

JOÃO PAULO FIGUEIRÓ LONGO

**Avaliação da aplicação da Terapia Fotodinâmica mediada pela
Alumínio-Cloro-Ftalocianina em formulação lipossomal sobre
o Câncer Bucal em modelos experimentais *in vivo* e *in vitro*.**

Brasília

2008

JOÃO PAULO FIGUEIRÓ LONGO

**Avaliação da aplicação da Terapia Fotodinâmica mediada pela
Alumínio-Cloro-Ftalocianina em formulação lipossomal sobre
o Câncer Bucal em modelos experimentais *in vivo* e *in vitro*.**

Dissertação de mestrado apresentado ao programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular, da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, como parte integrante dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Patologia Molecular.

Orientadora: Profa. Dra. Silene Paulino Lozzi

Co-Orientador: Prof. Dr. Ricardo Bentes de Azevedo

Brasília

2008

Dedicatória

Aos meus adorados pais, Marco e Ana, por terem sido os exemplos máximos de amor, respeito, dignidade e educação aos seus filhos.

À Deus, e ao meu Anjo da Guarda por terem me guiado por toda a vida.

Agradecimentos

Aos meus orientadores, Profs. Ricardo e Silene, pela amizade, exemplo de sucesso profissional e competência. Sou extremamente grato pelos valiosos ensinamentos na investigação científica.

Aos Profs. Marcio Poças e Maria de Fátima por terem me apresentado ao incrível mundo da ciência, fico extremamente agradecido.

Ao Prof. Antônio Claudio Tedesco e sua equipe, em especial à Andrezza Simioni e Daniela Manfrim por terem gentilmente produzido e enviado as amostras utilizadas neste trabalho, além de ter compartilhado informações fundamentais para o desenvolvimento da dissertação.

Ao Prof. Albino pela atenção e ajuda na análise das lâminas histopatológicas.

Aos amigos de laboratório: Carol Valois, Cláudio, Érica, Grazi, Humberto, Itajaí, Juliana, Larissa, Maite, Nathália, Prof. Mônica, Patrícia, Sacha, Victoria, Jaqueline e Shélida pelos excelentes momentos de concentração e descontração vividos nos últimos anos.

Às amigas Érica e Nathália pela fundamental participação na criação deste projeto.

Aos colegas Djalma e Felipe, pelo companheirismo e solicitude em todos os momentos.

Aos Profs. Jaime e Anamélia pela coordenação do curso de pós-graduação em Patologia Molecular.

Aos funcionários da pós-graduação em Patologia Molecular pelo excelente trabalho na administração do curso.

A todos amigos e professores que de alguma forma contribuíram para a conclusão desta dissertação.

A Universidade de Brasília que ofereceu sua estrutura para a realização deste trabalho.

Aos órgãos de fomento: CNPq, CAPES, Fintec, FAP-DF pelo fundamental apoio financeiro.

Resumo

O tratamento atual para o câncer de boca é feito através de cirurgia, radioterapia, quimioterapia ou uma associação destas modalidades terapêuticas. Por promoverem graves efeitos adversos aos pacientes, constantes esforços são tomados no desenvolvimento de novos protocolos terapêuticos que possam substituir ou auxiliar os tratamentos convencionais. A Terapia Fotodinâmica (TFD) é uma alternativa que tem sido utilizada clinicamente com sucesso para o tratamento de tumores superficiais com efeitos colaterais mínimos. Esta dissertação teve como objetivo a avaliação da aplicação da TFD mediada pela Alumínio-Cloro-Ftalocianina (AlClFt) em formulação lipossomal sobre o Câncer de Boca em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*. Experimentos *in vitro* utilizando células derivadas de carcinoma epidermóide bucal humano (linhagem OSCC) demonstraram alta eficiência da TFD na destruição destas células tumorais. Para os experimentos *in vivo*, foram induzidos três diferentes modelos experimentais: (1) indução química pela aplicação tópica do carcinógeno 4-NQO na língua de camundongos *Swiss*; (2) injeção das células OSCC no subcutâneo dorsal de camundongos *nude-Balb/c*; (3) injeção de células derivadas do tumor de Ehrlich na língua de camundongos *Swiss*. A análise histológica dos três modelos experimentais mostrou que a TFD atua na destruição tumoral pela (1) indução de citotoxicidade direta às células tumorais e (2) pela promoção de efeitos lesivos nos vasos do microambiente neoplásico, que culminaria no desenvolvimento de necrose tumoral por hipóxia. Os resultados apresentados indicam excelentes perspectivas para a utilização da TFD mediada pela AlClFt em ensaios clínicos posteriores.

Abstract

Surgery, chemotherapy, radiotherapy or a combination of these three methods are common treatments for oral cancer. Although these protocols have demonstrated some effectiveness in oral cancer therapy, they can promote a series of side effects for patients during treatment. Alternatively for these traditional treatments, Photodynamic Therapy (PDT) has been used clinically for oral cancer and precancerous lesions treatment. The objective of this study was the evaluation of PDT mediated by Aluminum-Chlorine-Phtalocyanine (AlClPc) in different *in vitro* and *in vivo* oral cancer models. *In vitro* experiments showed PDT as a high cytotoxic treatment in oral squamous cell carcinoma cell line (OSCC). As animal model, three different tumor were induced: (1) 4-NQO carcinogenesis induction in Swiss mice tongue; (2) injection of OSCC cell line in dorsal subcutaneous Balb/c-*nude* mice; (3) Ehrlich tumor cell injection in *Swiss* mice tongue. Histopathological analyses showed that PDT produce a (1) direct cytotoxicity in tumor cells and (2) vascular damage that could produces hypoxia areas in tumor microambient. Taken together, the results indicated that PDT mediated by AlClPt has excellent perspectives to be applied in future clinical trials.

Lista de Abreviaturas e Siglas

1. 4-NQO - 4-nitroquinolina 1-óxido
2. AlClFt – Alumínio-Cloro-Ftalocianina
3. ANOVA – análise de variância
4. DMEM – *Dulbecco's modified Eagle's médium*
5. DNA – Ácido Desoxiribonucléico / *Desoxiribonucleic Acid*
6. EDTA – Ácido Etilenodiaminotetracético / *Ethylenediaminetetracetic Acid*
7. ERO – espécie reativa de oxigênio.
8. FS – fotossensibilizador
9. INCA – instituto nacional do câncer
10. MTT - (brometo de 3(4,5 dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil-tetrazólio)
11. OSCC -*Oral Squamous Cell Carcinoma*
12. PBS - Solução de Tampão Fosfato / *Phosphate Buffer Solution*
13. TFD – terapia fotodinâmica

Sumário

1. Introdução	1
1. 1. Câncer	2
1. 2. Câncer Bucal	3
1. 3. Tratamento para o Câncer Bucal	4
1. 4. Terapia Fotodinâmica	6
1. 4. 1. Mecanismos de ação fotoquímicos	7
1. 4. 2. Mecanismos Biológicos envolvidos na Terapia Fotodinâmica	8
1. 4. 3. Fármacos Fotosensibilizadores	11
1. 5. Modelos Experimentais para o estudo da Carcinogênese Bucal.	14
1. 5. 1. Modelo de Indução Química com o carcinógeno 4-Nitroquinolina 1-Óxido	15
1. 5. 2. Animais <i>nude</i> para indução de tumores	15
1. 5. 3. Injeção do tumor de Erlich em animais imunocompetentes	16
2. Objetivos	18
2. 1. Objetivo Geral	19
2. 2. Objetivos Específicos	19
3. Material e Métodos	20
3. 1. Formulação lipossomal de Alumínio-Cloro-ftalocianina	21
3. 2. Fonte de Laser	21
3. 3. Desenho Experimental	21
3. 4. Experimentos <i>in vitro</i>	22
3. 4. 1. Linhagem Celular	22
3. 4. 2. Manutenção da linhagem OSCC	22
3. 4. 3. Reagentes e Corantes utilizados nos experimentos <i>in vitro</i>	22

3. 4. 4. Preparação dos Experimentos	23
3. 4. 5. Aplicação da TFD <i>in vitro</i>	23
3. 4. 6. Teste Viabilidade Celular pelo método de Exclusão por Azul Tripán	24
3. 4. 7. Coloração com Alaranjado de Acridina e Brometo de Etídio	25
3. 4. 8. Viabilidade Celular pelo método de MTT	26
3. 4. 9. Avaliação morfológica das células OSCC	27
3. 5. Experimentos <i>in vivo</i>	
3.5.1. Aprovação Projeto Comitê de Ética	27
3. 5. 1. Animais Experimentais	28
3. 5. 2. 1. Camundongos Imunocompetentes	28
3. 5. 2. 2. Animais Imunossuprimidos	28
3. 5. 3. Modelos de Indução tumoral	29
3. 5. 3. 1. Modelo de indução tumoral química com o carcinógeno 4-NQO	29
3. 5. 3. 2. Modelo de indução tumoral com a linhagem OSCC	29
3. 5. 3. 3. Modelo de indução tumoral com a o Tumor Ascítico de Ehrlich	30
3. 5. 3. Aplicação da Terapia Fotodinâmica nos modelos animais	30
3. 5. 4. 1. Terapia Fotodinâmica <i>in vivo</i> – Modelo 4-NQO	30
3. 5. 4. 2. Terapia Fotodinâmica <i>in vivo</i> – Modelo OSCC (<i>nude</i>)	31
3. 5. 4. 3. Terapia Fotodinâmica <i>in vivo</i> – Modelo Tumor de Ehrlich	32
3. 6. Processamento Histológico	32
3. 6. 1. Processo de coloração para microscopia de luz	33
3. 7. Morfometria dos Tumores de Ehrlich	35
3. 8. Análise Estatística	36

3. 9. Descrição dos animais envolvidos nos diferentes modelos experimentais	36
4. Resultados	37
4. 1. Resultados experimentos <i>in vitro</i> - Aplicação da Terapia Fotodinâmica (TFD) na linhagem celular OSCC	38
4. 2. Resultados experimentos <i>in vivo</i>	40
4. 2. 1. Modelo 4-NQO	40
4. 2. 2. Modelo linhagem OSCC em camundongos <i>nude</i>	45
4. 2. 3. Modelo Tumor de Ehrlich em camundongos imunocompetentes	50
4. 2. 4. Efeitos vasculares da aplicação da Terapia Fotodinâmica	54
4. 2. 4. Efeitos adversos da aplicação da Terapia Fotodinâmica	55
5. Discussão	56
6. Conclusões	68
7. Referências Bibliográficas	70
8. Anexos (aprovação Comitê de Ética)	81

1 INTRODUÇÃO

1. Introdução

1. 1. Câncer

O câncer é hoje um dos principais problemas de saúde pública mundial. Dados epidemiológicos apontam as neoplasias malignas como terceira maior causa de morte do mundo, sendo a segunda entre as doenças (INCA, 2008). Estes dados promoveram uma espécie de corrida mundial para a “cura” do câncer. Grande parte dos atuais conhecimentos em biologia celular foi desenvolvida a partir de projetos com interesse em terapêutica para os tumores malignos.

O câncer é uma terminologia mundialmente conhecida para uma série de doenças que possuem em comum a hiperproliferação de populações celulares específicas, com potencial de invasão de tecidos próximos e/ou distantes. Em termos patológicos, o câncer é classificado como uma neoplasia maligna, ou seja, é o desenvolvimento de novos clones celulares com atividade proliferativa superior às das células vizinhas e com caráter de invasão e destruição tecidual adjacente acentuada (KNOWLES & SELBY, 2005).

Alguns autores descrevem o desenvolvimento do câncer como um processo micro evolutivo em escala celular, onde uma entre os bilhões de células do organismo humano desenvolve algum tipo de nova característica que permite uma atividade proliferativa superior às das células vizinhas frente às pressões contra-proliferativas do organismo. A regulação do número de células dentro dos tecidos é fortemente realizada tanto por mecanismos intracelulares, representados pelos mecanismos de indução de apoptose e reparação de DNA quanto por fatores de controle extracelular, como a supressão tumoral pelo sistema imune. A ocorrência de proliferações desordenadas como no caso do câncer ocorre pela falha na

regulação de algum destes mecanismos, ou pelo desenvolvimento de clones malignos que conseguem “escapar” destes mecanismos de regulação (MERLO et al.,2006).

As causas para o desenvolvimento de tumores malignos sempre estão correlacionadas com algum grau de instabilidade genética. Essa instabilidade pode decorrer de algum tipo de desordem genômica hereditária ou de alguma alteração promovida por causas e fatores ambientais. Os fatores ambientais que desencadeiam o processo de carcinogênese são denominados carcinógenos. Por sua vez, os carcinógenos são elementos químicos, físicos ou biológicos, aos quais expõem o indivíduo a riscos aumentados de desenvolvimento cancerígeno (SCULLY et al., 2000; TODD, et al., 1997).

O processo de carcinogênese foi classicamente dividido em três fases: (1) a iniciação, (2) a promoção e (3) a progressão da doença. Na fase de iniciação, as células são expostas aos carcinógenos, que podem promover algum tipo de alteração ou instabilidade genética. A fase de promoção é caracterizada pela seleção e proliferação de clones iniciados, através da expressão aumentada de genes relacionadas ao aumento da capacidade proliferativa. A fase promotora é marcada pela alteração das marcações genotípicas, ocorridas na iniciação, para uma caracterização fenotípica, com a presença de algumas marcações morfológicas das células. Na progressão tumoral, células pré-neoplásicas se desenvolvem em tumores por um processo de expansão clonal facilitado pelo aumento progressivo da instabilidade genética dessas células (HURSTING et al., 1999).

1. 2. Câncer Bucal

Lesões cancerígenas, localizadas na cavidade bucal, que incluem lábio, mucosa bucal, gengivas, palato duro, língua e assoalho da boca, estão entre as mais prevalentes formas de câncer na população brasileira e mundial. No Brasil, este tipo de neoplasia é a quarta mais

prevalente entre os homens e sétima mais prevalente entre as mulheres. Relatórios do Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2008), indicam que este tipo de câncer terá aproximadamente 10.000 novos casos diagnosticados por ano no país.

Acredita-se que as diferenças de incidência de tumores na cavidade bucal nas diferentes populações estão diretamente relacionadas aos diferentes graus de exposição de fatores de risco nesses grupos. A maior prevalência de homens com tumores bucais em relação às mulheres deriva de sua maior exposição a fatores de risco para o câncer bucal, como tabaco, álcool e radiação ultravioleta proveniente dos raios solares (LIU et al, 2008).

Os fatores de risco para o desenvolvimento de câncer bucal estão bem estabelecidos na literatura, sendo apontado o consumo excessivo de álcool e tabaco como os principais fatores etiológicos para o desenvolvimento dos tumores de mucosa e a exposição à radiação ultravioleta do sol para as neoplasias de lábio. Outros fatores como composição da dieta, infecções virais e fatores hereditários são também apresentados na literatura como potenciais fatores de risco. (SCULLY et al., 2000; SCIUBBA, 2001; KOJIMA, 2002).

Aproximadamente 90% das lesões malignas localizadas na cavidade bucal são carcinomas, tumores de origem epitelial, que podem ser identificados e tratados com maior facilidade em suas fases iniciais de desenvolvimento. O carcinoma epidermóide é o principal tipo de câncer da cavidade bucal e decorre da proliferação descontrolada de células epiteliais estratificadas da mucosa bucal (SILVERMAN, 2001; PEREIRA et al., 2007).

1. 3. Tratamento para o Câncer Bucal

O tratamento básico para os vários tipos de câncer bucal consiste na eliminação dos tecidos neoplásicos através de cirurgia, radioterapia, quimioterapia ou uma associação destas três modalidades terapêuticas. A decisão na escolha da modalidade terapêutica depende da

extensão, estadiamento tumoral, relação com estruturas anatômicas anexas, envolvimento de cadeia linfática, idade e cooperação do paciente, além do subtipo histológico de lesão (LUNG et al. 2007). Nesta publicação, os autores apresentaram a casuística do tratamento de mais de 1000 pacientes, no período de 1993 a 2002, atendidos com o diagnóstico de alguma modalidade de neoplasia maligna de cabeça e pescoço. A partir disso, os autores concluíram que: (1) o tratamento cirúrgico é a opção de escolha para os casos de carcinoma epidermóide nos seus estágios iniciais, sendo que em estágios mais avançados destas lesões, é recomendada a utilização adjuvante de quimioterapia ou radioterapia. (2) a recorrência dos tumores tratados depende principalmente do envolvimento de cadeia linfática e da extensão da lesão.

Apesar de apresentar bons resultados, essas terapias apresentam várias complicações pós-tratamento. Mesmo com procedimentos de reconstrução cirúrgica, uma das conseqüências após os tratamentos é a ocorrência de algum grau de desfiguração facial, promovendo graves defeitos estéticos e funcionais. Nesses casos, a qualidade de vida dos pacientes tratados é fortemente comprometida, gerando alterações psicológicas e emocionais fortes, afetando o seu grau de recuperação. Muitas vezes os pacientes tratados necessitam do acompanhamento de equipes multidisciplinares para a recuperação completa e retorno a vida cotidiana normal (CHANDU et al., 2006).

Em uma visão mais fisiológica, um largo espectro de efeitos adversos ao complexo maxilo-mandibular e estruturas anexas são detectados após os tratamentos tradicionais para câncer bucal. As manifestações ou complicações mais freqüentes a radioterapia são: mucosite, candidose, hipossalivação, cárie de radiação, disfagia (dificuldade de deglutir), perda do paladar, trismo muscular (contratura na contração), alterações vasculares e osteorradionecrose, como complicação mais grave (SANNOMIYA & FURUKAWA, 2000; ORD & BLANCHAERT, 2001). Uma exacerbação de infecções como as doenças periapical e

periodontal, e a mucosite severa podem, ocasionalmente, levar à necessidade de um ajuste do tratamento ou mesmo da interrupção da radioterapia ou quimioterapia, demonstrando que as complicações bucais devem ser prevenidas ou reduzidas ao mínimo.

Pela exigência de internações hospitalares e mobilização de grandes equipes multidisciplinares de apoio à saúde, o custo operacional para o tratamento de câncer bucal tem despertado interesse por parte dos pesquisadores e gestores em saúde. MENZIN et al. (2006) revisaram os aspectos econômicos da execução dos procedimentos para tratamento de câncer de cabeça e pescoço, que segue os mesmos padrões dos tratamentos do câncer de boca. Nesse estudo, os autores confirmam que o custo operacional para o tratamento do câncer de boca é diretamente proporcional à complexidade dos casos e ao tempo de internação necessário para a conclusão das terapias.

1. 4. Terapia Fotodinâmica

Tendo como base o cenário atual das possibilidades terapêuticas para o tratamento das neoplasias bucais, diversos estudos têm demonstrado a utilização da Terapia Fotodinâmica (TFD) como alternativa para o tratamento de lesões neoplásicas da cavidade bucal (BIEL, 2007;.CHEN et al., 2005). A grande vantagem na utilização desta terapia é a diminuição dos efeitos colaterais observados pós-tratamento em comparação com as outras modalidades terapêuticas. Além dos fatores biológicos favoráveis a esta terapia, a aplicação da TFD na perspectiva de saúde coletiva tem despertado grande interesse pelo seu custo operacional inferior quando comparado com o de tratamentos tradicionalmente utilizados como a cirurgia e quimioterapia, pois pode ser realizada em ambiente ambulatorial, dispensando em alguns casos as internações hospitalares (HOPPER et al., 2004).

1. 4. 1. Mecanismos de ação fotoquímicos

O princípio básico da TFD é a geração de agentes citotóxicos através da interação dinâmica entre um fármaco fotossensibilizador (FS) excitado por luz em comprimentos de onda específicos. A absorção de fótons pelos FSs gera a ativação destes fármacos, levando estas moléculas a situações de grande instabilidade química, com a mudança do padrão de organização eletrônica normal. A tendência natural de toda molécula com algum grau de excitação eletrônica é o retorno ao seu estado fundamental, pois este estado é energeticamente o mais favorável a qualquer molécula. O retorno da molécula à estabilidade é realizado pela emissão de energia na mesma intensidade da energia de absorção do fóton pelo fármaco FS.

A figura 1 descreve como a absorção de fótons emitidos por irradiação a laser pode levar a transformação do fármaco fotossensibilizador do seu estado fundamental a um estado excitado chamado de estado “*singlet*”. A partir desta transformação inicial, o FS pode retornar ao seu estado fundamental liberando a energia de excitação em forma de fluorescência ou calor, ou passar a outro estado de excitação menos instável denominado de estado “*triplet*”. Para a destruição tumoral, a forma “*triplet*” do FS gerada na reação pode interagir com qualquer biomolécula presentes no meio (reação Tipo I), que se torna excitada e pode reagir com o oxigênio do meio, formando íons peróxidos, superóxidos e radicais hidroxilas, gerando uma cascata de espécies reativas de oxigênio (EROs). Na reação tipo II, o FS excitado transfere sua energia diretamente para o oxigênio em seu estado fundamental, tornando-o excitado, o oxigênio “*singlete*”, também uma ERO (LUKISIENE, 2003).

As EROs são radicais livres com alta energia que podem reagir com praticamente qualquer molécula, levando a modificações químicas que impedem seu funcionamento normal. A geração de uma cascata de espécies reativas após a aplicação da TFD é o fator

fundamental para a citotoxicidade causada pela terapia devido a sua alta capacidade de interações com diferentes biomoléculas (CASTANO et al., 2005).

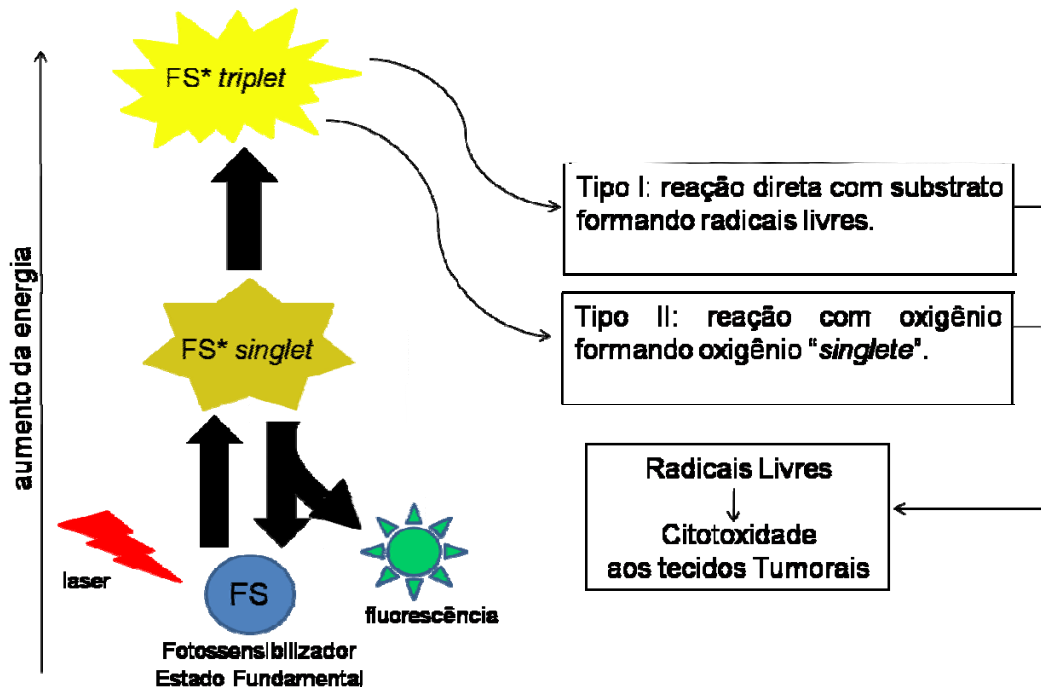


Figura 1: Desenho do funcionamento da reação fotoquímica presente na Terapia Fotodinâmica, onde está descrito a produção de radicais livres após a excitação do fármaco Fotossensibilizador (FS) com irradiação com laser.

1. 4. 2. Mecanismos Biológicos envolvidos na Terapia Fotodinâmica

DOLMANS et al. (2003) descrevem que a geração das espécies reativas de oxigênio (EROs) leva à destruição tumoral por três mecanismos biológicos principais: (1) destruição direta da massa tumoral pela ação das EROs, (2) alteração da vascularização tumoral, gerando áreas de hipóxia nas massas tumorais e (3) a ativação do sistema imunológico pela necrose e/ou apoptose que atuaria em uma fase secundária na redução da massa tumoral.

As EROs formadas após a aplicação da TFD são moléculas iônicas com alta atividade química e com potencial para reagir com qualquer biomolécula, visando a estabilização química destas espécies. Devido a pouca difusibilidade das EROs através dos compartimentos

celulares, os sítios celulares afetados pela TFD serão aqueles onde houve o acúmulo seletivo das drogas fotossensibilizadoras. Por sua vez, os sítios celulares onde há o acúmulo dos fármacos estão ligados às características físico-químicas de cada classe de drogas (DOUGHERTY et al., 1998).

O grande aporte de EROs, após a TFD promove uma série de alterações nas células tumorais. A morte celular dos clones tumorais pode derivar de mecanismos de apoptose e/ou necrose, dependendo das regiões subcelulares afetadas, além da intensidade do estímulo agressor (RELLO et al., 2005).

A morte celular caracterizada por necrose, em geral, está relacionada à presença de um agente agressor de alta intensidade. Nessas situações, os mecanismos básicos de defesa e escape celulares da morte são ineficientes devido à grande intensidade do estímulo agressor como o promovido pela formação de EROs após a aplicação da TFD. Uma das características marcantes da necrose são as alterações funcionais em diferentes regiões subcelulares, com especial atenção às membranas biológicas que provocam a liberação dos conteúdos celulares e conseqüente perda de viabilidade. Associada à destruição das membranas celulares, ocorre a liberação de fosfolipídios de membrana e, conseqüentemente, a geração de intenso processo inflamatório decorrente dos produtos gerados na via da lipooxigenase (RICH et al., 2000).

A apoptose é uma modalidade de morte celular que ocorre tanto em eventos fisiológicos quanto patológicos. Os eventos morfológicos observados em células em apoptose são a compactação nuclear, o empacotamento e liberação de fragmentos citoplasmáticos e de organelas em microvesículas envoltas em membrana plasmática, os corpos apoptóticos. A liberação dessas vesículas contendo material celular são fagocitadas pelas células vizinhas, desencadeando processos inflamatórios em menor intensidade quando comparados aos processos relacionados à necrose. A ocorrência de processos inflamatórios em menor proporção se refere a não-liberação de fosfolipídios de membrana. Na TFD esse processo de

via de morte celular ocorre em menor escala nos tecidos neoplásicos (BUYTAERT et al., 2007).

Assim, diversos estudos histológicos têm demonstrado que a aplicação da TFD promove a morte celular das células tumorais tanto por mecanismos de necrose quanto por mecanismos de apoptose. A caracterização destas duas modalidades de morte celular pode ser obtida a partir de análises morfológicas ou bioquímicas. Muitos trabalhos discutem as vantagens e desvantagens da ocorrência da morte celular tumoral preferencialmente por necrose ou por apoptose. Essa discussão se basearia na estimulação ou não do sistema imunológico. A morte celular por necrose estimularia mais a resposta imune, sendo que os eventos apoptóticos estimulariam menos essa resposta. O estímulo imunológico poderia gerar eventos inflamatórios clinicamente desfavoráveis aos pacientes, porém, estimularia o desenvolvimento de respostas imunes específicas contra os tumores tratados e promoveria a regulação do volume tumoral pela pressão imunológica contra os tumores (CASTANO et al., 2006).

O segundo mecanismo de controle tumoral pós-TFD consiste nas alterações vasculares observadas nas áreas do tumor promovidas pela terapia. Dentre os principais eventos descritos na literatura, citam-se a trombose e oclusão na microvasculatura tumoral. Esses eventos, em geral, promovem a diminuição e colapso do fluxo sanguíneo e conseqüente hipóxia tecidual das áreas tumorais supridas por estes vasos (KRAMMER, 2001). A presença de lesão do endotélio vascular, agregação plaquetária, aporte de células inflamatórias e necrose local são alguns dos fatores que potencializam o desenvolvimento dos eventos de trombose vascular após a aplicação da terapia fotodinâmica (BOBROV et al., 2007).

O terceiro mecanismo envolvido na destruição das massas tumorais é representado pela ação do sistema imunológico contra as células cancerígenas. Contrariamente às demais terapias contra o câncer, a TFD possui um efeito imunoestimulante. O desenvolvimento de

respostas imunológicas contra as células tumorais se encerra no aumento da apresentação antigênica promovida pela alta atividade das células imunológicas nos tumores tratados com a TFD. Alguns autores descrevem ainda um efeito de proteção antitumoral sistêmico quando há a utilização da TFD, advindo da seleção de linfócitos de memória contra os clones tumorais tratados no sítio primário do câncer (CASTANO et al., 2006).

1. 4. 3. Fármacos Fotossensibilizadores

Os fotossensibilizadores (FS) são os elementos principais na execução da TFD. Estas estruturas realizam a transferência de energia luminosa para gerar reações que culminam com a formação de uma série de espécies químicas altamente reativas, que por sua vez promovem a destruição das células-alvo. Diversos FSs têm sido desenvolvidos e testados clinicamente para serem utilizados na TFD. Classicamente, a literatura tem separado os grupos de FSs em gerações de fármacos de acordo com o período cronológico de desenvolvimento. Nessa lógica, podemos citar os fármacos de primeira geração desenvolvidos no final da década de setenta e início de oitenta, de segunda geração desenvolvidos na década de noventa e ainda FSs de terceira geração que seria referente a associações terapêuticas aos FSs, como imunoterapia ou radiofototerapia (DOUGHERTY, 1992).

Contrários a essa lógica cronológica de classificação, alguns autores (ALLISON et al., 2004) têm classificado os FSs de acordo com semelhanças químicas entre os fármacos, classificando-os em famílias de fotossensibilizadores. A justificativa para esta nova classificação é a falsa impressão de efetividade que a classificação em gerações poderia gerar. Na antiga classificação existia a impressão de que os fármacos de segunda geração seriam mais eficazes na TFD do que os de primeira geração, o que nem sempre é verdadeiro.

Seguindo esta nova lógica, os FSs foram classificados em três grandes famílias (Tabela 1). Na descrição da Tabela 1, apenas alguns representantes de cada família são apresentados.

Tabela 1: Famílias de fotossensibilizadores com seus precursores químicos e as formulações comerciais. Adaptado de ALLISON et al., 2004.

Família	Precursor Químico	Nome Comercial
Porfirinas	Derivados de hematoporfirina	Photofrin®
	ALA	Levulan®
	Vertiporfirina	Visudyne®
Clorinas	Temoporfina	Foscan®
	Talaprofin	LS11®
	HPPH	Photochlor®
Ftalocianina	Alumínio-Sulfonada-Ftalocianina	Photosens®

A escolha de um FS para a utilização na TFD envolve uma complexa análise de características até que se possa determinar qual a melhor opção para a execução da TFD. Dentre os pontos a serem analisados, podemos citar: a toxicidade e carcinogenicidade dos fármacos; a seletividade pelas células alvo; possíveis efeitos adversos decorrentes de exposição à luz branca, via de administração, custos, capacidade de eliminação das drogas, comprimento de onda para ativação e efetividade clínica. A análise de todos estes fatores muitas vezes se torna complexa, porém estes valores devem ser pesados e um fator de efetividade calculado subjetivamente para justificar a escolha de um FS entre as várias opções terapêuticas (CASTANO et al., 2005).

Entre as famílias de FSs, as ftalocianinas têm despertado grande interesse da comunidade científica. Estudos clínicos e pré-clínicos envolvendo ftalocianinas têm apresentado resultados promissores para aplicação na TFD. Como grandes vantagens, as

ftalocianinas são ativadas por luz em comprimentos de onda elevados (650-750 nm), o que confere maior poder de penetração, além de apresentarem baixa toxicidade quando empregada na TFD (ALLISON et al., 2004).

Outra importante característica desta classe de FS é sua hidrofobicidade. Devido a esta característica química, estes fármacos necessitam ser incorporados a sistemas de liberação de drogas específicos para que possam circular através do plasma sanguíneo. Um dos sistemas de liberação descritos para o carreamento de fármacos lipossolúveis são os lipossomas. Essas estruturas são pequenas vesículas formadas por paredes fosfolipídicas contendo um compartimento aquoso no seu interior. Desta forma, esse sistema pode carrear tanto estruturas lipofílicas (na parede) quando hidrofílicas (interior) (SIBATA et al., 2004).

Além da capacidade de fluir livremente pelo plasma sanguíneo, a associação de ftalocianinas com lipossomas apresenta outras vantagens, como sua maior captação pelas células tumorais. A estrutura do lipossomo pode ser modificada pela adição de algumas substâncias como colesterol. A presença deste lipídio na parede do lipossoma tende a aumentar a captação dos fármacos pelos tecidos tumorais. Esse aumento se refere ao fato de existir um aumento de receptores de membrana com afinidade para colesterol. Esta afinidade química permite que haja uma maior captação de FS pelas células neoplásicas (OLIVEIRA et al., 2006).

Estudos nosso grupo (TAPAJÓS et al., 2008) demonstraram a alta efetividade da Alumínio-Cloro-Ftalocianina na destruição de células em cultura derivadas de Carcinoma Epidermóide Bucal Humano. Nesse mesmo estudo, foi descrita a baixa toxicidade do FS quando aplicado às células em cultura sem que houvesse a iluminação com laser.

1. 5. Modelos Experimentais para o estudo da Carcinogênese Bucal.

A avaliação de eficiência de um protocolo terapêutico para o tratamento do câncer é extremamente complexa e envolve diversas etapas de avaliação até que se comprove a sua efetividade clínica. A utilização de modelos animais experimentais para a avaliação destas terapias é uma dos passos fundamentais para o estabelecimento de ensaios clínicos em seres humanos. Um modelo experimental é uma tentativa de se mimetizar o desenvolvimento e o comportamento de uma doença humana em cobaias animais. Boa parte do conhecimento sobre a biologia das neoplasias malignas foi desenvolvida a partir destes modelos experimentais. Entender os mecanismos biológicos envolvidos na progressão do câncer é fundamental para melhorar o prognóstico dos pacientes afetadas, bem como na elaboração de novos protocolos terapêuticos (MOGNETTI et al., 2006).

Diversos modelos experimentais têm sido propostos para o estudo do câncer bucal. Certamente não existem modelos animais perfeitos para este propósito, porém cada uma possui vantagens e desvantagens dentro de uma abordagem investigativa. Talvez o modelo animal mais próximo com o comportamento do câncer humano seja a utilização de tumores com desenvolvimento espontâneo em animais. Contudo, esse tipo de amostragem é bastante rara, dificultando a planejamento experimental. Desta forma, a indução artificial de neoplasias bucais é essencial para o progresso da pesquisa do câncer de boca (MOGNETTI et al., 2006).

Os protocolos de indução química, o transplante de células tumorais e a utilização de animais imunologicamente comprometidos são os modelos para o estudo do câncer bucal mais comuns da literatura. A escolha de determinado modelo deve ser baseada no seu objetivo de estudo, onde as vantagens serão ressaltadas e os defeitos do modelo experimental serão minimizados.

1. 5. 1. Modelo de Indução Química com o carcinógeno 4-Nitroquinolina 1-Óxido

O 4-nitroquinolina 1-óxido (4-NQO) é um carcinógeno amplamente utilizado para a obtenção de tumores bucais em camundongos. O 4-NQO gera um potente poder oxidante dentro do ambiente celular, gerando uma série de danos ao material genético. Os efeitos genotóxicos relacionados a este carcinógeno geralmente estão localizados nos sítios que possuem guanina, efeito muito semelhante ao promovido pelas substâncias presentes no tabaco. Como a base genética do desenvolvimento tumoral pelo 4-NQO é bastante semelhante à indução de tumores pelo tabaco, tanto o perfil de marcadores quanto a histopatologia dos tumores são similares. A semelhança no comportamento biológico dos tumores experimentais é a principal vantagem da utilização do modelo 4-NQO para a obtenção de tumores de boca. Os estágios clássicos da carcinogênese, indução, promoção e progressão, podem ser estudados neste modelo experimental. Como grandes desvantagens, temos o longo tempo para a obtenção de animais com tumores de boca e o percentual de desenvolvimento relativamente baixo dentro de um grupo de animais (KONOJIA & VAIDYA, 2006).

1. 5. 2. Animais *nude* para indução de tumores

O transplante de células tumorais para animais imunodeficientes é um método amplamente utilizado na literatura para a obtenção de modelos experimentais em câncer. A utilização de camundongos *nude* é o método mais antigo no desenvolvimento de tumores em animais imunologicamente deficientes.

Os *nude*, são uma forma mutante de camundongos desenvolvidos de forma naturalmente no final da década de 60. Estes mutantes são homocigotos recessivos (*nu/nu*) para o gene *nude*, esse gene expressa fatores transcricionais para o desenvolvimento do timo,

além de algumas proteínas relacionadas à ancoragem de pelos. A expressão fenotípica desta característica recessiva produz um animal atímico e desprovido de pelagem. A falha no desenvolvimento do timo impede a maturação dos linfócitos T, o que caracteriza toda a imunodeficiência destes animais (MECKLENBURG et al., 2005).

O poder de desenvolvimento de tumores nos animais *nude* é explicado pela ausência de linfócitos T maturados, célula fundamental para a vigilância imunológica contra populações celulares estranhas. A literatura apresenta um vasto número de estudos com a transferência de células tumorais provenientes tanto de biópsias, quanto de culturas celulares imortalizadas em cultura. KELLAND (2004) descreveu extensa revisão sobre a utilização de camundongos atímicos em ensaios de protocolos antitumorais. Nesse artigo, o autor descreve que aproximadamente 45% dos protocolos terapêuticos testados neste modelo animal, possuem correlação positiva quando testada em humanos.

As grandes vantagens de se utilizar esse modelo experimental é a produção de “enxertos” tumorais nos animais, mimetizando assim o mesmo comportamento biológico do tumor inserido no animal. Em contrapartida, como se trata de um animal imunocomprometido, as pressões exercidas pelo sistema de vigilância são praticamente ausentes, o que dificulta a sua comparação com o comportamento da doença em humanos.

1. 5. 3. Injeção do tumor de Erlich em animais imunocompetentes

O tumor de Ehrlich é primariamente um adenocarcinoma mamário de desenvolvimento espontâneo no camundongo fêmea, tendo sido isolado e transplantado para outros camundongos. Atualmente, esse tumor é mantido em suspensão no peritônio de camundongos, sendo considerada a forma ascítica do tumor. Estas células tumorais têm sido utilizadas para o desenvolvimento de tumores experimentais em camundongos tanto na forma

ascítica quanto na forma sólida, com indução dos tumores subcutâneos ou musculares (LOVE et al., 1996).

Por apresentar um padrão de crescimento rápido e a capacidade de desenvolvimento massas tumorais, mesmo em animais imunocompetentes, esse modelo experimental tem se mostrado rápido e barato para a investigação científica. Em contrapartida, por ser um tumor derivado de um adenocarcinoma mamário, a comparação do comportamento biológico deste modelo experimental fica comprometida.

2 OBJETIVOS

2. Objetivos

2. 1. Objetivo Geral

O objetivo desta dissertação foi avaliar a efetividade da Terapia Fotodinâmica mediada pela Alumínio-Cloro-Ftalocianina em formulação lipossomal em modelos experimentais para câncer de boca *in vitro* e *in vivo*.

2. 2. Objetivos Específicos

1. Avaliar sobre a linhagem celular OSCC, derivada de um carcinoma epidermóide bucal humano a eficiência da Terapia Fotodinâmica mediada por Alumínio-Cloro-Ftalocianina.
2. Obter modelos experimentais que mimetizem o câncer de boca em camundongos imunocompetentes (*Swiss*) e imunocomprometidos (*nude*-Balb/c).

Nos camundongos imunocompetentes, obter:

- Tumores de língua após a aplicação tópica do carcinógeno 4-NQO no ventre de língua;
- Tumores de língua após a injeção de células derivadas do tumor ascítico de Ehrlich na musculatura lingual.

Nos camundongos imunossuprimidos, obter:

- Tumores dorsais após a injeção da linhagem celular OSCC no subcutâneo dos camundongos nude-Balb/c.
3. Avaliar a eficiência da Terapia Fotodinâmica mediada pela Alumínio-Cloro-Ftalocianina nos modelos *in vivo* por meio de avaliação clínica e histopatológica dos tumores tratados.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3. Material e Métodos

3. 1. Formulação lipossomal de Alumínio-Cloro-ftalocianina

Amostra de ftalocianinas lipossomais (AlClPc – alumínio-cloro-ftalocianina), na concentração de 5 μM , gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Antônio Cláudio Tedesco – USP/ Ribeirão Preto, foram utilizadas nos experimentos deste trabalho.

3. 2. Fonte de Laser

Laser Diodo (BWF -Tech in), comprimento de onda de 670 nm, acoplado a fibra ótica, com potência de 80 mW. Para os experimentos *in vitro*, foi utilizada um energia total de 24 J/cm^2 e para os experimentos *in vivo* uma energia de 100 J/cm^2 .

3. 3. Desenho Experimental

As relações entre os experimentos realizados nessa dissertação pode ser identificada a partir do esquema seguinte:

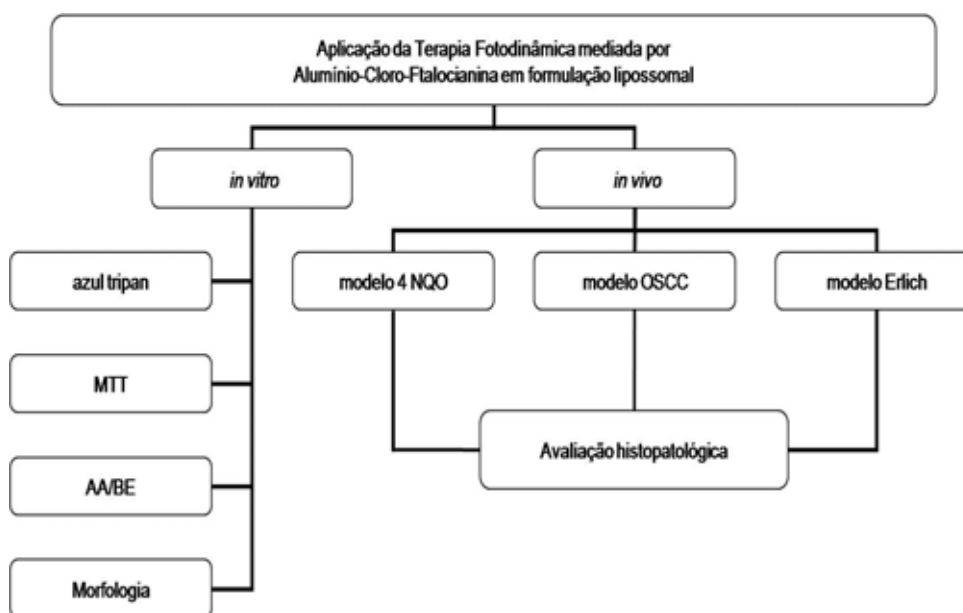


Figura 2: Desenho experimental dos ensaios realizados nesta dissertação.

3. 4. Experimentos *in vitro*

3. 4. 1. Linhagem Celular

Foi utilizada a linhagem celular OSCC (*Oral Squamous Cell Carcinoma*), imortalizada em cultura a partir de um Carcinoma Epidermóide Bucal Humano.

3. 4. 2. Manutenção da linhagem OSCC

As culturas celulares foram mantidas em meio de cultura DMEM (GIBCO-BRL), suplementado com soro fetal bovino a 10% e Penicilina / Estreptomicina a 10. 000 µg/mL (Gibco, USA), na proporção 1 mL do antibiótico para cada 100 mL de meio em pH 7,4. Os frascos de cultura foram mantidos a 37°C em atmosfera de 5% CO₂ e 80% de umidade.

3. 4. 3. Reagentes e Corantes utilizados nos experimentos *in vitro*

Tripsina-EDTA (0,125% de tripsina e 0.02% de EDTA - Gibco, USA); azul tripan (Sigma); PBS (Phosphate Buffer Solution - Solução de Tampão Fosfato - Sigma); alaranjado de acridina (VETEC); brometo de etídio (VETEC); metanol (Merk); Geimsa (Merk); violeta de cresil (Merck).

3. 4. 4. Preparação dos Experimentos

Partindo-se inicialmente de uma garrafa para cultura de células contendo uma monocamada de células confluentes, outras garrafas foram preparadas retirando-se o meio de cultura e adicionando-se 1mL de solução de tripsina-EDTA, uma protease inespecífica, para o destacamento das células aderidas ao fundo do frasco de cultura. Após 60 segundos de agitação no tratamento com a tripsina as células foram retiradas do frasco de cultura e depositadas em tubos do tipo Falcon de 15 mL. Imediatamente após esse procedimento, foram adicionado 5 mL de meio de cultura com soro fetal bovino para a neutralização da protease.

A suspensão celular obtida foi centrifugada por 5 minutos a 1000 rpm para formar um precipitado de células (estes valores foram também padronizados para todas as centrifugações executadas). O sobrenadante foi removido e as células ressuspensas em meio de cultura novo. Após, foram contadas em câmara de Neubauer e repicadas para placas de cultura de 6, 12 ou 96 poços de acordo com cada experimento. Todas as passagens celulares foram realizadas 24 horas antes dos procedimentos experimentais, para que houvesse a estabilização e adesão celular ao fundo das placas de cultura. Para as placas de 6, 12 ou 96 poços foram passadas respectivamente 10^6 , 10^5 , 10^4 células. Todos os procedimentos foram realizados em câmara de fluxo laminar, cuja luz ultravioleta permaneceu ligada por 30 a 40 minutos antes do uso.

3. 4. 5. Aplicação da TFD *in vitro*

Os experimentos *in vitro* foram planejados com 4 grupos experimentais: (1) controle; (2) Alumínio-Cloro-Ftalocianina; (3) Terapia Fotodinâmica; (4) Laser. O grupo experimental

de maior interesse foi o da Terapia Fotodinâmica (3), que consistia no tratamento das culturas celulares com solução liposomal de Alumínio-Cloro-Ftalocianina em uma concentração de 5 μM . Após 30 minutos de exposição em estufa de cultivo celular, a solução fotossensibilizadora foi descartada e uma solução de PBS estéril foi aplicada nos poços para que fosse procedida a aplicação de laser.

Como controle desse grupo experimental, os demais grupos foram organizados. O controle negativo (1) foi aquele em que as células não foram submetidas a nenhum tratamento, sendo mantidas em estufa de cultivo com solução de PBS estéril durante todo o procedimento. O grupo tratado com AlClFt (2) foi semelhante ao grupo tratado com TFD, porém não houve iluminação com laser. E finalmente, o grupo tratado somente com laser (4) era semelhante ao grupo controle (1), porém recebeu iluminação com laser na mesma intensidade e comprimento de onda que o grupo tratado com TFD.

Após 24 horas da execução destes procedimentos, as placas de cultura foram processadas para os diferentes ensaios experimentais. Todos os experimentos foram conduzidos em triplicata, ou seja, no mínimo três poços de tratamento para cada grupo experimental em cada experimento.

3. 4. 6. Teste Viabilidade Celular pelo método de Exclusão por Azul Tripán

Esse teste de viabilidade tem como princípio a detecção de células com perda de integridade de membrana citoplasmática sendo, assim, consideradas inviáveis. Para isso, às suspensões celulares foi adicionado o corante azul tripan, que tem por característica penetrar apenas as células que tenham perda na continuidade de membrana. Para tanto, foi feita a ressuspensão de uma amostra (10 μL) da suspensão de células de cada poço, aos quais eram adicionados 40 μL do corante azul tripan. Dez μL desta mistura foram levados à câmara de

Neubauer e o número de células viáveis (não coradas) e não viáveis (coradas em azul) foi determinado.

Para a determinação do número de células na câmara de Neubauer foi obtida a média do número de células contadas nos quatro quadrantes, multiplicando-se o resultado pelo fator de diluição e, este produto, por 10^4 , como pode ser visto a seguir.

$$\text{N}^\circ \text{ de células por mL} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de células 4 quadrantes}}{4} \times \text{fator de diluição} \times 10^4$$

4

Um número absoluto de células por mililitros é obtido neste ensaio. A média da contagem de 3 poços em cada grupo 24 horas após os diferentes tratamentos leva ao resultado obtido deste experimento.

3. 4. 7. Coloração com Alaranjado de Acridina e Brometo de Etídio

Este ensaio consiste em um teste de viabilidade celular que utiliza uma dupla coloração fluorescente. Os corantes então utilizados têm a capacidade de se intercalarem com ácidos nucleicos, sendo que o brometo de etídio emite fluorescência em vermelho quando se intercala ao DNA e o alaranjado de acridina emite fluorescência em verde quando se intercala a esse ácido nucléico. DNA. Esses dois corantes também possuem a capacidade de penetrar a membrana plasmática diferenciada. Enquanto o alaranjado de acridina consegue penetrar as células com membrana íntegra, o brometo etídio só penetra as células com perda de integridade de membrana. Desse modo, a identificação de células emitindo fluorescência vermelha é um indicativo de perda de viabilidade, enquanto a emissão de fluorescência verde indica a presença de células viáveis.

Para a execução do ensaio de viabilidade com a dupla coloração alaranjada de acridina

e brometo de etídio, as células foram cultivadas em placas de 12 poços, e coradas com a dupla coloração na própria placa de cultura 24 horas após os tratamentos. A mistura dos dois corantes (1:1) foi aplicada no próprio poço de cultura em uma concentração final de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, diluídos em PBS. A morfologia celular foi imediatamente observada em microscópio de fluorescência invertido Axiophot, Zeiss.

3. 4. 8. Viabilidade Celular pelo método de MTT

Esse ensaio de citotoxicidade consiste em um teste colorimétrico que quantifica a redução do reagente MTT (brometo de 3(4,5 dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil-tetrazólio) em um composto conhecido como formazan pela ação de desidrogenases mitocondriais. A presença de desidrogenases mitocondriais ativas é um indicativo de viabilidade celular. Os cristais do corante roxo de formazan formados pela redução do MTT são quantificados por técnicas de espectrofotometria.

Para a realização desse experimento, 10^4 células OSCC foram adicionadas a placas de 96 poços 24 horas antes dos tratamentos para adesão das células ao fundo da placa. Após 24 horas do tratamento das células em cultura, o meio foi substituído por outro adicionado de solução estoque de MTT (5 mg/mL) na proporção 20 μL / 180 μL de meio de cultura.

Após 4 horas de incubação com o meio de cultura adicionado com o corante MTT, esse meio foi removido e foram adicionados 200 μL de DMSO. Após alguns minutos, os cristais de formazan foram dissolvidos e a quantificação deste produto foi realizada em espectrofluorímetro modelo Biorad (3550-v) em comprimento de onda 595 nm.

3. 4. 9. Avaliação morfológica das células OSCC

Para a análise da morfologia celular, lamínulas de microscopia estéreis (23 mm x 34 mm) foram posicionadas no fundo de placas de cultura com 6 poços. Células OSCC se proliferaram nessas lamínulas, aderindo-se a essa superfície. 24 horas após os tratamentos, as células foram fixadas com solução de Paraformaldeído 2% por 15 minutos. A coloração das células aderidas às lamínulas foi realizada com solução de Cristal Violeta por 3 minutos. Em seguida, as lamínulas foram lavadas com solução PBS para retirada do excesso de corante e montadas em lâminas de microscopia com auxílio de solução de Entellan[®] como meio de montagem e colocadas para secar em estufa (37°C) por 12 horas. A seguir, as lâminas foram analisadas e fotografadas em microscópio de luz Zeiss Axioskop, sendo as imagens capturadas no programa Axio Vison 40v 4.6.1.0. Copyring © 2002-2004.

3. 5. Experimentos *in vivo*

3. 5. 1. Aprovação do Projeto pelo Comitê de Ética

O projeto de pesquisa desenvolvido na presente dissertação foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética no uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.

3. 5. 2. Animais Experimentais

3. 5. 2. 1. Camundongos Imunocompetentes

Camundongos *Swiss* fêmeas (n=45) com 8 semanas de vida foram utilizados para a obtenção de câncer de língua no modelo de indução química com o carcinógeno 4-NQO. Camundongos *Swiss* fêmeas (n=16) com 20 semanas foram utilizados para a obtenção de tumores de língua pela injeção de células derivadas do tumor ascítico de Erlich. Todos os animais foram obtidos da IQUEGO (GO, Brasil) e mantidos no Biotério do Departamento de Genética e Morfologia (GEM-IB-UnB) com temperatura controlada (23⁰C), ciclo de claro escuro de 12/12 horas, com fornecimento de água e ração *ad libitum*.

3. 5. 2. 2. Animais Imunossuprimidos

Camundongos imunossuprimidos *Balb/c nude*, 6 semanas de idade (n=5, machos e fêmeas), foram utilizados para obtenção de tumores dorsais subcutâneos derivados da proliferação *in vivo* de células em cultura derivadas de carcinoma epidermóide bucal humano, linhagem OSCC. A linhagem de camundongos foi obtida no CEMIB (Campinas, Brasil) e, a partir daí foram mantidos no Biotério do Departamento de Genética e Morfologia da Universidade de Brasília (GEM-IB-UnB). A temperatura foi controlada próxima (23⁰C) com ciclo claro/escuro de 12/12 horas, com fornecimento de água e ração autoclavadas *ad libitum*.

3. 5. 3. Modelos de Indução tumoral

3. 5. 3. 1. Modelo de indução tumoral química com o carcinógeno 4-NQO

O carcinógeno 4-NQO (4- nitroquinoline -1- oxido) é um composto alquilante, hidrossolúvel, e potente agente mutagênico, que uma vez ativado metabolicamente causa dano ao DNA. Modelos animais para o desenvolvimento de tumores epiteliais têm sido propostos utilizando-se nos mesmos esse agente clastogênico.

Para o estabelecimento do modelo experimental, os animais foram tratados 3 vezes por semana com a aplicação tópica na região ventral da língua com solução (10mg/mL) de 4-NQO diluída em propileno glicol (grupo indução) (n=28). Para os animais do grupo controle (n=17), os mesmos procedimentos foram realizados, porém com a aplicação do veículo propileno glicol sozinho. A aplicação era feita com a o auxílio de um pincel do tipo *microbrush*. Depois da aplicação, os animais foram mantidos durante duas horas privados de ração e água, a fim de otimizar a absorção da droga. Novas alíquotas da solução foram preparadas a cada aplicação. Esse processo foi repetido por 16 semanas de tratamento efetivo e os animais foram inspecionados semanalmente para a detecção de possíveis lesões tumorais por um período total de 54 semanas, totalizando um período de 70 semanas deste tratamento.

3. 5. 3. 2. Modelo de indução tumoral com a linhagem OSCC

Para a indução de tumores dorsais subcutâneos derivados da linhagem celular OSCC, suspensões celulares (500 µL) com aproximadamente 10^6 células OSCC foram injetadas no subcutâneo dorsal dos camundongos *nude* (n=5). Após 21 dias de acompanhamento, tumores com aproximadamente 6-8 mm de diâmetro foram detectados.

3. 5. 3. 3. Modelo de indução tumoral com a o Tumor Ascítico de Ehrlich

Para a indução de tumores linguais derivados do tumor ascítico de Ehrlich, suspensões celulares do tumor (50 µL) com aproximadamente 10^6 células foram injetadas na borda lateral esquerda da língua dos camundongos *swiss* (n=16). Os animais foram temporariamente anestesiados com Éter para a injeção da solução contendo as células tumorais. Após cinco dias de observação, tumores com aproximadamente 4-5 mm foram detectados na língua dos animais.

3. 5. 4. Aplicação da Terapia Fotodinâmica nos modelos animais

3. 5. 4. 1. Terapia Fotodinâmica *in vivo* – Modelo 4-NQO

Para a aplicação da terapia nas lesões neoplásicas, foi feita injeção peritumoral de 40 µL de solução de Alumínio-Cloro-Ftalocinina em formulação liposomal três horas antes de ser realizada a aplicação de laser em comprimento de onda de 670 nm, com uma energia total aproximada de 100 J/cm^2 . Para a injeção peritumoral, os animais foram levemente anestesiados com solução de Éter. Na aplicação do laser, os animais foram anestesiados profundamente com solução de Ketamina / Xilazina em doses aproximadas de 15mg/kg e 5mg/kg respectivamente.

Os animais com desenvolvimento tumoral neste modelo, foram divididos em três grupos experimentais:

1. Animais sacrificados 72 horas após a aplicação da TFD (n=3);
2. Animais sacrificados duas semanas após o início do tratamento, sendo realizadas duas aplicações, uma por semana, da TFD (n=3);

3. Animais com tumores sem a aplicação da TFD (n=2).

Após o sacrifício dos animais por deslocamento cervical, as línguas foram completamente excisadas e processadas para processamento histológico.

3. 5. 4. 2. Terapia Fotodinâmica *in vivo* – Modelo OSCC (*nude*)

Animais (n=3) com tumores de 6-8 mm de diâmetro foram selecionados para a aplicação da TFD. A solução de AICIFt-liposomal (500 µL) foi injetada na via peritoneal 24 horas antes da iluminação do tumor com laser em comprimento de onda de 670 nm, numa potência aproximada de 100 J/cm². Para a iluminação com laser, os animais foram anestesiados com solução de Ketamina / Xilazina em doses aproximadas de 15 mg/kg e 5 mg/kg respectivamente. Como controle, animais (n=2) com tumores do mesmo diâmetro receberam injeção de solução PBS estéril (500 µL) e foram anestesiados de acordo com o mesmo protocolo descrito anteriormente. Em 21 dias de tratamento, os animais foram tratados semanalmente, totalizando três procedimentos de tratamento (14 dias) e sete dias de espera para o sacrifício dos animais. Após o processo experimental, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e os tumores foram completamente retirados para o processamento histológico.

Durante o período de tratamento, o volume tumoral era estimado pela mensuração tumores. A mensuração foi feita pela multiplicação dos diâmetros maior e menor de cada tumor, sendo obtido um valor aproximado em mm². Os diâmetros foram mensurados com auxílio de um paquímetro milimetrado. Para o acompanhamento da progressão do crescimento, os valores iniciais dos tumores em milímetros foram considerados 100% e as mensurações sucessivas foram relativizadas de acordo com esse valor inicial.

3. 5. 4. 3. Terapia Fotodinâmica *in vivo* – Modelo Tumor de Ehrlich

Após o crescimento tumoral os animais (n=16) foram divididos em quatro grupos experimentais, sendo eles:

1. **AICIFt** - Tumor com injeção peritumoral de 40 μ L de solução lipossomal de AICIFt (n=4);
2. **Laser** - Tumor com irradiação de laser com aproximadamente 100 J/cm² (n=4);
3. **TFD** - Tumor com injeção peritumoral de 40 μ L de solução lipossomal de AICIFt e irradiação de laser com aproximadamente 100 J/cm² (Terapia Fotodinâmica) (n=4);
4. **Controle** - Tumor sem tratamento (n=4).

Para a aplicação dos tratamentos nos diferentes grupos experimentais, os animais foram anestesiados com a combinação de soluções de Ketamina / Xilazina em doses aproximadas de 15 mg/kg e 5 mg/kg respectivamente. Após 24 horas da aplicação da terapia, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical. As línguas foram, então, excisadas e processadas para processamento histológico.

3. 6. Processamento Histológico

As peças foram fixadas com solução de paraformaldeído a 4%, durante duas horas e em temperatura ambiente. Após o procedimento de fixação tecidual inicial, as peças foram lavadas com solução de Álcool 70% e deixadas durante a noite em temperatura ambiente. Foram realizadas duas trocas de Álcool 70% para a retirada do excesso de paraformaldeído. Após o processo de fixação inicial, as peças histológicas foram tratadas segundo a rotina histológica descrita na Tabela 2.

Tabela 2: Material e Métodos e tempos utilizados nos procedimentos de desidratação, diafanização e inclusão das peças histológicas.

Procedimento	Solução	Tempo
Desidratação	Álcool 80%	<i>40 minutos</i>
	Álcool 90%	<i>40 minutos</i>
	Álcool 100% - 1	<i>40 minutos</i>
	Álcool 100% - 2	<i>40 minutos</i>
	Diafanização	Álcool 100% / Xileno (1:1)
	Xileno - 1	<i>40 minutos</i>
	Xileno - 2	<i>40 minutos</i>
Inclusão	Parafina - 1 (50 ⁰ C)	<i>60 minutos</i>
	Parafina - 2 (50 ⁰ C)	<i>60 minutos</i>
	Parafina - 3 (50 ⁰ C)	<i>60 minutos</i>

Feita a impregnação com parafina, as peças foram moldadas com parafina derretida em barras de Leuckhart. Após a solidificação da parafina, foram feitos cortes histológicos semi-seriados com 5 µm de espessura utilizando-se um micrótomo Leica RM 2145. Os cortes foram então montados nas lâminas de microscopia e essas foram mantidas em estufa a 37⁰C durante no mínimo 12 horas para melhor aderência dos cortes .

3. 6. 1. Processo de coloração para microscopia de luz

As lâminas foram coradas com Hematoxilina e Eosina (H. & E.) de base aquosa, segundo a Tabela 3.

Tabela 3: Processo de coloração com os Hematoxilina e Eosina.

Procedimento	Solução	Tempo
Rehidratação	Xileno 1	<i>60 segundos</i>
	Xileno 2	<i>60 segundos</i>
	Xileno 3	<i>60 segundos</i>
	Álcool 100%	<i>60 segundos</i>
	Álcool 90%	<i>60 segundos</i>
	Álcool 80%	<i>60 segundos</i>
	Álcool 70%	<i>60 segundos</i>
	Coloração	Hematoxilina
Água corrente		<i>3 minutos</i>
Eosina		<i>40 segundos</i>
Água corrente		<i>20 segundos</i>
Desidratação	Álcool 70%	<i>60 segundos</i>
	Álcool 80%	<i>60 segundos</i>
	Álcool 90%	<i>60 segundos</i>
	Xileno 1	<i>60 segundos</i>
	Xileno 2	<i>60 segundos</i>
	Xileno 3	<i>60 segundos</i>

Após o último banho de xileno, as lâminas foram recobertas em lamínulas utilizando-se Entellan[®] como meio de montagem, e colocadas para secar em estufa (37°C) por 12 horas. A seguir, as lâminas foram analisadas e fotografadas em microscópio de luz Zeiss Axioskop, sendo as imagens capturadas no programa Axio Vison 40v 4.6.1.0. Copyring © 2002-2004.

3. 7. Morfometria dos Tumores de Ehrlich

Os cortes histológicos (5 μm) das línguas foram realizados em sentido coronal e feitos de maneira semi-seriada. Após a obtenção da primeira lâmina, desprezaram-se os 10 cortes seguintes e uma nova lâmina foi preparada, até que um total de 25 lâminas de microscopia fosse obtido em cada animal (Figura 3). Após essa etapa, a coloração foi feita em H&E e os cortes histológicos fotografados em Microscópio Zeiss, sendo as imagens capturadas no programa Axio Vison 40v 4.6.1.0. Copyring © 2002-2004 para a análise morfométrica.

A quantificação da área total da língua (1), da área total de infiltração tumoral (2) e a área de necrose tumoral (3) foram realizadas a partir de fotomicrografias tiradas das 25 laminas processadas com a utilização do *software* Image-ProPlus versão 5.1.

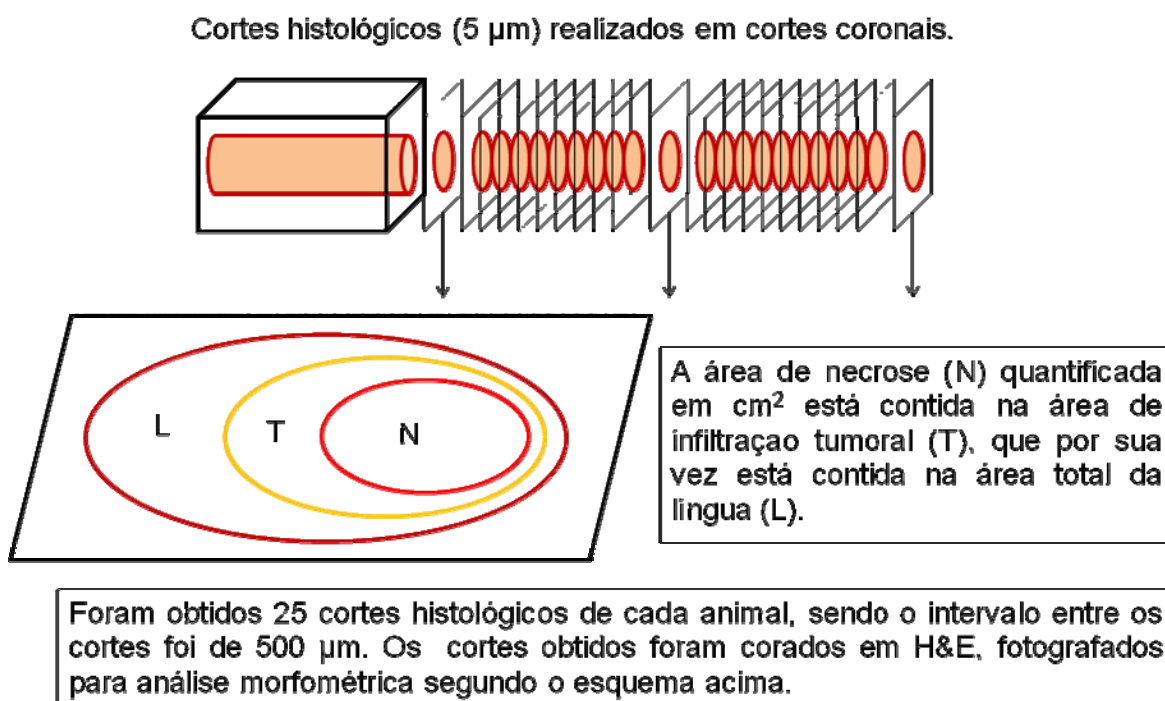


Figura 3: Esquema representativo da metodologia para corte histológico semi-seriado e a quantificação das áreas de necrose, infiltração tumoral e área total da língua.

3. 8. Análise Estatística

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), nos casos em que foram detectados diferenças entre os tratamentos, foi aplicado o teste de Scheffer (EstatView pra Windows) em nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

3. 9. Descrição dos animais envolvidos nos diferentes modelos experimentais

A Tabela 4 resume a utilização dos animais utilizados na dissertação nos diferentes modelos experimentais para o câncer de boca.

Tabela 4: Descrição da utilização dos animais experimentais nos diferentes modelos experimentais.

Animais experimentais (camundongos)				
modelo	linhagem	idade (semanas)	tratamentos	n
Animais Imunocompetentes				
4 NQO (indução)	swiss fêmeas	8	1. indução tumoral com aplicação tópica 4 NQO (grupo indução)	28*
			2. controle, aplicação solução inerte (grupo controle)	17
4 NQO (TFD)**	swiss fêmeas	78	1. aplicação TFD e sacrifício após 72 horas	3
			2. aplicação TFD e sacrifício após 2 semanas	3
			3. sacrifício de animais com tumor sem tratamento	2
			4. sacrifício de animais sem tumor	4
Ehrlich	swiss fêmeas	20	1. indução tumoral (grupo controle)	4
			2. indução tumoral + injeção AIClFt (grupo AIClFt)	4
			3. indução tumoral + irradiação com laser (grupo laser)	4
			4. indução tumoral + TFD (grupo TFD)	4
Animais Imunosuprimidos				
nude - OSCC	nude - Balb/c (machos/fêmeas)	6	1. indução tumoral (controle)	2
			2. indução tumoral + TFD (grupo TFD)	3

* Os animais que desenvolveram tumores linguais no processo de indução com o carcinógeno 4NQO (n=8) foram utilizados no processo de aplicação da TFD**.

4 RESULTADOS

4. Resultados

4. 1. Resultados experimentos *in vitro* - Aplicação da Terapia Fotodinâmica (TFD) na linhagem celular OSCC

A avaliação da efetividade da aplicação da TFD na linhagem celular OSCC, derivada de um carcinoma epidermóide bucal humano foi realizada por meio de diferentes experimentos, envolvendo aspectos qualitativos e quantitativos relacionados com a viabilidade celular.

As figuras 4 e 5 apresentam, respectivamente, os resultados dos ensaios com o corante de Azul Tripán e ensaio de MTT. Os dois ensaios apresentaram resultados semelhantes, sendo constatada uma redução significativa da viabilidade celular apenas nos grupos tratados com TFD. A grande eficiência na redução da viabilidade das células OSCC após a aplicação da TFD foi demonstrada pela morte celular de 100% da cultura no ensaio com o Azul Tripán e a aproximadamente 97% do total de células no ensaio de MTT. Os demais grupos experimentais não apresentaram diferença significativa na quantificação do número de células viáveis em comparação ao grupo controle.

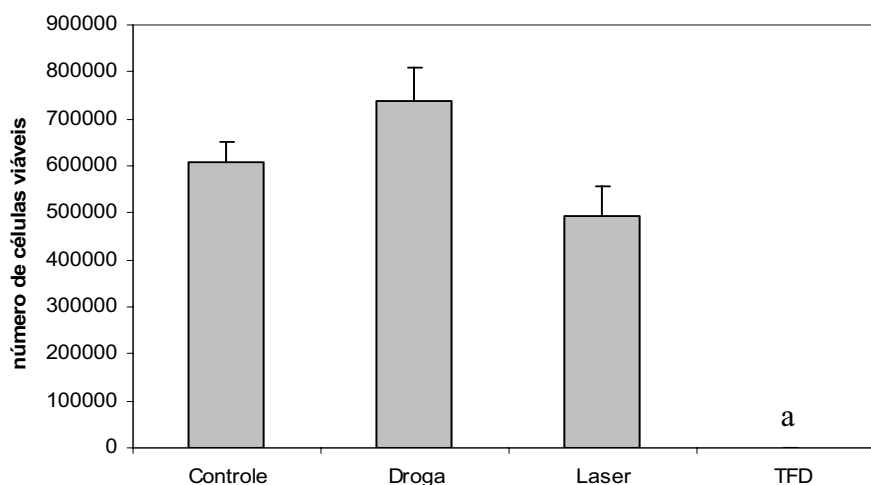


Figura 4: Viabilidade das células OSCC avaliada pelo ensaio Azul Tripán após 24 horas de diferentes tratamentos. ^a representa diferença estatisticamente significante ($p < 0,05$).

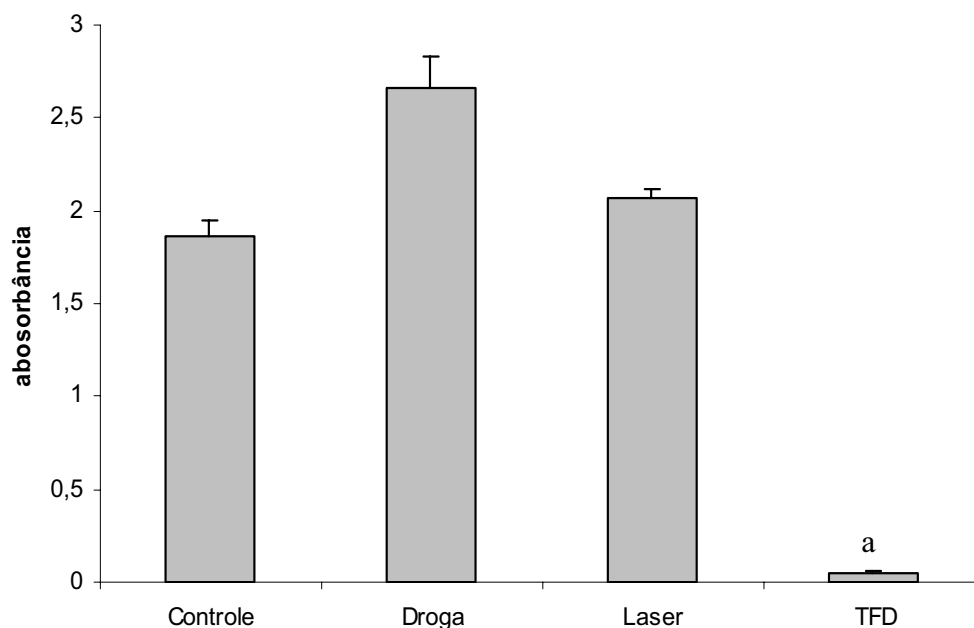


Figura 5: Viabilidade das células OSCC avaliada pelo ensaio de MTT após 24 horas de diferentes tratamentos. ^a representa diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

A análise morfológica das células OSCC após a aplicação da TFD foi realizada através de microscopia de luz (ML), com a coloração com Cristal Violeta e microscopia de fluorescência (MF) pela coloração com os corantes Alaranjado de Acridina e Brometo de Etídio, como descrito na metodologia. O padrão celular analisado por ML apresenta as células OSCC com intensas alterações morfológicas, que incluem: perda do conteúdo citoplasmático, condensação nuclear, fragmentação de núcleo e fragmentação de membrana plasmática. A ML das culturas celulares submetidas aos demais tratamentos apresentam morfologia semelhante ao grupo controle (figura 6). A análise morfológica por MF demonstra a morte celular induzida em todas as células tratadas com a TFD. Na figura 7 pode-se observar a coloração das células predominantemente com o corante Brometo de Etídio, o qual indica células em processo de morte celular por necrose.

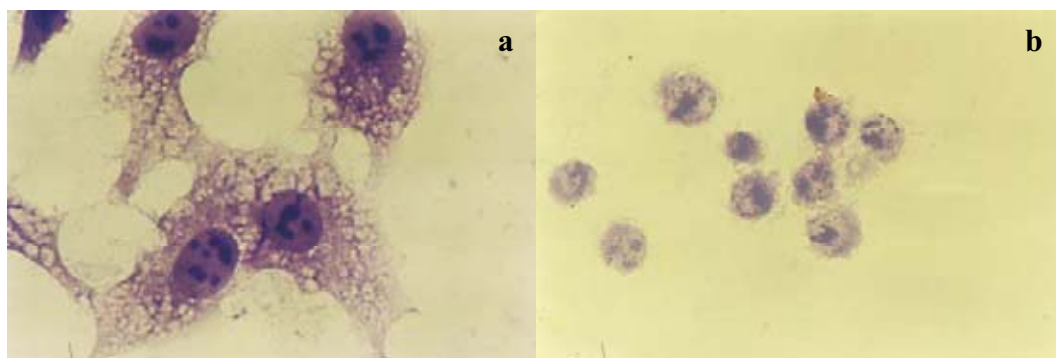


Figura 6: Fotomicrografia das células OSCC apresentando morfologia normal (a), comum aos grupos controle, laser e AICIFt. Em (b) morfologia celular após a aplicação da TFD apresentando diferentes sinais de degeneração celular.

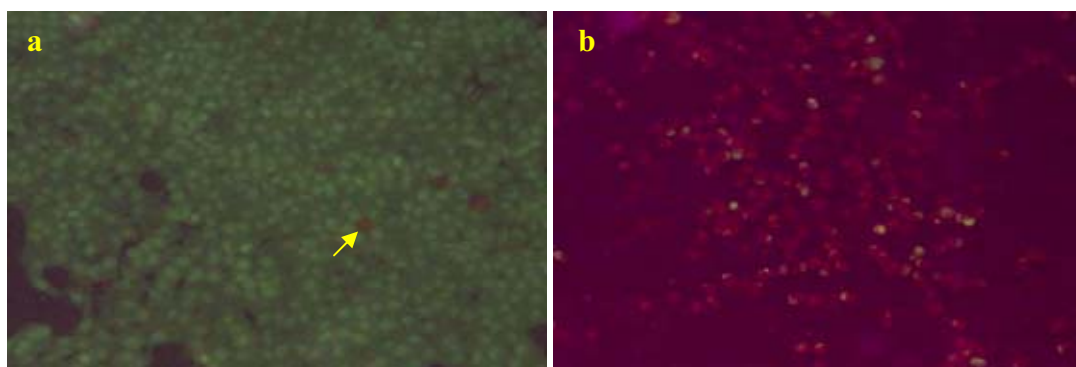


Figura 7: Fotomicrografia das células OSCC coradas com Alaranjado de Acridina e Brometo de Etídio. Em (a), células controle viáveis, com seta indicando célula isolada corada em vermelho indicando morte celular. Em (b), células tratadas com TFD

4. 2. Resultados experimentos *in vivo*

4. 2. 1. Modelo 4-NQO

Após 70 semanas de tratamento, 8 dentre os 28 camundongos tratados com a aplicação tópica do carcinógeno 4-NQO (28%) desenvolveram lesões neoplásicas na língua. A inspeção histopatológica demonstrou um carcinoma epidermóide agressivo com infiltração ao tecido conjuntivo e diferentes figuras de displasia morfológica como: estratificação epitelial irregular, hiperplasia da camada basal, aumento do número de figuras mitóticas, perda da

polaridade das células basais, aumento da razão núcleo-citoplasma, polimorfismo nuclear, hiperchromatismo nuclear, aumento do tamanho dos nucléolos, queratinização de células isoladas ou em grupos na camada celular espinhosa e redução da aderência intercelular (Figura 8).

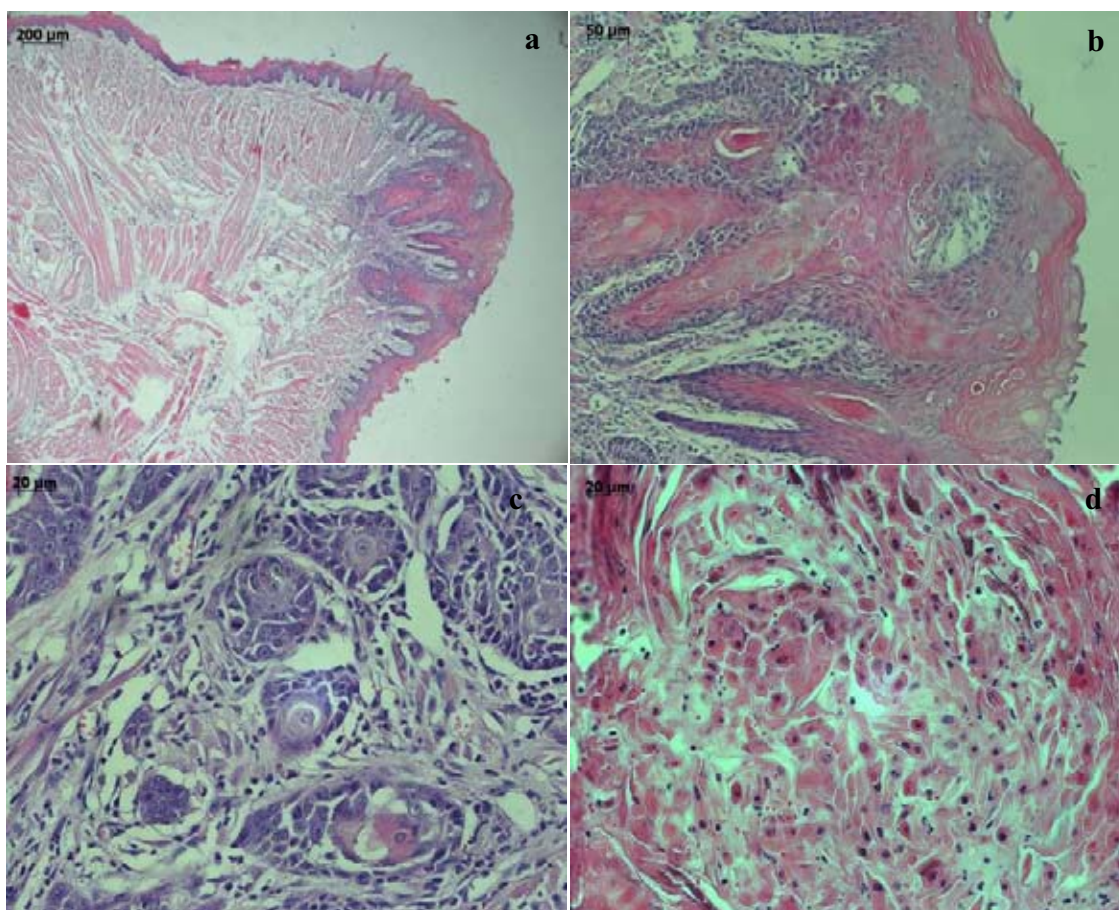


Figura 8: Carcinoma epidermóide induzido pelo 4NQO apresentando invasão do conjuntivo (a); espessamento da camada de queratina e hiperplasia da camada basal (b); queratinização de células isoladas e redução da aderência celular (c); aumento da razão núcleo citoplasma e hiperchromatismo nuclear (d).

Os animais induzidos com o carcinógeno 4-NQO apresentaram algumas alterações clínicas significativas. A figura 9 apresenta o aspecto clínico dos animais induzidos com o carcinógeno em comparação aos do grupo controle. Nota-se que a indução com o carcinógeno promoveu um quadro de alopecia moderada. Também foi constatada a significativa

($p=0,0025$) perda de peso em relação ao grupo controle de aproximadamente 25% do peso em gramas. O peso dos animais após a detecção das lesões bucais está representado no figura 10.

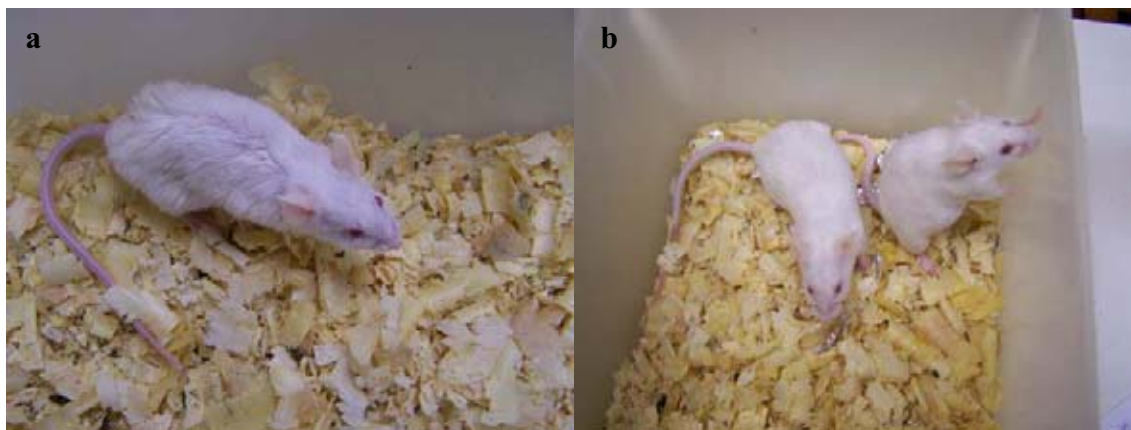


Figura 9: Camundongos induzidos com o carcinógeno 4NQO (a) apresentando alopecia moderada. Em comparação camundongos da mesma idade do grupo controle (b).

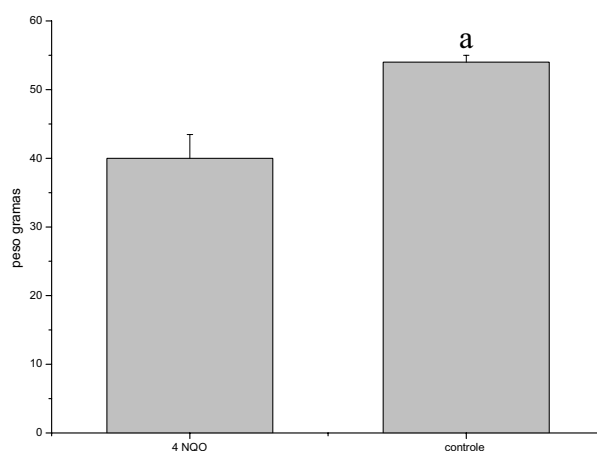


Figura 10: Peso dos camundongos induzidos com 4 NQO e animais do grupo controle (em gramas). ^a Representa diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ($p<0,05$).

A avaliação dos efeitos da TFD sobre os tumores linguais dos camundongos foi realizada nos períodos de 72 horas e 2 semanas após o início do tratamento. A figura 11 apresenta o aspecto clínico de uma lesão papilomatosa localizada no bordo anterior direito de língua antes (a) e após 72 horas (b) da aplicação da TFD. Nota-se que a região tumoral apresenta aspecto de necrose em toda a sua extensão, gerando um aspecto ulcerado em toda a

extensão da lesão com deposição de material de aspecto fibrinoso na superfície do tumor. Também se observa a formação de edema e regiões ulceradas na borda esquerda.

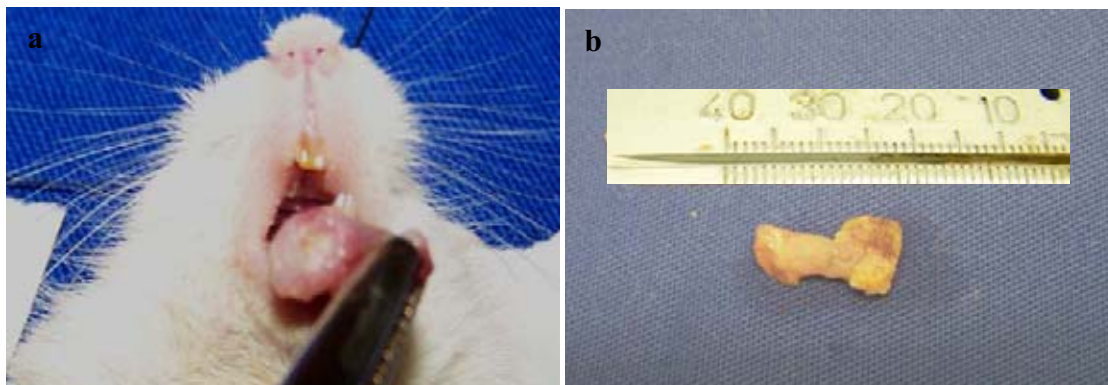


Figura 11: Fotografia mostrando (a) o aspecto clínico de um tumor induzido pelo carcinógeno 4 NQO no bordo direito de língua. Em (b) a língua excisada após 72 horas da aplicação da TFD. Nota-se a formação de edema aspecto necrótico nos dois bordos da língua do animal tratado.

A figura 12 apresenta a evolução do tratamento de uma lesão leucoplásica localizada na borda esquerda de língua induzida pelo carcinógeno 4 NQO. Em (a) aspecto da lesão antes do início do tratamento caracterizada pela integridade da mucosa tumoral. Em (b) se observa a ulceração central da lesão 72 horas após a aplicação da TFD e um aspecto de regeneração tecidual após 14 dias de tratamento pode ser constatada em (c), onde observa-se uma discreta diminuição da área ulcerada.

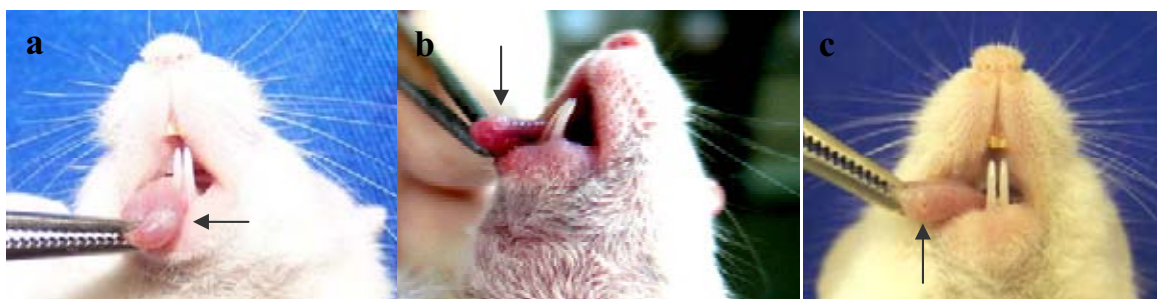


Figura 12: Lesão leucoplásica (a) induzida pelo 4 NQO localizada no bordo anterior esquerdo de língua. Em (b) aspecto da mesma lesão 72 horas após a aplicação da TFD, apresentando aspecto de úlcera no centro da lesão. Em (c) aspecto da mesma lesão após 14 dias de tratamento apresentando certo grau de regeneração tecidual. Setas indicam a posição da lesão neoplásica.

A análise histológica dos efeitos do tratamento administrado confirmou os achados clínicos, onde foi identificada a formação de úlceras nas regiões neoplásicas após a aplicação da terapia, indicando processo de regeneração tecidual. Apesar de promover a destruição das camadas tumorais mais superficiais, células neoplásicas viáveis e infiltradas nas camadas mais profundas do órgão foram detectadas, representadas pelas pérolas córneas identificadas no centro da massa tumoral (figura 13).

Durante o período de aplicação da TFD os animais apresentaram uma variação no peso, com uma queda significativa ($p=0,01$) nos animais tratados com a terapia em comparação aos animais do grupo controle (Figura 14).

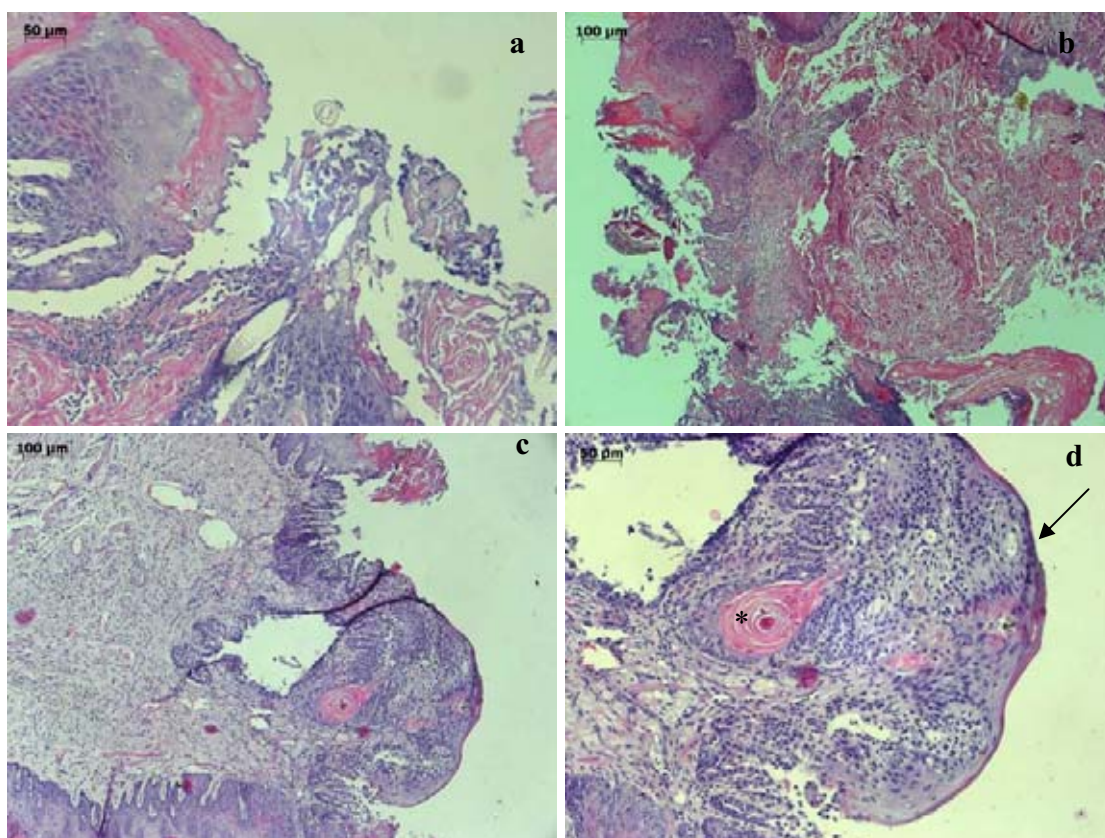


Figura 13: Fotomicrografia dos tumores induzidos pelo 4 NQO após 72 horas de tratamento (a; b), onde se observa a desorganização e destruição das camadas superficiais das áreas neoplásicas. Em (c; d) observam-se os tumores após 14 dias de tratamento apresentando aspecto de regeneração tecidual, com a repitelização inicial das úlceras (seta) e células neoplásicas remanescentes em camadas mais internas da língua (*).

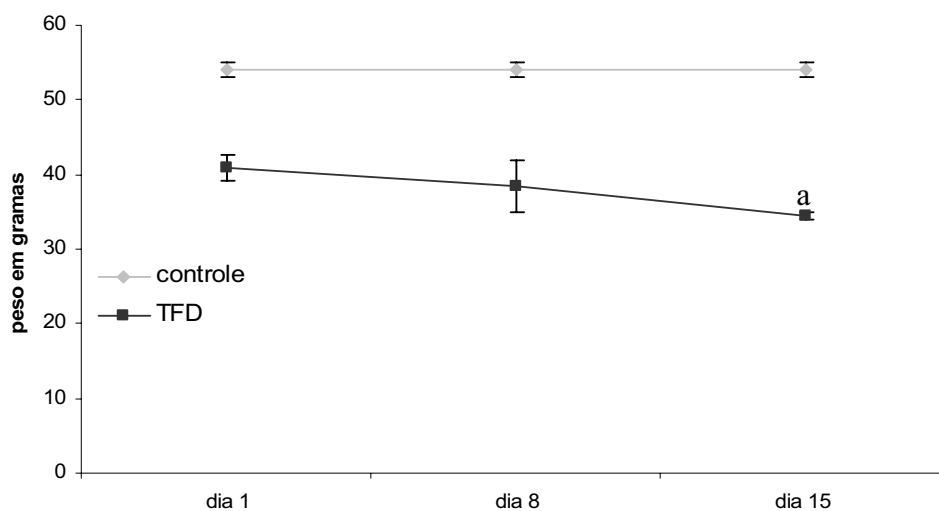


Figura 14: Variação do peso dos animais durante o período de tratamento. ^a representa diferença significativa do peso dos animais em comparação ao dia 1 ($p < 0,05$).

4. 2. 2. Modelo linhagem OSCC em camundongos *nude*

Três semanas após a injeção subcutânea da linhagem tumoral OSCC, foi observado o crescimento de tumores com aproximadamente 10 mm de diâmetro. A Figura 15 apresenta o aspecto clínico dos tumores antes do início dos tratamentos.

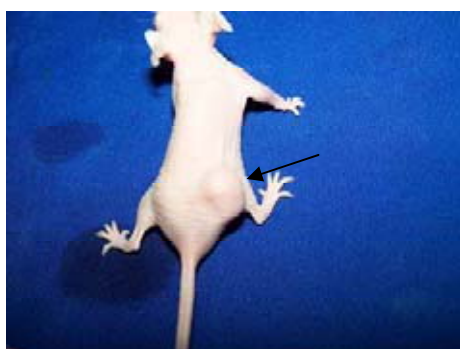


Figura 15: Aspecto do desenvolvimento de tumores subcutâneos dorsais pela injeção de células OSCC. Seta indica a localização da massa tumoral no dorso direito.

A Figura 16 apresenta o perfil de crescimento tumoral nos grupos controle e TFD ao longo do período de tratamento. Os valores estão representados em porcentagem em relação ao seu tamanho inicial dos tumores (100%). Observa-se que os dois grupos experimentais apresentaram crescimento semelhante até a terceira semana de tratamento, sendo que os

tumores controles aumentaram significativamente o padrão de crescimento em relação aos tumores tratados na última semana de avaliação.

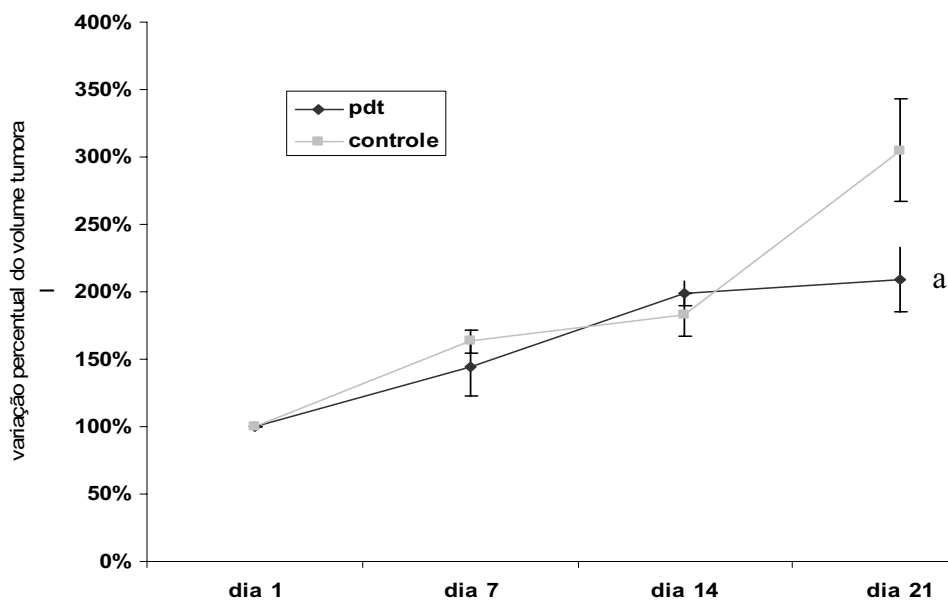


Figura 16: Perfil de crescimento tumoral durante o período de tratamento. O volume tumoral varia com o tempo e está percentualmente correlacionado com o volume inicial considerado 100%. ^a representa diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,05$).

A figura 17 apresenta o peso dos animais durante o período de tratamento. Pode-se observar que houve a manutenção do peso em gramas dos animais tratados. Não houve diferença no peso dos animais tratados e controle.

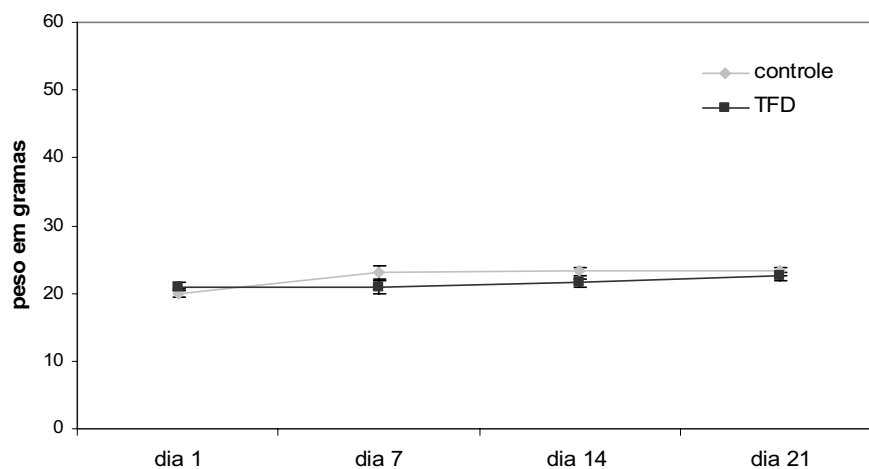


Figura 17: Curva de variação do peso dos animais *nude* com tumores dorsais tratados com TFD do grupo controle.

A figura 18 representa o aspecto clínico dos tumores tratados e controle após quatro semanas de tratamento. Nos tumores tratados (b; d) foi observado um aumento da vasoatividade local, aumento de regiões eritematosas, indicando um aumento dos processos inflamatórios. Em comparação, os tumores controle (a; c) apresentavam aspectos de coarcação sem sinais de eventos inflamatórios clinicamente detectáveis.

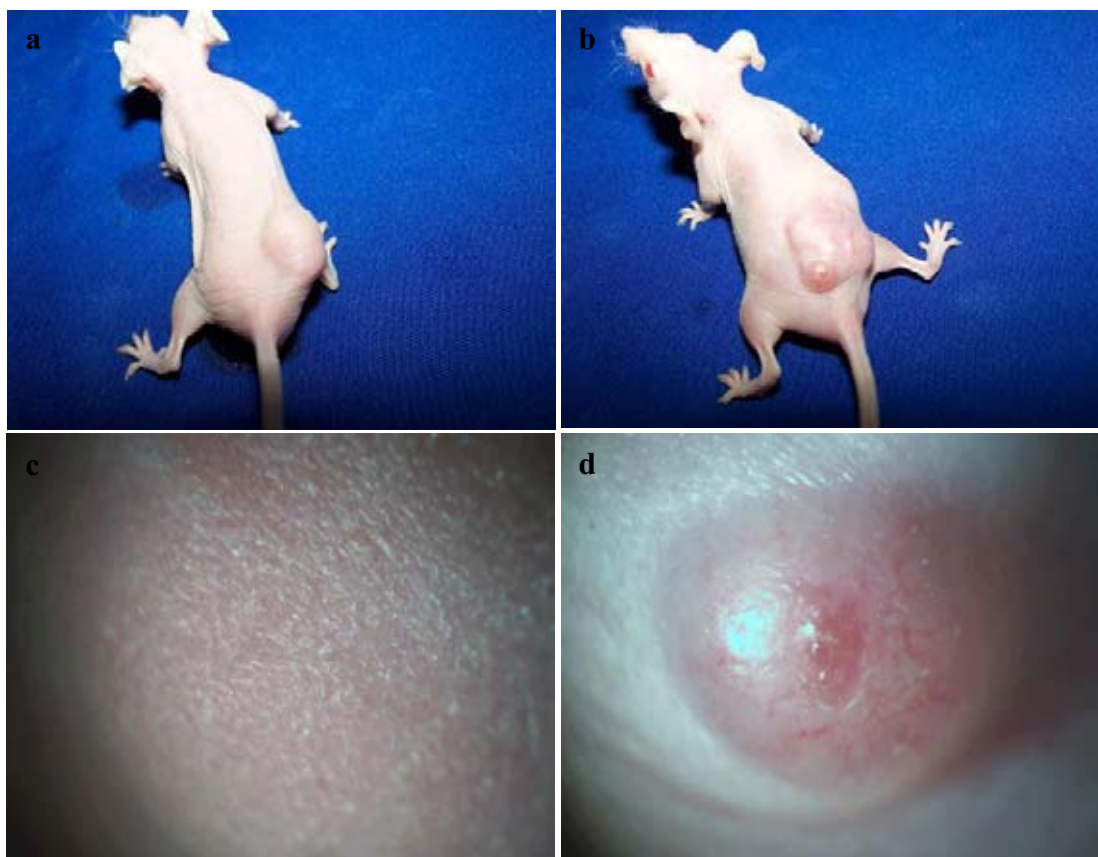


Figura 18: Fotografia dos tumores subcutâneos em camundongos *nude* do grupo controle (a; c) apresentando aspecto dérmico normal. Em (b; d) observam-se sinais de inflamação e vasoatividade local após a aplicação da TFD.

Na análise histológica (Figura 19) pode-se observar que os tumores subcutâneos induzidos pela linhagem celular OSCC apresentavam grande parte de sua massa em processo de morte celular por necrose. As regiões que não apresentavam marcas de necroses foram áreas próximas a vascularização sanguínea, em especial, às regiões adjacentes ao conjuntivo dérmico. As fotomicrografias do tumor controle mostram a grande massa tumoral necrosada ocupando a maior parte da imagem, com uma fina camada superficial de células tumorais

viáveis na região próxima a pele do animal, caracterizada por grande vascularização sanguínea.

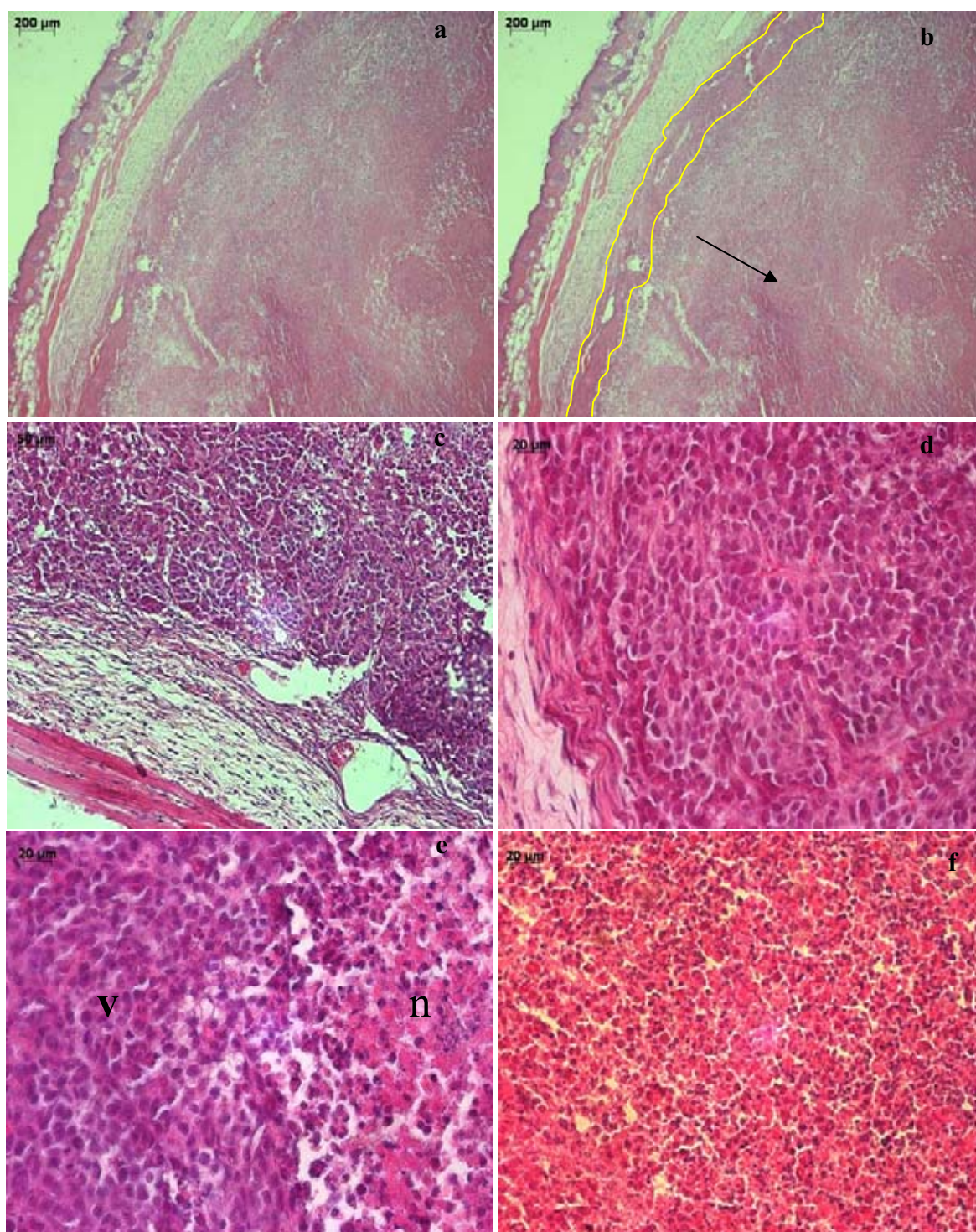


Figura 19: Fotomicrografia do tumor subcutâneo (OSCC) induzido em camundongos *nude* controle. Em (a) e (b) imagem em menor aumento do aspecto histológico com a delimitação em amarelo (b) da região com células tumorais viáveis e seta indicando a grande massa necrótica. Em (d; e) maiores aumentos para região tumoral viável próxima a vascularização da derme (*). Em (e) observa-se o limite entre o tumor viável (v) e necrótico (n). Em (f) observa-se o aspecto necrótico da massa tumoral interna.

Células tumorais viáveis também são encontradas no centro da massa tumoral profunda em necrose, porém, sempre próximas a vasos sanguíneos (Figura 20).

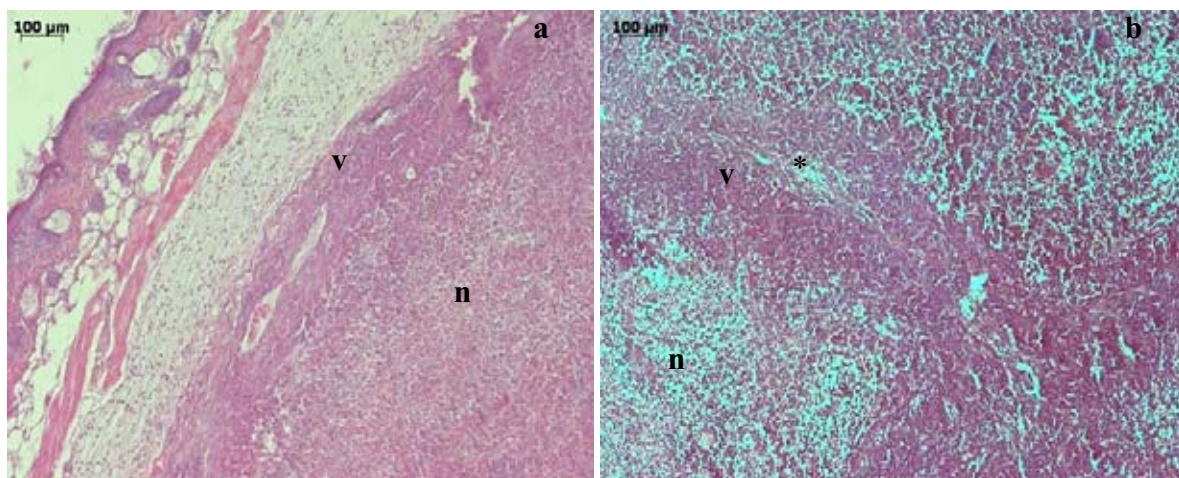


Figura 20: Fotomicrografia de tumor subcutâneo (OSCC) induzido em camundongos *nude* controle (a) apresentando fina faixa de células viáveis (v) próxima a vascularização dérmica e grande massa tumoral necrótica (n). Em (b) observam-se células viáveis (v) adjacentes a vaso sanguíneo (*) em volta de grande massa necrótica.

Os tumores tratados apresentaram diminuição do número de células viáveis nas camadas superficiais, com a degeneração tecidual promovida pela aplicação da TFD. Contrariamente aos tumores controles, que apresentavam células tumorais viáveis na superfície próxima à pele, os tratados com TFD apresentavam praticamente toda a massa tumoral em processo de necrose, restando apenas células isoladas com aspecto de viabilidade (Figura 21). Nota-se também a manutenção da integridade tecidual das camadas epiteliais, conjuntivas e musculares da pele nos tumores tratados.

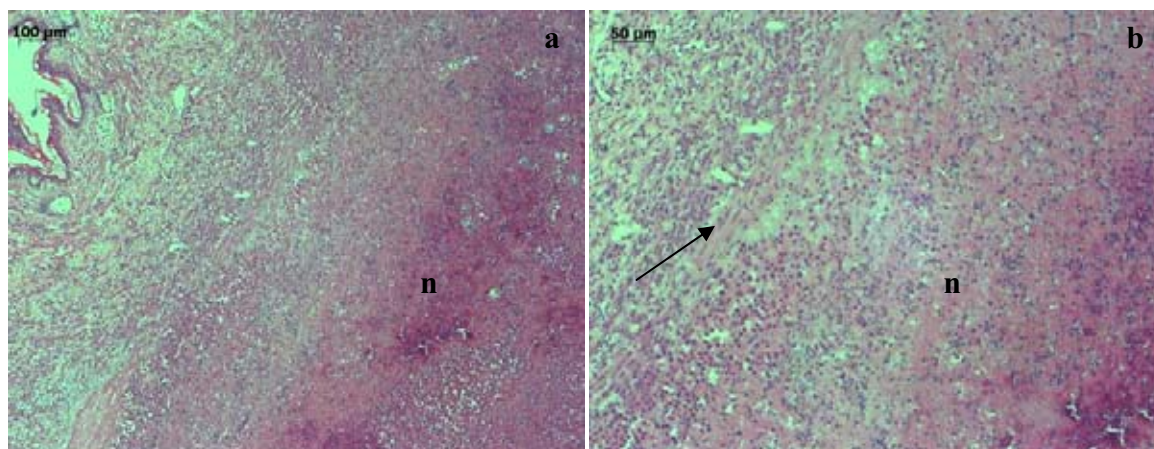


Figura 21: Fotomicrografia do tumor subcutâneo (OSCC) induzido em camundongos *nude*. Em (a) observa-se a grande massa tumoral necrótica (n) e em (b) seta indicando o limite entre a massa tumoral e o tecido conjuntivo da pele. Nota-se em (b) a ausência de células tumorais viáveis.

4. 2. 3. Modelo Tumor de Ehrlich em camundongos imunocompetentes

A utilização do tumor de Ehrlich para a indução de tumores em língua de camundongos *Swiss* imunocompetentes demonstrou ser um método simples, barato e rápido para a obtenção de modelos animais experimentais de câncer bucal. A figura 22 apresenta o aspecto histológico do tumor induzido por esta linhagem celular. Podemos observar a infiltração e proliferação de células tumorais entre as fibras musculares da língua.

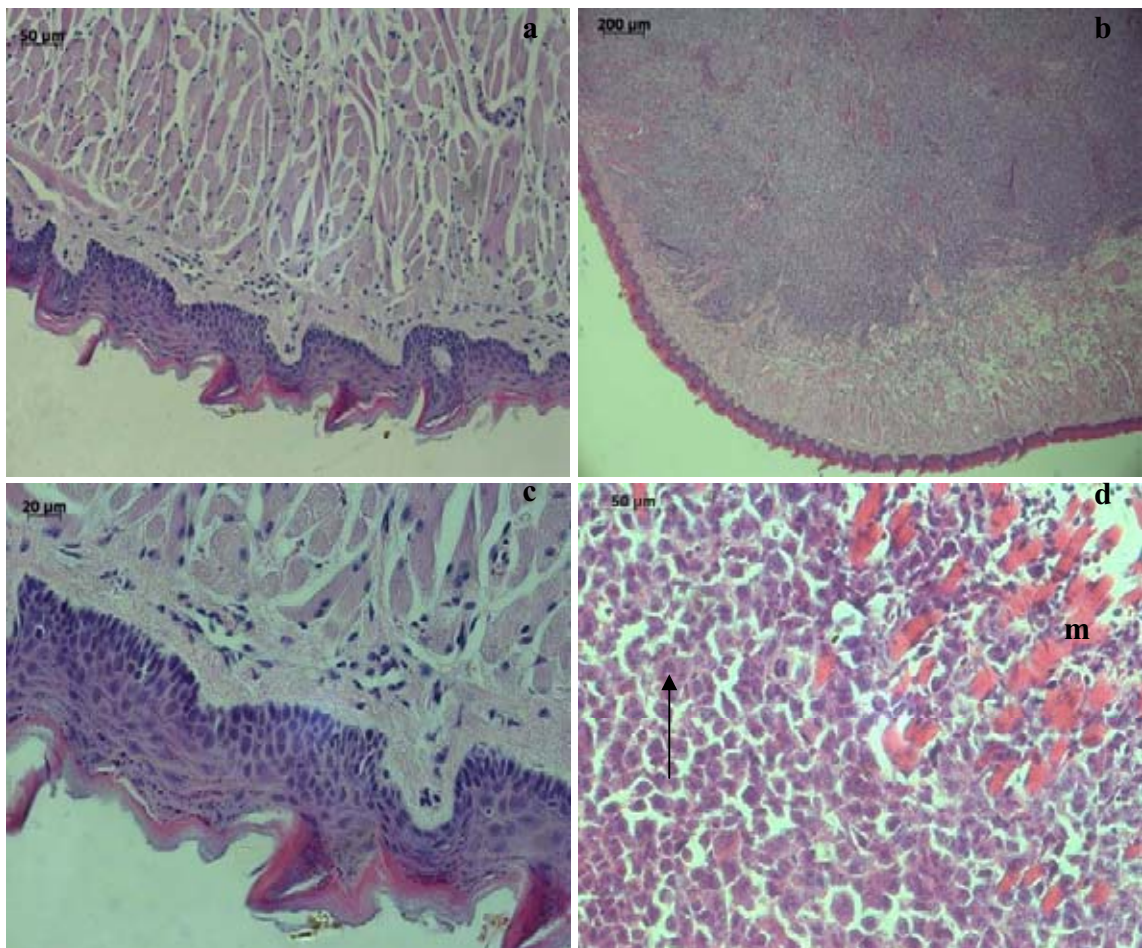


Figura 22: Língua de camundongo apresentando mucosa bucal normal nas porções superficiais e as diversas fibras musculares dispostas em vários sentidos (a; c). Aspecto histológico do tumor de Ehrlich infiltrado entre as fibras musculares da língua de camundongos (b; d). Em (b) observa-se a invasão tumoral (t) em grande parte da língua, restando pequena porção de musculatura (m) íntegra. Em (d) a seta indicando figuras mitóticas entre a grande massa de células tumorais (t), as fibras musculares remanescentes (m)

A figura 23 apresenta o aspecto macroscópico da língua de camundongos induzidas com o tumor de Ehrlich. Ficou evidenciada a presença de úlceras na borda lateral das línguas tratadas com TFD.

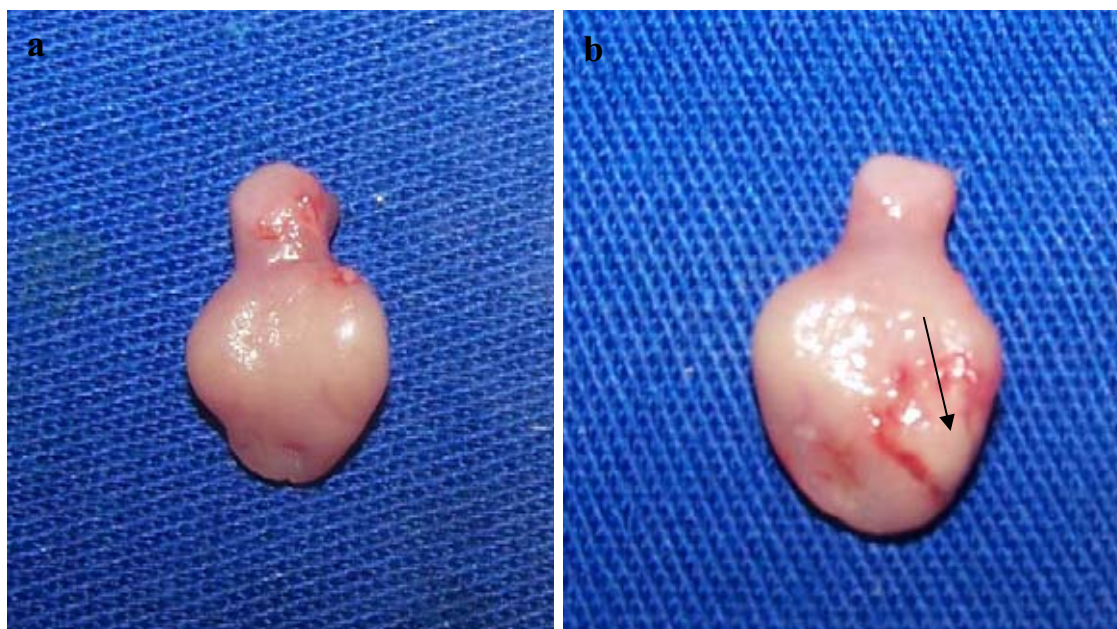


Figura 23: Aspecto macroscópico da língua dos animais excisadas. Em (a) Aspecto da língua controle com o tumor em evidência, em (b) aspecto do tumor com úlcera na borda lateral esquerda (seta) após a aplicação da TFD.

Os diferentes grupos experimentais utilizados neste modelo experimental apresentaram os seguintes padrões de resposta:

1. Grupo Controle – os tumores apresentaram focos de necrose e destruição tumoral mínimos, com presença de figuras de mitose na massa tumoral indicando a atividade proliferativa deste tumor (Figura 22 e 25).
2. Grupo Laser – aspecto das lâminas semelhante ao controle, os tumores apresentaram focos de necrose mínimos e viabilidade tumoral (Figura 25).
3. Grupo AICIFt – os tumores injetados com o fármaco fotossensibilizador AICIFt apresentaram focos de necrose tumoral extensos nas regiões mais internas dos tumores. Observa-se na Figura 25 (e; f) a presença de células tumorais viáveis na

periferia do tumor. Nas camadas mais externas podem-se observar os focos de necrose tumoral.

4. Grupo TFD – os tumores tratados com a Terapia Fotodinâmica apresentaram alto grau de necrose tumoral (Figura 25: g; h). Os tumores tratados com a TFD com grande parte de sua massa apresentando morte celular por necrose.

O figura 24 representa os valores percentuais dos tumores e das áreas de necrose desenvolvidas após os respectivos tratamentos. A área dos tumores nos diferentes grupos de tratamento não apresentou diferença significativa em relação ao grupo controle. Somente os grupos tratados com a AICIFt e os tratados com TFD apresentaram áreas de necrose após os tratamentos. Somente o grupo tratado com TFD apresentou aumento significativo ($p=0,0001$) da área de necrose em relação ao grupo controle.

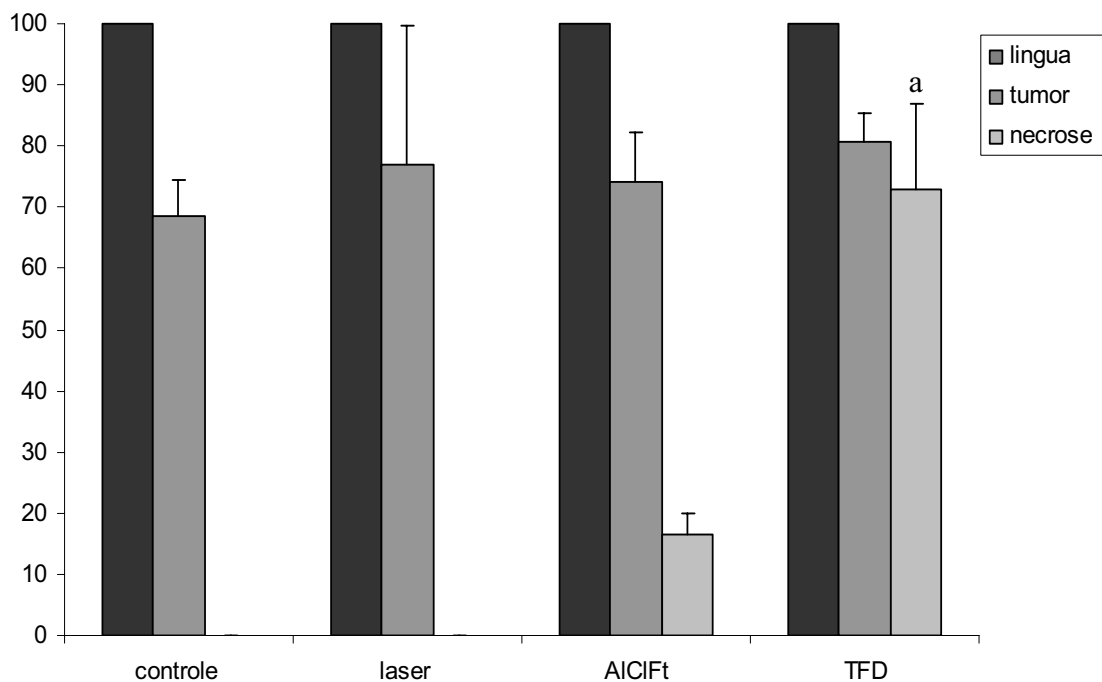


Figura 24: Porcentagem dos tumores e das áreas de necrose em comparação com a área total da língua (100%) desenvolvidas após a aplicação de diferentes tratamentos. ^a representa diferença significativa em relação ao controle ($p<0.05$).

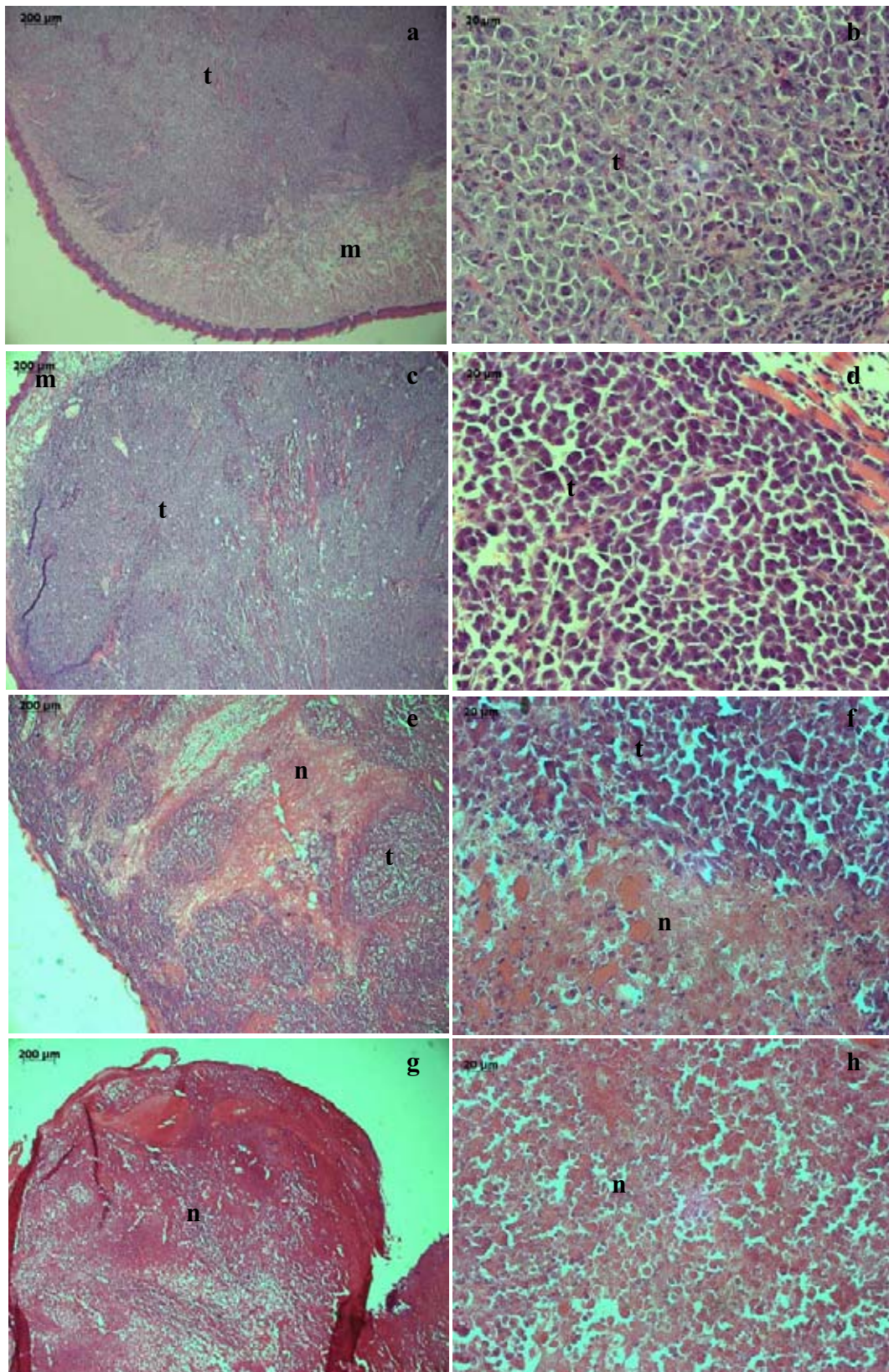


Figura 25: Fotomicrografia dos tumores de Ehrlich nos diferentes grupos experimentais: Controle (a; b); Laser (c; d) ; AICIFt (e; f) ; TFD (g; h). São destacadas nas fotomicrografias as áreas musculares normais (m); áreas de tumor proliferante (t) e áreas de necrose da massa tumoral (n).

4. 2. 4. Efeitos vasculares da aplicação da Terapia Fotodinâmica

Alterações vasculares foram observadas nos três modelos experimentais após a aplicação da TFD. A figura 26 apresenta o aspecto trombótico dos vasos sanguíneos nos tumores tratados.

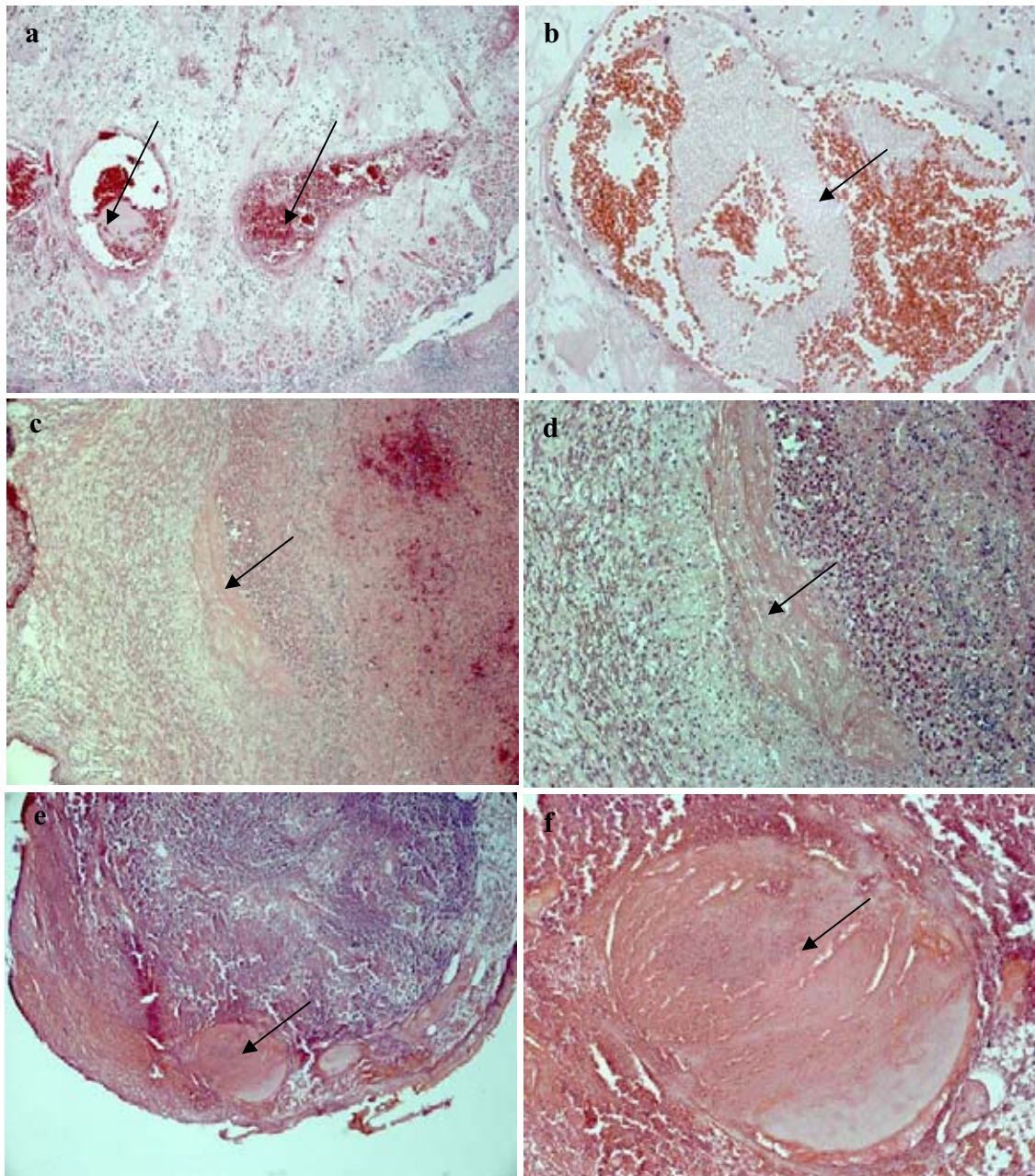


Figura 26: Fotomicrografias apresentando as alterações vasculares comuns nos diferentes tumores após a aplicação da TFD. Em (a; b) tumor lingual 4 NQO; em (c; d) tumor subcutâneo (OSCC), em (e; f) tumor de Ehrlich. As setas indicam os vasos sanguíneos trombóticos.

4. 2. 4. Efeitos adversos da aplicação da Terapia Fotodinâmica

Com exceção da perda de peso e da alopecia detectada nos animais do modelo 4-NQO, não foi detectada nenhum tipo de alteração clinicamente aparente nos demais animais tratados com a TFD. Nos três modelos experimentais não foi observada a formação de lesões em pele possivelmente relacionada à administração do fármaco fotossensibilizador.

5 DISCUSSÃO

5. Discussão

A avaliação de eficiência de um protocolo terapêutico para o tratamento do câncer é extremamente complexa e envolve diversas etapas de avaliação até que se comprove a sua efetividade clínica. Estudos pré-clínicos, envolvendo etapas de ensaios em sistemas de culturas celulares e a utilização de modelos animais experimentais para a avaliação destas terapias é uma dos passos fundamentais para o estabelecimento de protocolos clínicos para o tratamento do câncer em seres humanos.

In vitro

Os resultados obtidos nos experimentos com a cultura celular OSCC, derivada de um carcinoma epidermóide bucal humano, claramente demonstram a alta eficiência da TFD mediada pela AICIFt em formulação lipossomal na destruição destas células tumorais em sistemas de cultura celular. Os achados morfológicos das células OSCC após a aplicação da TFD, que incluem a perda de conteúdo citoplasmático, contração e condensação nuclear além de fragmentação nuclear de parte da cultura, indicam que a morte celular ocorreu por um processo de necrose.

TAPAJÓS et al. (2008) utilizando o mesmo modelo experimental, porém com outra linhagem celular, demonstraram a ocorrência de necrose celular com alterações morfológicas muito semelhantes às apresentadas no presente estudo. Além da morte celular induzida por um processo de necrose, o perfil de viabilidade celular dos grupos tratados apenas com laser ou com o fármaco fotossensibilizador AICIFt isolado foram semelhantes ao dos autores citados acima, demonstrando a reprodutibilidade dos resultados em diferentes linhagens celulares, ambas derivadas de carcinomas epidermóides bucais humanos.

In vivo

Modelo 4-NQO

A indução dos tumores de língua após a aplicação do carcinógeno 4-NQO em camundongos *Swiss* foi realizado com adaptações a protocolos disponíveis na literatura (TANG et al., 2004; GANNOT et al., 2004). A diferença entre o protocolo apresentado nesta dissertação e os protocolos apresentados na literatura é feita na escolha da linhagem de camundongo induzida com o carcinógeno.

A indução de tumores linguais após a aplicação tópica do 4-NQO gerou o desenvolvimento neoplásico em aproximadamente 28% (8/28) dos animais tratados, dado semelhante aos encontrados na literatura. Porém, o tempo de observação necessário para a detecção das lesões nos camundongos *Swiss* (54 semanas) foi maior do que em outras linhagens descritas na literatura. GANNOT et al (2004) utilizando camundongos Balb/c para a indução da carcinogênese, obtiveram o desenvolvimento de neoplasias linguais após aproximadamente 48 semanas de tratamento, sendo 16 de aplicação tópica do carcinógeno. TANG et al (2004) utilizando outra linhagem de camundongos, CBA, obtiveram o desenvolvimento de tumores em aproximadamente 46 semanas de tratamento sendo 16 de aplicação tópica do 4-NQO. Quanto ao percentual de animais com desenvolvimento tumoral, os autores citados obtiveram em torno de 25% dos animais com lesões neoplásicas.

Por se tratar de uma linhagem de camundongo não isogênica, os animais *Swiss* provavelmente apresentam uma resistência aumentada ao desenvolvimento de tumores malignos. ZHANG et al (2006) demonstraram a maior suscetibilidade para o desenvolvimento de tumores bucais em camundongos com maior predisposição genética em comparação a animais normais. No trabalho os autores descreveram o desenvolvimento de tumores em 67% dos camundongos deletados para p53 e 25% de desenvolvimento para camundongos selvagens. O gene p53 é fundamental no controle do ciclo celular, sua supressão está

fortemente relacionada ao desenvolvimento de tumores malignos, pois o controle da proliferação celular fica comprometida (CRUZ et al., 2002).

Perda de Peso – modelos experimentais

Caquexia é uma terminologia médica que indica um estado de desnutrição com significativa perda de peso. Esse sinal clínico é bastante freqüente em pacientes com câncer, em especial, pacientes com câncer de cabeça e pescoço e do trato digestivo superior (VAN BOKHORST-DE VAN DER SCHUEREN et al, 2001). A perda nutricional geralmente é acompanhada por uma depleção geral das funções normais do organismo, gerando um estado de depressão tanto fisiológica quanto emocional (SEGURA et al, 2005).

Os animais induzidos com o carcinógeno 4-NQO apresentaram um estado de caquexia clinicamente visível. Além da perda de peso significativa, a perda de pelos pelo corpo dos animais induzidos com o carcinógeno foi outra alteração clínica detectada nos animais com tumores. Segundo RUSHTON (2002), a alopecia pode estar relacionada à desnutrição e também as deficiências protéicas e de vitaminas que prejudicariam a formação e ancoragem de pelos na pele.

Nos dois modelos experimentais onde foi realizado um acompanhamento clínico mais longo durante a aplicação da TFD, os modelos 4-NQO e *nude*-OSCC, foram detectados importantes diferenças no peso dos animais tratados. Enquanto os animais com tumores linguais (4-NQO) apresentaram uma perda de peso significativa durante o tratamento, os animais com tumores dorsais subcutâneos não apresentaram tal manifestação clínica.

Indivíduos com câncer de cabeça e pescoço possuem maiores chances de desenvolver caquexia em comparação às outras modalidades de tumores em função do risco aumentado do desenvolvimento de disfagia. A disfagia é uma denominação clínica que indica algum tipo de dificuldade de deglutição (RAYKHER et al., 2007). A manifestação da disfagia pode ter diversos fatores etiológicos, um dos principais é a perda de motricidade e capacidade de

contração da musculatura lingual. A língua é um órgão fundamental para a elaboração do bolo alimentar e execução da deglutição propriamente dita (LAZARUS 2006).

A perda de peso dos animais com presença de tumores linguais e dos animais tratados com a TFD pode ser explicada pelo desenvolvimento de alterações no órgão lingual já descritas nos resultados, como a presença de úlceras e tomada de parte da musculatura lingual pelas células neoplásicas. A manifestação da disfagia é um evento comumente encontrado após o tratamento do câncer bucal. GARCIA-PEREZ et al. (2007) descreve que a manifestação desta condição pós-tratamento do câncer de cabeça e pescoço gira em torno de 25%, 60% e 70% após cirurgia, radioterapia e quimioterapia respectivamente. Os resultados apresentados nesta dissertação indicam que medidas paralelas de suplementação nutricional devem ser tomadas para evitar os efeitos da má nutrição relacionadas a aplicação TFD para tumores de boca.

Efeitos da TFD no modelo 4-NQO

A TFD é uma modalidade terapêutica que tem sido preconizada como alternativa de tratamento para alguns casos de tumores de boca (KONAPKA & GOSLINSKI, 2007). No presente trabalho, a aplicação da TFD mediada pela AICIFt em formulação lipossomal nos tumores induzidos com o carcinógeno 4-NQO promoveu a destruição superficial das células tumorais seguida de regeneração epitelial, porém sempre foram detectadas células neoplásicas remanescentes em regiões mais internas da língua.

Utilizando protocolo de indução química de tumores semelhante ao apresentado nesta dissertação, MA et al. (1999) realizaram a aplicação da TFD em tumores linguais de camundongos. Os autores apresentaram a completa destruição das células neoplásicas pela indução de necrose tecidual (48 horas após o tratamento) e regeneração epitelial das úlceras formadas após 10 dias de tratamento. A eliminação total das células tumorais apresentada no artigo, não foi obtida nos experimentos desta dissertação. Esse evento pode ser explicado pela

presença de células neoplásicas em camadas mais profundas da língua do que nos tumores apresentados pelos autores.

Uma das limitações da TFD é a sua profundidade de alcance, relacionado ao poder de penetração das fontes de luz nos tecidos. O poder de penetração da luz aumenta de forma proporcional ao aumento do seu comprimento de onda (NIEMZ, 1996). Como os fotossensibilizadores são ativados quimicamente através de comprimentos de onda específicos, a escolha do fármaco é fundamental para determinar o limite de penetração da TFD (CASTANO et al., 2005). As ftalocianinas pertencem a uma classe de fotossensibilizadores excitados em comprimentos de onda altos, em torno de 650-680 nm, característica que confere um bom poder de penetração da luz a esta classe de fotossensibilizadores, porém lesões mais profundas dificilmente serão atingidas pela TFD (CASTANO et al., 2005).

Uma das alternativas para tal problema é a repetição da aplicação da TFD até que todas as células neoplásicas sejam erradicadas. O planejamento experimental dos animais com tumores induzidos pelo 4-NQO previa a aplicação da TFD em repetições sucessivas até a remissão completa dos tumores. Porém devido à perda acentuada de peso nos animais experimentais, não foi possível realizar as repetições da terapia, e foi decidido realizar o sacrifício dos animais na segunda semana de tratamento.

Modelo nude-OSCC

Uma das características marcantes de praticamente todos os tipos de câncer é a sua capacidade de induzir angiogênese, de modo a poder suprir as necessidades metabólicas para a sobrevivência das células tumorais em crescimento (HASINA & LINGEN, 2001). Devido a uma diferença na quantidade de vasos sanguíneos gerados e o volume de células tumorais em proliferação, geralmente ocorrem focos de necrose nos tumores devido à baixa vascularização em determinados locais do tumor (MINCHINTON & TANNOCK, 2006).

Nos tumores induzidos no subcutâneo dorsal de camundongos *nude* pela injeção das células OSCC foi constatada a presença de massas necróticas ocupando a maior parte de todos os tumores, inclusive os controle. Segundo KELLAND (2004) a presença de massas tumorais nesse modelo experimental é comum e chega a ocupar 20-80% do volume tumoral total, sendo que o tamanho das áreas de necrose desenvolvidas depende principalmente da linhagem tumoral injetada. A necrose tumoral desenvolvida pela falta de oxigenação local devido à baixa vascularização é denominada de necrose por hipóxia (VAUPEL & MAYER, 2007).

A linhagem celular OSCC não apresentou uma grande indução angiogênica, promovendo a formação de tumores com células viáveis somente em regiões próximas a vascularização sanguínea. Nos tumores tratados com TFD, a necrose tecidual progrediu tanto de dentro para fora (necrose por hipóxia) quanto de fora para dentro dos tumores (necrose induzida pela terapia). Essa característica dificultou a quantificação precisa das áreas com necrose devido ao tratamento utilizado. Em contrapartida, alguns importantes dados podem ser extraídos deste modelo experimental como a destruição das células tumorais viáveis nos tumores tratados e a manutenção da viabilidade celular dos demais tipos teciduais presentes na pele adjacente ao tumor.

Um dos princípios básicos que estimulam a utilização da TFD como alternativa ao tratamento do câncer é sua retenção por maior tempo nas células neoplásicas, diminuindo desta forma efeitos colaterais adversos comuns em outras modalidades terapêuticas (HENDERSON & DOUGUERTY, 1992; CASTANO et al., 2005). A detecção da viabilidade celular das células da pele dos camundongos *nude* foi uma forma de se demonstrar a seletividade da aplicação da TFD mediada pela AICIFt em formulação lipossomal sobre as células tumorais. Como a administração do fármaco foi realizada de forma sistêmica, fica evidente que somente as células tumorais realizaram sua retenção intracelular no momento da iluminação com laser.

O crescimento dos tumores controle e tratado mantiveram o mesmo padrão até a segunda semana de tratamento, havendo uma diminuição no crescimento dos tumores tratados com a TFD na última semana de aplicação. Mesmo com a diminuição do padrão de crescimento, ainda foi identificado certo aumento volumétrico nos tumores tratados até o final dos experimentos. Como foi descrito nos resultados, células tumorais viáveis foram identificadas em pequena quantidade nos tumores tratados. A hipótese para tal evento é que a aplicação da TFD não foi capaz de destruir 100% das células OSCC proliferantes no subcutâneo e as células remanescentes a este tratamento inicial realizaram a proliferação celular e conseqüentemente aumentavam o volume tumoral. Em contrapartida, os tumores controle realizaram seu crescimento sem a pressão citotóxica exercida pela aplicação da TFD, e obtiveram um ganho volumétrico maior do que os tumores tratados.

Modelo Tumor de Ehrlich

Contrariamente ao modelo *nude*-OSCC, a injeção de células derivadas do tumor de Ehrlich não promoveu a formação de tumores com grandes massas necróticas. Os tumores do grupo controle apresentaram focos insignificantes de necrose dentro de toda a massa tumoral. Essas alterações de comportamento provavelmente são reflexos da injeção das células tumorais na língua, um órgão mais vascularizado do que o subcutâneo dos camundongos *nude*.

CHEN et al. (2005) compararam o padrão de crescimento de uma linhagem celular derivada de adenocarcinoma de próstata no subcutâneo e na própria próstata de animais experimentais. Os autores demonstraram que os tumores injetados na próstata obtiveram um crescimento mais acelerado em comparação aos tumores subcutâneos. Adicionalmente, os mesmos autores descreveram maiores áreas de hipóxia nos tumores subcutâneos em comparação aos tumores prostáticos, comprovando que a oferta de oxigênio é um valor determinante no crescimento e viabilidade tumoral.

A porcentagem de área tumoral infiltrada na língua dos camundongos foi de 70-80% de toda a massa do órgão. A diferença entre os grupos experimentais não foi significativa, demonstrando a homogeneidade da amostra de tumores experimentais em todos os grupos de tratamento.

Dos quatro grupos experimentais utilizados neste estudo com o tumor de Ehrlich, somente os grupos tratados com TFD e AICIFt apresentaram a presença de massas necróticas detectáveis, sendo apenas as áreas de necrose do grupo TFD estatisticamente diferentes do grupo controle. A forma de injeção peritumoral da AICIFt pode ser um fator importante na formação de áreas de necrose devido a pressão física da injeção do fármaco na língua dos animais. OTA et al. (*article in press*) descreveram que a injeção intratumoral de um fármaco pode induzir a formação de edema e lesão tecidual branda devida à pressão física da entrada do líquido no interstício do tumor, que poderia explicar a presença de necrose tecidual nos tumores tratados com a AICIFt.

Os tumores tratados com a TFD apresentaram em média aproximadamente 90% das áreas tumorais com morte celular por necrose. Porém contrariamente aos tumores *nude*-OSCC tratados, os tumores de Ehrlich tratados com a TFD não apresentaram a manutenção da viabilidade celular das células normais pertencentes à mucosa lingual, formando áreas de úlcera onde foi aplicada a iluminação com laser. A hipótese para essa observação é o tempo de biodistribuição da AICIFt diferenciado nos dois modelos experimentais. No modelo tumor de Ehrlich o tempo de biodistribuição foi de 3 horas após a injeção peritumoral do fotossensibilizador, enquanto que nos tumores *nude*-OSCC o tempo para a biodistribuição do fármaco foi de 24 horas após a injeção intraperitoneal.

A retenção dos fármacos fotossensibilizadores pelas células tumorais é dependente de uma série de fatores relacionadas tanto a estrutura química das drogas quanto as estratégias utilizadas para a sua biodistribuição. Alguns autores inclusive consideram que as drogas

fotossensibilizadoras não precisam ser absorvidas pelas células tumorais para que haja um efeito da TFD positivo. BRUN et al. (2004) descrevem que a ausência do fármaco nos tumores, porém a sua presença dentro da vascularização tumoral é suficiente para que a terapia seja efetiva na destruição tumoral. A localização dos fármacos na luz de vasos, e sua subsequente ativação fotoquímica irá gerar os efeitos lesivos nos vasos sanguíneos, que representa um dos mecanismos efetores da TFD.

Para que haja efetividade na aplicação da TFD, os três elementos fundamentais da terapia: fármaco fotossensibilizador, oxigênio e luz, devem estar presentes de maneira simultânea no microambiente tumoral, seja na luz dos vasos sanguíneos, seja no interior das células tumorais. Dentro deste contexto, variando o tempo de aplicação do laser após a administração do fármaco fotossensibilizador, a terapia pode ter como alvo preferencial os vasos sanguíneos do microambiente tumoral ou as próprias células tumorais. Um tempo de espera curto para a iluminação com laser atinge de maneira mais efetiva os vasos sanguíneos, enquanto que o aumento neste tempo permite que as moléculas do fármaco sejam absorvidas pelas células tumorais e se localizem no ambiente intracelular e promovam um citotoxicidade direta às células tumorais (CHEN et al., 2005).

Mecanismos Biológicos relacionados à destruição tumoral

Uma análise comparativa dos três modelos experimentais mostrou que existem diferenças nos resultados obtidos após a aplicação da Terapia Fotodinâmica, relacionadas às características de cada modelo experimental. Em contrapartida alguns eventos biológicos relacionadas ao controle tumoral foram observados em todas as abordagens investigativas.

Os três mecanismos efetores relacionados ao controle tumoral pela TFD são a citotoxicidade direta as células neoplásicas, os danos aos vasos tumorais após a aplicação da terapia e a ativação do sistema imunológico em um momento tardio (DOLMANS et al., 2003). A aplicação da TFD nos três modelos tumorais utilizados neste estudo apresentaram

como pontos em comum as (1) lesões vasculares associadas à presença de (2) áreas de necrose nos tumores tratados.

A descrição destes eventos biológicos é comum a vários trabalhos disponíveis na literatura (BOBROV et al., 2007; TOGASHI et al., 2006; HARROD-KIM, 2006). Alguns autores discutem a importância que cada mecanismo efetor da terapia possui no controle tumoral. TRISSCHEINJ et al (2005) demonstraram que a resposta de tumores a aplicação da TFD é diretamente correlacionada ao aumento das áreas de hipóxia local nos tumores. Esses dados indicam que os eventos vasculares relacionados à TFD têm grande importância no seu efeito final. As consequências aos danos vasculares são mais severas aos tecidos tumorais em comparação aos tecidos normais pelo fato de que os vasos sanguíneos nos tecidos normais são mais bem estruturados. Esse fato permitiria uma melhor recuperação vascular nos tecidos normais (JAIN et al., 2002).

Uma série de eventos fisiológicos é desenvolvida após a indução de morte celular direta das células tumorais após a aplicação da TFD. A liberação de fosfolípidios de membrana após a morte celular promove o início do processo inflamatório com o aporte de grande quantidade de células de defesas e ativação do sistema complemento. O início do processo inflamatório é acompanhado pela ativação vascular e recrutamento de células de defesa, em especial polimorfonucleares, que irão auxiliar na promoção da destruição tumoral (CECIC et al., 2006). Em momentos mais tardios o recrutamento de células de defesa proporciona o estabelecimento de mecanismos de defesas de memória (KOUSIS et al., 2007).

Tomados em conjunto, os resultados apresentados nesta dissertação demonstram que diferentes mecanismos efetores da TFD atuam de maneira sinérgica na eliminação de células tumorais. Os eventos relacionados à citotoxicidade da TFD foram primeiramente demonstrados em um sistema de cultura celular, onde células derivadas de um carcinoma epidermóide foram praticamente eliminadas após a aplicação da terapia. A análise dos dados referentes à

experimentação *in vivo*, comprovou que a TFD possui mecanismos de controle tumoral que extrapolam a citotoxicidade direta as células tumorais, como a sua ação contra a vascularização tumoral. Como estas observações foram obtidas a partir de três diferentes modelos de câncer bucal, com origens biológicas totalmente diferentes, podemos inferir que o protocolo de aplicação da TFD mediada pela AICIFt apresenta excelentes perspectivas para a sua utilização em ensaios clínicos posteriores.

6 CONCLUSÕES

6. Conclusões

1. A aplicação da Terapia Fotodinâmica mediada por AICIFt demonstrou ser eficiente na eliminação das células OSCC, derivadas de um carcinoma epidermóide bucal humano.
2. Foram obtidos com sucesso, diferentes modelos para estudo do câncer bucal tanto em camundongos imunocompetentes, quanto em camundongos imunossuprimidos. No processo de indução dos tumores linguais com o carcinógeno 4-NQO, ficou constatado que medidas de suporte nutricional devem ser tomadas para a prevenção da perda de peso dos animais experimentais.
3. A aplicação da TFD mostrou-se eficiente na eliminação de células neoplásicas superficiais no modelo 4-NQO, bem como na indução de danos vasculares. No acompanhamento dos animais durante a aplicação da terapia por duas semanas ficou constatado que medidas de suporte nutricional devem ser tomadas durante o a aplicação da TFD.
4. Nos modelos *nude*-OSCC e tumor de Ehrlich, concluímos que a aplicação da TFD mediada pela AICIFt foi capaz de eliminar grande parte dos tecidos tumorais, por meio de claro efeito tóxico no suprimento sanguíneo dos tumores tratados.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. Referências Bibliográficas

ALLISON, R. R.; DOWNIE, G. H.; CUENCA, R.; HU, X, H.; CHILDS, C. J. H.; SIBATA, C. H. Photosensitizers in clinical PDT. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 1, n. 1, p. 27-42, 2004.

BIEL, M.A. Photodynamic therapy treatment of early oral and laryngeal cancers. **Photochemical Photobiology**, v. 83, n.5, p.1063-1068, 2007.

BOBROV, N.; ČAVARGA, I.; LONGAUER, F.; RYBÁROVÁ, S.; FEDOROČKO, P.; BREZÁNI, P.; MIŠKOVSKÝ, P.; MIROSSAY, L.; ŠTUBŇA, J. Histomorphological changes in murine fibrosarcoma after hypericin-based photodynamic therapy. **Phytomedicine**, v.14, n.2-3, p. 172-178, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer – INCA, Estimativas da incidência e mortalidade por câncer. Rio de Janeiro: INCA, 2008.

BRUN, P. H.; DEGROOT, J. L.; DICKSON, E. F. G.; FARAHANIB, M.; POTTIER, R. H.. Determination of the in vivo pharmacokinetics of palladium-bacteriopheophorbide (WST09) in EMT6 tumour-bearing Balb/c mice using graphite furnace atomic absorption spectroscopy. **Photochemical and Photobiology Science**, v. 3, p. 1006-1010, 2004.

BUYTAERT, E.; DEWAELE, M.; AGOSTINIS, P. Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy. **Biochim. Biophys Acta**, v. 1776, n. 1, p. 86-107, 2007.

CASTANO, A. P.; DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: Part three—Photosensitizer pharmacokinetics, biodistribution, tumor localization and modes of tumor destruction. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 2, n. 2, p. 91-106, 2005.

CASTANO, A.P., MROZ, P., HAMBLIN, M.R. Photodynamic therapy and anti-tumour immunity. **Nature Cancer Reviews**, v.6, p. 535-545, 2006.

CECIC, I.; STOTT, B.; KORBELIK, M. Acute phase response-associated systemic neutrophil mobilization in mice bearing tumors treated by photodynamic therapy. **International Immunopharmacology**, v.6, n.8, p.1259-1266, 2006.

CHANDU, A.; SMITH, A. C. H.; ROGERS, S. N. Health-Related Quality of Life in Oral Cancer: A Review. **Journal Oral Maxillofacial Surgery**, v. 64, p. 485-502, 2006.

CHEN, B.; POGUE, B. W.; HOOPES, J.; HASAN, T. Combining vascular and cellular targeting regimens enhances the efficacy of photodynamic therapy. **International Journal Radiation Oncology Biological Physical**, v. 61, n. 4, p. 1216-1226, 2005.

CHEN, B.; POGUE, B. W.; ZHOU, X.; O'HARA, J. A. HOOPS, P. J.; HASSAN, T. Effect of Tumor Host Microenvironment on Photodynamic Therapy in a Rat Prostate Tumor Model. **Clinical Cancer Research**, v. 11, p. 720-727, 2005.

CHEN, H.M.; CHEN, C. T.; YANG, H.; LEE, M.I.; KUO, M.Y.; KUO, Y.S.; WANG, Y.P.; TSAI, T.; CHIANG, C.P. Successful treatment of an extensive verrucous carcinoma with topical 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy. **Journal Oral Pathology Medicine**, v. 34, n. 4, p. 253-256, 2005.

CRUZ, I.; NAPIER, S. S.; VAN DER WAAL, I.; SNIJDERS, P. J. F.; WALBOOMERS, J. M. M.; LAMEY, P. J.; COWAN, C. G.; GREGG, T. A.; MAXWELL, P.; MEIJER, C. J. M. Suprabasal p53 immunoexpression is strongly associated with high grade dysplasia and risk for malignant transformation in potentially malignant oral lesions from Northern Ireland. **Journal Clinical Pathology**, v. 55, n. 2, p. 98-104, 2002.

DOLMANS, D. E.; FUKUMURA, D.; JAIN, R. K. Photodynamic therapy for cancer. **Nature Review Cancer**, v. 3, n. 5, p. 380-387, 2003.

DOUGHERTY, T. J.; GOMER, C. J.; HENDERSON, B. W.; JORI, G.; KESSEL, D.; KOBERLIK, M.; MOAN, J.; PENG, Q. Photodynamic Therapy. **Journal National Cancer Institute**, v. 90, n. 12, p. 889-905, 1998.

DOUGHERTY, T.J.; MARCUS, S.L. Photodynamic therapy. **European Journal of Câncer**, v.28, v.10, n.1734-1742, 1992.

GANNOT, G.; BUCHNER, A.; KEISARI, Y. Interaction between the immune system and tongue squamous cell carcinoma induced by 4-nitroquinoline N-oxide in mice. **Oral Oncology**, v. 40, n. 3, p. 287-297, 2004.

GARCÍA-PERIS, P.; PARÓN, L.; VELASCO, C.; DE LA CUERDA, C.; CAMBLOR, M.; BRETÓN, I.; HERENCIA, H.; VERDAGUER, J.; NAVARRO, C.; CLAVE, P. Long-term prevalence of oropharyngeal dysphagia in head and neck cancer patients: Impact on quality of life. **Clinical Nutrition**, v. 26, n.6, p.710-717, 2007.

HARROD-KIM, P. Tumor ablation with photodynamic therapy: introduction to mechanism and clinical applications. **Journal Vascular Intervention Radiology**, v. 17, n. 9, p. 1441-1448, 2006.

HASINA, R.; LINGEN, M. W. Angiogenesis in oral cancer. **Journal Dental Research**, v. 65, n. 11, p. 1282-1290, 2001.

HENDERSON, B. W.; DOUGHERTY, T. J. How does photodynamic work? **Photochemistry and Photobiology**, v. 55, n. 1, p. 145-157, 1992.

HOPPER, C.; NIZIOL, C.; SHIDHU, M. The cost-effectiveness of Foscan mediated photodynamic therapy (Foscan-PDT) compared with extensive palliative surgery and palliative chemotherapy for patients with advanced head and neck cancer in the UK. **Oral Oncology**, v. 40, n. 4, p. 372-382, 2004.

HURSTING, S. D.; SLAGA T. J.; FISCHER, S. M.; DIGIOVANNI, J.; PHANG, J. M. Mechanism-Based Cancer Prevention Approaches: Targets, Examples, and the Use of Transgenic Mice. **JNCI Journal of the National Cancer Institute**, v. 91, n. 3, p.215-225, 1999.

JAIN, R. K. K. J.; MUNN, L. L.; FKUMURA, D. Dissecting tumour pathophysiology using intravital microscopy. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, p. 266-276, 2002.

KELLAND, L. R. Of mice and men: values and liabilities of the athymic nude mouse model in anticancer drug development. **European Journal Cancer**, v. 40, n. 6, p. 827-836, 2004.

KNOWLES, M.; SELBY, P. **Introduction to the Cellular and Molecular Biology of Cancer**. Oxford-Bioscience, 2005.

KOJIMA, A.; MAEDA, H.; SUGITA, Y.; TANAKA, S.; KAMEYAMA, Y. Human papillomavirus type 38 infection in oral squamous cell carcinomas. **Oral Oncology**, v. 38, p. 591-596, 2002.

KONAPKA, K.; GOSLINSKI, T. Photodynamic therapy in dentistry. **Journal of Dental research**, v. 86, n. 8, p. 694-707, 2007.

KONOJIA, D.; VAIDYA, M. M. 4-nitroquinoline-1-oxide induced experimental oral carcinogenesis. **Oral Oncology**, v. 42, n. 7, p. 655-667, 2006.

KOUSIS, P. C.; HENDERNOS, B. W.; MAIER, P.; G. GOLLNICK. Photodynamic therapy enhancement of antitumor immunity is regulated by neutrophils. **Cancer Research**, v. 67, n.21, p.10501-10, 2007.

KRAMMER, B. Vascular effects of photodynamic therapy. **Anticancer Research**, v. 21, n.6b, p. 4271-4277, 2001.

LAZARUS, C. Tongue Strength and Exercise in Healthy Individuals and in Head and Neck Cancer Patients. **Seminars Speech Lang**, v. 27, p. 260-267, 2006.

LIU, L.; KUMAR, S. K.; SEDGHIZADEH, P. P.; JAYAKAR, A. N.; SHULER, C. F. Oral squamous cell carcinoma incidence by subsite among diverse racial and ethnic populations in California. **Journal Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology Endodontics**, article in press, 2008.

LOVE, W. G.; DUK, S.; BIOLO, R.; JORI, G.; TAYLOR, P. W. Liposome-mediated delivery of photosensitizers: localization of zinc (II)-phthalocyanine within implanted tumors after intravenous administration. **Photochemical Photobiology**, v. 63, n. 5, p 656-661, 1996.

LUKSIENE, Z. Photodynamic therapy: mechanisms of action and ways to improve the efficiency of treatment. **Medicina**, v. 39, n. 12, p. 1137-1149, 2003.

LUNG, T.; TASCAU, O. C.; ALMASAN, H. A.; MURESAN, O. Head and neck cancer, treatment, evolution and post therapeutic survival – Part 2: A decade's results 1993–2002. **Journal of Cranio-Maxilo Surgery**, v. 35, p. 126-131, 2007.

MA, G.; IKEDA, H.; INOKUCHI, T.; SANO, K. Effect of photodynamic therapy using 5-aminolevulinic acid on 4-nitroquinoline-1-oxide-induced premalignant and malignant lesions of mouse tongue. **Oral Oncology**, v.35, n. 1, p.120-124, 1999.

MECKLENBURG, L.; TYCHSEN, B.; PAUS, R. Learning from nudity: lessons from the nude phenotype. **Experimental Dermatology**, v. 14, n. 11, p. 797-810, 2005.

MENZIN, J.; LINES, L. M.; MANNING, L. M. The economics of squamous cell carcinoma of the head and neck. **Head and Neck Surgery**, v. 15, p. 68-73, 2006.

MERLO, L. M.F.; PEPPER, J. W.; REID, B. J.; MALEY, C. C. Cancer as an evolutionary and ecological process. **Nature Reviews Cancer**, v.6, 924-935.

MINCHINTON, A. I.; TANNOCK, I. F. Drug penetration in solid tumors. **Nature Reviews in Cancer**, v. 16, p. 283-292, 2006.

MOGNETTI, B.; DI CARLO, F.; BERTA, G. N. Animals models in oral cancer research. **Oral Oncology**, v. 42, n. 5, p. 448-460, 2006.

NIEMS, M. H. **Laser-tissue interactions: fundamental applications**. On-line library: springer, 1996.

OLIVEIRA, D. M.; LACAVA, Z. G.; LIMA, E.C.; MORAIS, P. C.; TEDESCO, A. C. Zinc phthalocyanine/magnetic fluid complex: a promising dual nanostructured system for cancer treatment. **Journal Nanoscience Nanotechnology**, v. 6, n. 8, p. 2432-7, 2006.

ORD, R. A.; BLANCHAERT, R. H. Current management of oral cancer. *Jornal of American Dental Association*, v, 132, p. 19-23, 2001.

OTA, J.; GIULIANO, E. A.; COHN, L. A.; LEWIS, M. R.; MOORE, C. P. Local photodynamic therapy for equine squamous cell carcinoma: Evaluation of a novel treatment method in a murine model. **The Veterinary Journal** article in press, 2008.

PEREIRA, M. C.; OLIVEIRA, D. T.; LANDMAN, G.; KOWALSKI, L. P. Histologic Subtypes of Oral Squamous Cell Carcinoma: Prognostic Relevance. **Journal of Canadian Dental Association**, v. 73, n. 4, 2007.

RAYKHER, A.; RUSSO, L.; SCHATNER, M.; SCHWARTZ, L.; SCOTT, B.; SHIKE, M. Enteral nutritional support of head and neck cancer patients. **Nutrition Clinical Practice**, v. 22, n. 1, p. 68-73, 2007.

RELLO, S.; STOCKERT, J. C.; MORENO, V.; G'AMEZ, A.; PACHECO, M.; JUARRANZ, A.; CA'NETE, M.; VILLNEUCA, A. Morphological criteria to distinguish cell death induced by apoptotic and necrotic treatments. **Apoptosis**, v. 10, p. 201-208, 2005.

RICH, T.; ALLEN, R. L.; WYLLIE, A. H. Defying death after DNA damage. **Nature**, **407**: 777-783, 2000.

RUSHTON, D. H. Nutritional factors and hair loss. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 27, n. 5, p. 396-404, 2002.

SANNOMIYA, E. K.; FURUKAWA, S. Diferentes métodos de tratamento radioterápico em tumores da cavidade bucal e suas complicações. **RBO**, v. 57, p. 336-338, 2000.

SCIUBBA, J. J. Oral câncer and its detection. **Jornal of American Dental Association**, v.132, p.12-18, 2001.

SCULLY, C.; FIELD, J. K.; TANZAWA, H. Genetic aberrations in oral or head neck squamous cell carcinoma (SCCHN): 1. Carcinogen metabolism, DNA repair and cell cycle control. **Oral Oncology**, v. 36, p. 256-263, 2000.

SEGURA, A.; PARDO, J.; JARA, C.; ZUGAZABEITIA, L.; CARULLA, J.; DE LAS PEÑAS, R.; GARCÍA-CABRERA, E.; AZUARA, M. L.; CASADÓ, J.; GÓMEZ-CANDELA, C.. An epidemiological evaluation of the prevalence of malnutrition in Spanish patients with locally advanced or metastatic câncer.Clinical. **Nutrition**, v. 24, n. 5, p. 801-814, 2005.

SIBATA, M. N.; TEDESCO, A. C.; MARCHETTI, J. M. Photophysicals and photochemicals studies of zinc(II) phthalocyanine in long time circulation micelles for photodynamic therapy use. **European Journal Pharmacy Science**, v.23, n. 2, 131-138, 2004.

SILVERMAN Jr, S. Demographics and occurrence of oral and pharyngeal cancers. **Journal of American Dental Association**, v. 132, p. 7-11, 2001.

TANG, X. H.; KNUDSEN, B.; BEMIS, D.; TCKOO, S.; GUDAS, L. J. Oral Cavity and Esophageal Carcinogenesis Modeled in Carcinogen-Treated Mice. **Clinical Cancer Research**, v. 10, p. 301-313, 2004.

TAPAJÓS, E. C. C.; LONGO, J. P.; SIMIONI, A. R.; LACAVA, Z. G. M.; SANTOS, M. F. M. A.; MORAIS, P. C.; TEDESCO, A. C.; AZEVEDO, R. B. In vitro photodynamic therapy on human oral Keratinocytes cells using chloroaluminum-phthalocyanine. **Oral Oncology**, artigo aceito para publicação, 2008.

TODD, R.; DONOFF, R. B.; WONGD, T. W. The molecular biology of oral carcinogenesis: toward a tumor progression model. **J Oral Maxillofac Surg**, **55**, (6): 613-623, 1997.

TOGASHI, H.; UEHARA, M.; IKEDA, H.; INIKUCHI, T. Fractionated photodynamic therapy for a human oral squamous cell carcinoma xenograft. **Oral Oncology**, v. 42, n. 5, p. 526-532, 2006.

TRIESSCHEIJN, M.; RUEVEKAMP, M.; AALDERS, M.; BAAS, P.; STEWART, F. A. Outcome of mTHPC Mediated Photodynamic Therapy is Primarily Determined by the Vascular Response. **Photochemistry and Photobiology**, v. 81, p.1161–1167, 2005.

VAN BOKHORST-DE VAN DER SCHUEREN, M. A. E.; QUAK, J. J.; VON BLOMBERG-VAN DER FLIER, B. M. E.; KUIK, D. J.; LANGENDOEN, S. I.; SNOW, G. B.; GREEN, C. J.; VAN LEEUWEN, P. A. M. Effect of perioperative nutrition, with and without arginine supplementation, on nutritional status, immune function, postoperative morbidity, and survival in severely malnourished head and neck cancer patients. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, n. 2, p.323-332, 2001.

VAUPEL, P.; MAYER, A. Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome. **Cancer Metastasis Review**, v. 26, p. 225-239, 2007.

ZHANG, Z.; WANG, Y.; YAO, R.; LUBET, R. A.; YOU, M. p53 Transgenic Mice Are Highly Susceptible to 4-Nitroquinoline-1-Oxide-Induced Oral Cancer. **Molecular Cancer Research**, v. 4, p. 401-410, 2006.