

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde

Departamento de Odontologia

Laura Maria de Almeida Araújo

**EFEITO DA FOTOBIMODULAÇÃO NA ATIVIDADE DE
MONÓCITOS EXPOSTOS À CISPLATINA E ESTIMULADOS COM
*Porphyromonas gingivalis***

Belo Horizonte

2022

Laura Maria de Almeida Araújo

**EFEITO DA FOTOBIMODULAÇÃO NA ATIVIDADE DE
MONÓCITOS EXPOSTOS À CISPLATINA E ESTIMULADOS COM
*Porphyromonas gingivalis***

Trabalho de Iniciação Científica apresentado à Pró-
reitoria de Pesquisa e Pós-graduação da Pontifícia
Universidade Católica de Minas Gerais. FIP-PUC
Minas 2020/24894-1S.

Orientador: Prof. Paulo Eduardo Alencar de Souza

Belo Horizonte

2022

RESUMO

A mucosite oral é uma das complicações bucais mais frequentes do tratamento oncológico mediado por quimioterápicos, como a cisplatina. Leucócitos tem papel fundamental na manutenção e progressão das lesões e bactérias da microbiota oral, como *Porphyromonas gingivalis* (Pg), estão associadas a maior gravidade das lesões. Diversos estudos mostram efeitos da fotobiomodulação no tratamento e prevenção da mucosite oral sem, no entanto, avaliar os efeitos na atividade leucocitária. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da fotobiomodulação na produção de intermediários reativos do oxigênio e de citocinas por monócitos humanos expostos à cisplatina e Pg. Para isso, células mononucleares do sangue periférico de 10 indivíduos saudáveis foram expostas a cisplatina (7,8 µg/ml) por 2 horas e, em seguida, irradiadas com luz laser (660 nm; 5 J/cm²). Após 1 hora, as células foram estimuladas com Pg e incubadas por mais 6 horas. Foram avaliadas por citometria de fluxo a viabilidade celular, produção de intermediários reativos do oxigênio, pela marcação com DHR123, e expressão das citocinas IL-6, IL-8, IL-10, TNF, TGF-β1 por monócitos (CD14⁺). Os tratamentos realizados não afetaram a viabilidade dos monócitos e a expressão de DHR123 e de TGF-β1. Considerando as células estimuladas com Pg, cisplatina reduziu a expressão de IL-6, IL-8 e IL-10 por monócitos. Irradiação com laser nas células incubadas com cisplatina reduziu a expressão de IL-6, IL-8, IL-10 e TNF nos monócitos não estimulados com Pg. Já nas células tratadas com cisplatina e estimuladas com Pg, o laser aumentou a expressão de IL-6 e IL-8 por monócitos. Nossos dados sugerem que o laser vermelho na densidade de energia de 5 J/cm² apresenta atividade anti-inflamatória sobre monócitos humanos expostos à cisplatina quando não estimulados com Pg e atividade pró-inflamatória quando estimulados com a bactéria, podendo representar mecanismos de ação da fotobiomodulação na prevenção e tratamento da mucosite oral.

Palavras-chave: Fotobiomodulação. Monócitos. Citocinas. *Porphyromonas gingivalis*.

AGRADECIMENTOS

À Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-graduação da PUC Minas.

Ao Fundo de Incentivo à Pesquisa (FIP) da PUC Minas pelo auxílio financeiro e pela bolsa de Iniciação Científica concedida, os quais nos propiciaram condições de desenvolver nossas atividades, permitindo aprendizado de metodologias de pesquisa e contato com a pós-graduação.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro obtido por meio do Edital Universal para este projeto.

Ao meu orientador, professor Paulo Eduardo Alencar de Souza, pela oportunidade e aprendizado.

Ao mestrando Fábio Bruzinga e ao doutorando Hércules Henrique Onibene pela supervisão e ensinamentos.

À Professora Walderez Ornelas Dutra e ao Laboratório de Biologia das Interações Celulares do ICB/UFMG pelo apoio quanto à infraestrutura.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	4
2 OBJETIVOS	6
2.1 Objetivo geral.....	6
2.2 Objetivos específicos.....	6
3 MATERIAL E MÉTODOS	7
3.1 Amostras de sangue	7
3.2 Cisplatina.....	7
3.3 Laser de diodo.....	7
3.4 <i>Porphyromonas gingivalis</i>	7
3.5 Estimulação com cisplatina, laser e <i>P. gingivalis</i>	8
3.6 Avaliação da viabilidade celular	8
3.7 Avaliação da produção de espécies reativas do oxigênio	9
3.8 Reações de imunofluorescência e citometria de fluxo	9
3.9 Análises estatísticas	10
4 RESULTADOS	11
5 DISCUSSÃO	15
6 CONCLUSÕES.....	19
REFERÊNCIAS	20

1 INTRODUÇÃO

A cisplatina é um quimioterápico empregado no tratamento de diversas neoplasias, tais como tumores sólidos de cabeça e pescoço, mama, cérebro, pulmão e ovário (DASARI; TCHOUNWOU, 2014). Atua atravessando a membrana celular e carioteca, ligando-se ao DNA, desencadeando diferentes vias de apoptose e morte celular (CEPEDA *et al.*, 2007; ZITVOGEL *et al.*, 2008). Devido sua afinidade por tecidos de origem epitelial, sua utilização está relacionada ao desenvolvimento de mucosite oral (AL-ANSARI *et al.*, 2015; RABER-DURLACHER; ELAD; BARASCH, 2010).

A mucosite oral caracteriza-se por lesões ulceradas extremamente dolorosas que se desenvolvem posteriormente a destruição do epitélio de revestimento da mucosa (SONIS, 2004a), por meio de um processo imunoinflamatório induzido pelo tratamento antineoplásico e intensificado e sustentado pela resposta inflamatória, com participação efetiva de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , IL-6 e TNF (SONIS, 2004b). A colonização do sítio das lesões por bactérias da microbiota oral está relacionada a quadros mais graves (LAHEIJ *et al.*, 2012; LAHEIJ; SOET, 2014; SONIS, 2007).

Além de promover o dano inicial às células da camada basal do epitélio, a cisplatina ainda está relacionada ao aumento da produção de citocinas inflamatórias IFN, TNF, IL-1 β , IL-6 e IL-12 por leucócitos *in vitro* (OKAMOTO *et al.*, 1998) e *in vivo* (KOUFOS *et al.*, 2013). Em adição, o tratamento com cisplatina resultou na redução de compostos antioxidantes em leucócitos (KHYNRIAM; PRASAD, 2001), embora estudos não tenham observado alterações no estresse oxidativo em células mononucleares do sangue periférico (QUINTANILHA *et al.*, 2017) ou danos ao DNA de leucócitos totais (SHIMABUKURO *et al.*, 2011). Embora os efeitos da cisplatina sejam revertidos espontaneamente pouco dias após cessado o uso do fármaco (FELLER *et al.*, 2010; VILLA; SONIS, 2015), os fatores de morbidade associados à mucosite oral fazem necessárias medidas terapêuticas (CLARKSON *et al.*, 2010; WORTHINGTON *et al.*, 2011), com destaque à fotobiomodulação com laser de baixa intensidade por promover retardo do aparecimento das lesões, redução do tempo de cura, proteção contra graus mais intensos da condição e melhora na sintomatologia dolorosa (ANSCHAU *et al.*, 2019; GUEDES *et al.*, 2018; MARÍN-CONDE *et al.*, 2018; PINHEIRO *et al.*, 2019). Tendo em vista o caráter imunoinflamatório da mucosite oral,

os efeitos do laser sobre diferentes células do sistema imunológico frente à redução da expressão de citocinas pró-inflamatórias IL-6, IL-8, TNF, IL-1 β e estímulo da expressão de citocinas anti-inflamatórias IL-4 e IL-10 (MAFRA DE LIMA *et al.*, 2010; ALVES *et al.*, 2013; YIN *et al.*, 2017) justificam os efeitos e utilização da terapia como adjuvante ao tratamento das lesões.

Embora diversos estudos demonstrem o papel do laser na estimulação da proliferação de queratinócitos (ANTUNES *et al.*, 2018; ENGEL; KHAN; ARANY, 2016; RUPEL *et al.*, 2018), não se conhece ao certo os efeitos do laser na atividade de células fagocitárias expostas a quimioterápicos e bactérias da microbiota oral. Considerando a participação das citocinas e da atividade de células fagocitárias na etiopatogênese da mucosite oral, a avaliação do efeito da fotobiomodulação na produção dessas moléculas por células estimuladas com quimioterápicos é necessária para a melhor compreensão sobre os efeitos celulares e moleculares da luz laser nos tecidos acometidos pela mucosite.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito da fotobiomodulação na produção de espécies reativas do oxigênio e de citocinas por monócitos humanos expostos à cisplatina e estimulados com *Porphyromonas gingivalis*.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da fotobiomodulação na produção de espécies reativas do oxigênio e de citocinas por monócitos humanos expostos à cisplatina e estimulados com *Porphyromonas gingivalis*.

2.2 Objetivos específicos

- a) Determinar e comparar o efeito da densidade de energia de 5 J/cm² da luz laser de 660 nm na produção de intermediários reativos do oxigênio e das citocinas IL-6, IL-8, TNF, IL-10 e TGF- β 1 por monócitos estimulados ou não com *P. gingivalis*;
- b) determinar e comparar o efeito da cisplatina na produção de intermediários reativos do oxigênio e das citocinas IL-6, IL-8, TNF, IL-10 e TGF- β 1 por monócitos estimulados ou não com *P. gingivalis*;
- c) determinar e comparar o efeito da densidade de energia de 5 J/cm² da luz laser de 660 nm na produção de intermediários reativos do oxigênio e das citocinas IL-6, IL-8, TNF, IL-10 e TGF- β 1 por monócitos expostos à cisplatina e a *P. gingivalis*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostras de sangue

Foram coletados 20 mL de sangue de dez indivíduos saudáveis em tubos heparinizados (Becton Dickinson Vacutainer®, USA) e estes aplicados sobre 20 mL de Ficoll-Paque (GE Healthcare Life Sciences) para a obtenção das células mononucleares de sangue periférico (CMSP). Após centrifugação a 200g, por 40 minutos, a 20°C, as CMSP foram recolhidas, lavadas com RPMI. Após contagem de células com Azul de Tripán (0,4%) em câmara hemocitométrica, as CMSP foram ressuspensas em meio completo. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da PUC Minas e conduzido de acordo com normas vigentes.

3.2 Cisplatina

Neste estudo, foi utilizada cisplatina em pó (Quiral Química do Brasil S.A., Juiz de Fora, Brasil) dissolvida em PBS (tampão fosfato-salino) imediatamente antes de sua utilização nos experimentos, em concentração final de 7,8 µg/ml (26 µM), a qual equivale à concentração plasmática verificada nos pacientes em tratamento quimioterápico que recebem geralmente doses endovenosas de 100 mg/m² (GULLO *et al.*, 1980; GUNDOG *et al.*, 2019; HEYMANN *et al.*, 2014).

3.3 Laser de diodo

Foi utilizado neste estudo equipamento de laser de diodo semiconductor de Fosforeto de Índio-Gálio-Alumínio (PInGaAl) (DMC, São Carlos, SP, Brazil), com comprimento de onda de 660 nm (vermelho), potência de saída do aparelho de 20 mW, área de secção transversal do feixe (spot) de 0,028 cm² (0,6 mm de diâmetro), sem filtro adicional. A densidade de potência foi de 0.71 W/cm², densidade de energia 5 J/cm² (7s) e energia de 0.14 J. O modo de fotoativação foi em contato, contínuo e a aplicação realizada uma única vez, no centro de cada poço da placa de 96 poços de fundo em “U”, utilizando um dispositivo de silicone opaco, moldado previamente na placa, para isolar e padronizar a aplicação. Previamente à sua utilização, foi testada a estabilidade de potência, por meio de medidor de potência óptico (LaserCheck, Coherent Inc., Santa Clara, CA, USA).

3.4 *Porphyromonas gingivalis*

Porphyromonas gingivalis (Pg) (ATCC® 33277™, Manassas, VA, USA) foi cultivada em meio *Brain Heart Infusion Agar* (BHI - Difco, Sparks, MD, USA), suplementado com 0.5% de extrato de levedura (Difco, Sparks, MD, USA), 0.1% de hemina suína (Inlab Confiança, Diadema, SP, Brazil) e 0.1% de menadiona (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), e enriquecido com 5% de sangue de carneiro (BHIA-S/E), pH 7.2. Pg foi incubada em câmara de anaerobiose (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) com atmosfera de 85% de N₂, 5% CO₂ e 10% H₂, a 37°C, por 5 dias. As colônias foram transferidas para tubos contendo solução salina, homogeneizadas e ajustadas para um OD_{600nm} de 0,9 em espectrofotômetro (Micronal, S. A., SP, Brazil). A suspensão de bactérias foi então lavada com PBS, aquecida por 30 minutos a 100°C, para inativação e mantida a -80°C para utilização nos experimentos.

3.5 Estimulação com cisplatina, laser e *P. gingivalis*

Cerca de 5×10^5 CMSP por poço de placa de 96 poços de fundo em “U” foram incubadas com 7,8 µg/ml de cisplatina em estufa a 37°C, 5% CO₂. Após 2 horas, as células foram irradiadas com densidade de energia de 5 J/cm² de laser de diodo de 660 nm e incubadas por mais 1 hora em estufa a 37°C, 5% CO₂. Em seguida, foi adicionada *P. gingivalis* em concentração final de 5×10^5 UFC/mL e as células incubadas por mais 6 horas em estufa de CO₂. Quatro horas antes do final da incubação, em todos os grupos experimentais, foi adicionada Brefeldina A (1 µg/ml) (eBiociensce, San Diego, CA, USA), nos poços destinados à imunomarcação de citocinas.

Foram estabelecidos dois grupos experimentais: células tratadas ou não com cisplatina. Em cada grupo foi avaliado o efeito do laser na expressão dos marcadores, obtendo-se assim quatro condições: Controle; L (laser 5 J/cm²); Cis (cisplatina); Cis + L. As quatro condições também foram avaliadas em células estimuladas com a bactéria *P. gingivalis* (Pg).

3.6 Avaliação da viabilidade celular

Para avaliação da viabilidade celular após cada tratamento, as CMSP foram lavadas 2 vezes com PBS e incubadas com anticorpo anti-CD14 (FITC, clone M5E2, BioLegend) e Live/Dead (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) por 15

minutos à temperatura ambiente. Em seguida, as células foram lavadas com PBS 2% soro fetal bovino (SFB), fixadas com formaldeído 2% em PBS, por 15 minutos, a temperatura ambiente, lavadas com PBS e mantidas a 4°C, até aquisição de 70.000 eventos por tubo no citômetro de fluxo FACSCanto II (Becton Dickinson, New Jersey, USA).

3.7 Avaliação da produção de espécies reativas do oxigênio

Para mensuração da produção de espécies reativas do oxigênio, especialmente peróxido de hidrogênio, as CMSP foram centrifugadas a 200g, por 10 minutos, a 4°C, lavadas 2 vezes com PBS e incubadas com anticorpo anti-CD14 (FITC, clone M5E2, BioLegend), dihidrorodamina 123 (DHR123) (Life Technologies, Molecular Probes, Oregon, USA) e Live/Dead (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), por 30 minutos, a 4°C. Em seguida, as células foram lavadas com PBS 2% soro fetal bovino (SFB), fixadas com formaldeído 2% em PBS, por 15 minutos, a temperatura ambiente, lavadas com PBS e mantidas a 4°C, até aquisição de 70.000 eventos por tubo no citômetro de fluxo FACSCanto II (Becton Dickinson, New Jersey, USA).

3.8 Reações de imunofluorescência e citometria de fluxo

As CMSP foram centrifugadas a 200g, por 10 minutos, a 4°C, lavadas com PBS e incubadas por 30 minutos a 4°C com anticorpo anti-CD14 (FITC, clone M5E2, BioLegend) diluído em PBS 0,015 M, pH 7,4 e 0,2% de albumina bovina sérica (BSA). As células foram lavadas com PBS e fixadas com formaldeído 2% em PBS, por 10 minutos, a temperatura ambiente. Em seguida, para marcação intracitoplasmática, as células foram permeabilizadas com saponina 0,5% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) e incubadas com anticorpos monoclonais anti-IL-6 (PE, clone MQ2-13A5, Biolegend), IL-8 (PerCP-Cy5, clone BH0814, Biolegend), IL-10 (PE, Clone JES3-19F1, Biolegend), TNF (PE/Cy7, clone MAb11, Biolegend) e LAP (TGF- β 1) (PE/Cy7, clone TW4-2F8, BioLegend), 30 minutos à temperatura ambiente. Após lavagem com PBS e fixação com formaldeído 2%, as células foram analisadas em citômetro de fluxo FACSCanto II (Becton Dickinson, New Jersey, USA), com aquisição de 100.000 eventos por tubo. O software FlowJo X (Tree Star Inc., USA) foi utilizado para análises citométricas.

3.9 Análises estatísticas

O teste de normalidade de Kolmogorov-smirnov foi utilizado para verificar a distribuição dos dados. Para verificar existência de diferenças na expressão dos marcadores entre os grupos controle estimulados ou não com *P. gingivalis*, entre os grupos tratados ou não com cisplatina e entre os grupos irradiados e não irradiados com laser foi utilizado o teste t de Student pareado, com nível de significância de 5%. As análises foram realizadas utilizando-se o software GraphPad Prism 5.01 (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, EUA).

4. RESULTADOS

Análise da viabilidade celular pela coloração com Live/Dead mostrou que os tratamentos empregados (cisplatina, laser, estimulação com Pg e associações entre eles) não afetaram significativamente a porcentagem de monócitos CD14⁺ viáveis (Fig. 1).

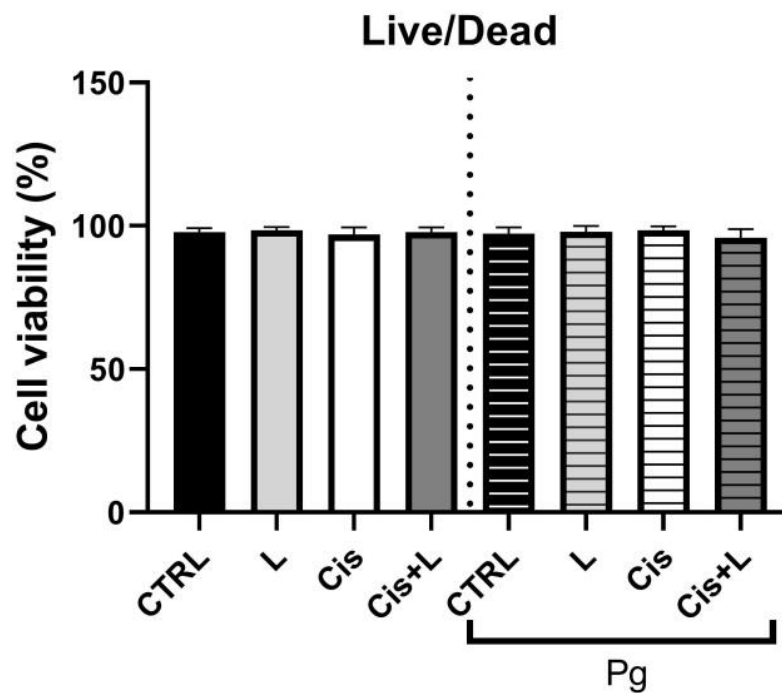


Figura 1 – Viabilidade de monócitos avaliada pelo método Live and Dead após os tratamentos. Resultados expressos como porcentagem de células viáveis. Barras de erro indicam desvio padrão.

Análise da produção de espécies reativas do oxigênio, especialmente peróxido de hidrogênio, pela marcação com dihidrorodamina 123 (DHR123), mostrou que estimulação com Pg aumentou significativamente a frequência de células DHR123⁺ na população de monócitos CD14⁺ (Fig. 2). Entretanto, tratamentos com laser e/ou cisplatina não foram capazes de afetar significativamente a expressão de DHR123, tanto nas células estimuladas quanto naquelas não estimuladas com Pg (Fig. 2).

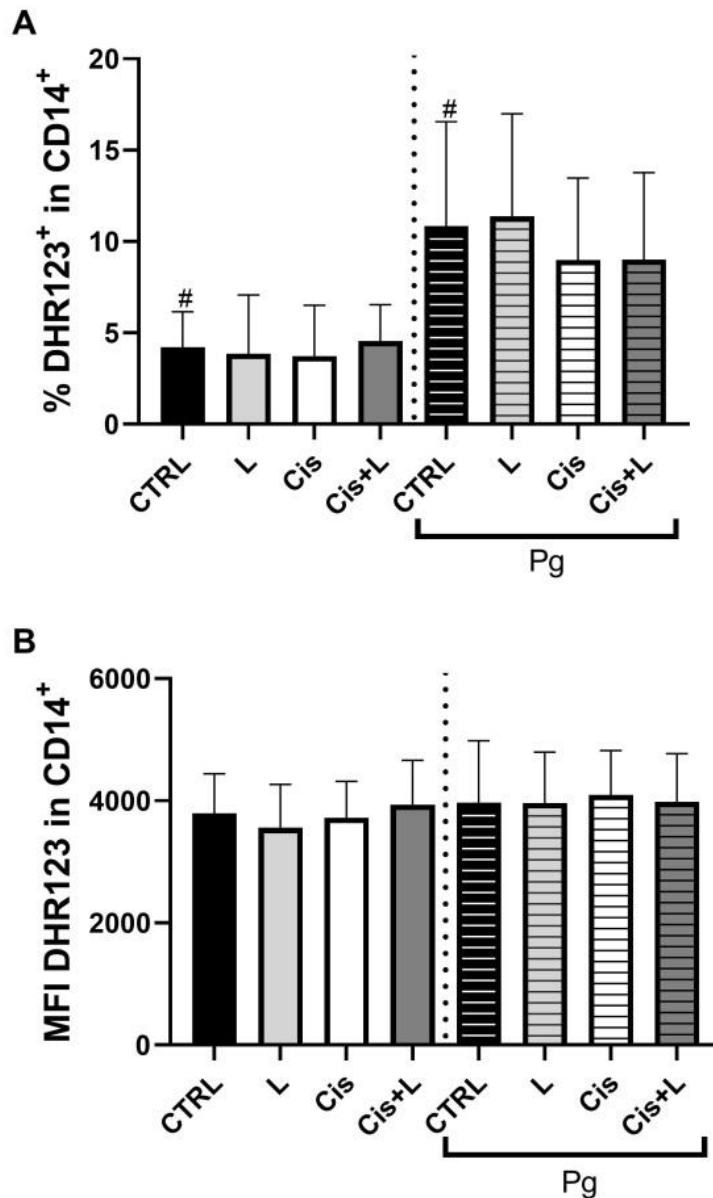


Figura 2 – Efeito da estimulação com cisplatina, laser de diodo de 660nm e *P. gingivalis* nas frequências de células positivas e na mediana de intensidade de fluorescência de DHR123 nos monócitos CD14⁺. L: laser de diodo; Cis: cisplatina; Pg: *P. gingivalis*. Barras de erro indicam desvio padrão.

Análise da expressão de citocinas mostrou que a aplicação do laser na densidade de 5 J/cm² não foi capaz de alterar significativamente a expressão das citocinas avaliadas (Fig. 3). Considerando as células tratadas com cisplatina, aplicação do laser reduziu a percentagem de células produtoras das citocinas IL-6 e IL-8 e reduziu a MIF de IL-6, IL-8, TNF e IL-10 (Fig. 3). Nenhum dos tratamentos foi capaz de alterar de forma significativa a expressão da citocina TGF- β 1 na população de monócitos (Fig. 3I e J).

Estimulação com Pg aumentou significativamente a percentagem de células positivas para IL-6, IL-8, TNF e IL-10, bem como a MIF de IL-6 e TNF, na população de monócitos CD14⁺, em relação ao grupo controle negativo (Fig. 3). Considerando o grupo estimulado com Pg, a incubação com cisplatina reduziu a frequência de células IL-10⁺ e a MIF de IL-6 e IL-8 na população de monócitos (Fig. 3B, D e G). Irradiação com laser à cultura de células estimuladas com Pg e tratadas com cisplatina reverteu os efeitos inibitórios da cisplatina, elevando a MIF de IL-6 e IL-8 (Fig. 3B e D).

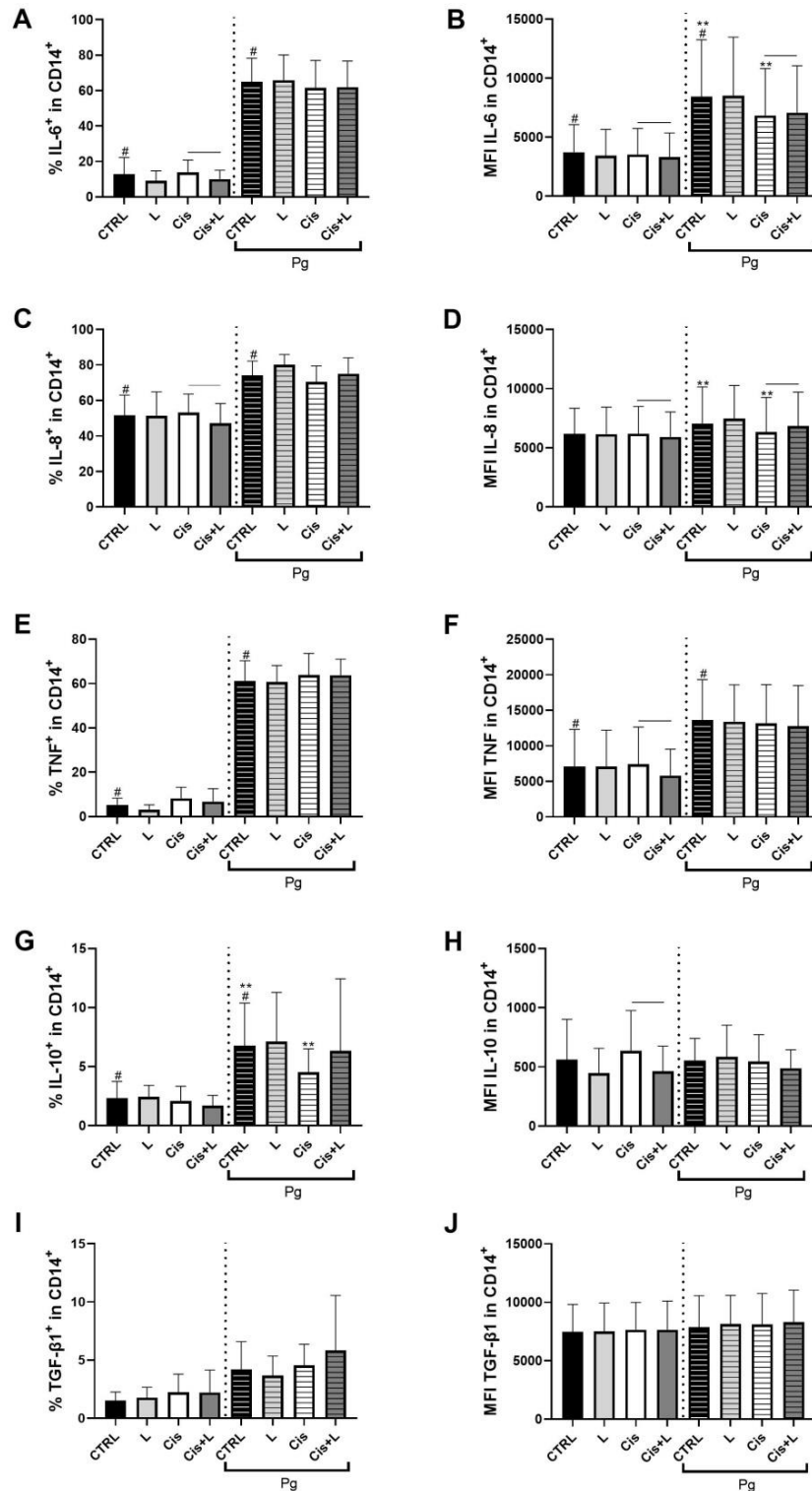


Figura 3 – Efeito da estimulação com cisplatina, laser de diodo de 660nm e *P. gingivalis* nas frequências de células positivas e na mediana de intensidade de fluorescência de citocinas nos monócitos CD14⁺. L: laser de diodo; Cis: cisplatina; Pg: *P. gingivalis*. Barras de erro indicam desvio padrão.

representa diferença significativa ($p < 0.05$) entre os grupos controle estimulados ou não com Pg (t test); ** representa a diferença significativa ($p < 0.05$) entre grupos controle e cisplatina estimulados com Pg (t test); linhas representam diferença significativa ($p < 0.05$) entre grupo cisplatina e grupo exposto a cisplatina e laser (t test).

5. DISCUSSÃO

O presente trabalho avaliou o efeito do laser de luz vermelha (660 nm) em monócitos expostos a agentes envolvidos na patogênese da mucosite oral, como drogas quimioterápicas e bactérias da microbiota oral. *Porphyromonas gingivalis* é uma bactéria gram-negativa residente da microbiota oral e apresenta grande capacidade em ativar a resposta imunológica do hospedeiro e estimular a produção de sinalizadores pró-inflamatórios (LAHEIJ; SOET, 2014). Foi observada associação entre a presença e porcentagem de Pg na cavidade bucal de pacientes oncológicos e o aumento do risco de ulceração e da gravidade de mucosite oral (LAHEIJ *et al.*, 2012). A cisplatina, quimioterápico utilizado no ensaio, é amplamente utilizada no tratamento de tumores sólidos de cabeça e pescoço e está relacionada ao desenvolvimento de lesões de mucosite oral (CINAUSERO *et al.*, 2017).

Cisplatina a 7,8 µg/ml não afetou significativamente a viabilidade de monócitos (CD14⁺). A concentração de cisplatina de 7,8 µg/ml simula doses terapêuticas de 100 mg/m² (GULLO *et al.*, 1980) usualmente infundidas em pacientes oncológicos e suficientes para desenvolvimento de lesões de mucosite oral (GUNDOG *et al.*, 2019). Resultados semelhantes foram observados em outros estudos utilizando doses entre 5 e 10 µg/ml (SODHI *et al.*, 1990; SODHI; PAI, 1992; VAN WIGCHEREN *et al.*, 2021).

A mucosite oral é um processo complexo desencadeado pelo tratamento antineoplásico e sustentado pela resposta imunoinflamatória e pela presença de microrganismos patogênicos (SONIS, 2007). Os macrófagos desempenham importante papel na patogênese da mucosite oral produzindo radicais livres, citocinas inflamatórias e metaloproteinases da matriz responsáveis por auxiliar e intensificar a destruição tecidual (SONIS, 2007; SONIS, 2011).

Análise da produção de espécies reativas do oxigênio por monócitos totais (CD14⁺) pelo método da dihidrorodamina 123 (DHR123) mostrou aumento da frequência de células DHR123⁺ quando estimuladas com Pg. A produção de radicais livres por células inflamatórias é um importante mecanismo de combate a patógenos. Células fagocitárias são estimuladas a produzirem espécies reativas do oxigênio e espécies reativas do nitrogênio quando estimuladas, promovendo a explosão oxidativa e regulação da sobrevivência celular, modulando de forma positiva ou negativa a apoptose e, assim, o processo inflamatório (BARAN *et al.*, 2004; CORMICAN; GRIFFIN, 2020).

Os tratamentos empregados, cisplatina ou laser, não afetaram a frequência de células DHR123⁺ ou a MIF da DHR123. Estudos anteriores mostraram que o laser de baixa intensidade reduziu o estresse oxidativo em leucócitos (COSTA CARVALHO *et al.*, 2016; YIN *et al.*, 2017), ao passo que em células polimorfonucleares, a irradiação com laser estimulou a explosão oxidativa com aumento de níveis de compostos oxigenados intra e extracelulares (CERDEIRA *et al.*, 2016).

A patogênese da mucosite oral envolve a produção de citocinas, as quais atuam como mensageiros, ligando-se ao epitélio, vasos sanguíneos e células do tecido conjuntivo, induzindo ocorrência de danos em suas estruturas (SONIS, 2004a). No presente estudo, em monócitos não estimulados com bactérias, a incubação com cisplatina em concentração de 7,8 µg/ml não foi capaz de alterar a expressão das citocinas avaliadas. Em contrapartida, Sodhi e Pai (1992) observaram aumento da produção de IL-1 e TNF por monócitos expostos a doses de 10 µg/ml e 5 µg/ml de cisplatina, respectivamente. Nossos dados sugerem que a cisplatina parece exercer pouco efeito direto na expressão das citocinas avaliadas por monócitos humanos.

Considerando as células estimuladas com Pg, a incubação com cisplatina apresentou efeito inibitório sobre a expressão das citocinas IL-6 e IL-8, verificado pela redução da MIF. Os resultados do presente estudo sugerem que a cisplatina pode desempenhar efeito anti-inflamatório nos monócitos. Adicionalmente, a cisplatina esteve relacionada à redução de células IL-10⁺ em monócitos estimulados com Pg. O fato de se observar o efeito inibitório do fármaco associado à bactéria sobre citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias pode representar desativação dos monócitos. Os mecanismos pelos quais a cisplatina afeta diferencialmente a expressão de citocinas nos monócitos com *P. gingivalis* ainda não são conhecidos. Entretanto, nossos resultados sugerem que os efeitos da cisplatina são mais intensos em monócitos ativados por produtos bacterianos, condição observada em lesões de mucosite ulceradas e expostas à microbiota oral.

A terapia de fotobiomodulação tem sido utilizada como agente adjuvante no tratamento e prevenção da mucosite oral induzida por tratamento antineoplásico, observando-se redução da sintomatologia, tempo de cura e severidade das lesões (ANSCHAU *et al.*, 2019; GUEDES *et al.*, 2018; MARÍN-CONDE *et al.*, 2018; PINHEIRO *et al.* 2019). Densidades de energia entre 1 J/cm² e 72 J/cm² são utilizadas em diferentes protocolos clínicos para manejo da mucosite oral sem, no entanto, existir um consenso sobre o melhor método de abordagem (HE *et al.*, 2017; ZADIK *et al.*,

2019).

No presente trabalho, utilizou-se densidade de energia de 5 J/cm² e esta não foi capaz de afetar a expressão das citocinas produzidas por monócitos expostos à cisplatina. Entretanto, em monócitos incubados com o quimioterápico, a irradiação com laser reduziu a frequência de células produtoras de IL-6, IL-8, IL-10 e a MIF de IL-6, IL-8, TNF e IL-10. Quando em meio estimulado com Pg e tratado com cisplatina, o laser elevou o MIF de IL-6 e IL-8.

Semelhante a este estudo, atividade anti-inflamatória do laser foi observado com a redução da produção das citocinas inflamatórias IL-6 e IL-8 por células mieloides expostas a lipopolissacarídeos (LPS) após irradiação com laser de comprimento de onda de 660 nm e densidade de energia de 11-16 J/cm². Além disso, observou-se aumento da produção de citocinas anti-inflamatórias IL-4 e IL-10 (YIN *et al.*, 2017). Entretanto, os dados sobre efeito do laser sobre células mononucleares estimulados com produto bacteriano são contraditórios, observando estudos nos quais laser não apresentou impacto sobre produção de citocinas (BOUMA; BUURMAN; VAN DEN WILDENBERG, 1996). Divergências na literatura podem estar relacionados a parâmetros do laser utilizados, tais como comprimento de onda e densidade de energia. Citocinas IL-6, IL-1 β e TNF desempenham papel importante na manutenção da mucosite oral (MARIA; ELIOPOULOS; MUANZA, 2017; SONIS, 2004b; SONIS, 2007), com estudo evidenciando associação entre o aumento da quantidade das citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF na saliva de pacientes com câncer de cabeça e pescoço a partir da terceira semana do tratamento antineoplásico e o desenvolvimento de mucosite oral severa (BOSSI *et al.*, 2016).

Em monócitos não estimulados com Pg, irradiação com laser reduziu a expressão de IL-6 e IL-8, enquanto que nos monócitos estimulados com Pg, a irradiação com laser aumentou a expressão dessas citocinas.

A IL-6 é um mediador pró-inflamatório agudo produzido principalmente por monócitos e macrófagos e contribui para o reparo de danos teciduais e combate a agentes infecciosos (TANAKA *et al.*, 2016). Em processos de mucosite oral, a atividade intensificada da IL-6 contribui para manutenção de mediadores inflamatórios no local de lesão e progressão do dano tecidual (SONIS, 2004b). A IL-8 é secretada principalmente por monócitos estimulados por LPS (HARADA *et al.*, 1994) e atua como agente quimiotático para neutrófilos, sendo responsável, também, por estimular várias atividades dos neutrófilos, incluindo degranulação, liberação de leucotrieno B4 e

fatores de ativação de plaquetas (YUAN *et al.*, 2005).

Os resultados sobre a expressão de IL-6 e IL8, aliado ao comportamento das citocinas, permite especular o efeito anti-inflamatório do laser quando utilizado de forma profilática na mucosa bucal de pacientes em tratamento quimioterápico. A irradiação anterior ao surgimento das lesões bucais induzidas pela quimioterapia possibilitaria o controle na atividade da IL-6 e IL-8, reduzindo-se, assim, os efeitos dos danos da produção excessiva ou persistência das citocinas nos sítios das lesões.

Em cultura de células tratadas com cisplatina, a irradiação com laser levou a redução da MIF de TNF nos monócitos. Quando estimulados com *P. gingivalis*, o laser não foi capaz de modular a expressão de TNF pelos monócitos tratados com cisplatina.

Citocina de atividade pró-inflamatória, o TNF participa ativamente no processo de manutenção da mucosite oral, sendo responsável por ativar vias pró-apoptóticas de células da lâmina própria e do epitélio, levando a destruição tecidual e, conseqüentemente, desenvolvimento de úlceras (SONIS, 2007). Atuação do laser regulando negativamente a produção de TNF representa, então, importante via para tratamento e prevenção da mucosite oral (RUSSI; RABER-DURLACHER; SONIS, 2014). O laser de luz vermelha na densidade 5 J/cm², por atuar de forma inibitória sobre a expressão de TNF, pode desempenhar efeito de proteção ao dano tecidual, principalmente quando aplicado de forma profilática, ou seja, anteriormente a formação de úlceras e colonização bacteriana.

Em células tratadas com cisplatina e não estimuladas com Pg, o laser reduziu a expressão da citocina IL-10 pelos monócitos. A IL-10 é uma citocina com atividade anti-inflamatória, capaz de inibir a expressão de citocinas inflamatórias TNF, IL-6 e IL-1 β em macrófagos ativados (YAO *et al.*, 2013). Embora tal achado possa indicar possível efeito pró-inflamatório do laser, há que se considerar que citocinas pró-inflamatórias avaliadas no presente estudo também foram moduladas negativamente nessas condições, indicando efeito inibitório amplo sobre monócitos expostos à cisplatina. O desfecho clínico dessa inibição na mucosa bucal será impactado pelo balanço na produção das várias citocinas, sendo que em quadros de mucosite oral, a atividade de TNF, IL-6 e IL-1 β desempenha maior impacto (MARIA; ELIOPOULOS; MUANZA, 2017; SONIS, 2004b; SONIS, 2007).

6. CONCLUSÕES

O laser de baixa intensidade é capaz de modular a produção de citocinas em monócitos humanos expostos à cisplatina e estimulados com bactéria da microbiota oral. Os efeitos observados pela irradiação do laser são diferentes frente ao estímulo bacteriano de modo a atuar de forma anti-inflamatória na ausência de bactérias e intensificar a atividade inflamatória quando na presença de patógenos. Clinicamente, especula-se que a aplicação do laser de forma profilática, ou seja, anterior a formação das úlceras, poderia reduzir os efeitos danosos da atividade inflamatória exacerbada sobre os tecidos locais, reduzindo-se a severidade das lesões. Quando em lesões ulceradas e colonizadas por bactérias, o laser atuaria estimulando a atividade inflamatória, contribuindo para o combate os microrganismos patógenos. Estudos adicionais abordando a expressão de moléculas envolvidas diretamente no dano tecidual e a capacidade microbicida de monócitos irradiados com laser poderão contribuir para a elucidação dos mecanismos relacionados à terapia de fotobiomodulação na mucosa bucal.

REFERÊNCIAS

1. Al-Ansari S, Zecha JA, Barasch A, de Lange J, Rozema FR, Raber-Durlacher JE. Oral Mucositis Induced By Anticancer Therapies. *Curr Oral Health Rep*. 2015;2(4):202-211. doi: 10.1007/s40496-015-0069-4.
2. Alves AC, Vieira R, Leal-Junior E, dos Santos S, Ligeiro AP, Albertini R, Junior J, de Carvalho P. Effect of low-level laser therapy on the expression of inflammatory mediators and on neutrophils and macrophages in acute joint inflammation. *Arthritis Res Ther*. 2013;15(5):R116. doi: 10.1186/ar4296.
3. Anschau F, Webster J, Capra MEZ, de Azeredo da Silva ALF, Stein AT. Efficacy of low-level laser for treatment of cancer oral mucositis: a systematic review and meta-analysis. *Lasers Med Sci*. 2019 Aug;34(6):1053-1062. doi: 10.1007/s10103-019-02722-7.
4. Antunes HS, Wajnberg G, Pinho MB, Jorge NAN, de Moraes JLM, Stefanoff CG, Herchenhorn D, Araújo CMM, Viégas CMP, Rampini MP, Dias FL, de Araujo-Souza PS, Passetti F, Ferreira CG. cDNA microarray analysis of human keratinocytes cells of patients submitted to chemoradiotherapy and oral photobiomodulation therapy: pilot study. *Lasers Med Sci*. 2018 Jan;33(1):11-18. doi: 10.1007/s10103-017-2313-8.
5. Baran CP, Zeigler MM, Tridandapani S, Marsh CB. The role of ROS and RNS in regulating life and death of blood monocytes. *Curr Pharm Des*. 2004;10(8):855-66. doi: 10.2174/1381612043452866.
6. Bouma MG, Buurman WA, van den Wildenberg FA. Low energy laser irradiation fails to modulate the inflammatory function of human monocytes and endothelial cells. *Lasers Surg Med*. 1996;19(2):207-15. doi: 10.1002/(SICI)1096-9101(1996)19:2<207::AID-LSM13>3.0.CO;2-3.
7. Cepeda V, Fuertes MA, Castilla J, Alonso C, Quevedo C, Pérez JM. Biochemical mechanisms of cisplatin cytotoxicity. *Anticancer Agents Med Chem*. 2007 Jan;7(1):3-18. doi: 10.2174/187152007779314044.
8. Cerdeira CD, Lima Brigagão MR, Carli ML, de Souza Ferreira C, de Oliveira Isac Moraes G, Hadad H, Costa Hanemann JA, Hamblin MR, Sperandio FF. Low-level laser therapy stimulates the oxidative burst in human neutrophils and increases their fungicidal capacity. *J Biophotonics*. 2016 Dec;9(11-12):1180-1188. doi: 10.1002/jbio.201600035.
9. Cinausero M, Aprile G, Ermacora P, Basile D, Vitale MG, Fanotto V, Parisi G, Calvetti L, Sonis ST. 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.

10. Clarkson JE, Worthington HV, Furness S, McCabe M, Khalid T, Meyer S. Interventions for treating oral mucositis for patients with cancer receiving treatment. *Cochrane Database Syst Rev.* 2010 Aug 4;2010(8):CD001973. doi: 10.1002/14651858.CD001973.pub4.
11. Cormican S, Griffin MD. Human Monocyte Subset Distinctions and Function: Insights From Gene Expression Analysis. *Front Immunol.* 2020 Jun 4;11:1070. doi: 10.3389/fimmu.2020.01070.
12. Costa Carvalho JL, de Brito AA, de Oliveira AP, de Castro Faria Neto HC, Pereira TM, de Carvalho RA, Anatriello E, Aimbire F. The chemokines secretion and the oxidative stress are targets of low-level laser therapy in allergic lung inflammation. *J Biophotonics.* 2016 Dec;9(11-12):1208-1221. doi: 10.1002/jbio.201600061.
13. Dasari S, Tchounwou PB. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol.* 2014 Oct 5;740:364-78. doi: 10.1016/j.ejphar.2014.07.025.
14. Diya Zhang, Lili Chen, Shenglai Li, Zhiyuan Gu, Jie Yan. Lipopolysaccharide (LPS) of *Porphyromonas gingivalis* induces IL-1beta, TNF-alpha and IL-6 production by THP-1 cells in a way different from that of *Escherichia coli* LPS. *Innate Immun.* 2008 Apr;14(2):99-107. doi: 10.1177/1753425907088244.
15. Engel KW, Khan I, Arany PR. Cell lineage responses to photobiomodulation therapy. *J Biophotonics.* 2016 Dec;9(11-12):1148-1156. doi: 10.1002/jbio.201600025.
16. Feghali CA, Wright TM. Cytokines in acute and chronic inflammation. *Front Biosci.* 1997 Jan 1;2:d12-26. doi: 10.2741/a171.
17. Feller L, Essop R, Wood NH, Khammissa RA, Chikte UM, Meyerov R, Lemmer J. Chemotherapy- and radiotherapy-induced oral mucositis: pathobiology, epidemiology and management. *SADJ.* 2010 Sep;65(8):372-4.
18. Guedes CDCFV, de Freitas Filho SAJ, de Faria PR, Loyola AM, Sabino-Silva R, Cardoso SV. Variation of Energy in Photobiomodulation for the Control of Radiotherapy-Induced Oral Mucositis: A Clinical Study in Head and Neck Cancer Patients. *Int J Dent.* 2018 Feb 22;2018:4579279. doi: 10.1155/2018/4579279.
19. Gullo JJ, Litterst CL, Maguire PJ, Sikic BI, Hoth DF, Woolley PV. Pharmacokinetics and protein binding of cis-dichlorodiammine platinum (II) administered as a one hour or as a twenty hour infusion. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1980;5(1):21-6. doi: 10.1007/BF00578558.
20. Gundog M, Basaran H, Bozkurt O, Eroglu C. A comparison of cisplatin cumulative dose and cisplatin schedule in patients treated with concurrent chemo-radiotherapy in nasopharyngeal carcinoma. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2020 Nov-Dec;86(6):676-686. doi: 10.1016/j.bjorl.2019.04.008.

21. Harada A, Sekido N, Akahoshi T, Wada T, Mukaida N, Matsushima K. Essential involvement of interleukin-8 (IL-8) in acute inflammation. *J Leukoc Biol.* 1994 Nov;56(5):559-64.
22. He M, Zhang B, Shen N, Wu N, Sun J. A systematic review and meta-analysis of the effect of low-level laser therapy (LLLT) on chemotherapy-induced oral mucositis in pediatric and young patients. *Eur J Pediatr.* 2018 Jan;177(1):7-17. doi: 10.1007/s00431-017-3043-4.
23. Heymann PG, Mandic R, Kämmerer PW, Kretschmer F, Saydali A, Neff A, Draenert FG. Laser-enhanced cytotoxicity of zoledronic acid and cisplatin on primary human fibroblasts and head and neck squamous cell carcinoma cell line UM-SCC-3. *J Craniomaxillofac Surg.* 2014 Oct;42(7):1469-74. doi: 10.1016/j.jcms.2014.04.014.
24. Khadra M, Lyngstadaas SP, Haanaes HR, Mustafa K. Effect of laser therapy on attachment, proliferation and differentiation of human osteoblast-like cells cultured on titanium implant material. *Biomaterials.* 2005 Jun;26(17):3503-9. doi: 10.1016/j.biomaterials.2004.09.033.
25. Khyriam D, Prasad SB. Hematotoxicity and blood glutathione levels after cisplatin treatment of tumor-bearing mice. *Cell Biol Toxicol.* 2001;17(6):357-70. doi: 10.1023/a:1013784115683.
26. Koufos N, Michailidou D, Xynos ID, Tomos P, Athanasiadou K, Kosmas C, Tsavaris N. Modulation of peripheral immune responses by paclitaxel-ifosfamide-cisplatin chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2013 Dec;139(12):1995-2003. doi: 10.1007/s00432-013-1514-1.
27. Laheij AM, de Soet JJ, von dem Borne PA, Kuijper EJ, Kraneveld EA, van Loveren C, Raber-Durlacher JE. Oral bacteria and yeasts in relationship to oral ulcerations in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Support Care Cancer.* 2012 Dec;20(12):3231-40. doi: 10.1007/s00520-012-1463-2.
28. Laheij AM, de Soet JJ. Can the oral microflora affect oral ulcerative mucositis? *Curr Opin Support Palliat Care.* 2014 Jun;8(2):180-7. doi: 10.1097/SPC.0000000000000053.
29. Mafra de Lima F, Villaverde AB, Salgado MA, Castro-Faria-Neto HC, Munin E, Albertini R, Aimbire F. Low intensity laser therapy (LILT) in vivo acts on the neutrophils recruitment and chemokines/cytokines levels in a model of acute pulmonary inflammation induced by aerosol of lipopolysaccharide from *Escherichia coli* in rat. *J Photochem Photobiol B.* 2010 Dec 2;101(3):271-8. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2010.07.012.
30. Maria OM, Eliopoulos N, Muanza T. Radiation-Induced Oral Mucositis. *Front Oncol.* 2017 May 22;7:89. doi: 10.3389/fonc.2017.00089.

31. Marín-Conde F, Castellanos-Cosano L, Pachón-Ibañez J, Serrera-Figallo MA, Gutiérrez-Pérez JL, Torres-Lagares D. Photobiomodulation with low-level laser therapy reduces oral mucositis caused by head and neck radio-chemotherapy: prospective randomized controlled trial. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2019 Jul;48(7):917-923. doi: 10.1016/j.ijom.2018.12.006.
32. Okamoto M, Kasetani H, Kaji R, Goda H, Ohe G, Yoshida H, Sato M. cis-Diamminedichloroplatinum and 5-fluorouracil are potent inducers of the cytokines and natural killer cell activity in vivo and in vitro. *Cancer Immunol Immunother.* 1998 Dec;47(4):233-41. doi: 10.1007/s002620050526.
33. Pinheiro SL, Bonadiman AC, Borges Lemos ALDA, Annicchino BM, Segatti B, Pucca DS, Dutra PT, de Carvalho E Silva RM, Leal F. Photobiomodulation Therapy in Cancer Patients with Mucositis: A Clinical Evaluation. *Photobiomodul Photomed Laser Surg.* 2019 Mar;37(3):142-150. doi: 10.1089/photob.2018.4526.
34. Quintanilha JCF, Visacri MB, Sousa VM, Bastos LB, Vaz CO, Guarnieri JPO, Amaral LS, Malaguti C, Lima CSP, Vercesi AE, Moriel P. Cisplatin-induced human peripheral blood mononuclear cells' oxidative stress and nephrotoxicity in head and neck cancer patients: the influence of hydrogen peroxide. *Mol Cell Biochem.* 2018 Mar;440(1-2):139-145. doi: 10.1007/s11010-017-3162-2.
35. Raber-Durlacher JE, Elad S, Barasch A. Oral mucositis. *Oral Oncol.* 2010 Jun;46(6):452-6. doi: 10.1016/j.oraloncology.2010.03.012.
36. Rupel K, Zupin L, Colliva A, Kamada A, Poropat A, Ottaviani G, Gobbo M, Fanfoni L, Gratton R, Santoro M, Di Lenarda R, Biasotto M, Zacchigna S. Photobiomodulation at Multiple Wavelengths Differentially Modulates Oxidative Stress *In Vitro* and *In Vivo*. *Oxid Med Cell Longev.* 2018 Nov 11;2018:6510159. doi: 10.1155/2018/6510159.
37. Russi EG, Raber-Durlacher JE, Sonis ST. Local and systemic pathogenesis and consequences of regimen-induced inflammatory responses in patients with head and neck cancer receiving chemoradiation. *Mediators Inflamm.* 2014;2014:518261. doi: 10.1155/2014/518261.
38. Shimabukuro F, Neto CF, Sanches JA Jr, Gattás GJ. DNA damage and repair in leukocytes of melanoma patients exposed in vitro to cisplatin. *Melanoma Res.* 2011 Apr;21(2):99-105. doi: 10.1097/CMR.0b013e3283426839.
39. Sodhi A, Pai K, Singh RK, Singh SM. Activation of human NK cells and monocytes with cisplatin in vitro. *Int J Immunopharmacol.* 1990;12(8):893-8. doi: 10.1016/0192-0561(90)90008-b.
40. Sodhi A, Pai K. Increased production of interleukin-1 and tumor necrosis factor by human monocytes treated in vitro with cisplatin or other biological response modifiers. *Immunol Lett.* 1992 Dec;34(3):183-8. doi: 10.1016/0165-2478(92)90211-6.

41. Sonis ST. Pathobiology of mucositis. *Semin Oncol Nurs*. 2004 Feb;20(1):11-5. doi: 10.1053/j.soncn.2003.10.003.
42. Sonis ST. Pathobiology of oral mucositis: novel insights and opportunities. *J Support Oncol*. 2007 Oct;5(9 Suppl 4):3-11.
43. Sonis ST. The pathobiology of mucositis. *Nat Rev Cancer*. 2004 Apr;4(4):277-84. doi: 10.1038/nrc1318.
44. Sonis ST. Oral mucositis. *Anticancer Drugs*. 2011 Aug;22(7):607-12. doi: 10.1097/CAD.0b013e3283462086.
45. Tanaka T, Narazaki M, Masuda K, Kishimoto T. Regulation of IL-6 in Immunity and Diseases. *Adv Exp Med Biol*. 2016;941:79-88. doi: 10.1007/978-94-024-0921-5_4.
46. Van Wigcheren GF, De Haas N, Mulder TA, Horrevorts SK, Bloemendal M, Hins-Debreë S, Mao Y, Kiessling R, van Herpen CML, Flórez-Grau G, Hato SV, De Vries IJM. Cisplatin inhibits frequency and suppressive activity of monocytic myeloid-derived suppressor cells in cancer patients. *Oncoimmunology*. 2021 Jun 27;10(1):1935557. doi: 10.1080/2162402X.2021.1935557.
47. Villa A, Sonis ST. Mucositis: pathobiology and management. *Curr Opin Oncol*. 2015 May;27(3):159-64. doi: 10.1097/CCO.000000000000180.
48. Worthington HV, Clarkson JE, Bryan G, Furness S, Glenny AM, Littlewood A, McCabe MG, Meyer S, Khalid T. Interventions for preventing oral mucositis for patients with cancer receiving treatment. *Cochrane Database Syst Rev*. 2011 Apr 13;2011(4):CD000978. doi: 10.1002/14651858.CD000978.pub5.
49. Yao Y, Simard AR, Shi FD, Hao J. IL-10-producing lymphocytes in inflammatory disease. *Int Rev Immunol*. 2013 Jun;32(3):324-36. doi: 10.3109/08830185.2012.762361.
50. Yin K, Zhu R, Wang S, Zhao RC. Low level laser (LLL) attenuate LPS-induced inflammatory responses in mesenchymal stem cells via the suppression of NF- κ B signaling pathway in vitro. *PLoS One*. 2017 Jun 8;12(6):e0179175. doi: 10.1371/journal.pone.0179175.
51. Yuan A, Chen JJ, Yao PL, Yang PC. The role of interleukin-8 in cancer cells and microenvironment interaction. *Front Biosci*. 2005 Jan 1;10:853-65. doi: 10.2741/1579.
52. Zadik Y, Arany PR, Fregnani ER, Bossi P, Antunes HS, Bensadoun RJ, Gueiros LA, Majorana A, Nair RG, Ranna V, Tissing WJE, Vaddi A, Lubart R, Migliorati CA, Lalla RV, Cheng KKF, Elad S; Mucositis Study Group of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer/International Society of Oral Oncology (MASCC/ISOO). Systematic review of photobiomodulation for the management of oral mucositis in cancer patients and clinical practice

guidelines. *Support Care Cancer*. 2019 Oct;27(10):3969-3983. doi: 10.1007/s00520-019-04890-2.

53. Zitvogel L, Apetoh L, Ghiringhelli F, Kroemer G. Immunological aspects of cancer chemotherapy. *Nat Rev Immunol*. 2008 Jan;8(1):59-73. doi: 10.1038/nri2216.