DANIELLE LIMA CORRÊA DE CARVALHO

**Efeito da fotobiomodulação sobre o estresse oxidativo e o dano no DNA
induzido pelo bussulfano em doses encontradas na saliva: estudo *in vitro***

São Paulo

2018

DANIELLE LIMA CORRÊA DE CARVALHO

**Efeito da fotobiomodulação sobre o estresse oxidativo e o dano no DNA
induzido pelo bussulfano em doses encontradas na saliva: estudo *in vitro***

Versão Original

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

Área de Concentração: Patologia Oral e Maxilofacial e Pacientes Especiais.

Orientador: Prof. Dra. Luciana Corrêa

São Paulo

2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

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

Carvalho, Danielle Lima Corrêa de.

Efeito da fotobiomodulação sobre o estresse oxidativo e o dano no DNA induzido pelo bussulfano em doses encontradas na saliva: estudo in vitro / Danielle Lima Corrêa de Carvalho; orientador Luciana Corrêa. -- São Paulo, 2018.

96p. : fig., tab., ; 30 cm.

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

Versão original

1. Terapia com Luz de Baixa Intensidade. 2. Bussulfano. 3. Mucosite oral. 4. Estresse oxidativo. 5. Dano ao DNA. I. Corrêa, Luciana. II. Título.

Carvalho DLC. Efeito da fotobiomodulação sobre o estresse oxidativo e o dano no DNA induzido pelo bussulfano em doses encontradas na saliva: estudo *in vitro*. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovado em: / /2018

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Dedico este trabalho a minha mãe Joana que sempre afirmou que a maior herança é a educação. Obrigada por tudo mãe, por todos os dias e noites ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter chegado até aqui ao lado de tantas pessoas maravilhosas que contribuem para o meu crescimento pessoal e profissional.

Agradeço imensamente a minha mãe, a mulher da minha vida, sem ela nada seria. Agradeço por ser um pedaço desta mulher maravilhosa, disposta, ativa. Mãe obrigada por tudo, por todos os dias de nossas vidas, por todos os beijos, abraços, conselhos e conversas. Amo você mais do que possa imaginar. Obrigada.

Ao meu bebê, Bóris, o melhor cãopanheiro de mundo.

Obrigada Prof^a Dr^a Luciana Corrêa, muito mais que uma Orientadora, uma pessoa maravilhosa. Muito obrigada pela oportunidade dada há anos atrás. Como disse em uma de nossas conversas, a Senhora é daqueles Professores que nenhum aluno é capaz de esquecer, não só pelo conhecimento e dedicação, mas pelo ser humano justo. Minha admiração ultrapassa a pós-graduação e espero poder compartilhar muitos outros momentos.

A todos os Professores da Área de Concentração de Patologia Oral e Maxilofacial e Pacientes Especiais, Prof. Dr. Décio dos Santos Pinto Júnior, Prof. Dr. Fábio Daumas Nunes, Prof^a Dr^a Kareem Lopez Ortega, Prof^a Dr^a Marília Trierveiler Martins, Prof^a Dr^a Marina Helena Cury Gallottini, Prof. Dr. Paulo Henrique Braz-Silva e Prof^a Dr^a Suzana Cantanhede Orsini Machado de Sousa. Imenso prazer poder compartilhar e conviver com cada um. Agradeço pelas disponibilidades, reuniões anatomo-clínicas e pelo PAE.

Aos secretários da pós graduação, Vinícius e Carlitos. Muito obrigada por todas as ajudas e amizade.

Aos biólogos Elisa e Juvani e especialmente Adriana. Dri, muito obrigada por todo ensinamento e todas as conversas. Meu muito obrigada por todos os dias de LABITRON.

Aos meus colegas de LABPEG, Flávia, Marina, Isaac, Mariana, Fabiola e Paula, muito obrigada por todos os dias, de desespero, ansiedade, conversas, risadas, cafés.

Flá meu muito muito muito obrigada por todos os dias de ajuda na bancada, pela paciência em ensinar. Obrigada pelos dias, tardes e noites. Má muito obrigada por todo apoio e ajuda. Vocês foram muito importantes durante todo o processo de aprendizagem da rotina e a amizade de vocês foi o melhor presente que eu poderia ter! AMIGAS, adoro vocês!

Aos colegas de pós graduação, muito obrigada por todos os dias: Marcos, Cibele, Dani Assis, Fabi, Jefferson, Ju Franco, Nathália, Rodrigo, Sofia, Solange, Natália, Thalita, Lara, Paulo, Rubens, Karin, Talita, Bruno, Marília, Marina, Gabriela, Bruno Matuck, Maria Patrícia, Letícia, Maria Fernanda, Lilia, Dmitry, Guilherme, Lucyene, Robson, Stephanie, Claudia e Jaqueline.

Marília, Marcos, Rubens e Claudinha meu muito obrigada pelos dias de PAE, noites de conhecimento e risadas.

Ao Professor Paulo e Fernanda pela participação na minha banca de qualificação. Obrigada pelas palavras, ideias e conhecimento.

Obrigada ao Douglas, que mesmo depois de muitos anos, ainda me ajuda e me ampara, não só na parte laboratorial, mas pessoal também.

Obrigada Marcella, Roberta e Mariana pelos dias de risadas, apoios, troca de conhecimento e pela alegria de sempre. Não poderia querer melhores companheiras de trabalho.

Obrigada Fernanda e Letícia por toda confiança sempre! Pelo apoio, pelo carinho, pela ajuda em crescer e me tornar uma profissional cada dia melhor. Sou muito grata por todas as oportunidades! É um prazer imenso estar ao lado de vocês!

Aos meus afilhados Luiza e Caique, meus pequenos pacote de amor! Madrinha ama vocês, meu carinho transborda tudo que já imaginei sentir!

As minhas queridas amigas Mel, Paulinha, Dd. Obrigada por todos os dias, risadas, almoços, conselhos, conversas, choros. Vocês são muito especiais.

Aos amigos do colégio, que desde 1992 estamos juntos, Li, Alex, Batata, Bó, Nathy, Wagnão, Wesley, Bia, Massa e Joy, saudades sempre.

A minha família pernambucana por estarmos juntos mesmo de longe. Lu, Lucas e Davi, amo vocês!

A minha amiga, irmã, comadre, de longe ou de perto! Má, você sabe da sua importância pra mim, não preciso expressar em palavras. Obrigada pela honra!

A minha família, amada e querida. Obrigada por estarem ao meu lado. Especialmente, meu primo, irmão, compadre Tiago!

Obrigada à família que deixou com que eu fizesse parte, D. Ailce, S. Pedro e Jorge, muito obrigado por todos os dias e acolhimento. Vocês são muito especiais para mim.

Obrigada meu amor, Alberto, muito obrigada por esta jornada, por estar comigo, perto ou longe, em dias de felicidade ou de nem tanta felicidade assim. Obrigada por compartilhar cada momento da sua vida ao meu lado, dividir e acrescentar a cada dia. Amo você.

E a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro.

“Sempre que houver alternativas, tenha cuidado. Não opte pelo conveniente, pelo confortável, pelo respeitável, pelo socialmente aceitável, pelo honroso. Opte pelo que faz seu coração vibrar. Opte pelo que gostaria de fazer, apesar de todas as consequências.”

Osho

RESUMO

Carvalho DLC. Efeito da fotobiomodulação sobre o estresse oxidativo e o dano no DNA induzido pelo bussulfano em doses encontradas na saliva: estudo *in vitro* [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2018. Versão Original.

O bussulfano (BU) é um quimioterápico amplamente utilizado para o tratamento de doenças hematológicas e para o condicionamento de transplante de células hematopoiéticas (TCH). As doses plasmáticas desse medicamento são altamente citotóxicas, causando mucosite oral (MO) com alta frequência e gravidade. O BU exibe concentrações na saliva que são similares às encontradas no plasma; porém, ainda não foi confirmado se essa concentração salivar também é citotóxica para queratinócitos, fato que poderia constituir um risco a mais para ocorrência de MO. A prevenção e o tratamento da MO têm sido realizados com laserterapia de baixa intensidade (LTBI), em que a fotobiomodulação (FBM) favorece a redução da frequência e da duração das lesões. O objetivo deste trabalho foi verificar se o BU encontrado na saliva é citotóxico e genotóxico para queratinócitos em cultura, bem como se a FBM minimiza esses efeitos. Foram estabelecidos os seguintes grupos experimentais: Grupo Controle (C) – queratinócitos sem nenhum tratamento; Grupo Controle Saliva (CS) – queratinócitos expostos a saliva artificial; Grupo Controle Irradiado (CI) – queratinócitos expostos a LTBI; Grupo Controle Saliva Irradiado (CSI) – queratinócitos expostos a saliva e a LTBI; Grupo BU (BU) – queratinócitos expostos a BU veiculado em saliva; Grupo BU Irradiado (BUI) – queratinócitos expostos a BU salivar e concomitantemente a LTBI. Inicialmente testou-se se a saliva artificial formulada não causava modificações na viabilidade dos queratinócitos cultivados. Em seguida, essas células foram expostas ao BU veiculado em saliva ou inserido diretamente no meio, em concentrações que variaram de 4,0µg/mL a 5,5µg/mL. Nesse ensaio, avaliou-se a viabilidade celular tanto no BU veiculado em saliva quanto do BU inserido no meio de cultura. Foi padronizado também um protocolo de LTBI para ser realizado nas células cultivadas, que incluiu três sessões de laserterapia (660nm, 100mW, 0,028 cm² área do spot, 20 segundos de tempo de irradiação, 8J/cm², 3571mW/cm²) com intervalo de 4h entre elas. Após essas

padronizações, a concentração salivar de 5,5µg/mL de BU, que provocou menor viabilidade celular, foi utilizada em outros ensaios, que incluíram avaliação da taxa de morte celular pelo teste de TUNEL, do estresse oxidativo (quantificação da porcentagem de sequestro do radical DPPH, quantificação da superóxido dismutase e da catalase e nível de peroxidação lipídica) e da presença de danos no DNA por intermédio do ensaio cometa. A saliva artificial formulada não alterou a viabilidade celular quando comparada ao grupo controle, porém induziu menor taxa de sequestro do DPPH e níveis discretos de dano no DNA. O BU veiculado na saliva provocou maior redução da viabilidade celular quando comparado ao BU inserido diretamente no meio de cultura ($p<0.001$), sugerindo que a saliva potencializou o efeito tóxico do BU. Comparando com o grupo controle saliva, o Grupo bussulfano exibiu maior frequência de células TUNEL positivas ($p<0.05$), menor taxa de sequestro do radical DPPH ($p<0.05$), maior atividade da catalase ($p<0.01$) e maior taxa de peroxidação lipídica ($p<0.01$); não houve, contudo, diferenças em relação à presença da superóxido dismutase. Em comparação ao Grupo BU, o Grupo BU Irradiado exibiu menor quantidade de células TUNEL positivas ($p<0.05$), maior potencial de sequestro do radical DPPH ($p<0.05$), menor atividade da catalase ($p<0.01$) e menor taxa de peroxidação lipídica ($p<0.01$). Na análise de cometa, o Grupo BU exibiu maior porcentagem de DNA fragmentado em relação ao Grupo BUI ($p<0.05$). Concluiu-se que a concentração salivar do BU é tóxica para queratinócitos, induzindo estresse oxidativo e danos no DNA, porém a LTBI foi eficaz para a redução da citotoxicidade e da genotoxicidade do BU.

Palavras-chave: Laserterapia de baixa intensidade. Bussulfano. Mucosite oral. Estresse oxidativo. Dano no DNA.

ABSTRACT

Carvalho DLC. Effects of photobiomodulation on oxidative stress and DNA damage induced by busulfan at doses found in saliva: an in vitro study [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2018. Versão Original.

Busulfan (BU) is a chemotherapeutic drug largely used into hematological diseases treatment and also on the conditioning hematopoietic cell transplantation (TCH).

BU plasma concentrations are highly cytotoxic, causing oral mucositis (OM) with high frequency and severity. BU salivary concentrations are similar to those found in plasma; however, it has not been confirmed whether the salivary concentration is also cytotoxic for keratinocytes, increasing risk for the occurrence of OM. Low intensity laser therapy (LILT) has been used for prevention and treatment of OM. Photobiomodulation (FBM) contributes to the reduction of frequency and lesions duration. This study aimed to verify if the BU found in saliva is cytotoxic and genotoxic for cultured keratinocytes, as well as whether FBM minimizes these effects. The following experimental groups were established: Control Group (C) - keratinocytes without any treatment; Control Group Saliva (CS) - keratinocytes exposed to artificial saliva; Irradiated Control Group (CI)- keratinocytes exposed to LILT; Control Group Irradiated saliva (CSI) - keratinocytes exposed to saliva and LILT; BU Group (BU) - keratinocytes exposed to salivary BU; BU Group Irradiated (BUI) - keratinocytes exposed to salivary BU and concomitantly to LILT. Initially it was tested the artificial formulated saliva effects over the viability of the cultured keratinocytes. Thereafter, in order to verify the cells viability, these cells were exposed to BU diluted into artificial saliva or medium culture, the concentrations ranged from 4.0 µg / mL to 5.5 µg / mL. A LILT protocol was also standardized, which consist three laser therapy sessions (660nm, 100mW, 0.028cm² spot areas, 20 seconds irradiation time, 8J / cm², 3571mW / cm²) with 4 hours interval between them. After these preliminary tests, the BU salivary concentration of 5.5 µg / mL, which provoked less cell viability, was submitted in other tests, including the evaluation of cell death rate by the TUNEL test, oxidative stress (quantification of the DPPH radical, quantification of superoxide dismutase and catalase and level of lipid peroxidation) and the presence of DNA damage through the comet assay. The

formulated artificial saliva did not modify the cell viability when compared to the Control group, but induced a lower DPPH sequestration rate and a discrete level of DNA damage. The salivary BU promoted a greater reduction in cell viability when compared to BU inserted directly into the culture medium ($p < 0.001$), suggesting that saliva increased the toxic effect of BU. Comparing with the Saliva Control group, the BU group showed a higher frequency of TUNEL positive cells ($p < 0.05$), a lower sequestration rate of the DPPH radical ($p < 0.05$), higher catalase activity ($p < 0.01$) and a higher lipid peroxidation rate ($p < 0.01$); however, there were no differences related to the presence of superoxide dismutase. Compared to the BU group, the irradiated BU group had a lower TUNEL positive cells rate ($p < 0.05$), a higher DPPH radical sequestration potential ($p < 0.05$), lower catalase activity ($p < 0.01$) and lower peroxidation rate lipid profile ($p < 0.01$). In the comet analysis, the BU group exhibited a higher percentage of fragmented DNA in relation to the irradiated BU Group ($p < 0.05$). It was concluded that the salivary concentration of BU is toxic to keratinocytes, inducing oxidative stress and DNA damage, but LTBI has been effective in reducing the cytotoxicity and genotoxicity of BU.

Keywords: Low intensity laser therapy. Busulfan. Oral mucositis. Oxidative stress. DNA damage.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 4.1** - Placa de Petri com adesivo-guia utilizada para os ensaios com a luz laser. B: Placa de 96 poços na cor preta com fundo transparente utilizada para os ensaios com a luz laser (Sperandio, 2012). C: Placa de 12 poços na cor preta com fundo transparente utilizada para os ensaios com a luz laser (Sperandio, 2012)52
- Figura 5.1** - Média ($\pm$ desvio-padrão) da viabilidade celular em cultivos sem saliva (controle) e naqueles contendo 10 μ L e 20 μ L de saliva.....61
- Figura 5.2** - Média ($\pm$ desvio-padrão) da viabilidade celular em cultivos sem saliva (controle) e naqueles com 10 μ L e 20 μ L de saliva, a qual foi previamente armazenada a -4°C ou 8°C. Teste de Tukey, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ 62
- Figura 5.3** - Média ($\pm$ desvio-padrão) da viabilidade celular (normalizada pela da do controle saliva) após tratamento com bussulfano em diferentes concentrações, inserido no meio sem saliva (A) e com saliva (B). Teste de Tukey, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ 64
- Figura 5.4** - Média ($\pm$ desvio-padrão) da viabilidade celular (normalizada pela da do controle saliva) após tratamento com bussulfano em diferentes concentrações e quatro ciclos de laserterapia de baixa intensidade, com intervalos de 1h, 2h, 3h e 4h entre os ciclos. Teste de Tukey, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ 65
- Figura 5.5** - Média ($\pm$ desvio-padrão) da viabilidade celular (normalizada pela da do controle saliva) após tratamento com bussulfano em diferentes concentrações e quatro ciclos de laserterapia de baixa intensidade, com intervalos de 4h entre os ciclos. Valor de p pelo teste t de Student66

- Figura 5.6** - *Box-plot* para a porcentagem de células positivas para TUNEL em cada grupo. Traço horizontal espesso - mediana; Altura do *box* - intervalo interquartis; *whiskers* - valores mínimo e máximo; O - *outliers*. * $p < 0.05$ (Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn) 67
- Figura 5.7** - Exemplos de padrões de marcação no ensaio TUNEL, dos grupos Controle Saliva (CS), Controle Saliva Irradiado (CSI), Bussulfano (Bu) e Bussulfano Irradiado (Bul). Aumento de 400x..... 67
- Figura 5.8** - *Box-plot* para a porcentagem de sequestro do radical livre DPPH em cada grupo. Traço horizontal espesso - mediana; Altura do *box* - intervalo interquartis; *whiskers* - valores mínimo e máximo. * $p < 0.05$ (Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn) 68
- Figura 5.9** - Média ($\pm$ desvio-padrão) da densidade de banda obtida na técnica de Western-blotting para análise da superóxido dismutase. Foi realizada normalização com a densidade de banda da actina em todos os grupos. Sem diferenças significativas (teste de variância Anova)..... 69
- Figura 5.10** - Média ($\pm$ desvio-padrão) da atividade da catalase, normalizada pela quantidade de proteínas em cada grupo e expressa em U/mg proteína. ** $p < 0.01$ (análise de variância Anova seguida do teste de Tukey). 70
- Figura 5.11** - Média ($\pm$ desvio-padrão) da quantidade de malondialdeído (MDA) em cada grupo. ** $p < 0.01$ (análise de variância Anova seguida do teste de Tukey) 71
- Figura 5.12** –Imagens representativas do espalhamento de fragmentos de DNA no ensaio cometa (DAPI, aumento original 400X). C: Ausência de cometas no grupo Controle. CS: Presença de cometas no grupo Controle Saliva, porém com caudas discretas. BU: Grande quantidade de cometas, com caudas nítidas, no grupo Bussulfano 5.5ug/mL. BUI: Redução da frequência de cometas no grupo Bussulfano 5.5ug/mL Irradiado..... 72
- Figura 5.13** –*Box-plot* para a porcentagem de DNA na cauda do cometa. Traço horizontal espesso - mediana; Altura do *box* - intervalo interquartis; *whiskers* - valores mínimo e máximo; O - *outliers*. * $p < 0.05$ (Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn). 73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$^1\text{O}_2$	oxigênio singleto
5-FU	5-fluorouracil
ABVD	doxorubicina-bleomicina-vinblastin-dacarbazina
APRT	adenina fosforribosiltransferase
ATX1	proteína antioxidante
BCA	ácido biocinconínico
BCNU	carmustina
BU	bussulfano/ grupo bussulfano
BUI	grupo bussulfano irradiado
C	grupo controle
CAT	catalase
CI	grupo controle irradiado
CMF	ciclofosfamida, metotrexato e 5-FU
CO_2	gás carbônico
CS	grupo controle saliva
CSI	grupo controle saliva irradiado
CTCAE	<i>Common terminology Criteria for Adverse Events</i>
Cu^{+1}	cobre
Cu^{+2}	cátion cuprico
DAPI	2-(4-amidinofenil)-1H-indole-6-carboxamida
DECH	doença do enxerto contra o hospedeiro
DMEM	meio Eagle modificado por Dulbeco
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	deoxyribonucleic acid/ ácido desoxiribunucleico
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
ERN	espécies reativas de nitrogênio

ERO	espécies reativas de oxigênio
FBM	fotobiomodulação
Fpg	formamidopiridina glicosilase
G1	<i>Gap</i> - interfase do ciclo celular – crescimento celular
GPx	glutathione peroxidase
GRx	glutathione reductase
GSH	glutathione reduced
GST	glutathione S transferase
h	horas
HaCat	keratinocytes humanos
HCl	hydrochloric acid
He-Ne	helium-neon
HEPES	tampão
HO•	hydroxyl radical
InGaAlP	indium gallium aluminum phosphide
LBI	low intensity laser therapy
LED	light emitting diodes
LTDA	limited
M-BACOD/M-BECOD	metotrexate-bleomycin- doxorubicin/epidriamicin-cyclophosphamide- oncovin-dexamethasone
MDA	malondialdehyde
Min	minutes
MO	oral mucositis
MOPP-ABV	mustine-oncovin-procarbazine-prednisone
MTS	salt tetrazolium
NaCl	sodium chloride
NaOH	sodium hydroxide
NCI	<i>National Cancer Institutes</i>
ONOO ⁻	peroxynitrite
PBS	phosphate buffered saline
pH	hydrogen ion potential
RIPA	protein extraction buffer

RIR	regime de intensidade reduzida
S	interfase do ciclo celular – síntese de DNA
SDS	dodecil sulfato de sódio
SOD	superóxido dismutase
TBARS	<i>thiobarbituric acid reactive substances</i> /substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TBI	total body irradiation
TCH	transplante de células hematopoiéticas
TreoFlu	treosulfan e fludarabina
TUNEL	TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling
UVA	raios ultravioleta A
WHO	<i>World Health Organization</i> / Organização Mundial da Saúde

LISTA DE SÍMBOLOS

%	porcentagem
$\mu\text{M/kg}$	micromolar por quilograma
μM	micromolar
J/cm^2	joules por centímetro quadrado
nm	nanômetro
mW/cm^2	miliwatts por centímetro quadrado
W	Watts
mW	miliwatts
cm^2	centímetro quadrado
W/cm^2	watts por centímetro quadrado
Gy	gray
s	segundos
kJ/m^2	quilojoules por metro quadrado
Hz	Hertz
mM	milimolar
°C	Celsius
μL	microlitros
g/l	gramas por litro
mg/l	miligramas por litro
α	alpha
U/l	unidades internacionais
$\mu\text{g/mL}$	microgramas por mililitros
nM	nanomolar
rpm	rotações por minuto

mL	microlitros
M	molar
V	volt
β	beta
g	gramas
mA	miliampere
X	vezes
Δ	delta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	27
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	29
2.1	Concentrações salivares de quimioterápicos.....	29
2.2	Efeito citotóxico do bussulfano	30
2.3	Estresse oxidativo induzido por condicionamentos com bussulfano.....	32
2.4	Danos no DNA induzidos pelo bussulfano	35
2.5	Estresse oxidativo e fotobiomodulação	38
2.6	Danos no DNA e fotobiomodulação.....	42
3	PROPOSIÇÃO	45
3.1	Geral	45
3.2	Específicas	45
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	47
4.1	Cultivo Celular	47
4.2	Grupos experimentais	48
4.3	Teste de viabilidade celular	48
4.4	Validação de protocolo de confecção armazenamento e veiculação de saliva artificial no meio de cultura	49
4.5	Exposição ao bussulfano	50
4.6	Fotobiomodulação com laserterapia de baixa intensidade	51
4.7	Ensaio TUNEL	52
4.8	Obtenção de lisado celular	53
4.9	Quantificação de proteínas.....	54
4.10	Quantificação da atividade sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (<i>DPPH</i>)	54
4.11	Quantificação da superóxido dismutase	55
4.12	Quantificação da catalase.....	56
4.13	Quantificação da Peroxidação lipídica	57
4.14	Mensuração da fragmentação do DNA por ensaio Cometa	58
4.15	Análise estatística	59

5	RESULTADOS	61
5.1	Viabilidade celular	61
5.1.1	Quantidade e tipo de armazenamento da saliva	61
5.1.2	Concentração do bussulfano veiculado ou não em saliva	62
5.1.3	Tratamento com laserterapia de baixa intensidade (LTBI)	64
5.2	Análise de TUNEL	66
5.3	Estresse oxidativo	68
5.3.1	Atividade sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (<i>DPPH</i>)	68
5.4	Quantificação da superóxido dismutase	69
5.5	Quantificação da catalase	69
5.6	Peroxidação lipídica	70
5.7	Dano no DNA	71
5.7.1	Ensaio cometa	71
6	DISCUSSÃO	75
7	CONCLUSÕES	81
	REFERÊNCIAS	83
	ANEXO	92

1 INTRODUÇÃO

Há décadas, agentes quimioterápicos têm sido utilizados como agentes terapêuticos contra neoplasias malignas, tendo formulações químicas e protocolos de posologia que visam atingir uma dose plasmática compatível com a destruição das células neoplásicas. Ao atingir o pico plasmático, alguns desses quimioterápicos e seus metabólitos podem estar presentes na saliva, com doses iguais ou abaixo da dose terapêutica plasmática. Exemplos desses quimioterápicos são 5-fluorouracil (5-FU) (Jansman et al., 2002), metotrexato (Rodin et al., 2013), ciclofosfamida (Ritschel et al., 1981) e bussulfano (Bezinelli et al., 2017).

O bussulfano (BU) é um agente alquilante utilizado para o tratamento de ampla gama de doenças hematológicas, incluindo leucemias e linfomas. Em conjunto com a ciclofosfamida, é o principal agente quimioterápico utilizado durante o condicionamento do transplante de células hematopoiéticas (TCH) (Palmer et al., 2016). Contudo, gera intensa toxicidade, principalmente mucosite no trato digestivo, danos hepáticos e renais e distúrbios no sistema nervoso central (McCune & Holmberg, 2009), por induzir intenso estresse oxidativo, levando a danos do DNA (Mangerich et al., 2016). Particularmente em relação à mucosite oral (MO), nenhum estudo até então avaliou se as concentrações salivares do BU levariam a efeitos tóxicos nas células epiteliais; dessa maneira, a MO poderia advir tanto do efeito do BU plasmático, atingindo diretamente o tecido conjuntivo, quanto do BU salivar, atingindo diretamente os queratinócitos. A proposta deste trabalho foi verificar se a concentração salivar do BU gera efeitos citotóxicos, incluindo danos no DNA (do inglês, *deoxyribonucleic acid*), e se a fotobiomodulação (FBM) poderia acarretar efeito protetor nessas células.

A FBM com lasers ou diodos emissores de luz (LEDs, do inglês *light emitting diodes*) tem sido amplamente utilizada como agente preventivo e terapêutico da MO, com resultados que evidenciam eficácia clínica, principalmente quanto à prevenção das lesões (Oberoi et al., 2014). A FBM aumenta a quantidade de ATP (adenosina trifosfato) e das espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN) (Karu, 1999; Karu, 1986), favorecendo a ativação de vias de sinalização celular que culminam

com um efeito anti-inflamatório e reparativo, eficaz para a prevenção da MO (Zecha et al., 2016).

O estresse oxidativo tem sido associado à patogenia da MO, principalmente em suas fases iniciais. As células agredidas pelos agentes antineoplásicos exibem danos diretos e indiretos no DNA e produzem grande quantidade de EROs, que atuam nas membranas celulares, deflagrando respostas celulares inflamatórias (Cinausero et al., 2017). O efeito da FBM sobre as EROs em células sob estresse, exibindo grande quantidade desses radicais livres, ainda não é conhecido. Há uma tendência de se associar redução do estresse oxidativo em células e tecidos agredidos após a FBM (Hamblin, 2017), porém esses achados têm sido restritos principalmente a células musculares sob estresse mecânico, utilizando comprimentos de onda no infravermelho. Não encontramos nenhum estudo associando o efeito da FBM em células em cultura tratadas com quimioterápicos.

Em função da presença do BU na saliva, e considerando a indicação da FBM para prevenção e tratamento da MO em pacientes sob TCH, elaboramos a hipótese de que a laserterapia poderia proteger queratinócitos contra danos derivados do estresse oxidativo gerado pelo BU, minimizando, com isso, danos no DNA gerados por esse quimioterápico quando presente na saliva.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Concentrações salivares de quimioterápicos

Os agentes quimioterápicos, para terem máxima eficiência, requerem dosagens que produzem concentrações plasmáticas próximas de níveis tóxicos. A farmacocinética desses medicamentos é altamente variável, dependendo, por exemplo, da idade e do sexo do paciente, de interações medicamentosas e de ativação de genes relacionados ao metabolismo da droga. A farmacodinâmica identifica uma concentração que atinja de forma eficiente alvos neoplásicos, tendo efeitos diversos sobre tecidos saudáveis; a eficácia terapêutica é entendida como a máxima atividade terapêutica com o mínimo de toxicidade (Evans, 2001; Fan; de Lannoy, 2014).

A monitorização terapêutica dos agentes quimioterápicos é feita, em geral, por intermédio da obtenção da curva de concentração plasmática do medicamento. Contudo, alguns quimioterápicos têm sido monitorados por intermédio do fluido salivar, procurando-se associação com os níveis plasmáticos. Exemplos desses quimioterápicos são 5-fluorouracil (5-FU) (Jansman et al. 2002), metotrexato (Rodin et al. 2013), ciclofosfamida (Ritschel et al., 1981) e bussulfano (Bezinelli et al., 2017).

O BU exibe níveis salivares muito próximos daqueles observados em nível sérico. Um estudo demonstrou que seria viável realizar a monitorização terapêutica do BU administrado por via oral utilizando as concentrações salivares observadas em pacientes pediátricos portadores de leucemias e linfomas (Rauh et. al., 2006). Nosso grupo realizou outro estudo em que também demonstramos um índice de correlação alta entre os níveis plasmáticos e salivares do BU administrado por via endovenosa em pacientes sob condicionamento para TCH (Bezinelli et al., 2017).

Não é sabido se as concentrações salivares dos quimioterápicos causam também efeitos citotóxicos, principalmente sobre as células epiteliais da mucosa oral, as quais estão expostas à saliva. Um estudo demonstrou que não houve associação da área sobre a curva do 5-FU encontrada na saliva com a toxicidade

provocada por esse quimioterápico, incluindo a MO (Jansman et al., 2002). Caso ocorra algum efeito sobre essas células, poder-se-ia dizer que a MO seria derivada tanto do processo inflamatório que se instala no tecido conjuntivo, quanto da exposição das células endoteliais aos agentes quimioterápicos via saliva.

Além de um suposto efeito sobre a mucosa oral, os níveis salivares dos agentes quimioterápicos podem estar associados a alterações na própria saliva. Os agentes quimioterápicos acarretam modificações na composição e no fluxo salivar. Por exemplo, pode ocorrer diminuição da imunoglobulina A secretora diante da exposição a agentes alquilantes (Harrison et al., 1998); diminuição de amilase e aumento da albumina em pacientes com combinações incluindo doxorrubicina, metotrexato e vimblastina (Laine et al., 1992).

2.2 Efeito citotóxico do bussulfano

Desde meados dos anos 80, o BU foi reconhecido com um dos principais agentes quimioterápicos utilizados no condicionamento de TCH (Palmer et al., 2016). O BU é um agente alquilante bifuncional, da classe dos alquisulfonados. Pode ser administrado por via oral ou endovenosa, tanto em doses mieloablativas ou em condicionamento de toxicidade reduzida (Palmer et al., 2016). Os regimes mieloablativos envolvendo doses mais altas do BU causam toxicidade aguda e crônica, como náuseas e vômitos, MO, enterites e doença hepática veno-oclusiva (de Lima et al., 2004). O BU foi introduzido como uma alternativa à irradiação corpórea total (TBI, do inglês *total body irradiation*), sendo uma terapia eficaz em regimes de condicionamento pré-TCH envolvendo ciclofosfamida, para pacientes com leucemia mielóide crônica (Takamatsu et al., 2005). O BU pode ser também utilizado em conjunto com outras drogas quimioterápicas, como a fludarabina, sendo esse regime considerado benéfico em virtude da menor toxicidade (Patel et al., 2014; Lee et al., 2010).

Recentemente, têm-se optado por utilizar o BU por via endovenosa, em detrimento da via oral, para reduzir o efeito de primeira passagem e, consequentemente, os efeitos tóxicos sobre o fígado. Não há consenso, contudo,

que a via endovenosa tenha efeito tóxico menor em relação ao trato digestivo. Há estudos evidenciando que pacientes sob BU endovenoso apresentaram menor frequência e menor gravidade de MO quando comparados com aqueles que utilizaram BU por via oral (Russell et al., 2002; Sobecks et al., 2012).

O princípio de ação do BU é ocasionar danos no DNA e induzir a parada do ciclo celular (Takamatsu et al., 2005). É metabolizado principalmente no fígado, no qual ocorre conjugação catalítica com a glutathione pela glutathione S transferase (GST), formando um conjugado sulfônico, ou seja, a GST catalisa a reação de BU com o tripéptido glutathione, que resulta na formação de cátion sulfônico, ocorrendo no fígado. Atividade de GST hepática elevada é associada a baixas concentrações de BU no plasma, indicando que a conjugação com a glutathione é um mecanismo eficaz para metabolização do BU (DeLeve; Wang, 2000).

Um estudo avaliou o potencial citotóxico do BU, 5-FU, vimblastina, ciclofosfamida e carmustina (BCNU) em cultura de células. Ficou evidenciado que o BU e o BCNU induziram a morte preferencialmente de células responsáveis pela formação de colônias, com um fenótipo tronco, provocando um processo mais lento de recuperação das colônias. Com os demais quimioterápicos, o crescimento celular foi mais rápido. Ausência de recuperação do potencial proliferativo celular foi observado somente para o BU, o qual se estendeu até 650 dias após o tratamento, sugerindo que o tratamento com esse medicamento pode acarretar danos mieloablativos permanentes na medula hematopoiética (Botnick et al., 1981).

Em queratinócitos cutâneos, o efeito citotóxico do BU é observado pela perda de coesão dessas células com a membrana basal e posteriormente eritema (Mangerich et al., 2016). Nessa situação observa-se eritema com sintomas de queimação, principalmente em regiões de mãos e pés (síndrome de mãos e pés) e axilas. Frequentemente o epitélio descama e origina hiperpigmentação, com resolução espontânea do quadro (Parker et al., 2013).

Na cavidade oral, o BU provoca MO, xerostomia, alterações do paladar e predispõe a infecções oportunistas. Em geral, as mucosites são de graus severos, com média de tempo de aparecimento após 4 dias de infusão das células-tronco no TCH (Wingard et al., 1991; Chaudhry et al., 2016). Um estudo demonstrou que pacientes em protocolo de tratamento com BU apresentam desenvolvimento de

graus mais severos de MO (graus 3 e 4), em comparação com protocolo de treosulfan e fludarabina (TreoFlu). A duração das lesões ulceradas foi significativamente maior no grupo que recebeu o BU (Heli et al., 2012). Os regimes contendo BU também apresentam um risco aumentando de MO quando comparados com agentes alquilantes como, por exemplo, o melfalano (Fadda et al., 2006).

2.3 Estresse oxidativo induzido por condicionamentos com bussulfano

O estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio entre a produção de EROs (radicais livres derivados do oxigênio) e a defesa antioxidante. A geração de radicais livres ocorre em mitocôndrias, membranas celulares e citoplasma. Cerca de 2 a 5% do oxigênio metabolizado nas mitocôndrias são desviados da via metabólica e reduzidos a forma univalente, dando origem a radicais livres, que podem ser radicais superóxido, hidroxila e peróxido de hidrogênio, tendo em sua formação a participação de íons ferro e cobre (Barbosa et al., 2010). A produção contínua de radicais livres culmina no desenvolvimento de mecanismos de defesa antioxidantes, com o objetivo de limitar os níveis intracelulares das EROs e controlar a ocorrência de danos. A cascata de reações que promove a produção de EROs e a consequente ativação de antioxidantes é denominada de estresse oxidativo. A produção excessiva pode conduzir a danos oxidativos; em contrapartida, quantidades menores de EROs exercem funções fisiológicas essenciais, tais como induzem proliferação celular e a síntese protéica (Barbosa et al., 2010)

Dano oxidativo é o dano biomolecular causado pela reação das espécies reativas com estruturas celulares, promovendo alterações não compatíveis com a homeostase. As estruturas alvos desses radicais livres são lipídios, DNA, proteínas e carboidratos. Principalmente o DNA pode ser reparado após o dano oxidativo, em que ocorre a substituição de estruturas dessa molécula, mantendo a células viável. Por outro lado, o dano oxidativo pode induzir a morte celular por apoptose ou necrose, derivadas de intensa peroxidação lipídica e grande quantidade de adutos de DNA (Halliwell; Whiteman, 2004).

Os antioxidantes são substâncias que, quando presentes em baixas concentrações em comparação com a concentração do substrato oxidável, atrasam significativamente ou previnem a oxidação desse substrato. O sistema de defesa antioxidante tem a função de inibir e/ou reduzir os danos causados pela ação deletéria dos radicais livres ou das espécies reativas não radicais, impedindo a formação ou a ação destes, bem como favorecendo o reparo. Os antioxidantes podem ser vitaminas (A, C e E), cobre, zinco, mangânes e selênio, licopeno, agentes fitoquímicos (não enzimáticos) e enzimas, tais como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPX). A SOD catalisa a conversão do radical superóxido em peróxido de hidrogênio; já a CAT e a GPX transformam o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio (Halliwell; Whiteman, 2004; Barbosa et al., 2010). A CAT contém ferro e é encontrada em eritrócitos e no fígado, estando concentrada principalmente nos peroxissomos (Barbosa et al., 2010).

A peroxidação lipídica é um dos eventos de maior importância para a indução de lesões irreversíveis nas células. Nesse processo, EROs se ligam a ácidos graxos poli-insaturados, gerando subprodutos que podem produzir danos no sistema de membranas, no DNA e em proteínas. Esse processo pode ser intensificado diante da presença de ferro. As substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (*TBARS*, do inglês *thiobarbituric acid reactive substances*) sinalizam os níveis de peroxidação lipídica. O teste avalia a formação do malonaldeído (MDA) e de outros produtos dessa oxidação, os quais se ligam a aminoácidos e a bases nitrogenadas (Ayala et al., 2014).

Altas doses de quimioterapia no TCH resultam em oxidação protéica, tanto no plasma como nos eritrócitos, podendo gerar aumento do estresse oxidativo e levar a um aumento irreversível na formação de grupos carbonila (Sabuncuoglu et al., 2012). Como as proteínas têm diferentes funções biológicas, modificações oxidativas podem levar a diversas consequências funcionais, tais como inibição de enzimas e atividades de ligação, aumento da agregação protéica e proteólise (Sabuncuoglu et al., 2012). As EROs produzidas no TCH podem também incrementar substancialmente a peroxidação lipídica, na qual se observam altos níveis de MDA, mas não necessariamente de CAT e SOD (Gonçalves et al., 2009).

As EROs têm papel central na aplasia medular, estando associadas a inibição da hematopoese. O aumento das EROs pode prejudicar a capacidade de regeneração da medula hematopoiética e induzir a senescência, levando a supressão da medula óssea a longo prazo (Chatterjee; Law, 2018).

Particularmente o condicionamento com BU pode acarretar até 40% de redução da atividade antioxidante plasmática, com redução dos níveis plasmáticos de ácido úrico (um potente antioxidante) e intensa peroxidação lipídica, levando a níveis elevados de ferro sérico não ligado a transferrina (Dürken et al., 2000). Além disso, o BU se liga a glutatona das células, reduzindo em até 60% os níveis dessa substância antioxidante e aumentando a quantidade de EROs (DeLeve; Wang, 2000; Hassan et al., 2002). A peroxidação lipídica induzida pelo BU altera a permeabilidade de membrana, resultando em inviabilidade celular (Cai et al., 2016).

As EROs induzem danos no DNA por intermédio de vários mecanismos. Um deles é a ligação do radical hidroxila ($\text{HO}^\bullet$) a algumas purinas e bases pirimidínicas (timina e citosina, por exemplo). O oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) também reage com o DNA, porém de forma mais seletiva que o radical hidroxila. O peroxinitrito (ONOO^-) e os produtos de lipoperoxidação (dentre eles, o MDA) são outros componentes que reagem diretamente com o DNA, produzindo efeitos mutagênicos importantes. Os agentes alquilantes, no qual se enquadra o BU, são quimioterápicos que produzem danos diretos e indiretos no DNA. Os agentes alquilantes monofuncionais reagem com bases localizadas em somente uma fita de DNA; os bifuncionais (como é o caso do BU) reagem com as duas fitas de DNA, originando ligações cruzadas covalentes. Essas ligações impedem que a célula prolifere, acionando mecanismos de morte. Os danos indiretos no DNA são gerados a partir da peroxidação lipídica, induzindo mutações de DNA (Thirumaran et al., 2007).

2.4 Danos no DNA induzidos pelo bussulfano

Os estudos envolvendo a análise de danos no DNA induzidos pelo BU exibem ampla gama de resultados, em função principalmente da dose empregada. Alguns deles demonstram que o BU induz a formação de adutos de DNA, e outros detectam somente a fragmentação do DNA.

Em um desses trabalhos, o BU foi considerado (e outros quimioterápicos, como melfalano e ciclofosfamida) um potencial carcinógeno para as células humanas, em função do risco de se originarem neoplasias secundárias ao tratamento com esses quimioterápicos. Esse potencial foi avaliado por intermédio de um ensaio em que foram utilizados DNA de bacteriófagos, sem a presença de células. O BU e a ciclofosfamida não provocaram a formação de adutos de DNA, mas sim a fragmentação deste; já o melfalano induziu a formação de adutos de DNA e a fragmentação deste em um padrão dose-dependente (Adams et al., 1996).

Outro estudo verificou a frequência de quebras de DNA em leucócitos no sangue periférico de pacientes sob condicionamento com BU, daunorrubicina, ciclofosfamida e TBI. Foram realizadas coletas de sangue durante a infusão dos quimioterápicos e antes da TBI, bem como dois minutos após a TBI. A ciclofosfamida induziu altos níveis de quebra do DNA, a qual persistiu por até 2 dias após a finalização do tratamento. Já com o BU e daunorrubicina não foi possível detectar esses danos pelo método utilizado. Os autores discutem que provavelmente isso foi devido a dose administrada. Por outro lado, os danos no DNA provocados pela TBI foram reparados em 24h, diferentemente daqueles induzidos pela ciclofosfamida, que persistiram por mais tempo (Franssen et al., 1990).

Em contraste com o estudo anterior, na mini-revisão descrita a seguir, o BU exibiu maior potencial genotóxico que a ciclofosfamida. Provavelmente essas diferenças ocorreram em função dos métodos de detecção de danos no DNA, que foram diferentes.

O BU foi considerado um potente agente aneuploidogênico, ou seja, que induz a formação de cromatina com cromossomos em excesso ou faltantes, em uma mini-revisão incluindo vários agentes alquilantes, dentre eles a ciclofosfamida, e seu

potencial de induzir micronúcleos em eritrócitos presentes no sangue periférico e na medula hematopoiética. Em comparação a ciclofosfamida, o BU foi indutor de maior quantidade de micronúcleos e de maior efeito citotóxico. Contudo, em comparação com a vincristina e a vimblastina, o BU e a ciclofosfamida exibiram potencial genotóxico menor. Os autores discutiram que o BU causa quebras de DNA e, durante as fases G1 e S, na qual ocorre o reparo desse DNA, há a formação de micronúcleos; esse processo é mais lento na ciclofosfamida, a qual necessita ser ativada no fígado primeiro, para que tenha efeito citotóxico. Ambos quimioterápicos exibiram uma relação direta entre efeito genotóxico e citotoxicidade, ou seja, a morte celular foi diretamente relacionada com os danos induzidos no DNA (Morales-Ramirez et al., 2014).

Há uma hipótese de que doses baixas de BU induzam a formação de monoadutos de DNA, e doses mais altas originem ligações cruzadas entre as fitas de DNA. Um estudo verificou o efeito da dose sobre a cinética de indução de danos no DNA analisando leucócitos murinos de sangue periférico por intermédio do ensaio cometa. Esse ensaio evidencia a perda as quebras de DNA, as quais, por eletroforese, são espalhadas em uma lâmina e analisadas por intermédio de microscopia de fluorescência. Foi evidenciado que doses baixas (até 30µM/kg) induziram a formação de cometas em um intervalo de 60min, ao passo que doses mais altas (acima de 45 µM/kg) não provocaram a formação de cometas, ao contrário, inibiram a formação destes, ficando abaixo do controle com dimetilsulfóxido (DMSO). Os autores discutiram que as doses altas provavelmente induziram ligações cruzadas entre as fitas de DNA, o que impediu a denaturação e o espalhamento dos fragmentos de DNA. Assim, os danos no DNA provocados pelo BU parecem ser dose-dependentes (Morales-Ramírez et al., 2006).

O BU pode gerar senescência nas células, ou seja, a célula não progride no ciclo celular, mas também não aciona mecanismos de morte, perdendo a capacidade de gerar nova progênie em função de danos extensos de DNA. Essas células secretam várias citocinas inflamatórias e fatores de crescimento, que contribuem para a resistência celular ao quimioterápico. A hipótese vigente na literatura é que o BU induz a formação de ligações cruzadas no DNA, que acionam mecanismos de reparo no DNA mediados pela proteína p53. Um estudo demonstrou que fibroblastos exibindo diploidia, mantidos em cultura e tratados com BU (120µM),

exibiram parada na proliferação celular após 24h, devido à alta frequência de células em senescência, e não devido a apoptose. Essas células exibiram redução em até 50% da glutatona, bem como aumento da quantidade de EROs em até 34% após 4h de exposição ao quimioterápico. Os autores ainda demonstraram que a senescência foi induzida não pela p53, mas sim pela ativação da via Erk-p38 MAPK, feita pelas EROs (Probin et al., 2007).

Em estudos com biópsia de pele, é comum verificar a presença de displasia cutânea após o TCH no qual o condicionamento foi realizado com agentes alquilantes. Essa displasia já foi associada a ciclofosfamida (Castaño et al., 2002), bem como ao BU (Hymes et al., 1985), no período de 15 a 45 dias após o transplante. Queratinócitos amplos, com núcleo extremamente grande, de contorno irregular e cromatina bizarra, exibindo pérolas querato-hialinas, têm sido denominados de “células do bussulfano” (Fitzpatrick, 1993). Aspecto semelhante foi observado em outro estudo (Li et al., 2012), no qual foram detectados casos exibindo displasia severa em queratinócitos cutâneos de pacientes sob TCH com condicionamento envolvendo quimioterápicos alquilantes e TBI. Essa displasia cutânea foi detectada no período pós-transplante, sendo significativamente associada ao BU, mas não a ciclofosfamida, fludarabina e TBI, nem a regimes de toxicidade reduzida e à doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH). Contudo, avaliações a longo prazo revelaram que a tendência foi a displasia diminuir, normalizando o fenótipo dos queratinócitos após 241 dias do transplante. Esses estudos sugerem que o BU atua nos queratinócitos induzindo danos severos no DNA, porém esses danos são reversíveis e não-permanentes. Não há estudos indicando que esses mesmos efeitos genotóxicos possam ser detectados em queratinócitos da mucosa oral.

Assim, o BU é um potente indutor de ligações cruzadas no DNA, as quais são convertidas em fragmentos quando houver o acionamento do reparo do DNA. Esses danos são dose-dependentes, e podem induzir senescência nas células. Na prática clínica, alterações no DNA traduzidas por displasia severa em queratinócitos de pele parecem ser reversíveis após longo tempo no período pós-transplante.

2.5 Estresse oxidativo e fotobiomodulação

A FBM é a propriedade que os fótons têm de induzir respostas físicas e químicas em células e tecidos. Esses efeitos podem ser estimulatórios, em que a célula aumenta seu aporte energético e adquire potencial proliferativo, ou então inibitórios, com depleção energética e redução da atividade celular. Em geral, esse termo é empregado para a fototerapia incluindo doses baixas de energia e potência, tanto com LEDs quanto com lasers (Hamblin, 2017).

A fototerapia provoca efeitos primários, secundários e terciários. São de particular interesse para o presente projeto os efeitos primários, nos quais ocorre absorção do fóton por cromóforos celulares, em geral localizados nas mitocôndrias, induzindo produção de ATP, EROs e óxido nítrico, em função do consumo de oxigênio nessas reações (Karu, 1999). O efeito do fóton sobre os cromóforos, particularmente sobre o citocromo c oxidase, leva ao aumento do potencial de membrana mitocondrial, induzindo produções baixas de EROs nas células normais. Essa produção é dose-dependente e bifásica, ou seja, baixas doses de densidade de energia (por volta de $3\text{J}/\text{cm}^2$) levam à produção de EROs, e altas doses (por volta de $30\text{J}/\text{cm}^2$) limitam o potencial de membrana, inibindo a formação de EROs; doses intermediárias (cerca de $10\text{J}/\text{cm}^2$), quando o potencial de membrana mitocondrial está igual ao baseline, também não induzem muita produção de EROs. A interpretação se essa produção de EROs é benéfica ou não depende do quanto o sistema antioxidante foi ativado, já que a presença, por exemplo de superóxidos dentro da mitocôndria pode induzir danos irreversíveis nessa organela. Por outro lado, a ação eficiente da SOD, inibindo os superóxidos, ativa vias de sinalização celular, benéficas para a proliferação celular (Hamblin, 2017). Pode-se dizer, em geral, que a baixa produção de EROs tem efeito benéfico sobre as células, e altas concentrações desses radicais são citotóxicos (Tafur; Mills, 2008).

Há uma tendência de se verificar que a FBM gera redução de EROs em tecidos ou células nos quais esses radicais encontram-se em altos níveis, mesmo quando a fototerapia é realizada em doses baixas (Hamblin, 2017). As explicações para esses fatos ainda não estão esclarecidas, mas já se sabe que os tecidos com níveis altos de oxidação têm maior sensibilidade à fototerapia com luz de baixa

intensidade, principalmente porque o citocromo c oxidase torna-se mais fotossensível, absorvendo maior quantidade de fótons (Tafur; Mills, 2008).

A redução de EROs após fototerapia com luz de baixa intensidade também está ligada à ativação de genes específicos. A FBM promove a modulação de vários genes, incluindo aqueles relacionados à proliferação celular, à inibição da apoptose, à ativação do sistema antioxidante e ao reparo do DNA. Um estudo demonstrou que o laser de 628nm, variando de 0.44 a 8.6J/cm² e irradiância de 11.5mW/cm², foi capaz de modular 111 genes em fibroblastos normais em cultura; desses, dois genes eram ligados ao sistema antioxidante, e estavam superexpressos: um ligado a selenoproteína W, um antioxidante dependente de glutathione, que torna as células mais resistentes ao peróxido de hidrogênio; outro relacionado à proteína antioxidante ATX1, que substitui a SOD1, consumindo diretamente os superóxidos ou então ativando vias das metalochaperonas. Os autores verificaram também que outros dois genes, também superexpressos, faziam parte do sistema de reparo do DNA: um gene considerado antimutagênico (denominado Nudix), que neutraliza a formação de adutos de DNA gerados por EROs; outro relacionado a uma enzima (denominada adenina fosforribosiltransferase - APRT) que promove o reparo do DNA em situações de danos que podem gerar mutações; a ativação dessa enzima tem sido estudada diante da exposição a agentes alquilantes, pois ela promove a hidrólise do DNA alquilado. Os autores concluíram que a expressão gênica observada condiz com o efeito estimulatório que as doses empregadas no estudo comumente acarretam sobre os fibroblastos, principalmente no tocante à proliferação celular, e que genes ligados à proteção e reparo do DNA participam desse efeito estimulatório (Zhang et al., 2003).

Em experimentos animais envolvendo situações de inflamação e reparo, a FBM tem promovido redução de proteínas antioxidantes. Essa redução tem sido interpretada como derivada da diminuição da inflamação provocada pela fototerapia. A ação de neutrófilos, macrófagos e células dendríticas promove aumento da produção de EROs, os quais são essenciais para eliminar patógenos, mas também contribuem para a instalação da inflamação e da destruição tecidual (Hoffmann; Griffiths, 2018). A fototerapia, ao modular esse processo, reduziria, como consequência, as EROs e a atividade do sistema antioxidante no local inflamado.

Um exemplo do papel da FBM no estresse oxidativo em situações de inflamação é um estudo em que foram realizadas lesões cutâneas padronizadas e posteriormente irradiadas com diferentes lasers (pulsado, 904nm, 70W, $0.4\text{W}/\text{cm}^2$, área do spot $0,10\text{cm}^2$, 1 e $3\text{J}/\text{cm}^2$; e contínuo, 660nm, 30mW, $0,10\text{cm}^2$, 1 e $3\text{J}/\text{cm}^2$). Esse trabalho demonstrou uma redução significativa de MDA (técnica TBARS) nos grupos dos dois tipos de lasers a $3\text{J}/\text{cm}^2$, bem como de SOD e de CAT nos grupos com laser contínuo a 1 e $3\text{J}/\text{cm}^2$ e no grupo com laser pulsátil a $3\text{J}/\text{cm}^2$. Os autores interpretaram a redução das proteínas antioxidantes como resultado da pouca exposição do tecido às EROs, já que a laserterapia provocou diminuição da inflamação e aumento da velocidade de reparo das feridas (Silveira et al., 2011).

Uma revisão sistemática recente avaliou o papel da FBM sobre o estresse oxidativo presente em lesões musculares induzidas em animais. Após aplicação dos critérios de inclusão e exclusão, os autores selecionaram oito artigos. Os biomarcadores de estresse oxidativo mais presentes nesses estudos foram CAT, SOD, GPX e marcadores de peroxidação lipídica. Os comprimentos de onda mais utilizados foram entre 780 e 904nm, com somente três estudos avaliando a fototerapia com 660nm. A potência variou de 5/2mW a 100W, e a fluência entre 1 e $20\text{J}/\text{cm}^2$. Os autores verificaram que, em todos os estudos, a FBM promoveu aumento de proteínas antioxidantes e diminuição de TBARs, com diferenças significativas em relação aos controles em três deles. Os autores discutem que a FBM mediada por laser ou LED promove redução de EROs por intermédio da redução da inflamação aguda, bem como pela indução direta de proteínas antioxidantes; contudo, a grande variação na dosimetria limita conclusões a respeito do protocolo ideal para se atingir o máximo de efeito antioxidante (dos Santos et al., 2017). Assim, contrariamente ao estudo anterior, essa revisão sistemática indica certa tendência em se encontrar aumento da capacidade antioxidante nos músculos.

Outro estudo, agora com inflamação pulmonar induzida por formaldeído em ratos, para simular as condições de poluição ambiental, demonstrou que a FBM (laser 660nm, $210\text{mW}/\text{cm}^2$, $12.8\text{J}/\text{cm}^2$) reduziu os níveis de nitritos e de peróxido de hidrogênio e aumentou os teores de SOD e GPX, mas não de CAT (Silva Macedo et al., 2016).

A grande maioria dos trabalhos avaliou o estresse oxidativo diretamente nas células e nos tecidos injuriados. Um estudo verificou a capacidade antioxidante presente no sangue de ratos nos quais foi induzida ferida na mucosa do palato duro, posteriormente irradiada com laser 940nm (100mW, $1.11\text{W}/\text{cm}^2$, $10\text{J}/\text{cm}^2$). Os autores verificaram efeito positivo da FBM sobre o processo de reparo, principalmente na proliferação de fibroblastos e na síntese de colágeno; por outro lado, detectaram diminuição da capacidade antioxidante total no sangue (Firat et al., 2014).

Outra investigação avaliou o estresse oxidativo no sangue de ratos expostos a radiação gama (1 a 8Gy), a laserterapia de baixa intensidade (830nm, 20 ou $100\text{J}/\text{cm}^2$, $300\text{mW}/\text{cm}^2$) ou a ambas irradiações na região da pele abdominal. A radiação gama provocou aumento significativo da SOD e do MDA, mas a laserterapia não modificou essa tendência quando utilizada em conjunto; ao contrário, houve certa tendência de a laserterapia aumentar a SOD e o MDA, apesar de não haver diferenças estatísticas. Os autores discutem a questão da dosimetria e o fato de terem avaliado o sangue e não o tecido injuriado, fatores que podem ser associados às diferenças encontradas com a maioria dos estudos, os quais incluem o tecido muscular inflamado (Freitinger Skalická et al., 2012).

Assim, parece haver certo consenso de que, nos músculos com inflamação, a FBM reduz EROs e aumenta o potencial antioxidante, enquanto nos demais tecidos, incluindo pele e mucosa oral, a escassez de trabalhos não permite uma extrapolação geral.

Embora os trabalhos citados envolvam os temas estresse oxidativo e FBM, nenhum deles se aproxima diretamente da proposta do presente estudo. Não encontramos nenhum trabalho que avaliasse o estresse oxidativo em células tratadas com quimioterapia e FBM.

2.6 Danos no DNA e fotobiomodulação

O efeito da FBM sobre o DNA é pouco estudado. Uma investigação conduzida com queratinócitos orais humanos em cultura demonstrou que irradiações com $4\text{J}/\text{cm}^2$ (660nm, 40mW, $1\text{mW}/\text{cm}^2$) aumentaram os níveis de EROs, porém $20\text{J}/\text{cm}^2$ não acarretaram modificações na taxa de EROs. O aumento do estresse oxidativo não gerou, contudo, fragmentação do DNA, avaliada por intermédio do ensaio cometa. Os autores também verificaram que as irradiações não induziram quebras nas fitas de DNA, avaliadas pela imunoexpressão de γ -H2AX, nem ativação do sistema de reparo do DNA, avaliada pela imunoexpressão de BRCA1. Os autores concluíram que a produção de EROs pela dose mais baixa de irradiação empregada é fisiológica, e pode ser benéfica em situações nas quais é necessário o estímulo à proliferação celular (Dillenburg et al., 2014).

Um estudo demonstrou que a FBM (660nm, 40mW, 30, 90 e 150s de irradiação, gerando 30, 90 e $150\text{J}/\text{cm}^2$, respectivamente) diminuiu a taxa de senescência (nas fluências de 90 e $150\text{J}/\text{cm}^2$) em fibroblastos normais expostos a radiação gama de 2.5Gy e 10Gy. Contudo, em células de câncer de mama, a FBM aumentou a taxa de senescência após 4 dias da exposição à radiação gama. Os autores concluíram que a FBM promove proteção contra danos no DNA provocados pela radiação gama, porém esse efeito parece ser mais perceptível em células normais (Ramos Silva et al., 2016).

O efeito protetor do FBM também foi avaliado em cultura de linfócitos B humanos, tratados com radiação UVA (100 e $135\text{kJ}/\text{m}^2$). A FBM foi realizada antes da radiação UVA, feita com laser 633nm, 1.2mW, com tempo de irradiação de 20 a 100s, gerando fluência de $2.7\text{kJ}/\text{m}^2$. Os danos no DNA foram avaliados por ensaio cometa. Houve redução da quantidade de DNA danificado induzido pela radiação UVA quando as células foram expostas previamente a laserterapia, porém esse efeito foi limitado até $1\text{kJ}/\text{cm}^2$. Acima dessa fluência, o efeito protetor não foi mais observado. Os autores concluíram que a FBM com laser de 633nm tem efeito protetor contra danos no DNA induzidos pela radiação UVA, porém esse efeito é dose limitante (Dube et al. 2001).

Outra investigação demonstrou que FBM (LED 670nm, 35mW/cm², 300s, 10.5J/cm²), realizada sobre a pele na região dos rins de ratos com diabetes induzida, reduziu a formação de adutos 8-OHdG no DNA dos rins dos animais em comparação com o grupo diabético sem laserterapia. Houve também aumento significativo de CAT, mas não de SOD, GPX, glutathione redutase (GRX), glutathione S-transferase (GST) e glutathione reduzida (GSH). Nesse experimento, houve aumento significativo também da citocromo c oxidase. Os autores concluíram que a FBM foi eficaz para reduzir o estresse oxidativo e o dano no DNA provocado pelo diabetes nos rins (Lim et al., 2010).

O efeito genotóxico da FBM foi avaliado em células procariotas, em modelo de cultura de *Escherichia coli* e plasmídeos dessa bactéria, com ou sem capacidade de reparo do DNA via exonuclease II. A cultura dessas bactérias foi exposta a laser de 658nm (contínuo ou pulsátil, 2,5, 250 ou 25000Hz, 10mW, 79mW/cm², 1, 4 e 8J/cm²) e a peróxido de hidrogênio (10mM, tempo de incubação de 10min). O estudo evidenciou que a pré-exposição das células e dos plasmídeos a laserterapia protegeu-os da ação genotóxica do peróxido de hidrogênio; essa proteção foi mais evidente nas células com deficiências no reparo do DNA. Nos plasmídeos, foi observado um padrão de distribuição do DNA diferente quando o material genético foi submetido a eletroforese no grupo em que houve exposição ao laser; os autores sugeriram que provavelmente o DNA foi alterado pelo laser, mas não em termos de quebras simples ou duplas de DNA. Os autores concluíram que a laserterapia, utilizada nas condições do experimento, não foi genotóxica; contudo, alterações no DNA foram detectadas e necessitam ser investigadas (Fonseca et al., 2010).

Fluências mais altas de laserterapia podem induzir danos no DNA. Uma investigação envolvendo fibroblastos humanos em cultura utilizou FBM com laser de 636nm, com fluências de 5 (7min de irradiação) e 10J/cm² (24 min de irradiação), 100mW, 11mW/cm². Os autores fizeram duas sessões de irradiação, com intervalo de 3 dias entre elas. Após 1h ou 24h da irradiação, as células foram submetidas a dois tipos de ensaio cometa (alcalino), um de maneira convencional, que detecta presença de quebra de fitas de DNA, e outro, modificado com a introdução da enzima formamidopiridina glicosilase (Fpg), que detecta purinas oxidadas. No ensaio cometa convencional, a laserterapia com 16J/cm² provocou danos no DNA em comparação aos controles sem tratamento e a 5J/cm². Resultado semelhante foi

obtido com o ensaio cometa adicionado da enzima Fpg, quando a laserterapia de $16\text{J}/\text{cm}^2$ provocou maior quantidade de purinas oxidadas quando comparada aos controles e a $5\text{J}/\text{cm}^2$. Contudo, houve redução dessa taxa de dano no DNA após 24h, sugerindo que o sistema de reparo do DNA é suficiente para corrigir os erros no material genético induzidos pela FBM. Os autores concluíram que laserterapia com fluências mais altas podem ter efeito inibitório sobre fibroblastos, induzindo danos no DNA; esses danos, contudo, podem ser reparados por mecanismos ainda a serem esclarecidos (Mbene et al., 2009).

Assim, os estudos descritos parecem indicar que a FBM tem efeito protetor contra danos no DNA provocados por radiação gama, radiação UVA e diabetes; contudo, esse efeito é dose-dependente, já que fluências mais altas parecem induzir lesões no DNA; esse efeito parece variar também em função do tipo celular envolvido. Não encontramos nenhum trabalho que avaliasse o efeito da FBM sobre o DNA de células expostas a quimioterápicos.

3 PROPOSIÇÃO

3.1 Geral

Investigar se doses salivares de BU são citotóxicas e se a FBM exerce efeito protetor sobre queratinócitos humanos expostos a essas doses.

3.2 Específicas

- Validar a metodologia de utilização de saliva artificial constituída em laboratório, contendo agentes quimioterápicos e inserido em cultura de células.

- Investigar se doses de BU encontradas na saliva modificam a viabilidade de queratinócitos humanos *in vitro*.

- Investigar se a concentração salivar do BU induz estresse oxidativo nesses queratinócitos, por intermédio da quantificação da atividade sequestradora de DPPH, SOD, CAT e peroxidação lipídica.

- Investigar se a concentração salivar do BU induz quebras de fita de DNA.

- Analisar se a exposição prévia a LBI atenua os efeitos citotóxicos do BU veiculado em saliva.

4 MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia descrita a seguir foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (Parecer n. 1.585.003) (Anexo A).

4.1 Cultivo Celular

Todo o experimento do presente trabalho foi realizado com a linhagem comercial de queratinócitos cutâneos humanos imortalizados HaCat (Humane Kerainozyten Zell-Line, CLS Cell Lines Service, GmbH, Eppelheim, Germany). As células foram acondicionadas em criotubos e mantidas no nitrogênio líquido até sua utilização. O descongelamento foi feito com banho-maria a 37°C; após esse procedimento, as células foram transferidas para frascos de cultivo celular contendo meio Eagle modificado por Dulbeco (DMEM) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco – Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 1% de antibiótico/antimicótico (Gibco – Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e 1% de L-Glutamina. Os frascos de cultivo foram mantidos a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. A manipulação das células ocorreu em fluxo laminar e seu crescimento foi analisado a cada dois dias em microscópio invertido com contraste de fase (Axio Vert®, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha). O meio de cultivo foi trocado conforme o metabolismo celular (em média a cada dois dias).

4.2 Grupos experimentais

Foram estabelecidos os seguintes grupos experimentais:

- a) Grupo Controle (C): células HaCat sem nenhum tratamento.
- b) Grupo Controle Saliva (CS): células HaCat com adição de saliva artificial constituída em laboratório.
- c) Grupo Bussulfano (BU): células HaCat expostas a diferentes doses de BU veiculado em saliva artificial.
- d) Grupo Controle Irradiado (CI): células HaCat submetidas a FBM com laserterapia de baixa intensidade.
- e) Grupo Controle Saliva Irradiado (CSI): células HaCat com adição de saliva artificial e submetidas a FBM com laserterapia de baixa intensidade.
- f) Grupo Bussulfano Irradiado (BUI): células HaCat expostas a saliva contendo BU e submetidas a FBM com laserterapia de baixa intensidade.

Nas análises preliminares do efeito da saliva com BU sobre os queratinócitos, criamos mais um grupo no qual este quimioterápico foi veiculado diretamente no meio de cultura. Esse grupo teve por objetivo sinalizar se o BU veiculado em saliva ou em meio exerce efeitos diferentes sobre a viabilidade celular. Não constitui um grupo experimental, pois o foco do presente trabalho é verificar os efeitos do BU veiculado em saliva.

4.3 Teste de viabilidade celular

A citotoxicidade do BU foi avaliada por meio de teste de viabilidade celular MTS (sal tetrazólio). Esse teste também foi utilizado para confirmar que a saliva artificial constituída em laboratório era inerte aos queratinócitos.

O ensaio MTS é um método colorimétrico de detecção de células capazes de reduzir o sal tetrazólio, pela ação de desidrogenases mitocondriais, gerando trifenilformazan; a detecção do trifenilformazan sugere que a atividade mitocondrial celular está preservada; a modificação de cor detectada pelos filtros de absorbância é proporcional à frequência de células cuja capacidade de conversão do sal tetrazólio está preservada (Sittampalam et al., 2004).

Células HaCat (3500 células por poço) (Sperandio, 2012; Rosin, 2015) foram cultivadas em placas de 96 poços de cor preta e fundo transparente. Após 24h dos tratamentos (administração de BU, saliva e FBM), o teste de viabilidade celular foi realizado com o utilizando o kit Cell Titer 96 (Promega, Madison, Wisconsin, EUA). Foram adicionados 20µL da solução Cell Titer 96 a 180µL de meio, prosseguindo-se a incubação por 120min em estufa CO₂ a 37°C. Após esse período, foi quantificada a formação do sal formazan em espectrofotômetro (ELX 800 Biotek Instruments Inc., Winooski, VT, EUA), com filtro de 490 nm. Os valores dos testes foram divididos pelos do controle e multiplicados por 100, obtendo-se uma porcentagem de viabilidade celular. Os experimentos de MTS foram realizados em sextuplicata.

4.4 Validação de protocolo de confecção armazenamento e veiculação de saliva artificial no meio de cultura

Foi constituída saliva artificial com base em Malpass et al. (2013), com a seguinte composição: mucina (1.35 g/l), cloreto de potássio (475 mg/l), cloreto de sódio (700 mg/l), cloreto de cálcio (185 mg/l), fosfato de potássio (420 mg/l), cloreto de magnésio (105 mg/l), uréia (45 mg/l), D-(+)-glicose (100 mg/l), α-amilase (100,000 U/l), lisozima (750 U/l) e fosfatase ácida (4 U/l). Esta saliva artificial, por vezes

chamada de saliva artificial completa, é utilizada para experimentos *in vitro*, a fim de criar um ambiente oral artificial válido. Segundo Malpass et al. (2013) o cálcio e fostato ajudam a manter a integridade mineral dos dentes; a mucina protege a superfície dentária contra a desmineralização e promove a remineralização, além de lubrificação e proteção da mucosa; a amilase catalisa as quebras de amido e glicogênio em maltose e inibe a aderência e o crescimento bacteriano; a lisozima destrói as paredes celulares bacterianas; a fosfatase alcalina libera grupos fosfato de outras moléculas durante a digestão; e a uréia, em conjunto com bicarbonatos e fosfatos, modula o pH e a capacidade tampão. Assim foi composta uma saliva artificial capaz de imitar a saliva humana.

Inicialmente, foi verificado se essa composição e o volume de 10µL e 20 µL de saliva interferiam na viabilidade celular. Esse volume foi inserido após a constatação da aderência dos queratócitos. A viabilidade celular foi avaliada após a saliva ficar 24h em contato com as células.

Em seguida, foi avaliada a melhor maneira de se armazenar essa saliva, para evitar de se constituir essa solução toda vez que a mesma fosse utilizada. Testou-se então o armazenamento a 8°C e a -4°C, bem como se o descongelamento não interferiria na viabilidade celular. A saliva artificial foi acondicionada em tubos falcon com as quantidades adequadas para cada ensaio, sendo descongelada uma única vez.

4.5 Exposição ao bussulfano

O BU (Sigma-Aldrich Brasil LTDA, São Paulo, SP, Brasil) foi dissolvido em saliva artificial e no meio de cultura em diferentes concentrações. Para o estabelecimento dessas concentrações, baseamo-nos naquelas detectadas na saliva de pacientes submetidos a monitorização terapêutica do BU durante condicionamento para TCH (Bezinelli et al., 2017). Nesse estudo do qual participamos, foi encontrada alta correlação entre os níveis plasmáticos de BU com os níveis salivares, indicando que as concentrações do BU no sangue são muito similares àsquelas detectadas na saliva. Portanto, esse quimioterápico está presente

na saliva em concentrações consideradas terapêuticas. Vimos que o pico do BU na saliva ocorre após 180min após a infusão endovenosa do medicamento, com declínio para níveis não tóxicos e não-terapêuticos após 360min; a mesma farmacocinética foi observada no sangue. A média de concentração na saliva em 180min foi de 4.21µg/mL de BU, com valor mínimo de 2.32 µg/mL e máximo de 5.7µg/mL (Bezinelli et al., 2017).

Para verificar se o pico de concentração salivar do BU gerava efeitos citotóxicos em queratinócitos, estudamos a viabilidade celular de culturas expostas a 4.0, 4.5, 5.0 e 5.5 µg/mL de BU veiculado, inicialmente, diretamente no meio de cultura nas concentrações descritas, com tempo de incubação de 24h. Após o período de incubação, o meio contendo o BU foi substituído por meio desprovido dessa droga e realizado o teste de viabilidade celular. Em seguida, essa droga foi diluída na saliva artificial nas mesmas concentrações descritas, e 20µL dessa solução foram inseridos nas placas de cultura, com tempo de incubação de 24h, sendo também realizado teste de viabilidade celular. Pela comparação destes, foi possível verificar se a saliva alterou o potencial citotóxico do BU, considerando-se o tipo de linhagem celular envolvida e as condições de experimentação padronizadas no presente estudo. Também foi possível estabelecer a concentração padrão do BU veiculado em saliva para ser utilizada nos demais ensaios.

4.6 Fotobiomodulação com laserterapia de baixa intensidade

Para verificar se os protocolos de LTBI exercem efeito protetor sobre queratinócitos expostos ao BU, células HaCat receberam irradiação com laser InGaAlP 660nm (Therapy XT, DMC Importação e Exportação de Equipamentos LTDA, São Carlos, SP, Brasil), 100 mW de potência, 0,028 cm² área do spot, 20 segundos de tempo de irradiação, gerando fluência de 8J/cm² e irradiância de 3571mW/cm². Essa dosimetria foi estabelecida com base em estudos nos quais foi realizada LTBI para prevenção e tratamento de MO em pacientes sob condicionamento com BU (Eduardo et al., 2015; Bezinelli et al., 2015). A irradiação foi realizada com a fibra óptica mantida em posição perpendicular ao fundo da placa.

Utilizou-se placa de Petri contendo adesivo preto no fundo, no qual furos de mesmo diâmetro, compatíveis com a área do spot, foram realizados, para se padronizar o local e a área de irradiação, evitando-se que células ficassem sem irradiação ou com excesso desta (Figura 4.2). Esse método foi adaptado de Sperandio (2012). Também foi utilizada placa preta de 96 e 12 poços, contendo fundo transparente, a qual mantém a irradiação restrita às células presentes somente no poço no qual foi posicionada a ponta (Figura 4.3 e 4.4). A irradiação ocorreu em fluxo laminar, mantendo-se o grupo respectivo que não receberia irradiação também sob as mesmas condições experimentais.

Para simular múltiplas sessões de LTBI aplicadas durante e após o condicionamento com BU, estipulou-se que seriam realizadas três sessões de LTBI. A primeira sessão ocorreu imediatamente após a finalização da incubação do BU. Foram testados os intervalos de 1, 2, 3 e 4h entre as sessões, para se estabelecer aquele mais adequado para se detectar o efeito protetor da LTBI, avaliado pelo teste de viabilidade celular.

Figura 4.1 – A: Placa de Petri com adesivo-guia utilizada para os ensaios com a luz laser. B: Placa de 96 poços na cor preta com fundo transparente utilizada para os ensaios com a luz laser (Sperandio, 2012). C: Placa de 12 poços na cor preta com fundo transparente utilizada para os ensaios com a luz laser (Sperandio, 2012)

4.7 Ensaio TUNEL

Foi realizado ensaio TUNEL (TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling), o qual detecta fragmentação de DNA derivada de quebras simples e duplas da fita de DNA. O ensaio é utilizado para avaliar os índices de células sugestivas de estarem em morte por apoptose ou necrose (Otsuki, 2000).

Células HaCat foram cultivadas em lamínulas colocadas em placa de 12 poços, cujo fundo continha adesivo similar ao descrito no item 4.6. Após adesão sobre as lamínulas, as células foram submetidas aos diferentes tratamentos e, após 24h, foram fixadas com metanol puro até sua utilização. Depois de fixadas, foram lavadas três vezes com PBS. Em seguida, as lamínulas foram incubadas com os reagentes pertencentes ao Kit Dead End Fluorometric Tunel System (Promega, Inc., Madison, Wisconsin, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Após este procedimento, as lâminas foram montadas com meio de montagem DAPI (Vectashield®, Vector Laboratories, CA, USA) e analisadas em microscópio de fluorescência Zeiss LSM 510 (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha). Foram quantificadas as células TUNEL positivas, obtendo-se a porcentagem dessas células em um total de 500 células. Esse ensaio foi realizado em triplicata para os seguintes grupos com ou sem tratamento com BU e com ou sem irradiação com LTBI: Controle, Controle Irradiado, Controle Saliva, Controle Saliva Irradiado, BU com concentração salivar de 5,5µg/mL e BU 5,5µg/mL Irradiado.

4.8 Obtenção de lisado celular

Para quantificação de proteínas de interesse, foi obtido lisado das células dos diferentes grupos. Para tanto, as células HaCat foram cultivadas em placas de 60 mm de diâmetro, apropriadas para a LTBI quando necessário, e posteriormente submetidas aos diferentes tratamentos. Após 24h, o meio de cultura foi descartado e as células foram lavadas com PBS. Para que as células se soltassem do fundo, foram imersas em tampão RIPA (50mM Tris-HCl, 150 mM cloreto de sódio, 1% Triton X, 1% desoxicolato de sódio, 0,1% de SDS e 1mM EDTA) acrescido de inibidor de protease (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), e posteriormente foram gentilmente deslocadas com auxílio de “cell scraper”. Essa solução foi então centrifugada a 11000 rpm por 20 minutos a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi coletado e armazenado em alíquotas de 100µL em freezer -80°C, até o momento de sua utilização.

4.9 Quantificação de proteínas

Para todos os grupos, foram quantificadas as proteínas a partir do lisado celular, pelo método do ácido biocinconínico (BCA) (Protein Assay Reagent Kit, ThermoScientific, EUA).

Este ensaio consiste na detecção colorimétrica e quantificação de proteína total. O método combina a redução de Cu^{+2} a Cu^{+1} por proteína em meio alcalino, reação de biureto, com detecção colorimétrica altamente sensível e seletiva do cátion cuproso usando o reagente contendo ácido biocinconínico. O produto da reação de cor púrpura deste ensaio é formado pela quelação de duas moléculas de BCA com um íon cuproso. A leitura é realizada na absorbância de 562 nm. O experimento foi realizado em triplicata.

A quantificação de proteínas foi necessária para a análise da SOD (item 4.11) e também da CAT (item 4.12).

4.10 Quantificação da atividade sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)

O DPPH ($\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{N}_5\text{O}_6$) contém um elétron desemparelhado, sendo então considerado um radical livre, porém relativamente estável, de fácil detecção. Na reação descrita a seguir, adaptada de Ginsburg et. al., (2013) para amostras de saliva, ocorre uma oxi-redução do DPPH pelo sistema antioxidante das amostras testadas. O DPPH confere cor violeta à solução; ao ser reduzido (“sequestrado”), a solução modifica de cor. Em ambiente escuro, 1,9 mL de uma solução contendo DPPH a 0,06 mM (0,1 mM DPPH, 0,9% NaCl e 25 mM tampão HEPES, constituído de NaCl 0,15M e EDTA 20 mM; pH 7,4, em 40% de etanol) foi adicionada a uma alíquota (100 μL) de cada amostra em um tubo de ensaio, com posterior homogeneização em agitador de tubos. Para o cálculo da porcentagem de sequestro do DPPH, foi feito um controle padrão de DPPH (1,9 ml de radical DPPH 0,06mM

adicionado a 100 µL de RIPA), tendo como branco álcool metílico. Foi realizada leitura da absorbância imediatamente após a reação com a solução de DPPH em espectrofotômetro (COLEMAN, Equipamentos para Laboratório Com. E Importação LTDA, Santo André, SP, Brasil) com filtro de 515nm. O experimento foi realizado para os grupos Controle, Controle Irradiado, Controle Saliva, Controle Saliva Irradiado, BU 5,5µg/mL veiculado em saliva, e BU 5,5µg/mL veiculado em saliva irradiado. Em cada grupo, as análises foram feitas em quadruplicata. Os resultados foram expressos em porcentagem de sequestro de DPPH, obtida pela seguinte fórmula:

$$\text{Sequestro de DPPH (\%)} = [(Abs \text{ controle DPPH} - Abs \text{ Teste}) / Abs \text{ controle DPPH}] \times 100$$

4.11 Quantificação da superóxido dismutase

A SOD foi quantificada por intermédio da técnica de Western blotting. Alíquotas de lisado celular dos diferentes grupos contendo 30µg de proteína foram diluídas em tampão da amostra (3% de dodecil sulfato de sódio, 150 mM Tris pH 6,8, 15% de B-mercaptoetanol, 30% de glicerol e 0,01% de azul de bromofenol) e, em seguida, mantidas em banho-maria a 95°C. Após desnaturação das proteínas, as amostras foram submetidas a eletroforese SDS-PAGE com gel de corrida a base de acrilamida 10% a 100V em temperatura ambiente. Foi utilizada cuba para eletroforese vertical (BioRad, Hercules, CA, USA) acoplada a fonte de elétrons (LPS 300V, Loccus do Brasil LTDA, São Paulo, Brasil). Para o controle da eletroforese e posteriormente do blot, utilizou-se padrão de peso molecular Precision Plus Kaleidoscope Protein Standard (BioRad, Hercules, CA, USA). Após a eletroforese, procedeu-se a transferência das proteínas do gel de acrilamida para membrana de nitrocelulose (Amersham-GE Healthcare Life Science, Little Chalfont, Reino Unido) sob voltagem de 60 V por 1 hora e meia a 4°C. Depois da transferência, as membranas foram incubadas com albumina bovina 5% por 1h, para bloqueio de sítios inespecíficos. Em seguida, foram incubadas “overnight a 4°C com anticorpo primário anti-SOD (Anti-Superoxide Dismutase 1 antibody, ab16831, rabbit

polyclonal to superoxide dismutase 1, 1:10000, Cambridge, Reino Unido) e anti- β -actina (clone AC-15, mouse anti β -actina, #A5441, 1:500, Sigma-Aldrich, Brasil) conjuntamente e manter sob agitação. Após a incubação com o anticorpo primário, as membranas foram lavadas com TBST (150 nM cloreto de sódio, 20 mM Tris base pH 7,6, 0,1% Tween 20) sob agitação em temperatura ambiente (três lavagens de 5min cada); em seguida foi realizada a incubação com anticorpo secundário conjugado a HRP (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, MA, USA) por 1,5h em temperatura ambiente. Em seguida, as membranas foram lavadas com TBST (três lavagens de 5min cada) e imersas em solução contendo luminol (ECL Prime, Amersham-Ge Healthcare Life Science, Little Chalfont, Reino Unido), para análise por quimioluminescência. As membranas foram então digitalizadas em escaner para blot (C-Digit®, Li-Cor Biosciences, Lincoln, Reino Unido). Foi quantificada a densidade de cada banda utilizando o programa Image J. Os ensaios de Western blotting foram feitos em triplicata experimental para todos os grupos. A densidade da banda de amostra foi normalizada pela densidade de banda da β -actina.

4.12 Quantificação da catalase

O princípio do método descrito a seguir é baseado na redução da absorbância das amostras testadas, devido a indução da transformação do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio pela CAT. Foi realizada quantificação dessa enzima seguindo o método preconizado por Aebi (1984). Foram adicionadas alíquotas (10 μ L) de cada amostra a 890 μ L de tampão fosfato 50mM; em seguida, foi adicionado 100 μ L de tampão fosfato contendo peróxido de hidrogênio 13.2mM (6 mL de tampão fosfato e 28 μ L de peróxido de hidrogênio). Após agitação por inversão do tubo, foi realizada leitura em espectrofotômetro (Beckman Coulter DU 800, California, EUA) com filtro de 240 nm por 5 minutos. Esta metodologia baseia-se no acompanhamento da decomposição do peróxido de hidrogênio, desta maneira obtém-se uma absorbância inicial e uma final, das quais o delta é a subtração destas leituras.

O experimento foi realizado em triplicata para os grupos Controle, Controle Irrradiado, Controle Saliva, Controle Saliva Irrradiado, BU 5,5µg/mL veiculado em saliva, e BU 5,5µg/mL veiculado em saliva Irrradiado. O cálculo da atividade da CAT foi feito seguindo a fórmula:

$$\begin{aligned} \text{U/ml} &= \Delta \text{ leituras} / (\text{tomada de ensaio} * E) \\ E \text{ (coeficiente de extinção molar)} &= 0,071 \\ \text{Tomada de ensaio} &= 0,01\text{mL} \end{aligned}$$

Os resultados da CAT (em U/mL) foram normalizados pela concentração de proteínas totais de cada amostra e apresentados em U/µg de proteína.

4.13 Quantificação da Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica foi analisada pela quantificação do MDA utilizando a técnica TBARS. O princípio dessa técnica baseia-se na reação do ácido tiobarbitúrico com o MDA, originando cor vermelha nessa reação. O método foi adaptado de Shirzad et al. (2014). Alíquotas de 100 µL de lisado celular foram homogenizadas com 200 µL de uma solução contendo ácido tricloroacético 15%, ácido tiobarbitúrico 0,375% e ácido clorídrico 0,25N. A mistura foi aquecida a 90-100°C por 15min e, após resfriamento em bancada, centrifugada por 10min a 1300g. O sobrenadante foi colhido e analisado em espectrofotômetro (Coleman, Equipamentos para Laboratório Com. e Importação LTDA, Santo André, SP, Brasil), com comprimento de onda em 532 nm. O teste foi realizado em quadruplicata para os grupos Controle, Controle Irrradiado, Controle Saliva, Controle Saliva Irrradiado, BU 5,5µg/mL veiculado em saliva, e BU 5,5µg/mL veiculado em saliva Irrradiado.

A quantidade de MDA foi calculada seguinte a fórmula (Estherbauer; Cheeseman, 1990):

$$\begin{aligned} X \text{ (g/L)} &= (\text{Abs/C}) \cdot M \\ \text{mg/L} &= X/1000 \\ \text{Abs} &= \text{absorbância das amostras} \\ C \text{ (coeficiente de absorção molar)} &= 153 \text{ M}^{-1}\text{L}^{-1} \\ M \text{ (massa molar MDA)} &= 73 \text{ g/mol} \end{aligned}$$

O resultado foi expresso em mg de MDA/litro.

4.14 Mensuração da fragmentação do DNA por ensaio Cometa

A presença de dano no DNA foi investigada por meio do ensaio cometa. Nesse ensaio, a fragmentação do DNA é visualizada por intermédio do espalhamento desse material a partir do núcleo da célula, o qual origina uma imagem semelhante a um cometa, com cabeça (núcleo) e cauda (espalhamento do DNA). Para este ensaio utilizamos o método de cometa em solução alcalina descrito por Singh et al. (1988). Lâminas de vidro foram mergulhadas em 1% de agarose diluída em água e secas em uma estufa a 37°C, até secagem completa. Em um Eppendorf com 2×10^4 de células, foi realizada centrifugação a 200g por 3 min a 4°C, retirando-se em seguida o sobrenadante. A esse sobrenadante, foi adicionado 70 μL de agarose de baixo ponto de fusão a 1% misturada em PBS. O material foi, em seguida, depositado nas lâminas e mantido a 4°C por 5 min. Solução de lise (2,5 M NaCl, 0,1 M EDTA, 10 mM TrisHCl, pH 10) contendo Triton X-100 foi adicionada às lâminas, as quais foram mantidas a 4°C por 1h. Após este período, as lâminas foram transferidas para um tanque horizontal de eletroforese (BioRad Sub-Cell® GT, Itália) e incubadas com tampão de eletroforese (0,3 M NaOH e 1 mM EDTA) por 40 minutos a 4°C. A eletroforese foi realizada a 25 V, 300 mA, por 30 min. Após a eletroforese, as lâminas foram retiradas do tanque e lavadas por três vezes com tampão de neutralização (0,4 Tris, pH 7,5 com concentrado de HCl). Após esse procedimento, as lâminas foram montadas com meio de montagem DAPI

(Vectashield®, Vector Laboratories, CA, USA) e analisadas em microscópio Zeiss LSM 510 (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha). O experimento foi realizado em triplicata para os grupos Controle, Controle Irrradiado, Controle Saliva, Controle Saliva Irrradiado, BU 5,5µg/mL veiculado em saliva, e BU 5,5µg/mL veiculado em saliva Irrradiado.

Imagens de 100 cometas de cada grupo foram digitalizadas (aumento original de 400X) e analisadas por intermédio do plugin “OpenComet” (Gyori et al., 2014) instalado no programa ImageJ (Schneider et al., 2012). Esse plugin fornece, dentre outras mensurações, a porcentagem de DNA presente na cauda do cometa, que representa a quantidade de quebras de DNA presentes na amostra.

4.15 Análise estatística

Os dados numéricos foram apresentados em média e desvio-padrão, quando seguiram uma distribuição paramétrica, e em média, desvio-padrão, mediana e valores mínimo e máximo, quando seguiram uma distribuição não-paramétrica. Os grupos foram comparados entre si pela análise de variância Anova seguida do teste de Tukey, para distribuições paramétricas, e Krusal-Wallis seguida do teste de Dunn, para distribuições não paramétrica. Quando necessário comparar somente dois grupos, foi utilizado o teste de Mann-Whitney ou teste t de Student. O nível de significância adotado foi de 5%.

5 RESULTADOS

5.1 Viabilidade celular

5.1.1 Quantidade e tipo de armazenamento da saliva

Foram realizados ensaios para verificar se a quantidade a ser inserida no meio de cultura e o tipo de armazenamento da saliva interferiam na viabilidade celular. A figura 5.1 mostra a viabilidade celular com a inserção de 10 μ L e 20 μ L de saliva. Não houve diferenças significativas entre os volumes de 10 μ L e 20 μ L em relação ao controle ($p>0,05$), sugerindo que a saliva propriamente dita, e o seu volume, não interferiram na viabilidade celular.

Figura 5.1 – Média ($\pm$ desvio-padrão) da viabilidade celular em cultivos sem saliva (controle) e naqueles contendo 10 μ L e 20 μ L de saliva

A figura 5.2 ilustra a viabilidade celular segundo o tipo de armazenamento da saliva, variando-se o seu volume inserido no meio de cultura. O grupo contendo 10 μ L de saliva com armazenamento prévio a 8°C exibiu maior viabilidade celular,

diferindo estatisticamente do controle. Já o volume de 20µL não exibiu diferença com o controle, independentemente do tipo de armazenamento prévio da saliva. Na prática laboratorial, vimos que o mais seguro seria utilizar a saliva congelada no freezer -4°C; na geladeira, a solução corria o risco de contaminação e de perda da temperatura de manutenção, uma vez que o refrigerador era aberto várias vezes ao dia para acesso a outros materiais. Assim, como queríamos manter a saliva o mais inerte possível, sem exibir diferenças com o grupo C, adotamos como Grupo CS a veiculação de 20µL de saliva previamente constituída e armazenada a -4°C.

Figura 5.2 – Média ($\pm$ desvio-padrão) da viabilidade celular em cultivos sem saliva (controle) e naqueles com 10 µL e 20µL de saliva, a qual foi previamente armazenada a -4°C ou 8°C. Teste de Tukey, * $p<0.05$; ** $p<0.01$

5.1.2 Concentração do bussulfano veiculado ou não em saliva

A figura 5.3 mostra a viabilidade celular segundo diferentes concentrações salivares do BU. Inicialmente, o BU foi inserido diretamente no meio de cultura (Figura 5.3 A) e, em seguida, veiculado em saliva (Figura 5.3 B), para se verificar se a saliva modifica a citotoxicidade desse quimioterápico. O efeito do BU sobre os

queratinócitos foi dose-dependente, ou seja, quanto maior a concentração da droga, menor a viabilidade celular. A concentração de 5,5µg/mL de BU inserido diretamente no meio de cultura foi a que provocou diferenças significativas em relação ao controle ($p<0.05$), gerando viabilidade celular de 76% (Figura 5.3 A). Quando as mesmas concentrações de BU foram veiculadas em saliva, todas elas acarretaram menor viabilidade em relação ao controle-saliva (Figura 5.3 B).

Comparamos também os valores de viabilidade dos grupos de BU veiculado no meio de cultura, com os aqueles em que o BU foi veiculado na saliva, pareando-se cada concentração. Observou-se que todas as concentrações do BU veiculadas em saliva geraram menor viabilidade celular; na análise pareada de cada concentração, somente a de 4.0ug/mL foi significativa (Teste t de Student, $p=0.004$). Assim, as concentrações do BU selecionadas no presente trabalho exercem efeito tóxico sobre queratinócitos, com ou sem a presença da saliva. Os resultados também sugerem que a saliva modifica a citotoxicidade do BU, havendo uma tendência de tornar mais tóxico esse quimioterápico para os queratinócitos.

Para os ensaios de TUNEL, estresse oxidativo e de dano no DNA, foi adotado o BU com concentração em saliva de 5.5µg/mL, por ser essa concentração a que maior se aproximou de uma dose letal de 50%.

Figura 5.3 – Média ($\pm$ desvio-padrão) da viabilidade celular (normalizada pela da do controle (A) e controle saliva(B)) após tratamento com bussulfano em diferentes concentrações, inserido no meio sem saliva (A) e com saliva (B). Teste de Tukey, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

5.1.3 Tratamento com laserterapia de baixa intensidade (LTBI)

Para simular as sessões diárias de LTBI realizadas no paciente sob TCH, os cultivos celulares tratados com BU veiculado em saliva foram expostos a três sessões de LBI. A figura 5.4 mostra a viabilidade celular quando as sessões de LBI tiveram intervalo de 1h, 2h, 3h e 4h. Nota-se que os intervalos das sessões que aumentaram a viabilidade celular após o tratamento com BU, independentemente da concentração dessa droga, foram de 2h e 4h. O intervalo de 4h entre as sessões aumentou a viabilidade celular de forma mais homogênea considerando-se as

diferentes concentrações, sendo escolhido então para ser realizado nos demais ensaios envolvendo LBI.

Figura 5.4 - Média ($\pm$ desvio-padrão) da viabilidade celular (normalizada pela da do controle saliva) após tratamento com bussulfano em diferentes concentrações e quatro ciclos de laserterapia de baixa intensidade, com intervalos de 1h, 2h, 3h e 4h entre os ciclos. Teste de Tukey, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

A figura 5.5 ilustra a viabilidade celular após tratamento com BU veiculado em saliva em diferentes concentrações, com e sem a execução de três sessões de LBI, com intervalo de 4h entre elas. Nota-se que em todas as concentrações do BU, a LBI exerceu um efeito protetor, acarretando um aumento significativo da viabilidade celular.

Figura 5.5 – Média ($\pm$ desvio-padrão) da viabilidade celular (normalizada pela da do controle saliva) após tratamento com bussulfano em diferentes concentrações, inserido no meio sem saliva (A) e com saliva (B). Teste de Tukey, * $p<0.05$; ** $p<0.01$

5.2 Análise de TUNEL

A porcentagem de células positivas para TUNEL é representada na Figura 5.6. O grupo BU 5,5 μ g/mL exibiu maior porcentagem de células TUNEL positivas, com diferenças significativas em relação aos controles ($p<0.05$) e ao grupo BU irradiado ($p<0.05$). Não houve diferenças significativas entre o BU irradiado e os controles. A figura 5.7 ilustra as marcações encontradas.

Figura 5.6 - *Box-plot* para a porcentagem de células positivas para TUNEL em cada grupo. Traço horizontal espesso - mediana; Altura do *box* - intervalo interquartis; *whiskers* - valores mínimo e máximo; ○ - *outliers*. * $p < 0.05$ (Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn)

Figura 5.7 – Exemplos de padrões de marcação no ensaio TUNEL, dos grupos Controle Saliva (CS), Controle Saliva Irradiado (CSI), Bussulfano (BU) e Bussulfano Irradiado (BUI). Aumento de 400X

5.3 Estresse oxidativo

5.3.1 Atividade sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)

A mensuração da atividade sequestradora do radical livre DPPH foi realizada para os grupos C, CS e BU 5,5µg/mL veiculado em saliva, com e sem três sessões de LBI. A Figura 5.8 ilustra a porcentagem de redução de DPPH. Nota-se que a menor mediana da porcentagem de sequestro do DPPH é do grupo BU 5.5ug/mL, seguido do grupo CS. Os grupos que receberam LBI exibiram um incremento na porcentagem de sequestro desse radical livre, mostrando diferenças significativas em relação aos grupos sem LBI. Particularmente o grupo BU 5.5ug/mL Irradiado exibiu diferenças significativas em relação ao BU sem LBI ($p < 0.05$).

Figura 5.8 - *Box-plot* para a porcentagem de sequestro do radical livre DPPH em cada grupo. Traço horizontal espesso - mediana; Altura do *box* - intervalo interquartis; *whiskers* - valores mínimo e máximo. * $p < 0.05$ (Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn)

5.4 Quantificação da superóxido dismutase

A quantificação da SOD foi realizada por intermédio da técnica de Western blotting. A figura 5.9 evidencia a densidade da banda obtida nos blottings de cada grupo. Nota-se densidade ligeiramente maior no grupo BU 5.5µg/mL, porém essa diferença não foi estatisticamente significativa em relação aos demais grupos. Assim, as irradiações com LBI, em especial as realizadas nos grupos com BU, não acarretaram diferenças na produção de SOD.

Figura 5.9 – Média ($\pm$ desvio-padrão) da densidade de banda obtida na técnica de Western-blotting para análise da superóxido dismutase. Foi realizada normalização com a densidade de banda da actina em todos os grupos. Sem diferenças significativas (teste de variância Anova)

5.5 Quantificação da catalase

A média de atividade da catalase em todos os grupos é demonstrada na figura 5.10. Nota-se que o grupo BU 5.5ug/mL exibiu a maior atividade dessa enzima, diferindo estatisticamente dos demais grupos ($p<0.01$). A LBI (três sessões, feitas a cada 4h) reduziu a atividade da catalase em todos os grupos, com diferenças significativas na comparação entre Controle Saliva com e sem LBI ($p<0.01$) e BU 5.5ug/mL com e sem LTBI ($p<0.01$).

Figura 5.10 - Média ($\pm$ desvio-padrão) da atividade da catalase, normalizada pela quantidade de proteínas em cada grupo e expressa em U/mg proteína. ** $p<0.01$ (análise de variância Anova seguida do teste de Tukey)

5.6 Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica foi avaliada pela quantificação do malondialdeído (MDA) utilizando a técnica TBARS. A figura 5.11 mostra a média da quantidade de MDA detectada em cada grupo. O grupo BU 5.5ug/mL exibiu a maior quantidade de MDA, com diferenças significativas em relação aos demais grupos ($p<0.01$). Quando

esse grupo recebeu LBI, houve redução drástica da quantidade de MDA ($p < 0.01$), equiparando-se aos controles. Em geral, os demais grupos irradiados também exibiram menor quantidade de MDA, porém sem diferenças significativas em relação aos respectivos grupos sem LBI.

Figura 5.11 - Média ($\pm$ desvio-padrão) da quantidade de malondialdeído (MDA) em cada grupo. ** $p < 0.01$ (análise de variância Anova seguida do teste de Tukey)

5.7 Dano no DNA

5.7.1 Ensaio cometa

A presença de dano no DNA foi investigada por meio do ensaio cometa nos grupos Controle, Controle Saliva, Controle Saliva Irradiado, Bussulfano 5.5ug/mL e Bussulfano 5.5ug/mL Irradiado. Nota-se que o grupo C não exibiu espalhamento do DNA, ou seja, não foram detectados cometas (Figura 5.12 A), ao passo que no

grupo CS (Figura 5.12 B) alguns cometas, de cauda restrita, foram encontrados. Já o grupo BU 5.5ug/mL exibiu alta frequência de cometas, com núcleos quase inexistentes e caudas longas (Figura 5.12 D). Todos os grupos com LBI exibiram redução da quantidade de cometas e caudas mais curtas (Figuras 5.12 C e 5.12 E), principalmente o grupo BU 5.5ug/mL Irradiado. Na quantificação da porcentagem de DNA na cauda do cometa, o grupo BU exibiu a maior média, seguido pelo Grupo CS (Figura 5.13). Houve redução dessa porcentagem em todos os grupos irradiados, com menor valor para o grupo BU Irradiado. Esse grupo diferiu estatisticamente quando comparado com o grupo BU ($p<0.05$) e Controle Saliva ($p<0.05$).

Figura 5.12 - Imagens representativas do espalhamento de fragmentos de DNA no ensaio cometa (DAPI, aumento original 400X). C: Ausência de cometas no grupo Controle. CS: Presença de cometas no grupo Controle Saliva, porém com caudas discretas. BU: Grande quantidade de cometas, com caudas nítidas, no grupo Bussulfano 5.5ug/mL. BUI: Redução da frequência de cometas no grupo Bussulfano 5.5ug/mL Irradiado

Figura 5.13 - *Box-plot* para a percentagem de DNA na cauda do cometa. Traço horizontal espesso - mediana; Altura do *box* - intervalo interquartis; *whiskers* - valores mínimo e máximo; O - *outliers*. * $p < 0.05$ (Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn)

6 DISCUSSÃO

O objetivo deste trabalho foi verificar se as concentrações salivares do BU poderiam ser citotóxicas para queratinócitos e se a LTBI poderia atenuar esses efeitos.

Inicialmente padronizamos a confecção e a utilização de saliva artificial que serviria de veículo para o BU. Verificamos se essa composição não interferia na cultura celular utilizando a HaCat. Decidimos realizar essa etapa porque no estudo que nos baseamos para formular a saliva, os autores verificaram que a sua composição, principalmente a presença da α -amilase, induziu a secreção de IL-8, IL-6 e VCAM1 em cultura de fibroblastos gengivais, não sendo inerte nesse meio de cultura. Os autores também avaliaram se essa saliva modificou os níveis de EROs ou de superóxidos, e não encontraram diferenças em relação ao controle (Malpass et al. 2013). Em nosso estudo, os grupos contendo saliva não exibiram alterações significativas quanto à viabilidade celular, porém verificamos que o grupo CS exibiu menor atividade de sequestro do DPPH. Nesse grupo também notamos certa frequência de fragmentação do DNA, ainda que discreta se compararmos com os resultados para o Grupo C. Assim, podemos admitir que a saliva utilizada no presente experimento não interferiu, de forma significativa, na viabilidade celular, mas acarretou certa redução na atividade antioxidante relacionada à neutralização de radicais livres de nitrogênio. Esse resultado foi uma surpresa, já que a saliva é sabidamente um potente fluido antioxidante (Buczko et al., 2015). Esse potencial antioxidante é oriundo da catalase derivada de microrganismos do biofilme, de produtos antioxidantes derivados do sangue e extravasados para a saliva via fluido crevicular, bem como de substâncias antioxidantes presentes nas verduras e frutas ingeridas na dieta, as quais são mantidas na saliva por tempo prolongado após as refeições (Ginsburg et al., 2013). Como não adicionamos nenhum desses componentes na saliva artificial, o potencial antioxidante avaliado no presente estudo é exclusivamente derivado dos queratinócitos cultivados. Assim, pode-se dizer que a saliva modificou diretamente as células analisadas, reduzindo seu potencial de sequestro de radicais livres de nitrogênio. Por outro lado, os danos no DNA observados no grupo CS não foram suficientes para induzir modificações nos

padrões de viabilidade celular. Contudo, pode-se inferir que, se a formulação utilizada provocou a secreção de citocinas pró-inflamatórias, as quais demandam ativação de vias de sinalização, bem como alterou o potencial antioxidativo, provavelmente esses mesmos componentes atuaram direta ou indiretamente, de forma negativa, no DNA dos queratinócitos estudados, os quais, vale comentar, não são especializados no contato com a saliva, já que são cutâneos. Mais estudos são necessários para elucidar o efeito da saliva formulada no presente estudo sobre o DNA e o estresse oxidativo em cultura de queratinócitos, incluindo os da mucosa oral.

Utilizamos uma formulação de saliva que contivesse as principais substâncias encontradas nesse fluido, incluindo, além da α -amilase, mucina, lisozima, fosfatase ácida, magnésio, cálcio e uréia, para verificar se esses componentes não alterariam o potencial citotóxico do BU. Um resultado interessante foi que o conjunto BU+saliva provocou maior redução da viabilidade celular em comparação à taxa provocada pelo BU sem saliva. Portanto, a combinação da saliva com o BU gerou um efeito tóxico maior. Se a saliva modificou quimicamente o BU e o tornou mais tóxico, não é possível depreender pela metodologia empregada no presente estudo. Contudo, esse resultado pode ter significado direto para o paciente, já que até então se acreditava que a MO causada pelo BU era somente derivada do BU plasmático (Chaudhry et al., 2016). O presente estudo demonstrou que o BU salivar é tóxico para os queratinócitos, bem como que os componentes salivares também têm interferência nessa toxicidade.

Verificamos que as doses salivares de BU, encontradas no pico farmacocinético máximo da droga, induziram redução da viabilidade celular, aumento da frequência de células sugestivas de estarem em apoptose ou necrose pelo teste de TUNEL, bem como aumento da taxa de peroxidação lipídica e redução do potencial antioxidante de radicais livres de nitrogênio. Esses resultados estão de acordo com outros estudos que demonstraram, no sangue, intensa peroxidação lipídica e redução da viabilidade celular devido a alterações da membrana plasmática por esses radicais (Dürken et al., 2000; DeLeve; Wang, 2000; Hassan et al., 2002; Gonçalves et al., 2009; Cai et al., 2016). Assim, as concentrações salivares do BU induzem produção de radicais livres nos queratinócitos por vias similares às descritas para as células sanguíneas provocadas pelo BU plasmático.

Paralelamente ao aumento dos radicais livres, detectamos altos níveis de catalase nas células tratadas com BU salivar, mas não houve a mesma tendência com a SOD. Esse resultado está condizente com um estudo clínico descrito na literatura que demonstrou aumento da catalase e manutenção dos níveis de SOD nos eritrócitos do sangue periférico de pacientes com condicionamento a base de BU e ciclofosfamida para TCH (Gonçalves et al., 2009). O aumento da catalase pode ser interpretado em função do aumento da peroxidação lipídica, ou seja, altos níveis de peróxido de hidrogênio induzidos pelo BU provocam intensa peroxidação lipídica (Gonçalves et al., 2009). Altos níveis de peróxidos, por sua vez, induzem a produção de catalase, a qual neutraliza esses EROs. A ausência de aumento da SOD, por outro lado, é intrigante, já que essa enzima converte os superóxidos em peróxido de hidrogênio. Uma hipótese é que o BU não induz tanto superóxido, mas diretamente peróxido de hidrogênio por outras vias de oxirredução, fato que necessita ser confirmado.

Apesar de termos encontrado porcentagem de células TUNEL positivas no grupo tratado com BU maior que o C, consideramos essa porcentagem menor que os valores de viabilidade celular detectados pelo MTS. O tratamento com BU a 5.5µg/mL veiculado em saliva gerou uma média de viabilidade celular de 52.1%, indicando que pelo menos metade da população celular analisada não estava viável. Detectamos, no TUNEL, uma porcentagem ao redor de 3% de células positivas, bem abaixo do índice sugerido pelo MTS, sugerindo que a ausência de viabilidade não é oriunda de morte celular. Outro estudo também detectou índices não tão elevados de células TUNEL positivas após tratamento com BU, mas sim taxas elevadas de células em senescência, com altos níveis de estresse oxidativo (Probin et al., 2007). Assim, é necessário investigar se as doses salivares do BU também exerceram esse efeito sobre queratinócitos, ou seja, mais do que provocar apoptose, o BU induziria parada no ciclo celular. Nesse processo, pode haver redução da atividade mitocondrial, justificando os resultados de MTS, o qual é um teste que indica a atividade de enzimas mitocondriais. Na mucosa oral, a senescência de queratinócitos levaria à ausência de renovação epitelial, o que explicaria por que esse agente quimioterápico provoca MOs severas (Chaudhry et al., 2016; Eduardo et al., 2018), que se manifestam, frequentemente, dias após ter cessado o tratamento.

No presente trabalho, o BU encontrado na saliva também foi capaz de induzir danos no DNA, tal qual é descrito para o BU plasmático (Morales-Ramirez et al., 2014). Em pele, o BU plasmático origina displasias cutâneas detectadas após a finalização do tratamento (Hymes et. al., 1985; Li et al., 2012), mas com potencial de regressão a longo prazo (Li et al., 2012). Em função da indução de danos no DNA também pelo BU salivar, podemos formular a hipótese de que a mucosa oral teria risco maior do que a pele em exibir essa displasia. A confirmação dessa tendência é crucial para se posicionar o BU não só como importante agente causador de MO, mas também como agente mutagênico para a mucosa oral.

Detectamos no presente estudo que a LTBI, com dosimetria similar à utilizada para prevenção da MO durante o TCH (Eduardo et al., 2015), teve efeito protetor sobre as células expostas ao BU salivar. Esse efeito protetor foi caracterizado por aumento da viabilidade dessas células, redução da taxa de células TUNEL positivas, promoção de maior sequestro do DPPH e redução da taxa de peroxidação lipídica. Além disso, houve menor porcentagem de DNA fragmentado nas células irradiadas, sugerindo que essa proteção se estendeu também para o DNA das células.

Uma das etapas do presente estudo foi estabelecer qual intervalo entre sessões de LTBI causariam maior viabilidade celular, ou seja, qual regime de LTBI teria efeito estimulatório perceptível. Decidimos realizar essa etapa porque um dos efeitos da fotobiomodulação é gerar inibição da proliferação celular, ou então não a alterar, principalmente quando doses excessivas são administradas (Hamblin, 2017). Por exemplo, o intervalo de 1h entre as sessões gerou os menores valores de viabilidade celular, inclusive abaixo do controle, independentemente da dose do BU. Provavelmente isso ocorreu porque a energia fornecida pela primeira irradiação não foi totalmente utilizada nesse intervalo de tempo; assim, a segunda irradiação teve efeito inócuo, ou seja, a célula não converteu a energia do fóton em ATP, já que ainda estava repleta de energia. Por outro lado, o intervalo de 2h gerou os maiores índices de viabilidade celular, mas somente quando as doses de BU foram maiores. Para evitar a variável dose nos grupos com LTBI, optamos pelo intervalo de 4h entre as irradiações, que também gerou maior taxa de células viáveis em relação ao controle, com uma constância maior independentemente da concentração do BU.

Em geral, os estudos sobre FBM e estresse oxidativo estão atrelados a situações de inflamação, nas quais a irradiação promove a redução de EROs derivadas de células inflamatórias (Silveira et al., 2011; dos Santos et al., 2017; Hoffmann; Griffiths, 2018). A comparação desses estudos com o nosso é limitada no sentido de que não avaliamos a inflamação induzida pela ação do BU. Contudo, a tendência geral de que a LTBI promove a redução de EROs em tecidos nos quais esses radicais encontram-se elevados (Hamblin, 2017) foi também observada no presente estudo, principalmente pela redução drástica dos níveis de peroxidação lipídica no grupo BUI. Contudo, em nosso estudo essa redução de EROs não foi acompanhada de aumento da produção de proteínas antioxidantes, como é detectado nos experimentos envolvendo inflamação muscular (dos Santos et al., 2017). Nos músculos esqueléticos, a LTBI parece reduzir radicais livres derivados de oxigênio e nitrogênio, bem como aumentar o potencial antioxidante da célula muscular. Nossos resultados não se alinham com esses trabalhos publicados em tecido muscular no tocante ao aumento das proteínas antioxidantes, já que verificamos diminuição da catalase e ausência de modificações dos teores de SOD nos grupos irradiados. Outros autores também observaram diminuição da catalase após a LTBI, com lesões induzidas em pele (Silveira et al., 2011). Assim, podemos dizer que a LTBI aplicada nos queratinócitos expostos ao BU salivar promoveu redução da peroxidação lipídica, fato que sugere indiretamente uma redução dos níveis de EROs, mas não necessariamente aumentou a capacidade antioxidante ligada a radicais livres de oxigênio. Por outro lado, o potencial de sequestrar o DPPH, um radical livre derivado de nitrogênio, foi aumentado após a LTBI, o que demonstra certa ação positiva da irradiação laser sobre outros sistemas antioxidantes presentes nos queratinócitos.

A FBM também reduziu a porcentagem de dano no DNA induzida pelo BU. Outros trabalhos com células expostas a radiação gama (Ramos Silva et al., 2016) e radiação ultravioleta (Dube et al., 2001) também demonstraram redução nos danos no DNA gerados por essas radiações. Contudo, esse efeito protetor da LTBI parece ser dose-dependente, em que fluências mais altas ($16\text{J}/\text{cm}^2$) não exercem mais proteção e, ao contrário, induzem fragmentação do DNA (Mbene et al., 2009). Já outro estudo com queratinócitos normais demonstrou que doses de $20\text{J}/\text{cm}^2$ não provocaram modificação nos níveis de estresse oxidativo, nem alterações no DNA

(Dillenburg et al., 2014). No presente estudo, utilizamos a fluência de $8\text{J}/\text{cm}^2$, que pareceu segura no tocante à conservação do DNA em células saudáveis, ou seja, sem exposição ao BU. Constatamos bem esse fato principalmente no Grupo CI e no Grupo CSI; nesse último, praticamente não foram encontrados cometas quando comparado ao Grupo CS, o qual exibiu certa quantidade de DNA fragmentado. Um aspecto a ser considerado é que as irradiações foram realizadas durante a exposição ao BU, ou seja, foram feitas com uma intenção de profilaxia contra os efeitos citotóxicos do BU, e não depois que as lesões celulares foram instaladas. Provavelmente os resultados obtidos na análise do DNA ilustram uma possível ativação do sistema de reparo dessa molécula feita pela FBM. Formulamos essa hipótese com base no fato de que a FBM pode ativar genes ligados à neutralização de adutos oriundos de EROs e genes relacionados a proteínas que hidrolisam DNA alquilado por agentes quimioterápicos (Zhang et al., 2003).

Assim, podemos afirmar que o efeito citotóxico e genotóxico do BU foi significativamente atenuado pela LTBI com a dosimetria e os ciclos de irradiação empregados no presente trabalho. Esses resultados são promissores e ensejam novas aplicações da LTBI para pacientes sob quimioterapia, utilizando esse recurso como um agente profilático contra efeitos genotóxicos do tratamento antineoplásico. Nesse sentido, o aprimoramento da dosimetria, aliado à condução de mais estudos acerca dos mecanismos de ação da LTBI sobre o sistema de reparo do DNA, são fundamentais.

7 CONCLUSÕES

A saliva artificial formulada no presente estudo não interfere na viabilidade de queratinócitos, mas acarreta menor potencial de sequestro de radicais livres derivados de nitrogênio.

As concentrações salivares do BU são citotóxicas para queratinócitos em cultura, gerando menor viabilidade celular, maior taxa de morte celular, maior estresse oxidativo e alta frequência de fragmentação do DNA.

A saliva artificial potencializou a citotoxicidade do BU, diminuindo a viabilidade celular em comparação ao BU veiculado sem saliva.

A LTBI, realizada em três sessões com intervalo de 4h entre elas, conferiu proteção aos queratinócitos expostos ao BU salivar, reduzindo o estresse oxidativo e os danos no DNA.

REFERÊNCIAS¹

Adams SP, Laws GM, Storer RD, DeLuca JG, Nichols WW. Detection of DNA damage induced by human carcinogens in acellular assays: potential application for determining genotoxic mechanisms. *Mutat Res.* 1996 Jul 5;368(3-4):235-48.

Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984;105:121-6.

Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy 2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev.* 2014;2014:360438. doi: 10.1155/2014/360438.

Barbosa KBF, Costa NMB, Alfenas RCG, de Paula SO, Minim VPR, Bressan J. Oxidative stress: concept, implications and modulating factors. *Ver. Nutri., Campinas.* 2010 jul/ago 23(4):629-43.

Bezinelli LM, Eduardo FP, de Carvalho DLC, Dos Santos Ferreira CE, de Almeida EV, Sanches LR, et al Therapeutic salivary monitoring of IV busulfan in patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation: a pilot study. *Bone Marrow Transplant.* 2017 Oct;52(10):1384-1389. doi: 10.1038/bmt.2017.142. Epub 2017 Jul 24.

Bezinelli LM, Eduardo FP, Neves VD, Correa L, Lopes RM, Michel-Crosato E, et al. Quality of life related to oral mucositis of patients undergoing haematopoietic stem cell transplantation and receiving specialised oral care with low-level laser therapy: a prospective observational study. *Eur J Cancer Care (Engl).* 2015 Jun 18. doi: 10.1111/ecc.12344.

Botnick LE, Hannon EC, Vigneulle R, Hellman S. Differential effects of cytotoxic agents on hematopoietic progenitors. *Cancer Res.* 1981 Jun;41(6):2338-42.

Buczko P, Zalewska A, Szarmach I. Saliva and oxidative stress in oral cavity and in some systemic disorders. *J Physiol Pharmacol.* 2015 Feb;66(1):3-9. Review.

Cai Y, Liu T, Fang F, Shen S, Xiong C. Involvement of ICAM-1 in impaired spermatogenesis after busulfan treatment in mice. *Andrologia.* 2016 Feb;48(1):37-44. doi: 10.1111/and.12414.

¹ De acordo com Estilo Vancouver.

Castaño E, Rodriguez-Peralto JL, Lopez-Rios F, Gomez C, Zimmermann M, Iglesias Diez L. Keratinocyte dysplasia: an usual finding after transplantation or chemotherapy. *J Cutan Pathol*. 2002;29:579–584.

Chatterjee R, Law S. Epigenetic and microenvironmental alterations in bone marrow associated with ROS in experimental aplastic anemia. *Eur J Cell Biol*. 2018 Jan;97(1):32-43. doi: 10.1016/j.ejcb.2017.11.003.

Chaudhry HM, Bruce AJ, Wolf RC, Litzow MR, Hogan WJ, Patnaik MS, et al. The Incidence and Severity of Oral Mucositis among Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation Patients: A Systematic Review. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2016 Apr;22(4):605-616. doi: 10.1016/j.bbmt.2015.09.014.

Cinausero M, Aprile G, Ermacora P, Basile D, Vitale MG, Fanotto V, et al. New Frontiers in the Pathobiology and Treatment of Cancer Regimen-Related Mucosal Injury. *Front Pharmacol*. 2017 Jun 8;8:354. doi: 10.3389/fphar.2017.00354. eCollection 2017. Review.

de Lima M, Anagnostopoulos A, Munsell M, Shahjahan M, Ueno N, Ippoliti C, et al. Nonablative versus reduced-intensity conditioning regimens in the treatment of acute myeloid leukemia and high-risk myelodysplastic syndrome: dose is relevant for long-term disease control after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2004 Aug 1;104(3):865-72.

DeLeve LD, Wang X. Role of oxidative stress and glutathione in busulfan toxicity in cultured murine hepatocytes. *Pharmacology*. 2000 Apr;60(3):143-54.

Dillenburg CS, Almeida LO, Martins MD, Squarize CH, Castilho RM. Laser phototherapy triggers the production of reactive oxygen species in oral epithelial cells without inducing DNA damage. *J Biomed Opt*. 2014 Apr;19(4):048002. doi: 10.1117/1.JBO.19.4.048002.

Dos Santos SA, Serra AJ, Stancker TG, Simões MCB, Dos Santos Vieira MA, Leal-Junior EC, et al. Effects of Photobiomodulation Therapy on Oxidative Stress in Muscle Injury Animal Models: A Systematic Review. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017:5273403. doi: 10.1155/2017/5273403. Epub 2017 Sep 17. Review.

Dube A, Bock C, Bauer E, Kohli R, Gupta PK, Greulich KO. He-Ne laser irradiation protects B-lymphoblasts from UVA-induced DNA damage. *Radiat Environ Biophys*. 2001 Mar;40(1):77-82.

Dürken M, Herrnring C, Finckh B, Nagel S, Nielsen P, Fischer R, et al. Impaired plasma antioxidative defense and increased nontransferrin bound iron during high-

dose chemotherapy and radiochemotherapy preceding bone marrow transplantation. *Free Radic Biol Med*. 2000 Mar 15;28(6):887-94.

Eduardo Fde P, Bezinelli LM, de Carvalho DL, Lopes RM, Fernandes JF, Brumatti M, et al. Oral mucositis in pediatric patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation: clinical outcomes in a context of specialized oral care using low-level laser therapy. *Pediatr Transplant*. 2015 May;19(3):316-25. doi: 10.1111/petr.12440.

Eduardo FP, Bezinelli LM, Gobbi MF, Pereira AZ, Vogel C, Hamerschlak N, Corrêa L. Impact of Oral and Gastrointestinal Mucositis on Body Weight Alterations during Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Nutr Cancer*. 2018 Feb-Mar;70(2):241-248. doi: 10.1080/01635581.2018.1412476.

Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol*. 1990;186:407-21.

Evans WE. Pharmacodynamics of cancer chemotherapy: childhood ALL as a model. *International Congress Series 1220* (2001) 203-222.

Fadda G, Campus G, Lugliè P. Risk factors for oral mucositis in paediatric oncology patients receiving alkylant chemotherapy. *BMC Oral Health*. 2006 Oct 18;6:13.

Fan J, de Lannoy IA. Pharmacokinetics. *Biochem Pharmacol*. 2014 Jan 1;87(1):93-120. doi: 10.1016/j.bcp.2013.09.007. Epub 2013 Sep 17. Review.

Firat ET, Dağ A, Günay A, Kaya B, Karadede Mİ, Ersöz Kanay B, Ketani A, Evliyaoğlu O, Uysal E. The effect of low-level laser therapy on the healing of hard palate mucosa and the oxidative stress status of rats. *J Oral Pathol Med*. 2014 Feb;43(2):103-10. doi: 10.1111/jop.12106.

Rosin FCP. Resistência de células de carcinoma epidermóide bucal à terapia fotodinâmica mediada pelo ácido 5-aminolevulínico. [Tese] Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia. 2015.

Fitzpatrick TB. The cutaneous histopathology of chemotherapeutic reactions. *J Cutan Pathol*. 1993;20:1–14.

Fonseca AS, Moreira TO, Paixão DL, Farias FM, Guimarães OR, de Paoli S, et al. Effect of laser therapy on DNA damage. *Lasers Surg Med*. 2010 Aug;42(6):481-8. doi: 10.1002/lsm.20921.

Franssen C, Boekema P, De Witte T, Wessels J, Van der Kogel A, Haanen C. DNA strand breaks in human leukocytes induced by chemotherapy and total body irradiation. *Leuk Res*. 1990;14(1):91-7.

Freitinger Skalická Z, Zölzer F, Beránek L, Racek J. Indicators of oxidative stress after ionizing and/or non-ionizing radiation: superoxid dismutase and malondialdehyde. *J Photochem Photobiol B*. 2012 Dec 5;117:111 4. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2012.08.009.

Ginsburg I, Kohen R, Shalish M, Varon D, Shai E, Koren E. The oxidant-scavenging abilities in the oral cavity may be regulated by a collaboration among antioxidants in saliva, microorganisms, blood cells and polyphenols: a chemiluminescence-based study. *PLoS One*. 2013 May 2;8(5):e63062.

Gonçalves TL, Benvegnú DM, Bonfanti G, Frediani AV, Pereira DV, Rocha JB. Oxidative stress and delta-ALA-D activity in diferente conditioning regimens in allogeneic bone marrow transplantation patients. *Clin Biochem*. 2009 May;42(7-8):602-10. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2008.12.001.

Gyori BM, Venkatachalam G, Thiagarajan PS, Hsu D, Clement MV. OpenComet: na automated tool for comet assay image analysis. *Redox Biol*. 2014 Jan 9;2:457-65. doi: 10.1016/j.redox.2013.12.020.

Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol*. 2004 May;142(2):231-55. Review.

Hamblin MR. Mechanisms and applications of the anti-inflammatory effects of photobiomodulation. *AIMS Biophys*. 2017;4(3):337-361. doi: 10.3934/biophy.2017.3.337.

Harrison T, Bigler L, Tucci M, Pratt L, Malamud F, Thigpen JT, et al. Salivary sIgA concentrations and stimulated whole saliva flow rates among women undergoing chemotherapy for breast cancer: an exploratory study. *Spec Care Dentist*. 1998 May-Jun;18(3):109-12.

Hassan Z, Hellström-Lindberg E, Alsadi S, Edgren M, Hägglund H, Hassan M. The effect of modulation of glutathione cellular content on busulphan induced cytotoxicity on hematopoietic cells in vitro and in vivo. *Bone Marrow Transplant.* 2002 Aug;30(3):141-7.

Heli U, Eeva J, Anne N, Tapani R, Liisa V. Low incidence and severity of oral mucositis in allogeneic stem cell transplantation after conditioning with treosulfan and fludarabine. *Eur J Haematol.* 2012 Jan;88(1):87-8. doi: 10.1111/j.1600-0609.2011.01732.x.

Hoffmann MH, Griffiths HR. The dual role of ROS in autoimmune and inflammatory diseases: Evidence from preclinical models. *Free Radic Biol Med.* 2018 Mar 15. pii: S0891-5849(18)30119-9. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.03.016.

Hymes SR, Simonton SC, Farmer ER, Beschorner WB, Tutschka PJ, Santos GW. Cutaneous busulfan effect in patients receiving bone-marrow transplantation. *J Cutan Pathol.* 1985 Apr;12(2):125-9.

Jansman FG, Coenen JL, De Graaf JC, Tobi H, Sleijfer DT, Brouwers JR. Relationship between pharmacokinetics of 5-FU in plasma and in saliva, and toxicity of 5-fluorouracil/folinic acid. *Anticancer Res.* 2002 Nov Dec;22(6B):3449-55.

Karu T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. *J Photochem Photobiol B.* 1999 Mar;49(1):1-17. Review.

Karu TI. Molecular mechanism of the therapeutic effect of low intensity laser irradiation. *Dokl Akad Nauk SSSR.* 1986;291(5):1245-9.

Laine P, Meurman JH, Tenovuo J, Murtomaa H, Lindqvist C, Pyrhönen S, et al. Salivary flow and composition in lymphoma patients before, during and after treatment with cytostatic drugs. *Eur J Cancer B Oral Oncol.* 1992 Oct;28B(2):125-8.

Lee JH, Choi J, Kwon KA, Lee S, Oh SY, Kwon HC, et al. Fludarabine-based myeloablative regimen as pretransplant conditioning therapy in adult acute leukemia/myelodysplastic syndrome: comparison with oral or intravenous busulfan with cyclophosphamide. *Korean J Hematol.* 2010 Jun;45(2):102-8.

Li N, Guthrie KA, Storer BE, Martin PJ, Sale GE, Argenyi ZB, et al. Keratinocyte dysplasia in hematopoietic stem cell transplantation recipients in the day-28-to-84 posttransplantation period. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2012 Aug;18(8):1281-6.

Lim J, Sanders RA, Snyder AC, Eells JT, Henshel DS, Watkins JB 3rd. Effects of low-level light therapy on streptozotocin-induced diabetic kidney. *J Photochem Photobiol B*. 2010 May 3;99(2):105-10. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2010.03.002.

Malpass GE, Arimilli S, Prasad GL, Howlett AC. Complete artificial saliva alters expression of proinflammatory cytokines in human dermal fibroblasts. *Toxicol Sci*. 2013 Jul;134(1):18-25.

Mangerich A, Debiak M, Birtel M, Ponath V, Balszuweit F, Lex K, et al. Sulfur and nitrogen mustards induce characteristic poly(ADP-ribosylation) responses in HaCaT keratinocytes with distinctive cellular consequences. *Toxicol Lett*. 2016 Feb 26;244:56-71.

Mbene AB, Houreld NN, Abrahamse H. DNA damage after phototherapy in wounded fibroblast cells irradiated with 16 J/cm(2). *J Photochem Photobiol B*. 2009 Feb 9;94(2):131-7. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2008.11.002.

McCune JS, Holmberg LA. Busulfan in hematopoietic stem cell transplant setting. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2009 Aug;5(8):957-69. doi: 10.1517/17425250903107764. Review.

Morales-Ramírez P, Miranda-Pasaye S, Cruz-Vallejo VL, Vallarino-Kelly T, Mendiola-Cruz MT. Kinetic of genotoxic expression in the pharmacodynamics of busulfan. *Arch Med Res*. 2006 Apr;37(3):316-21.

Morales-Ramírez P, Vallarino-Kelly T, Cruz-Vallejo V. Kinetics of micronucleus induction and cytotoxicity caused by distinct antineoplastics and alkylating agents in vivo. *Toxicol Lett*. 2014 Jan 30;224(3):319-25. doi: 10.1016/j.toxlet.2013.11.012. Epub 2013 Nov 21. Review.

Oberoi S, Zamperlini-Netto G, Beyene J, Treister NS, Sung L. Effect of prophylactic low level laser therapy on oral mucositis: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2014 Sep 8;9(9):e107418.

Otsuki Y. Various methods of apoptosis detection. *Acta Histochem Cytochem* 2000; 33 (4):235-241.

Palmer J, McCune JS, Perales MA, Marks D, Bubalo J, Mohty M, et al. Personalizing Busulfan-Based Conditioning: Considerations from the American Society for Blood

and Marrow Transplantation Practice Guidelines Committee. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2016 Nov;22(11):1915-1925. doi: 10.1016/j.bbmt.2016.07.013.

Parker TL, Cooper DL, Seropian SE, Bolognia JL. Toxic erythema of chemotherapy following i.v. BU plus fludarabine for allogeneic PBSC transplant. *Bone Marrow Transplant*. 2013 May;48(5):646-50. doi: 10.1038/bmt.2012.218.

Patel P, Aydogan B, Koshy M, Mahmud D, Oh A, Saraf SL, et al. Combination of linear accelerator-based intensity modulated total marrow irradiation and myeloablative fludarabine/busulfan: a phase I study. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2014 Dec;20(12):2034-41.

Probin V, Wang Y, Zhou D. Busulfan-induced senescence is dependent on ROS production upstream of the MAPK pathway. *Free Radic Biol Med*. 2007 Jun 15;42(12):1858-65.

Ramos Silva C, Cabral FV, de Camargo CF, Núñez SC, Mateus Yoshimura T, de Lima Luna AC et al. Exploring the effects of low level laser therapy on fibroblasts and tumor cells following gamma radiation exposure. *J Biophotonics*. 2016 Dec;9(11-12):1157-1166. doi: 10.1002/jbio.201600107.

Rauh M, Stachel D, Kuhlen M, Gröschl M, Holter W, Rascher W. Quantification of busulfan in saliva and plasma in haematopoietic stem cell transplantation in children : validation of liquid chromatography tandem mass spectrometry method. *Clin Pharmacokinet*. 2006;45(3):305-16.

Ritschel WA, Bykadi G, Norman EJ, Cluxton RJ, Denton D. Salivary elimination of cyclophosphamide in man. *J Clin Pharmacol*. 1981 Nov Dec;21(11-12 Pt 1):461-5.

Rodin I, Braun A, Stavrianidi A, Shpigun O. A validated LC-MS/MS method for rapid determination of methotrexate in human saliva and its application to na excretion evaluation study. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2013 Oct 15;937:1-6.

Russell JA, Tran HT, Quinlan D, Chaudhry A, Duggan P, Brown C, et al. Once-daily intravenous busulfan given with fludarabine as conditioning for allogeneic stem cell transplantation: study of pharmacokinetics and early clinical outcomes. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2002;8(9):468-76.

Sabuncuoğlu S, Öztaş Y, Çetinkaya DU, Özgüneş N, Özgüneş H. Oxidative protein damage with carbonyl levels and nitrotyrosine expression after chemotherapy in bone

marrow transplantation patients. *Pharmacology*. 2012;89(5-6):283-6. doi: 10.1159/000337040.

Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods*. 2012 Jul;9(7):671-5.

Shirzad A, Pouramir M, Seyedmajidi M, Jenabian N, Bijani A, Motallebnejad M. Salivary total antioxidant capacity and lipid peroxidation in patients with erosive oral lichen planus. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects*. 2014 Winter;8(1):35-9. doi: 10.5681/joddd.2014.006.

Silva Macedo R, Peres Leal M, Braga TT, Barioni ÉD, de Oliveira Duro S, Ratto Tempestini Horliana AC, et al. Photobiomodulation Therapy Decreases Oxidative Stress in the Lung Tissue after Formaldehyde Exposure: Role of Oxidant/Antioxidant Enzymes. *Mediators Inflamm*. 2016;2016:9303126. doi: 10.1155/2016/9303126.

Silveira PC, Silva LA, Freitas TP, Latini A, Pinho RA. Effects of low-power laser irradiation (LPLI) at different wavelengths and doses on oxidative stress and fibrogenesis parameters in an animal model of wound healing. *Lasers Med Sci*. 2011 Jan;26(1):125-31. doi: 10.1007/s10103-010-0839-0.

Singh, NP., McCoy, MT., Tice, RR, Schneider, EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*. 1988 Mar; 175 (1): 184–91.

Sittampalam GS, Coussens NP, Brimacombe K, et al., editors. *Assay Guidance Manual* [Internet]. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004.

Sobecks RM, Rybicki L, Yurch M, Kalaycio M, Dean R, Andresen S, et al. Intravenous compared with oral busulfan as preparation for allogeneic hematopoietic progenitor cell transplantation for AML and MDS. *Bone Marrow Transplant*. 2012 May;47(5):633-8.

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

Tafur J, Mills PJ. Low-intensity light therapy: exploring the role of redox mechanisms. *Photomed Laser Surg*. 2008 Aug;26(4):323-8. doi: 10.1089/pho.2007.2184.

Takamatsu Y, Ogata K, Yamauchi K, Hara S, Kamimura T, Hayashi S, et al. An evaluation of busulfan pharmacokinetics in patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation. *Jpn J Clin Oncol*. 2005 Jul;35(7):400-3.

Thirumaran R, Prendergast GC, Gilman, PB. Cytotoxic Chemotherapy in Clinical Treatment of Cancer. In: , *Cancer Immunotherapy -Immune Suppression and Tumor Growth*. Edited by:George C. Prendergast and Elizabeth M. Jaffee. ISBN: 978-0-12-372551-6. 2007. Chapter 7. Pages – 101-116.

Wingard JR, Niehaus CS, Peterson DE, Jones RJ, Piantadosi S, Levin LS, et al. Oral mucositis after bone marrow transplantation. A marker of treatment toxicity and predictor of hepatic veno-occlusive disease. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1991 Oct;72(4):419-24.

Zecha JA, Raber-Durlacher JE, Nair RG, Epstein JB, Elad S, Hamblin MR, et al. Low-level laser therapy/photobiomodulation in the management of side effects of chemoradiationtherapy in head and neck cancer: part 2: proposed applications and treatment protocols. *Support Care Cancer*. 2016 Jun;24(6):2793-805.

Zhang Y, Song S, Fong CC, Tsang CH, Yang Z, Yang M. cDNA microarray analysis of gene expression profiles in human fibroblast cells irradiated with red light. *J Invest Dermatol*. 2003 May;120(5):849-57.

ANEXO A – Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Efeito da laserterapia de baixa intensidade sobre queratinócitos e fibroblastos sob quimioterapia

Pesquisador: Luciana Corrêa

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 56457116.1.0000.0075

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.585.003

Apresentação do Projeto:

A mucosite oral (MO) é um processo inflamatório na mucosa oral derivado da ação citotóxica de agentes quimioterápicos e radioterápicos, durante o tratamento antineoplásico. É caracterizada pela presença de lesões inflamatórias que variam de eritema até ulceração, a qual acarreta intensa sintomatologia dolorosa e dificuldade de mastigação e deglutição. Essa condição diminui significativamente a qualidade de vida do paciente, bem como pode gerar comprometimento nutricional, complicando seu estado sistêmico já debilitado. A prevenção e o tratamento da MO ainda não estão estabelecidos. A laserterapia de baixa intensidade (LBT) tem sido apontada como uma das medidas terapêuticas fundamentais para a prevenção da mucosite, e um elemento adjuvante importante no tratamento dessas lesões.

O mecanismo de ação do laser sobre as células da mucosa oral agredidas por agentes quimioterápicos ainda não é completamente conhecido. Há muitos trabalhos clínicos evidenciando a eficácia da LBT para a prevenção e o tratamento da MO, porém poucos são os estudos que descrevem a fotomodulação em situações de intenso estresse oxidativo provocado por agentes químicos. Visando avaliar este tipo de situação, será feito estudo in vitro para análise do efeito da laserterapia de baixa intensidade no controle do estresse oxidativo provocado por agentes quimioterápicos em queratinócitos e fibroblastos humanos. Serão cultivadas in vitro duas

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-900

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)3091-7960

Fax: (11)3091-7814

E-mail: cepfo@usp.br

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

Continuação do Parecer: 1.585.003

linhagens de queratinócitos e fibroblastos humanos, os

quais serão submetidos a tratamento prévio com laserterapia de baixa intensidade e, em seguida, expostos aos seguintes quimioterápicos: bussulfano, metotrexato e everolimus.

O bussulfano e o metotrexato serão veiculados em saliva artificial com dose descrita na literatura para a presença dos mesmos na saliva, simulando a situação em que a mucosa oral fica exposta a esses agentes por intermédio de sua presença na saliva. Já o everolimus será veiculado em concentração semelhante a plasmática, uma vez que não é sabido se essa droga está presente na saliva. A primeira questão a ser respondida é se a dose desses quimioterápicos encontrada na saliva induz estresse oxidativo sobre as células analisadas.

A segunda questão diz respeito ao efeito da laserterapia sobre essas células e se há ou não redução do estresse oxidativo. Para tanto, serão feitas análises de captura do radical orgânico DPPH e de peroxidação lipídica (TBARS), bem como de quantificação da superóxido dismutase. Também será analisada a viabilidade celular por meio de MTS, teste de TUNEL (para análise de apoptose) e de expressão de Ki-67, para verificação da proliferação celular. As análises serão realizadas em dez grupos experimentais, com células de queratinócitos humanos (HaCat) e fibroblastos humanos (OHF), obtidas de linhagens comerciais, que serão cultivadas e comporão os seguintes grupos:

- a)- Grupo controle – sem nenhum tratamento.
- b)- Grupo saliva – células expostas a saliva artificial adicionada ao meio de cultura na proporção 1:1.
- c)- Grupo veículo - células expostas somente ao veículo pelo qual será administrado o quimioterápico.
- d)- Grupo bussulfano – células expostas a 5µm/mL de bussulfano adicionado à saliva artificial.
- e)- Grupo metotrexato – células expostas a 0,2µg/mL de metotrexato adicionado à saliva artificial.
- f)- Grupo everolimus – células expostas a concentração da droga ainda a ser estabelecida. Serão feitos testes de dose-resposta até se obter a dose letal de 50%, partindo-se das concentrações de 10, 20 e 30µM.
- g)- Grupo LBT – células expostas a laserterapia de baixa intensidade (8J/cm²), simulando sessões consecutivas padronizadas para o tratamento clínico de MO derivado de quimioterapia de alta intensidade durante o transplante de células-tronco hematopoiéticas
- h)- Grupo LBT+bussulfano – células expostas a protocolo de LBT seguido do tratamento com bussulfano, semelhantemente ao feito nos grupos anteriores.
- i)- Grupo LBT + metotrexato - células expostas a protocolo de LBT seguido do tratamento com

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-900

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-7960

Fax: (11)3091-7814

E-mail: cepfo@usp.br

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO

Continuação do Parecer: 1.585.003

metotrexato, semelhantemente ao feito nos grupos anteriores.

j)- Grupo LBT + everolimus - células expostas a protocolo de LBT seguido do tratamento com everolimus, semelhantemente ao feito nos grupos anteriores.

A saliva artificial será confeccionada com base no método e nos constituintes propostos em Malpass et al. (2013), a qual contém basicamente - mucina(1.35 g/l), cloreto de potássio (475 mg/l), cloreto de sódio(700 mg/l), cloreto de cálcio(185 mg/l), Fosfato de potássio (420 mg/l), cloreto de magnésio(105 mg/l), uréia(45 mg/l), D-(+)-glicose(100 mg/l), amilase(100,000 U/l), lisozima(750 U/l) e fosfatase ácida(4 U/l).

Para a Laserterapia de baixa intensidade será desenvolvido método para irradiação das células simulando o tratamento com LBT feito para os pacientes sob alta dose desses quimioterápicos. Nesse caso, são feitas sessões diárias de laserterapia com dosimetria de 8J/cm², utilizando laser 660nm, conforme protocolo já estabelecido.

Espera-se verificar a redução do estresse oxidativo após a laserterapia, fato que confirmará seu efeito clínico preventivo e curativo sobre a mucosite oral.

Objetivo da Pesquisa:

A hipótese é de que a concentração de bussulfano e de metotrexato encontrada na saliva e o everolimus, ainda que administrado em doses encontradas em níveis plasmáticos, acarretarão alterações no padrão de estresse oxidativo das células, e que a LBT modificará esse perfil, reduzindo o estresse oxidativo. O objetivo primário será analisar o efeito da LBT sobre o estresse oxidativo induzido por agentes quimioterápicos quando em contato com queratinócitos e fibroblastos humanos. Secundariamente serão analisados: a)- A viabilidade celular e o estresse oxidativo de queratinócitos e fibroblastos humanos quando expostos a bussulfano, metotrexato e everolimus em doses encontradas na saliva.

b)- Se a exposição prévia a LBT atenua os efeitos citotóxicos dessas drogas quando veiculadas na saliva.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não há riscos diretos derivados da presente pesquisa, por envolver estudo in vitro com cultura de células comerciais.

Os benefícios serão indiretos, a depender dos resultados deste projeto, poderão auxiliar no entendimento do papel da LBT no controle clínico da mucosite oral, com extrapolação futura para a clínica de cuidados ao paciente oncológico, aperfeiçoando protocolos já existentes, bem como poderão esclarecer os efeitos das doses salivares de quimioterápicos sobre as células da mucosa oral.

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-900

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-7960

Fax: (11)3091-7814

E-mail: cepfo@usp.br

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO

Continuação do Parecer: 1.585.003

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Bastante interessante pois poderá beneficiar muito os pacientes que venham apresentar quadro de mucosite oral pós quimioterapia.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados todos os termos necessários para pesquisa: Folha de rosto; Declaração de manuseio de material biológico; Projeto detalhado; Informações básicas do projeto, sendo dispensado o TCLE porque serão utilizadas linhagens de células comerciais.

Recomendações:

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

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

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há inadequações.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_725751.pdf	25/05/2016 18:13:01		Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	AutorizacaoLaboratorioCEP.pdf	25/05/2016 18:12:07	Luciana Corrêa	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoCulturaCEP.pdf	25/05/2016 18:09:57	Luciana Corrêa	Aceito
Folha de Rosto	FolhaRostoCEP.pdf	25/05/2016 18:09:19	Luciana Corrêa	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-900

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)3091-7960

Fax: (11)3091-7814

E-mail: cepfo@usp.br

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

Continuação do Parecer: 1.585.003

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 10 de Junho de 2016

Assinado por:
Maria Gabriela Haye Biazevic
(Coordenador)