FELIPE FORNIAS SPERANDIO

Análise da expressão e mecanismos de ação das proteínas Akt, Hsp90, mTOR e ciclina D1 em cultura de células de carcinoma epidermoide humano e células displásicas após irradiação com laser em baixa intensidade

São Paulo

2012

FELIPE FORNIAS SPERANDIO

Análise da expressão e mecanismos de ação das proteínas Akt, Hsp90, mTOR e ciclina D1 em cultura de células de carcinoma epidermoide humano e células displásicas após irradiação com laser em baixa intensidade

Versão Original

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia

Área de Concentração: Patologia Bucal

Orientadora: Profa. Dra. Suzana C.O.M. de Sousa

São Paulo

2012

Sperandio FF. Análise da expressão e mecanismos de ação das proteínas Akt, Hsp90, mTOR e ciclina D1 em cultura de células de carcinoma epidermoide humano e células displásicas após irradiação com laser em baixa intensidade. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Odontologia.

Aprovado em: __/__/2012

Banca Examinadora

Prof(a)Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a)Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a)Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a)Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a)Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

A Deus.

A minha mãe, Roseli. Qualquer conquista minha é, e sempre será, sua em primeiro lugar. Por isso, dedico esta tese a você e a todas as dificuldades que superou para que um dia eu chegasse aqui.

A Michelle, minha doce esposa, eterna namorada e verdadeira companheira. Sinto que qualquer vitória torna-se possível quando estou ao seu lado e, por sua causa, todos os momentos difíceis têm um final feliz.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Agradeço a minha orientadora, Profa. Dra. Suzana Cantanhede Orsini Machado de Sousa, por tanto ter me ajudado nesta longa jornada que vem acontecendo desde minha iniciação científica. Obrigado por ter me possibilitado trabalhar nesta área e desenvolver meus projetos. Admiro muito sua inteligência e agradeço por ser uma pessoa tão acessível, colaboradora e justa.

Agradeço ao Prof. Michael R. Hamblin, coorientador de meu projeto de Doutorado-sanduíche. A experiência que adquiri enquanto trabalhei em seu laboratório foi tremenda. Obrigado por ter sido tão gentil e por ter contribuído tanto para minha vida acadêmica.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família: meu pai Walter, por todo o carinho e presença marcantes na minha vida pessoal e profissional, minha avó Elza, minha tia Quíria e meu tio Paulinho, aos quais não há palavras para descrever o quanto sou grato por tudo, absolutamente. Agradeço também ao meu tio Walter pelos mesmos motivos e por nossas horas dedicadas ao kart, que certamente me ajudaram a espairecer.

A minha tia Maria e Olguinha, por toda a torcida e apoio em todas as fases de minha vida.

Ao meu irmão Evandro, à Milena e ao meu sobrinho, Pedrinho, que encheu nossas vidas de alegria.

Ao João Batista e à Sonia, meus sogros, por terem me recebido carinhosamente em sua família e por terem sempre torcido pelo meu sucesso.

Ao meu amigo Pedro, e às tantas risadas e aventuras que renderam nossa amizade.

Ao Prof. Dr. Décio dos Santos Pinto Júnior, por suas grandes ideias. Obrigado por todo o conhecimento que compartilhou comigo.

À Profa. Dra. Luciana Corrêa, pesquisadora exemplar de capacidade ímpar, cujas opiniões foram essenciais ao desenvolvimento de minha pós-graduação.

Agradeço às Profas. Dras. Ana Cecília Correa Aranha, Alyne Simões Gonçalves e Patrícia Moreira de Freitas, excelentes profissionais com quem tive o prazer de trabalhar.

Aos professores da disciplina de Patologia Bucal desta Faculdade, Marina Helena Cury Gallottini de Magalhães, Fábio Daumas Nunes, Marília Trierveiler

Martins, Karem Lopez Ortega e Andréa Mantesso agradeço por tudo o que me ensinaram.

A minha grande amiga, Fernanda Salgueiredo Giudice, pessoa tão dedicada, corajosa e persistente. Não tenho como lhe agradecer devidamente por tudo que produzimos com nossa parceria; esta tese, em particular, tem seu toque desde o esboço do projeto até as conclusões finais. Valeu, Fê!

Aos meus queridos amigos Anely e Marcelo (Cello), hoje colegas de pós-graduação, e as minhas queridas amigas Luciana Sassa Marocchio e Maria Fátima Guarizo Klingbeil (seu bom humor é animador, não importa a situação). Muito obrigado a todos pelos momentos de alegria e descontração.

To my dear colleagues at Mass Gen/ Harvard Med: Sulbha K. Sharma, Ying-Ying Huang, Masayoshi Kawakubo, Daniela Vecchio, Maria Garcia-Diaz, Liyi Huang, Suhasini Nayka, Tyler G. St. Denis, Hoon Chung, Tianhong Dai, Weijun Xuan, Nivaldo Antonio Parizotto e Caetano Sabino. Thanks for the commitment, for the laughs and, most of all, thanks for teaching me what science is all about.

Aos funcionários da Disciplina de Patologia Bucal desta Faculdade, Zilda Natalina Ramos Alves, Neia Barbosa dos Santos, Nair Maria Pereira, Elisa dos Santos, Beatriz Costa, Adriana Fraga Costa Paris e Juvani Lago Saturno deixo os meus sinceros agradecimentos.

A todos os meus colegas de pós-graduação com quem convivi desde a iniciação científica até o doutorado.

Por fim, agradeço à FAPESP por ter financiado este projeto com minha bolsa de doutorado e também por meio de auxílio-pesquisa. Agradeço também à CAPES pela bolsa de doutorado-sanduíche a mim concedida.

RESUMO

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

O carcinoma de cabeça e pescoço é uma neoplasia maligna de origem epitelial que resulta em aproximadamente 500.000 novos casos por ano ao redor do mundo. Diversos estudos têm sido conduzidos de maneira a elucidar os mecanismos de proliferação e invasão desta doença, sendo a via de sinalização Akt/mTOR e proteínas relacionadas, apontada como uma das principais vias envolvidas em sua progressão. Sabe-se que células neoplásicas, bem como células de diferentes tecidos, podem ter seu comportamento modificado após terem sido irradiadas com laser em baixa intensidade (LLLT). Porém, os mecanismos de atuação da luz laser de baixa potência sobre estas células permanecem ainda não completamente esclarecidos. Portanto, o objetivo deste estudo foi o de analisar a viabilidade celular e expressão das proteínas Akt, pAkt, Hsp90, S6, pS6 e Ciclina D1 em duas linhagens celulares de carcinoma de boca (SCC9 e SCC25), bem como em uma linhagem de queratinócitos orais humanos com displasia (DOK) após irradiação com laser em baixa intensidade. O laser utilizado foi um diodo semiconductor de arseneto de Gálio e Alumínio (GaAlAs) operando nos comprimentos de onda vermelho (660nm) e infravermelho (780nm), com potência fixa em 40mW e três densidades de energia para cada comprimento de onda disponível: 2.05J/cm², 3.07J/cm² e 6.15J/cm². A análise de apoptose foi realizada por meio do teste de TUNEL e a expressão proteica foi obtida com imunofluorescência e western blotting. Após análise estatística por meio do método ANOVA dois critérios e testes de Tukey ou teste T de estudante, todos com nível de significância de 5%, pôde-se concluir que a LLLT induziu comportamentos distintos em cada uma das linhagens celulares utilizadas. Foi notado aumento, bem como diminuição da viabilidade celular, dependendo do comprimento de onda utilizado e das células irradiadas. A densidade de energia de 2.05J/cm² foi a que produziu efeitos mais significativos em SCC9.

Para a linhagem celular SCC25, a dose mais relevante foi a de 3.07J/cm², enquanto que para a linhagem DOK, a dose de 6.15J/cm² causou efeitos mais proeminentes. Estas respectivas doses foram escolhidas para cada uma das linhagens para dar continuidade aos experimentos de Western Blotting e Imunofluorescência. Dentre os resultados mais relevantes obtidos com estas técnicas, pode-se citar a variação dos níveis de pS6 e Ciclina D1 para a linhagem DOK em determinados períodos. Já a linhagem SCC9 apresentou variação dos níveis de pAkt e Ciclina D1 nos períodos estudados. A linhagem SCC25 também teve as expressões de pAkt, pS6 e Ciclina D1 modificadas por LLLT. De maneira interessante, o aparecimento ou manutenção de uma isoforma de Hsp90 foi encontrado em SCC9 e SCC25 após irradiação laser. Por fim, a indução de apoptose foi detectada na linhagem SCC25. Em conclusão, pode-se dizer que a LLLT, como empregada neste estudo, foi capaz de aumentar a expressão de proteínas relacionadas à progressão e invasão em todas as linhagens estudadas. Além disso, a irradiação laser foi única, apesar de ter causado efeitos prolongados, algumas vezes até o último período estudado.

Palavras-chave: Laser de baixa potência. Carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço. Células displásicas. Via de sinalização Akt/mTOR.

ABSTRACT

Sperandio FF. The expression and action mechanisms of Akt, Hsp90, mTOR and cyclin D1 proteins in cultured cells of squamous cell carcinoma and dysplastic cells after being irradiated with low level laser therapy [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2012. Versão Original.

Head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) is an epithelial malignant neoplasm that accounts for approximately 500.000 new cases yearly around the world. Several studies have been conducted to elucidate the mechanisms of proliferation and invasion of this lesion, whereas the Akt/mTOR signaling pathway with its related proteins is being pointed out as one of the main pathways involved in HNSCC's progression. Neoplastic cells, as well as cells that originate from different tissues may have their behavior modified by low level laser therapy (LLLT); however, the mechanisms through which the low level laser light interacts with these cells remain poorly understood. Thus, this study sought to evaluate the cell viability and the expression levels of Akt, pAkt, Hsp90, S6, pS6 and Cyclin D1 proteins in two oral squamous cell carcinoma cell lineages (SCC9 and SCC25) and in one oral dysplastic human keratinocyte cell line (DOK) after they had been treated with LLLT. The laser device was a semiconductor diode of Gallium and Aluminum Arsenate (GaAlAs), operating with wavelengths of 660nm (red) and 780nm (infrared), with a fixed power of 40mW and giving three different energy densities: 2.05J/cm², 3.07J/cm² and 6.15J/cm². Apoptosis was analyzed through TUNEL test and the protein expression was accessed with Immunofluorescence and Western blotting. After statistical analysis through two-way ANOVA and Tukey or Student's T test, all of them with a level of significance of 5%, it was concluded that LLLT induced distinct behaviors to each of the studied cell lines. Increases and inhibitions in cell viabilities were detected depending on the wavelength and also on the irradiated cell line. The energy density of 2.05J/cm² produced the most significant findings over SCC9. On the other hand, in SCC25 the most relevant results were detected with 3.07J/cm², while the most prominent findings were seen with 6.15J/cm² when the cell line DOK was evaluated. In that way, these respective doses were chosen for each cell line to continue with Western blotting and Immunofluorescence. Among the most relevant

findings, the variation of pS6 and Cyclin D1 levels can be cited for DOK in some evaluated periods. SCC9 presented both pAkt and Cyclin D1 variations in the studied periods. Besides that, SCC25 also had pAkt, pS6 and Cyclin D1 levels modified by LLLT. Interestingly, the appearance and maintenance of an Hsp90 isoform was found in SCC9 and SCC25 after laser irradiation. Moreover, the induction of apoptosis was detected for the SCC25 cell line. Finally, the LLLT employed herein was able to enhance the expression of proteins related to progression and invasion in all of the studied cell lines. In addition, there was a single laser irradiation, although it caused prolonged effects, sometimes through the latest evaluated period.

Keywords: Low level laser. Head and neck squamous cell carcinoma. Dysplastic cells. Akt/mTOR signaling pathway.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 2.1	Via de sinalização Akt.....	25
Figura 2.2	Via de sinalização mTOR	30
Figura 2.3	Domínios funcionais e os seis sítios de fosforilação presentes em RSKs.....	31
Figura 2.4	Regulagem de tradução protéica por p70S6K e eIF-4E	33
Figura 2.5	Ativação de S6K via Akt/mTOR e via PDK1, independente da ativação de Akt, além de inativação de TSC2 por pAkt.....	34
Figura 4.1	Aparelho laser utilizado.....	43
Figura 4.2	Placa de 96 poços na cor preta, útil para evitar o espalhamento da luz laser dentre os grupos experimentais	44
Figura 4.3	Dispositivo metálico confeccionado para acomodar as placas de 96 poços	45
Figura 4.4	Dispositivo metálico e placa de 80.5mm com adesivo-guia durante irradiação laser	46
Figura 4.5	Placa de 12 poços com adesivo-guia aplicado ao fundo.....	50
Figura 5.1	Valores médios de absorbância e seus respectivos desvios para a linhagem SCC9 – Comprimento de onda 660nm	53
Figura 5.2	Valores médios de absorbância e seus respectivos desvios para a linhagem SCC9 – Comprimento de onda 780nm	54
Figura 5.3	Valores médios de absorbância e seus respectivos desvios para a linhagem SCC25 – Comprimento de onda 660nm	54

Figura 5.4	Valores médios de absorvância e seus respectivos desvios para a linhagem SCC25 – Comprimento de onda 780nm 55
Figura 5.5	Valores médios de absorvância e seus respectivos desvios para a linhagem DOK – Comprimento de onda 660nm 55
Figura 5.6	Valores médios de absorvância e seus respectivos desvios para a linhagem DOK – Comprimento de onda 780nm 56
Figura 5.7	Western Blotting das linhagens celulares DOK, SCC9 e SCC25 em cada tempo experimental (Ctrl= Controle; V=Comprimento de Onda Vermelho; IV= Comprimento de Onda Infravermelho..... 61
Figura 5.8	Imagens da reação de imunofluorescência para as diversas proteínas estudadas na linhagem DOK – Grupos Controle (Ctrl), Vermelho (V) e Infravermelho (IV) no período de 12 horas – Aumento 400X 63
Figura 5.9	Imagens da reação de imunofluorescência para as diversas proteínas estudadas na linhagem DOK – Grupos Controle (Ctrl), Vermelho (V) e Infravermelho (IV) no período de 48 horas – Aumento 400X 63
Figura 5.10	Imagens da reação de imunofluorescência para as diversas proteínas estudadas na linhagem DOK – Grupos Controle (Ctrl), Vermelho (V) e Infravermelho (IV) no período de 72 horas – Aumento 400X 64
Figura 5.11	Imagens da reação de imunofluorescência para as diversas proteínas estudadas na linhagem SCC9 – Grupos Controle (Ctrl), Vermelho (V) e Infravermelho (IV) no período de 12 horas – Aumento 400X 64
Figura 5.12	Imagens da reação de imunofluorescência para as diversas proteínas estudadas na linhagem SCC9 – Grupos Controle (Ctrl), Vermelho (V) e Infravermelho (IV) no período de 24 horas – Aumento 400X 65
Figura 5.13	Imagens da reação de imunofluorescência para as diversas proteínas estudadas na linhagem SCC9 – Grupos Controle

	(Ctrl), Vermelho (V) e Infravermelho (IV) no período de 72 horas – Aumento 400X	65
Figura 5.14	Imagens da reação de imunofluorescência para as diversas proteínas estudadas na linhagem SCC25 – Grupos Controle (Ctrl), Vermelho (V) e Infravermelho (IV) no período de 12 horas – Aumento 400X	66
Figura 5.15	Imagens da reação de imunofluorescência para as diversas proteínas estudadas na linhagem SCC25 – Grupos Controle (Ctrl), Vermelho (V) e Infravermelho (IV) no período de 48 horas – Aumento 400X	66
Figura 5.16	Imagens da reação de imunofluorescência para as diversas proteínas estudadas na linhagem SCC25 – Grupos Controle (Ctrl), Vermelho (V) e Infravermelho (IV) no período de 72 horas – Aumento 400X	67
Figura 5.17	Células em apoptose da linhagem SCC9 detectadas por meio do método de TUNEL: A – Controle em 72 horas (200X); B – Controle positivo em 72 horas (200X); C – 2.05 J/cm ² (V) em 72 horas (200X); D – 6.15 J/cm ² (IV) em 72 horas (200X)	69
Figura 5.18	Células em apoptose da linhagem SCC25 detectadas por meio do método de TUNEL: A – Controle em 48 horas (200X); B – Controle em 72 horas (200X); C – Controle positivo em 72 horas (200X); D – 6.15 J/cm ² (IV) em 48 horas (200X); E – 3.07 J/cm ² (IV) em 72 horas (200X); F – 3.07 J/cm ² (V) em 72 horas (200X)	69
Figura 5.19	Porcentagem de células em apoptose para cada um dos grupos estudados por meio do método de TUNEL. *p<0.01; **p<0.001 em relação a seus respectivos grupos controle.....	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1	Estimativas para o ano de 2012 das taxas brutas de incidência por 100 mil habitantes e de número de casos novos por câncer, segundo sexo e localização primária no Brasil (INCA).....	23
Tabela 2.2	Os clientes de Hsp90 são responsáveis por diversas características das células neoplásicas.....	27
Tabela 4.1	Anticorpos utilizados para as reações de Western Blot e Imunofluorescência.....	48
Tabela 5.1	Análise estatística para as taxas de viabilidade celular da linhagem SCC9, grupos vermelho e infravermelho. Valores em vermelho representam os valores estatisticamente significantes	57
Tabela 5.2	Análise estatística para as taxas de viabilidade celular da linhagem SCC25, grupos vermelho e infravermelho. Valores em vermelho representam os valores estatisticamente significantes	58
Tabela 5.3	Análise estatística para as taxas de viabilidade celular da linhagem DOK, grupos vermelho e infravermelho. Valores em vermelho representam os valores estatisticamente significantes	59
Tabela 5.4	Resumo de resultados relevantes quanto à expressão de proteínas detectada por meio de Western Blotting em todas linhagens celulares - ↑ (aumento) e ↓ (diminuição) de níveis proteicos, respectivamente. * (detecção de Hsp90N). Cor azul (12 horas); cor vermelha (24 horas); cor verde (48 horas) e cor preta (72 horas)	62
Tabela 5.5	Quedas significativas em viabilidade celular detectadas por análise estatística	68

LISTA DE ABREVIATURAS

Akt	Sinônimo de PKB – proteína quinase B
AMP	Adenosina monofosfato
AMPK	Proteína quinase ativada por adenosina monofosfato
ANOVA	Análise de variância
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosina-trifosfato
BCA	Ácido bicinconínico
BSA	Albumina de soro bovino
Ca ²⁺	Íon cálcio
CAK	Quinase ativadora de CDK
CDK	Quinase Dependente de Ciclina
CECP	Carcinoma Epidermoide de Cabeça e Pescoço
cm	Centímetro
cm ²	Centímetro quadrado
CO ₂	Dióxido de Carbono
Cu ⁺	Íon cobre
Cu ²⁺	Íon cobre
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol - Marcação para fita dupla (DNA)
DMEM	Meio Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DOK	<i>Dysplastic Oral Keratinocytes</i> – Queratinócitos Orais Displásicos
ECGC	Epigallocatequina-3-galato
EGFR	<i>Epidermal growth fator receptor</i> – Receptor de fator de crescimento epidermal
ELISA	Ensaio de imunoadsorção enzimática
FOXO	Fator de transcrição “Forkhead box O”
GaAIs	Arseneto de Gálio e Alumínio
GSK-3β	Glicogênio sintase quinase 3-beta
h	Horas
He-Ne	Hélio-Neônio

HeLa	Henrietta Lacks (linhagem celular de carcinoma cervical)
Hsp90	Proteína de choque térmico de 90 quilodalton
IgG	Inunoglobulina G
ILK	Quinase ligada à integrina
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IV	Infravermelho
J	Joule
J/cm ²	Joules por centímetro quadrado (Medida de densidade de energia)
kDa	Quilodalton
LASER	<i>Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation</i> - Amplificação da Luz por Emissão Estimulada de Radiação
LLLT	Termo em inglês: <i>Low level laser therapy</i> – Laser em baixa intensidade
mA	Miliampere
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
mTOR	Proteína alvo da rapamicina em mamíferos
MTS	Sal de tetrazólio MTS
MTT	Sal de tetrazólio MTT
mW	Miliwatt
NaCl	Cloreto de Sódio
nm	Nanômetro
p70S6K	Quinase p70S6
pAkt	Akt fosforilado (ativado)
PBS	Tampão fosfato-salino
PDK	Fosfatidilinositol quinase-dependente
PDT	<i>Photodynamic Therapy</i> – Terapia Fotodinâmica
PI3K	Fosfatidilinositol-3-quinase
PIP2	Fosfatidilinositol bifosfato
PIP3	Fosfatidilinositol trifosfato
PKB	Proteína-quinase B
PMSF	Fenilmetil sulfonil fluoreto

pS6	Proteína S6 fosforilada em serinas 235/236 ou 240/244
PTEN	Homólogo da Fosfatase e Tensina
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> - Espécies Reativas de Oxigênio
rpm	Rotações por minuto
RSK	Quinase S6 ribossomal
s	Segundos
S6	Proteína ribossomal S6
SCC	<i>Squamous Cell Carcinoma</i> – Carcinoma Epidermoide
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Dodecil sulfato de sódio em gel de poliacrilamida
Ser	Serina
STAT3	Transdutor de sinal e ativador da transcrição 3
TBST	Solução salina tamponada com Tris
TSC	<i>Tuberous sclerosis complex</i> – Complexo de Esclerose Tuberosa
TUNEL	Do ingles: <i>Terminal Uridine Nick-End Labeling</i>
V	Vermelho
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular
W	Watt
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromolar

LISTA DE SÍMBOLOS

®	Marca Registrada
%	Porcentagem
α	Alfa (alfabeto grego)
β	Beta
γ	Gama
°C	Graus Celsius
pH	Potencial hidrogeniônico
X	Veze (Aumento)
<	Menor
λ	Lambda (comprimento de onda)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	22
2.1 Carcinoma epidermoide.....	22
2.2 Akt.....	24
2.3 Hsp90	26
2.4 Complexo mTOR.....	29
2.5 Proteína S6	31
2.6 Ciclina D1	35
2.7 Laser em baixa intensidade.....	36
2.8 LLLT em cultura de células	37
3 PROPOSIÇÃO	41
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	42
4.1 Cultivo celular	42
4.2 Irradiação laser	43
4.3 Teste de viabilidade celular	44
4.4 Western Blot.....	45
4.4.1 Extração proteica – grupo controle e grupo tratado	45
4.4.2 Western Blot propriamente dito	47
4.5 Imunofluorescência.....	49
4.6 Análise de apoptose.....	51
4.7 Análise estatística	51
5 RESULTADOS	53
5.1 Viabilidade celular	53
5.2 Análise estatística e escolha dos valores de dose do laser.....	56
5.3 Western Blot.....	60
5.4 Imunofluorescência.....	62
5.5 Análise de apoptose.....	68
6 DISCUSSÃO	71
7 CONCLUSÕES	82
REFERÊNCIAS	83
ANEXO A	115

1 INTRODUÇÃO

A proliferação celular atingida por meio de irradiação laser em baixa intensidade, do inglês “*low level laser therapy*” (LLLT), é importante para diversas aplicações médicas e tem sido estudada em várias linhagens celulares *in vitro*, incluindo fibroblastos, queratinócitos, osteoblastos humanos, linfócitos, células-tronco de origem mesenquimal e cardíacas e células endoteliais. Alguns estudos também mostram os efeitos de LLLT sobre a taxa de crescimento de células neoplásicas. Estes estudos mostram resultados distintos que dependem não só das características da luz laser empregada (comprimento de onda, potência, densidade de energia), como também da natureza das células irradiadas.

Não obstante, os mecanismos pelos quais a luz laser em baixa intensidade promove mudanças no comportamento das células ainda não foram completamente elucidados. Sabe-se que os comprimentos de onda vermelho e infravermelho são absorvidos pelos componentes da cadeia respiratória mitocondrial, podendo resultar em ligeiro aumento das espécies reativas de oxigênio e/ou aumento da geração de adenosina-trifosfato (ATP) ou adenosina-monofosfato (AMP) cíclico, o que inicia uma cascata de sinalização cujo resultado é a proliferação celular.

Desta maneira, autores e clínicos contraindicam o uso de LLLT em lesões proliferativas e de tecido glandular. Entre as contraindicações estão incluídas também as lesões pré-malignas e lesões cujo diagnóstico é difícil em um estágio inicial. Além disso, o risco de uma exposição acidental de uma lesão pré-maligna à luz laser durante terapia clínica não pode ser descartado, em especial no tratamento com LLLT de mucosite oral, desenvolvida por muitos pacientes em tratamento oncológico.

Sabe-se que há participação de algumas vias de sinalização no comportamento de células irradiadas com laser em baixa intensidade. Dentre estas vias pode ser citada a do PI3K/Akt/mTOR. Além disso, o aumento na expressão de proteínas reguladoras do ciclo celular, como ciclina D1, também foi observado em células expostas à LLLT.

Assim, a via de sinalização do PI3K/Akt/mTOR, juntamente com outras proteínas relacionadas, como a forma fosforilada da proteína S6, a chaperona Hsp90 e ciclina D1 desempenham um papel central nos carcinomas de cabeça e

pescoço, incluindo o câncer de boca. Estudar a expressão destas proteínas em células de carcinoma oral e células displásicas, após irradiação com laser em baixa intensidade, poderá ajudar a desvendar os mecanismos de atuação de LLLT no comportamento celular.

Desta forma, o presente estudo teve o objetivo de verificar o efeito de LLLT (comprimentos de onda vermelho e infravermelho) na viabilidade celular e na localização e expressão de proteínas relacionadas à via do Akt/mTOR, além da possível indução de apoptose em linhagens celulares de carcinoma epidermoide de boca e queratinócitos orais displásicos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Carcinoma epidermoide

O carcinoma epidermoide representa mais de 90% das neoplasias malignas de cabeça e pescoço ^(1, 2), sendo que apenas 34% destes casos são diagnosticados a tempo de proporcionar alguma terapia ou cura para o paciente ⁽³⁻⁶⁾. Dentre os carcinomas de cabeça e pescoço, pode-se citar o câncer de boca, que representa um grave problema de saúde pública no Brasil e no mundo, sendo sua incidência variada de acordo com os hábitos culturais de cada país, que incluem mascar folhas de betel e tabaco ⁽⁷⁾.

O carcinoma epidermoide de boca afeta predominantemente etilistas e tabagistas, principalmente entre a sexta e sétima décadas de vida ^(8, 9). Apesar de ocorrer em idades mais avançadas, 8,7% dos casos diagnosticados no Laboratório de Patologia Cirúrgica da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo entre 1961 e 2008 pertenciam a pacientes com menos de 40 anos de idade ⁽¹⁰⁾. No Brasil, segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA – www.inca.gov.br), o câncer de boca está entre os tipos de câncer mais incidentes estimados para 2012, prevendo-se 9.990 novos casos deste câncer em homens e 4.180 em mulheres neste ano. Desta forma, há um risco estimado de 10 casos novos de câncer de boca a cada 100 mil homens e 4 a cada 100 mil mulheres (Tabela 2.1) ⁽¹¹⁾.

Tabela 2.1 – Estimativas para o ano de 2012 das taxas brutas de incidência por 100 mil habitantes e de número de casos novos por câncer, segundo sexo e localização primária no Brasil (INCA)⁽¹¹⁾

Localização Primária Neoplasia Maligna	Estimativa dos Casos Novos							
	Homens				Mulheres			
	Estados		Capitais		Estados		Capitais	
	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta
Próstata	60.180	62,54	15.660	75,26	-	-	-	-
Mama Feminina	-	-	-	-	52.680	52,50	18.160	78,02
Colo do Útero	-	-	-	-	17.540	17,49	5.050	21,72
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.210	17,90	4.520	21,85	10.110	10,08	3.060	13,31
Cólon e Reto	14.180	14,75	4.860	23,24	15.960	15,94	5.850	25,27
Estômago	12.670	13,20	3.200	15,34	7.420	7,42	2.170	9,47
Cavidade Oral	9.990	10,41	2.760	13,34	4.180	4,18	1.130	4,92
Laringe	6.110	6,31	1.540	7,56	-	-	-	-
Bexiga	6.210	6,49	1.900	9,28	2.690	2,71	880	3,72
Esôfago	7.770	8,10	1.500	7,26	2.650	2,67	520	2,27
Ovário	-	-	-	-	6.190	6,17	2.220	9,53
Linfoma não Hodgkin	5.190	5,40	1.560	7,66	4.450	4,44	1.560	6,85
Glândula Tireoide	-	-	-	-	10.590	10,59	3.490	14,97
Sistema Nervoso Central	4.820	5,02	1.190	5,82	4.450	4,46	1.200	5,23
Leucemias	4.570	4,76	1.180	5,81	3.940	3,94	1.180	5,02
Corpo do Útero	-	-	-	-	4.520	4,53	1.700	7,39
Pele Melanoma	3.170	3,29	810	4,05	3.060	3,09	790	3,46
Outras Localizações	43.120	44,80	11.100	53,33	38.720	38,61	10.320	44,50
Subtotal	195.190	202,85	51.780	248,60	189.150	188,58	59.280	254,86
Pele não Melanoma	62.680	65,17	14.620	70,39	71.490	71,30	15.900	68,36
Todas as Neoplasias	257.870	267,99	66.400	318,79	260.640	259,86	75.180	323,22

O carcinoma epidermoide pode ocorrer em qualquer parte da boca, mas há maior frequência na língua e no assoalho bucal ⁽¹²⁾. Essas regiões são grandes facilitadoras da disseminação dos carcinomas para linfonodos regionais e órgãos distantes devido à capacidade das células neoplásicas migrarem e invadirem tecidos ⁽¹³⁾. Os vasos linfáticos servem como vias importantes para a metástase de um câncer, sendo a disseminação de células malignas para os linfonodos locais o início de uma progressão da neoplasia e um importante fator determinante para o prognóstico ^(14, 15).

Podem ser citados dois mecanismos moleculares para o câncer. Um deles diz respeito à iniciação tumoral a partir de células diferenciadas. Por este mecanismo, células normais sofreriam algum tipo de agressão do meio ambiente e seriam danificadas, sem serem reparadas adequadamente devido a disfunções existentes em seus próprios genes ⁽¹⁶⁾.

Outro mecanismo é o de iniciação tumoral a partir de células-tronco ⁽¹⁷⁾. No carcinoma epidermoide, em particular, as células-tronco seriam as únicas, dentre os queratinócitos, com tempo de vida suficiente para acumular o número de mutações necessário para que esta lesão se desenvolva. Assim, seria plausível acreditar que o

câncer de boca tem origem em células-tronco específicas ^(18, 19). Subpopulações de células tumorais com características de células-tronco já foram identificadas em neoplasias de mama, próstata, melanoma, entre outras ⁽²⁰⁻²²⁾.

2.2 Akt

O Akt ou PKB, uma serina/treonina quinase de 59kDa, torna-se ativada quando as células são estimuladas por diversos fatores de crescimento. São conhecidos três membros da família PKB: PKB α (Akt1), PKB β (Akt2) e PKB γ (Akt3) ⁽²³⁻²⁶⁾.

A proteína Akt tem participação em processos fisiológicos e neoplásicos, nos mecanismos de proliferação e sobrevivência da célula. Akt regula positivamente fatores antiapoptóticos e negativamente fatores pró-apoptóticos ⁽²⁷⁾.

A ativação do Akt vai depender da disponibilidade intracelular de PI3K (fosfatidilinositol-3 kinase). Através de sinais extracelulares, esta molécula é recrutada para a membrana plasmática, onde fosforila uma outra molécula, o PIP2, passando a PIP3. Esta é responsável pelo recrutamento do Akt e é negativamente regulada pelo PTEN ⁽²⁶⁾. Quando na membrana plasmática, o Akt sofre fosforilações em diferentes sítios, por PDK-1 (fosfatidilinositol quinase-dependente 1), PDK-2 (fosfatidilinositol quinase-dependente 2) e principalmente ILK (quinase ligada a integrina) ^(26, 28). Após sua ativação na membrana plasmática, Akt passa a ter localização citoplasmática e nuclear ⁽²⁹⁻³¹⁾. (Figura 2.1).

Sabe-se que o Akt pode promover ou impedir a ação de diversas proteínas relacionadas ao ciclo celular. Dentre elas, podemos citar P21, Mdm2 e P53 ^(26, 33).

A N-acetilcisteína, por exemplo, é um composto organossulfurado encontrado em plantas do gênero *allium*, aspargos e pimenta vermelha ^(34, 35). O tratamento com base neste composto pode causar a inibição de crescimento de células de câncer oral que superexpressam EGFR (*epidermal growth fator receptor*). Acredita-se que este efeito inibitório seja devido à supressão da sinalização de EGFR/Akt nas células ⁽³⁶⁾. Outro estudo demonstrou que o tratamento de células de carcinoma oral com gefitinib (inibidor de tirosina quinase) em conjunto com EGCG (polifenol encontrado no chá verde) inibiu a proliferação e migração das mesmas ⁽³⁷⁾. Em concordância com os achados, este tratamento combinado suprimiu os níveis de algumas proteínas fosforiladas, dentre elas o pAkt (Akt ativado), o que contribuiu para atenuar a habilidade metastática das células neoplásicas ⁽³⁷⁾.

Assim, a fosforilação do Akt é um evento muito importante na patogênese do carcinoma de cabeça e pescoço ^(38, 39). Esta fosforilação tem sido detectada em aproximadamente 50% das lesões pré-neoplásicas de língua e indica um pior

prognóstico destas lesões ⁽⁴⁰⁾. Além disso, o estresse oxidativo e fosforilação do Akt têm sido associados a alterações energéticas e do equilíbrio redox, o que pode contribuir significativamente para o desenvolvimento e progressão de tumores ⁽⁴¹⁻⁴⁵⁾, uma vez que a adaptação a estas condições pode conferir resistência das células neoplásicas à morte e, portanto cooperar para o estabelecimento do câncer ^(44, 46-48).

A presença de Akt fosforilado (pAkt) realmente previne a morte celular ⁽⁴⁹⁾. Isto também foi um dos achados de Leopoldino et al., que estudaram três linhagens celulares de cabeça e pescoço (HN12, HN13 e CAL27), ressaltando o fato das células neoplásicas possuírem a habilidade de escapar da indução de morte por estimular a fosforilação do Akt, ou por prevenir a desfosforilação do mesmo ⁽⁵⁰⁾.

Desta maneira, fica clara a importância da inativação do pAkt em células neoplásicas como método terapêutico. XL147 (SAR245408), por exemplo, é um medicamento administrado via oral, atualmente sob investigação, que atua como um inibidor do PI3K, tendo mostrado atividade pré-clínica em modelos xenógenos de câncer de mama, pulmão e próstata ⁽⁵¹⁾. Em um estudo clínico de fase I, este medicamento em conjunto com carboplatina e paclitaxel foi testado em 19 pacientes com tumores sólidos avançados, provocando melhora em dois pacientes acometidos por carcinomas de cabeça e pescoço ⁽⁵²⁾.

Outra droga que está sendo investigada é a perifosina, um fosfolípídeo que inibe a ativação do Akt ^(53, 54) e que se mostrou eficaz quando tratando linhagens celulares derivadas de carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço ⁽⁵⁵⁾. Assim, o efeito antitumoral desta droga levou a sua utilização em um estudo clínico fase II, que infelizmente não trouxe melhoras para pacientes com carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço. No entanto, este estudo investigou o uso de perifosina como tratamento único, restando ainda a possibilidade de investigar seus efeitos quando combinados a outros medicamentos e radiação ⁽⁵⁶⁾.

2.3 Hsp90

A Hsp90 (*heat shock protein 90*) apresenta um papel importante na transformação maligna das células. Esta proteína está presente em todos os compartimentos celulares e é estável, além de ser abundante intracelularmente. Ela

é considerada uma chaperona molecular que possui, entre outras funções, a de estabilização do Akt⁽⁵⁷⁾ (Figura 2.1).

De fato, seguindo a hipótese primeiramente proposta por Hanahan e Weinberg em 2000⁽¹⁶⁾, a instabilidade genética permite com que a célula eventualmente adquira seis capacidades que são características da maioria ou de todos os cânceres. Estas são: 1. autossuficiência em sinais de crescimento; 2. invasão tecidual e metástase; 3. potencial replicativo sem limites; 4. angiogênese; 5. insensibilidade a sinais de supressão de crescimento e 6. evasão à apoptose. Determinadas proteínas têm papel importante em cada uma destas funções e, muitas delas são “clientes” da Hsp90⁽⁵⁸⁻⁶³⁾ (Tabela 2.2).

Tabela 2.2 – Os clientes de Hsp90 são responsáveis por diversas características das células neoplásicas. Adaptado de Maloney e Workman⁽⁶³⁾

Características das Células de Câncer⁽¹⁶⁾	Clientes da Hsp90
Autossuficiência em sinais de crescimento	RTKs, Serina/treonina quinases, receptores de hormônio esteroide, Akt, ErbB2, Raf-1
Insensibilidade a sinais de supressão de crescimento	PIK, Wee1, Myt1
Potencial replicativo sem limites	hTERT
Evasão à apoptose	Akt, RIP
Angiogênese	Hif-1 α , FAK, Akt
Invasão tecidual e metástase	MMP2, Met

Assim, a Hsp90 é responsável por ligar-se a estas proteínas clientes, estabilizando-as e permitindo com que suas funções possam ser corretamente realizadas, contribuindo para o câncer. Portanto, a Hsp90 também é um dos alvos do tratamento de neoplasias⁽⁶⁴⁾. Okui et al. investigaram o efeito antitumoral do inibidor de Hsp90 (NVP- AUY922) em células de carcinoma epidermoide oral. Este inibidor foi capaz de inibir a proliferação destas células e suprimir a expressão de pAkt e VEGF em um modelo xenógeno utilizando as mesmas células⁽⁶⁵⁾.

Na verdade, os primeiros inibidores de Hsp90 eram baseados no componente natural geldanamicina, o qual deu origem a um número de análogos com propriedades farmacêuticas melhoradas, incluindo o inibidor 17-AAG⁽⁶⁶⁾. Alguns estudos pré-clínicos apontam a geldanamicina e seus derivados 17-AAG e 17-DMAG como alternativas para o tratamento de diversas células neoplásicas *in vitro*,

incluindo aquelas derivadas de carcinoma epidermoide ⁽⁶⁷⁾, câncer de próstata ⁽⁶⁸⁻⁷⁰⁾, câncer de pulmão ⁽⁷¹⁾, câncer colorretal ⁽⁷¹⁻⁷³⁾, câncer cervical ^(74, 75), câncer de bexiga ⁽⁷²⁾, câncer de pâncreas ⁽⁶⁹⁾, glioma ^(68, 75) e melanoma ⁽⁷²⁾.

Na verdade, inibidores de Hsp90 podem seletivamente inativar células neoplásicas, enquanto não apresentam o mesmo efeito em células normais ⁽⁷⁶⁾. Outro estudo mostrou que os inibidores de Hsp90 S06 e 17-AAG reduziram a expressão de proteínas clientes relacionadas à evasão à apoptose de células de carcinoma epidermoide oral ⁽⁷⁷⁾.

A Hsp90 é pouco expressa em sua forma livre, principalmente em células tumorais. No entanto, ela participa amplamente na formação de um complexo multimolecular chamado de multichaperona ⁽⁷⁸⁾. É por meio desta forma de multichaperona, caracterizada pelo agrupamento de Hsp90 com p50_{cdc37} e p23, que a manutenção das proteínas clientes envolvidas em sobrevivência e diferenciação celular são mantidas em sua forma nativa, e conseqüentemente prevenidas de sofrerem ubiquitinação e degradação ⁽⁷⁹⁾.

O inibidor de Hsp90 17-DMAG levou à diminuição do crescimento e formação de metástases de tumores xenógenos provenientes de carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço ⁽⁸⁰⁾. Estes efeitos foram constatados uma vez que o inibidor de Hsp90 causou acúmulo nuclear de YAP e depleção nuclear de FRMD4A, um marcador de células-tronco epidermais superexpresso em carcinomas epidermóides ⁽⁸⁰⁾. Assim, a inativação de Hsp90 é inquestionavelmente vantajosa para o tratamento de tumores caracterizados por múltiplos eventos mutacionais, como os de cabeça e pescoço ⁽⁸¹⁾.

De maneira interessante, foi identificada uma nova forma de Hsp90 chamada de Hsp90N. Esta forma é uma proteína associada ao Raf e possui 75kDa ⁽⁸²⁾. Em contraste com a Hsp90, a Hsp90N não se associa ao cofator quinase p50_{cdc37}. Além disso, a Hsp90N ativa a Raf e, altos níveis de expressão de Hsp90N resultaram em transformação neoplásica ⁽⁸²⁾.

Há uma superexpressão de Hsp90N em tecidos tumorais ⁽⁸³⁾ e, de forma notável, 70% de pacientes com melanoma em estágio avançado (estágio 4) apresentaram células que secretavam microvesículas contendo esta isoforma específica de Hsp90 ⁽⁸⁴⁾.

2.4 Complexo mTOR

O mTOR, cujo nome deriva do inglês (*mammalian target of rapamycin*) é uma serina-treonina que pertence à família dos fosfatidilinositol quinases (PI3K) ⁽⁸⁵⁾. O mTOR constitui o núcleo de uma via molecular que regula o crescimento celular e a proliferação pela integração de sinais provenientes de fatores de crescimento, nutrientes e estado de energia da célula ⁽⁸⁶⁾.

Nos mamíferos, há dois complexos mTOR : complexo Raptor-GβL-mTOR e complexo Rictor-GβL-mTOR, onde raptor (*regulatory associated protein of mTOR*) e rictor (*rapamycin-insensitive companion of mTOR*). O complexo Raptor-GβL-mTOR pode ser inibido pelo macrolídeo imunossupressivo rapamicina e é crítico para a maioria dos aspectos que envolvem a regulação do crescimento celular ⁽⁸⁶⁾. Já o complexo Rictor-GβL-mTOR é insensível à rapamicina e regula a organização do citoesqueleto de actina ^(87, 88).

O mTOR é encontrado na via de sinalização PI3K/AKT ⁽⁸⁹⁾. Estudos mostram que o mTOR é substrato do Akt e, por isso apontam para envolvimento da via do Akt em sua regulação (Figura 2.2). Evidências recentes também apontam o envolvimento do complexo Rictor-GβL-mTOR na fosforilação do sítio serina473 do Akt ⁽⁸⁸⁾.

A via de sinalização Akt/mTOR está sendo investigada como um alvo terapêutico para o câncer. A ativação desta via em tumores primários parece representar um padrão mais agressivo de tumor. Na verdade, a via do PI3K/Akt/mTOR encontra-se ativada em uma grande porcentagem de cânceres humanos por uma variedade de mecanismos, como a mutação do Ras, perda do PTEN, ativação de receptores de fatores de crescimento como o EGFR e mutações no PI3KA ⁽⁹⁰⁾.

Esta via do PI3K/Akt/mTOR regula diversas funções celulares, como crescimento, proliferação, sobrevivência, metabolismo e autofagia ⁽⁹¹⁾, além de estar relacionada à resistência à radiação ⁽⁹²⁾. Assim, a inibição Akt/mTOR, que tem sido proposta como um complemento à terapia do câncer com cisplatina e radiação, leva as células à morte por autofagia, em associação com a formação de organelas vesiculares ácidas (AVOs) ^(93, 94).

Figura 2.2 – Via de sinalização mTOR ⁽³²⁾

Os inibidores de mTOR compõem uma nova classe de agentes antitumorais que estão, no momento, sob testes clínicos. Vários alvos que se localizam *downstream* ao mTOR apresentam-se desregulados no câncer humano, incluindo o eIF4E ⁽⁹⁵⁾, ciclinas D ⁽⁹⁶⁾, p27kip ⁽⁹⁷⁾ e c-myc ⁽⁹⁸⁾.

A via PI3K/PTEN/Akt/mTOR de fato desempenha um papel muito importante no câncer. Um estudo recente mostrou que variações genéticas ao longo desta via podem traduzir o risco de um indivíduo com CECP apresentar recorrência do tumor ou formação de tumores secundários, além de preverem se tal indivíduo deve ou não responder ao tratamento quimiopreventivo com o medicamento 13-cRA (Ácido 13-Cis-Retinoico) ⁽⁹⁹⁾.

As serina-treonina quinases S6 são o alvo mais *downstream* da via PI3K/Akt/mTOR, sendo ativadas por Akt ou mTOR^(100, 101). O aumento da atividade desta via resulta na ativação da proteína ribossômica S6 que, por consequência, aumenta a tradução protéica. De forma interessante, dentre os genes estudados por Hildebrandt et al., duas isoformas da S6 quinase (RPS6KB2 e RPS6KL1) foram identificadas como importantes marcadores para a formação de tumores secundários ou recorrência de CECP⁽⁹⁹⁾.

2.5 Proteína S6

As RSKs (Quinases ribossômicas S6) foram descobertas em oócitos de rãs *Xenopus laevis*, por Erikson e Maller e classificadas como quinases intracelulares que fosforilam a proteína S6 da subunidade ribossômica 40S⁽¹⁰²⁻¹⁰⁴⁾. Acredita-se que a fosforilação da proteína S6 seja responsável pela tradução de mRNAs específicos para o crescimento celular⁽¹⁰⁵⁾.

Duas proteína-quinases S6 (S6KI e S6KII) com peso molecular de 90kDa foram identificadas⁽¹⁰⁶⁾, sendo seus homólogos subsequentemente clonados de camundongos, galinhas, ratos, *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans*⁽¹⁰⁷⁻¹⁰⁹⁾. Já em humanos, três isoformas de RSK têm sido identificadas^(110, 111). Além de S6KI e S6KII, uma outra quinase S6 de 70kDa, p70S6K, mostra sequência homóloga com a extremidade N-terminal das duas anteriores^(112, 113) (Figura 2.3). Esta S6 quinase de 70kDa é considerada, dentre as três, aquela cujo papel é principalmente de caráter fisiológico⁽¹¹⁴⁻¹¹⁶⁾.

Figura 2.3 – Domínios funcionais e os seis sítios de fosforilação presentes em RSKs. Adaptado de Frödin e Gammeltoft⁽¹¹⁷⁾

Membros da família RSK estão presentes no citoplasma, bem como no núcleo, como foi demonstrado em células HeLa ⁽¹¹⁸⁾. A adição de fatores de crescimento às células resulta na ativação de RSK citoplasmático e nuclear. Além disso, parte do RSK citoplasmático é translocado para o núcleo mediante ativação, como demonstrado em células HeLa após cultura em meio estimulado com 20% de soro fetal bovino ⁽¹¹¹⁾.

Dois alvos importantes ativados pelo mTOR são o fator de iniciação de tradução protéica *4-E binding protein 1* (4E-BP1) e a p70S6 quinase (p70S6K), um regulador de tradução protéica ^(119, 120). A ativação do primeiro impede sua ação repressiva ⁽⁸⁵⁾ e resulta na ativação de diversos genes necessários para o crescimento celular no CECP ⁽¹²¹⁾. Já a p70S6K é fosforilada no sítio treonina 389 pelo complexo Raptor-GβL-mTOR ^(122, 123), e tem como alvo direto a proteína ribossômica S6 ⁽¹¹⁹⁾. Quando ativada, a p70S6K estimula a síntese proteica por meio da fosforilação da proteína S6 nos sítios serina 235 e 236 ^(124, 125) (Figura 2.2 e 2.4). Além disso, a p70S6K atua na regulação na fase G1/S do ciclo celular ⁽¹²⁶⁾ e também está envolvida na inibição de apoptose ^(127, 128).

Assim, o acúmulo da forma fosforilada da proteína S6, último alvo downstream da via Akt-mTOR-p70S6K, é frequentemente encontrado em espécimes clínicos de pacientes com carcinoma de cabeça e pescoço e linhagens celulares derivadas da mesma patologia ⁽³⁹⁾.

Figura 2.4 – Regulação de tradução proteica por p70S6K e eIF-4E ⁽³²⁾

Alvos da via de sinalização PI3K/AKT, S6 e 4EBP1 podem ser inibidos por meio da inativação do Akt, como foi demonstrado por Zhao et al. ⁽¹²⁹⁾ em linhagens celulares de carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço SCC9 e SCC25. Além disso, determinar o *status* de fosforilação da proteína S6 ajuda a estabelecer a efetividade de tratamentos bloqueadores da via de sinalização do mTOR em carcinomas de cabeça e pescoço ⁽³⁹⁾.

De forma interessante, pode haver discordância entre os níveis de pAkt e pS6. Assim, células podem ter altos níveis de pAkt e baixos níveis de pS6, caso a ativação de Akt iniba o complexo de esclerose tuberosa 2 (TSC2), o qual inibe o complexo mTOR (Figura 2.5) ⁽¹³⁰⁾. Além disso, além da ativação de S6K poder acontecer via ativação de Akt, como visto anteriormente, ela também pode ocorrer via ativação de PDK-1, ou seja, de maneira independente da ativação do Akt ⁽¹³⁰⁾ (Figura 2.5).

Figura 2.5 – Ativação de S6K via Akt/mTOR e via PDK1, independente da ativação de Akt, além de inativação de TSC2 por pAkt. Adaptado Aziz et al. ⁽¹³⁰⁾

Assim, a inibição da ativação de mTOR em lesões experimentais e clínicas de CECP levou ao rápido declínio da proteína fosforilada S6 (pS6), que é alvo *downstream* do mTORC1 ⁽¹³¹⁾. Sabe-se, portanto, que S6 serve como um biomarcador da resposta de inibidores de mTOR em seus tecidos-alvo. De maneira condizente, a inibição de Tgfbr1 e PTEN em linhagens celulares de CECP resulta na ativação de PI3K, Akt e pS6 ⁽¹¹⁹⁾.

BGT226, um inibidor de PI3K/mTOR, diminuiu significativamente o crescimento de tumores de cabeça e pescoço em camundongos em 34.7% e 76.1%, quando administrado em doses de 2.5 e 5 mg/kg, respectivamente. O mesmo estudo aponta para uma análise imuno-histoquímica condizente, em que a expressão citoplasmática de p-p70S6K foi atenuada após o tratamento *in vitro* ⁽¹³²⁾.

A p70S6K foi recentemente apontada como um alvo terapêutico promissor no CECP ⁽¹³³⁾. Além da proteína S6 ser altamente expressa em vários tipos de câncer, incluindo os de cabeça e pescoço ⁽¹³⁴⁾, camundongos e diversos tipos celulares que apresentam ausência desta proteína sofrem de crescimento e proliferação celulares reduzidos ^(135, 136). Assim, a avaliação dos níveis de proteína S6 torna-se importante para prever a progressão maligna de lesões ^(137, 138).

Enfim, altos níveis de pS6 são frequentemente encontrados em displasias epiteliais orais e CECP, porém não foram associados aos parâmetros clínico-patológicos destas lesões ⁽¹³⁴⁾. Na verdade, a expressão de pS6 e aumento da relação pS6/S6 estão relacionadas ao desenvolvimento e à invasão de células

neoplásicas de carcinoma de esôfago ⁽¹³⁹⁾. Além disso, níveis elevados de pS6 foram associados à metástase de adenocarcinoma de pulmão ⁽¹⁴⁰⁾.

Outros estudos identificaram altos níveis de pS6 em uma fração considerável de amostras clínicas e linhagens celulares de CECp ^(39, 138), mostrando que a inibição do mTOR pela rapamicina diminui os níveis de pS6 e causa morte por apoptose em enxertos xenógenos de CECp ^(39, 138). Estudos recentes mostraram que a depleção de S6 leva à indução de p53, o que resulta na interrupção do ciclo celular em hepatócitos ⁽¹⁴¹⁾, sugerindo que S6 ajuda a regular o ciclo celular.

2.6 Ciclina D1

As ciclinas são proteínas de baixo peso molecular, presentes em todas as células eucarióticas, e que desempenham um importante papel de ativação na sucessão dos principais pontos de transição celular. Elas atuam como subunidades reguladoras de quinases dependentes de ciclinas (CDKs) ⁽¹⁴²⁾.

As ciclinas têm grande participação no desenvolvimento de várias neoplasias humanas ⁽¹⁴³⁾. Elas estão presentes somente em momentos específicos do ciclo celular, o que é resultado da constante indução e eliminação destas proteínas durante todo o ciclo.

Oito tipos de ciclinas humanas são conhecidos: A, B, C, D, E, F, G, H. A ciclina D tem três subtipos - D1, D2, D3 – possui uma meia-vida de aproximadamente 38 minutos, e é extremamente instável ⁽¹⁴⁴⁾. A ciclina D1 forma complexos com CDK4 e CDK6, e está envolvida na transição da fase G1 para a fase S (ponto de restrição – ponto R) do ciclo celular. Este complexo é positivamente regulado pela CAK (fosforilação), e pela cdc25 (desfosforilação). O alvo final deste complexo é a proteína do retinoblastoma (pRb).

Estudos experimentais mostram que a ciclina D1 pode funcionar como oncogene, cooperando com outros genes na transformação celular ⁽¹⁴⁵⁾. Entre os três tipos de ciclinas, a ciclina D1 apresenta maior importância e correlação com o câncer ⁽¹⁴⁶⁾.

O gene da ciclina D1 tem sido frequentemente amplificado ou superexpresso em vários tipos de carcinomas em humanos, incluindo os carcinomas de cabeça e

pescoço ^(147, 148). A presença desta proteína está relacionada a um prognóstico menos favorável, já que os tumores que a sintetizam em excesso são mais agressivos e invasivos ⁽¹⁴⁹⁻¹⁵¹⁾.

A consequência da superexpressão de ciclina D1 é uma transição encurtada pelo ciclo celular que confere uma vantagem proliferativa às células e talvez limite a capacidade de reparação aos danos genômicos causados pela exposição a carcinógenos ⁽¹⁵²⁾. Como já antes mencionado, a ciclina D1 é um potencial biomarcador do câncer humano, como o câncer de boca ⁽¹⁵³⁻¹⁵⁵⁾, e alguns estudos mostram que seu envolvimento na formação de tumores pode independe do complexo formado entre ciclina e CDKs ^(156, 157).

O medicamento polietilenoglicol tem a capacidade de reprimir EGFR, funcionando como um quimiopreventivo eficaz contra o câncer colorretal ⁽¹⁵⁸⁻¹⁶⁰⁾. Estes efeitos sobre o EGFR acabam por diminuir os níveis de ciclina D1 e SNAIL (também envolvido em cânceres colorretais e de cabeça e pescoço), funcionando como efeitos antineoplásicos ⁽¹⁶⁰⁾. De qualquer forma, a expressão de ciclina D1 é uma forma muito utilizada para se ilustrar a proliferação de células neoplásicas ou de um CECP ⁽¹⁶¹⁾.

Assim, diversos estudos que visam testar as propriedades antineoplásicas de um medicamento acabam por identificar, entre outros achados, a expressão aumentada de ciclina D1 em suas células ou tumores-alvo. Da mesma maneira, quimioterápicos devem, em geral, reduzir a expressão de ciclina D1 no câncer, uma vez que esta é um dos marcadores importantes para o prognóstico de tumores ^(162, 163). Chang et al., por exemplo, mostraram que a droga BGT226 bloqueia ambos Akt e mTOR, levando à expressão atenuada de suas proteínas *downstream*, como p-GSK-3 β , p-p70S6K e p-4E-BP1, o que resulta em supressão da expressão de ciclina D1 nas células de CECP ⁽¹³²⁾.

2.7 Laser em baixa intensidade

A palavra LASER é um acrônimo para *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*, e pode ser traduzida como amplificação da luz por emissão estimulada de radiação. A luz laser consiste em um tipo peculiar de radiação

eletromagnética que apresenta propriedades específicas. O laser é colimado, monocromático e coerente, características estas que o difere das fontes de luz convencionais. Além disso, o laser, operando em comprimentos de onda visíveis e infravermelhos, é uma radiação não-ionizante, que não tem a capacidade de ionizar átomos ou causar mutações ⁽¹⁶⁴⁾.

Em 1966, Endre Mester, um dos pioneiros da pesquisa com laser de baixa potência, mostrou os efeitos desta terapia na cicatrização de feridas em dorso de ratos ⁽¹⁶⁵⁾. A terapia com laser em baixa intensidade (LLLT – *low level laser therapy*) utiliza a luz nas porções do espectro visível e infravermelho, visando as distintas interações que cada uma é capaz de manter com os tecidos vivos. E além do comprimento de onda utilizado, sabe-se que a interação da luz laser depende da densidade de energia, potência e também das propriedades inerentes ao tecido em questão ⁽¹⁶⁶⁾.

Desta maneira, a LLLT tem sido aplicada clinicamente em diversas áreas da medicina que requeiram prevenção de morte celular e tecidual, estimulação de reparo de lesões, redução de dor e redução de inflamação ⁽¹⁶⁷⁻¹⁶⁹⁾. Esta terapia vem crescendo no campo do derrame cerebral ^(170, 171), injúria traumática do cérebro ⁽¹⁷²⁻¹⁷⁴⁾, doenças neurodegenerativas ⁽¹⁷⁵⁾, e lesões de medula espinal ⁽¹⁷⁶⁾.

Em odontologia, o uso da LLLT tem se tornado cada vez mais difundido e, dentre suas aplicações, podem ser citados a prevenção e aceleração da reparação de lesões de herpes labial recorrente ⁽¹⁷⁷⁻¹⁸¹⁾, prevenção e tratamento da mucosite oral ⁽¹⁸²⁻¹⁸⁵⁾, tratamento de parestesia do nervo trigêmeo ^(186, 187), além do auxílio no tratamento de disfunções temporomandibulares ⁽¹⁸⁸⁻¹⁹⁰⁾.

2.8 LLLT em cultura de células

Sabe-se que a LLLT altera os processos intracelulares tanto em animais como em bactérias de uma maneira não-térmica e ao mesmo tempo dependente do comprimento de onda utilizado, sendo a luz absorvida por componentes da cadeia respiratória mitocondrial, e resultando no aumento de espécies reativas de oxigênio, adenosina trifosfato (ATP) e AMP cíclico, iniciando uma cascata que promove a proliferação celular ⁽¹⁹¹⁻¹⁹⁵⁾. Vários estudos, tanto em cultura de células como em

animais e humanos têm sido feitos de forma a avaliar os possíveis efeitos desta energia ^(177, 196-200).

Há resultados distintos em relação à proliferação celular quando diferentes protocolos de LLLT são utilizados ⁽²⁰¹⁻²⁰⁵⁾. Além destes protocolos, o estado fisiológico da célula também é capaz de interferir nos efeitos proliferativos da luz laser ⁽²⁰⁶⁾.

Existem alguns estudos que mostram os efeitos da terapia com laser em baixa intensidade sobre a taxa de crescimento de células neoplásicas. Estes estudos mostram resultados distintos que dependem não só das características da luz laser empregada (comprimento de onda, potência, densidade de energia), como também da natureza das células irradiadas ⁽²⁰⁷⁾.

De Castro et al. ⁽¹⁶⁶⁾ estudaram o efeito proliferativo de células de carcinoma submetidas a comprimentos de onda de 685 e 830 nm, ambos com uma dose de 4J/cm². Neste estudo, pôde ser observado que as células, independentemente do efeito causado pelo laser, obedeceram seu ciclo natural de vida. O estado nutricional das células, como já antes mencionado ⁽²⁰⁶⁾, também influenciou a proliferação e, quando os dois comprimentos de onda foram comparados, o comprimento de onda de 830nm causou um efeito proliferativo maior.

Werneck et al., encontraram um efeito positivo de bioestimulação em células de carcinoma de laringe (H.Ep.2) quando estas foram irradiadas com dois comprimentos de onda distintos (685 e 830nm) e uma dose de 4J/cm² ⁽²⁰⁸⁾.

Em um estudo feito por Kreisler et al. ⁽²⁰⁴⁾, células de carcinoma de laringe foram irradiadas *in vitro* por um laser de GaAlAs utilizando um comprimento de onda de 809nm. Em seus resultados, houve proliferação aumentada das células quando uma dose de 7.84J/cm² foi usada. Já Schaffer et al. ⁽²⁰⁹⁾ demonstraram que células de carcinoma epidermoide bucal apresentaram uma queda da taxa de mitose após serem irradiadas com doses de 4J/cm² e 20 J/cm².

Os achados de Schaffer não estão em concordância com os de Monteiro et al., que encontraram aumento na progressão de carcinomas epidermóides orais induzidos em mucosa jugal de *hamsters* após estes terem sido submetidos à LLLT. Na verdade, após a irradiação laser com comprimento de onda vermelho (660 nm) e densidade de energia de 56.4 J/cm², um total de 40% de carcinomas pouco diferenciados foi encontrado histologicamente, o que representou significativa piora na evolução clínica dos tumores após a LLLT ⁽²¹⁰⁾.

Assim, os estudos *in vitro* em cultura de células neoplásicas podem não refletir os resultados encontrados *in vivo* ^(211, 212). Frigo et al. estudaram a taxa de proliferação de melanoma *in vitro* e *in vivo* após irradiação laser com luz vermelha (660nm) e doses de 150J/cm² e 1050J/cm². Os resultados *in vitro* mostraram que ambas as doses apresentaram um efeito proliferativo não-significativo estatisticamente, ou mesmo um efeito inibitório através de aumento dos níveis de apoptose. Já os estudos *in vivo* mostraram aumento significativo da massa tumoral, além de piora no quadro histológico do câncer quando irradiado com a dose de 1050J/cm² ⁽²⁰²⁾.

A questão sobre um efeito proliferativo indesejado frente à irradiação laser já havia sido trazida por alguns autores ^(213, 214). Assim, existe um consenso entre autores e clínicos para se contraindicar o uso de LLLT em lesões proliferativas e de tecido glandular. Dentre as contraindicações estão incluídas também as lesões pré-malignas e lesões cujo diagnóstico é dificultoso em um estágio inicial ⁽²⁰⁶⁾. Portanto, é muito importante que se estude o efeito da LLLT em células neoplásicas para que esta questão seja esclarecida. Além disso, há risco de uma exposição acidental da luz laser a uma lesão pré-maligna durante tratamento clínico ⁽²⁰⁶⁾.

Apesar de estes estudos mostrarem uma proliferação diferenciada de determinadas linhagens celulares frente à irradiação laser, não é investigada a fundo a causa desta alteração de comportamento. Existem, de fato, poucos estudos que relacionam a expressão de vias de sinalização celulares com a irradiação laser. O laser de He-Ne (632.8 nm), por exemplo, aumentou a expressão das proteínas reguladoras do ciclo celular, ciclinas D1, ciclina E e ciclina A, na linhagem celular pm128 de camundongos. A expressão de ciclina D1 foi detectada aos seis minutos após a irradiação, sugerindo que a LLLT aumenta a síntese protéica e inicia a tradução de proteínas requeridas para a entrada e progressão da fase G1 do ciclo celular. Além disso, os autores mostraram que a fosforilação de Akt é aumentada após a LLLT, o que consequentemente leva à ativação do complexo mTOR ⁽²¹⁵⁾.

A LLLT também pode ativar as PKCs (Proteína-quinase C) e Akt ⁽²¹⁶⁻²¹⁸⁾. As PKCs estão envolvidas em diferentes e até opostas funções, incluindo a proliferação celular, a promoção de tumores, diferenciação e apoptose de diversos tipos de células ^(219, 220). Um estudo mostrou que uma baixa dose de LLLT (HeNe; 632.8 nm; 0.8J/cm²) pode ativar as PKCs, e então induzir a proliferação de células de carcinoma de pulmão ⁽²¹⁶⁾. Por outro lado, altas doses de LLLT (HeNe; 632.8 nm;

60J/cm²) tiveram o efeito inverso, inativando as PKCs ⁽²¹⁶⁾. De maneira condizente, estas altas doses de LLLT foram capazes de induzir apoptose em células de adenocarcinoma de pulmão ⁽²²¹⁾.

Já a estimulação de Akt por LLLT é mediada por PI3K, e a ativação desta via é crucial para promover a proliferação celular induzida por LLLT ⁽²¹⁷⁾. Estando a via do PI3K/Akt ativada pela LLLT, a GSK-3 β é consequentemente fosforilada, o que leva à inibição da translocação de Bax e à falta de ativação da Caspase-3. Assim, a LLLT exerce seu papel antiapoptótico ⁽²¹⁸⁾. Sabe-se também que a LLLT é capaz de estimular a via do Akt/YAP (YAP – *Yes-associated protein*), protegendo as células da apoptose induzida por A β 25–35 e tornando-se então uma alternativa para o tratamento do Mal de Alzheimer ⁽²²²⁾.

Assim, estudar a conexão entre o crescimento e proliferação de células neoplásicas e a expressão de vias de sinalização e proteínas relacionadas aos seus ciclos celulares e envolvidas na carcinogênese levará a um maior entendimento dos efeitos da luz laser sobre estas células.

3 PROPOSIÇÃO

Avaliar a ação da luz laser, por meio de diferentes parâmetros, sobre a viabilidade celular e expressão da via Akt/mTOR em duas linhagens celulares de carcinoma epidermoide de boca e em uma linhagem celular de queratinócitos orais displásicos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Cultivo Celular

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da USP (Anexo A). Para a realização deste estudo foram utilizadas três linhagens celulares humanas: SCC9 e SCC25 - ATCC®, ambas provenientes de carcinomas epidermóides de língua e comercialmente obtidas; e DOK – European Cell Culture Bank®, linhagem de queratinócitos humanos orais com displasia. Estas células foram incluídas de modo a verificar os efeitos da irradiação laser em baixa intensidade em células displásicas, ou seja, células que apresentam potencial de se transformarem em uma neoplasia maligna.

As células foram descongeladas em banho-maria a 37°C por 2 minutos e transferidas para frascos de cultivo. As linhagens foram cultivadas em meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM – Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab Ltda., Campinas, SP, Brasil) e 1% de solução antibiótica – antimicótica (Sigma). As células foram mantidas em frascos a 37°C, em atmosfera úmida contendo 5% CO₂. Toda a manipulação ocorreu em capela de fluxo laminar. O crescimento das células foi monitorado diariamente em microscópio invertido de contraste de fase, e o meio de cultura trocado de acordo com o metabolismo celular.

Após ocuparem 70% do frasco, o que é denominado subconfluência, as células foram tripsinizadas e subcultivadas, dando origem a uma nova passagem. De cada passagem, uma amostra das células crioprotegida com 5-10% de dimetil sulfoxido (DMSO – Sigma) foi congelada e mantida em recipientes contendo nitrogênio líquido.

Para dar início ao experimento, as células foram tripsinizadas e após rápida centrifugação foram ressuspensas em 1mL de meio. A partir deste momento foi feita a contagem prévia do número de células cultivadas em DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de solução antibiótica – antimicótica utilizando-se a câmara de Neubauer.

4.2 Irradiação laser

Para o presente estudo, foi utilizado um laser de diodo semiconductor de arseneto de Gálio e Alumínio (GaAlAs) operando nos comprimentos de onda vermelho (660nm) e infravermelho (780nm) (Twin Flex II; MMO – São Carlos, SP – Brasil) (Figura 4.1). A área do feixe laser é de $0,039\text{cm}^2$ e a potência utilizada foi de 40mW para ambos os comprimentos de onda.

Figura 4.1 – Aparelho laser utilizado. Twin Flex - MMO - São Carlos, SP – Brasil

Foram escolhidas três densidades de energia para cada comprimento de onda disponível: $2.05\text{J}/\text{cm}^2$, $3.07\text{J}/\text{cm}^2$ e $6.15\text{J}/\text{cm}^2$. Assim, o tempo de irradiação para cada uma destas doses foi de 2s, 3s e 6s por ponto, respectivamente.

A irradiação foi feita de forma que a ponta do aparelho laser ficasse em contato com o fundo das placas de cultivo que continham cada linhagem de células. Ao mesmo tempo, a ponta permaneceu sempre perpendicular ao fundo.

A irradiação laser foi realizada 24 horas após as células terem sido semeadas, e foi sempre realizada com a luz da capela de fluxo laminar apagada, para que esta não interferisse de alguma forma na absorção dos comprimentos de onda da luz laser pelas células.

4.3 Teste de viabilidade celular

Para verificarmos o número de células viáveis e se houve aumento ou inibição de viabilidade celular nos diferentes tempos analisados (12, 24, 48 e 72 horas após a irradiação laser), realizamos o experimento de MTS. O experimento foi realizado em uma placa de ELISA (96 poços) de cor preta (GREINER BIO-ONE, Brasil) (Figura 4.2). Foram utilizadas as mesmas doses e tempos de irradiação laser previamente mencionadas. Todos os experimentos de viabilidade foram realizados em quadruplicata. O número de células plaqueadas foi de 3500 células por poço.

Foi desenhado e construído um dispositivo metálico próprio que teve por finalidade posicionar as placas na posição ideal para receberem a irradiação laser (Figura 4.3). Este dispositivo também teve por finalidade diminuir ao máximo o contato das mãos do pesquisador com as placas de cultivo, já que posteriormente foram analisadas proteínas sensíveis ao estresse, como a Hsp90.

Figura 4.2 – Placa de 96 poços na cor preta, útil para evitar o espalhamento da luz laser dentre os grupos experimentais (GREINER BIO-ONE, Brasil)

Figura 4.3 – Dispositivo metálico confeccionado para acomodar as placas de 96 poços

As células foram cultivadas em 100 μ L de meio por 24 horas, e em seguida realizou-se a irradiação laser. Após cada tempo de tratamento (12, 24, 48 e 72h), foi realizado o teste de viabilidade celular com o MTS Kit Cell Titer96 (Promega, madison, Wisconsin, USA). Em cada poço foram aplicados 20 μ L da solução Cell Titer96, seguida por incubação por 180 minutos em estufa de CO₂ a 37°C. Esta reação é baseada na conversão celular do sal tetrazolium (MTS) incolor em formazam azul por enzimas de desidrogenase presentes nas células metabolicamente ativas. Desta forma, os poços que possuem mais células viáveis produzem maior quantidade do sal formazam, tornando o meio azulado. A leitura da densidade óptica é então proporcional ao número de células viáveis, sendo realizada em um aparelho de ELISA (ELX 800 Bio-TEK instruments Inc.) com filtro de 490nm.

4.4 Western Blot

4.4.1 Extração proteica – grupo controle e grupo tratado

Após a subconfluência (70% da área cultivável), em placas de 80.5mm de diâmetro, foi realizado o tratamento com laser. A dose e o tempo de tratamento foram definidos por meio das curvas de viabilidade celular descritas para as linhagens SCC9, SCC25 e DOK.

De maneira a utilizar a densidade correta de energia, foram confeccionados adesivos aplicados ao fundo das placas de cultivo, que guiaram a irradiação laser. Cada adesivo teve furos com diâmetros correspondentes à ponta do aparelho laser utilizado e igualmente distribuídos de forma a deixarem uma área de 1cm² entre o centro de um furo e outro (Figuras 4.4). As placas foram irradiadas individualmente, com a preocupação de entregar exatamente a densidade de energia desejada a cada uma delas.

Um dispositivo-guia metálico foi também confeccionado para as novas placas utilizadas (Figura 4.4). Além disso, tomou-se o cuidado de realizar novos cálculos para que fossem entregues as mesmas densidades de energia ao mesmo número de células, assim como realizado no experimento de viabilidade celular.

Figura 4.4 – Dispositivo metálico e placa de 80.5mm com adesivo-guia durante irradiação laser

Conforme demonstrado na seção de **RESULTADOS**, foi utilizada a dose de 2.05J/cm² para os comprimentos de onda 660 e 780nm para a linhagem SCC9; 3.07J/cm² para ambos os comprimentos de onda para a linhagem SCC25 e 6.15J/cm² para também ambos os comprimentos de onda para a linhagem DOK. Assim, foram definidos seis grupos experimentais (2.05 J/cm² Vermelho e 2.05 J/cm² Infravermelho para SCC9; 3.07J/cm² Vermelho e 3.07J/cm² Infravermelho para SCC25; e 6.15J/cm² Vermelho e 6.15J/cm² Infravermelho para DOK) juntamente com seus respectivos grupos Controle (SCC9, SCC25 e DOK).

O meio de cultura foi removido para depois as placas serem lavadas 3 (três) vezes com PBS 1X a frio e colocadas sobre gelo (4°C). A extração proteica foi realizada com tampão RIPA⁺ (10 mM Tris HCl pH 7,5; 10mM desoxicolato de sódio; 1% Triton X-100; 150 mM NaCl; 0,1% SDS, 2µg/ml aprotinina, 2µg/ml pepstatina, 1mM PMSF) por 10 minutos e então as placas foram raspadas e as amostras centrifugadas a 15000 rpm por 10 (dez) minutos a 4°C. O sobrenadante foi aliquoteado e estocado a -80°C.

4.4.2 Western Blot propriamente dito

As proteínas dos lisados foram quantificadas através do método do ácido biocinconínico (BCA Protein Assay Reagent Kit – Pierce). Esse método tem por princípio a reação de peptídeos das amostras com o cobre (Cu²⁺) resultando na redução do mesmo, formando um complexo de peptídeos com o cátion cuproso (Cu⁺). Por sua vez, o ácido biocinconínico reage com o cátion cuproso, formando o complexo BCA-Cu⁺, produzindo uma cor púrpura que é lida no espectrofotômetro, no comprimento de onda de 562nm, ou seja, quanto mais intensa for a cor púrpura, ocorrerá maior absorção de luz, significando maior quantidade de proteína.

As alíquotas (30 µg) previamente quantificadas foram fervidas por 5 minutos em sample buffer (3% de dodecil sulfato e sódio (SDS), 150 mM Tris pH 6,8, 15% de mercaptoetanol, 30% de glicerol e 0,01% de azul de bromofenol) para a denaturação das proteínas. Em seguida, foram submetidas à SDS-PAGE. O gradiente dos géis de acrilamida foi definido a partir dos pesos moleculares das proteínas a serem estudadas.

A eletroforese foi realizada a 120V durante 3 (três) horas. O padrão de peso molecular utilizado foi o Kaleidoscope® (Bio Rad, Hercules, Califórnia, USA). A transferência das proteínas que migram do gel para a membrana de nitrocelulose (Hybond-P, Amersham) foi feita por eletrotransferência úmida em aparelho especial (Höefer, mini VE, Amersham Biosciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, Reino Unido). Com o tampão de transferência (48mM Tris Base; 39mM Glicina, 20% Metanol; pH 8,3) utilizado como recomendado pelo fabricante, a transferência foi feita com 70 mA por 3 (três) horas.

Para a imunorreação, foi feito bloqueio dos sítios inespecíficos com 5% de leite em pó desnatado em TBST (150mM NaCl; 50mM Tris HCl pH 7,5; 0,1% Tween 20) por 2 (duas) horas em temperatura ambiente, sob agitação. Todavia, no caso da utilização de anticorpos primários fosforilados a solução de bloqueio foi de BSA 1% em TBST (150mM NaCl; 50mM Tris HCl pH 7,5; 0,1% Tween 20).

Tabela 4.1 – Anticorpos utilizados para as reações de Western Blot e Imunofluorescência

<i>Anticorpo</i>	<i>Clone</i>	<i>Origem</i>	<i>Diluição</i>	<i>Fabricante</i>
Anti-Akt	#9272*	Rabbit	1:1000	Cell Signaling Danvers, MA, USA
Anti-pAkt	7985R*	Rabbit	1:1000	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
Anti-Hsp90	#4875*	Rabbit	1:1000	Cell Signaling Danvers, MA, USA
Anti-S6	#2217*	Rabbit	1:1000	Cell Signaling Danvers, MA, USA
Anti-pS6 ^{ser235/236}	#2211*	Rabbit	1:1000	Cell Signaling Danvers, MA, USA
Anti-pS6 ^{ser240/244}	#2215*	Rabbit	1:1000	Cell Signaling Danvers, MA, USA
Anti-Ciclina D1	#2922*	Rabbit	1:1000	Cell Signaling Danvers, MA, USA
Anti-rabbit IgG HRP	sc-2004*	Goat	1:4000	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
Anti-mouse IgG HRP	Sc-2005*	Goat	1:3000	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
β-Actina	AC-15	Mouse	1:1000	Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA
Fluorescein Anti- rabbit IgG	FI-1000*	Goat	1:100	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA

* Número de catálogo

Em seguida, a solução de bloqueio foi removida lavando-se a membrana com TBST, e o anticorpo de interesse (Tabela 4.1) foi diluído em sua respectiva solução de bloqueio, aplicado de acordo com o tempo recomendado pelo fabricante, mantido à temperatura ambiente sob agitação. Seguiram-se 3 (três) lavagens para remoção do anticorpo não absorvido com TBST sob agitação e à temperatura ambiente. Os anticorpos secundários (anti-mouse IgG HRP e anti-rabbit IgG HRP – tabela 4.1) foram diluídos em sua solução de bloqueio respectiva e então aplicados por 1 (uma) hora, e depois lavados em TBST por 5 minutos e PBS por 2 (duas) vezes por 10 (dez) minutos.

A detecção colorimétrica foi feita através do kit Bio-Rad. Uma parte do diluente concentrado Opti-4CN foi adicionada a 9 (nove) partes de água deionizada. Foram utilizados 0,25ml para cada cm^2 da membrana. Para cada 10ml do diluente preparado foi adicionado 0,2ml de substrato Opti-4CN, que após ser bem misturado, foi colocado sobre a membrana. A membrana foi incubada no substrato por até 30 (trinta) minutos, no escuro, depois lavada em água deionizada por 15 (quinze) minutos, e pronta para documentação.

Como controle, foi utilizado o anticorpo gerado em camundongo β -actina (Sigma) (Tabela 4.1).

4.5 Imunofluorescência

O cultivo celular foi realizado em placas de área 9.6cm^2 (Placas contendo 12 poços), contendo uma lamínula previamente autoclavada. Novamente, de maneira a guiar a irradiação laser, adesivos foram confeccionados e aplicados ao fundo das placas de 12 poços (Figura 4.5) e o mesmo dispositivo metálico desenvolvido para as placas de 96 poços foi utilizado (Figura 4.3). As doses do laser aplicadas foram as mesmas utilizadas para o experimento de Western Blot, extraídas dos experimentos prévios de viabilidade celular e correspondentes à cada linhagem celular estudada. O experimento também contou com respectivos grupos controle para cada linhagem celular.

As lamínulas contendo as células foram lavadas em PBS 1X, e foi acrescentado, após a lavagem, metanol suficiente para cobrir as lamínulas. O metanol foi deixado em contato com as células por 6 minutos no *freezer* (-20°C). Após esse período, as lamínulas foram lavadas (3 vezes de 5 minutos) com PBS 1X. Após as lavagens, foi colocada sobre as lamínulas 50 µL de solução de PBS + BSA a 1% por 30 minutos.

Figura 4.5 – Placa de 12 poços com adesivo-guia aplicado ao fundo

Os anticorpos primários (Tabela 4.1) foram diluídos em PBS+BSA a 1% e reagiram *overnight*. Posteriormente, as lamínulas foram lavadas na solução já citada. Após tal lavagem, foi colocado sobre as lamínulas o anticorpo secundário (Fluoresceína anti-rabbit IgG - H+L – Tabela 4.1) na concentração 1:100 diluído em PBS+BSA a 1% por 90 minutos, e a reação ocorreu na ausência de luz. As lamínulas foram novamente lavadas com PBS 1X, para posterior montagem das lâminas com Vecta Shield® (Vector Laboratories, Ind.Burlingame, CA 94010). As lamínulas foram fixadas com o uso de esmalte incolor e armazenadas na geladeira na ausência de luz para posterior análise no microscópio de fluorescência (Zeiss Axiophot II, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha). Por fim, as lamínulas pertencentes

a todas as linhagens foram fotografadas no mesmo microscópio de fluorescência, utilizando o programa (AxioVision, v. 4.8, Carl Zeiss, Alemanha), e analisadas de acordo com a localização intracelular de proteínas.

4.6 Análise de Apoptose

Em todos os casos em que foi detectada diminuição da viabilidade celular, foi investigado se esse fato se deu por indução de apoptose pela luz laser. Para detecção de apoptose, as linhagens celulares foram plaqueadas e tratadas da mesma forma como no estudo da imunofluorescência.

A apoptose celular foi identificada por meio do método TUNEL (*TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling* - Promega, Madison, Wisconsin, EUA). Após fixação com solução de paraformaldeído a 4%, por 25 minutos a 4°C, as lamínulas foram lavadas duas vezes com PBS (cada lavagem durou 5 minutos) e, em seguida as lamínulas foram permeabilizadas com a solução de Triton X 100 a 2%, diluída em PBS em temperatura ambiente.

Após as lavagens, as lamínulas foram incubadas com os reagentes pertencentes ao *kit* DeadEnd Fluorometric Tunel System (Promega, Inc.), sendo o tempo, concentração e sequência de reações realizados conforme o manual do fabricante (Promega, Inc.).

Com o objetivo de comparar as taxas de apoptose no grupo controle com as taxas dos grupos submetidos à irradiação laser, foi necessária a determinação do índice de células apoptóticas. Para tal, foram contadas, em quatro campos (200X) escolhidos de forma aleatória no microscópio, o número total de células presentes e o número de células em apoptose. Com isto, obteve-se a porcentagem de células apoptóticas em cada linhagem celular.

4.7 Análise estatística

Testes ANOVA dois critérios e de Tukey, ambos com significância de 5%, foram utilizados para determinar se existiram ou não diferenças estatisticamente significantes entre a viabilidade celular dos grupos que receberam irradiação laser e seus respectivos grupos controle.

Para determinar se existiram quedas significativas nas curvas de viabilidade celular dentro de um mesmo grupo, o que indicaria inibição significativa de viabilidade celular, foi utilizado o teste T de estudante, com nível de significância de 5%. Além disso, para encontrar diferenças significativas entre o índice de células apoptóticas de cada linhagem, foi realizado este mesmo teste estatístico.

Todas as análises estatísticas foram feitas por meio do software StatPlus:mac (Analystsoft® Inc., Vancouver, BC, Canadá).

5 RESULTADOS

5.1 Viabilidade celular

Como descrito na seção de Material e Métodos, os experimentos de viabilidade celular foram realizados em quadruplicata e estão ilustrados nas figuras 5.1 a 5.6.

Figura 5.1 – Valores médios de absorvância e seus respectivos desvios para a linhagem SCC9 – Comprimento de onda 660nm

Figura 5.2 – Valores médios de absorvância e seus respectivos desvios para a linhagem SCC9 – Comprimento de onda 780nm

Figura 5.3 – Valores médios de absorvância e seus respectivos desvios para a linhagem SCC25 – Comprimento de onda 660nm

Figura 5.4 – Valores médios de absorbância e seus respectivos desvios para a linhagem SCC25 – Comprimento de onda 780nm

Figura 5.5 – Valores médios de absorbância e seus respectivos desvios para a linhagem DOK – Comprimento de onda 660nm

Figura 5.6 – Valores médios de absorvância e seus respectivos desvios para a linhagem DOK – Comprimento de onda 780nm

5.2 Análise estatística e escolha dos valores de dose do laser

Para selecionar as densidades de energia laser que mais provocaram alteração na viabilidade celular das diferentes linhagens, foi realizada a análise estatística dos valores obtidos com o teste de viabilidade celular.

A análise estatística consistiu inicialmente no teste de ANOVA dois critérios, para uma análise global (nível de significância de 5%) e, posteriormente, para os grupos que apresentaram significância, no teste de Tukey (nível de significância de 5%), que visou a comparação dos grupos par a par.

Abaixo podem ser observadas as tabelas correspondentes à análise estatística realizada de ANOVA dois critérios e posterior análise par a par por meio do teste de Tukey (Tabelas 5.1 a 5.3).

Tabela 5.1 – Análise estatística para as taxas de viabilidade celular da linhagem SCC9, grupos vermelho e infravermelho. Valores em vermelho representam os valores estatisticamente significantes

	ANOVA	Valor de <i>p</i>
	12h	0,111
SCC9 660nm	24h	0,002
	48h	0,002
	72h	0,007
	ANOVA	Valor de <i>p</i>
	12h	0,012
SCC9 780nm	24h	0,003
	48h	0,023
	72h	0,002

	Teste de Tukey para grupos significativos	Valor de <i>p</i>		Teste de Tukey para grupos significativos	Valor de <i>p</i>
	24h (C X 2 J/cm ²)	0.01218		12h (C X 2 J/cm ²)	0.03894
SCC9 660nm	24h (C X 3 J/cm ²)	0.00375	SCC9 780nm	12h (C X 3 J/cm ²)	0.89223
	24h (C X 6 J/cm ²)	0.00312		12h (C X 6 J/cm ²)	0.70961
	24h (2 X 3 J/cm ²)	0.06472		12h (2 X 3 J/cm ²)	0.03798
	24h (2 X 6 J/cm ²)	0.04968		12h (2 X 6 J/cm ²)	0.02979
	24h (3 X 6 J/cm ²)	0.44228		12h (3 X 6 J/cm ²)	0.68809
	48h (C X 2 J/cm ²)	0.15425		24h (C X 2 J/cm ²)	0.00031
	48h (C X 3 J/cm ²)	0.00317		24h (C X 3 J/cm ²)	0.23384
	48h (C X 6 J/cm ²)	0.0254		24h (C X 6 J/cm ²)	0.49727
	48h (2 X 3 J/cm ²)	0.03724		24h (2 X 3 J/cm ²)	0.02541
	48h (2 X 6 J/cm ²)	0.07583		24h (2 X 6 J/cm ²)	0.00253
	48h (3 X 6 J/cm ²)	0.01364		24h (3 X 6 J/cm ²)	0.35929
	72h (C X 2 J/cm ²)	0.01328		48h (C X 2 J/cm ²)	0.03231
	72h (C X 3 J/cm ²)	0.02892		48h (C X 3 J/cm ²)	0.02471
	72h (C X 6 J/cm ²)	0.0173		48h (C X 6 J/cm ²)	0.11584
	72h (2 X 3 J/cm ²)	0.98971		48h (2 X 3 J/cm ²)	0.24901
	72h (2 X 6 J/cm ²)	0.6594		48h (2 X 6 J/cm ²)	0.05754
	72h (3 X 6 J/cm ²)	0.40036		48h (3 X 6 J/cm ²)	0.26378
				72h (C X 2 J/cm ²)	0.27714
				72h (C X 3 J/cm ²)	0.00012
				72h (C X 6 J/cm ²)	0.00017
				72h (2 X 3 J/cm ²)	0.03421
				72h (2 X 6 J/cm ²)	0.03617
				72h (3 X 6 J/cm ²)	0.8305

Tabela 5.2 – Análise estatística para as taxas de viabilidade celular da linhagem SCC25, grupos vermelho e infravermelho. Valores em vermelho representam os valores estatisticamente significantes

SCC25	ANOVA	Valor de <i>p</i>
660nm	12h	0,423
	24h	0,345
	48h	0,003
	72h	<0,001
SCC25	ANOVA	Valor de <i>p</i>
780nm	12h	0,659
	24h	0,003
	48h	0,005
	72h	0,001

SCC25	Teste de Tukey para grupos significativos	Valor de <i>p</i>	SCC25	Teste de Tukey para grupos significativos	Valor de <i>p</i>
660nm	48h (C X 2 J/cm ²)	0.35694	780nm	24h (C X 2 J/cm ²)	0.97934
	48h (C X 3 J/cm ²)	0.00644		24h (C X 3 J/cm ²)	0.94108
	48h (C X 6 J/cm ²)	0.1526		24h (C X 6 J/cm ²)	0.03414
	48h (2 X 3 J/cm ²)	0.02284		24h (2 X 3 J/cm ²)	0.9308
	48h (2 X 6 J/cm ²)	0.72156		24h (2 X 6 J/cm ²)	0.04282
	48h (3 X 6 J/cm ²)	0.01922		24h (3 X 6 J/cm ²)	0.04372
	72h (C X 2 J/cm ²)	0.01246		48h (C X 2 J/cm ²)	0.00148
	72h (C X 3 J/cm ²)	0.78184		48h (C X 3 J/cm ²)	0.00103
	72h (C X 6 J/cm ²)	0.00263		48h (C X 6 J/cm ²)	0.34474
	72h (2 X 3 J/cm ²)	0.00214		48h (2 X 3 J/cm ²)	0.04837
	72h (2 X 6 J/cm ²)	0.00103		48h (2 X 6 J/cm ²)	0.00102
	72h (3 X 6 J/cm ²)	0.0094		48h (3 X 6 J/cm ²)	0.00088
				72h (C X 2 J/cm ²)	0.99445
				72h (C X 3 J/cm ²)	0.00308
				72h (C X 6 J/cm ²)	0.00801
				72h (2 X 3 J/cm ²)	0.00465
				72h (2 X 6 J/cm ²)	0.02285
				72h (3 X 6 J/cm ²)	0.14684

Tabela 5.3 – Análise estatística para as taxas de viabilidade celular da linhagem DOK, grupos vermelho e infravermelho. Valores em vermelho representam os valores estatisticamente significantes

DOK	ANOVA	Valor de <i>p</i>
660nm	12h	0,004
	24h	0,155
	48h	0,007
	72h	0,036
DOK	ANOVA	Valor de <i>p</i>
780nm	12h	0,227
	24h	0,271
	48h	0,063
	72h	0,001

DOK	Teste de Tukey para grupos significativos	Valor de <i>p</i>	DOK	Teste de Tukey para grupos significativos	Valor de <i>p</i>
660nm	12h (C X 2 J/cm ²)	0.00124	780nm	72h (C X 2 J/cm ²)	0.11295
	12h (C X 3 J/cm ²)	0.34303		72h (C X 3 J/cm ²)	0.02769
	12h (C X 6 J/cm ²)	0.66585		72h (C X 6 J/cm ²)	0.00119
	12h (2 X 3 J/cm ²)	0.3522		72h (2 X 3 J/cm ²)	0.16474
	12h (2 X 6 J/cm ²)	0.00398		72h (2 X 6 J/cm ²)	0.01736
	12h (3 X 6 J/cm ²)	0.12258		72h (3 X 6 J/cm ²)	0.20189
	48h (C X 2 J/cm ²)	0.04985			
	48h (C X 3 J/cm ²)	0.00193			
	48h (C X 6 J/cm ²)	0.03289			
	48h (2 X 3 J/cm ²)	0.35907			
	48h (2 X 6 J/cm ²)	0.82424			
	48h (3 X 6 J/cm ²)	0.18067			
	72h (C X 2 J/cm ²)	0.09335			
	72h (C X 3 J/cm ²)	0.14929			
	72h (C X 6 J/cm ²)	0.04173			
	72h (2 X 3 J/cm ²)	0.80565			
	72h (2 X 6 J/cm ²)	0.05447			
	72h (3 X 6 J/cm ²)	0.33029			

5.3 Western Blot

Conforme exemplificado nas tabelas e figuras acima, os grupos que apresentaram maior significância estatística em relação a seus respectivos grupos controle corresponderam às densidades de energia $3.07\text{J}/\text{cm}^2$ para a linhagem SCC25, em ambos os comprimentos de onda e no período de 48 horas (viabilidade celular aumentada); $2.05\text{J}/\text{cm}^2$ para a linhagem SCC9 em ambos os comprimentos de onda e nos períodos de 24 e 72 horas (inibição de viabilidade celular para o comprimento de onda vermelho em 24 e 72 horas, e aumento de viabilidade para o comprimento de onda infravermelho em 24 horas); e $6.15\text{J}/\text{cm}^2$ para a linhagem DOK, em ambos os comprimentos de onda (aumento de viabilidade celular com o comprimento de onda vermelho nos períodos 48 e 72 horas, e com o comprimento de onda infravermelho no período de 72 horas). Estes períodos mais relevantes foram escolhidos para os experimentos de Western Blot. De qualquer forma, os períodos de 12 horas e 72 horas também foram incluídos para todas as linhagens. Isto ocorreu para que se verificasse a ação do laser em um primeiro momento e também no último período avaliado, constatando se os efeitos iniciais eram mantidos até o fim do experimento.

O ensaio de western blotting indicou a expressão das proteínas ciclina D1, Akt, pAkt, Hsp90, S6, pS6^{ser235/236} e pS6^{ser240/244} quantitativamente, mostrando a real resposta celular frente ao tratamento aplicado, e as possíveis relações entre estes eventos. Os resultados de western blotting para todas as linhagens estudadas encontram-se abaixo (Figura 5.7).

Figura 5.7 – Western Blotting das linhagens celulares DOK, SCC9 e SCC25 em cada tempo experimental (Ctrl = Controle; V = Comprimento de Onda Vermelho; IV = Comprimento de Onda Infravermelho)

Por meio da análise das bandas obtidas com a técnica de western blot pode-se concluir que a LLLT foi capaz de alterar a expressão das proteínas estudadas em todas as linhagens celulares analisadas. Dentre os resultados mais relevantes encontram-se a expressão aumentada de $pS6^{\text{ser240/244}}$ (grupos V e IV) em 12 e 48 horas para linhagem DOK. Houve também aumento de expressão de Ciclina D1 em 12 (grupos V e IV) e 48 horas (grupo V) para DOK, além de expressão atenuada de $pS6^{\text{ser235/236}}$ e $pS6^{\text{ser240/244}}$ em 72 horas para a mesma linhagem (grupo IV).

Além disso, a linhagem SCC9 (grupo IV) apresentou níveis elevados de pAkt e Ciclina D1 em 12 horas; diminuição de pAkt, porém aparecimento de isoforma de Hsp90 e aumento de Ciclina D1 em 24 horas (grupo IV); e diminuição de pAkt, diminuição de Hsp90 e Ciclina D1 em 72 horas (grupo IV); também foram notados aumentos focais de expressão de Ciclina D1 em 12, 24 e 72 horas com o grupo Vermelho na linhagem SCC9.

Por fim, quando a linhagem SCC25 foi avaliada, aumento discreto nos níveis de pAkt, $pS6^{\text{ser240/244}}$ e Ciclina D1 foram notados em 12 horas (V); Em 48 horas, foi observado diminuição da expressão de pAkt, além de aumento da expressão de $pS6^{\text{ser240/244}}$ e Ciclina D1, para ambos os comprimentos de onda utilizados; Já em 72 horas, uma diminuição discreta nos níveis de pAkt (IV) foi detectada, sendo que este mesmo comprimento de onda foi responsável por aumentar levemente a expressão de $pS6^{\text{ser235/236}}$ no mesmo período. Por fim, a isoforma Hsp90N apareceu em todos

os grupos de SCC25 em 12 horas, sendo apenas mantida notoriamente em 48 horas no grupo IV.

Estes resultados encontram-se resumidos na tabela 5.4.

Tabela 5.4 – Resumo de resultados relevantes quanto à expressão de proteínas detectada por meio de Western Blotting em todas linhagens celulares - ↑ (aumento) e ↓ (diminuição) de níveis proteicos, respectivamente. * (detecção de Hsp90N). Cor azul (12 horas); cor vermelha (24 horas); cor verde (48 horas) e cor preta (72 horas)

	DOK		SCC9		SCC25	
	V	IV	V	IV	V	IV
pAkt				↑↓	↑↓	↓↓
Hsp90				↓		
Hsp90N				*	*	**
pS6ser240/244	↑↑	↑↑↓		↑	↑↑	↑
pS6ser235/236		↓				↑
Ciclina D1	↑↑	↑	↑↑↑	↑↑↓	↑↑	↑↑

5.4 Imunofluorescência

A imunofluorescência serviu para verificarmos a distribuição intracelular das proteínas estudadas. Desta forma, a localização intracelular de ciclina D1, Akt, pAkt, Hsp90, S6, pS6^{ser235/236} e pS6^{ser240/244} após LLLT, e em células cultivadas sem nenhum estímulo foi determinada.

Os resultados de imunofluorescência para as linhagens DOK, SCC9 e SCC25 encontram-se abaixo (Figuras 5.8 a 5.16).

Figura 5.8 – Imagens da reação de imunofluorescência para as diversas proteínas estudadas na linhagem DOK – Grupos Controle (Ctrl), Vermelho (V) e Infravermelho (IV) no período de 12 horas – Aumento 400X

Figura 5.9 – Imagens da reação de imunofluorescência para as diversas proteínas estudadas na linhagem DOK – Grupos Controle (Ctrl), Vermelho (V) e Infravermelho (IV) no período de 48 horas – Aumento 400X

Figura 5.10 – Imagens da reação de imunofluorescência para as diversas proteínas estudadas na linhagem DOK – Grupos Controle (Ctrl), Vermelho (V) e Infravermelho (IV) no período de 72 horas – Aumento 400X

Figura 5.11 – Imagens da reação de imunofluorescência para as diversas proteínas estudadas na linhagem SCC9 – Grupos Controle (Ctrl), Vermelho (V) e Infravermelho (IV) no período de 12 horas – Aumento 400X

Figura 5.12 – Imagens da reação de imunofluorescência para as diversas proteínas estudadas na linhagem SCC9 – Grupos Controle (Ctrl), Vermelho (V) e Infravermelho (IV) no período de 24 horas – Aumento 400X

Figura 5.13 – Imagens da reação de imunofluorescência para as diversas proteínas estudadas na linhagem SCC9 – Grupos Controle (Ctrl), Vermelho (V) e Infravermelho (IV) no período de 72 horas – Aumento 400X

Figura 5.14 – Imagens da reação de imunofluorescência para as diversas proteínas estudadas na linhagem SCC25 – Grupos Controle (Ctrl), Vermelho (V) e Infravermelho (IV) no período de 12 horas – Aumento 400X

Figura 5.15 – Imagens da reação de imunofluorescência para as diversas proteínas estudadas na linhagem SCC25 – Grupos Vermelho (V), Infravermelho (IV) e Controle (Ctrl) no período de 48 horas – Aumento 400X

Figura 5.16 – Imagens da reação de imunofluorescência para as diversas proteínas estudadas na linhagem SCC25 – Grupos Vermelho (V), Infravermelho (IV) e Controle (Ctrl) no período de 72 horas – Aumento 400X

Por meio da análise de imunofluorescência pode-se verificar que a intensidade de expressão das diversas proteínas estudadas foi condizente com aquela vista por Western Blot. Todavia, a técnica de imunofluorescência é utilizada para avaliação qualitativa, e não quantitativa das amostras.

A localização intracelular das proteínas estudadas, com exceção de pAkt, não foi modificada por LLLT. Assim, notou-se expressão citoplasmática e, por vezes, citoplasmática e nuclear de Akt em todas as linhagens estudadas e em todos os grupos experimentais. A expressão de pAkt, no entanto, variou de citoplasmática e nuclear para apenas nuclear em 24 horas para os grupos vermelho e infravermelho de SCC9. Em todos os demais períodos e linhagens a expressão foi citoplasmática ou citoplasmática e nuclear.

Notou-se ainda que a expressão de pS6^{ser240/244} foi geralmente citoplasmática ou citoplasmática e nuclear para todos os grupos de um determinado período avaliado. Já a expressão das proteínas pS6^{ser235/236} e S6 foi principalmente citoplasmática em todos os grupos e linhagens celulares.

Por fim, a proteína Hsp90 esteve presente nos citoplasmas ou citoplasmas e núcleos das células, não havendo diferenças relevantes de sua expressão entre os grupos laser e controle de cada linhagem. Enquanto isso, a expressão de Ciclina D1 foi expressivamente nuclear para todos os grupos experimentais.

Por fim, por meio da análise da imunofluorescência pode-se perceber que a LLLT não induziu alterações morfológicas nas células estudadas.

5.5 Análise de apoptose

De maneira a encontrar os grupos que apresentaram queda significativa de viabilidade celular, foi realizada uma análise estatística que consistiu em comparar os valores de viabilidade entre os períodos existentes de um mesmo grupo experimental. O teste utilizado foi um teste T de estudante, com nível de significância de 5%. Os grupos que apresentaram queda significativa em sua viabilidade estão representados na Tabela 5.5, em conjunto com seus respectivos valores estatísticos.

Tabela 5.5 – Quedas significativas em viabilidade celular detectadas por análise estatística

Linhagem	Grupo	Queda em	Valor de <i>p</i>
SCC9	660nm/2.05 J/cm ²	72 horas	0.00084
	660nm/3.07 J/cm ²	72 horas	0.00852
	660nm/6.15 J/cm ²	72 horas	0.00529
	780nm/2.05 J/cm ²	72 horas	0.00101
	780nm/3.07 J/cm ²	72 horas	0.00159
	780nm/6.15 J/cm ²	72 horas	0.00079
SCC25	660nm/3.07 J/cm ²	72 horas	0.00072
	660nm/6.15 J/cm ²	72 horas	0.00226
	780nm/6.15 J/cm ²	48 horas	0.00128
	780nm/3.07 J/cm ²	72 horas	0.00065

A partir da Tabela 5.5 foram escolhidos os grupos com queda mais significativa de cada período e comprimento de onda analisado. Assim, os grupos escolhidos foram: SCC9 – V – 2.05 J/cm² – 72 horas; SCC9 – IV – 6.15 J/cm² – 72 horas; SCC25 – V – 3.07 J/cm² – 72 horas; SCC25 – IV – 6.15 J/cm² – 48 horas; e SCC25 – IV – 3.07 J/cm² – 72 horas. Para estes grupos foi realizado o teste de TUNEL, evidenciando a quantidade de células totais pela coloração de seus núcleos com DAPI (emitindo fluorescência azul) e células em apoptose, detectadas por fluorescência na cor verde (Figura 5.17 e 5.18).

Figura 5.17 – Células em apoptose da linhagem SCC9 detectadas por meio do método de TUNEL: A – Controle em 72 horas (200X); B – Controle positivo em 72 horas (200X); C – 2.05 J/cm² (V) em 72 horas (200X); D – 6.15 J/cm² (IV) em 72 horas (200X)

Figura 5.18 – Células em apoptose da linhagem SCC25 detectadas por meio do método de TUNEL: A – Controle em 48 horas (200X); B – Controle em 72 horas (200X); C – Controle positivo em 72 horas (200X); D – 6.15 J/cm² (IV) em 48 horas (200X); E – 3.07 J/cm² (IV) em 72 horas (200X); F – 3.07 J/cm² (V) em 72 horas (200X)

Posteriormente, o índice de células apoptóticas foi calculado para cada um dos grupos selecionados por meio do teste T de estudante, com nível de significância de 5% (Figura 5.19). Os grupos controle de cada linhagem não apresentaram sinal de células apoptóticas, bem como os grupos 2.05 (V) e 6.15 J/cm² (IV) da linhagem SCC9 em 72 horas e o grupo 3.07 J/cm² (V) da linhagem SCC25; assim, estes grupos não foram representados na Figura 5.19.

Figura 5.19 – Porcentagem de células em apoptose para cada um dos grupos estudados por meio do método de TUNEL. *p<0.01; **p<0.001 em relação a seus respectivos grupos controle

6 DISCUSSÃO

O carcinoma epidermoide de boca representa mais de 95% das neoplasias malignas de cavidade oral ⁽²²³⁾ e, apesar de uma baixa porcentagem dos casos ser diagnosticada a tempo de proporcionar alguma terapia ou cura ^(3, 5, 6), nos últimos anos tem havido uma tendência à detecção precoce do câncer de boca no Brasil ⁽¹⁰⁾. Além disso, sabe-se que a presença de displasia epitelial é um dos fatores mais importantes para a possível transformação maligna de uma lesão ⁽²²⁴⁾. Por isso, a presença de displasia deve ser checada cuidadosamente no caso da existência de uma lesão intraoral com potencial de transformação maligna.

O surgimento de um carcinoma oral está, na maioria das vezes, ligado à exposição dos tecidos orais a carcinógenos. Dentre os principais hábitos prejudiciais e capazes de induzir o câncer estão o etilismo e tabagismo ^(225, 226). O hábito do tabagismo, por exemplo, leva ao contato direto de substâncias nocivas com células epiteliais, as quais podem ter seu DNA danificado e não reparado, contribuindo para o processo de carcinogênese ⁽²²⁷⁾.

A radiação ultravioleta, por outro lado, é ionizante e também capaz de induzir danos ao DNA ^(228, 229), estando envolvida na maioria dos cânceres de pele ⁽²³⁰⁾. No entanto, o que determina se uma radiação tem potencial ionizante, ou seja, potencial de ionizar átomos, partir ligações químicas e causar mutações é seu comprimento de onda e, conseqüentemente, sua energia ⁽¹⁶⁴⁾. A radiação laser, no caso, operando nos comprimentos de onda visíveis e infravermelhos, é caracterizada como não-ionizante e, portanto, sem quaisquer efeitos mutagênicos ⁽²³¹⁾.

De qualquer forma, estudos mostram que a LLLT pode induzir respostas diversas nas células irradiadas, o que depende não só do comprimento de onda utilizado, mas também da potência e dos parâmetros da irradiação laser em geral, e também do próprio tecido que está sendo irradiado ⁽²⁰¹⁻²⁰⁵⁾. Assim, apesar de não ser considerada uma radiação ionizante e não induzir danos ao DNA, a LLLT tem o poder de alterar comportamentos celulares. Desta forma, autores contraindicam seu uso em lesões proliferativas e de tecido glandular, além de lesões cujo diagnóstico é difícil em um estágio inicial ⁽²⁰⁶⁾ e podem apresentar potencial de transformação maligna.

De maneira interessante, o uso da LLLT em células neoplásicas leva a efeitos que estimulam ou inibem a viabilidade destas células ⁽²¹⁰⁾. Além disso, é apontado o fato de que células irradiadas em cultura não refletem a realidade biológica tão complexa que um câncer mantém com seu hospedeiro ^(211, 212, 232). Isto acontece porque existem outros fatores que podem influenciar o crescimento de um tumor e que podem ser modulados pela LLLT ⁽²⁰²⁾.

Sabe-se que a LLLT pode, por exemplo, aumentar o potencial de angiogênese ⁽²³³⁻²³⁵⁾, a síntese de fatores de crescimento ⁽²³⁶⁻²³⁸⁾, de metabólitos da inflamação ⁽²³⁹⁾, assim como modular as células inflamatórias e a resposta imunológica do paciente ⁽²⁴⁰⁻²⁴²⁾. Por isso, a LLLT pode induzir efeitos distintos *in vivo* e *in vitro* em tumores ⁽²⁰²⁾, já que o cultivo de células não apresenta a complexidade encontrada em um organismo.

De qualquer forma, o método de cultura celular é o mais importante para se estudar e entender processos biológicos básicos, além da possível reação celular frente a diferentes tratamentos ⁽²⁰²⁾. Assim, o método de cultura de células é o mais válido para se estudar determinadas vias de sinalização frente à irradiação laser. De maneira condizente, células de diversas origens, incluindo carcinomas, sarcomas e mielomas já foram cultivadas e contribuíram para o melhor entendimento dos efeitos da luz laser nestes tumores ^(207, 243-247).

O presente estudo revelou que a LLLT pode induzir diferentes taxas de viabilidade nas três linhagens celulares escolhidas. Na verdade, as doses utilizadas aqui são apenas uma representação da energia laser e, nada impede que outras densidades de energia, bem como outras densidades de potência possam influenciar células displásicas e neoplásicas de outra forma que não esta encontrada no presente estudo.

No entanto, os parâmetros da energia laser escolhidos neste projeto tiveram o propósito de serem equivalentes àqueles utilizados na clínica odontológica, em especial no tratamento da mucosite oral ⁽²⁴⁸⁾, vista a íntima relação existente entre o grupo de pacientes com mucosite oral e LLLT. No caso de um câncer de cabeça e pescoço, células neoplásicas podem estar no campo de irradiação laser indesejavelmente, durante o tratamento de mucosite oral ⁽²⁴⁹⁾.

A princípio, seria importante observar o crescimento das células da linhagem DOK, de displasia epitelial. É muito interessante o que nos revela o ensaio de MTS, em que as taxas de viabilidade celular desta linhagem encontram-se aumentadas

em praticamente todos os períodos de avaliação. Em 72 horas, há crescimento estatisticamente significativo para a dose de 6.15 J/cm^2 (Vermelho - V) e de 3.07 e 6.15 J/cm^2 (Infravermelho - IV). Desta maneira, mostrou-se imprescindível a investigação da via de sinalização Akt/mTOR para estes grupos, nesta linhagem.

Já as linhagens celulares de CECp (SCC9 e SCC25) sofreram mudanças interessantes que variaram desde inibição até aumento de viabilidade após LLLT. Ambos os comprimentos de onda utilizados foram capazes de induzir tanto aumento (SCC9 – 2.05 J/cm^2 – IV em 12, 24 e 48 horas; SCC25 – 3.07 J/cm^2 – V em 48 horas e 3.07 J/cm^2 – IV em 48 horas) quanto inibição significativos de viabilidade celular (SCC9 – todas as doses – V em 24 horas; 3.07 J/cm^2 e 6.15 J/cm^2 – V em 48 horas; todas as doses – V em 72 horas; SCC25 – 6.15 J/cm^2 – V em 72 horas; 3.07 e 6.15 J/cm^2 – IV em 72 horas).

É necessário levar em consideração também que as diminuições significativas encontradas após um aumento de viabilidade celular podem ter sido induzidas secundariamente, devido à inibição de crescimento por contato existente em altas densidades celulares ⁽²⁵⁰⁾. Assim, com exceção dos grupos SCC9 (Vermelho), as inibições de viabilidade celular podem não ter sido causadas diretamente pela irradiação laser.

O fato de haver inibição da viabilidade celular frente à irradiação laser em baixa intensidade não é um achado inédito. Outros estudos já demonstraram que a LLLT, quando aplicada sob altas fluências, pode sim causar diminuição das células viáveis ^(209, 221, 251). Mas apesar destes estudos terem encontrado efeitos inibitórios, as densidades de energia utilizadas por eles foram expressivamente mais altas do que as utilizadas em nosso estudo. Assim, é possível afirmar com o presente estudo que doses relativamente menores também podem causar inibição de viabilidade em células neoplásicas. Além disso, os efeitos de LLLT aconteceram já a partir das 12 horas, primeiro período de avaliação, e se estenderam, em alguns grupos, até o último período avaliado.

Em contraste com os resultados encontrados para a linhagem SCC9 com o comprimento de onda vermelho, os outros grupos experimentais revelaram aumento da viabilidade celular frente à LLLT, o que também está de acordo com a literatura, que indica o aumento de viabilidade a longo prazo em diferentes tipos de células ^(216, 217, 252-254).

Na verdade, os ensaios de MTT ou MTS são baseados em um sal de tetrazolium, o qual é reduzido a cristais de formazam principalmente pela succinato desidrogenase das mitocôndrias ^(255, 256). Teoricamente, a intensidade da cor produzida pelo formazam é correlacionada à viabilidade celular (quanto mais intensa a cor púrpura, maior o número de células viáveis). No entanto, alguns experimentos podem mudar a atividade da succinato desidrogenase mitocondrial, assim como alguns compostos químicos podem interagir com o sal de tetrazolium diretamente ^(257, 258). Ambos os eventos fazem com que os resultados obtidos não sejam extremamente fieis à proliferação ou inibição de crescimento celular ⁽²⁵⁹⁾.

Assim, como o ensaio de MTS revela a atividade mitocondrial das células e a LLLT pode ter influência na mesma ⁽²⁶⁰⁾, o mais correto seria concluir que o laser modificou esta atividade, aumentando-a ou diminuindo-a, ao invés de traduzir os resultados apenas como promoção ou inibição de proliferação celular. De fato, a literatura mostra que a LLLT (AsGa; λ 904nm; 5J/cm²) aumentou significativamente a atividade de succinato desidrogenase mitocondrial em músculo esquelético após injúria, além de ter influenciado positivamente também os complexos I, II, III e IV da cadeia respiratória ⁽²⁶¹⁾.

O aumento da atividade mitocondrial muitas vezes encontrado em células que tiveram contato com LLLT ⁽²⁶²⁻²⁶⁶⁾ é, na realidade, importante para o estabelecimento de alguns tratamentos, como o de traumatismo craniano ⁽¹⁷⁴⁾ e de regeneração de células nervosas ⁽²⁶⁷⁾. Isto porque um aumento da atividade das mitocôndrias leva à consequente geração de ATP e aceleração do metabolismo celular ⁽²⁶¹⁾, tornando-se importante para a reparação tecidual frente a injúrias, por exemplo ⁽²⁶⁸⁻²⁷⁰⁾.

No entanto, em células displásicas ou de carcinoma epidermoide, este aumento de viabilidade não é desejado. Uma maior geração de ATP foi detectada em células tumorais em estágio proliferativo ⁽²⁷¹⁾ e Muller et al., já haviam sugerido que uma estratégia para suprimir a proliferação acelerada de tumores seria a de simultaneamente bloquear ambas as vias de geração de ATP ⁽²⁷²⁾, já que células tumorais podem depender tanto de glicólise como de fosforilação oxidativa para gerar ATP ⁽²⁷³⁾.

De fato, o AMPK (AMP-ativado proteína-quinase) presente nas células é ativado por uma queda na produção de ATP ou por estímulos que aumentem a razão AMP/ATP. Assim, quando inibidores da síntese de ATP ativam o AMPK, este é responsável por inibir mTOR e reter o ciclo celular na fase G1, além de induzir

células de câncer de cólon à autofagia ⁽²⁷⁴⁾. Como recentemente apontado por Hanahan e Weinberg ⁽⁴¹⁾, além das características já consolidadas das células de câncer ⁽¹⁶⁾, é importante também o ajuste de metabolismo energético empregado por elas, de maneira a alimentar seu crescimento e divisão ⁽⁴¹⁾.

Outros estudos tem mostrado que medicamentos capazes de agir na cadeia respiratória e suprimir a atividade mitocondrial podem ser utilizados como drogas antineoplásicas, inibindo o crescimento de diversas linhagens celulares de câncer ⁽²⁷⁵⁾. Um dos mecanismos possíveis é o bloqueio do complexo I da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, por sua vez ativando também o AMPK, e então inibindo a fosforilação de STAT3, o que impede sua translocação para o núcleo, evitando a transcrição de Bcl-XL, Bcl-2 e Ciclina D1 ^(276, 277).

Conforme demonstrado nos resultados acima, dependendo do período e comprimento de onda utilizado, todas as linhagens celulares apresentaram certo aumento de sua atividade mitocondrial após receberem LLLT. De maneira condizente, LLLT foi capaz de aumentar a síntese de ATP em células de adenocarcinoma de mama ⁽²⁵¹⁾ e células HeLa ⁽²⁷⁸⁾. De qualquer forma, foi também importante checar, além desta modificação de viabilidade celular, a alteração da expressão de proteínas relacionadas à progressão e invasão destas mesmas linhagens.

Sabe-se que, quando ativado, o Akt exerce efeito antiapoptótico por regular a expressão de genes envolvidos na morte e sobrevivência da célula. O Akt inibe a atividade de fatores de transcrição FOXO ⁽²⁷⁹⁾ e p53 ⁽²⁸⁰⁾, prevenindo a expressão de seus genes-alvo, além de estar relacionado com a ativação do NF-κB ⁽²⁸¹⁾ e levar à expressão de genes relacionados à sobrevivência, como o a1, bcl-XL e iap ⁽²¹⁸⁾. O Akt também inibe a atividade de algumas proteínas pro-apoptóticas, como Bad ⁽²⁸²⁾ e ASK1 ⁽²⁸³⁾.

Assim, níveis aumentados de pAkt (Akt ativado) devem, via de regra, sugerir ausência de apoptose ⁽⁴⁹⁾. Em SCC25, por exemplo, uma discreta queda nos níveis de pAkt indicou detecção significativa de apoptose para o grupo IV em 72h, traduzindo a forte relação mantida entre os níveis de pAkt e a presença ou não de apoptose ⁽²⁸⁴⁾. A mesma linhagem apresentou níveis elevados de apoptose com a dose de 6.15 J/cm² (IV) em 48h, porém os níveis de pAkt não foram avaliados neste período. A linhagem SCC9 (V) teve níveis mantidos de pAkt em relação ao seu controle em 72 horas, não apresentando apoptose.

Até pouco tempo atrás acreditava-se que a ação de pAkt no câncer era exclusivamente ligada à sua expressão citoplasmática ^(285, 286). No entanto, estudos recentes mostraram que uma parte do Akt fosforilado pode estar presente nos núcleos das células, exercendo efeito antiapoptótico ^(285, 287). Ainda há controvérsia com relação aos efeitos da sublocalização celular de pAkt em células neoplásicas. Pacientes com câncer de mama positivos para pAkt nuclear tiveram maior taxa de sobrevida do que aqueles com pAkt citoplasmático, por exemplo ⁽²⁸⁸⁾. Por outro lado, pacientes com câncer de próstata em estágios mais avançados apresentam maior porcentagem de pAkt nuclear em seus tumores ⁽²⁸⁹⁾. De qualquer forma, o fato da localização de pAkt ter sido modificada por LLLT de predominantemente citoplasmática para apenas nuclear em SCC9 (período de 24 horas) é um achado interessante, apesar de não haver consenso na literatura que nos permita concluir se isto é indicativo de pior comportamento celular ou não.

Apenas duas das cinco quedas significativas de viabilidade celular encontradas para as linhagens de CECF estiveram relacionadas com morte celular, o que foi detectado por meio do ensaio de TUNEL, que indica a fragmentação do DNA, importante indicador bioquímico de apoptose ^(290, 291). De maneira interessante, um estudo muito recente encontrou um efeito pró-apoptótico de LLLT na linhagem SCC25. Isto está de acordo com nossos achados, uma vez que a única linhagem a apresentar taxas de apoptose foi, na verdade, a SCC25. No entanto, as doses de laser empregadas neste outro estudo foram maiores do que aquelas empregadas aqui ⁽²⁴⁹⁾.

Todavia, as outras quedas significativas encontradas na viabilidade celular e provocadas pela luz laser não tiveram relação com apoptose. Além disso, as densidades de energia utilizadas neste estudo são relativamente muito baixas para causar efeito de inibição por necrose. Conforme aumenta-se o comprimento de onda da luz empregada, aumentam-se também as doses necessárias para se induzir morte celular ^(292, 293). Por isso, por meio dos comprimentos de onda (relativamente altos) e doses (relativamente baixas) empregados neste estudo, em geral não se esperava encontrar efeitos inibitórios por morte celular.

Na verdade, a detecção de apoptose nos dois grupos laser de SCC25 foi relativamente baixa, em torno de 2,5%. Porém, devido ao fato dos grupos controle não terem apresentado qualquer sinal de apoptose, estes valores tornaram-se estatisticamente significantes, mesmo sendo extremamente inferiores aos seus

controles positivos. De outra forma, deve-se lembrar que após a estimulação das mitocôndrias ter sido atingida com a luz laser, a atividade mitocondrial retorna aos níveis normais, a não ser que outra estimulação com LLLT seja entregue às células (192).

Diversos trabalhos mostram que a estimulação com laser leva a um aumento muito relevante dos níveis mitocondriais, em torno de 150% (192, 263, 264, 294). Estes níveis voltam ao normal após aproximadamente uma hora, no entanto, e continuam decaindo até atingir 50% da atividade mitocondrial do grupo controle durante as próximas duas horas (192). Em nosso estudo, a viabilidade das células dependeu da estimulação inicial com LLLT, sendo que, de acordo com a linhagem avaliada, esta estimulação influenciou o comportamento celular de três maneiras distintas: inicial estimulação com níveis aumentados de viabilidade até o último período (DOK), inicial estímulo com posterior queda de viabilidade (SCC9 – IV; SCC25) e inibição de viabilidade desde o primeiro momento (SCC9 – V).

É condizente com a literatura o fato de altas densidades de energia laser poderem inibir o metabolismo celular (295, 296). Um mecanismo proposto para explicar tal fato é o de que altas doses de laser fazem com que muito Ca^{2+} seja liberado, causando hiperatividade da bomba $\text{Ca}^{2+}/\text{ATPase}$ e levando à extinção das reservas de ATP da célula (296). Assim, sabe-se que altas doses de LLLT causam estresse adicional às células, podendo reduzir sua viabilidade e inibir sua proliferação (297), o que é mais um indicativo de que diferentes parâmetros de irradiação laser induzem diferentes comportamentos celulares (298).

Além de doses acima de 60 J/cm² terem induzido apoptose em células de adenocarcinoma de pulmão, por ativação de caspase-3 (221), dois outros estudos mostraram que esta ativação de caspase-3 pode ser induzida pela geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) por LLLT em altas fluências (299, 300). A geração de ROS leva ao estresse oxidativo e à perda das funções celulares, consequentemente levando à apoptose ou necrose das células (301, 302).

A geração de ROS é muito útil se utilizada como decorrência da terapia fotodinâmica (PDT), que é resultado da interação de luz visível com fotossensibilizantes não-tóxicos e oxigênio. A PDT é útil para diversas aplicações na medicina, incluindo o câncer (303, 304), e pode levar à obtenção de ROS por meio de dois mecanismos fotoquímicos, gerando oxigênio singlete, radicais hidroxila ou superóxido (305). No entanto, a irradiação laser por si só, e em baixas fluências, como

utilizada no presente estudo, em geral não é capaz de gerar ROS numa quantidade suficiente para produzir tais efeitos de morte celular ⁽³⁰⁶⁾, devendo tais efeitos serem consequência de outros mecanismos.

Diversas vias de sinalização participam simultaneamente no estabelecimento e progressão de uma neoplasia ⁽³⁰⁷⁾. Assim, melhor descrevendo a participação do Akt em células irradiadas com laser em baixa intensidade, pode-se citar que a fosforilação desta proteína foi detectada por Western blotting em fibroblastos, após estes terem sido estimulados por LLLT (He-Ne; 632.8 nm; 0.2, 0.4, 0.8, e 1.2 J/cm²) ⁽²¹⁷⁾. Outro estudo utilizou o mesmo laser com doses que variaram entre 0.8 e 2.4 J/cm² e verificou que a LLLT pode ativar o Akt efetivamente, mesmo na presença de um indutor de apoptose (estaurosporina a 1µM). Segundo o estudo, este efeito da LLLT foi dependente do PI3K, uma vez que o inibidor específico de PI3K *wortamannin* aboliu o efeito da LLLT ⁽²¹⁸⁾.

Assim, a LLLT, se utilizada em determinados parâmetros, pode induzir a ativação da via PI3K/Akt em determinadas células. Isto se torna, na verdade, muito interessante e útil para alguns tipos celulares e tecidos, em geral visando a reparação dos mesmos ^(252, 308, 309). Por ativar a via do PI3K/Akt, a LLLT inativa, por consequência, a GSK-3β ⁽²¹⁸⁾, um importante ativador de apoptose ^(310, 311). Como a expressão e atividade de GSK-3β foi relacionada à degeneração neuronal, sugere-se também que a LLLT exerça um papel importante em regular a sobrevivência de neurônios ⁽²¹⁸⁾.

No caso de lesões displásicas e carcinomas, porém, a ativação da via PI3K/Akt não é desejada. No entanto, da mesma forma que a LLLT levou à diminuição dos níveis de pAkt em alguns períodos, o aumento destes níveis também foi detectado em outros períodos para as mesmas linhagens, por exemplo em SCC9 (IV) em 12 horas e SCC25 (V) em 12 horas. Por consequência, foram avaliados os níveis de Hsp90, uma chaperona que se liga ao Akt e permite com que este exerça suas funções específicas ⁽⁵⁷⁾. Como resultado, não foi interpretado aumento dos níveis de Hsp90 para os grupos laser, se comparados a seus respectivos grupos controle, em nenhum dos tempos estudados para a linhagem DOK. Condizentemente, os níveis de pAkt também não se alteraram para esta linhagem.

Também não houve aumento dos níveis de Hsp90 nas primeiras 12 horas em nenhum dos grupos experimentais, o que significa que a temperatura não foi aumentada significativamente com tais densidades de energia laser escolhidas para

o estudo, já que a exposição a altas temperaturas não-fisiológicas resulta na superexpressão de proteínas relacionadas ao estresse (*heat-shock proteins*)^(312, 313), em particular a Hsp90⁽³¹⁴⁻³¹⁶⁾. Isto sugere que a LLLT, como empregada aqui, não influenciou nos resultados obtidos devido à geração indesejada de energia térmica.

A diminuição dos níveis de Hsp90 para SCC9, em 72 horas, após irradiação com laser infravermelho também foi correlacionada a uma diminuição dos níveis de pAkt e, por consequência, Ciclina D1. Além disso, o aparecimento da isoforma de Hsp90, a Hsp90N, em 24 horas para o grupo infravermelho na linhagem SCC9 é um achado importante. Esta proteína da família das chaperonas tem potencial oncogênico⁽⁸²⁾, e está superexpressa em tecidos tumorais⁽⁸³⁾, além de estar presente em microvesículas secretadas por melanomas em estágios avançados⁽⁸⁴⁾. Esta isoforma Hsp90N foi detectada apenas para o grupo laser infravermelho em SCC9, e não para o grupo controle, o que sugere pior comportamento da linhagem após LLLT.

A Hsp90N também foi encontrada na linhagem SCC25, mesmo em seu grupo controle em 12 horas. No entanto, esta isoforma se manteve expressa em 48 horas no grupo laser infravermelho, quando seu grupo controle já não mais a expressava. Novamente, um aumento nos níveis das proteínas aqui estudadas indicariam uma pior evolução das células epiteliais displásicas no sentido de se tornarem mais semelhantes a um carcinoma epidermoide, cujos níveis de pAkt, Hsp90 e/ou ciclina D1, por exemplo, encontram-se aumentados^(50, 83, 99, 143). Este mesmo aumento de expressão em células de CECP também indicariam uma pior evolução da lesão, uma vez que carcinomas que apresentam altos níveis destes marcadores geralmente são relacionados a um pior prognóstico^(39, 40, 138, 147, 148).

Assim, este estudo também se propôs a avaliar a atividade de mTOR nas linhagens celulares irradiadas com a luz laser. A atividade máxima da ativação da via mTOR pode ser medida pela fosforilação da proteína ribossômica S6⁽³¹⁷⁾, que é o alvo mais *downstream* desta via⁽¹³¹⁾. A fosforilação da proteína S6 ocorre de maneira ordenada, começando com a serina 236 e seguida sequencialmente pelas serinas 235, 240, 244 e 247, respectivamente⁽³¹⁸⁻³²⁰⁾. Na verdade, a fosforilação da serina 235/236 da proteína S6 é amplamente utilizada como um biomarcador da atividade de mTOR, particularmente no câncer⁽¹³¹⁾. Níveis elevados da proteína S6 fosforilada nas serinas 240/244 também foram relacionados a um pior prognóstico de pacientes com carcinoma de esôfago em estagio inicial⁽¹³⁹⁾.

Os níveis da proteína fosforilada S6 em serinas 235/236, serinas 240/244, bem como níveis totais da proteína ribossômica S6 foram então relacionados à resposta das linhagens celulares SCC9, SCC25 e DOK frente à LLLT. Sabe-se que o aumento da proliferação celular é acompanhado por uma atividade aumentada da sinalização mTOR, medida pelos níveis de pS6⁽³²¹⁾ e, de fato a marcação com pS6 em tecidos e cultura de células pode ser utilizada para detectar mitoses⁽³²²⁾.

Deste modo, níveis aumentados de pS6^{ser240/244} na linhagem DOK, nos períodos de 12 e 48 horas para os comprimentos de onda vermelho e infravermelho foram detectados e foram também, em alguns casos, relacionados a um discreto aumento nos níveis de Ciclina D1. Foi detectada também nesta linhagem, em contrapartida, diminuição discreta de fosforilação de S6, tanto em ser 235/236 quanto em ser 240/244 no grupo infravermelho às 72 horas após LLLT; os níveis de pAkt, no entanto, apresentaram-se mantidos, assim como os níveis de Ciclina D1, para o mesmo período. De maneira condizente, células podem apresentar altos níveis de pAkt e baixos níveis de pS6, caso a ativação de Akt iniba o TSC2, o qual inibe o mTOR por consequência⁽¹³⁰⁾ (Figura 2.5).

Portanto, os presentes resultados indicam que diferentes comprimentos de onda podem influenciar a expressão das vias de sinalização de maneira distinta em lesões displásicas e de carcinoma oral. Apesar da diminuição dos níveis de pAkt, correlacionados a diminuição de níveis de Hsp90 e Ciclina D1 para o grupo infravermelho de SCC9 em 72 horas, houve aumento de pS6^{ser240/244} para este grupo, o que impede que concluamos melhor comportamento de tal linhagem frente a LLLT infravermelho. A linhagem SCC25 também demonstrou aumento dos níveis de pS6^{ser240/244} e pS6^{235/236} em determinados períodos, o qual muitas vezes foi relacionado a uma diminuição dos níveis de pAkt; a ativação de S6 de uma maneira independente do Akt está, de fato, prevista na literatura e ocorre por meio de PDK-1⁽¹³⁰⁾.

Em adição, o aumento de viabilidade celular de todas as linhagens utilizadas neste estudo nem sempre se relacionou ao aumento dos níveis de ciclina D1. Como apontado na literatura, o aumento dos níveis de ciclina D1 algumas vezes coincidiu com uma queda na viabilidade celular⁽³²³⁻³²⁵⁾. Assim, apesar da queda de viabilidade detectada para a linhagem SCC9 em 24 e 72 horas com o comprimento de onda vermelho (2.05J/cm²), foram encontrados níveis aumentados da proteína ciclina D1

para estes mesmos grupos. Isto é um indicativo de pior evolução da lesão estudada^(147, 148), mesmo quando relacionado a baixos índices de viabilidade.

As linhagens DOK e SCC25 também apresentaram, em alguns momentos, aumento de expressão de Ciclina D1. A expressão desta proteína foi demonstrada significativamente no núcleo das células, por imunofluorescência e, como já antes mencionado, o aumento de expressão de ciclina D1 relaciona-se a um prognóstico menos favorável, já que os tumores que a sintetizam em excesso são mais agressivos e invasivos⁽¹⁴⁹⁻¹⁵¹⁾. Além disso, a diminuição nos níveis de pAkt sugeriria, a princípio, uma diminuição dos níveis de Ciclina D1, e vice-versa, o que nem sempre ocorreu, como por exemplo em SCC25 (V e IV) em 48 horas ou SCC9 (IV) em 24 horas, sugerindo mais uma vez o possível *crosstalk* entre diferentes vias de sinalização como, por exemplo, com a via do Ras/MAPK. Esta via trabalha em paralelo com a de PI3K/Akt e pode levar ao aumento de expressão de Ciclina D1 independentemente da ativação do Akt⁽³²⁶⁻³³¹⁾.

7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos com este estudo permitem-nos concluir que:

- A única irradiação laser empregada levou a modificações na viabilidade celular (aumentos e inibições), bem como mudanças na expressão de proteínas relacionadas à progressão e invasão nas linhagens celulares avaliadas; outros estudos poderão esclarecer se mais episódios de LLLT podem levar a alterações ainda mais evidentes e permanentes nos grupos experimentais;
- Os efeitos de LLLT tiveram início em apenas 12 horas após a irradiação laser (primeiro período avaliado), e se mantiveram, em alguns casos, até o último tempo experimental de 72 horas;
- Diferentes comprimentos de onda, bem como densidades de energia diferentes induziram respostas celulares distintas;
- Foi detectada indução de apoptose por LLLT em uma linhagem de CECP, porém não foi possível estabelecer relação entre os parâmetros utilizados da luz laser e a presença ou não deste evento de morte celular;
- Todas as linhagens estudadas apresentaram comportamento agressivo mantido ou ainda agravado após LLLT, o que foi confirmado pelos níveis aumentados de expressão de pAkt, pS6^{ser240/244} ou Ciclina D1, além de aparecimento ou manutenção da isoforma Hsp90N após as células terem recebido irradiação laser em baixa intensidade.

REFERÊNCIAS¹

1. Davies L, Welch HG. Epidemiology of head and neck cancer in the United States. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2006;135:451-7.
2. Conway DI, Hashibe M, Boffetta P, Wunsch-Filho V, Muscat J, La Vecchia C, et al. Enhancing epidemiologic research on head and neck cancer: INHANCE - The international head and neck cancer epidemiology consortium. *Oral Oncol.* 2009;45:743-6.
3. Bsoul SA, Huber MA, Terezhalmay GT. Squamous cell carcinoma of the oral tissues: a comprehensive review for oral healthcare providers. *J Contemp Dent Pract.* 2005;6:1-16.
4. Chen JS, Pardo FS, Wang-Rodriguez J, Chu TS, Lopez JP, Aguilera J, et al. EGFR regulates the side population in head and neck squamous cell carcinoma. *Laryngoscope.* 2006;116:401-6.
5. Franceschi S, Bidoli E, Herrero R, Munoz N. Comparison of cancers of the oral cavity and pharynx worldwide: etiological clues. *Oral Oncol.* 2000;36:106-15.
6. Sudbo J. Novel management of oral cancer: a paradigm of predictive oncology. *Clin Med Res.* 2004;2:233-42.
7. Petersen PE. The World Oral Health Report 2003: continuous improvement of oral health in the 21st century--the approach of the WHO Global Oral Health Programme. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2003;31 Suppl 1:3-23.
8. Scully C, Bedi R. Ethnicity and oral cancer. *Lancet Oncol.* 2000;1:37-42.
9. Neville BW, Day TA. Oral cancer and precancerous lesions. *CA Cancer J Clin.* 2002;52:195-215.
10. Marocchio LS, Lima J, Sperandio FF, Correa L, de Sousa SO. Oral squamous cell carcinoma: an analysis of 1,564 cases showing advances in early detection. *J Oral Sci.* 2010;52:267-73.

¹ De acordo com o estilo Vancouver.

11. INCA. Estimativas/ 2012 - Incidência de Câncer no Brasil. 2012 [citado 16/out/2012]; Disponível em: <http://www.inca.gov.br>.
12. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin*. 2009;59:225-49.
13. Kudo Y, Kitajima S, Ogawa I, Hiraoka M, Sargolzaei S, Keikhaee MR, et al. Invasion and metastasis of oral cancer cells require methylation of E-cadherin and/or degradation of membranous beta-catenin. *Clin Cancer Res*. 2004;10:5455-63.
14. Corvo R. Evidence-based radiation oncology in head and neck squamous cell carcinoma. *Radiother Oncol*. 2007;85:156-70.
15. Frech S, Hormann K, Riedel F, Gotte K. Lymphatic vessel density in correlation to lymph node metastasis in head and neck squamous cell carcinoma. *Anticancer Res*. 2009;29:1675-9.
16. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100:57-70.
17. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*. 2001;414:105-11.
18. Hunter KD, Parkinson EK, Harrison PR. Profiling early head and neck cancer. *Nat Rev Cancer*. 2005;5:127-35.
19. Owens DM, Watt FM. Contribution of stem cells and differentiated cells to epidermal tumours. *Nat Rev Cancer*. 2003;3:444-51.
20. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100:3983-8.
21. Collins AT, Berry PA, Hyde C, Stower MJ, Maitland NJ. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res*. 2005;65:10946-51.
22. Fang D, Nguyen TK, Leishear K, Finko R, Kulp AN, Hotz S, et al. A tumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanomas. *Cancer Res*. 2005;65:9328-37.

23. Bellacosa A, Testa JR, Staal SP, Tsichlis PN. A retroviral oncogene, akt, encoding a serine-threonine kinase containing an SH2-like region. *Science*. 1991;254:274-7.
24. Coffey PJ, Woodgett JR. Molecular cloning and characterisation of a novel putative protein-serine kinase related to the cAMP-dependent and protein kinase C families. *Eur J Biochem*. 1992;205:1217.
25. Jones PF, Jakubowicz T, Pitossi FJ, Maurer F, Hemmings BA. Molecular cloning and identification of a serine/threonine protein kinase of the second-messenger subfamily. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991;88:4171-5.
26. Nicholson KM, Anderson NG. The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cell Signal*. 2002;14:381-95.
27. Datta SR, Brunet A, Greenberg ME. Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev*. 1999;13:2905-27.
28. Testa JR, Bellacosa A. AKT plays a central role in tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001;98:10983-5.
29. Borgatti P, Martelli AM, Bellacosa A, Casto R, Massari L, Capitani S, et al. Translocation of Akt/PKB to the nucleus of osteoblast-like MC3T3-E1 cells exposed to proliferative growth factors. *FEBS Lett*. 2000;477:27-32.
30. Dufner A, Andjelkovic M, Burgering BM, Hemmings BA, Thomas G. Protein kinase B localization and activation differentially affect S6 kinase 1 activity and eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1 phosphorylation. *Mol Cell Biol*. 1999;19:4525-34.
31. Filippa N, Sable CL, Hemmings BA, Van Obberghen E. Effect of phosphoinositide-dependent kinase 1 on protein kinase B translocation and its subsequent activation. *Mol Cell Biol*. 2000;20:5712-21.
32. BioCarta. Pathways. 2012 [citado 16/out/2012]; Disponível em: <http://www.biocarta.com>.
33. Assoian RK, Schwartz MA. Coordinate signaling by integrins and receptor tyrosine kinases in the regulation of G1 phase cell-cycle progression. *Curr Opin Genet Dev*. 2001;11:48-53.

34. Demirkol O, Adams C, Ercal N. Biologically important thiols in various vegetables and fruits. *J Agric Food Chem.* 2004;52:8151-4.
35. Souza GA, Ebaid GX, Seiva FR, Rocha KH, Galhardi CM, Mani F, et al. N-acetylcysteine an allium plant compound improves high-sucrose diet-induced obesity and related effects. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2011;2011:643269.
36. Lee MF, Chan CY, Hung HC, Chou IT, Yee AS, Huang CY. N-acetylcysteine (NAC) inhibits cell growth by mediating the EGFR/Akt/HMG box-containing protein 1 (HBP1) signaling pathway in invasive oral cancer. *Oral Oncol, Philadelphia*; 2012. In press. [cited 2012 ago 31]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22944050>.
37. Chang CM, Chang PY, Tu MG, Lu CC, Kuo SC, Amagaya S, et al. Epigallocatechin gallate sensitizes CAL-27 human oral squamous cell carcinoma cells to the anti-metastatic effects of gefitinib (Iressa) via synergistic suppression of epidermal growth factor receptor and matrix metalloproteinase-2. *Oncol Rep.* 2012;28:1799-807.
38. Amornphimoltham P, Sriuranpong V, Patel V, Benavides F, Conti CJ, Sauk J, et al. Persistent activation of the Akt pathway in head and neck squamous cell carcinoma: a potential target for UCN-01. *Clin Cancer Res.* 2004;10:4029-37.
39. Amornphimoltham P, Patel V, Sodhi A, Nikitakis NG, Sauk JJ, Sausville EA, et al. Mammalian target of rapamycin, a molecular target in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Cancer Res.* 2005;65:9953-61.
40. Massarelli E, Liu DD, Lee JJ, El-Naggar AK, Lo Muzio L, Staibano S, et al. Akt activation correlates with adverse outcome in tongue cancer. *Cancer.* 2005;104:2430-6.
41. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011;144:646-74.
42. Clerkin JS, Naughton R, Quiney C, Cotter TG. Mechanisms of ROS modulated cell survival during carcinogenesis. *Cancer Lett.* 2008;266:30-6.
43. Sadidi M, Lentz SI, Feldman EL. Hydrogen peroxide-induced Akt phosphorylation regulates Bax activation. *Biochimie.* 2009;91:577-85.
44. Pani G, Galeotti T, Chiarugi P. Metastasis: cancer cell's escape from oxidative stress. *Cancer Metastasis Rev.* 2010;29:351-78.

45. Robey RB, Hay N. Is Akt the "Warburg kinase"?-Akt-energy metabolism interactions and oncogenesis. *Semin Cancer Biol.* 2009;19:25-31.
46. Ozben T. Oxidative stress and apoptosis: impact on cancer therapy. *J Pharm Sci.* 2007;96:2181-96.
47. Walsh B, Pearl A, Suchy S, Tartaglio J, Visco K, Phelan SA. Overexpression of Prdx6 and resistance to peroxide-induced death in Hepa1-6 cells: Prdx suppression increases apoptosis. *Redox Rep.* 2009;14:275-84.
48. Chandra J, Samali A, Orrenius S. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 2000;29:323-33.
49. Franke TF, Kaplan DR, Cantley LC. PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis. *Cell.* 1997;88:435-7.
50. Leopoldino AM, Squarize CH, Garcia CB, Almeida LO, Pestana CR, Sobral LM, et al. SET protein accumulates in HNSCC and contributes to cell survival: Antioxidant defense, Akt phosphorylation and AVOs acidification. *Oral Oncol*, Philadelphia; 2012. In press. [cited 2012 jun 25]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22739068>.
51. Markman B, Dienstmann R, Tabernero J. Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway--beyond rapalogs. *Oncotarget.* 2010;1:530-43.
52. Traynor AM, Kurzrock R, Bailey HH. A phase I safety and pharmacokinetic (PK) study of the PI3K inhibitor XL147 (SAR245408) in combination with paclitaxel (P) and carboplatin (C) in patients (pts) with advanced solid tumors. *ASCO Annual Meeting. J Clin Oncol.* 2010;23:3078.
53. Kondapaka SB, Singh SS, Dasmahapatra GP, Sausville EA, Roy KK. Perifosine, a novel alkylphospholipid, inhibits protein kinase B activation. *Mol Cancer Ther.* 2003;2:1093-103.
54. Momota H, Nerio E, Holland EC. Perifosine inhibits multiple signaling pathways in glial progenitors and cooperates with temozolomide to arrest cell proliferation in gliomas in vivo. *Cancer Res.* 2005;65:7429-35.
55. Patel V, Lahusen T, Sy T, Sausville EA, Gutkind JS, Senderowicz AM. Perifosine, a novel alkylphospholipid, induces p21(WAF1) expression in squamous carcinoma cells through a p53-independent pathway, leading to loss in cyclin-dependent kinase activity and cell cycle arrest. *Cancer Res.* 2002;62:1401-9.

56. Argiris A, Cohen E, Karrison T, Esparaz B, Mauer A, Ansari R, et al. A phase II trial of perifosine, an oral alkylphospholipid, in recurrent or metastatic head and neck cancer. *Cancer Biol Ther.* 2006;5:766-70.
57. Tsuruo T, Naito M, Tomida A, Fujita N, Mashima T, Sakamoto H, et al. Molecular targeting therapy of cancer: drug resistance, apoptosis and survival signal. *Cancer Sci.* 2003;94:15-21.
58. Basso AD, Solit DB, Chiosis G, Giri B, Tsichlis P, Rosen N. Akt forms an intracellular complex with heat shock protein 90 (Hsp90) and Cdc37 and is destabilized by inhibitors of Hsp90 function. *J Biol Chem.* 2002;277:39858-66.
59. Beliakoff J, Bagatell R, Paine-Murrieta G, Taylor CW, Lykkesfeldt AE, Whitesell L. Hormone-refractory breast cancer remains sensitive to the antitumor activity of heat shock protein 90 inhibitors. *Clin Cancer Res.* 2003;9:4961-71.
60. Eustace BK, Sakurai T, Stewart JK, Yimlamai D, Unger C, Zehetmeier C, et al. Functional proteomic screens reveal an essential extracellular role for hsp90 alpha in cancer cell invasiveness. *Nat Cell Biol.* 2004;6:507-14.
61. Isaacs JS, Jung YJ, Mimnaugh EG, Martinez A, Cuttitta F, Neckers LM. Hsp90 regulates a von Hippel Lindau-independent hypoxia-inducible factor-1 alpha-degradative pathway. *J Biol Chem.* 2002;277:29936-44.
62. Munster PN, Marchion DC, Basso AD, Rosen N. Degradation of HER2 by ansamycins induces growth arrest and apoptosis in cells with HER2 overexpression via a HER3, phosphatidylinositol 3'-kinase-AKT-dependent pathway. *Cancer Res.* 2002;62:3132-7.
63. Maloney A, Workman P. HSP90 as a new therapeutic target for cancer therapy: the story unfolds. *Expert Opin Biol Ther.* 2002;2:3-24.
64. Specenier P, Vermorken JB. Biologic therapy in head and neck cancer: a road with hurdles. *ISRN Oncol.* 2012;2012:163752.
65. Okui T, Shimo T, Hassan NM, Fukazawa T, Kurio N, Takaoka M, et al. Antitumor effect of novel HSP90 inhibitor NVP-AUY922 against oral squamous cell carcinoma. *Anticancer Res.* 2011;31:1197-204.
66. Zaidi S, McLaughlin M, Bhide SA, Eccles SA, Workman P, Nutting CM, et al. The HSP90 inhibitor NVP-AUY922 radiosensitizes by abrogation of homologous recombination resulting in mitotic entry with unresolved DNA damage. *PLoS One.* 2012;7:e35436.

67. Machida H, Nakajima S, Shikano N, Nishio J, Okada S, Asayama M, et al. Heat shock protein 90 inhibitor 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin potentiates the radiation response of tumor cells grown as monolayer cultures and spheroids by inducing apoptosis. *Cancer Sci.* 2005;96:911-7.
68. Russell JS, Burgan W, Oswald KA, Camphausen K, Tofilon PJ. Enhanced cell killing induced by the combination of radiation and the heat shock protein 90 inhibitor 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin: a multitarget approach to radiosensitization. *Clin Cancer Res.* 2003;9:3749-55.
69. Dote H, Cerna D, Burgan WE, Camphausen K, Tofilon PJ. ErbB3 expression predicts tumor cell radiosensitization induced by Hsp90 inhibition. *Cancer Res.* 2005;65:6967-75.
70. Bull EE, Dote H, Brady KJ, Burgan WE, Carter DJ, Cerra MA, et al. Enhanced tumor cell radiosensitivity and abrogation of G2 and S phase arrest by the Hsp90 inhibitor 17-(dimethylaminoethylamino)-17-demethoxygeldanamycin. *Clin Cancer Res.* 2004;10:8077-84.
71. Machida H, Matsumoto Y, Shirai M, Kubota N. Geldanamycin, an inhibitor of Hsp90, sensitizes human tumour cells to radiation. *Int J Radiat Biol.* 2003;79:973-80.
72. Matsumoto Y, Machida H, Kubota N. Preferential sensitization of tumor cells to radiation by heat shock protein 90 inhibitor geldanamycin. *J Radiat Res.* 2005;46:215-21.
73. Moran DM, Gawlak G, Jayaprakash MS, Mayar S, Maki CG. Geldanamycin promotes premature mitotic entry and micronucleation in irradiated p53/p21 deficient colon carcinoma cells. *Oncogene.* 2008;27:5567-77.
74. Bisht KS, Bradbury CM, Mattson D, Kaushal A, Sowers A, Markovina S, et al. Geldanamycin and 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin potentiate the in vitro and in vivo radiation response of cervical tumor cells via the heat shock protein 90-mediated intracellular signaling and cytotoxicity. *Cancer Res.* 2003;63:8984-95.
75. Dungey FA, Caldecott KW, Chalmers AJ. Enhanced radiosensitization of human glioma cells by combining inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase with inhibition of heat shock protein 90. *Mol Cancer Ther.* 2009;8:2243-54.
76. Kamal A, Thao L, Sensintaffar J, Zhang L, Boehm MF, Fritz LC, et al. A high-affinity conformation of Hsp90 confers tumour selectivity on Hsp90 inhibitors. *Nature.* 2003;425:407-10.

77. Jung DW, Kim J, Che ZM, Oh ES, Kim G, Eom SH, et al. A triazine compound S06 inhibits proinvasive crosstalk between carcinoma cells and stromal fibroblasts via binding to heat shock protein 90. *Chem Biol*. 2011;18:1581-90.
78. Xu W, Yuan X, Jung YJ, Yang Y, Basso A, Rosen N, et al. The heat shock protein 90 inhibitor geldanamycin and the ErbB inhibitor ZD1839 promote rapid PP1 phosphatase-dependent inactivation of AKT in ErbB2 overexpressing breast cancer cells. *Cancer Res*. 2003;63:7777-84.
79. Powers MV, Workman P. Targeting of multiple signalling pathways by heat shock protein 90 molecular chaperone inhibitors. *Endocr Relat Cancer*. 2006;13 Suppl 1:S125-35.
80. Goldie SJ, Mulder KW, Tan DW, Lyons SK, Sims AH, Watt FM. FRMD4A upregulation in human squamous cell carcinoma promotes tumor growth and metastasis and is associated with poor prognosis. *Cancer Res*. 2012;72:3424-36.
81. Misso G, Giuberti G, Lombardi A, Grimaldi A, Ricciardiello F, Giordano A, et al. Pharmacological inhibition of HSP90 and ras activity as a new strategy in the treatment of HNSCC. *J Cell Physiol*, Philadelphia; 2012. In press. [cited 2012 may 7]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22566192>.
82. Grammatikakis N, Vultur A, Ramana CV, Sigano A, Schweinfest CW, Watson DK, et al. The role of Hsp90N, a new member of the Hsp90 family, in signal transduction and neoplastic transformation. *J Biol Chem*. 2002;277:8312-20.
83. Schweinfest CW, Graber MW, Henderson KW, Papas TS, Baron PL, Watson DK. Cloning and sequence analysis of Hsp89alpha DeltaN, a new member of the Hsp90 gene family. *Biochim Biophys Acta*. 1998;1398:18-24.
84. Peinado H, Aleckovic M, Lavotshkin S, Matei I, Costa-Silva B, Moreno-Bueno G, et al. Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nat Med*. 2012;18:883-91.
85. Hay N, Sonenberg N. Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev*. 2004;18:1926-45.
86. Fingar DC, Blenis J. Target of rapamycin (TOR): an integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression. *Oncogene*. 2004;23:3151-71.

87. Kim DH, Sarbassov DD, Ali SM, King JE, Latek RR, Erdjument-Bromage H, et al. mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell*. 2002;110:163-75.
88. Sarbassov DD, Ali SM, Kim DH, Guertin DA, Latek RR, Erdjument-Bromage H, et al. Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr Biol*. 2004;14:1296-302.
89. Tsang CK, Qi H, Liu LF, Zheng XF. Targeting mammalian target of rapamycin (mTOR) for health and diseases. *Drug Discov Today*. 2007;12:112-24.
90. Yuan TL, Cantley LC. PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. *Oncogene*. 2008;27:5497-510.
91. Manning BD, Cantley LC. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell*. 2007;129:1261-74.
92. Cerniglia GJ, Karar J, Tyagi S, Christofidou-Solomidou M, Rengan R, Koumenis C, et al. Inhibition of Autophagy as a Strategy to Augment Radiosensitization by the Dual PI3K/mTOR Inhibitor NVP-BEZ235. *Mol Pharmacol*, Bethesda; 2012. In press. [cited 2012 sep 18]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22989521>.
93. Jaboin JJ, Shinohara ET, Moretti L, Yang ES, Kaminski JM, Lu B. The role of mTOR inhibition in augmenting radiation induced autophagy. *Technol Cancer Res Treat*. 2007;6:443-7.
94. Claerhout S, Verschooten L, Van Kelst S, De Vos R, Proby C, Agostinis P, et al. Concomitant inhibition of AKT and autophagy is required for efficient cisplatin-induced apoptosis of metastatic skin carcinoma. *Int J Cancer*. 2010;127:2790-803.
95. De Benedetti A, Harris AL. eIF4E expression in tumors: its possible role in progression of malignancies. *Int J Biochem Cell Biol*. 1999;31:59-72.
96. Weinstat-Saslow D, Merino MJ, Manrow RE, Lawrence JA, Bluth RF, Wittenbel KD, et al. Overexpression of cyclin D mRNA distinguishes invasive and in situ breast carcinomas from non-malignant lesions. *Nat Med*. 1995;1:1257-60.
97. Fredersdorf S, Burns J, Milne AM, Packham G, Fallis L, Gillett CE, et al. High level expression of p27(kip1) and cyclin D1 in some human breast cancer cells: inverse correlation between the expression of p27(kip1) and degree of

malignancy in human breast and colorectal cancers. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997;94:6380-5.

98. Liao DJ, Dickson RB. c-Myc in breast cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2000;7:143-64.
99. Hildebrandt MA, Lippman SM, Etzel CJ, Kim E, Lee JJ, Khuri FR, et al. Genetic variants in the PI3K/PTEN/AKT/mTOR pathway predict head and neck cancer patient second primary tumor/recurrence risk and response to retinoid chemoprevention. *Clin Cancer Res*. 2012;18:3705-13.
100. Chung J, Grammer TC, Lemon KP, Kazlauskas A, Blenis J. PDGF- and insulin-dependent pp70S6k activation mediated by phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Nature*. 1994;370:71-5.
101. Hara K, Yonezawa K, Weng QP, Kozlowski MT, Belham C, Avruch J. Amino acid sufficiency and mTOR regulate p70 S6 kinase and eIF-4E BP1 through a common effector mechanism. *J Biol Chem*. 1998;273:14484-94.
102. Erikson E, Maller JL. A protein kinase from *Xenopus* eggs specific for ribosomal protein S6. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1985;82:742-6.
103. Erikson RL. Structure, expression, and regulation of protein kinases involved in the phosphorylation of ribosomal protein S6. *J Biol Chem*. 1991;266:6007-10.
104. Blenis J. Signal transduction via the MAP kinases: proceed at your own RSK. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90:5889-92.
105. Jefferies HB, Fumagalli S, Dennis PB, Reinhard C, Pearson RB, Thomas G. Rapamycin suppresses 5'TOP mRNA translation through inhibition of p70s6k. *Embo J*. 1997;16:3693-704.
106. Jones SW, Erikson E, Blenis J, Maller JL, Erikson RL. A *Xenopus* ribosomal protein S6 kinase has two apparent kinase domains that are each similar to distinct protein kinases. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1988;85:3377-81.
107. Alcorta DA, Crews CM, Sweet LJ, Bankston L, Jones SW, Erikson RL. Sequence and expression of chicken and mouse rsk: homologs of *Xenopus laevis* ribosomal S6 kinase. *Mol Cell Biol*. 1989;9:3850-9.

108. Grove JR, Price DJ, Banerjee P, Balasubramanyam A, Ahmad MF, Avruch J. Regulation of an epitope-tagged recombinant Rsk-1 S6 kinase by phorbol ester and erk/MAP kinase. *Biochemistry*. 1993;32:7727-38.
109. Wassarman DA, Solomon NM, Rubin GM. The *Drosophila melanogaster* ribosomal S6 kinase II-encoding sequence. *Gene*. 1994;144:309-10.
110. Moller DE, Xia CH, Tang W, Zhu AX, Jakubowski M. Human rsk isoforms: cloning and characterization of tissue-specific expression. *Am J Physiol*. 1994;266:C351-9.
111. Zhao Y, Bjorbaek C, Weremowicz S, Morton CC, Moller DE. RSK3 encodes a novel pp90rsk isoform with a unique N-terminal sequence: growth factor-stimulated kinase function and nuclear translocation. *Mol Cell Biol*. 1995;15:4353-63.
112. Banerjee P, Ahmad MF, Grove JR, Kozlosky C, Price DJ, Avruch J. Molecular structure of a major insulin/mitogen-activated 70-kDa S6 protein kinase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990;87:8550-4.
113. Kozma SC, Ferrari S, Bassand P, Siegmann M, Totty N, Thomas G. Cloning of the mitogen-activated S6 kinase from rat liver reveals an enzyme of the second messenger subfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87:7365-9.
114. Ballou LM, Luther H, Thomas G. MAP2 kinase and 70K S6 kinase lie on distinct signalling pathways. *Nature*. 1991;349:348-50.
115. Chung J, Kuo CJ, Crabtree GR, Blenis J. Rapamycin-FKBP specifically blocks growth-dependent activation of and signaling by the 70 kd S6 protein kinases. *Cell*. 1992;69:1227-36.
116. von Manteuffel SR, Dennis PB, Pullen N, Gingras AC, Sonenberg N, Thomas G. The insulin-induced signalling pathway leading to S6 and initiation factor 4E binding protein 1 phosphorylation bifurcates at a rapamycin-sensitive point immediately upstream of p70s6k. *Mol Cell Biol*. 1997;17:5426-36.
117. Frodin M, Gammeltoft S. Role and regulation of 90 kDa ribosomal S6 kinase (RSK) in signal transduction. *Mol Cell Endocrinol*. 1999;151:65-77.
118. Chen RH, Sarnecki C, Blenis J. Nuclear localization and regulation of erk- and rsk-encoded protein kinases. *Mol Cell Biol*. 1992;12:915-27.

119. Sun ZJ, Zhang L, Hall B, Bian Y, Gutkind JS, Kulkarni AB. Chemopreventive and Chemotherapeutic Actions of mTOR Inhibitor in Genetically Defined Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Mouse Model. *Clin Cancer Res*. 2012;18:5304-13.
120. Dann SG, Thomas G. The amino acid sensitive TOR pathway from yeast to mammals. *FEBS Lett*. 2006;580:2821-9.
121. Molinolo AA, Amornphimoltham P, Squarize CH, Castilho RM, Patel V, Gutkind JS. Dysregulated molecular networks in head and neck carcinogenesis. *Oral Oncol*. 2009;45:324-34.
122. Alessi DR, Kozlowski MT, Weng QP, Morrice N, Avruch J. 3-Phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1) phosphorylates and activates the p70 S6 kinase in vivo and in vitro. *Curr Biol*. 1998;8:69-81.
123. Pullen N, Dennis PB, Andjelkovic M, Dufner A, Kozma SC, Hemmings BA, et al. Phosphorylation and activation of p70s6k by PDK1. *Science*. 1998;279:707-10.
124. Pallet N, Beaune P, Thervet E, Legendre C, Anglicheau D. [mTOR inhibitors: pleiotropic antiproliferative drugs]. *Med Sci (Paris)*. 2006;22:947-52.
125. Vignot S, Faivre S, Aguirre D, Raymond E. mTOR-targeted therapy of cancer with rapamycin derivatives. *Ann Oncol*. 2005;16:525-37.
126. Lane HA, Fernandez A, Lamb NJ, Thomas G. p70s6k function is essential for G1 progression. *Nature*. 1993;363:170-2.
127. Harada H, Andersen JS, Mann M, Terada N, Korsmeyer SJ. p70S6 kinase signals cell survival as well as growth, inactivating the pro-apoptotic molecule BAD. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001;98:9666-70.
128. Hosoi H, Dilling MB, Shikata T, Liu LN, Shu L, Ashmun RA, et al. Rapamycin causes poorly reversible inhibition of mTOR and induces p53-independent apoptosis in human rhabdomyosarcoma cells. *Cancer Res*. 1999;59:886-94.
129. Zhao TT, Le Francois BG, Goss G, Ding K, Bradbury PA, Dimitroulakos J. Lovastatin inhibits EGFR dimerization and AKT activation in squamous cell carcinoma cells: potential regulation by targeting rho proteins. *Oncogene*. 2010;29:4682-92.

130. Aziz SA, Davies M, Pick E, Zito C, Jilaveanu L, Camp RL, et al. Phosphatidylinositol-3-kinase as a therapeutic target in melanoma. *Clin Cancer Res.* 2009;15:3029-36.
131. Guertin DA, Sabatini DM. Defining the role of mTOR in cancer. *Cancer Cell.* 2007;12:9-22.
132. Chang KY, Tsai SY, Wu CM, Yen CJ, Chuang BF, Chang JY. Novel phosphoinositide 3-kinase/mTOR dual inhibitor, NVP-BGT226, displays potent growth-inhibitory activity against human head and neck cancer cells in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res.* 2011;17:7116-26.
133. Bhola NE, Thomas SM, Freilino M, Joyce S, Sahu A, Maxwell J, et al. Targeting GPCR-mediated p70S6K activity may improve head and neck cancer response to cetuximab. *Clin Cancer Res.* 2011;17:4996-5004.
134. Chaisuparat R, Rojanawatsirivej S, Yodsanga S. Ribosomal Protein S6 Phosphorylation is Associated with Epithelial Dysplasia and Squamous Cell Carcinoma of the Oral Cavity. *Pathol Oncol Res, New York*; 2012. In press. [cited 2012 sep 28]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23015458>.
135. Ruvinsky I, Katz M, Dreazen A, Gielchinsky Y, Saada A, Freedman N, et al. Mice deficient in ribosomal protein S6 phosphorylation suffer from muscle weakness that reflects a growth defect and energy deficit. *PLoS One.* 2009;4:e5618.
136. Ruvinsky I, Sharon N, Lerer T, Cohen H, Stolovich-Rain M, Nir T, et al. Ribosomal protein S6 phosphorylation is a determinant of cell size and glucose homeostasis. *Genes Dev.* 2005;19:2199-211.
137. Clark C, Shah S, Herman-Ferdinandez L, Ekshyyan O, Abreo F, Rong X, et al. Teasing out the best molecular marker in the AKT/mTOR pathway in head and neck squamous cell cancer patients. *Laryngoscope.* 2010;120:1159-65.
138. Molinolo AA, Hewitt SM, Amornphimoltham P, Keelawat S, Rangdaeng S, Meneses Garcia A, et al. Dissecting the Akt/mammalian target of rapamycin signaling network: emerging results from the head and neck cancer tissue array initiative. *Clin Cancer Res.* 2007;13:4964-73.
139. Kim SH, Jang YH, Chau GC, Pyo S, Um SH. Prognostic significance and function of phosphorylated ribosomal protein S6 in esophageal squamous cell carcinoma. *Mod Pathol, Baltimore*; 2012. In press. [cited 2012 sep 21]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22996377>.

140. McDonald JM, Pelloski CE, Ledoux A, Sun M, Raso G, Komaki R, et al. Elevated phospho-S6 expression is associated with metastasis in adenocarcinoma of the lung. *Clin Cancer Res.* 2008;14:7832-7.
141. Fumagalli S, Di Cara A, Neb-Gulati A, Natt F, Schwemberger S, Hall J, et al. Absence of nucleolar disruption after impairment of 40S ribosome biogenesis reveals an rpL11-translation-dependent mechanism of p53 induction. *Nat Cell Biol.* 2009;11:501-8.
142. Jacks T, Weinberg RA. The expanding role of cell cycle regulators. *Science.* 1998;280:1035-6.
143. Motokura T, Arnold A. Cyclin D and oncogenesis. *Curr Opin Genet Dev.* 1993;3:5-10.
144. Goodger NM, Gannon J, Hunt T, Morgan PR. Cell cycle regulatory proteins--an overview with relevance to oral cancer. *Oral Oncol.* 1997;33:61-73.
145. Kuo MY, Lin CY, Hahn LJ, Cheng SJ, Chiang CP. Expression of cyclin D1 is correlated with poor prognosis in patients with areca quid chewing-related oral squamous cell carcinomas in Taiwan. *J Oral Pathol Med.* 1999;28:165-9.
146. Diehl JA. Cycling to cancer with cyclin D1. *Cancer Biol Ther.* 2002;1:226-31.
147. Callender T, el-Naggar AK, Lee MS, Frankenthaler R, Luna MA, Batsakis JG. PRAD-1 (CCND1)/cyclin D1 oncogene amplification in primary head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer.* 1994;74:152-8.
148. el-Naggar AK, Steck K, Batsakis JG. Heterogeneity of the proliferative fraction and cyclin D1/CCND1 gene amplification in head and neck squamous cell carcinoma. *Cytometry.* 1995;21:47-51.
149. Masuda M, Hirakawa N, Nakashima T, Kuratomi Y, Komiyama S. Cyclin D1 overexpression in primary hypopharyngeal carcinomas. *Cancer.* 1996;78:390-5.
150. Mate JL, Ariza A, Aracil C, Lopez D, Isamat M, Perez-Piteira J, et al. Cyclin D1 overexpression in non-small cell lung carcinoma: correlation with Ki67 labelling index and poor cytoplasmic differentiation. *J Pathol.* 1996;180:395-9.
151. Shin KY, Kong G, Kim WS, Lee TY, Woo YN, Lee JD. Overexpression of cyclin D1 correlates with early recurrence in superficial bladder cancers. *Br J Cancer.* 1997;75:1788-92.

152. Petty WJ, Dragnev KH, Dmitrovsky E. Cyclin D1 as a target for chemoprevention. *Lung Cancer*. 2003;41 Suppl 1:S155-61.
153. Jayasurya R, Sathyan KM, Lakshminarayanan K, Abraham T, Nalinakumari KR, Abraham EK, et al. Phenotypic alterations in Rb pathway have more prognostic influence than p53 pathway proteins in oral carcinoma. *Mod Pathol*. 2005;18:1056-66.
154. Bova RJ, Quinn DI, Nankervis JS, Cole IE, Sheridan BF, Jensen MJ, et al. Cyclin D1 and p16INK4A expression predict reduced survival in carcinoma of the anterior tongue. *Clin Cancer Res*. 1999;5:2810-9.
155. Michalides R, van Veelen N, Hart A, Loftus B, Wientjens E, Balm A. Overexpression of cyclin D1 correlates with recurrence in a group of forty-seven operable squamous cell carcinomas of the head and neck. *Cancer Res*. 1995;55:975-8.
156. Coqueret O. Linking cyclins to transcriptional control. *Gene*. 2002;299:35-55.
157. Fu M, Wang C, Li Z, Sakamaki T, Pestell RG. Minireview: Cyclin D1: normal and abnormal functions. *Endocrinology*. 2004;145:5439-47.
158. Corpet DE, Parnaud G, Delverdier M, Peiffer G, Tache S. Consistent and fast inhibition of colon carcinogenesis by polyethylene glycol in mice and rats given various carcinogens. *Cancer Res*. 2000;60:3160-4.
159. Roy HK, Gulizia J, DiBaise JK, Karolski WJ, Ansari S, Madugula M, et al. Polyethylene glycol inhibits intestinal neoplasia and induces epithelial apoptosis in Apc(min) mice. *Cancer Lett*. 2004;215:35-42.
160. Wali RK, Kunte DP, Koetsier JL, Bissonnette M, Roy HK. Polyethylene glycol-mediated colorectal cancer chemoprevention: roles of epidermal growth factor receptor and Snail. *Mol Cancer Ther*. 2008;7:3103-11.
161. Wali RK, Kunte DP, De La Cruz M, Tiwari AK, Brasky J, Weber CR, et al. Topical polyethylene glycol as a novel chemopreventive agent for oral cancer via targeting of epidermal growth factor response. *PLoS One*. 2012;7:e38047.
162. Suwinski R, Jaworska M, Nikiel B, Grzegorz W, Bankowska-Wozniak M, Wojciech M, et al. Predicting the effect of accelerated fractionation in postoperative radiotherapy for head and neck cancer based on molecular marker profiles: data from a randomized clinical trial. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2010;77:438-46.

163. Snietura M, Jaworska M, Mlynarczyk-Liszka J, Goraj-Zajac A, Piglowski W, Lange D, et al. PTEN as a prognostic and predictive marker in postoperative radiotherapy for squamous cell cancer of the head and neck. *PLoS One*. 2012;7:e33396.
164. Tunér J, Hode L. Laser therapy in dentistry and medicine. Edsbruk: Prima books; 1996.
165. Mester E. [The use of the laser beam in therapy]. *Orv Hetil*. 1966;107:1012-6.
166. de Castro JL, Pinheiro AL, Werneck CE, Soares CP. The effect of laser therapy on the proliferation of oral KB carcinoma cells: an in vitro study. *Photomed Laser Surg*. 2005;23:586-9.
167. Huang Y, Chen ACH, Hamblin MR. Advances in low-intensity laser and phototherapy. In: Tuchin VV, editor. *Handbook of photonics for medical science*. London: Taylor and Francis; 2010. p. 687–716.
168. Sperandio FF, Simoes A, Aranha AC, Correa L, Orsini Machado de Sousa SC. Photodynamic therapy mediated by methylene blue dye in wound healing. *Photomed Laser Surg*. 2010;28:581-7.
169. Chung H, Dai T, Sharma SK, Huang YY, Carroll JD, Hamblin MR. The nuts and bolts of low-level laser (light) therapy. *Ann Biomed Eng*. 2012;40:516-33.
170. Huang Y, Hamblin MR, De Taboada L. Low-level laser therapy in stroke and central nervous system. In: Tuchin VV, editor. *Handbook of photonics for medical science*. London: Taylor and Francis; 2010. p. 717–37.
171. Lampl Y. Laser treatment for stroke. *Expert Rev Neurother*. 2007;7:961-5.
172. Naeser MA, Hamblin MR. Potential for transcranial laser or LED therapy to treat stroke, traumatic brain injury, and neurodegenerative disease. *Photomed Laser Surg*. 2011;29:443-6.
173. Huang YY, Gupta A, Vecchio D, Arce VJ, Huang SF, Xuan W, et al. Transcranial low level laser (light) therapy for traumatic brain injury. *J Biophotonics*, Hoboken; 2012. In press. [cited 2012 jul 17]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22807422>.

174. Wu Q, Xuan W, Ando T, Xu T, Huang L, Huang YY, et al. Low-level laser therapy for closed-head traumatic brain injury in mice: effect of different wavelengths. *Lasers Surg Med*. 2012;44:218-26.
175. De Taboada L, Yu J, El-Amouri S, Gattoni-Celli S, Richieri S, McCarthy T, et al. Transcranial laser therapy attenuates amyloid-beta peptide neuropathology in amyloid-beta protein precursor transgenic mice. *J Alzheimers Dis*. 2011;23:521-35.
176. Wu X, Dmitriev AE, Cardoso MJ, Viers-Costello AG, Borke RC, Streeter J, et al. 810 nm Wavelength light: an effective therapy for transected or contused rat spinal cord. *Lasers Surg Med*. 2009;41:36-41.
177. Sperandio FF, Marotti J, Aranha AC, Eduardo Cde P. Photodynamic therapy for the treatment of recurrent herpes labialis: preliminary results. *Gen Dent*. 2009;57:415-9.
178. Marotti J, Sperandio FF, Fregnani ER, Aranha AC, de Freitas PM, Eduardo Cde P. High-intensity laser and photodynamic therapy as a treatment for recurrent herpes labialis. *Photomed Laser Surg*. 2010;28:439-44.
179. Munoz Sanchez PJ, Capote Femenias JL, Diaz Tejeda A, Tuner J. The effect of 670-nm low laser therapy on herpes simplex type 1. *Photomed Laser Surg*. 2012;30:37-40.
180. Schindl A, Neumann R. Low-intensity laser therapy is an effective treatment for recurrent herpes simplex infection. Results from a randomized double-blind placebo-controlled study. *J Invest Dermatol*. 1999;113:221-3.
181. Landthaler M, Haina D, Waidelich W. [Treatment of zoster, post-zoster pain and herpes simplex recidivans in loco with laser light]. *Fortschr Med*. 1983;101:1039-41.
182. Qutob AF, Gue S, Revesz T, Logan RM, Keefe D. Prevention of oral mucositis in children receiving cancer therapy: A systematic review and evidence-based analysis. *Oral Oncol*, Philadelphia; 2012. In press. [cited 2012 sep 6]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22959949>.
183. Gautam AP, Fernandes DJ, Vidyasagar MS, Maiya AG, Vadhira BM. Low level laser therapy for concurrent chemoradiotherapy induced oral mucositis in head and neck cancer patients - A triple blinded randomized controlled trial. *Radiother Oncol*. 2012;104:349-54.

184. Cunha CB, Eduardo FP, Zezell DM, Bezinelli LM, Shitara PP, Correa L. Effect of irradiation with red and infrared laser in the treatment of oral mucositis : A pilot study with patients undergoing chemotherapy with 5-FU. *Lasers Med Sci*, New York; 2012. In press. [cited 2012 may 17]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22588683>.
185. Simoes A, Eduardo FP, Luiz AC, Campos L, Sa PH, Cristofaro M, et al. Laser phototherapy as topical prophylaxis against head and neck cancer radiotherapy-induced oral mucositis: comparison between low and high/low power lasers. *Lasers Surg Med*. 2009;41:264-70.
186. Khullar SM, Brodin P, Barkvoll P, Haanaes HR. Preliminary study of low-level laser for treatment of long-standing sensory aberrations in the inferior alveolar nerve. *J Oral Maxillofac Surg*. 1996;54:2-7; discussion -8.
187. Leung YY, Fung PP, Cheung LK. Treatment modalities of neurosensory deficit after lower third molar surgery: a systematic review. *J Oral Maxillofac Surg*. 2012;70:768-78.
188. Dostalova T, Hlinakova P, Kasparova M, Rehacek A, Vavrickova L, Navratil L. Effectiveness of physiotherapy and GaAlAs laser in the management of temporomandibular joint disorders. *Photomed Laser Surg*. 2012;30:275-80.
189. Salmos-Brito JA, de Menezes RF, Teixeira CE, Gonzaga RK, Rodrigues BH, Braz R, et al. Evaluation of low-level laser therapy in patients with acute and chronic temporomandibular disorders. *Lasers Med Sci*, New York; 2012. In press. [cited 2012 feb 25]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22367394>.
190. Oz S, Gokcen-Rohlig B, Saruhanoglu A, Tuncer EB. Management of myofascial pain: low-level laser therapy versus occlusal splints. *J Craniofac Surg*. 2010;21:1722-8.
191. Castano AP, Dai T, Yaroslavsky I, Cohen R, Apruzzese WA, Smotrich MH, et al. Low-level laser therapy for zymosan-induced arthritis in rats: Importance of illumination time. *Lasers Surg Med*. 2007;39:543-50.
192. Gavish L, Asher Y, Becker Y, Kleinman Y. Low level laser irradiation stimulates mitochondrial membrane potential and disperses subnuclear promyelocytic leukemia protein. *Lasers Surg Med*. 2004;35:369-76.
193. Karu T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. *J Photochem Photobiol B*. 1999;49:1-17.

194. Lavi R, Shainberg A, Friedmann H, Shneyvays V, Rickover O, Eichler M, et al. Low energy visible light induces reactive oxygen species generation and stimulates an increase of intracellular calcium concentration in cardiac cells. *J Biol Chem*. 2003;278:40917-22.
195. Oren DA, Charney DS, Lavie R, Sinyakov M, Lubart R. Stimulation of reactive oxygen species production by an antidepressant visible light source. *Biol Psychiatry*. 2001;49:464-7.
196. Caetano KS, Frade MA, Minatel DG, Santana LA, Enwemeka CS. Phototherapy improves healing of chronic venous ulcers. *Photomed Laser Surg*. 2009;27:111-8.
197. Ozcelik O, Cenk Haytac M, Kunin A, Seydaoglu G. Improved wound healing by low-level laser irradiation after gingivectomy operations: a controlled clinical pilot study. *J Clin Periodontol*. 2008;35:250-4.
198. Schubert MM, Eduardo FP, Guthrie KA, Franquin JC, Bensadoun RJ, Migliorati CA, et al. A phase III randomized double-blind placebo-controlled clinical trial to determine the efficacy of low level laser therapy for the prevention of oral mucositis in patients undergoing hematopoietic cell transplantation. *Support Care Cancer*. 2007;15:1145-54.
199. Stein A, Benayahu D, Maltz L, Oron U. Low-level laser irradiation promotes proliferation and differentiation of human osteoblasts in vitro. *Photomed Laser Surg*. 2005;23:161-6.
200. Stergioulas A, Stergioula M, Aarskog R, Lopes-Martins RA, Bjordal JM. Effects of low-level laser therapy and eccentric exercises in the treatment of recreational athletes with chronic achilles tendinopathy. *Am J Sports Med*. 2008;36:881-7.
201. Almeida-Lopes L, Rigau J, Zangaro RA, Guidugli-Neto J, Jaeger MM. Comparison of the low level laser therapy effects on cultured human gingival fibroblasts proliferation using different irradiance and same fluence. *Lasers Surg Med*. 2001;29:179-84.
202. Frigo L, Luppi JS, Favero GM, Maria DA, Penna SC, Bjordal JM, et al. The effect of low-level laser irradiation (In-Ga-Al-AsP - 660 nm) on melanoma in vitro and in vivo. *BMC Cancer*. 2009;9:404.
203. Khadra M, Lyngstadaas SP, Haanaes HR, Mustafa K. Determining optimal dose of laser therapy for attachment and proliferation of human oral fibroblasts cultured on titanium implant material. *J Biomed Mater Res A*. 2005;73:55-62.

204. Kreisler M, Christoffers AB, Willershausen B, d'Hoedt B. Low-level 809 nm GaAlAs laser irradiation increases the proliferation rate of human laryngeal carcinoma cells in vitro. *Lasers Med Sci.* 2003;18:100-3.
205. Pourzarandian A, Watanabe H, Ruwanpura SM, Aoki A, Ishikawa I. Effect of low-level Er:YAG laser irradiation on cultured human gingival fibroblasts. *J Periodontol.* 2005;76:187-93.
206. Pinheiro AL, Carneiro NS, Vieira AL, Brugnera A, Jr., Zanin FA, Barros RA, et al. Effects of low-level laser therapy on malignant cells: in vitro study. *J Clin Laser Med Surg.* 2002;20:23-6.
207. Sroka R, Schaffer M, Fuchs C, Pongratz T, Schrader-Reichard U, Busch M, et al. Effects on the mitosis of normal and tumor cells induced by light treatment of different wavelengths. *Lasers Surg Med.* 1999;25:263-71.
208. Werneck CE, Pinheiro AL, Pacheco MT, Soares CP, de Castro JL. Laser light is capable of inducing proliferation of carcinoma cells in culture: a spectroscopic in vitro study. *Photomed Laser Surg.* 2005;23:300-3.
209. Schaffer M, Sroka R, Fuchs C, Schrader-Reichardt U, Schaffer PM, Busch M, et al. Biomodulative effects induced by 805 nm laser light irradiation of normal and tumor cells. *J Photochem Photobiol B.* 1997;40:253-7.
210. de Monteiro CJS, Pinheiro AN, de Oliveira SC, Aciole GT, Sousa JA, Canguss MC, et al. Influence of laser phototherapy (lambda660 nm) on the outcome of oral chemical carcinogenesis on the hamster cheek pouch model: histological study. *Photomed Laser Surg.* 2011;29:741-5.
211. Liu YH, Cheng CC, Ho CC, Pei RJ, Lee KY, Yeh KT, et al. Effects of diode 808 nm GaAlAs low-power laser irradiation on inhibition of the proliferation of human hepatoma cells in vitro and their possible mechanism. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol.* 2004;115-116:185-201.
212. Renno AC, McDonnell PA, Parizotto NA, Laakso EL. The effects of laser irradiation on osteoblast and osteosarcoma cell proliferation and differentiation in vitro. *Photomed Laser Surg.* 2007;25:275-80.
213. Karu TI. Effects of visible radiation on cultured cells. *Photochem Photobiol.* 1990;52:1089-98.

214. Moore P, Ridgway TD, Higbee RG, Howard EW, Lucroy MD. Effect of wavelength on low-intensity laser irradiation-stimulated cell proliferation in vitro. *Lasers Surg Med.* 2005;36:8-12.
215. Shefer G, Barash I, Oron U, Halevy O. Low-energy laser irradiation enhances de novo protein synthesis via its effects on translation-regulatory proteins in skeletal muscle myoblasts. *Biochim Biophys Acta.* 2003;1593:131-9.
216. Gao X, Chen T, Xing D, Wang F, Pei Y, Wei X. Single cell analysis of PKC activation during proliferation and apoptosis induced by laser irradiation. *J Cell Physiol.* 2006;206:441-8.
217. Zhang L, Xing D, Gao X, Wu S. Low-power laser irradiation promotes cell proliferation by activating PI3K/Akt pathway. *J Cell Physiol.* 2009;219:553-62.
218. Zhang L, Zhang Y, Xing D. LPLI inhibits apoptosis upstream of Bax translocation via a GSK-3 β -inactivation mechanism. *J Cell Physiol.* 2010;224:218-28.
219. Musashi M, Ota S, Shiroshta N. The role of protein kinase C isoforms in cell proliferation and apoptosis. *Int J Hematol.* 2000;72:12-9.
220. Braun DC, Garfield SH, Blumberg PM. Analysis by fluorescence resonance energy transfer of the interaction between ligands and protein kinase C δ in the intact cell. *J Biol Chem.* 2005;280:8164-71.
221. Wang F, Chen TS, Xing D, Wang JJ, Wu YX. Measuring dynamics of caspase-3 activity in living cells using FRET technique during apoptosis induced by high fluence low-power laser irradiation. *Lasers Surg Med.* 2005;36:2-7.
222. Zhang H, Wu S, Xing D. Inhibition of A β (25-35)-induced cell apoptosis by low-power-laser-irradiation (LPLI) through promoting Akt-dependent YAP cytoplasmic translocation. *Cell Signal.* 2012;24:224-32.
223. Pontes HA, Pontes FS, Fonseca FP, de Carvalho PL, Pereira EM, de Abreu MC, et al. Nuclear factor kappaB and cyclooxygenase-2 immunoexpression in oral dysplasia and oral squamous cell carcinoma. *Ann Diagn Pathol, New York;* 2012. In press. [cited 2012 jul 17]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22818026>.
224. Khan FA, Robinson PG, Warnakulasuriya KA, Newton JT, Gelbier S, Gibbons DE. Predictors of tobacco and alcohol consumption and their relevance to oral

cancer control amongst people from minority ethnic communities in the South Thames health region, England. *J Oral Pathol Med*. 2000;29:214-9.

225. Pfeifer GP, Denissenko MF, Olivier M, Tretyakova N, Hecht SS, Hainaut P. Tobacco smoke carcinogens, DNA damage and p53 mutations in smoking-associated cancers. *Oncogene*. 2002;21:7435-51.
226. Biolchini F, Pollastri G, Figurelli S, Chiarini L. Carcinogen metabolism, DNA damage repair and oral head and neck squamocellular carcinoma (HNSCC). A review. *Minerva Stomatol*. 2005;54:405-14.
227. Arimilli S, Damratoski BE, Bombick B, Borgerding MF, Prasad GL. Evaluation of cytotoxicity of different tobacco product preparations. *Regul Toxicol Pharmacol*, New York; 2012. In press. [cited 2012 sep 17]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22996032>.
228. Liljendahl TS, Kotova N, Segerback D. Quantification of ultraviolet radiation-induced DNA damage in the urine of Swedish adults and children following exposure to sunlight. *Biomarkers*, London; 2012. In press. [cited 2012 aug 13]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22889379>.
229. Garinis GA, Jans J, van der Horst GT. Photolyases: capturing the light to battle skin cancer. *Future Oncol*. 2006;2:191-9.
230. de Vries E, Arnold M, Altsitsiadis E, Trakatelli M, Hinrichs B, Stockfleth E, et al. Potential impact of interventions resulting in reduced exposure to ultraviolet (UV) radiation (UVA and UVB) on skin cancer incidence in four European countries, 2010-2050. *Br J Dermatol*. 2012;167 Suppl 2:53-62.
231. Brugnera Junior A, Pinheiro ALB. *Lasers na odontologia moderna*. São Paulo: Pancast; 1998.
232. Pinheiro AL, do Nascliento SC, de Vieira AL, Rolim AB, da Silva PS, Brugnera A, Jr. Does LLLT stimulate laryngeal carcinoma cells? An in vitro study. *Braz Dent J*. 2002;13:109-12.
233. Ihsan FR. Low-level laser therapy accelerates collateral circulation and enhances microcirculation. *Photomed Laser Surg*. 2005;23:289-94.
234. Salate AC, Barbosa G, Gaspar P, Koeke PU, Parizotto NA, Benze BG, et al. Effect of In-Ga-Al-P diode laser irradiation on angiogenesis in partial ruptures of Achilles tendon in rats. *Photomed Laser Surg*. 2005;23:470-5.

235. Schindl A, Merwald H, Schindl L, Kaun C, Wojta J. Direct stimulatory effect of low-intensity 670 nm laser irradiation on human endothelial cell proliferation. *Br J Dermatol*. 2003;148:334-6.
236. Yu W, Naim JO, Lanzafame RJ. The effect of laser irradiation on the release of bFGF from 3T3 fibroblasts. *Photochem Photobiol*. 1994;59:167-70.
237. Zhang WG, Wu CY, Pan WX, Tian L, Xia JL. Low-power Helium-Neon laser irradiation enhances the expression of VEGF in murine myocardium. *Chin Med J (Engl)*. 2004;117:1476-80.
238. Agaiby AD, Ghali LR, Wilson R, Dyson M. Laser modulation of angiogenic factor production by T-lymphocytes. *Lasers Surg Med*. 2000;26:357-63.
239. Yu HS, Chang KL, Yu CL, Chen JW, Chen GS. Low-energy helium-neon laser irradiation stimulates interleukin-1 alpha and interleukin-8 release from cultured human keratinocytes. *J Invest Dermatol*. 1996;107:593-6.
240. Dube A, Bansal H, Gupta PK. Modulation of macrophage structure and function by low level He-Ne laser irradiation. *Photochem Photobiol Sci*. 2003;2:851-5.
241. Fujimaki Y, Shimoyama T, Liu Q, Umeda T, Nakaji S, Sugawara K. Low-level laser irradiation attenuates production of reactive oxygen species by human neutrophils. *J Clin Laser Med Surg*. 2003;21:165-70.
242. Honmura A, Yanase M, Obata J, Haruki E. Therapeutic effect of Ga-Al-As diode laser irradiation on experimentally induced inflammation in rats. *Lasers Surg Med*. 1992;12:441-9.
243. Kujawa J, Zavodnik IB, Lapshina A, Labieniec M, Bryszewska M. Cell survival, DNA, and protein damage in B14 cells under low-intensity near-infrared (810 nm) laser irradiation. *Photomed Laser Surg*. 2004;22:504-8.
244. Mognato M, Squizzato F, Facchin F, Zaghetto L, Corti L. Cell growth modulation of human cells irradiated in vitro with low-level laser therapy. *Photomed Laser Surg*. 2004;22:523-6.
245. Zhu NW, Perks CM, Burd AR, Holly JM. Changes in the levels of integrin and focal adhesion kinase (FAK) in human melanoma cells following 532 nm laser treatment. *Int J Cancer*. 1999;82:353-8.

246. Ocana-Quero JM, Gomez-Villamandos R, Moreno-Millan M, Santisteban-Valenzuela JM. Biological effects of helium-neon (He-Ne) laser irradiation on acrosome reaction in bull sperm cells. *J Photochem Photobiol B*. 1997;40:294-8.
247. Morales JA, Ruiz-Gomez MJ, Gil-Carmona L, Souviron A, Martinez-Morillo M. He-Ne laser has no effect on cell cycle phases of human colon adenocarcinoma cells. *Rev Esp Fisiol*. 1995;51:43-7.
248. Migliorati C, Hewson I, Lalla RV, Antunes HS, Estilo CL, Hodgson B, et al. Systematic review of laser and other light therapy for the management of oral mucositis in cancer patients. *Support Care Cancer*, Philadelphia; 2012. In press. [cited 2012 sep 22]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23001179>.
249. Schartinger VH, Galvan O, Riechelmann H, Dudas J. Differential responses of fibroblasts, non-neoplastic epithelial cells, and oral carcinoma cells to low-level laser therapy. *Support Care Cancer*. 2012;20:523-9.
250. Seluanov A, Hine C, Azpurua J, Feigenson M, Bozzella M, Mao Z, et al. Hypersensitivity to contact inhibition provides a clue to cancer resistance of naked mole-rat. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009;106:19352-7.
251. Hilf R, Murant RS, Narayanan U, Gibson SL. Relationship of mitochondrial function and cellular adenosine triphosphate levels to hematoporphyrin derivative-induced photosensitization in R3230AC mammary tumors. *Cancer Res*. 1986;46:211-7.
252. Shefer G, Oron U, Irintchev A, Wernig A, Halevy O. Skeletal muscle cell activation by low-energy laser irradiation: a role for the MAPK/ERK pathway. *J Cell Physiol*. 2001;187:73-80.
253. Tuby H, Maltz L, Oron U. Low-level laser irradiation (LLLI) promotes proliferation of mesenchymal and cardiac stem cells in culture. *Lasers Surg Med*. 2007;39:373-8.
254. Zhang J, Xing D, Gao X. Low-power laser irradiation activates Src tyrosine kinase through reactive oxygen species-mediated signaling pathway. *J Cell Physiol*. 2008;217:518-28.
255. Wang HZ, Chang CH, Lin CP, Tsai MC. Using MTT viability assay to test the cytotoxicity of antibiotics and steroid to cultured porcine corneal endothelial cells. *J Ocul Pharmacol Ther*. 1996;12:35-43.

256. O'Toole SA, Sheppard BL, McGuinness EP, Gleeson NC, Yoneda M, Bonnar J. The MTS assay as an indicator of chemosensitivity/resistance in malignant gynaecological tumours. *Cancer Detect Prev.* 2003;27:47-54.
257. Hsu S, Bollag WB, Lewis J, Huang Q, Singh B, Sharawy M, et al. Green tea polyphenols induce differentiation and proliferation in epidermal keratinocytes. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003;306:29-34.
258. Devika PT, Stanely Mainzen Prince P. (-)Epigallocatechin-gallate (EGCG) prevents mitochondrial damage in isoproterenol-induced cardiac toxicity in albino Wistar rats: a transmission electron microscopic and in vitro study. *Pharmacol Res.* 2008;57:351-7.
259. Wang P, Henning SM, Heber D. Limitations of MTT and MTS-based assays for measurement of antiproliferative activity of green tea polyphenols. *PLoS One.* 2010;5:e10202.
260. Rizzi CF, Mauriz JL, Freitas Correa DS, Moreira AJ, Zettler CG, Filippin LI, et al. Effects of low-level laser therapy (LLLT) on the nuclear factor (NF)-kappaB signaling pathway in traumatized muscle. *Lasers Surg Med.* 2006;38:704-13.
261. Silveira PC, Silva LA, Fraga DB, Freitas TP, Streck EL, Pinho R. Evaluation of mitochondrial respiratory chain activity in muscle healing by low-level laser therapy. *J Photochem Photobiol B.* 2009;95:89-92.
262. Chen AC, Arany PR, Huang YY, Tomkinson EM, Sharma SK, Kharkwal GB, et al. Low-level laser therapy activates NF-kB via generation of reactive oxygen species in mouse embryonic fibroblasts. *PLoS One.* 2011;6:e22453.
263. Pastore D, Di Martino C, Bosco G, Passarella S. Stimulation of ATP synthesis via oxidative phosphorylation in wheat mitochondria irradiated with helium-neon laser. *Biochem Mol Biol Int.* 1996;39:149-57.
264. Pastore D, Greco M, Petragallo VA, Passarella S. Increase in $\text{--H}^+/\text{e}^-$ ratio of the cytochrome c oxidase reaction in mitochondria irradiated with helium-neon laser. *Biochem Mol Biol Int.* 1994;34:817-26.
265. Passarella S, Casamassima E, Molinari S, Pastore D, Quagliariello E, Catalano IM, et al. Increase of proton electrochemical potential and ATP synthesis in rat liver mitochondria irradiated in vitro by helium-neon laser. *FEBS Lett.* 1984;175:95-9.

266. Passarella S, Ostuni A, Atlante A, Quagliariello E. Increase in the ADP/ATP exchange in rat liver mitochondria irradiated in vitro by helium-neon laser. *Biochem Biophys Res Commun*. 1988;156:978-86.
267. Hashmi JT, Huang YY, Osmani BZ, Sharma SK, Naeser MA, Hamblin MR. Role of low-level laser therapy in neurorehabilitation. *Pm R*. 2010;2:S292-305.
268. Pastore D, Greco M, Passarella S. Specific helium-neon laser sensitivity of the purified cytochrome c oxidase. *Int J Radiat Biol*. 2000;76:863-70.
269. Hallen S, Brzezinski P. Light-induced structural changes in cytochrome c oxidase: implication for the mechanism of electron and proton gating. *Biochim Biophys Acta*. 1994;1184:207-18.
270. Grossman N, Schneid N, Reuveni H, Halevy S, Lubart R. 780 nm low power diode laser irradiation stimulates proliferation of keratinocyte cultures: involvement of reactive oxygen species. *Lasers Surg Med*. 1998;22:212-8.
271. Schmidt H, Siems W, Muller M, Dumdey R, Rapoport SM. ATP-producing and consuming processes of Ehrlich mouse ascites tumor cells in proliferating and resting phases. *Exp Cell Res*. 1991;194:122-7.
272. Muller M, Siems W, Buttgereit F, Dumdey R, Rapoport SM. Quantification of ATP-producing and consuming processes of Ehrlich ascites tumour cells. *Eur J Biochem*. 1986;161:701-5.
273. Moreno-Sanchez R, Rodriguez-Enriquez S, Marin-Hernandez A, Saavedra E. Energy metabolism in tumor cells. *Febs J*. 2007;274:1393-418.
274. Liu YQ, Cheng X, Guo LX, Mao C, Chen YJ, Liu HX, et al. Identification of an Annonaceous Acetogenin Mimetic, AA005, as an AMPK Activator and Autophagy Inducer in Colon Cancer Cells. *PLoS One*. 2012;7:e47049.
275. Ishii I, Harada Y, Kasahara T. Reprofile a classical anthelmintic, pyrvinium pamoate, as an anti-cancer drug targeting mitochondrial respiration. *Front Oncol*. 2012;2:137.
276. Harada Y, Ishii I, Hatake K, Kasahara T. Pyrvinium pamoate inhibits proliferation of myeloma/erythroleukemia cells by suppressing mitochondrial respiratory complex I and STAT3. *Cancer Lett*. 2012;319:83-8.

277. Kalvakolanu DV, Nallar SC, Kalakonda S. Cytokine-induced tumor suppressors: a GRIM story. *Cytokine*. 2010;52:128-42.
278. Karu T, Pyatibrat L, Kalendo G. Irradiation with He-Ne laser increases ATP level in cells cultivated in vitro. *J Photochem Photobiol B*. 1995;27:219-23.
279. Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, et al. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell*. 1999;96:857-68.
280. Yamaguchi A, Tamatani M, Matsuzaki H, Namikawa K, Kiyama H, Vitek MP, et al. Akt activation protects hippocampal neurons from apoptosis by inhibiting transcriptional activity of p53. *J Biol Chem*. 2001;276:5256-64.
281. Ozes ON, Mayo LD, Gustin JA, Pfeffer SR, Pfeffer LM, Donner DB. NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. *Nature*. 1999;401:82-5.
282. Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, et al. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell*. 1997;91:231-41.
283. Kim AH, Khursigara G, Sun X, Franke TF, Chao MV. Akt phosphorylates and negatively regulates apoptosis signal-regulating kinase 1. *Mol Cell Biol*. 2001;21:893-901.
284. Zhang X, Zhang H, Tighiouart M, Lee JE, Shin HJ, Khuri FR, et al. Synergistic inhibition of head and neck tumor growth by green tea (-)-epigallocatechin-3-gallate and EGFR tyrosine kinase inhibitor. *Int J Cancer*. 2008;123:1005-14.
285. Martelli AM, Faenza I, Billi AM, Manzoli L, Evangelisti C, Fala F, et al. Intranuclear 3'-phosphoinositide metabolism and Akt signaling: new mechanisms for tumorigenesis and protection against apoptosis? *Cell Signal*. 2006;18:1101-7.
286. Plas DR, Thompson CB. Akt-dependent transformation: there is more to growth than just surviving. *Oncogene*. 2005;24:7435-42.
287. Ahn JY, Liu X, Liu Z, Pereira L, Cheng D, Peng J, et al. Nuclear Akt associates with PKC-phosphorylated Ebp1, preventing DNA fragmentation by inhibition of caspase-activated DNase. *Embo J*. 2006;25:2083-95.

288. Badve S, Collins NR, Bhat-Nakshatri P, Turbin D, Leung S, Thorat M, et al. Subcellular localization of activated AKT in estrogen receptor- and progesterone receptor-expressing breast cancers: potential clinical implications. *Am J Pathol.* 2010;176:2139-49.
289. Van de Sande T, Roskams T, Lerut E, Joniau S, Van Poppel H, Verhoeven G, et al. High-level expression of fatty acid synthase in human prostate cancer tissues is linked to activation and nuclear localization of Akt/PKB. *J Pathol.* 2005;206:214-9.
290. Doi T, Nishida K, Matsuo M, Yoshida A, Murakami T, Inoue H. Evidence of oncotic cell death and DNA fragmentation in human hypertrophic chondrocytes in chondro-osteophyte. *Osteoarthritis Cartilage.* 2002;10:270-6.
291. Das S, Dey KK, Dey G, Pal I, Majumder A, Maitichoudhury S, et al. Antineoplastic and apoptotic potential of traditional medicines thymoquinone and diosgenin in squamous cell carcinoma. *PLoS One.* 2012;7:e46641.
292. Aoki M, Furusawa Y, Higashi S, Watanabe M. Action spectra of apoptosis induction and reproductive cell death in L5178Y cells in the UV-B region. *Photochem Photobiol Sci.* 2004;3:268-72.
293. Thogersen J, Knudsen CS, Maetzke A, Jensen SJ, Keiding SR, Alsner J, et al. Reproductive death of cancer cells induced by femtosecond laser pulses. *Int J Radiat Biol.* 2007;83:289-99.
294. Greco M, Vacca RA, Moro L, Perlino E, Petragallo VA, Marra E, et al. Helium-Neon laser irradiation of hepatocytes can trigger increase of the mitochondrial membrane potential and can stimulate c-fos expression in a Ca²⁺-dependent manner. *Lasers Surg Med.* 2001;29:433-41.
295. Schindl A, Schindl M, Pernerstorfer-Schon H, Schindl L. Low-intensity laser therapy: a review. *J Investig Med.* 2000;48:312-26.
296. Friedmann H, Lubart R, Laulicht I, Rochkind S. A possible explanation of laser-induced stimulation and damage of cell cultures. *J Photochem Photobiol B.* 1991;11:87-91.
297. Hawkins D, Abrahamse H. Effect of multiple exposures of low-level laser therapy on the cellular responses of wounded human skin fibroblasts. *Photomed Laser Surg.* 2006;24:705-14.

298. Tunér J, Hode L. Laser Therapy—Clinical Practice and Scientific Background. Grängesberg: Prima Books AB.; 2002.
299. Wu S, Xing D, Wang F, Chen T, Chen WR. Mechanistic study of apoptosis induced by high-fluence low-power laser irradiation using fluorescence imaging techniques. *J Biomed Opt.* 2007;12:064015.
300. Wu S, Xing D, Gao X, Chen WR. High fluence low-power laser irradiation induces mitochondrial permeability transition mediated by reactive oxygen species. *J Cell Physiol.* 2009;218:603-11.
301. Ito K, Nakazato T, Yamato K, Miyakawa Y, Yamada T, Hozumi N, et al. Induction of apoptosis in leukemic cells by homovanillic acid derivative, capsaicin, through oxidative stress: implication of phosphorylation of p53 at Ser-15 residue by reactive oxygen species. *Cancer Res.* 2004;64:1071-8.
302. Zhang R, Humphreys I, Sahu RP, Shi Y, Srivastava SK. In vitro and in vivo induction of apoptosis by capsaicin in pancreatic cancer cells is mediated through ROS generation and mitochondrial death pathway. *Apoptosis.* 2008;13:1465-78.
303. Wang M, Huang L, Sharma SK, Jeon S, Thota S, Sperandio FF, et al. Synthesis and photodynamic effect of new highly photostable decacationically armed [60]- and [70]fullerene decaiodide monoadducts to target pathogenic bacteria and cancer cells. *J Med Chem.* 2012;55:4274-85.
304. Sharma SK, Chiang LY, Hamblin MR. Photodynamic therapy with fullerenes in vivo: reality or a dream? *Nanomedicine (Lond).* 2011;6:1813-25.
305. Mroz P, Pawlak A, Satti M, Lee H, Wharton T, Gali H, et al. Functionalized fullerenes mediate photodynamic killing of cancer cells: Type I versus Type II photochemical mechanism. *Free Radic Biol Med.* 2007;43:711-9.
306. Rejiya CS, Kumar J, Raji V, Vibin M, Abraham A. Laser immunotherapy with gold nanorods causes selective killing of tumour cells. *Pharmacol Res.* 2012;65:261-9.
307. Dent P, Curiel DT, Fisher PB, Grant S. Synergistic combinations of signaling pathway inhibitors: mechanisms for improved cancer therapy. *Drug Resist Updat.* 2009;12:65-73.
308. Duan R, Liu TC, Li Y, Guo H, Yao LB. Signal transduction pathways involved in low intensity He-Ne laser-induced respiratory burst in bovine neutrophils: a

- potential mechanism of low intensity laser biostimulation. *Lasers Surg Med.* 2001;29:174-8.
309. Zhang L, Xing D, Zhu D, Chen Q. Low-power laser irradiation inhibiting Abeta25-35-induced PC12 cell apoptosis via PKC activation. *Cell Physiol Biochem.* 2008;22:215-22.
 310. Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature.* 1995;378:785-9.
 311. Cross TG, Scheel-Toellner D, Henriquez NV, Deacon E, Salmon M, Lord JM. Serine/threonine protein kinases and apoptosis. *Exp Cell Res.* 2000;256:34-41.
 312. Tissieres A, Mitchell HK, Tracy UM. Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs. *J Mol Biol.* 1974;84:389-98.
 313. Lindquist S, Craig EA. The heat-shock proteins. *Annu Rev Genet.* 1988;22:631-77.
 314. Huang HC, Yang Y, Nanda A, Koria P, Rege K. Synergistic administration of photothermal therapy and chemotherapy to cancer cells using polypeptide-based degradable plasmonic matrices. *Nanomedicine (Lond).* 2011;6:459-73.
 315. Gibbons NB, Watson RW, Coffey RN, Brady HP, Fitzpatrick JM. Heat-shock proteins inhibit induction of prostate cancer cell apoptosis. *Prostate.* 2000;45:58-65.
 316. Rylander MN, Feng Y, Bass J, Diller KR. Thermally induced injury and heat-shock protein expression in cells and tissues. *Ann N Y Acad Sci.* 2005;1066:222-42.
 317. Weekes CD, Song D, Arcaroli J, Wilson LA, Rubio-Viqueira B, Cusatis G, et al. Stromal Cell-Derived Factor 1alpha Mediates Resistance to mTOR-Directed Therapy in Pancreatic Cancer. *Neoplasia.* 2012;14:690-701.
 318. Wettenhall RE, Erikson E, Maller JL. Ordered multisite phosphorylation of *Xenopus* ribosomal protein S6 by S6 kinase II. *J Biol Chem.* 1992;267:9021-7.

319. Martin-Perez J, Thomas G. Ordered phosphorylation of 40S ribosomal protein S6 after serum stimulation of quiescent 3T3 cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1983;80:926-30.
320. Hutchinson JA, Shanware NP, Chang H, Tibbetts RS. Regulation of ribosomal protein S6 phosphorylation by casein kinase 1 and protein phosphatase 1. *J Biol Chem*. 2011;286:8688-96.
321. Bryant KG, Camacho J, Jasmin JF, Wang C, Addya S, Casimiro MC, et al. Caveolin-1 overexpression enhances androgen-dependent growth and proliferation in the mouse prostate. *Int J Biochem Cell Biol*. 2011;43:1318-29.
322. Schmidt T, Wahl P, Wuthrich RP, Vogetseder A, Picard N, Kaissling B, et al. Immunolocalization of phospho-S6 kinases: a new way to detect mitosis in tissue sections and in cell culture. *Histochem Cell Biol*. 2007;127:123-9.
323. Freeman RS, Estus S, Johnson EM, Jr. Analysis of cell cycle-related gene expression in postmitotic neurons: selective induction of Cyclin D1 during programmed cell death. *Neuron*. 1994;12:343-55.
324. Giardina SF, Cheung NS, Reid MT, Beart PM. Kainate-induced apoptosis in cultured murine cerebellar granule cells elevates expression of the cell cycle gene cyclin D1. *J Neurochem*. 1998;71:1325-8.
325. Martin-Romero FJ, Santiago-Josefat B, Correa-Bordes J, Gutierrez-Merino C, Fernandez-Salguero P. Potassium-induced apoptosis in rat cerebellar granule cells involves cell-cycle blockade at the G1/S transition. *J Mol Neurosci*. 2000;15:155-65.
326. Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer*. 2002;2:489-501.
327. Krymskaya VP, Penn RB, Orsini MJ, Scott PH, Plevin RJ, Walker TR, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase mediates mitogen-induced human airway smooth muscle cell proliferation. *Am J Physiol*. 1999;277:L65-78.
328. Ravenhall C, Guida E, Harris T, Koutsoubos V, Stewart A. The importance of ERK activity in the regulation of cyclin D1 levels and DNA synthesis in human cultured airway smooth muscle. *Br J Pharmacol*. 2000;131:17-28.
329. Kim DH, Na HK, Oh TY, Kim WB, Surh YJ. Eupatilin, a pharmacologically active flavone derived from *Artemisia* plants, induces cell cycle arrest in ras-

transformed human mammary epithelial cells. *Biochem Pharmacol.* 2004;68:1081-7.

330. Okabe H, Lee SH, Phuchareon J, Albertson DG, McCormick F, Tetsu O. A critical role for FBXW8 and MAPK in cyclin D1 degradation and cancer cell proliferation. *PLoS One.* 2006;1:e128.
331. Hong J, Qian T, Le Q, Sun X, Wu J, Chen J, et al. NGF promotes cell cycle progression by regulating D-type cyclins via PI3K/Akt and MAPK/Erk activation in human corneal epithelial cells. *Mol Vis.* 2012;18:758-64.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

**Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia
Comitê de Ética em Pesquisa**

**PARECER DE APROVAÇÃO
FR - 221122
Protocolo 182/2008**

O grupo de trabalho indicado pelo Comitê de Ética em Pesquisa **APROVOU** o protocolo de pesquisa **"ANÁLISE DA EXPRESSÃO E MECANISMOS DE AÇÃO DAS PROTEÍNAS CICLINA D1, AKT, mTOR E hsp90 EM CULTURAS DE CÉLULAS DE CARCINOMA EPIDERMÓIDE HUMANO APÓS IRRADIAÇÃO COM LASER EM BAIXA INTENSIDADE"**, de responsabilidade do(a) pesquisador(a) **FELIPE FORNIAS SPERANDIO**, sob orientação do(a) Prof(a). Dr(a). **SUZANA CANTANHEDE ORSINI MACHADO DE SOUSA**.

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados a este Comitê relatórios anuais referentes ao andamento da pesquisa e ao término cópia do trabalho em "cd". Qualquer emenda do projeto original deve ser apresentada a este CEP para apreciação, de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

São Paulo, 13 de outubro de 2008.

Prof. Dr. João Gualberto de Cerqueira Luz
Coordenador do CEP-FOUSP