



Fotobiomodulación por un nuevo dispositivo de fibra óptica: análisis del impacto in vitro sobre la proliferación / migración de queratinocitos y células de carcinomas de células escamosas estresadas por rayos X

Elodie Courtois¹ · Jean-Baptiste Guy^{2,3} · Fabrice Axisa¹ · Pierre Saint-Girons¹ · Laure Alston¹ · Narimène Houmera^{2,3} · René-Jean Bensadoun⁴ · Anne Visbecq¹ · Claire Rodriguez-Lafrasse² · Nicolas Magné^{2,3}

Received: 23 June 2020 / Accepted: 3 November 2020
© Springer-Verlag London Ltd., part of Springer Nature 2020

Abstract

Las terapias basadas en fotobiomodulación (basadas en PBM) muestran resultados prometedores en el tratamiento de la mucositis y la dermatitis al estimular los mecanismos de curación de heridas como la proliferación y migración celular. El objetivo del presente estudio es investigar los efectos in vitro de CareMin650 sobre la proliferación y migración de dos tipos diferentes de células, a saber, células cancerosas y no cancerosas, con o sin radiación de rayos X. El diseño del estudio utilizó PBM a través de una combinación de dosis de 0-3-6 J / cm², con o sin radiación de rayos X, sobre las capacidades de proliferación y migración de una línea celular de queratinocitos (HaCaT) y una línea de carcinoma de células escamosas (SCC61). El PBM se suministra mediante un nuevo dispositivo de fibra óptica tejida, el prototipo CareMin650 (emisión de luz mediante LED (diodos emisores de luz), pico a 660 nm, irradiancia de 21,6 mW / cm²). La eficacia de PBM para aumentar la proliferación y migración de HaCaT (con o sin radiación de rayos X) respalda la capacidad de PBM para favorecer la cicatrización de heridas. También destaca que PBM no proporciona ningún efecto anti-radiación a SCC previamente irradiado por rayos X (p <0,001). Dichos datos respaldan el efecto beneficioso de PBM administrado por un dispositivo de fibra óptica para curar heridas, sin promover el desarrollo del cáncer.

Keywords Photobiomodulation · Squamous cell carcinoma · Proliferation · Migration · Optical fiber · X-ray radiation

Introducción

La mucositis y la dermatitis debidas a terapias contra el cáncer son frecuentes (grado 1) y no tan frecuentes (grados 2-4). Su incidencia difiere de un paciente a otro según el tipo de cáncer y el tratamiento. La radiodermatitis afecta hasta al 95% de los pacientes con cáncer que reciben radioterapia [1]. De manera similar, hasta el 80% de los pacientes con cáncer de cabeza y cuello irradiados desarrollan mucositis oral [2]. Pueden afectar significativamente el bienestar del paciente

y ponen en peligro la eficacia del tratamiento cuando requieren interrupciones.

La fotobiomodulación (FBM) anteriormente llamada LLLT (terapia de luz de bajo nivel) consiste en la aplicación de una fuente de luz de bajo nivel sobre un tejido dañado para mejorar la reparación del tejido, disminuir la inflamación y finalmente reducir el dolor [3, 4]. La PBM ha demostrado en gran medida su eficacia tanto in vitro como en ensayos clínicos con respecto a la prevención y el tratamiento curativo de la mucositis y la dermatitis [5-9]. Más específicamente, PBM puede ser la clave para evitar lesiones inducidas por radioterapia en pacientes con cáncer de cabeza y cuello y de mama [10, 11]. La amplia gama de dispositivos y parámetros de la FBM hace difícil comparar los resultados con diferentes estudios. De hecho, muchos estudios in vitro carecen de informes adecuados de los parámetros del dispositivo, como la dosis precisa en la superficie del tejido biológico o la capa celular (J / cm²), la irradiancia en el objetivo administrada por el dispositivo (mW / cm²), o la duración y el número de sesiones de PBM [12, 13]. Para armonizar las prácticas, MASCC / ISOO (Asociación Multinacional de Atención de Apoyo en Cáncer y Sociedad Internacional de Oncología Oral) recomendó PBM a 650 nm, proporcionando una dosis de 2 J / cm² a los tejidos para

✉ Nicolas Magné
nicolas.magne@icloire.fr

¹ NeoMedLight SA, Villeurbanne, France

² Laboratoire de Radiobiologie Cellulaire et Moléculaire, Faculté de Médecine Lyon-Sud, Université Lyon 1, Oullins, France

³ Département de Radiothérapie, Institut de Cancérologie de la Loire, 108 bis, avenue Albert Raimond, BP 60008, 42270 Saint-Priest en Jarez cedex, France

⁴ Centre de Haute Energie, Nice, France

prevención de la mucositis [14]. Sin embargo, los dispositivos actuales no permiten una iluminación reproducible de los tejidos debido a la variabilidad entre operadores, especialmente debido a la distancia variable entre la fuente de luz y el tejido.

CareMin650 se ha creado para superar esta falta de reproducibilidad y precisión. La característica innovadora de CareMin650 es que las fibras ópticas están tejidas y conectadas a LEDs de alta potencia (LEDs OSLO SSL® 80 referencia LH CP7P). La ventaja de la tecnología es que la irradiancia suministrada en el lugar de aplicación es homogénea. Los tejidos están en contacto directo con la fuente de luz, lo que significa que la dosis emitida y la dosis recibida son las mismas.

Se ha demostrado que FBM actúa promoviendo la proliferación y la migración celular. Sin embargo, quedan dudas sobre el efecto de las FBM en las células cancerosas y / o en células previamente estresadas por la radiación ionizante. Estas incertidumbres pueden ser aún más relevantes con un dispositivo que emite luz al contacto de los tejidos.

Para abordar este importante problema, realizamos un estudio *in vitro* para investigar los efectos de CareMin650 sobre la proliferación y migración de dos tipos diferentes de células, a saber, células cancerosas y no cancerosas, con o sin irradiación por rayos X.

Métodos

Cultivo de células

Los experimentos se realizaron con células HaCaT y células SCC-61. HaCaT es una línea celular de queratinocitos transformada espontáneamente de piel humana adulta. El SCC es una línea celular de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC), derivada de un cáncer de lengua. Se obtuvieron de la American Type Culture Collection (ATCC, EE. UU.).

La línea celular HaCaT se cultivó en DMEN (medio Eagle modificado de Dulbecco) que contenía suero de ternero fetal (FCS) al 10%, penicilina-estreptomina al 1% y HEPES al 1%. La línea celular SCC-61 se cultivó en DMEN (medio Eagle modificado de Dulbecco) que contenía FCS al 10%, penicilina-estreptomina al 1% e hidrocortisona al 1%. Las células se mantuvieron en una incubadora estéril a 37 ° C en una atmósfera saturada de humedad y en presencia de 5% de CO₂.

Microscopía

Las células se sembraron en una placa de 96 pocillos durante un mínimo de 6 h. Las células se lavaron primero dos veces con PBS y luego se cubrieron con tripsina. Después de 5 min de incubación, se complementó el medio de cultivo. Después del recuento de células, las placas se dejaron en una incubadora a 37 ° C.

Irradiación ionizante

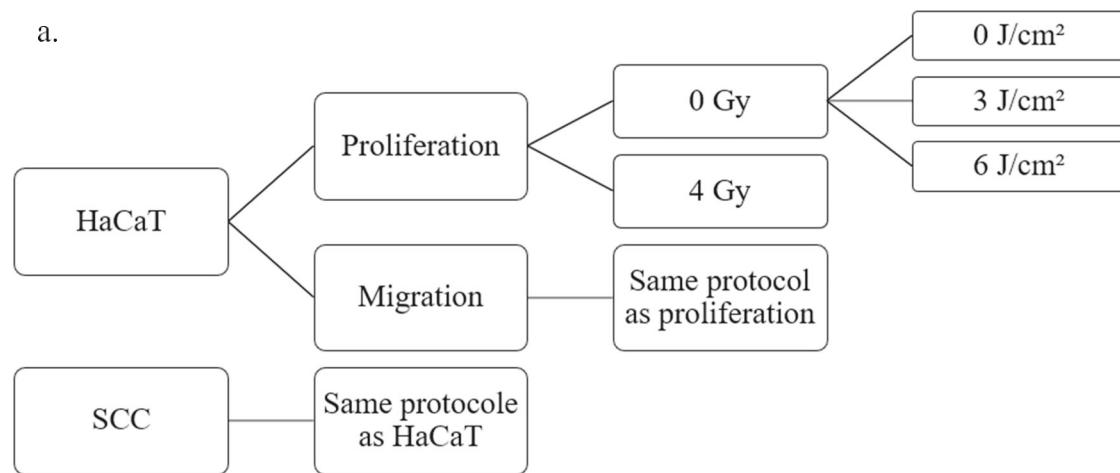
La irradiación ionizante se realizó utilizando un irradiador biológico XRAD 320 (Precision X-ray Inc., North Brandford, CT, EE. UU.). Las células se irradiaron a 4 Gy después de la formación de la placa. Los experimentos preliminares utilizaron 4 Gy como dosis óptima porque proporcionó un efecto relativamente significativo sobre la proliferación celular sin causar toxicidad. En las siguientes partes del artículo, la irradiación se refiere al uso de rayos X.

Fotobiomodulación

Las células se expusieron a PBM usando un prototipo CareMin650. Los parámetros de tratamiento se detallan en la Tabla 1. Las células se iluminaron desde abajo para que el tejido luminoso estuviera en contacto directo con el fondo de la placa de Petri. Se administraron tres dosis de iluminación una vez (0 J / cm², 3 J / cm² o 6 J / cm²), en dos condiciones de irradiación ionizante celular, a saber, sin irradiación (0 Gy) e irradiación (4 Gy). Esto llevó a la distribución de cada línea celular en 6 condiciones diferentes (mostradas en la Fig. 1): condición de celda n ° 1, es decir, control: sin irradiación y sin iluminación; n ° 2: sin irradiación / iluminación 3 J / cm²; n ° 3: sin irradiación / iluminación 6 J / cm²; n ° 4: irradiación 4 Gy / sin iluminación; n ° 5: irradiación 4 Gy / iluminación 3 J / cm²; y n ° 6: irradiación 4 Gy / iluminación 6 J / cm² (Fig. 1). La PBM se realizó 10 min después de la irradiación de rayos X. La irradiancia se midió con un espectrómetro modelo Qmini 2 Wide UV. La irradiancia en el sitio objetivo tuvo en cuenta la absorción de plástico del fondo de la placa de Petri. No se tuvo en cuenta la contaminación luminosa ya que el valor está por debajo del 3% de la irradiancia total, igual a la precisión del espectrómetro.

Tabla 1 Parámetros de tratamiento. Los datos se toman de la hoja de datos y de la medición experimental con un espectrómetro modelo Qmini 2 Wide UV. La irradiancia se ha calculado como un valor medio entre 6 puntos de medición en la almohadilla bucal. nm, nanómetro; mW, milivatios; s, segundo; J, julios; cm², centímetro cuadrado.

LED characteristics	Data	Unit
Longitud de onda	660	nm
Ancho de banda espectral al 50%	25	nm
Modo operativo	Continuous	
Potencia radiante típica por LED	355	mW
Área irradiada	1.7*2.6	cm ²
Irradiancia en el objetivo	21.6	mW/cm ²
Exposición / dosis radiante	3	6
Duración exposición	139	278
Número de aplicaciones FBM	1	/



b.

Cell condition	Irradiation X-rays (Gy)	Illumination PBM (J/cm ²)
1 (control)	0 Gy	0 J/cm ²
2	0 Gy	3 J/cm ²
3	0 Gy	6 J/cm ²
4	4 Gy	0 J/cm ²
5	4 Gy	3 J/cm ²
6	4 Gy	6 J/cm ²

Fig. 1 Diseño del experimento (a). Cada condición celular (b) se probó en la misma placa de Petri. La luz se emitió desde abajo. Cada condición se probó en 6 pozos, cada prueba se realizó por triplicado. En total, 18 datos

fueron recolectados por condición. Pierna; SCC, carcinoma de células escamosas; HaCaT, queratinocito no canceroso; Gy, gris; J, julios; cm², centímetro cuadrado

En las siguientes partes del artículo, la iluminación se refiere al uso de fotobiomodulación.

Ensayos de proliferación y migración

Los ensayos de proliferación se realizaron en placas de 96 pocillos (Essen BioScience ref. 353072). Se inocularon 3000 células por ml 6 h antes del tratamiento con FBM.

Cada grupo de orificios se trató de acuerdo con las 6 condiciones definidas por los parámetros de iluminación e irradiación. Las curvas de proliferación se construyeron a partir de la medición de la confluencia con un microscopio de video IncuCyte ZOOM® (Essen BioScience, Ann Arbor, MI, EE. UU.) a través de imágenes de células vivas. La confluencia de células se definió como el porcentaje de células que cubren el agujero. El valor de la confluencia celular se evaluó mediante la medición de la confluencia basada en 4 imágenes por agujero, tomadas cada 4 h, durante 7 días. Los ensayos de migración se realizaron en una placa

Image Lock de 96 pocillos (Essen BioScience ref. 4379). Se inocularon 35 000 células por ml (para la línea HaCaT) y 40000 células por ml (para la línea SCC) 6 h antes del tratamiento con PBM para obtener la mejor adhesión celular en la placa y permitir una adecuada formación de la herida. Cada grupo de agujeros se trató de acuerdo con las 6 condiciones diferentes definidas por los parámetros de iluminación e irradiación. Se realizó una lesión después de la irradiación y antes de la PBM, utilizando el dispositivo WoundMaker™ (Essen BioSciences). Diez minutos después de que se realizó la lesión, se administró PBM a las células. Las curvas de migración se construyeron a partir de la medición de la confluencia mediante un microscopio de vídeo IncuCyte ZOOM® (Essen BioScience, Ann Arbor, MI, EE. UU.) A través de imágenes de células vivas. Se trata de un vídeo microscópico potente y reproducible que dice [16] sobre la cicatrización de heridas. La confluencia de la herida corresponde a la densidad de las células que cubren la lesión. El valor de la migración se evaluó mediante la medición de la confluencia basada en 2 fotografías por agujero, tomadas cada 2 h, durante 3 días.

Análisis estadístico

La proliferación y la migración se describieron como porcentajes sobre la confluencia celular y la confluencia de la herida en los doce grupos predefinidos (6 grupos de HaCaT y 6 grupos de SCC). Las comparaciones se realizaron mediante la prueba de Mann-Whitney. Por un lado, se comparó cada grupo objetivo y el grupo de control (sin irradiación, sin iluminación). Por otro lado, se compararon los grupos de células irradiadas e iluminadas y los grupos de células no iluminadas irradiadas. El nivel mínimo de significancia se estableció en $p < 0.05$.

Resultados

HaCaT ensayo

A lo largo del estudio, la proliferación aumentó en las células iluminadas no irradiadas (3 J / cm² y 6 J / cm²) en comparación con el grupo de control. Pero la diferencia no fue estadísticamente significativa en ninguna de las condiciones investigadas y en ningún momento (Tabla 2 y Fig. 2a). La FBM administrada a 3 J / cm² aumentó ligeramente la proliferación de células HaCaT de 4 Gy en comparación con la ausencia de FBM, pero la diferencia no fue estadísticamente significativa (Tabla 2). Por el contrario, la FBM administrada a 6 J / cm² mejoró una proliferación similar para las células HaCaT de 4 Gy a ninguna FBM (Fig. 2a).

PBM a 6 J / cm² aumentó la migración de células HaCaT no irradiadas, mientras que no se observó ningún efecto a 3 J / cm² (Fig. 2b). Las diferencias entre 6 J / cm² y las células de control no fueron estadísticamente significativas, aunque el aumento de la proliferación de células HaCaT casi

alcanzó significación estadística (Tabla 2). El efecto de PBM no fue significativo sobre 4 Gy HaCaT (Tabla 2 y Fig. 2b).

SCC ensayo

Ningún SCC irradiado que recibió PBM a 3 J / cm² o 6 J / cm² proliferó más rápidamente que los del grupo de control. Sin embargo, la diferencia no fue estadísticamente significativa en ninguna de las condiciones investigadas en ningún momento (Tabla 3 y Figura 3a).

La proliferación disminuyó significativamente en las células de 4 Gy en comparación con el grupo de control a partir de las 72 h, independientemente de la iluminación. La proliferación de células de 4 Gy fue muy baja: después de 120 h, la confluencia celular fue de alrededor del 11% (Tabla 3). FBM a 3 o 6 J / cm² no aumentó la proliferación en comparación con las células de 4 Gy no iluminadas (Fig. 3a).

FBM a 6 J / cm² aumentó la migración de células SCC no irradiadas, mientras que no se observó ningún efecto a 3 J / cm² (Fig. 3b).

El efecto de PBM no fue significativo ni en 4 Gy SCC (Tabla 3 y Fig. 3b).

Discusión

La mucositis y la dermatitis representan un efecto importante de las terapias contra el cáncer. Su microambiente está formado principalmente por células de la epidermis, como los queratinocitos y, en algunos casos, células cancerosas restantes, todas ellas sometidas a estrés por la radiación ionizante [17]. FBM ha demostrado su eficacia en la prevención y curación de la mucositis y dermatitis. Sin embargo, el efecto de FBM en las células cancerosas restantes sigue sin estar claro.

Table 2 Proliferación y migración de células HaCaT expresada mediante la confluencia y los valores p (a). Pierna; IC95%, intervalo de confianza; vs, versus; Gy, gris; J, julios; cm², centímetro cuadrado; HaCaT, queratinocito no canceroso

HaCaT proliferation							
Hour	HaCaT	Control	3 J/cm ²	6 J/cm ²	4 Gy	4 Gy + 3 J/cm ²	4 Gy + 6 J/cm ²
48 h	Confluence (%)	23.4 ± 9.7	28.2 ± 11.7	28.6 ± 11.9	26.5 ± 12.2	29.3 ± 11.1	26.1 ± 11.3
	p value	vs Control	0.23	0.18	0.44	0.13	0.46
		vs 4 Gy				0.45	0.98
72 h	Confluence (%)	46.41 ± 18.7	57.2 ± 22.4	57.3 ± 21.5	43.6 ± 19.5	49.1 ± 20.3	43.9 ± 19.9
	p value	vs Control	0.10	0.074	0.44	0.93	0.44
		vs 4 Gy				0.35	0.84
120 h	Confluence (%)	87.8 ± 14	93.3 ± 12.7	90.5 ± 12.4	72.7 ± 22.1	80.6 ± 18.3	75.4 ± 20.2
	p value	vs Control	0.078	0.38	0.025	0.17	0.041
		vs 4 Gy				0.15	0.45
HaCaT migration							
Hour	HaCaT	Control	3 J/cm ²	6 J/cm ²	4 Gy	4 Gy + 3 J/cm ²	4 Gy + 6 J/cm ²
24 h	Confluence (%)	55.4 ± 21.7	52.4 ± 14.6	69.9 ± 22.7	63.4 ± 23.1	60.2 ± 21.1	63.3 ± 25.1
	p value	vs Control	0.94	0.059	0.17	0.48	0.34
		vs 4 Gy				0.49	0.62

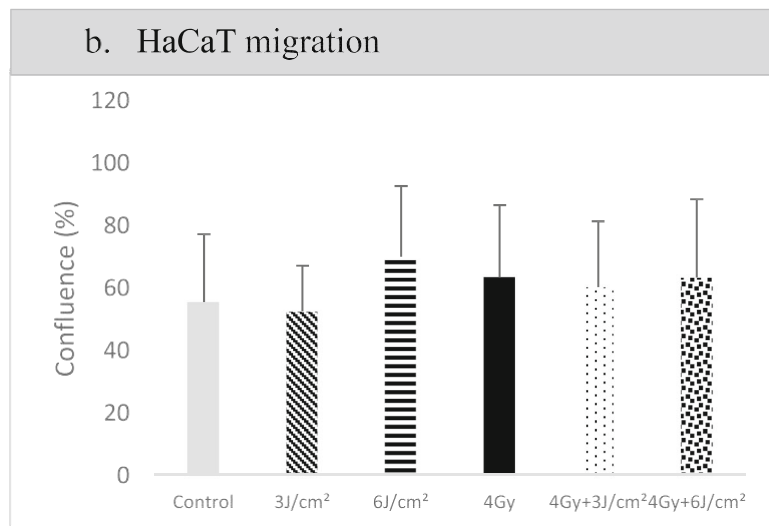
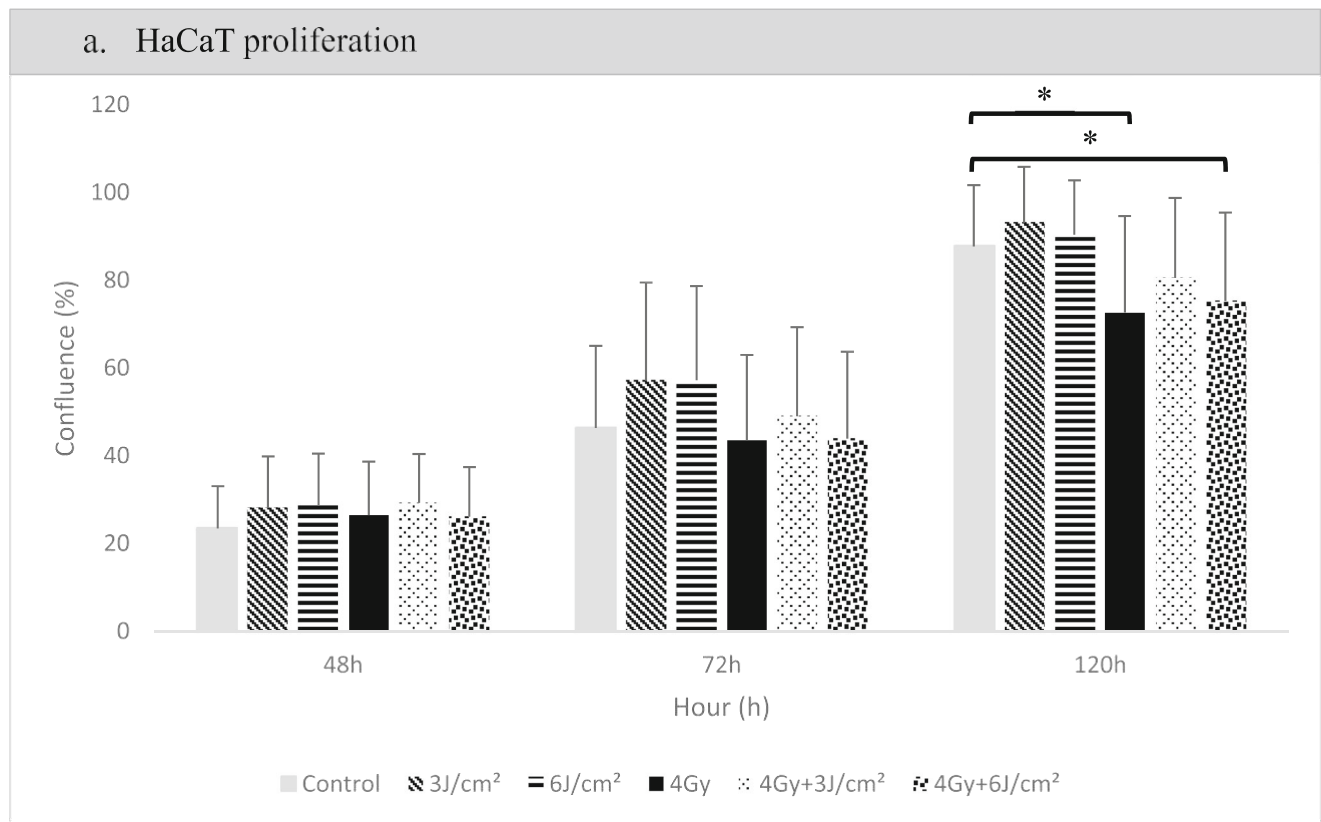


Fig. 2 Impacto de PBM sobre la proliferación de HaCaT a las 48 h, 72 h y 120 h (a) y la migración de HaCaT a las 24 h (b). La confluencia de HaCaT se evaluó en las siguientes 6 condiciones: control; 3 J / cm²; 6 J / cm², 4 Gy; 4 Gy + 3 J / cm², 4 Gy + 6 J / cm². Diferencias estadísticamente significativas se expresan como * p < 0,05, ** p < 0,01 y *** p < 0,001. Cada experimento se realizó por triplicado. Pierna; HaCaT, queratinocito no canceroso

[18]. En el presente estudio se seleccionaron un cierto número de parámetros: 3 dosis de PBM (0 J / cm², 3 J / cm² y 6 J / cm²), 2 condiciones de estrés (0 Gy, 4 Gy) y dos tipos de ensayos (proliferación y migración) para evaluar el impacto de estos factores en las respuestas de HaCaT y SCC.

Registramos que PBM favorece la proliferación y migración de queratinocitos (HaCaT). También encontramos que la proliferación de SCC tratados con IRR fue significativamente menor con PBM que en el grupo de control (0 Gy). En la literatura, solo se han realizado estudios en los que el dispositivo PBM emite entre 620 y 680 nm,

Table 3 SCC cell proliferation and migration expressed by mean of the confluence and *p* values (a). Leg: *CI95%*, confidence interval; *vs*, versus; *Gy*, gray; *J*, Joules; *cm²*, centimeter square; *SCC*, squamous cell carcinoma

SCC proliferation							
Hour	SCC	Control	3 J/cm ²	6 J/cm ²	4 Gy	4 Gy + 3 J/cm ²	4 Gy + 6 J/cm ²
48 h	Confluence (%)	8.1 ± 3.2	10.0 ± 5.2	9.3 ± 2.9	6.7 ± 2.8	6.7 ± 3.4	7.5 ± 3.1
	<i>p</i> value	vs Control	0.40	0.26	0.28	0.17	0.61
		vs 4 Gy				0.79	0.54
72 h	Confluence (%)	13.5 ± 5.6	16.4 ± 8.3	15.4 ± 4.9	8.6 ± 3.8	8.3 ± 4.3	9.4 ± 3.9
	<i>p</i> value	vs Control	0.50	0.29	0.016	0.0079	0.034
		vs 4 Gy				0.72	0.52
120 h	Confluence (%)	41.2 ± 18.8	51.3 ± 20.5	47.8 ± 13.4	10.9 ± 4.7	10.6 ± 5.4	11.8 ± 5.1
	<i>p</i> value	vs Control	0.17	0.21	<0.001	<0.001	<0.001
		vs 4 Gy				0.77	0.58
SCC migration							
Hour	SCC	Control	3 J/cm ²	6 J/cm ²	4 Gy	4 Gy + 3 J/cm ²	4 Gy + 6 J/cm ²
24 h	Confluence (%)	29.7 ± 9.9	30.1 ± 6.9	32.3 ± 12.8	27.8 ± 18.0	29.3 ± 18.6	27.7 ± 19.3
	<i>p</i> value	vs Control	0.88	0.64	0.23	0.29	0.18
		vs 4 Gy				0.81	0.98

utilizado para la comparación. Los parámetros de PBM de cada estudio mencionado se muestran en la Tabla 4.

El efecto de PBM sobre la proliferación y migración de queratinocitos se ha explicado a través de mecanismos celulares. Está razonablemente bien establecido que la luz roja es absorbida por la citocromo c oxidasa (Cco), un cromóforo ubicado en las mitocondrias. La activación de Cco provoca un aumento en la tasa de transferencia de electrones de la cadena respiratoria, lo que aumenta la producción de ATP (trifosfato de adenosina), ROS (especies reactivas de oxígeno) y NO (óxido nítrico) [15, 25-27]. El efecto de la luz roja en la promoción de la proliferación y la migración puede ser causado por la biodisponibilidad de ATP [4] y ROS [28, 29]. El ATP es energía, ingrediente para todas las reacciones biológicas [4]. La formación de ROS provoca un estrés oxidativo durante el cual se desequilibra la producción de ROS y la capacidad de un sistema biológico para desintoxicarlas [30]. Esas moléculas activan principalmente dos vías de señalización, NF-κB y AP-1, que generan una cascada de efectos posteriores implicados en la proliferación y la migración [31]. Por lo tanto, sobre una base teórica, parecería que PBM aumenta la proliferación y migración de células no cancerosas.

Los estudios *in vitro* también proporcionaron evidencia de que PBM promueve la proliferación y migración epidérmica [17, 19-23]. En células epidérmicas, Gagnon et al. informaron que la proliferación fue significativamente mayor después de PBM a 0,1-0,2 y 1,2 J / cm² que en un grupo de control, mientras que no se encontró ningún efecto a 10 J / cm² [19]. Liao y col. utilizó un láser que promovió significativamente la proliferación de células madre epidérmicas a 2 J / cm² en comparación con un grupo de control [17].

En células epidérmicas previamente irradiadas (IRR), la tendencia es similar en la literatura. Cuando se iluminaron fibroblastos IRR de 2,5 Gy con PBM a 90 J / cm² y 150 J / cm², la capacidad de proliferación fue significativamente mayor que en el grupo de control de 2,5 Gy no iluminado. Sin embargo, FBM a 30 J / cm² no fue eficaz para mejorar la proliferación después de la exposición a 2,5 Gy. Después de la exposición a 10 Gy, la FBM no estimuló la proliferación de fibroblastos [20]. Barasch y col. investigó si FBM a 4 J / cm² podría aumentar el número de células linfoblásticas humanas. Encontraron que el grupo iluminado con IRR tenía un número significativamente mayor de células en comparación con el IRR solo [23]. De hecho, resultó que PBM podría estimular la proliferación de células epiteliales sanas irradiadas y no irradiadas. Los estudios *in vitro* mostraron la influencia de PBM en la migración de queratinocitos [19, 21, 22]. Gagnon y col. evaluaron la influencia de la dosis de FBM sobre la proliferación de queratinocitos. Destacan que a las 24 horas, la migración aumentó significativamente con 0,1 J/cm², 0,2 J/cm² and 1.2 J/cm² en comparación con un grupo de control y con el grupo de 10 J / cm². Descubrieron que dosis más bajas de PBM eran más eficientes para promover la migración [19]. Además, Teuschl et al. probaron dosis más altas de PBM. Llegaron a la conclusión de que el tiempo hasta el cierre de los grupos de queratinocitos fue significativamente menor en el grupo de PBM (30 J / cm²) que en el grupo de control [21]. Finalmente, Fushimi et al. probaron y examinaron dosis más bajas de PBM. Su estudio reveló que las tasas de migración de HaCaT fueron significativamente más altas para las células iluminadas a 0,6 J / cm² que el grupo de control entre 0 y 24 h [22]. De hecho, PBM aumentó la migración de queratinocitos en la mayoría de los estudios.

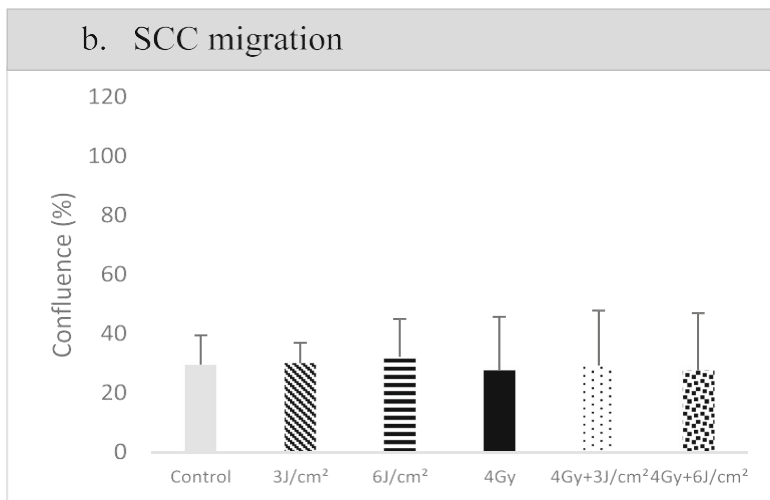
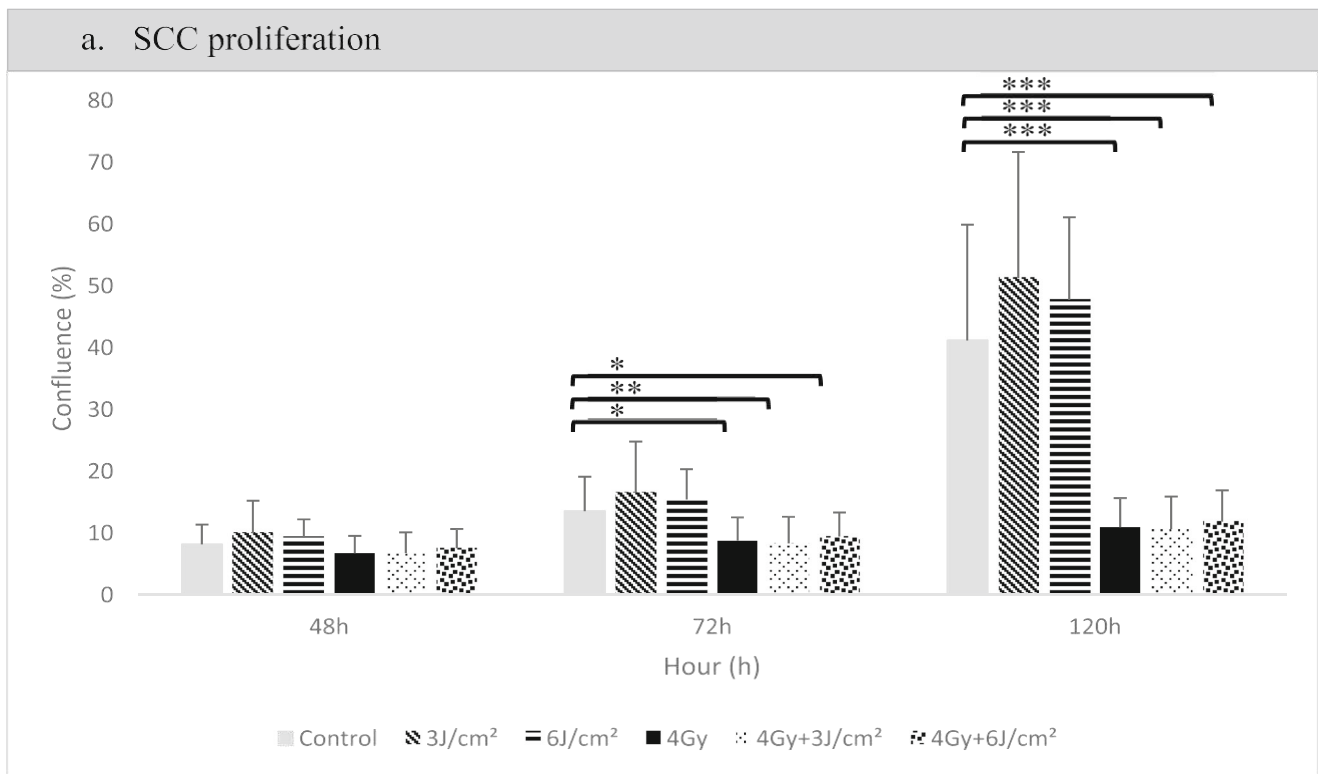


Fig. 3 PBM impact on SCC proliferation at 48 h, 72 h, and 120 h (a) and SCC migration at 24 h (b). The confluence of SCC was evaluated under the following 6 conditions: control; 3 J/cm²; 6 J/cm²; 4 Gy; 4 Gy + 3

J/cm²; 4 Gy + 6 J/cm². Statistically significant differences are expressed as * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$. Each experiment was performed in triplicate. Leg; SCC, squamous cell carcinoma

De acuerdo con estos hallazgos, nuestros datos experimentales demostraron la capacidad mejorada de proliferación y migración de HaCaT después de la iluminación por el dispositivo de fibra óptica, aunque ninguna de las diferencias fue estadísticamente significativa. A las 72 h, parecía que la proliferación de HaCaT sin IRR aumentaba con una dosis única de PBM a 3 J/cm² o 6 J/cm² ($p = 0,10$; $p = 0,07$ respectivamente).

Los resultados también destacaron que la proliferación de

IRR HaCaT parecía mayor a las 120 h después de PBM a 3 J/cm² ($p = 0,15$) que en el grupo de 4 Gy sin IRR. A las 24 h, la migración de HaCaT sin IRR aumentó para la línea HaCaT en comparación con el grupo de control después de PBM a 6 J/cm² ($p = 0,059$). En nuestro estudio, parece que 6 J/cm² fue más eficiente en promoviendo la migración de HaCaT de 3 J/cm² ($p = 0,94$). Esto puede sugerir que el efecto biológico depende de la dosis de FBM. De acuerdo con estudios previos, demostramos que PBM administrado por un dispositivo de fibra óptica podría mejorar la

Table 4 PBM parameters of each study mentioned in the discussion (study reference, PBM device, wavelength, type of cells, dose, time, power/irradiance, etc.). Leg: Gy, Gray; J, Joules; cm^2 , centimeter square; W, watt; nm, nanometer; cm, centimeter

Study reference	PBM device	Wavelength (nm)	Type of cells tested	Dose (J/cm ²)	Time (s)	Power or irradiance	Other parameters
Gagnon et al. 2016 [19]	He-Ne laser	650	Canine epidermal keratinocyte progenitors (CPEK)	0.1-0.2-1.2-10	2-2-4-8	0.5 W-1 W-3 W-12 W	Single exposure, continuous emission, spot size: 9.62 cm ² , distance 5 cm
Liao et al. 2014 [17]	He-Ne laser	632.8	Epidermal stem cells	2	80	25 mW	Single exposure
Ramos <i>et al.</i> 2016 [20]	GaAlAs laser	660	Human gingival fibroblasts, human breast cancer cells	30-90-150	30-90-150	40 mW	Irradiation: 2.5 Gy and 10 Gy Laser tip in direct contact with the plaque bottom Energy: 1.2 J-3.6 J-6 J Spot area Laser: 0.04 cm ² 5 consecutive days 10 cm distance from the light source
Teuschl et al. 2015 [21]	LEDS	630	BICR10 keratinocyte cell line	30	60	1 W, 50 mW/cm ²	
Fushimi et al. 2012 [22]	LEDS	638	Human lymphoblasts (TK6 cells), human leukemia cells (HL60)	0.6	1200	7.56 W 0.75 mW/cm ²	
Barasch et al. 2015 [23]	He-Ne laser	632.8	Human lymphoblasts (TK6 cells), human leukemia cells (HL60)	4	114	35 mW	Irradiation: 5 cGy gamma Light transferred to collimator with a 1 cm ² optical fiber flat to aperture Source at 3 cm
Kim et al. 2019 [24]	LEDS	633	Mesenchymal stem cells (MSC)	0.3-1-3-6	42-140-421-843	7.12 mW/cm ²	

la proliferación de células sanas después de la exposición a IRR o no, y que FBM favorece la migración de queratinocitos in vitro. La novedad de nuestro estudio es que la FBM fue administrada con un dispositivo médico de fibra óptica, en lugar de láseres o LED directo. Las diferencias entre las celdas iluminadas y no iluminadas no fueron estadísticamente significativas.

Se necesitan más experimentos para validar la tendencia observada. Un número limitado de estudios in vitro investigó la capacidad de las PBM para prevenir o mitigar los daños debidos a la irradiación ionizante [20, 23, 24, 32]. El efecto de PBM en las células cancerosas previamente estresadas por la radiación ionizante sigue sin estar claro, ya que los resultados del análisis bibliográfico de estos estudios son inconsistentes. Ramos y col. evaluaron el impacto de FBM en células de cáncer de mama humano irradiadas a 2,5 Gy y 10 Gy. Ninguna de las dosis de FBM tuvo influencia sobre la proliferación en comparación con el grupo de control 0 Gy [20]. Barasch y col. estudiaron la proliferación celular después de la exposición a rayos gamma (IRR) a 5 cGy. La proliferación de células de leucemia humana irradiadas se inhibió después de que PBM a 4 J / cm² se comparara con el grupo de control (0 Gy) [23]. Por último, Kim et al. demostraron que la FBM mejoró significativamente la proliferación de células madre mesenquimales de IRR, componentes críticos del ambiente tumoral [33] a 0.3 J / cm² y 1 J / cm² en comparación con el grupo de IRR. Se centraron en el impacto de la dosis de PBM en la proliferación de células IRR: cuando se administró PBM con una fluencia de 7,12 mW / cm², 3 J / cm² fue más eficaz para aumentar la proliferación celular que 6 J / cm² [24]. Con todo, no se puede encontrar ninguna tendencia en la literatura con respecto al efecto de FBM en las células IRR.

El presente estudio evaluó la proliferación después de la emisión de PBM en SCC previamente irradiado a 4 Gy. Encontramos que PBM en 4 Gy SCC no contrarresta el efecto terapéutico de la exposición a la radiación. De hecho, después de una exposición única a la radiación y una dosis única de PBM a 3 J / cm² y 6 J / cm², la proliferación de SCC se inhibió significativamente en comparación con el grupo de control a 0 Gy (p <0,05 a las 72 h y p <0,001 a las 120 h durante 3 J / cm² y 6 J / cm²). Nuestros resultados confirmaron un estudio en la literatura actual [23]. Sin embargo, los artículos sobre este tema siguen siendo contradictorios [20, 24]. El nivel de estrés de las células y, por extrapolación, el efecto de las PBM parecen depender de la dosis de la irradiación ionizante (dosis efectiva, dosis acumulada) [34].

Conclusión

En conclusión, este estudio fue pionero en la exploración de los efectos del PBM suministrado por un dispositivo de fibra óptica en las células cancerosas previamente irradiadas por rayos X. El resultado más interesante fue que PBM a 3 J / cm² y 6 J / cm² no aceleró la proliferación de IRR (4 Gy) SCC61 en comparación con las células IRR (4 Gy) no iluminadas. Dado que el número de estudios sobre PBM aplicados en células cancerosas previamente irradiadas es bajo, se deben recopilar más datos para validar aún más nuestros resultados. Este estudio también mostró la capacidad de FBM, administrado como una dosis única a 3 J / cm² o 6 J / cm², para mejorar la proliferación y migración de una línea de queratinocitos (HaCaT) con o sin irradiación. Cuando se extrapolan a la clínica, estos datos respaldan el efecto beneficioso del PBM administrado por un dispositivo de fibra óptica en la cicatrización de heridas, sin promover el desarrollo del cáncer. Sin embargo, se requiere precaución al extrapolar los datos. Actualmente, se está realizando un ensayo clínico para evaluar la viabilidad y seguridad de CareMin650 en pacientes con cáncer con alto riesgo de / o que padecen mucositis oral y / o dermatitis por radiación debido a la administración de radioterapia.

Authors' contributions Conceptualization: Fabrice Axisa, Elodie Courtois, Laure Alston, Pierre Saint-Girons; methodology: Jean-Baptiste Guy, Elodie Courtois, René-Jean Bensadoun; formal analysis and investigation: Elodie Courtois, Jean-Baptiste Guy, Narimène Houmera; writing—original draft preparation: Elodie Courtois; writing—review and editing: Fabrice Axisa, Nicolas Magné, Anne Visbecq; resources: full name; supervision: Claire Rodriguez-Lafresse, Pierre Saint-Girons.

Data availability HaCaT is a spontaneously transformed keratinocyte cell line from adult human skin. SCC is a head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) cell line, derived from a tongue cancer. These cell lines were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, USA).

Compliance with ethical standards

Conflict of interest Elodie Courtois (R&D Engineer), Fabrice Axisa (R&D Director), Pierre Saint-Girons (CEO), and Anne Visbecq (CMO) are employees of NeoMedLight. The authors declare that they have no other conflict of interest. The authors had full control of the primary data and agree to allow review of said data, if requested by the journal.

Code availability Not applicable.

Ethical approval Not applicable.

References

- Singh M, Alavi A, Wong R, Akita S (2016) Radiodermatitis: a review of our current understanding. *Am J Clin Dermatol* 17: 277–292. <https://doi.org/10.1007/s40257-016-0186-4>
- Maria OM, Eliopoulos N, Muanza T (2017) Radiation-induced oral mucositis. *Front Oncol* 7. <https://doi.org/10.3389/fonc.2017.00089>
- Sonis ST, Elting LS, Keefe D et al (2004) Perspectives on cancer therapy-induced mucosal injury: pathogenesis, measurement, epidemiology, and consequences for patients. *Cancer* 100:1995–2025. <https://doi.org/10.1002/cncr.20162>
- Zecha JAEM, Raber-Durlacher JE, Nair RG et al (2016) Low level laser therapy/photobiomodulation in the management of side effects of chemoradiation therapy in head and neck cancer: part 1: mechanisms of action, dosimetric, and safety considerations. *Support Care Cancer Off J Multinatl Assoc Support Care Cancer* 24:2781–2792. <https://doi.org/10.1007/s00520-016-3152-z>
- Bjordal JM, Bensadoun R-J, Tunèr J et al (2011) A systematic review with meta-analysis of the effect of low-level laser therapy (LLL) in cancer therapy-induced oral mucositis. *Support Care Cancer* 19:1069–1077. <https://doi.org/10.1007/s00520-011-1202-0>
- Migliorati C, Hewson I, Lalla RV et al (2013) Systematic review of laser and other light therapy for the management of oral mucositis in cancer patients. *Support Care Cancer* 21:333–341. <https://doi.org/10.1007/s00520-012-1605-6>
- Bensadoun R-J, Nair R (2012) Low-level laser therapy in the prevention and treatment of cancer therapy-induced mucositis: 2012 state of the art based on literature review and meta-analysis. *Curr Opin Oncol* 24:363–370. <https://doi.org/10.1097/CCO.0b013e328352eaa3>
- DeLand MM, Weiss RA, McDaniel DH, Geronemus RG (2007) Treatment of radiation-induced dermatitis with light-emitting diode (LED) photomodulation. *Lasers Surg Med* 39:164–168. <https://doi.org/10.1002/lsm.20455>
- Censabella S, Claes S, Robijns J et al (2016) Photobiomodulation for the management of radiation dermatitis: the DERMIS trial, a pilot study of MLS® laser therapy in breast cancer patients. *Support Care Cancer* 24:3925–3933. <https://doi.org/10.1007/s00520-016-3232-0>
- Zadik Y, Arany PR, Fregnani ER et al (2019) Systematic review of photobiomodulation for the management of oral mucositis in cancer patients and clinical practice guidelines. *Support Care Cancer* 27: 3969–3983. <https://doi.org/10.1007/s00520-019-04890-2>
- Robijns J, Lodewijckx J, Mebis J (2019) Photobiomodulation therapy for acute radiodermatitis. *Curr Opin Oncol* 31:291–298. <https://doi.org/10.1097/CCO.0000000000000511>
- Jenkins P, Carroll J (2011) How to report low-level laser therapy (LLL) photomedicine dose and beam parameters in clinical and laboratory studies. *Photomed Laser Surg* 29:785–787. <https://doi.org/10.1089/pho.2011.9895>
- Tunèr J, Jenkins PA (2016) Parameter reproducibility in photobiomodulation. *Photomed Laser Surg* 34:91–92. <https://doi.org/10.1089/pho.2016.4105>
- Lalla RV, Bowen J, Barasch A et al (2014) MASCC/ISOO clinical practice guidelines for the management of mucositis secondary to cancer therapy: MASCC/ISOO Mucositis Guidelines. *Cancer* 120: 1453–1461. <https://doi.org/10.1002/cncr.28592>
- Huang Y-Y, Sharma SK, Carroll J, Hamblin MR (2011) Biphasic dose response in low level light therapy—an update. *Dose-Response Publ Int Hormesis Soc* 9:602–618. <https://doi.org/10.2203/dose-response.11-009.Hamblin>
- Guy J-B, Espenel S, Vallard A et al (2017) Evaluation of the cell invasion and migration process: a comparison of the video microscope-based scratch wound assay and the Boyden chamber assay. *J Vis Exp JoVE*. <https://doi.org/10.3791/56337>
- Liao X, Xie G-H, Liu H-W et al (2014) Helium-neon laser irradiation promotes the proliferation and migration of human epidermal stem cells in vitro: proposed mechanism for enhanced wound re-epithelialization. *Photomed Laser Surg* 32:219–225. <https://doi.org/10.1089/pho.2013.3667>
- Hamblin MR, Nelson ST, Strahan JR (2018) Photobiomodulation and cancer: what is the truth? *Photomed Laser Surg* 36:241–245. <https://doi.org/10.1089/pho.2017.4401>
- Gagnon D, Gibson TWG, Singh A et al (2016) An in vitro method

19. to test the safety and efficacy of low-level laser therapy (LLLT) in the healing of a canine skin model. *BMC Vet Res* 12:73. <https://doi.org/10.1186/s12917-016-0689-5>
20. Ramos Silva C, Cabral FV, de Camargo CFM et al (2016) Exploring the effects of low-level laser therapy on fibroblasts and tumor cells following gamma radiation exposure. *J Biophotonics* 9: 1157–1166. <https://doi.org/10.1002/jbio.201600107>
21. Teuschl A, Rosado balmayor E, Redl H et al (2015) Phototherapy with LED light modulates healing processes in an in vitro scratch wound model using 3 different cell types. *Dermatol Surg* 41:261–268
22. Fushimi T, Inui S, Nakajima T et al (2012) Green light emitting diodes accelerate wound healing: characterization of the effect and its molecular basis in vitro and in vivo. *Wound Repair Regen* 20: 226–235. <https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2012.00771.x>
23. Barasch A, Raber-Durlacher J, Epstein JB, Carroll J (2016) Effects of pre-radiation exposure to LLLT of normal and malignant cells. *Support Care Cancer* 24:2497–2501. <https://doi.org/10.1007/s00520-015-3051-8>
24. Kim K, Lee J, Jang H et al (2019) Photobiomodulation enhances the angiogenic effect of mesenchymal stem cells to mitigate radiation-induced enteropathy. *Int J Mol Sci* 20. <https://doi.org/10.3390/ijms20051131>
25. Pastore D, Greco M, Passarella S (2000) Specific helium-neon laser sensitivity of the purified cytochrome c oxidase. *Int J Radiat Biol* 76:863–870. <https://doi.org/10.1080/09553000050029020>
26. Hamblin MR, Agrawal T, de Sousa M (2016) Chapter 10 Molecular Basis for photobiomodulation: light-induced nitric oxide synthesis by cytochrome c oxidase in low-level laser therapy. In: *Handbook of low-level laser therapy*. CRC Press, Boca Raton
27. Hamblin MR, Agrawal T, de Sousa M (2016) Chapter 16 Low-level laser (light) therapy for wound healing in animal models. In: *Handbook of low-level laser therapy*. CRC Press, Boca Raton
28. Day RM, Suzuki YJ (2006) Cell proliferation, reactive oxygen and cellular glutathione. *Dose-Response* 3:425–442. <https://doi.org/10.2203/dose-response.003.03.010>
29. Hurd TR, DeGennaro M, Lehmann R (2012) Redox regulation of cell migration and adhesion. *Trends Cell Biol* 22:107–115. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2011.11.002>
30. Hamblin MR, Agrawal T, de Sousa M (2016) Chapter 9 Role of reactive oxygen species in low-level laser therapy. In: *Handbook of low-level laser therapy*. CRC Press, Boca Raton
31. de Freitas LF, Hamblin MR (2016) Proposed mechanisms of photobiomodulation or low-level light therapy. *IEEE J Sel Top Quantum Electron Publ IEEE Lasers Electro-Opt Soc* 22. <https://doi.org/10.1109/JSTQE.2016.2561201>
32. Karu T, Pyatibrat L, Kalendo G (1994) Irradiation with He–Ne laser can influence the cytotoxic response of HeLa cells to ionizing radiation. *Int J Radiat Biol* 65:691–697. <https://doi.org/10.1080/09553009414550811>
33. CuiFFo BG, Karnoub AE (2012) Mesenchymal stem cells in tumor development. *Cell Adhes Migr* 6:220–230. <https://doi.org/10.4161/cam.20875>
34. Franken NAP, Oei AL, Kok HP et al (2013) Cell survival and radiosensitisation: modulation of the linear and quadratic parameters of the LQ model (review). *Int J Oncol* 42:1501–1515. <https://doi.org/10.3892/ijco.2013.1857>

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

