinâmica e seus efeitos em células tronco de carcinoma de boca

##### Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A alterações constantes desta emenda foram inseridas de forma adequada no projeto detalhado e no formulário de informações básicas do projeto na plataforma Brasil.

**Endereço:** Av Prof Lineu Prestes 2227  
**Bairro:** Cidade Universitária **CEP:** 05.508-900  
**UF:** SP **Município:** SAO PAULO  
**Telefone:** (11)3091-7960 **Fax:** (11)3091-7814 **E-mail:** cepfo@usp.br



Continuação do Parecer: 1.730.935

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Não há necessidade a apresentação de TCLE pois o projeto pretende utilizar linhagem de células comerciais.

**Recomendações:**

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP-FOUSP relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final, utilizando-se da opção "Enviar Notificação" (descrita no Manual "Submeter Notificação", disponível na Central de Suporte - canto superior direito do site [www.saude.gov.br/plataformabrasil](http://www.saude.gov.br/plataformabrasil)).

Qualquer alteração no projeto original deve ser apresentada "emenda" a este CEP, de forma objetiva e com justificativas para nova apreciação.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Não há pendências o projeto e a emenda agora apresentada estão adequados do ponto de vista ético.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_748635 E1.pdf	11/08/2016 08:32:09		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_doutorado_marina.docx	11/08/2016 08:28:59	Marina Gabriela Teixeira	Aceito
Folha de Rosto	Folhaderosto.pdf	11/08/2016 08:26:08	Marina Gabriela Teixeira	Aceito
Outros	AutorizaçãoLabExperimental.pdf	16/06/2015 16:13:11		Aceito
Outros	AutorizaçãoLabTron.pdf	16/06/2015 16:12:37		Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Endereço:** Av Prof Lineu Prestes 2227  
**Bairro:** Cidade Universitária **CEP:** 05.508-900  
**UF:** SP **Município:** SAO PAULO  
**Telefone:** (11)3091-7960 **Fax:** (11)3091-7814 **E-mail:** cepfo@usp.br



FACULDADE DE  
ODONTOLOGIA DA  
UNIVERSIDADE DE SÃO



Continuação do Parecer: 1.730.935

SAO PAULO, 16 de Setembro de 2016

---

**Assinado por:**  
**Maria Gabriela Hays Biazevic**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** Av Prof Lineu Prestes 2227  
**Bairro:** Cidade Universitária **CEP:** 05.508-900  
**UF:** SP **Município:** SAO PAULO  
**Telefone:** (11)3091-7960 **Fax:** (11)3091-7814 **E-mail:** cepfo@usp.br