

Universidade de Brasília
Faculdade de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

**AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DA TERAPIA FOTODINÂMICA
MEDIADA PELA ALUMÍNIO CLORO FTALOCIANINA-ALPHCL-
LIPOSSOMAL NO TRATAMENTO DE CÉLULAS DERIVADAS DO
CÂNCER BUCAL E SUA ATUAÇÃO NA REGULAÇÃO DA VIA DE
SINALIZAÇÃO PI3K/AKT/MTOR.**

NATHÁLIA VIEIRA VELLOSO

Orientador: Prof.Dr. Ricardo Bentes Azevedo

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde, como parte
integrante dos requisitos para a
obtenção do título de Mestre em
Ciências da Saúde.

Brasília
2009

VELLOSO, Nathália Vieira Velloso. Avaliação da eficácia da Terapia Fotodinâmica mediada pela Alumínio Cloro Ftalocianina - AIPHCl - lipossomal no tratamento de células derivadas do câncer bucal e sua atuação na regulação da via de sinalização PI3K/AKT/mTOR. Brasília: UNB - Universidade de Brasília, Março de 2009. 75 p. (Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, como parte integrante dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde).

Resumo: O presente trabalho teve como objetivo avaliar através de testes citotóxicos e citostáticos a eficácia da Terapia Fotodinâmica mediada pela alumínio cloro ftalocianina-AIPHCl-lipossomal (AIPHCl) no tratamento de células derivadas do câncer bucal e verificar por análise de imunofluorescência sua atuação na regulação da via de sinalização PI3K/AKT/mTOR, uma via de sinalização que vem sendo amplamente correlacionada com a carcinogênese.

Palavras-chave: Terapia Fotodinâmica, Câncer Bucal, apoptose, mTOR.

Dedicatória

Dedico esta dissertação de mestrado...

A Deus. “Para Ti, Senhor, para tua Glória e por amor.”

Aos meus super pais, Heloise e Robinson, os primeiros a me ensinarem a buscar o valor Divino do humano.

“Deus nos espera cada dia: no laboratório, na sala de operações de um hospital, no quartel, na cátedra universitária, na fábrica, na oficina, no campo, no seio do lar e em todo o imenso panorama do trabalho. Não esqueçamos nunca: há algo de santo, de divino, escondido nas situações mais comuns, algo que a cada um de nós compete descobrir.”

(São Josemaria Escrivá de Balaguer)

Agradecimentos

Ao Professor Ricardo Bentes, meu querido orientador, pelo ensino, confiança e exemplo.

Ao Dr. Silvio Gutkind, pelo incentivo e oportunidade de começar e continuar a trabalhar com a pesquisa científica.

Ao Walt e John Basile, pelo modo como me ensinaram a trabalhar.

Ao Professor Antônio Cláudio Tedesco e sua equipe, em especial à Daniela Cervanelle por terem gentilmente produzido e enviado as amostras utilizadas neste trabalho.

Aos Professores Albino Magalhães e Anamélia Bocca pela atenção e ajuda nas análises.

À querida Jaqueline Rodrigues, quem me ajudou todo o tempo durante este mestrado. Obrigada pelo ensino, e, sobretudo pela amizade.

À Patrícia Cunha e Graziella Joanitti pela amizade e disponibilidade de ajudar a todo o momento.

Ao João Paulo Longo e Priscila Malnati pelo fundamental incentivo e a este trabalho, desde a graduação.

A todos os colegas e técnicos do Laboratório de Morfologia e Morfogênese.

À Professora Sônia Bao e sua equipe do Laboratório de Microscopia Eletrônica, em especial à Shélida, pela análise na Microscopia Confocal.

A todas queridas do Centro Cultural Lajedo, este trabalho só foi possível pelo apoio de cada uma.

Aos meus pais que sempre me incentivaram e apoiaram em tudo.

À minha querida irmã, Fernanda, pela paciência, carinho e ajuda, sempre.

Ao meu querido irmão, Robinho, for always being (good) there.

À Universidade de Brasília, pela oportunidade de estudo desde a graduação.

Ao CNPQ, FINEP, MCT, CAPES, FAP-DF, FINATEC pelo auxílio financeiro.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento desta pesquisa.

Resumo

A Terapia Fotodinâmica (TFD) apresenta grande potencial para o tratamento de câncer de boca. Enquanto as terapias mais difundidas contra o câncer tendem a ser imunossupressoras, a TFD configura-se como uma terapia local capaz de destruir eficientemente as células tumorais ao mesmo tempo em que estimula o sistema imune a procurar e destruir metástases. A TFD consiste na administração de um fármaco não-tóxico, por via sistêmica, local ou tópica, seguida da aplicação de uma dose específica de luz visível sobre o tecido ou lesão a ser tratada.

Avanços recentes no entendimento biomolecular da iniciação, progressão e conseqüentes metástases do carcinoma epidermóide bucal estão possibilitando o melhor entendimento desta patologia bem como a descoberta de moléculas chaves para a aplicação terapêutica.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar através de testes citotóxicos e citostáticos a eficácia da Terapia Fotodinâmica mediada pela alumínio cloro ftalocianina-AIPHCl-lipossomal (AIPHCl) no tratamento de células derivadas do câncer bucal e verificar por análise de imunofluorescência sua atuação na regulação da via de sinalização PI3K/AKT/mTOR, uma via de sinalização que vem sendo amplamente correlacionada com a carcinogênese.

Os resultados apresentados nesta dissertação demonstram que o tratamento com a TFD utilizando-se AIPHCl lipossomal suscita diferentes mecanismos de morte celular dose-dependente, sendo a apoptose a via principal envolvida, e pode ainda regular a proliferação, crescimento, e outros processos celulares pela inibição da via do mTOR.

Desta forma, a TFD utilizando-se AIPHCl lipossomal apresenta grandes possibilidades para o tratamento do câncer bucal. Acredita-se que, combinada com terapias como a quimioterapia ou a radioterapia, esta modalidade terapêutica possa ser ainda mais eficaz no tratamento do câncer bucal.

Abstract

Photodynamic Therapy (PDT) presents great potential for oral cancer treatment. PDT is known as a local therapy that not only destroy the primary tumor, but also trigger the immune system to recognize, to track down and to destroy remaining tumor cells.

PDT can be defined as the administration of a nontoxic drug or dye known as a PS to a patient bearing a lesion, either systemically, locally, or topically, followed by the illumination of the lesion with visible light which, in the presence of oxygen, leads to the generation of cytotoxic species and, consequently, to cell death and tissue destruction.

Recent advances in the biomolecular knowledge of initiation, progression and consequent metastases of oral squamous cell carcinoma are contributing to construct a better understanding of this pathology and also to discover molecule keys for the therapeutical application.

This present work aimed to evaluate the effectiveness of Photodynamic Therapy using Chloroaluminum-phthalocyanine-ALPHCI-liposomal in the oral cancer treatment and its effects on PI3K/AKT/mTOR signaling pathway, which have been reported as a frequent event activated in squamous cell carcinoma.

The presented results in vitro demonstrate that the treatment with PDT using liposomal ALPHCI excites different mechanisms of dose-dependant, cellular death being apoptose the main triggered pathway triggered, and can still regulate the proliferation, growth, and other processes for the inhibition of mTOR. In such a way, the PDT using liposomal ALPHCI presents great possibilities for the oral cancer treatment.

Lista de abreviaturas

4E-BP - proteína de ligação 4E
AKT - proteína quinase B
ALA - Ácido 5-Aminolevulínico
ALPHC - Alumínio Cloro Ftalocianina
ANOVA - análise de Variância
ATP - Adenosina tri-fosfato
DAPI - diamidino-2-fenilindol
EGFR - receptores de crescimento epidermóide
eIF4E - fator de tradução
FITC – isotiocianato de fluoresceína
FS - fotossensibilizador
FSC – *forward angle light scatter*
INCA – Instituto Nacional do Câncer
MAPK - proteína quinase mitogênica ativada
mTOR - *mammalian target of rapamycin*
MTT – brometo de 3(4,5 dimetiltiazol-2,5-difenil-tetrazólio)
NIH 3T3 - células de Fibroblasto
OSCC 3 – *Oral Squamous Cell Carcinoma*
p70S6K - proteína ribossomal S6 quinase
PBS – Tampão Fosfato Salina
PI3K – Fosfatidilinositol-quinase
PKC – proteína quinase C
PTEN - gene homólogo ao da fosfatase e tensina
PDT – *Photodynamic Therapy*
ROS - oxigênio reativo
SSC – *side angle light scatter*
TFD - terapia fotodinâmica
TSG - Genes Supressores de Tumor
ZnPc - Zinco-ftalocianina

Lista de figuras

Figura 1. Via PI3K/AKT/mTOR.....	6
Figura 2. Modo de ação da Terapia Fotodinâmica	9
Figura 3. Vias de reação fotoquímica	12
Figura 4. Desenho Experimental para os testes <i>In Vitro</i>	20
Figura 5. Grupos experimentais <i>In Vitro</i>	23
Figura 6. Protocolo do tratamento empregado	24
Figura 7. Viabilidade das células OSCC3, avaliada pelo método do MTT....	31
Figura 8. Viabilidade das células NIH 3T3, avaliada pelo método do MTT...	32
Figura 9. Análise da morfologia das células OSCC 3 por Microscopia de Contraste de Fase.	33
Figura 10. Análise da morfologia das células NIH 3T3 por Microscopia de Contraste de Fase.	35
Figura 11. Relação de granulosidade (SSC) e tamanho (FSC) de células OSCC 3.....	36
Figura 12. Integridade da membrana plasmática das células OSCC 3.....	37
Figura 13. Integridade da membrana plasmática das células NIH 3T3.....	37
Figura 14. Fragmentação de DNA das células OSCC 3	38
Figura 15. Potencial de Membrana Mitocondrial das células OSCC 3.....	39
Figura 16. Avaliação da proliferação das células OSCC 3	40
Figura 17. Ciclo celular das células OSCC 3.....	41
Figura 18. Microscopia Confocal das células OSCC 3, grupo Controle	42
Figura 19. Microscopia Confocal das células OSCC 3, grupo Tratado com TFD 2,5µM.	42

Lista de Tabelas

Tabela 1. Estimativas, para o ano 2008, do número de casos novos por câncer, em homens e mulheres, segundo localização primária.1

Tabela 2. Equipamentos, materiais e reagentes utilizados12

Sumário

1. Introdução	1
1.1 Câncer	1
1.2 Câncer bucal	3
1.3 Vias de transdução de sinais	4
1.4 Via de sinalização PI3K/AKT/mTOR	5
1.5 Tratamentos para o câncer bucal	7
1.6 Terapia Fotodinâmica	8
1.6.1 Fotossensibilizadores	9
1.6.2 Fenômenos Fotoquímicos e Fotofísicos	10
1.6.3 TFD, sinalização e mudanças no metabolismo celular..	12
1.6.3.1 Tirosinaquinases	12
1.6.3.2 Mecanismos de morte celular e destruição tumoral	13
1.6.4 Alumínio Cloro Ftalocianina (AIPHCl)	15
2. Objetivos	17
2.1 Objetivo geral	17
2.2 Objetivos específicos	17
3. Material e Métodos	18
3.1 Equipamentos, materiais e reagentes utilizados	18
3.2 Alumínio Cloro Ftalocianina – AIPHCl – lipossomal	20
3.3 Fonte de laser	20
3.4 Desenho experimental <i>in vitro</i>	20
3.5 Linhagens celulares	21
3.5.1 Manutenção das linhagens celulares	21
3.5.2 Preparação dos experimentos	21

3.6	Aplicação da TFD nas culturas celulares	22
3.7	Análise dos Efeitos Citotóxicos	24
3.7.1	Viabilidade Celular pelo método de MTT	25
3.7.2	Morfologia Celular	25
3.7.2.1	Determinação de tamanho e granulosidade celular	26
3.7.3	Integridade da Membrana Plasmática	26
3.7.4	Fragmentação de DNA	27
3.7.5	Potencial de Membrana Mitocondrial	27
3.8	Análise dos Efeitos Citostáticos	28
3.8.1	Proliferação Celular	28
3.8.2	Ciclo Celular	28
3.9	Microscopia confocal	29
3.10	Análise Estatística	30
4.	Resultados	31
4.1	Análise dos efeitos Citotóxicos	31
4.1.1	Viabilidade celular pelo método MTT em células OSCC 3 e NIH 3T3 tratadas com TFD	31
4.1.2	Efeitos da TFD na morfologia das células OSCC 3 e NIH 3T3	33
4.1.3	Integridade da membrana plasmática de células OSCC 3 e NIH 3T3 tratadas com TFD	36
4.1.4	Material genético das células OSCC 3 tratadas com TFD	38
4.1.5	Potencial de membrana mitocondrial de células OSCC 3 tratadas com TFD	38
4.2	Análise dos efeitos Citostáticos	39
4.2.1	Efeitos da TFD na proliferação celular das células OSCC3	39

4.3 Avaliação da Influência da TFD na via de sinalização PI3K/AKT/mTOR	41
4.3.1 Avaliação por microscopia confocal da expressão de pS6 em células OSCC 3	41
5. Discussão	42
6. Conclusões	49
7. Referências Bibliográficas	50

I – INTRODUÇÃO

1. Introdução

1.1 Câncer

O câncer pode ser definido, entre outras possíveis maneiras, como um conjunto de doenças desencadeadas por desordens celulares, ocasionadas por fatores genéticos e ambientais (INCA, 2008). Uma das características mais marcante e comum a todos os tipos de câncer é a proliferação celular desenfreada e a capacidade de invasão e destruição dos tecidos.

O câncer é um dos maiores problemas de saúde mundial. Dados recentes demonstram que 1 em 4 mortes nos Estados Unidos é ocasionada por esta doença. A estimativa de novos casos e mortes naquele país para o ano de 2008 foi de 1.437.180 e cerca de 565.650 respectivamente (JEMAL;SIEGEL et al., 2008).

No Brasil, segundo dados do Instituto Nacional do Câncer, a estimativa de novos casos para o ano de 2008 chegou a 231.860 para o sexo masculino e 234.870 para o feminino, totalizando 466.730 novos casos (figura 1) (INCA, 2008).

Localização Primária Neoplasia Maligna	Estimativa de casos novos		
	Masculino	Feminino	Total
Próstata	49.530	-	49.530
Mama Feminina	---	49.400	49.400
Traquéia, Brônquio e Pulmão	17.810	9.460	27.270
Cólon e Reto	12.490	14.500	26.990
Estômago	14.080	7.720	21.800
Colo do Útero	-	18.680	18.680
Cavidade Oral	10.380	3.780	14.160
Esôfago	7.900	2.650	10.550
Leucemias	5.220	4.320	9.540
Pele Melanoma	2.950	2.970	5.920
Outras Localizações	55.610	62.270	117.880
Subtotal	175.970	175.750	351.720
Pele não Melanoma	55.890	59.120	115.010
Todas as Neoplasias	231.860	234.870	466.730

*Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10.

Tabela1. Estimativas, para o ano 2008, do número de casos novos por câncer, em homens e mulheres, segundo localização primária. Dados: INCA, 2008.

Em geral, o processo da carcinogênese é lento, podendo inclusive ser dividido em 3 fases: iniciação, promoção e progressão da doença. No estágio de iniciação, as células são expostas aos agentes carcinogênicos que podem promover alterações genéticas cumulativas. Na segunda fase, chamada de promoção, há uma seleção e proliferação dos clones atingidos na fase I, que iniciam o processo de transformação maligna caracterizado pela expressão de oncogenes. A fase de progressão da doença, fase III, é caracterizada pela proliferação descontrolada e irreversível das células formando uma massa tumoral local, processo este que é facilitado pelo aumento progressivo da instabilidade genética dessas células (HURSTING;SLAGA et al., 1999).

Descobertas recentes ampliaram consideravelmente o entendimento dos mecanismos básicos de controle e crescimento celular, o que proporcionou o desenvolvimento da investigação dos processos biológicos que levam ao câncer.

Atualmente, sabe-se que a maior parte das células cancerígenas são originárias da expansão clonal e também do crescimento anormal de uma célula tronco, ou de poucas células tumorais que readquiriram sua capacidade de renovação (revisito por LOBO;SHIMONO et al., 2007).

As células normais proliferam-se quando há uma necessidade resultante de balanço bioquímico entre fatores promotores e inibidores de crescimento. Esses fatores chegam às células por meio da circulação e das células vizinhas. As células cancerígenas fogem desses mecanismos regulatórios, seguindo um controle interno próprio para sua replicação. Desta forma, as células cancerígenas crescem de modo irrestrito e, por vezes, podem escapar da senescência e programas de morte celular. Em consequência, há uma sobrevivência maior dessas células. Além disso, as células cancerígenas adquirem a habilidade de migrar de seu local original, invadindo tecidos vizinhos e promovendo a metástase em locais anatômicos distantes (revisito por MOLINOLO;AMORNPHIMOLTHAM et al., 2008).

Estas mudanças progressivas no comportamento celular são resultado de acumulação de mudanças genéticas em um conjunto limitado de genes. Entre estes, duas classes de genes atuam de modo principal, são os chamados oncogenes e os genes supressores de tumor.

Os oncogenes são aqueles que, uma vez ativados, promovem a proliferação celular, enquanto os genes supressores de tumor inibem o

crescimento celular e contribuem para o processo carcinogênico quando inativados por eventos genéticos (revisito por HANAHAN;WEINBERG, 2000).

Exemplos de oncogenes são alguns fatores de crescimento (*hst-1, int-2, EGFR/erbB, cerbB- 2/Her-2, sis*), transdutores de sinais intracelulares (*ras,raf, stat-3*), fatores de transcrição (*myc, fos, jun, c-myb*), reguladores do ciclo celular (*Cyclin D1*) e os genes envolvidos no mecanismo de morte celular programada ou apoptose (*bcl-2, Bax*). Estes genes pode ser ativados de forma alterada devido à alguma mutação, translocação cromossomal, amplificação gênica ou ainda inserção retroviral.

Os genes supressores de tumor (TSG) agem como transdutores de sinais inibitórios ao crescimento tumoral. Estes genes estão envolvidos na regulação do ciclo celular e da apoptose. Os TSG podem ser inativados por vários mecanismos incluindo mutações pontuais, deleções, ou ainda ligações com proteínas virais (NAGPAL;DAS, 2003). PTEN (gene homólogo ao da fosfatase e tensina) é um exemplo de TSG envolvido na carcinogênese bucal.

Um conceito recente sugere que variados eventos ativadores e inativadores devem ocorrer nos oncogenes e nos genes supressores de tumor para a iniciação e progressão do câncer. No caso do carcinoma epidermóide bucal, estas mudanças ocorrem em processos de múltiplas etapas (MOLINOLO;AMORNPHEMOLTHAM et al., 2008).

1.2 Câncer Bucal

Lesões cancerígenas localizadas na cavidade bucal são consideradas uma das neoplasias mais freqüentes na população brasileira.

No Brasil, o câncer bucal é considerado o quinto tipo de neoplasia mais prevalente entre os homens enquanto nas mulheres esta patologia ocupa o sexto lugar (INCA, 2008).

Assim como em tantos carcinomas, o risco do carcinoma bucal aumenta com a idade, principalmente entre os homens. Homens caucasóides têm um risco maior após os 65 anos de idade quando comparados aos outros grupos. No entanto, a maior incidência, entre as pessoas de meia idade é verificada entre os

homens afro-descendentes. As mulheres, em geral, apresentam uma incidência menor que os homens, em qualquer faixa etária (NEVILLE;DAMM et al., 2004).

Entre os fatores de risco correlacionados a esta patologia, pode-se citar os fatores extrínsecos como o tabaco, álcool, luz solar, dieta, infecções virais entre outros; além dos fatores intrínsecos como os estados sistêmicos e a predisposição genética.

Cerca de 90% das malignidades orais são carcinomas de células escamosas. Tumores de origem epitelial, de fácil identificação e tratamento nas fases iniciais de desenvolvimento (SILVERMAN, 2001; CONCEICAO PEREIRA;TOSTES OLIVEIRA et al., 2007).

A carcinogênese bucal, assim como as demais, está associada a alterações genéticas cumulativas e a superexpressão e/ou atividade de receptores de superfície celular. Como exemplo, os receptores de crescimento epidermóide (EGFR), receptores de citocinas e receptores de proteína G, têm sido associados diretamente ao início e progressão do carcinoma epidermóide bucal. Estes receptores traduzem sinais via diferentes rotas bioquímicas, que por sua vez, promovem o controle das atividades de moléculas intracelulares sinalizadoras (MOLINOLO;AMORNPOLTHAM et al., 2008).

1.3 Vias de transdução de sinais

Atualmente há uma vasta literatura relatando as vias de sinalização intracelulares envolvidas na regulação da diferenciação, sobrevivência, metabolismo, mobilidade e crescimento celular. Estes estudos permitem um melhor entendimento destas vias, sobretudo em doenças, como no câncer, onde se encontram desreguladas. O desenvolvimento de alternativas terapêuticas que atuem por meio da regulação destas vias é uma alternativa promissora para o tratamento destas doenças.

As vias de transdução de sinais em células cancerígenas envolvem frequentemente a ativação constitutiva e condicional de receptores de quinases. Quinases são enzimas que transferem grupos fosfatos de moléculas doadoras de alta energia, como o ATP (Adenosina tri-fosfato), para moléculas alvo

específicas, por um processo denominado de fosforilação. Os receptores destas enzimas ativam múltiplas quinases citoplasmáticas, que são normalmente da classe das serinas e treoninas quinases.

Existem três principais vias de sinalização identificadas pela atuação no desenvolvimento do câncer. Estas vias de sinalização celular podem atuar de modo independente, paralelas ou ainda interconectadas (FAIVRE;KROEMER et al., 2006). São elas:

1. Via quinase da Fosfatidilinositol-quinase PI3K/AKT
2. Via da família da proteína quinase C (PKC)
3. Via da proteína quinase mitogênica ativada MAPK/Ras

Na década passada, muitas pesquisas na área de câncer estavam voltadas para a atuação de *ras* – o primeiro oncogene identificado – na transformação neoplásica. Desta forma chegou-se ao modelo atual da cascata que envolve este oncogene e a proteína quinase mitogênica MAPK. A importância desta via foi confirmada pelos sucessos clínicos de terapias que tinham como alvo esta quinase.

Nos últimos anos, foi dada uma atenção especial à via que envolve a PI3K e AKT. Esta também é ativada por receptores de quinases, e verificou-se que atua regulando processos centrais nas células, tais como proliferação e sobrevivência (HENNESSY;SMITH et al., 2005).

Vários componentes desta via se encontram desregulados na maioria dos tipos de câncer. Estratégias terapêuticas que tem como alvo esta via têm se mostrado promissoras (VIVANCO;SAWYERS, 2002).

1.4 A via de sinalização PI3K/AKT/ mTOR

A via que envolve a PI3K é estimulada fisiologicamente por fatores de crescimento e reguladores (figura 1). Independe do mecanismo, a ativação de PI3K resulta em um distúrbio do controle do crescimento tumoral e sobrevivência, o que contribui para a formação de metástases e resistência à terapia. Desta forma, esta via é um alvo atrativo para o desenvolvimento de novos agentes anti-câncer (HENNESSY;SMITH et al., 2005).

Em contraste com a via do *p53* e outras vias que envolvem genes supressores de tumor *que se encontram desativadas*, a via que envolve a quinase PI3K está super-ativada no câncer, tornando-a um bom alvo para terapias. Além disso, inibir uma ativação é mais simples que recuperar uma função perdida, como no caso das vias que envolvem genes supressores de tumor que perderam sua função (HENNESSY;SMITH et al., 2005).

Esta via de sinalização é considerada uma das mais importantes no mecanismo da carcinogênese, estando constitutivamente ativada em mais de 30% dos cânceres humanos. Pela constante mutação de PI3K e seus múltiplos efeitos nos seus respectivos efetores, muitas drogas que visam atingir esta via estão sendo elaboradas, visando sua inativação em diferentes tipos de câncer (HENNESSY;SMITH et al., 2005; CULLY;YOU et al., 2006).

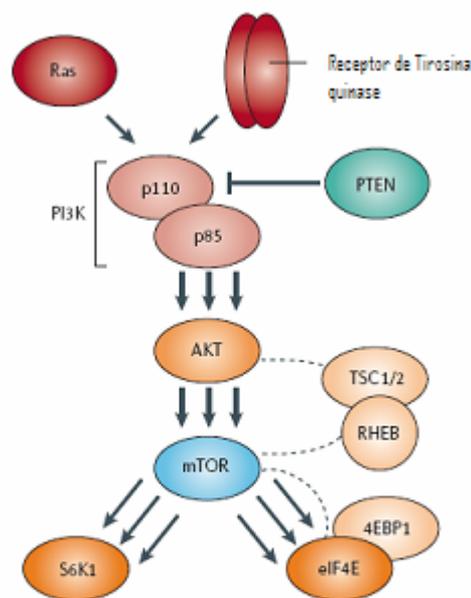


Figura 1. Via PI3K/AKT/mTOR. Adaptado de:Favre et al, 2005.

Varreduras genéticas demonstraram que AKT é o primeiro alvo dos efeitos de PI3K. AKT media a ativação de mTOR, molécula importante na sinalização da proliferação celular, já que regula a tradução em resposta a nutrientes e fatores de crescimento pela fosforilação de componentes da maquinaria de síntese protéica, incluindo a proteína ribossomal S6 quinase (p70S6K) e a proteína de ligação 4E (4E-BP), resultando em efluxo do fator de tradução eIF4E, que é

conhecido por desempenhar atividades de transformação maligna e antiapoptóticas in vitro (HENNESSY;SMITH et al., 2005; MOLINOLO;AMORNPHIMOLTHAM et al., 2008).

PTEN é um gene supressor de tumor que quando deletado, sofre alguma mutação, ou é inativado de alguma outra forma, favorece a ativação de efetores de PI3K, particularmente a proteína quinase B, que pode ocorrer inclusive sem a atuação de nenhum fator externo, o que pode levar ao início do mecanismo de tumorigênese. Em alguns tipos de câncer, como o câncer de mama, demonstrou-se que a redução da expressão de *PTEN* ou a ativação de *AKT* conferem susceptibilidade à inibição da via PI3K/*AKT* por inibidores de *mTOR* (CULLY;YOU et al., 2006).

Recentemente, passou-se a considerar o *mTOR* como um alvo molecular de escolha para o tratamento de diferentes tipos de carcinoma, incluindo o carcinoma epidermóide bucal. Um exemplo de droga inibidora deste alvo é a rapamicina, que atualmente já está sendo empregada na fase de testes clínicos.

A alteração funcional da via de sinalização envolvendo PI3Ks, *PTEN*, *AKT* e *mTOR* é um evento freqüente no carcinoma epidermóide bucal, e terapias que tenham como alvo a inibição desta via podem ser promissoras no tratamento deste tipo de neoplasia.

1.5 Tratamentos para o câncer bucal

As terapias freqüentemente usadas para o tratamento do câncer de boca consistem em cirurgia, radioterapia e quimioterapia. Estas são baseadas na excisão completa do tumor, radiação e conseqüente alteração letal das células neoplásicas e células normais adjacentes, respectivamente. A decisão pela alternativa/combinção de tratamento depende de fatores como, estadiamento tumoral, relação com as estruturas anexas, envolvimento da cadeia linfática, idade e cooperação do paciente, além do subtipo histológico de lesão (LUNG;TASCAU et al., 2007).

Os resultados obtidos por estes tipos de tratamento apesar de proporcionarem um bom prognóstico ao paciente no que se referem à lesão, apresentam complicações pós-tratamento, como por exemplo, a mutilação facial,

promovendo graves defeitos estéticos e funcionais, podendo comprometer a qualidade de vida dos pacientes. Além disto, pode ocasionar danos às estruturas do complexo estomatognático remanescentes, levando a um quadro de mucosite, candidíase, hipossalivação, disfagia ou ainda favorecendo o aparecimento da cárie de radiação, trismo muscular ou perda do paladar. Complicações mais graves podem chegar a alterações vasculares e osteoradionecrose (SANNOMIYA, 2000; ORD;BLANCHAERT, 2001).

O fato de estas terapias atuais serem debilitantes e muitas vezes mutilantes leva a procura de novas terapias para o câncer. É neste cenário que algumas inovações no tratamento são propostas, entre elas, a terapia fotodinâmica (REIBEL, 2003).

1.6 Terapia Fotodinâmica

A terapia fotodinâmica (TFD) consiste na administração de um fármaco não-tóxico (fotossensibilizador), por via sistêmica, local ou tópica seguida da aplicação de uma dose específica de luz visível sobre o tecido ou lesão a ser tratada. A ação desta terapia se faz através da produção de íons radicais (oxigênio reativo - ROS) que reagem destruindo o tecido tumoral (figura 2).

Estudos demonstram que este tipo de terapia pode ser promissora no tratamento do carcinoma epidermóide bucal (CHEN;POGUE et al., 2005; BIEL, 2007; LONGO;LOZZI et al., 2008; TAPAJÓS;LONGO et al., 2008) A vantagem apresentada por esta modalidade terapêutica é a diminuição dos efeitos colaterais observados pós-tratamento em comparação com os demais tratamentos. Além disso, se apresenta como um tratamento de custo operacional inferior, uma vez que pode ser realizado em ambiente ambulatorial.

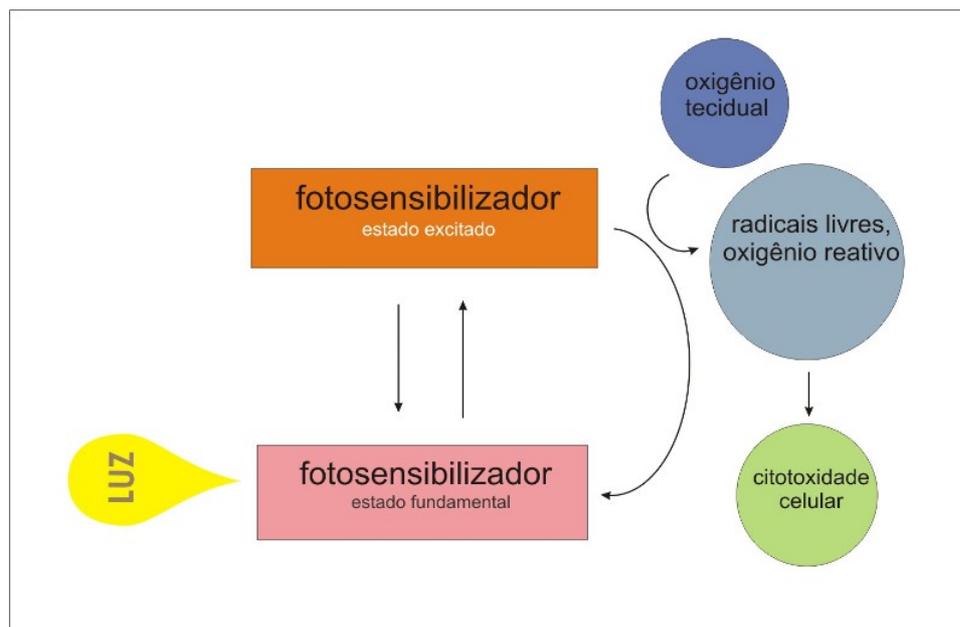


Figura 2 . Modo de ação da Terapia Fotodinâmica.

1.6.1 Fotossensibilizadores

Um fotossensibilizador (FS) deve possuir propriedades químicas e físicas ideais para que seja usado de forma eficaz e não-tóxica para o organismo. Deve ter baixa toxicidade quando não estiver exposto à luz e não produzir efeitos adversos durante sua administração; ser efetivo sob iluminação de faixas vermelhas e infravermelhas e possuir uma alta taxa de absorção de luz, para que não sejam necessárias altas dosagens do produto químico para atingir o efeito desejado.

Os fotossensibilizadores devem ser compostos puros, de composição constante e de forma química estável. A eliminação farmacocinética deve ser rápida, para que não cause efeitos colaterais duradouros. Idealmente, de alta especificidade para o tecido alvo e que a acumulação neste tecido se dê de forma rápida, para que o intervalo entre a administração da droga e a aplicação da luz seja curto. É desejável um tratamento indolor, de fácil acompanhamento e avaliação de efetividade, além de possuir uma dose eficaz muito menor do que a dose tóxica (CASTANO;DEMIDOVA et al., 2004).

Os fotossensibilizadores são, em geral, hidrófobos e por isso necessitam de um veículo que possibilite seu transporte sanguíneo. As moléculas hidrófobas ou que possuem carga negativa passam pela membrana celular e se localizam em outras membranas intracelulares; aquelas que são menos hidrófobas e são mais eletronegativas não conseguem passar pela membrana, necessitando de métodos ativos de transporte para entrar nas células (CASTANO;DEMIDOVA et al., 2004).

Alguns dos veículos mais usados para este fim são: óleo de castor, lipossomos, albumina e polietilenoglicol modificado (CASTANO;DEMIDOVA et al., 2005a). Os lipossomos são considerados como o sistema de carreamento de escolha pela sua flexibilidade em acomodar fotossensibilizadores com propriedades físico-químicas variadas, além de poder interagir com moléculas alvo pré-marcadas (DERYCKE;DE WITTE, 2004).

A porção hidrofílica do lipossomo, a qual limita o seu reconhecimento e captação pelas células do sistema mononuclear linfocitário, permite que estas moléculas se acumulem de modo mais extenso e específico ao redor do tecido tumoral (DERYCKE;DE WITTE, 2004).

Acredita-se que estas os fotossensibilizadores possuem uma maior afinidade por células cancerígenas em conseqüência da alteração do metabolismo das mesmas, permitindo uma menor eliminação do fármaco.

1.6.2 Fenômenos Fotoquímicos e Fotofísicos

Como dito inicialmente, a TFD consiste na ação conjunta de um produto químico, o fotossensibilizador, e uma luz aplicada diretamente sobre o tecido. Devido à variedade de propriedades ópticas dos vários fotossensibilizadores, há uma gama de variação no comprimento de onda utilizado, mas em geral eles variam dentro da faixa de luz visível vermelha, onde a profundidade de penetração da luz no tecido é aproximadamente 1 a 3 mm com um comprimento de onda de 630 nm, podendo dobrar quando se aumenta este comprimento para 700 a 850 nm (CASTANO;DEMIDOVA et al., 2004).

Quando atingido dentro do tecido pela energia luminosa, o fármaco sofre uma série de fenômenos físicos para absorver esta energia e transformá-la em energia necessária para o início das reações químicas subseqüentes

(CASTANO;MROZ et al., 2006). Estas reações podem se dar de duas formas (figura 3). No tipo I, o fotossensibilizador reage diretamente com um substrato, como a membrana celular ou uma molécula específica, e perde ou ganha um elétron, formando respectivamente, um cátion ou um ânion. Esses íons reagem com uma molécula de oxigênio formando radicais de oxigênio reativos. No tipo II, a reação do fármaco se dá diretamente com o oxigênio, transferindo diretamente sua energia e gerando uma fase de excitação neste. Ambos os tipos de reação podem acontecer simultaneamente e a proporção de ocorrência de cada uma delas varia de acordo com o tipo de fotossensibilizador e a concentração de substrato e de oxigênio (LIPPMAN;SUDBO et al., 2005).

A via tipo 1 envolve freqüentemente a produção inicial do ânion superóxido, por meio da transferência do elétron do fotossensibilizador para o oxigênio molecular. Esse ânion não é muito reativo nos sistemas biológicos e não causa muitas alterações oxidativas nos tecidos, mas pode reagir com íon Hidrogênio(H^+) e formar peróxido de hidrogênio e oxigênio, esta reação é conhecida como dismutação e catalisada pela enzima superóxido-dismutase (CASTANO;DEMIDOVA et al., 2004).

Os radicais de oxigênio produzidos pela via tipo 2 são agentes oxidantes que podem reagir diretamente com muitas moléculas biológicas, dentre elas, seus principais alvos são os aminoácidos como a cisteína, tirosina e histidina. O DNA também pode ser atingido pela oxidação das bases nucleotídicas e dos açúcares que ligam suas fitas (CASTANO;DEMIDOVA et al., 2004). Devido a sua alta reatividade e à vida curta do estado de excitação elétrica do oxigênio, apenas as moléculas e estruturas próximas ao local de formação dos radicais livres reativos, ou seja, o local de acumulação do fotossensibilizador é atingido pela TFD.

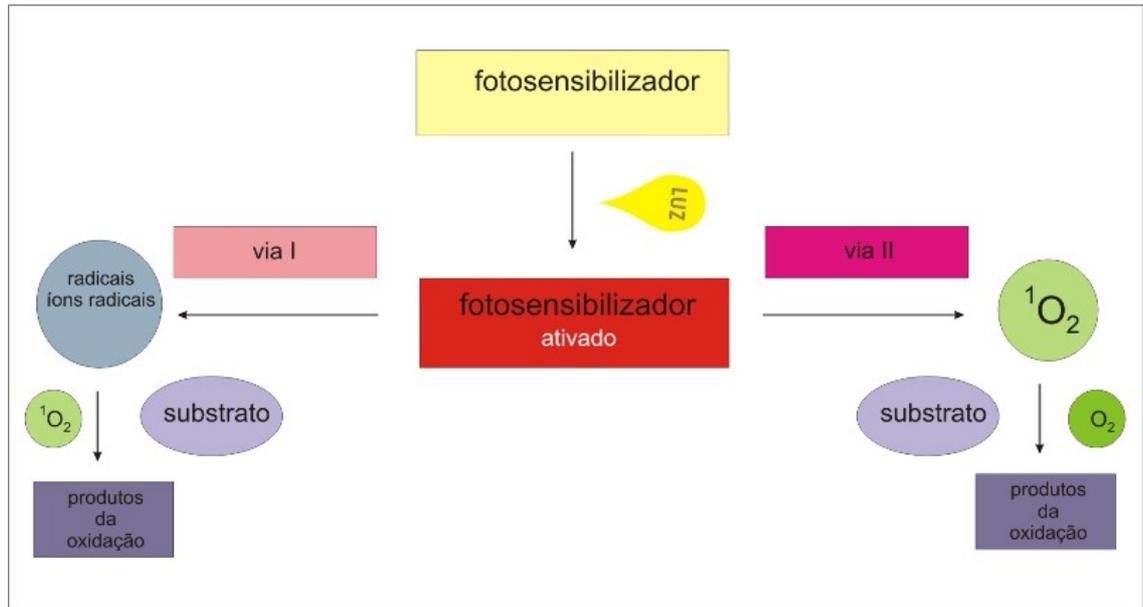


Figura 3. Vias de reação fotoquímica.

1.6.3 TFD, sinalização e mudanças no metabolismo celular.

1.6.3.1 Tirosinaquinases

A sinalização por meio das quinases exerce um importante papel na transdução de sinais em células eucarióticas, onde modulam vários eventos celulares, como: a progressão do ciclo celular, a regulação do desenvolvimento embrionário, a movimentação celular e a apoptose, assim como a diferenciação celular (CASTANO;DEMIDOVA et al., 2005b).

A TFD pode estimular reações em cascata envolvendo as quinases gerando a apoptose celular de forma lenta ou rápida. Entre outras, pode-se citar a via que envolve o receptor do fator de crescimento epidermal, envolvido na iniciação e progressão de vários tipos de câncer, especialmente em seus aspectos proliferativos, angiogênicos, invasivos e metastáticos. Este fator é inibido pela TFD, o que gera implicações vasculares como a hipóxia nos tumores, por exemplo.

1.6.3.2 Mecanismos de morte celular e destruição tumoral

Há três tipos de mecanismos pelos quais a TFD pode suscitar a destruição do tumor:

- a. Geração de efeitos antivasculares: levando à trombose e hemorragia dos vasos que irrigam os tumores, causando morte por privação do oxigênio;
- b. Indução de morte celular: por mecanismo de apoptose, necrose ou ainda autofagia;
- c. Produção de inflamação: destruindo o tumor devido a um ataque primário por neutrófilos ou por uma resposta mediada pelo sistema imune com quimiotaxia de leucócitos (CASTANO;DEMIDOVA et al., 2005b).

Os efeitos vasculares de destruição tecidual são os primeiros a ocorrerem e podem ser observados imediatamente após o término da sessão de TFD. O colapso microvascular pode levar a uma hipóxia severa e persistente e possui um papel muito importante no controle do crescimento tumoral a longo-prazo. Os mecanismos dos danos vasculares variam de acordo com o fotossensibilizador utilizado (CASTANO;DEMIDOVA et al., 2005a; LONGO;LOZZI et al., 2008).

O mecanismo de morte celular pode ocorrer de três formas. Atualmente, estes três processos são classificados como apoptose, autofagia de morte celular e necrose. São programas celulares conhecidos pelo papel crucial desempenhado no desenvolvimento normal na homeostase tecidual e na eliminação de células danificadas ou anormais (BUYTAERT;DEWAELE et al., 2007).

A morte celular por apoptose é o mecanismo mais estudado. A regulação defeituosa deste mecanismo rompe o balanço entre proliferação celular e morte, podendo ser o gatilho para algumas doenças, incluindo o câncer (BUYTAERT;DEWAELE et al., 2007).

Apoptose é um processo dependente de ATP, morfológicamente caracterizado pela condensação da cromatina, quebra de DNA cromossomal em fragmentos internucleosomais, formação de corpos apoptóticos, redução da relação núcleo-citoplasma, vacuolização da membrana, podendo ainda apresentar a perda da integridade da membrana plasmática em uma fase tardia deste processo, e fagocitose pelas células vizinhas.

Macroautofagia, também chamada de autofagia, é um importante processo catabólico nas células eucarióticas iniciado pela reciclagem de componentes citoplasmáticos (LEVINE;KLIONSKY, 2004).

O passo inicial da autofagia é a formação estrutural de uma membrana dupla que seqüestra componentes citoplasmáticos como organelas, e forma vacúolos autofágicos (autofagossomos). Eventualmente autofagossomos se fundem com lisossomos e seu material citoplasmático é degradado por hidrolases lisossomais (LEVINE;KLIONSKY, 2004).

A via de sinalização que envolve a PI3K vem sendo relacionada com a inibição e estimulação da autofagia (PETIOT;OGIER-DENIS et al., 2000); (KONDO;KANZAWA et al., 2005).

A contribuição funcional deste processo catabólico na morte celular é ainda incerto, pois, ainda é pouco claro se a autofagia contribui diretamente para a morte celular ou se é apenas uma consequência de um processo de tentativa de viabilidade celular fracassado. No entanto, estudos recentes sugerem que a autofagia possa regular o desenvolvimento do câncer e sua progressão, assim como a resposta a terapias citotóxicas (KONDO;KANZAWA et al., 2005).

O esclarecimento do mecanismo pelo qual a TFD induz a autofagia pode elucidar fenômenos como a estimulação à sobrevivência celular, comprovada quando esta terapia é aplicada em doses subletais (BUYTAERT;DEWAELE et al., 2007).

Necrose é morfológicamente caracterizada pela vacuolização do citoplasma e rápida perda da integridade da membrana plasmática, resultando em uma reação inflamatória decorrente da liberação de conteúdos celulares e de moléculas pró-inflamatórias. Pode ser ainda definida como o resultado de um catástrofe bio-energética por uma depleção de ATP a um nível incompatível com a sobrevivência celular (BUYTAERT;DEWAELE et al., 2007).

A necrose é a principal via de morte suscitada apela TFD quando o fotossensibilizador está localizado na membrana plasmática. Isto se deve principalmente pela rápida perda da integridade da membrana plasmática, pela incapacidade de manutenção do fluxo iônico pela membrana plasmática e rápida depleção do ATP intracelular.

Em alguns casos, verifica-se que esta via de morte também é suscitada de modo preferencial quando os fotossensibilizadores se encontram em outros compartimentos subcelulares.(BUYTAERT;DEWAELE et al., 2007)

Outro tipo de resposta de defesa após a TFD é iniciada com a atividade dos macrófagos que fagocitam um grande número de células tumorais mortas, para então apresentar os antígenos por meio do complexo de histocompatibilidade classe II em suas membranas. Este processo cria condições para que os linfócitos TCD4 reconheçam estes antígenos, mantenham essa sensibilização como memória e respondam imunologicamente sempre que incitados. A reação imuno específica induzida pela TFD não possui um papel importante na destruição inicial do tumor, mas pode ser decisiva na manutenção do controle do tumor em longo prazo (CASTANO;DEMIDOVA et al., 2005a).

1.6.4 Alumínio Cloro Ftalocianina (AIPHCI)

As vantagens da Terapia Fotodinâmica quando comparada aos métodos convencionais de tratamento do câncer são, principalmente, sua baixa toxicidade e habilidade para destruir os tumores de forma mais seletiva, causando menos danos sistêmicos (OGASAWARA;MIYOSHI et al., 2006). Entretanto, conforme mencionado, a biocompatibilidade desta modalidade terapêutica é dependente da droga utilizada como fotossensibilizador.

O Fotofrin é o fotossensibilizador mais utilizado nas aplicações clínicas da TFD, seu uso já está aprovado em muitos países. Entretanto, este fotossensibilizador possui a desvantagem de se acumular nos tecidos da pele após a aplicação, causando uma sensibilidade indesejada por algumas semanas pós-tratamento. Além disso, observou-se que a seletividade deste agente para as áreas tumorais não é muito alta como se espera do tratamento por esta modalidade terapêutica (OGASAWARA;MIYOSHI et al., 2006).

Na busca de uma alternativa de maior biocompatibilidade, surgiu o ALA (Ácido 5-Aminolevulínico) que vem sendo amplamente utilizado com sucesso no tratamento de variadas patologias, incluindo as lesões malignas e, atualmente está em fase clínica IV da aplicação também para as lesões pré-malignas. ALA é um precursor do Fotofrin[®] IX (nome comercial éter/éster dihematoporfirina) que

pode ser eliminado do corpo entre 24 e 48 horas após sua administração sistêmica (CHEN;CHEN et al., 2005; OGASAWARA;MIYOSHI et al., 2006).

Atualmente, o ALA é o fotossensibilizador de escolha para o tratamento de lesões pré-malignas bucais (CHEN;CHEN et al., 2004; CHEN;CHEN et al., 2005). Porém, esta droga possui algumas desvantagens que levam a constante procura de um fotossensibilizador mais adequado. Entre as desvantagens pode-se citar: a) O ALA tem baixo poder de penetração nas formulações tópicas, portanto as camadas mais profundas não são eficazmente atingidas; b) O ALA necessita de doses de energia superiores aos demais fotossensibilizadores. Isto representa um maior incomodo e desconforto para o paciente; c) Alto custo por se tratar de tecnologia importada.

Na busca do fotossensibilizador ideal para o tratamento do carcinoma epidermóide bucal, variadas são as drogas que estão sendo sintetizadas e estudadas. Entre elas, compostos conjugados com a ftalocianina - $(C_6H-C_2N)_4N_4$.

As ftalocianinas constituem uma grande classe de compostos com alto coeficiente de extinção na região espectral vermelha (630-800 nm), e tem apresentado excelentes propriedades de localização tumoral e alta eficiência de fotossensibilização (MAFTOUM-COSTA;NAVES et al., 2008). O complexo metal-ftalocianina, utilizando-se Zn(II) e Al(III), Zinco-ftalocianina (ZnPc) e Cloro-Alumínio-ftalocianina (AIPHCl) respectivamente, apresentam propriedades fotofísicas mais favoráveis para a aplicação da TFD. No entanto, fotossensibilizadores hidrofóbicos, como AIPHCl, agregam-se fortemente em meios aquosos, o que reduz sua eficácia fotossensibilizadora. Neste caso, a utilização de sistemas de liberação baseado na formulação lipossomal do fotossensibilizador propicia a formação monomérica do mesmo, diminuindo a sua agregação (DERYCKE;DE WITTE, 2004; MAFTOUM-COSTA;NAVES et al., 2008).

Segundo Machado e colaboradores (2007), o uso da ftalocianina na detecção e cura de tumores é uma das suas maiores e mais promissoras aplicações (MACHADO;BRAGA et al., 2007); (MILLER;BARON et al., 2007).

II – OBJETIVOS

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

O Objetivo geral deste trabalho é avaliar a eficácia da Terapia Fotodinâmica mediada pela alumínio cloro ftalocianina-AIPHCl-lipossomal no tratamento de células derivadas do câncer bucal e sua atuação na regulação da via de sinalização PI3K/AKT/mTOR.

2.2 Objetivos Específicos

1. Avaliar, pelos ensaios de MTT; Teste de exclusão por Azul tripan; Citometria de Fluxo e Microscopia por Contraste de Fase, os efeitos citostáticos e citotóxicos da Terapia Fotodinâmica mediada pela alumínio cloro ftalocianina-AIPHCl –lipossomal em células derivadas de Carcinoma Epidermóide Bucal (OSCC 3).

2. Avaliar, pelos ensaios de MTT, Teste de exclusão por Azul tripan e Microscopia por Contraste de Fase os efeitos citotóxicos da Terapia Fotodinâmica mediada pela alumínio cloro ftalocianina- AIPHCl –lipossomal em células de Fibroblasto (NIH 3T3).

3. Avaliar, por análise Imunohistoquímica, *in vitro*, a atuação da Terapia Fotodinâmica mediada pela alumínio cloro ftalocianina- AIPHCl –lipossomal na regulação da via de sinalização PI3K/AKT/mTOR pela expressão de pS6.

III – MATERIAIS E MÉTODOS

3. Material e Métodos

3.1 Equipamentos, materiais e reagentes utilizados

Equipamento	Fabricante
Balança analítica Modelo AA-200	Denver Instrument Company, EUA
Câmara Neubauer	C.A.Hausser & Son, EUA
Câmera Digital	Zeiss, ALE
Centrífuga Hilmac CR 21	Hitachi Koki Co., JAP
Centrífuga Mikro 22R	Andreas Hettich GmbH & Co KG, ALE
Citômetro de Fluxo (FACSCallibur)	Becton & Dickeson, EUA
Espectrofotômetro	JASCO, JAP
Estufa	Tecnal, BRA
Fluxo Laminar	Veco, BRA
Leitora de Microplaca (Spectra Max M2)	Molecular Devices, BRA
Microscópio de Luz Invertido	Unico, EUA
Microscópio de Luz	Zeiss, ALE
Microscópio Confocal	Leica TCS SP5
pHâmetro Accumet Basic AB 15	Fisher Scientific, EUA

Materiais	Fabricante
Criotubos	TPP, ALE
Frascos de Cultura de Poliestireno	TPP, ALE
Lâmina de microscopia	Perfecta, BRA
Lamínula de microscopia	Perfecta, BRA
Papel Fitro	J Prolab, BRA
Placa de cultura de células (12 poços) de Poliestireno	TPP,ALE
Tubos Falcon 15 e 50 ml	TPP, ALE

Reagentes	Fabricante
Albumina Sérica Bovina (BSA)	Sigma–Aldrich Co., EUA
Antibiótico (Penicilina e Estreptomicina)	Gibco, USA
Anticorpo anti-pS6ribossomal (ser 240/244)	Cell Signaling, USA
Anticorpo Anti-IgG rabbit FITC	Cell Signaling, USA
Azul Tripán	Sigma-Aldrich Co., EUA
Bicarbonato de Sódio	Sigma-Aldrich Co., EUA
Cacodilato de Sódio	Electron Microscopy Sciences, EUA
Citrato de Sódio	Invitrogen, EUA
DAPI	Sigma-Aldrich Co., EUA
Dimetilsufóxido (DMSO)	Sigma-Aldrich Co., EUA
DEMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)	Gibco, USA
Fosfato de Potássio Monobásico	Sigma-Aldrich Co., EUA
Iodeto de Propídio	Invitrogen, EUA
Leite em Pó desnatado	Nestle, BRA
MTT (brometo de 3(4,5 dimetiltiazol-2il) -2,5-difenil-tetrazólio)	Invitrogen, EUA
Paraformaldeído	Vetec Química Fina, Ltda, BRA
Rodamina 123	Invitrogen, EUA
Soro Fetal Bovino	Gibco, USA
Tampão Fosfato Salina (PBS)	Labosclin, BRA
Tripsina	Sigma-Aldrich, EUA
Tripsina-EDTA (0,25 E 0,02%)	Gibco, USA
Tris	Merck, ALE
Triton X-100	Merck, ALE

Tabela 2: Equipamentos, materiais e reagentes utilizados

3.2. Alumínio cloro ftalocianina- AIPHCI –lipossomal

O fármaco (AIPHCI lipossomal na concentração inicial de 5 μ M) utilizado como teste neste trabalho foi desenvolvido e gentilmente cedido pela equipe do Prof. Dr. Antônio Cláudio Tedesco - USP/Ribeirão Preto.

3.3 Fonte de Laser

A terapia Fotodinâmica foi realizada utilizando-se um Laser Diodo (BWF – Tech in), no comprimento de onda de 670nm, acoplado a fibra ótica, com potência de 80mW. Para os experimentos *in vitro*, aplicamos uma energia total de 24 J/cm² .

3.4 Desenho Experimental

Os experimentos *in vitro* foram realizados segundo o esquema a baixo:

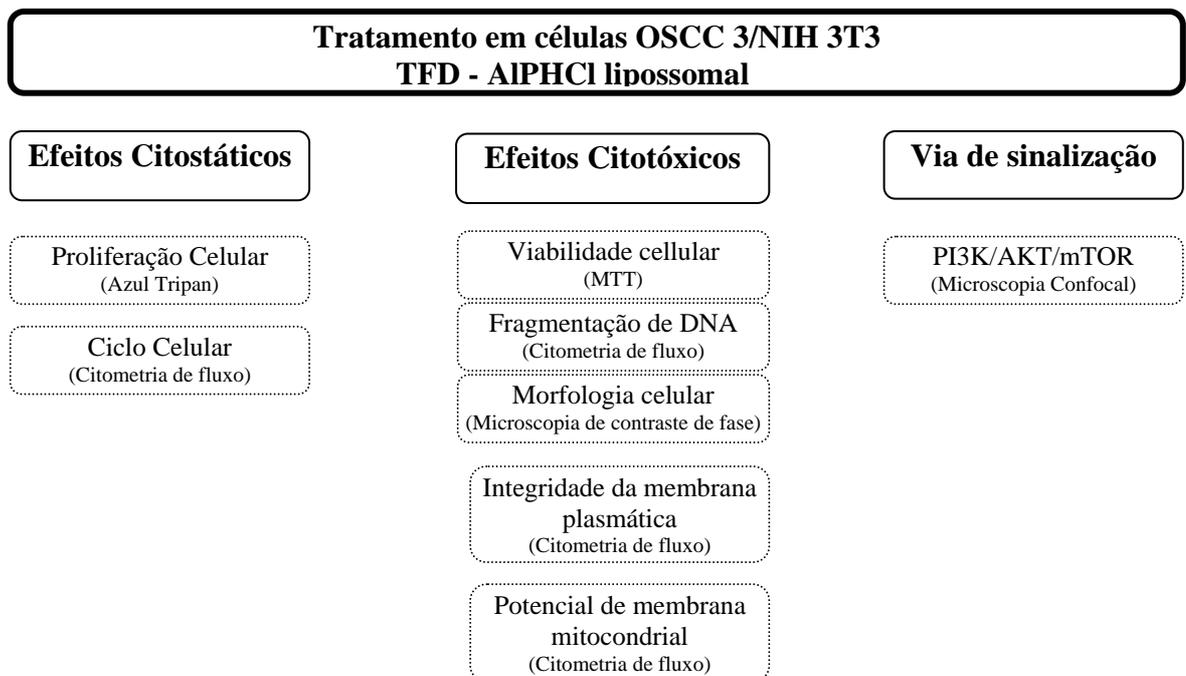


Figura 4. Desenho Experimental para os testes *In Vitro*.

3.5 Linhagens Celulares

Para os experimentos *in vitro* foram utilizadas duas linhagem celulares imortalizadas, sendo uma derivada de Carcinoma Epidermóide Bucal – OSCC 3 (*Oral Squamous Cell Carcinoma*) (NOR;CHRISTENSEN et al., 2001; NÖR;PETERS et al., 2001) e uma de fibroblasto – NIH 3T3 (BOZKULAK;WONG et al., 2007).

3.5.1 Manutenção das linhagens celulares

As culturas celulares foram mantidas em meio de cultura DMEM , suplementado com soro fetal bovino a 10% e Penicilina / Estreptomicina a 10.000 µg/mL, 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.

3.5.2 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, para o destacamento das células aderidas a parede do frasco de cultura. Após 3 minutos de incubação em estufa, as células foram retiradas do frasco de cultura e depositadas em tubos do tipo Falcon de 15 mL. Imediatamente após esse procedimento, foram adicionados 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. O sobrenadante foi removido e as células

ressuspendidas em novo meio de cultura. Para a determinação do número de células 10 µL desta suspensão de células foi adicionado a 40 µL de solução de Azul Tripán (0,4% diluído em PBS, p/v). Dez µL desta nova mistura foram depositados em uma câmara de Neubauer para contagem. A contagem foi feita em microscópio de luz, baseando-se nos quatro quadrantes laterais desta câmara. O número de células foi determinado pela seguinte fórmula:

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

As células foram então replicadas para placas de cultura de 12 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. Foi padronizado como número de células satisfatório para o tratamento o valor $1,5 \times 10^5$ células por poço. Todos os procedimentos foram realizados em câmara de fluxo laminar, cuja luz ultravioleta permaneceu ligada por 30 a 40 minutos antes do uso.

3.6 Aplicação da TFD nas culturas celulares

Os experimentos *in vitro* foram realizados utilizando-se 1 grupo controle e 5 tratamentos experimentais: (figura 7)

- I. Controle (C) , células sem tratamento.
- II. Alumínio-Cloro-Ftalocianina, na concentração de 5 µM (AIPHCl 5µM);
- III. Alumínio-Cloro-Ftalocianina, na concentração de 2,5 µM (AIPHCl 2,5 µM);
- IV. Alumínio-Cloro-Ftalocianina, na concentração de 0,5 µM (AIPHCl 0,5 µM);
- V. Terapia Fotodinâmica com AIPHCl na concentração de 0,5µM (TFD 0,5µM);
- VI. Terapia Fotodinâmica com AIPHCl na concentração 2,5µM (TFD 2,5µM);

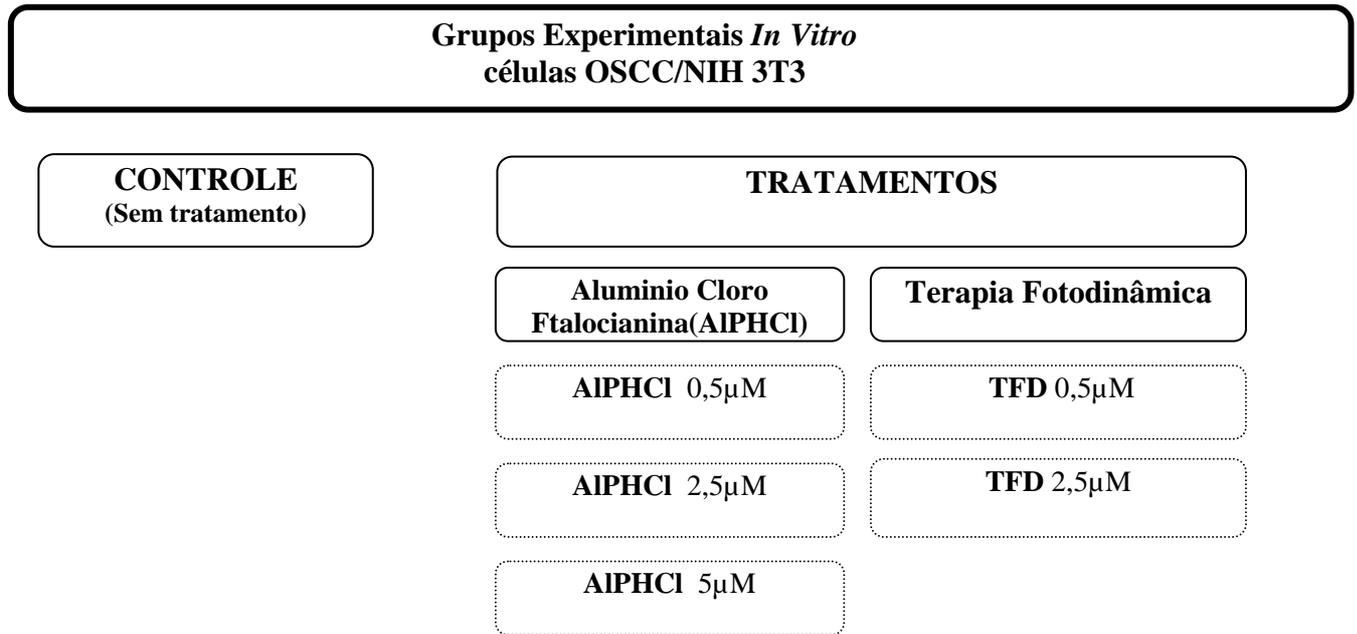


Figura 5. Grupos experimentais *In Vitro*.

Os grupos experimentais foram submetidos ao tratamento com a TFD, que consistia no tratamento das culturas celulares com a solução de AIPHCI lipossomal em diferentes concentrações. O fármaco era adicionado às células e incubado por 30 minutos em estufa de cultivo celular (37°C, 5% CO₂). Decorrido este tempo, a solução fotossensibilizadora era descartada e uma solução de PBS estéril era adicionada nos poços onde então o laser era aplicado por 5 min, conforme figura 8.

Segundo estudos anteriores, o laser utilizado é inócuo para os tecidos, não provocando efeitos tóxicos nem anti-carcinogênicos quando aplicado sem o fármaco. Por esta razão, justifica-se a ausência de um grupo tratado apenas com o laser (LONGO, 2008; TAPAJÓS; LONGO et al., 2008).

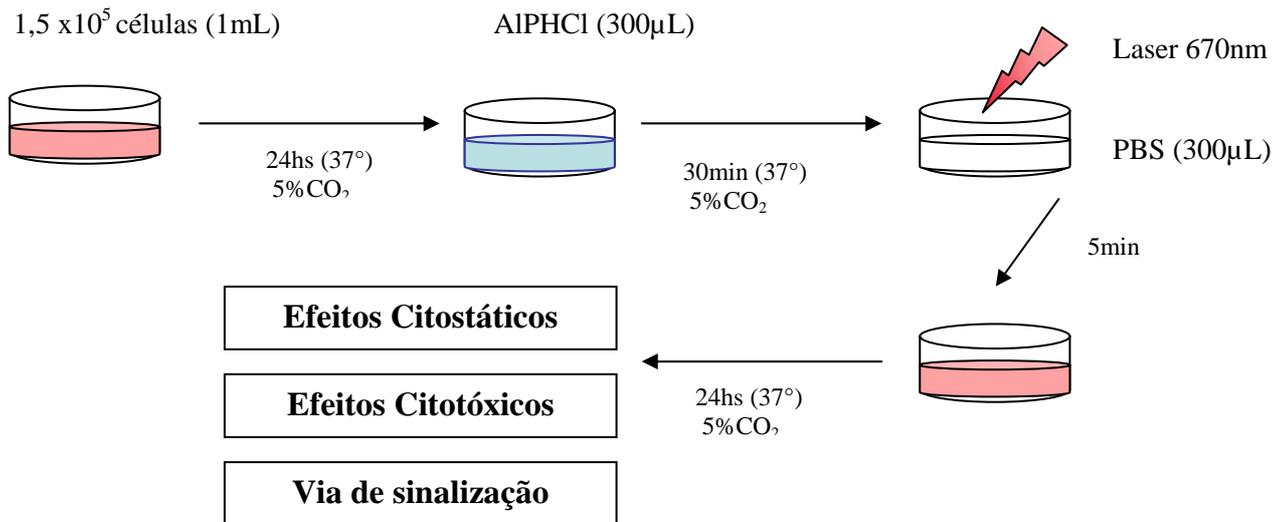


Figura 6 . Protocolo do tratamento empregado

No controle negativo (I) as células não foram submetidas a nenhum tratamento, sendo mantidas em estufa de cultivo com solução de PBS estéril durante o período de tratamento (30 min) e posteriormente 5 min no fluxo (período correspondente à aplicação do laser) sem qualquer tipo de iluminação. Os grupos tratados com AIPHCl (II; III; IV) foram semelhantes aos grupos tratados com TFD, porém não houve irradiação com o laser.

Após cada tratamento, foi adicionado meio de cultura nos poços e as células mantidas em estufa de cultivo (37°C, 5% CO₂) por 24 horas. Até a realização dos testes de descritos na figura 6.

3.7 Análise dos efeitos citotóxicos

Esta análise tem como objetivo avaliar se a AIPHCl lipossomal, bem como a TFD empregada com este fotossensibilizador, induzem efeitos em estruturas celulares vitais, levando à morte celular. Tal avaliação foi feita em diversas estruturas celulares visando a observar diferentes aspectos dos efeitos destes tratamentos nas células. As observações são relevantes para elucidar o mecanismo de ação da TFD e do fotossensibilizador em questão utilizado.

3.7.1 Viabilidade Celular pelo método de MTT

A viabilidade celular foi avaliada pelo método de MTT estabelecido por Mosmann em 1983. Esse ensaio de citotoxicidade consiste em um teste colorimétrico que quantifica a redução do reagente MTT 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. O resultado do teste é dependente, portanto, da população celular viável capaz de metabolizar o formazan. (MOSMANN, 1983)

Para a realização desse experimento, as células foram adicionadas a placas de 12 poços 24 horas antes dos tratamentos. 24 horas após o tratamento (AIPHCl e TFD), o meio foi descartado e adicionado a solução de MTT na proporção de 1:10 (Estoque MTT: meio de cultura), e incubado por 4 horas. Em seguida, para análise, esse meio foi removido e foram adicionados 200 µl de DMSO. Após alguns minutos, com os cristais de formazan dissolvidos, a quantificação deste produto foi realizada pela medida da absorbância da solução no comprimento de onda 595 nm em espectrofotômetro conjugado com leitora de microplacas.

3.7.2 Morfologia Celular

A morfologia celular é um importante indicativo de viabilidade. Alterações desencadeadas por agentes citotóxicos geralmente culminam na modificação da morfologia celular. Tais modificações foram analisadas neste trabalho por microscopia de contraste de fase.

A Microscopia por Contraste de Fase consiste na passagem da luz do microscópio por um anel de contraste que atinge a amostra e produz um aumento de contraste, onde estruturas claras ficam mais claras e estruturas escuras ficam mais escuras. Dessa forma, é possível observar e analisar rapidamente a morfologia de células imersas em meio de cultura sem utilização de fixadores ou corantes.

Neste trabalho, após o período de tratamento, relatado no item 3.6, as placas de cultura foram observadas em microscópio de contraste de fase invertido. A aquisição das imagens foi realizada com o uso de câmera digital acoplada a ocular do microscópio e o software de aquisição Scope (versão 1.0.0.0,2003).

3.7.2.1 Determinação de tamanho e granulosidade celular

Aspectos morfológicos como tamanho e granulosidade celular podem ser avaliados pela citometria de fluxo (DARZYNKIEWICZ;JUAN et al., 1997). De acordo com esta metodologia, um feixe de luz incide sobre as células e suas características de tamanho e granulosidade são identificadas pelos detectores FSC (*forward angle light scatter*) e SSC (*side angle light scatter*), respectivamente. Dessa forma, é possível obter características morfológicas de um grande número de células em um curto período de tempo.

No presente trabalho, após os tratamentos mencionados no item 3.6, a suspensão de células foi diluída em 200µl de PBS e avaliada em citômetro de fluxo utilizando-se os detectores FSC e SSC. Os dados obtidos foram plotados em um gráfico e posteriormente analisados no software CellQuest 3.0.1 (Becton & Dickison, EUA).

3.7.3 Integridade da Membrana Plasmática

A integridade da membrana plasmática foi avaliada pelo método de exclusão por azul de tripan, um corante que tem por característica penetrar apenas nas células que tenham perda da continuidade de membrana. Desta forma em células consideradas viáveis este corante não penetra a membrana enquanto que as células inviáveis são aquelas que permanecem coradas em azul (FRESHNEY). Para tanto, 10 µl da suspensão de células de cada poço foram adicionados a 40 µl do corante azul tripan. Uma alíquota desta mistura (10 µl) foi levada 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 mencionado no item 3.5.2 .

Um número absoluto de células vivas e mortas por mililitros após contagem dos 3 poços de cada tratamento experimental foi obtido neste ensaio. Como resultado toma-se a média de cada tratamento.

3.7.4 Fragmentação de DNA

A determinação da fragmentação de DNA foi realizada de acordo com protocolo mencionado anteriormente no item 3.7.2. Após os respectivos tratamentos, células ressuspensas em 100µl de meio de cultura foram incubadas em 200 µl de tampão lise (0,1% de citrato de sódio, 0,1% Triton X-100 e 20 µg/ml de iodeto de propídio diluído em PBS, pH 7,4) por 30 minutos em temperatura ambiente. As amostras foram protegidas da luz durante o tempo de incubação e avaliadas em citômetro de fluxo no canal FL2-H (sensível a detecções na faixa de 560 e 580nm). Os dados obtidos foram analisados no programa CellQuest 3.0.1(Becton & Dickinson, EUA).

3.7.5 Potencial de Membrana Mitocondrial

A rodamina 123 é uma molécula fluorescente catiônica capaz de atravessar a membrana plasmática e rapidamente seqüestrada por mitocôndrias com potencial de membrana normalizado. Alterações no potencial de membrana da mitocôndria desencadeiam um efluxo da rodamina 123 da mitôcondria (CHEN et al.,1982).

Após os respectivos tratamentos, células ressuspensas em 100µl de meio de cultura foram lavadas com 500 µl de PBS e incubadas no escuro com 0,5 µl de solução de rodamina 123(5mg/ml diluídos em etanol) por 15 minutos à temperatura ambiente. Após a incubação, as células foram lavadas 2 vezes com PBS. Foram então incubadas com 300 µl de PBS por 30 minutos (temperatura ambiente e no escuro) e avaliadas em citômetro de fluxo no canal FL1-H (sensível a detecções na faixa de 515 a 530 nm). Os dados obtidos foram

analisados no programa CellQuest 3.0.1 (Becton & Dickinson, EUA). Todas as etapas de lavagem foram seguidas por centrifugação (750g por 3 minutos) e descarte do sobrenadante.

3.8 Análise dos Efeitos Citostáticos

Esses testes têm como objetivo avaliar se a AIPHCl lipossomal bem como a TFD empregada juntamente com este fotossensibilizador induzem efeitos relacionados ao bloqueio da proliferação celular. Esta avaliação é de extrema relevância considerando que a proliferação celular descontrolada é uma das principais características do câncer. Além disso, substâncias que suscitam efeitos citostáticos em células tumorais são promissoras para tratamentos terapêuticos desta doença.

3.7.1 Proliferação Celular

Após remover as células tratadas com os diferentes tipos de tratamento (conforme descrito na figura 3), estas foram homogenizadas em 100µL de meio de cultura. 10 µL dessa suspensão foram adicionados a 40 µL de solução de Azul Tripán (0,4% diluídos em PBS, p/v) em seguida 10 µL desta nova solução foram depositados gentilmente em uma câmara de Neubauer e o número total de células (vivas e mortas) contidas na suspensão foi determinado conforme descrito no item 3.5.2.

3.8.2 Ciclo Celular

A identificação das fases do ciclo celular foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Peres e Curi, 2005, no qual após cada tratamento, as células foram ressuspensas em 100µL de meio de cultura e incubadas em 200

μ L de tampão de lise (0,1% de citrato de sódio, 0,1% Triton X-100 e 20 μ g/mL de iodeto de propídeo diluído em PBS, pH7,4) por 30 minutos em temperatura ambiente, e protegidas da luz. Em seguida, essa suspensão foi avaliada em citômetro de fluxo no canal FL2-A (sensível a detecções na faixa de 560 e 580nm) para a identificação das fases do ciclo celular. Os dados obtidos foram analisados com o programa CellQuest 3.0.1 (Becton & Dickinson, EUA). O cálculo da proporção de células em cada uma das fases do ciclo celular foi realizado considerando-se apenas as células com o DNA não fragmentado (PERES, 2005).

3.9 Microscopia Confocal

Para este teste, as células foram cultivadas em lamínulas tratadas com poli-Llisina. Após os respectivos tratamentos, as células foram fixadas em paraformaldeído 2% por 30 min, em seguida foram lavadas em PBS (3x 10min) e foi feita a recuperação de antígenos com o uso do tampão triton 100X 0,2% em PBS por 10 min, e após lavagens em PBS foi feito o bloqueio dos sítios inespecíficos com BSA 2% e soro de cabra 5% por 30 min. A incubação com o anticorpo primário em solução de 1% de BSA 2,5% de soro de cabra (na diluição de 1:20) foi feita durante a noite.. O anticorpo secundário (na diluição de 1:300) foi incubado por 1h30 e em seguida foi feita a montagem com meio de montagem, já pré-marcado com DAPI.

As imagens foram capturadas por microscópio confocal. Todas as imagens foram feitas em imersão em óleo utilizando objetivas (Plan-Neofluar) em aumento de 40X. A excitação foi feita por laser de argônio e filtro em comprimentos de onda de 488 nm para FITC e 358 nm para DAPI e a emissão captada por filtro LP em comprimento de onda de 525 nm para FITC e 461nm para DAPI.

3.10 Análise Estatística

Foi feita análise estatística dos dados referentes aos experimentos realizados utilizando-se a análise de Variância (ANOVA) com teste estatístico de Tukey, utilizando-se o software GrahPrism versão 5.00, com $p < 0,05$; $p < 0,01$ e $p < 0,001$ considerados como significativos.

IV – RESULTADOS

4. Resultados

4.1 Análise dos Efeitos Citotóxicos.

4.1.1 Viabilidade Celular determinada pelo método de MTT em células OSCC 3 e NIH 3T3 tratadas com TFD.

O resultado representado na figura 7 demonstra alta viabilidade celular nos tratamentos realizados apenas com o fármaco fotossensibilizador, aproximadamente 70% para as concentrações de 0,5 μM e 2,5 μM . No entanto, na concentração de 5 μM encontramos apenas 2% de células viáveis. Nos tratamentos com a TFD em ambas as concentrações há uma redução significativa da viabilidade celular, sendo mais relevante na concentração de 2,5 μM com apenas 19 % de células viáveis.

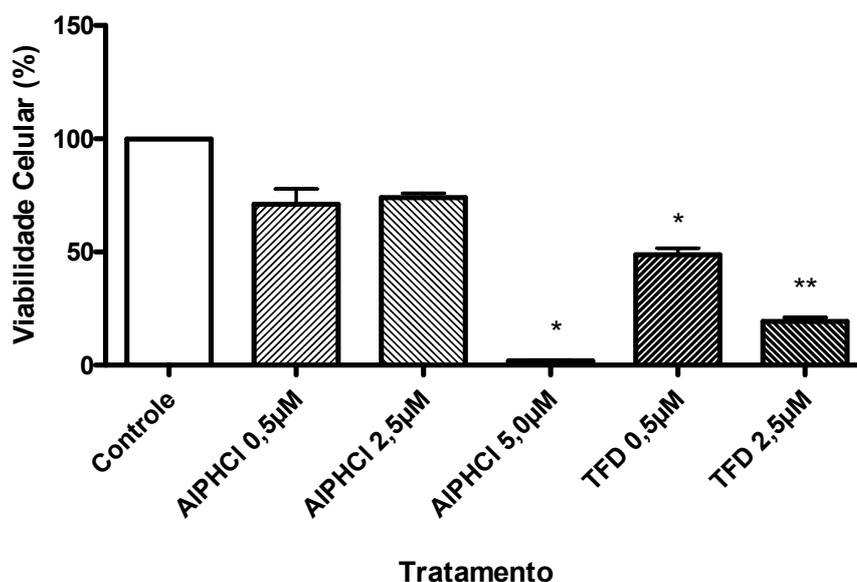


Figura 7. Viabilidade das células OSCC3, avaliada pelo método do MTT, submetidas aos diferentes tratamentos em relação ao grupo controle. Os resultados apresentam a Média e Desvio Padrão obtidos do resultado de 3 experimentos. Todos os grupos de tratamento apresentaram diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,001$). *diferença significativa em relação aos grupos tratados com AIPHCl lipossomal 0,5 μM e 2,5 μM ($p < 0,01$). **Diferença significativa em relação a todos os demais grupos tratados ($p < 0,05$).

Ao analisar os efeitos citotóxicos em uma linhagem de células normais, não foi observada alteração significativa nos grupos de tratamentos, com exceção do grupo TFD 2,5 μM , conforme dados da figura 8, onde observou-se uma redução na viabilidade de 5%.

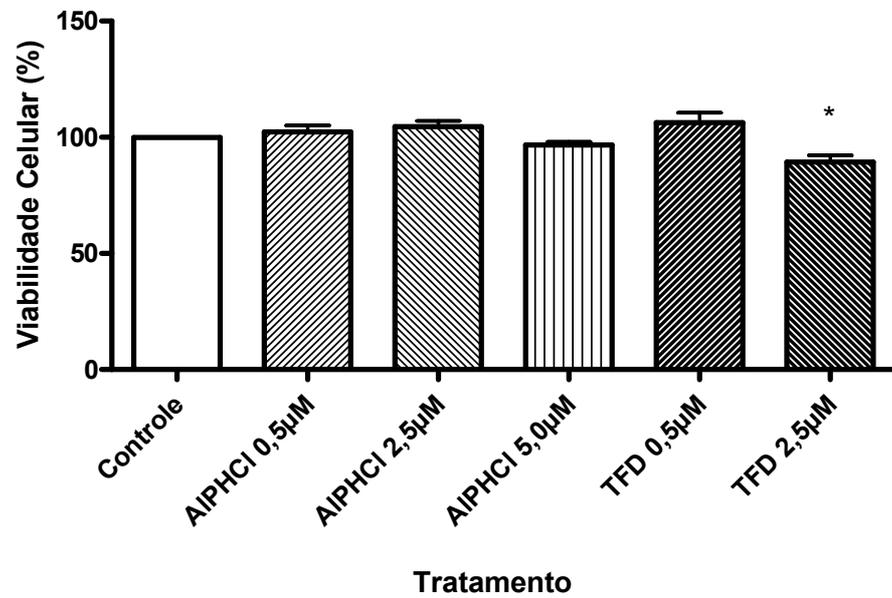


Figura 8. Viabilidade das células NIH 3T3, avaliada pelo método do MTT, submetidas aos diferentes tratamentos em relação ao grupo controle. Os resultados apresentam a Média e Desvio Padrão obtidos do resultado de 3 experimentos. *Diferença significativa em relação ao grupo controle $< 0,01$ e diferença significativa em relação ao grupo TFD 0,5 μM ($p < 0,001$).

4.1.2. Efeitos da TFD na morfologia das células OSCC 3 e NIH 3T3

A morfologia das células OSCC 3 nos diferentes grupos de tratamento, analisadas por Microscopia por Contraste de Fase está ilustrada na figura 9.

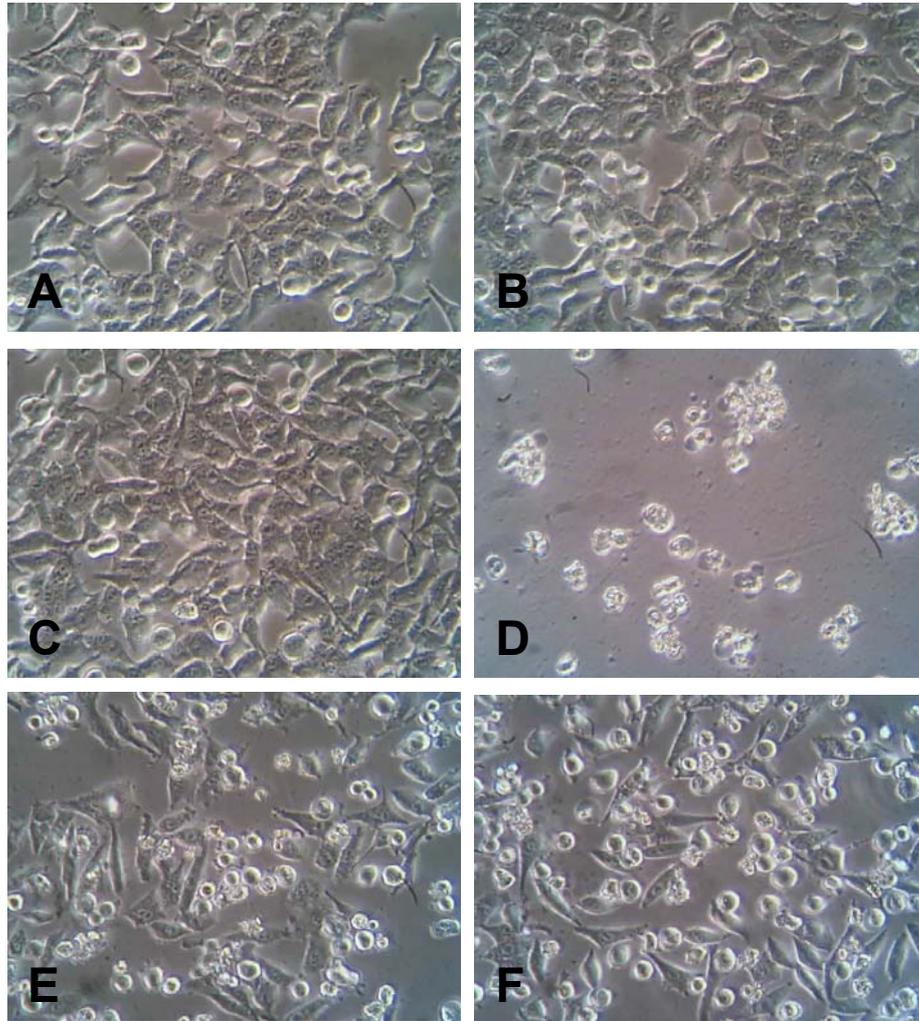


Figura 9. Análise da morfologia das células OSCC 3 por Microscopia de Contraste de Fase. Controle (A). Tratados com AIPHCI-lipossomal nas concentrações de 0,5 μ M (B), 2,5 μ M(C) e 5 μ M (D); Tratados e submetidos a TFD nas concentrações da AIPHCI-Lipossomal de 0,5 μ M (E) e 2,5 μ M (F).

As células OSCC 3 do grupo controle apresentaram forma estrelada, projeções citoplasmáticas, nucléolos evidentes, além de se apresentarem aderidas ao fundo da placa de cultivo e confluentes. Estas características correspondem à morfologia normal desta linhagem celular.

Ao analisar as células dos grupos tratados com AIPHCl 0,5 μ M e 2,5 μ M verificou-se as mesmas características encontradas na morfologia do grupo controle. Já o grupo tratado com AIPHCl 5 μ M apresentou apenas células com a morfologia característica de células não viáveis, ou seja, perda dos prolongamentos citoplasmáticos, tamanho reduzido e formato arredondado, núcleo celular não evidente além de estarem suspensas no meio, não aderidas.

Nos grupos tratados com a TFD nota-se um aumento dose-dependente das células com a morfologia alterada e em suspensão sugestivas de morte celular. Ainda pode-se inferir uma redução na proliferação das células submetidas a estes tratamentos, observando-se uma diminuição das células aderidas ao fundo da placa de cultivo.

Já na linhagem de fibroblasto NIH 3T3 não foi observada alterações morfológicas sugestivas de morte celular nos diferentes grupos tratados. Conforme a figura 10 A, observa-se células com prolongamentos citoplasmáticos, estreladas próprias deste tipo celular também em B, C, D, E e F, não sendo observado redução na confluência das células ao fundo da placa de cultivo, conforme demonstrado na figura 9 D, E e F.

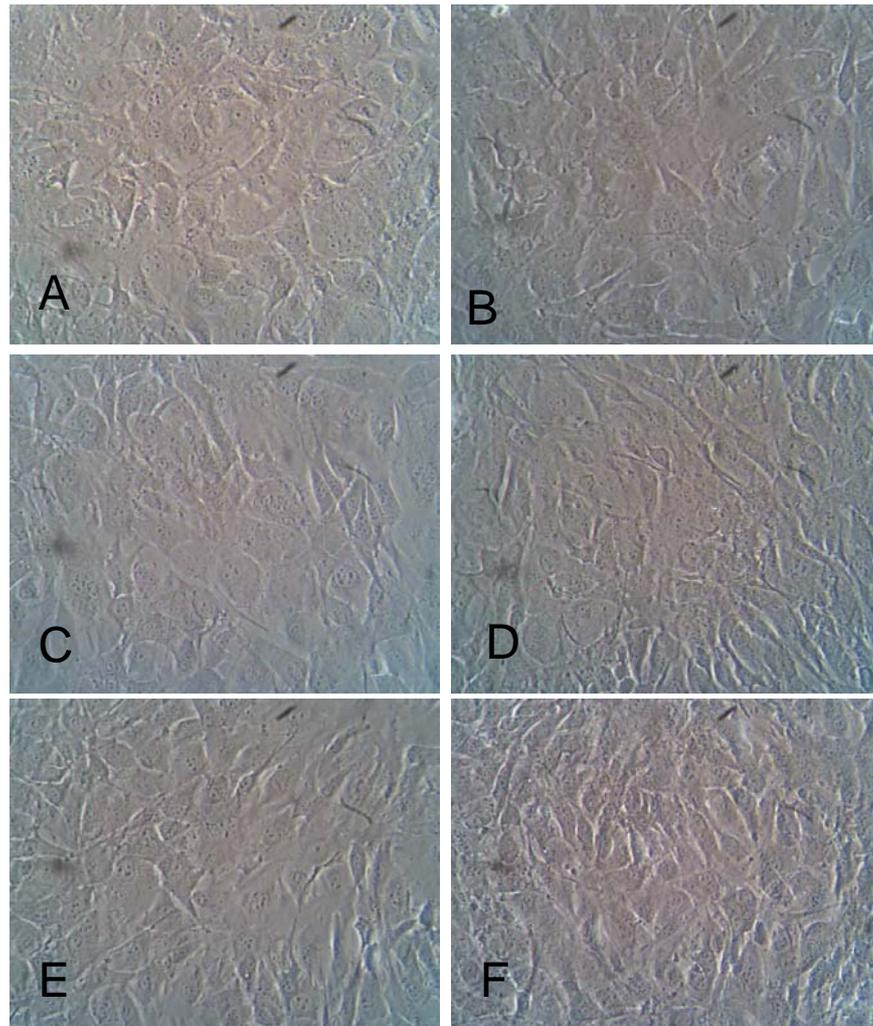


Figura 10. Análise da morfologia das células NIH 3T3 por Microscopia de Contraste de Fase. Controle (A). Tratados com AIPHCl-lipossomal nas concentrações de 0,5 μ M (B), 2,5 μ M(C) e 5 μ M (D); Tratados e submetidos a TFD nas concentrações da AIPHCl-lipossomal de 0,5 μ M (E) e 2,5 μ M (F).

Conforme os resultados descritos, no presente estudo, ao avaliar o emprego da TFD, utilizando- AIPHCl lipossomal como fotossensibilizador na linhagem OSCC 3, verificou-se que este fármaco apresenta alta citotoxicidade quando administrado na concentração de 5 μ M. Desta forma, baseando-se nos resultados obtidos no teste de MTT e morfologia, optou-se por eleger as concentrações de 0,5 μ M e 2,5 μ M para os subseqüentes testes citotóxicos e citostáticos.

Para confirmação dos resultados obtidos na Microscopia por Contraste de Fase, na linhagem OSCC 3, foram feitas análises da granulosidade e do tamanho celular por citometria de fluxo. A figura 11 ilustra o resultado obtido tendo como referência o percentual de células com a morfologia normal.

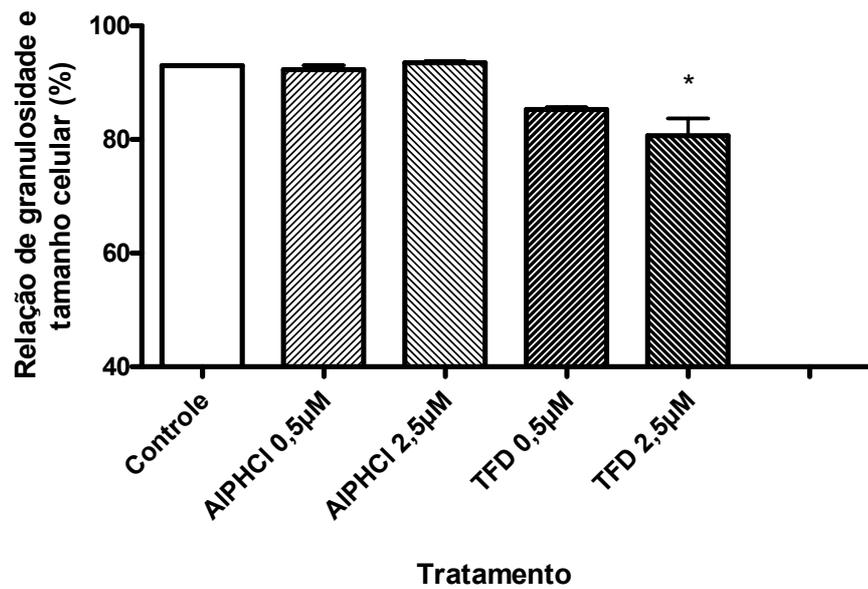


Figura 11. Relação de granulosidade (SSC) e tamanho (FSC) de células OSCC 3 submetidas aos diferentes tratamentos. Esta relação foi obtida após análise das células por citometria de fluxo. *Diferença significativa em relação aos grupos controle ($p < 0,001$)

Observou-se uma redução percentual (14%) na granulosidade e tamanho das células tratadas com TFD 2,5 μM em relação às células do grupo controle.

4.1.3 Integridade da membrana plasmática de células OSCC 3 e NIH 3T3 tratadas com TFD

Os resultados ilustrados na figura 12 demonstram que os grupos AIPHCl 0,5 μM e 2,5 μM apresentaram baixa porcentagem de células lesadas (3 a 5%) em relação ao grupo controle. No entanto, com o tratamento da TFD, nota-se uma diminuição das células com a membrana intacta de 6% no grupo TFD 0,5 μM e de aproximadamente 35% no grupo de 2,5 μM .

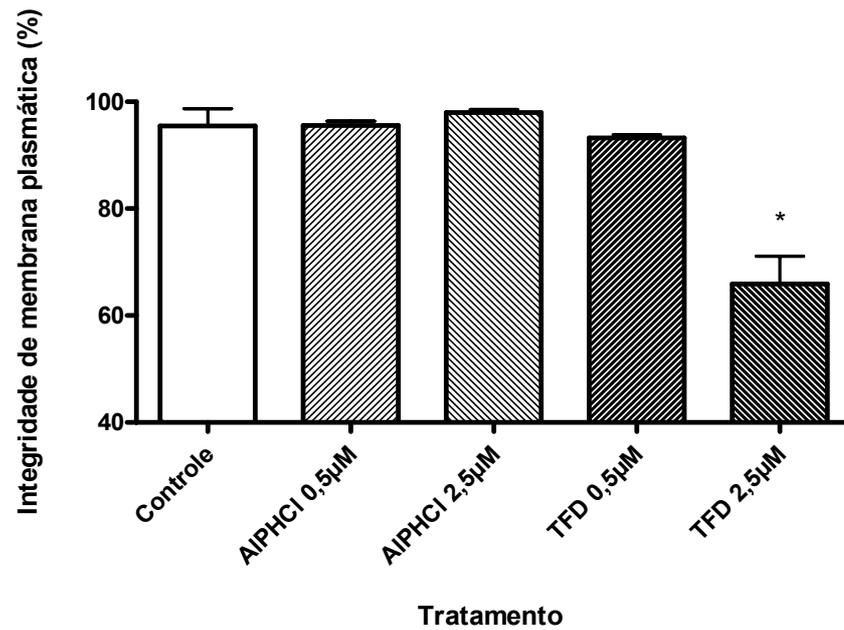


Figura 12. Integridade da membrana plasmática das células OSCC 3 submetidas aos diferentes tratamentos. Os resultados apresentam a Média e Desvio Padrão do número percentual de células com a membrana intacta de 3 experimentos. Considerando-se 100% o número total de células de cada tratamento. *Diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,001$). Teste de Azul Tripán.

Semelhantes resultados foram encontrados na linhagem de células normais NIH 3T3 conforme a figura 13. No entanto, observa-se que a redução das células viáveis ocorre em menor grau (aproximadamente 25%).

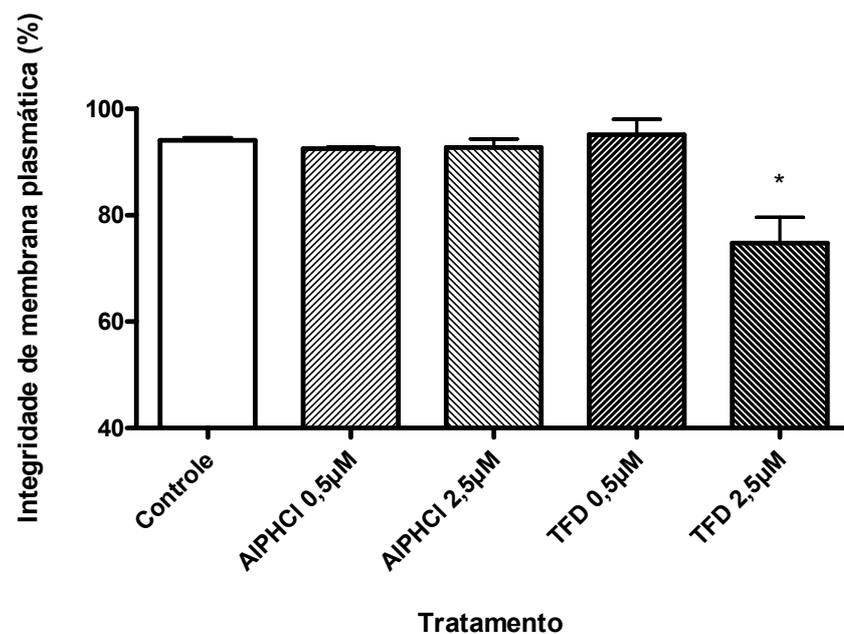


Figura 13. Integridade da membrana plasmática das células NIH 3T3 submetidas aos diferentes tratamentos. Os resultados apresentam a Média e Desvio Padrão do número percentual de células com a membrana intacta de 3 experimentos. Considerando-se 100% o número total de células de cada tratamento. *Diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,01$).

De acordo com os resultados acima descritos com a linhagem celular NIH 3T3, considerados como satisfatórios ao que se refere à biocompatibilidade da Terapia testada, não foi realizado os demais testes citotóxicos ou citostáticos.

4.1.4 Material genético das células OSCC 3 tratadas com TFD

Os efeitos da TFD com AIPHCl lipossomal na fragmentação do DNA das células OSCC 3 estão demonstrados na figura 14. Observa-se um maior percentual de células com o DNA fragmentado no grupo TFD 2,5 μM (aproximadamente 75%).

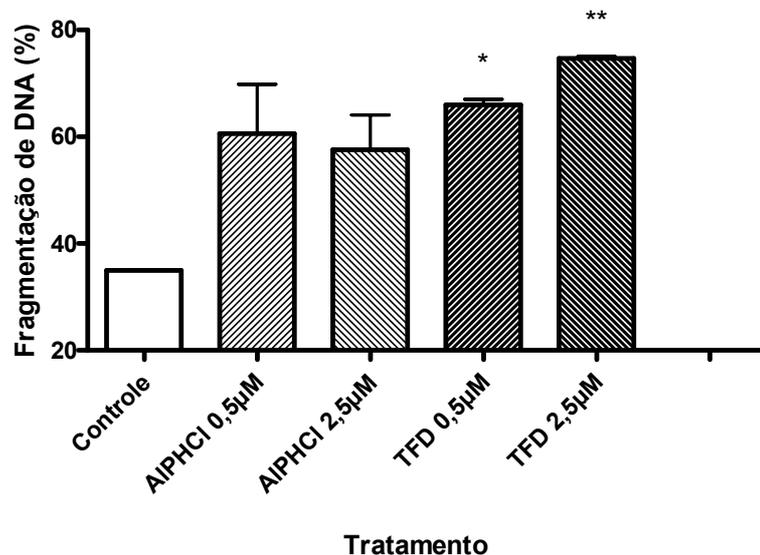


Figura 14. Fragmentação de DNA das células OSCC 3 submetidas aos diferentes tratamentos. O DNA das células foi corado com iodeto de propídeo e analisado por citometria de fluxo. Os resultados apresentam a Média e Desvio Padrão obtida do resultado de 2 experimentos. *diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,05$). **Diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,01$)

4.1.5 Potencial de membrana mitocondrial de células OSCC 3 tratadas com TFD

O tratamento com AIPHCl 0,5 μM e 2,5 μM não provocou alteração no potencial de membrana das células dentro do período observado. No entanto, o tratamento com TFD 0,5 μM provocou redução de 15% no potencial de mitocondrial das células enquanto o grupo tratado com TFD 2,5 μM obteve uma redução de 23% no mesmo, conforme representado na figura 15.

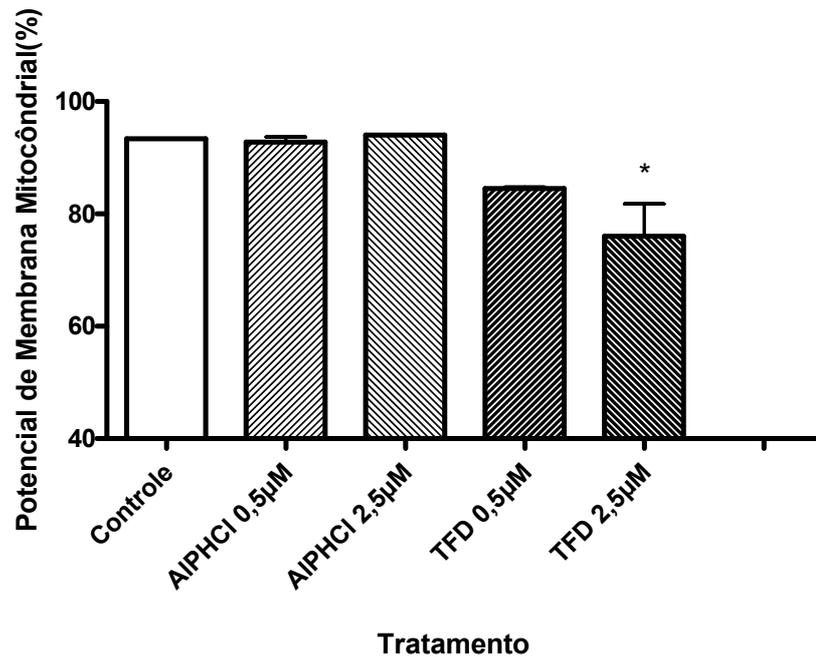


Figura 15. Potencial de Membrana Mitocôndrial ($\Delta\psi_m$) das células OSCC 3 submetidas aos diferentes tratamentos. As células foram tratadas com rodamina 123 e, em seguida, o $\Delta\psi_m$ foi analisado por citometria de fluxo. Os resultados apresentam a Média e Desvio Padrão obtida do resultado de 2 experimentos. *Diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,01$).

4.1. Análise dos Efeitos Citostáticos.

4.1.1 Efeitos da TFD na proliferação das células OSCC 3

A figura 16 demonstra o número de células totais em cada grupo de tratamento 24hs após o mesmo, obtido através do ensaio de Azul Tripán. Nos grupos tratados somente com o fármaco, há uma pequena diminuição do número total de células. Nota-se uma redução dose-dependente no número total de células nos grupos tratados com a TFD em ambas as concentrações. Observa-se uma diferença significativa em relação ao grupo controle, redução de 49% do número total de células, apenas no grupo TFD 2,5 μM .

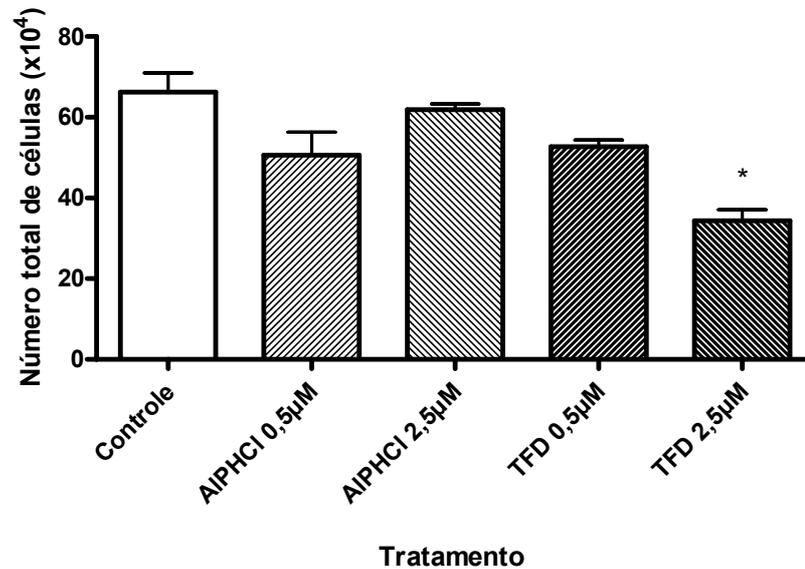


Figura 16. Avaliação da proliferação das células OSCC 3 submetidas aos diferentes tratamentos (número total de células resultante da média de 3 experimentos). *Diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,001$). Método Azul Tripán.

Na análise do ciclo celular por meio de citometria de fluxo (figura 17) dos diferentes tratamentos nota-se um aumento no número de células na fase S do ciclo celular (chegando a aproximadamente 100% nos grupos AIPHCl 2,5 µM, TFD 0,5 µM e TFD 2,5 µM) em relação ao grupo controle. Além disso, nota-se da mesma forma um menor número de células na fase G2 (redução em média de 36% nos grupos AIPHCl 2,5 µM, TFD 0,5 µM e TFD 2,5 µM) em relação ao grupo controle.

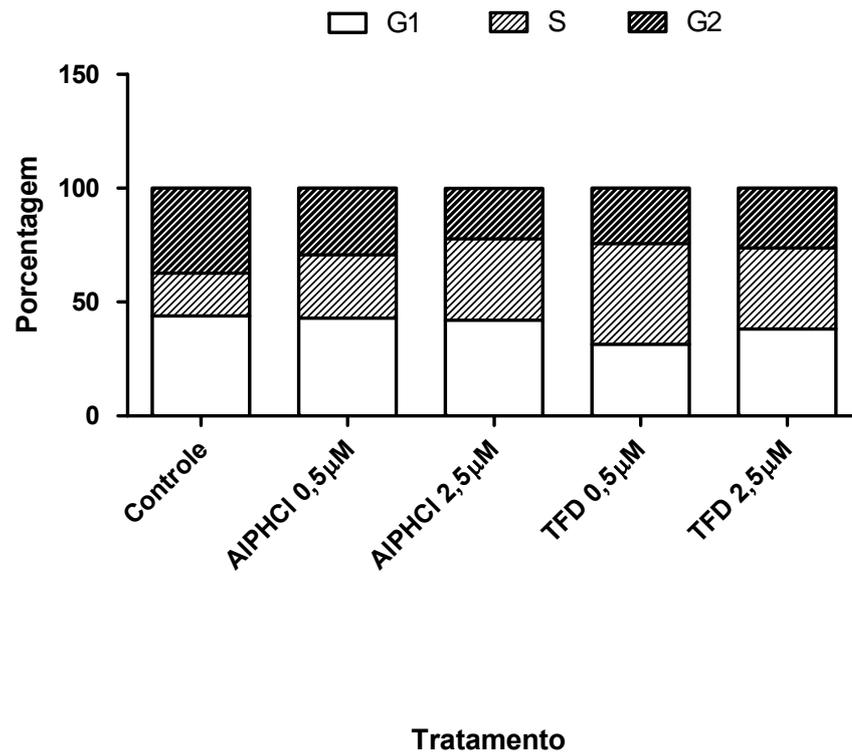


Figura 17. Ciclo celular das células OSCC 3 submetidas aos diferentes tratamentos (número total de células resultante da média de 2 experimentos). O DNA das células tratadas foi corado com iodeto de propideo e estas foram analisadas por citometria de fluxo. O cálculo da proporção das células em cada uma das fases do ciclo celular foi realizado considerando apenas as células com o DNA não fragmentado. Todos os grupos de tratamento apresentaram diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,001$).

4.3 Avaliação da influência da TFD na via de sinalização PI3K/AKT/mTOR por microscopia confocal em células OSCC 3

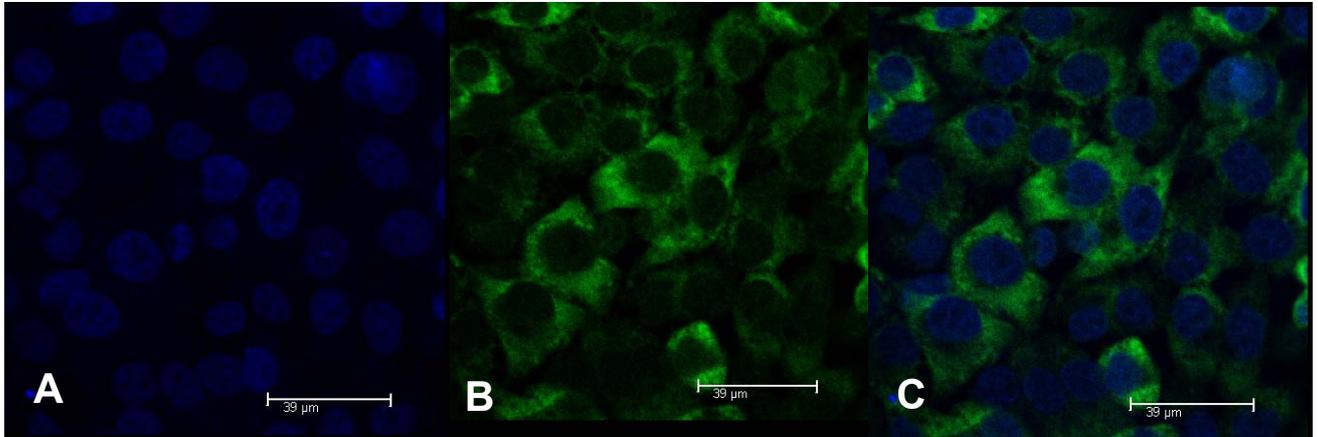


Figura 18. Microscopia Confocal das células OSCC 3, grupo Controle. As células OSCC 3 apresentam-se com marcação específica (DAPI) para o núcleo na figura A. A Figura B apresenta a marcação específica para o pS6 que fluoresce em verde, demonstrando uma marcação positiva desta proteína nesta linhagem celular. Na figura C há uma superposição das marcações descritas em A e B.

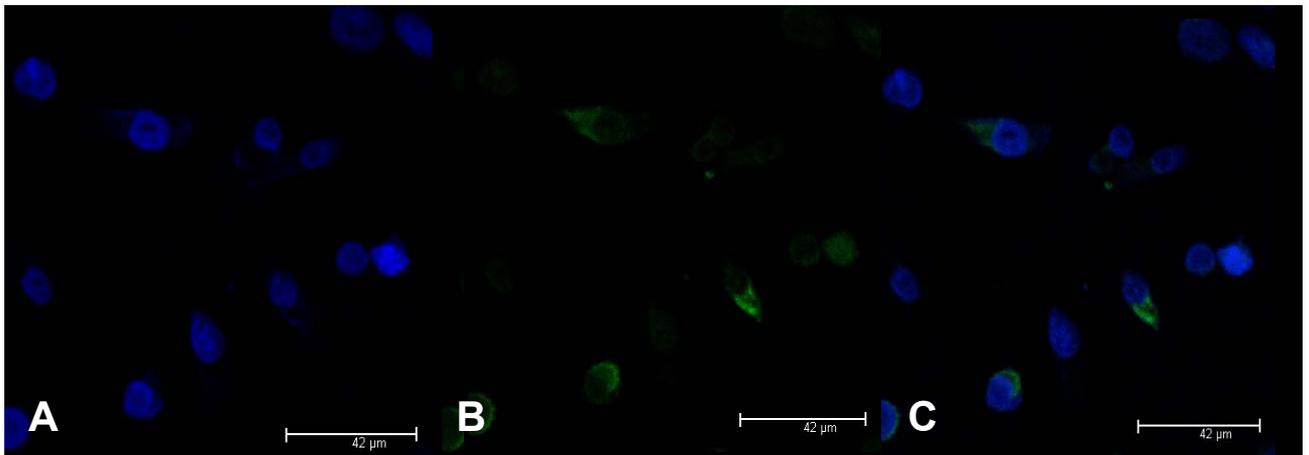


Figura 19. Microscopia Confocal das células OSCC 3, grupo Tratado com TFD 2,5µM. As células OSCC 3 apresentam-se com marcação específica (DAPI) para o núcleo na figura A. A Figura B apresenta a marcação específica para o pS6 que fluoresce em verde, demonstrando uma marcação pouco específica neste grupo tratado. Na figura C há uma superposição das marcações descritas em A e B.

À Microscopia Confocal nota-se a marcação específica, em azul, para núcleo com DAPI e a superexpressão de pS6, proteína ribossomal *downstream* de mTOR, que nesse ensaio fluoresce em verde, em células OSCC3, conforme ilustrado na figura 18. O grupo tratado com TFD 2,5 µM apresenta a mesma marcação específica para núcleo, no entanto há uma diminuição da expressão de pS6 marcado com FITC, figura 19 (c).

V – DISCUSSÃO

5. Discussão

A Incidência do Carcinoma Epidermóide Bucal continua elevada. Os fatores de risco relacionados ao estilo de vida, como uso de tabaco, álcool, e a exposição solar, são bem conhecidos. No entanto, o mecanismo de desenvolvimento, a influência genética e a predisposição a esta patologia são ainda objeto de muitas pesquisas atuais (BAGAN;SCULLY, 2008).

O câncer, uma doença originada de mutações nas seqüências de DNA, desregula vias de sinalização estreitamente relacionadas com a viabilidade, morte e homeostase celular (DE VISSER;EICHTEN et al., 2006).

Entre os tratamentos empregados para a cura do câncer, destaca-se a Terapia Fotodinâmica. Atualmente muitos estudos estão sendo feitos para comprovar a sua eficácia terapêutica em cada tipo de câncer. Esta avaliação depende do tecido em questão, do fotossensibilizador e fonte de laser utilizado.

O Carcinoma Epidermóide Bucal é um tipo de tumor favorável à aplicação deste tipo de tratamento, por se tratar, sobretudo de um tumor de localização acessível. Embora haja alguns protocolos já descritos na literatura utilizando-se a TFD para o tratamento de lesões pré-neoplásicas, como a Leucoplasia, há uma crescente necessidade da busca do fotossensibilizador ideal para o tratamento deste tipo de câncer, dado que os fotossensibilizadores atuais provocam efeitos adversos não desejados.

Como mencionado anteriormente, o fotossensibilizador ideal deve possuir uma dose eficaz muito menor do que a dose tóxica e alta especificidade para o tecido alvo. Para tanto, faz-se necessário o estudo de diferentes concentrações do mesmo fotossensibilizador para cada tipo celular.

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que o tratamento de células derivadas do Carcinoma Epidermóide Bucal (OSCC 3) com a TFD, utilizando-se AIPHCl lipossomal como fotossensibilizador, induziu significativa redução, dose-dependente, na viabilidade celular após 24hs decorridas da aplicação.

O AIPHCl é um fotossensibilizador hidrofóbico cuja localização subcelular primária é mitocondrial. Tal como outros fotossensibilizadores hidrofóbicos que se localizam nesta organela, aí exerce sua ação primária. Numa série de estudos, Kessel e seus colaboradores (1998) demonstraram que

fotossensibilizadores localizados na mitocôndria são rápidos indutores de apoptose, em contraste com aqueles localizados nos lisossomos ou na membrana plasmática. O mecanismo dessa rápida ativação da apoptose ainda não se encontra totalmente elucidado (KESSEL;LUO, 1998).

Sabe-se, no entanto que a combinação de alguns fatores, entres eles a localização subcelular e a dose do fotossensibilizador, é determinante para o tipo e extensão de morte celular. Em geral, resulta em apoptose quando do uso de baixas doses de TFD, e em necrose na aplicação de doses mais altas (CASTANO;DEMIDOVA et al., 2005b).

A redução da viabilidade celular analisada pela metabolização de MTT é um indicativo de redução da proliferação celular, indução de morte celular, ou ocorrência de ambos os processos simultaneamente.

O controle da proliferação celular em células tumorais é considerado uma estratégia para prevenir ou retardar o crescimento tumoral (MOLINARI, 2000). No entanto, nos tratamentos com TFD pode ser considerado como consequência do mecanismo de morte celular suscitado.

Neste trabalho, constatou-se que o número de células diminuiu após o tratamento com a TFD. O teste de Exclusão por Azul Tripán foi conduzido com o objetivo de validar os resultados obtidos no MTT. Desta forma, os resultados confirmam a eficácia dose-dependente da TFD demonstrado no teste do MTT. No entanto, os resultados desse mesmo teste apresentam uma menor efetividade, ou seja, uma maior viabilidade celular, mesmo no grupo tratado com a TFD na maior concentração (TFD 2,5 μ M – 51%), quando comparados com os resultados obtidos no MTT.

Esta diferença indica como provável que possa ocorrer em tempos diferentes o prejuízo metabólico medido pela atividade mitocondrial detectada no MTT e o dano celular irreversível medido pela alteração da membrana plasmática celular detectado no teste do Azul Tripán. Além disso, vale ressaltar que ambos os testes possuem sensibilidades diferentes. Desta forma os resultados obtidos pelos diferentes testes podem ser considerados como aditivos (MACHADO;SOARES et al., 2008).

Entre as características das células que entram em processo de morte celular destaca-se a morfologia alterada, com perda da adesão celular e redução

do volume e granulosidade celular, entre outros aspectos relevantes (MAJNO;JORIS, 1995; DARZYNKIEWICZ;JUAN et al., 1997).

A análise pela microscopia por contraste de fase permitiu constatar que as células tratadas com TFD em ambas as concentrações apresentaram uma menor confluência de adesão à placa de cultivo, proporcional ao aumento das células com a morfologia alterada, sugestivas de morte celular, em comparação com as células do grupo controle. A análise por citometria de fluxo confirmou a redução do volume e granulosidade celular apresentada no grupo TFD 2,5 μ M. Este resultado também confirma os dados obtidos nos testes de MTT e Azul Tripán, no que se refere à redução da viabilidade celular.

Para melhor investigação dos efeitos da TFD na proliferação celular, foi feita a avaliação do ciclo celular das células OSCC 3.

Estudos anteriores abordando as ftalocianinas demonstraram que este fotossensibilizador, aplicado à TFD, induz a morte celular e causa a apreensão das células na fase G0/G1 do ciclo celular de modo dose-dependente (HAYWOOD-SMALL;VERNON et al., 2006). Em contrapartida, outros trabalhos estão investigando a possibilidade do laser causar a acumulação das células na fase G2/M. Assim, as células moderadamente sensibilizadas seriam ativadas após uma segunda irradiação, entrando em colapso quando já se progrediu no ciclo celular (VARRIALE;COPPOLA et al., 2002).

A progressão do ciclo celular de células eucarióticas envolve a ativação seqüencial de quinases que são dependentes da associação com suas respectivas ciclinas regulatórias. O bloqueio de uma das fases do ciclo celular está relacionado com alterações na ativação/inibição das moléculas responsáveis pela regulação do ciclo (MOLINARI, 2000).

No presente estudo, o tratamento com ALPHCl 0,5 μ M e 2,5 μ M e com a TFD nas duas concentrações induziu alterações no ciclo celular, diminuindo a proporção de células nas fases G1,G2 e aumentando-a na fase S do ciclo celular. Isto sugere que parte das células sobreviventes após a TFD possivelmente entraram em apoptose, não chegando ao final do ciclo celular. Além disso, pode-se inferir que, nesta linhagem celular, este tratamento teria possivelmente um efeito citostático intrínseco, numa segunda aplicação do laser, fato este já relatado por Varriale e colaboradores (2002).

Evidências recentes indicam que a TFD pode matar as células cancerígenas diretamente pela indução da apoptose celular ou ainda pelas outras vias de morte celular, como a necrose ou a autofagia. A identificação de efetores moleculares que regulam a comunicação entre estas vias de morte celular é uma área de pesquisa intensa no que se refere ao tratamento do câncer. As moléculas de sinalização que modulam a indução de diferentes vias de morte poderiam ser também marcadores do aumento da eficácia da TFD (BUYTAERT;DEWAELE et al., 2007).

No nível molecular, a destruição direta do tumor pela TFD é causada por um dano irreversível a estruturas subcelulares vitais, que incluem a membrana plasmática, a membrana intracelular mitocondrial, os lisossomos, o complexo de Golgi e o retículo endoplasmático e o DNA.

A primeira decorrência da TFD que emprega fotossensibilizadores mitocondriais na células é a liberação de citocromo c mitocondrial para o citosol, fato observado imediatamente após a TFD em alguns casos. Acrescenta-se a isto uma rápida perda do potencial mitocondrial, devido à formação de canais na superfície da membrana mitocondrial, também chamados de poros de permeabilidade mitocondrial. Estes canais ainda não foram completamente definidos, mas são aparentemente formados por proteínas de membrana – interna e externa - que podem separar-se despolarizando a membrana mitocondrial com a liberação de fatores pró-apoptóticos (MAFTOUM-COSTA;NAVES et al., 2008).

Desta forma, a mitocôndria é cada vez mais considerada como uma importante organela alvo durante o fotodano. Vários estudos usando tratamento por TFD demonstram o colapso do potencial mitocondrial após a terapia. Este fato foi também observado neste estudo nas células OSCC-3 submetidas ao tratamento com TFD utilizando-se ALPHCI lipossomal nas concentrações de 0,5 μ M e 2,5 μ M , onde foi encontrada uma diminuição dose-dependente do potencial mitocondrial celular (FERREIRA;TEDESCO et al., 2004; MAFTOUM-COSTA;NAVES et al., 2008).

Além disso, estudos comprovam que as mitocôndrias do carcinoma de células escamosas acumulam uma quantidade muito maior de determinados fotossensibilizadores do que as mitocôndrias de células normais. Este resultado foi também constatado neste trabalho com o tratamento da TFD nas células

derivadas de fibroblastos NIH 3T3, pelos testes de MTT e análise morfológica. Apenas o grupo tratado com TFD na concentração de 2,5µM apresentou uma pequena redução da viabilidade celular e alteração na integridade da membrana, provavelmente provocadas pela necrose suscitada pela produção de ROS em pequena escala. O achado sugere uma biocompatibilidade do AIPHCl lipossomal em células normais (não cancerígenas) e sua especificidade para células cancerígenas (CASTANO;DEMIDOVA et al., 2004).

A maioria dos fotossensibilizadores não sofre acumulação no núcleo celular. Por isso, a TFD geralmente causa pouco ou nenhum dano ao DNA, como mutações e carcinogênese, o que representa uma vantagem da TFD quando comparada a outras terapias, como a Radioterapia. Os ensaios realizados relativos à integridade do material genético mostraram que o tratamento com TFD com AIPHCl lipossomal induziu alta fragmentação do DNA (75%). A fragmentação do DNA é uma característica marcante no processo apoptótico desencadeado após a ativação de caspases, que ativam endonucleases, contribuindo para a intensa fragmentação de DNA e condensação da cromatina (SAVILL;FADOK, 2000).

Alguns estudos demonstraram a realocização de alguns fotossensibilizadores após a irradiação, sugerindo que além do primeiro sítio, o fotodano pode ser rapidamente propagado para outras estruturas subcelulares (BUYTAERT;DEWAELE et al., 2007).

Desta forma também foi analisada a integridade da membrana plasmática, pelo ensaio de Azul Tripán. Geralmente, a alteração na membrana plasmática é uma característica atribuída ao tipo de morte celular denominada necrose. Como este programa de morte celular se inicia com danos físicos às células, leva à ruptura da membrana plasmática. No entanto, células em estágios avançados de apoptose podem assemelhar-se a estas células necróticas, também apresentando a membrana plasmática com a integridade corrompida.

É possível que os estágios iniciais dos processos de apoptose e necrose compartilhem uma via comum, e o modo de morte celular seja influenciado fortemente pela liberação da caspase. Então, a inativação desta enzima e, portanto, da apoptose, implicaria a morte por necrose (CASTANO;DEMIDOVA et al., 2005b).

De acordo com os resultados apresentados, o tratamento com TFD em ambas as concentrações provocou pouco dano à membrana plasmática, apesar de estatisticamente significativo na concentração de 2,5 μ M, sugerindo que uma pequena porção das células teria morrido por necrose, conforme outros estudos feitos pelo grupo (TAPAJÓS;LONGO et al., 2008).

Alguns estudos mostram evidências de que a autofagia e a apoptose são processos evolutivamente relacionados. Ambos os processos apresentam moléculas e vias intracelulares de ativação em comum (MARIÑO;LÓPEZ-OTÍN, 2004). No entanto, o mecanismo de autofagia também pode proteger algumas células cancerígenas contra tratamentos, bloqueando a via da apoptose. Em mamíferos, a autofagia é controlada principalmente pela via da quinase PI3K/AKT/mTOR.

Como a via envolvendo PI3K é crucial na regulação da sobrevivência ao estresse celular, e dado que os tumores frequentemente existem em um ambiente de estresse metabólico, com limitado suprimento de oxigênio, e baixo pH, a inibição desta via é um alvo interessante para tratamentos. Somando-se a isto, a fosforilação é um meio importante para modificação pós-tradução de proteínas, e é um mecanismo muito utilizado para regulação de proteínas nas vias de sinalização. O conhecimento sobre a fosforilação de proteínas-chave após a TFD é fundamental para elucidar de modo completo seu mecanismo de ação. No entanto, atualmente, há poucos estudos relatando sobre o efeito da TFD nestas vias.

No presente trabalho foi avaliada a inibição da via PI3K/AKT/mTOR, pela expressão de uma proteína fosforilada, efetora de mTOR, pS6, sendo observada uma clara inibição desta proteína com o tratamento empregado. O fato sugere que esta via é inibida pela TFD utilizando-se AIPHCl lipossomal na concentração de 2,5 μ M. Possivelmente, esta inibição acontece em decorrência de uma oxidação de mTOR, provocada pela reação fotoquímica(INFO;WEYERGANG et al., 2009).

Além disso, como a ativação desta via inibe a autofagia, por este resultado pode-se inferir que há uma estimulação deste processo suscitado pela TFD. Este resultado se mostrou muito promissor em virtude de que estudos anteriores com outras vias, como a via da quinase MAPK, cruciais no desenvolvimento da

carcinogênese, não se apresentaram alteradas pela atuação da TFD (MOOR, 2000).

Tomados em conjunto, os resultados apresentados nesta dissertação demonstram que o tratamento com a TFD utilizando-se AIPHCl lipossomal é biocompatível com os tecidos adjacentes sadios, suscita diferentes mecanismos de morte celular dose-dependente, sendo a apoptose a via principal envolvida, e pode ainda regular a proliferação, crescimento, e outros processos pela inibição da via do mTOR. Desta forma, a TFD utilizando-se AIPHCl lipossomal apresenta grandes possibilidades para o tratamento do câncer bucal. Embora não constitua o objetivo deste trabalho, acredita-se que, combinada com terapias que induzem o estresse celular, como a quimioterapia ou ainda radioterapia, esta modalidade terapêutica possa ser ainda mais eficaz (HENNESSY; SMITH et al., 2005; VERMA; WATT et al., 2007).

VI – CONCLUSÕES

6. Conclusões

1. A aplicação da Terapia Fotodinâmica mediada por ALPHCI lipossomal nas concentrações de 0,5 μ M e 2,5 μ M provoca efeitos citotóxicos, dose-dependentes na linhagem OSCC 3.
2. A aplicação da Terapia Fotodinâmica mediada por ALPHCI lipossomal nas concentrações de 0,5 μ M e 2,5 μ M provoca efeitos citostáticos conseqüentes dos efeitos citotóxicos na linhagem OSCC 3.
3. Os efeitos citostáticos e citotóxicos induzidos pela Terapia Fotodinâmica mediada por ALPHCI lipossomal nas concentrações de 0,5 μ M e 2,5 μ M, na linhagem OSCC 3, são característicos principalmente da apoptose celular, podendo estar correlacionados à autofagia e necrose.
4. A aplicação da Terapia Fotodinâmica mediada por ALPHCI lipossomal atua na via PI3K/AKT/mTOR inibindo-a.
5. Terapia Fotodinâmica mediada por ALPHCI lipossomal nas concentrações de 0,5 μ M e 2,5 μ M não apresentou citotoxicidade às células normais NIH 3T3.

VII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. Referências Bibliográficas

- BAGAN, J. V. e C. SCULLY. Recent advances in Oral Oncology 2007: Epidemiology, aetiopathogenesis, diagnosis and prognostication. **Oral Oncology**, v.44, p.103-108. 2008.
- BIEL, M. A. Photodynamic Therapy Treatment of Early Oral and Laryngeal Cancers. **Photochemistry and Photobiology**, v.83, p.1063-1068. 2007.
- BOZKULAK, O., S. WONG, M. LUNA, A. FERRARIO, N. RUCKER, M. GULSOY e C. J. GOMER. Multiple Components of Photodynamic Therapy Can Phosphorylate Akt. **Photochemistry and Photobiology**, v.83, p.1029-1033. 2007.
- BUYTAERT, E., M. DEWAELE e P. AGOSTINIS. Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer**, v.1776, p.86-107. 2007.
- CASTANO, A. P., T. N. DEMIDOVA e M. R. HAMBLIN. Mechanisms in photodynamic therapy: part one—photosensitizers, photochemistry and cellular localization. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v.1, p.279-293. 2004.
- CASTANO, A. P., T. N. DEMIDOVA e M. R. HAMBLIN. Mechanisms in photodynamic therapy: Part three—Photosensitizer pharmacokinetics, biodistribution, tumor localization and modes of tumor destruction. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v.2, p.91-106. 2005a.
- CASTANO, A. P., T. N. DEMIDOVA e M. R. HAMBLIN. Mechanisms in photodynamic therapy: part two—cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v.2, p.1-23. 2005b.
- CASTANO, A. P., P. MROZ e M. R. HAMBLIN. Photodynamic therapy and anti-tumour immunity. **Nature Reviews Cancer**, v.6, p.535. 2006.
- CHEN, B., B. W. POGUE, P. J. HOOPES e T. HASAN. Combining vascular and cellular targeting regimens enhances the efficacy of photodynamic therapy. **International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics**, v.61, p.1216-1226. 2005.

CHEN, H. M., C. T. CHEN, H. YANG, M. Y. P. KUO, Y. S. KUO, W. H. LAN, Y. P. WANG, T. TSAI e C. P. CHIANG. Successful treatment of oral verrucous hyperplasia with topical 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy. **Oral Oncology**, v.40, p.630-637. 2004.

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

CONCEICAO PEREIRA, M., D. TOSTES OLIVEIRA, G. LANDMAN e L. P. KOWALSKI. Histologic subtypes of oral squamous cell carcinoma: Prognostic relevance. **Journal- Canadian Dental Association**, v.73, p.339-344. 2007.

CULLY, M., H. YOU, A. J. LEVINE e T. W. MAK. Beyond PTEN mutations: the PI3K pathway as an integrator of multiple inputs during tumorigenesis. **Nature Reviews Cancer**, v.6, p.184-192. 2006.

DARZYNKIEWICZ, Z., G. JUAN, X. LI, W. GORCZYCA, T. MURAKAMI e F. TRAGANOS. Cytometry in cell necrobiology: Analysis of apoptosis and accidental cell death(necrosis). **Cytometry**, v.27, p.1-20. 1997.

DE VISSER, K. E., A. EICHTEN e L. M. COUSSENS. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. **Nature**, v.6, p.2-8. 2006.

DERYCKE, A. S. L. e P. A. M. DE WITTE. Liposomes for photodynamic therapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.56, p.17-30. 2004.

FAIVRE, S., G. KROEMER e E. RAYMOND. Current development of mTOR inhibitors as anticancer agents. **Nature Reviews Drug Discovery**, v.5, p.671. 2006.

FERREIRA, S., A. C. TEDESCO, G. SOUSA, R. A. ZÂNGARO, N. S. SILVA, M. T. T. PACHECO e C. PACHECO-SOARES. Analysis of mitochondria, endoplasmic reticulum and actin filaments after PDT with AIPcS 4. **Lasers in Medical Science**, v.18, p.207-212. 2004.

FRESHNEY, R. I. Culture of Animal Cells. A Manual of Basic Technique .New York: Wiley-Liss Inc.2000.

HANAHAN, D. e R. A. WEINBERG. The Hallmarks of Cancer. **Cell**, v.100, p.57-70. 2000.

HAYWOOD-SMALL, S. L., D. I. VERNON, J. GRIFFITHS, J. SCHOFIELD e S. B. BROWN. Phthalocyanine-mediated photodynamic therapy induces cell death and a G0/G1 cell cycle arrest in cervical cancer cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.339, p.569-576. 2006.

HENNESSY, B. T., D. L. SMITH, P. T. RAM, Y. LU e G. B. MILLS. Exploiting the PI3K/AKT Pathway for Cancer Drug Discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v.4, p.988-1004. 2005.

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

INCA.Instituto Nacional do Câncer. Ministério da Saúde - Estimativa da incidência de câncer no Brasil. 2008.

INFO, S., A. WEYERGANG, K. BERG, O. KAALHUS, Q. PENG e P. K. SELBO. Photodynamic Therapy Targets the mTOR Signaling Network in Vitro and in Vivo. **Mol. Pharmaceutics**. 2009.

JEMAL, A., R. SIEGEL, E. WARD, Y. HAO, J. XU, T. MURRAY e M. J. THUN. Cancer Statistics, 2008. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v.58, p.71-96. 2008.

KESSEL, D. e Y. U. LUO. MITOCHONDRIAL PHOTODAMAGE AND PDT-INDUCED APOPTOSIS. **Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology**, v.42, p.89-95. 1998.

KONDO, Y., T. KANZAWA, R. SAWAYA e S. KONDO. Role of autophagy in cancer development and response to therapy. **Nature Reviews Cancer**, v.5, p.726. 2005.

LEVINE, B. e D. J. KLIONSKY. Development by Self-Digestion Molecular Mechanisms and Biological Functions of Autophagy. **Developmental Cell**, v.6, p.463-477. 2004.

LIPPMAN, S. M., J. SUDBO e W. K. HONG. Oral Cancer Prevention and the Evolution of Molecular-Targeted Drug Development. **Journal of Clinical Oncology**, v.23, p.346. 2005.

LOBO, N. A., Y. SHIMONO, D. QIAN e M. F. CLARKE. The Biology of Cancer Stem Cells. **Annual Review of Cell Developmental Biology**, v.23, p.675. 2007.

LONGO, J. P. F. **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**. Patologia Molecular, Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

LONGO, J. P. F., S. P. LOZZI, A. R. SIMIONI, P. C. MORAIS, A. C. TEDESCO e R. B. AZEVEDO. Photodynamic therapy with aluminum-chloro-phthalocyanine induces necrosis and vascular damage in mice tongue tumors. **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**. 2008.

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

MACHADO, A. H. A., F. M. P. BRAGA, C. P. SOARES, M. M. M. PELISSON, M. BELTRAME e N. S. DA SILVA. Photodynamic Therapy with a New Photosensitizing Agent. **Photomedicine and Laser Surgery**, v.25, p.220-228. 2007.

MACHADO, A. H. A., C. P. SOARES, M. B. JUNIOR, M. T. T. PACHECO e N. S. DA SILVA. Cytotoxicity of Octal-Bromide Zinc Phthalocyanine After Photodynamic Therapy with Different Light Sources. **Photomedicine and Laser Surgery**, v.26, p.455-459. 2008.

MAFTOUM-COSTA, M., K. T. NAVES, A. L. OLIVEIRA, A. C. TEDESCO, N. S. DA SILVA e C. PACHECO-SOARES. Mitochondria, endoplasmic reticulum and actin filament behavior after PDT with chloroaluminum phthalocyanine liposomal in HeLa cells. **Cell Biology International**. 2008.

MAJNO, G. e I. JORIS. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. **American Journal of Pathology**, v.146, p.3-15. 1995.

MARIÑO, G. e C. LÓPEZ-OTÍN. Autophagy: molecular mechanisms, physiological functions and relevance in human pathology. **Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)**, v.61, p.1439-1454. 2004.

MILLER, J. D., E. D. BARON, *et al.* Photodynamic therapy with the phthalocyanine photosensitizer Pc 4: The case experience with preclinical mechanistic and early clinical–translational studies. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.224, p.290-299. 2007.

MOLINARI, M. Cell cycle checkpoints and their inactivation in human cancer. **Cell Proliferation**, v.33, p.261-274. 2000.

MOLINOLO, A. A., P. AMORNPHIMOLTHAM, C. H. SQUARIZE, R. M. CASTILHO, V. PATEL e J. S. GUTKIND. Dysregulated molecular networks in head and neck carcinogenesis. **Oral Oncology**. 2008.

MOOR, A. C. E. Signaling pathways in cell death and survival after photodynamic therapy. **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**, v.57, p.1-13. 2000.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v.65, p.55-63. 1983.

NAGPAL, J. K. e B. R. DAS. Oral cancer: reviewing the present understanding of its molecular mechanism and exploring the future directions for its effective management. **Oral Oncology**, v.39, p.213-221. 2003.

NEVILLE, B. W., D. D. DAMM, C. M. ALLEN e J. E. BOUQUOT. **Patologia oral & maxilofacial**: Guanabara Koogan. 2004

NOR, J. E., J. CHRISTENSEN, J. LIU, M. PETERS, D. J. MOONEY, R. M. STRIETER e P. J. POLVERINI. Up-Regulation of Bcl-2 in Microvascular Endothelial Cells Enhances Intratumoral Angiogenesis and Accelerates Tumor Growth 1: **American Association for Cancer Research**. 61: 2183-2188 p. 2001.

NÖR, J. E., M. C. PETERS, J. B. CHRISTENSEN, M. M. SUTORIK, S. LINN, M. K. KHAN, C. L. ADDISON, D. J. MOONEY e P. J. POLVERINI. Engineering and Characterization of Functional Human Microvessels in Immunodeficient Mice. **Laboratory Investigation**, v.81, p.453-463. 2001.

OGASAWARA, T., N. MIYOSHI, K. SANO, Y. KITAGAWA, T. YAMADA, T. OGAWA, K. MIYAUCHI e H. KINOSHITA. Influence of administration methods on the accumulation of ALA-induced Pp-IX in mouse tongue tumors. **Oral Diseases**, v.12, p.415. 2006.

ORD, R. A. e R. H. BLANCHAERT. Current management of oral cancer A multidisciplinary approach. **The Journal of the American Dental Association**, v.132, p.19-23. 2001.

PERES, C. M. C., R, Ed. **Como cultivar células**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., p.283ed. 2005.

PETIOT, A., E. OGIER-DENIS, E. F. C. BLOMMAART, A. J. MEIJER e P. CODOGNO. Distinct Classes of Phosphatidylinositol 3'-Kinases Are Involved in Signaling Pathways That Control Macroautophagy in HT-29 Cells. **Journal of Biological Chemistry**, v.275, p.992-998. 2000.

REIBEL, J. PROGNOSIS OF ORAL PRE-MALIGNANT LESIONS: SIGNIFICANCE OF CLINICAL, HISTOPATHOLOGICAL, AND MOLECULAR BIOLOGICAL CHARACTERISTICS. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v.14, p.47. 2003.

SANNOMIYA, E. K. F., S. Diferentes métodos de tratamento radioterápico em tumores da cavidade bucal e suas complicações. **Revista Brasileira de Odontologia**, v.57, p.336-338. 2000.

SAVILL, J. e V. FADOK. Corpse clearance defines the meaning of cell death. **NATURE-LONDON**, p.784-788. 2000.

SILVERMAN, S. O. L. Demographics and occurrence of oral and pharyngeal cancers The outcomes, the trends, the challenge. **The Journal of the American Dental Association**, v.132, p.7-11. 2001.

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

VARRIALE, L., E. COPPOLA, M. QUARTO, B. MARIA VENEZIANI e G. PALUMBO. Molecular aspects of photodynamic therapy: low energy pre-sensitization of hypericin-loaded human endometrial carcinoma cells enhances photo-tolerance, alters gene expression and affects the cell cycle. **Federation of European Biochemical Societies**, v.512, p.287-290. 2002.

VERMA, S., G. M. WATT, Z. MAI e T. HASAN. Strategies for Enhanced Photodynamic Therapy Effects. **Photochemistry and Photobiology**, v.83, p.996-1005. 2007.

VIVANCO, I. e C. L. SAWYERS. The phosphatidylinositol 3-kinase/AKT pathway in human cancer. **Nature Reviews Cancer**, v.2, p.489-501. 2002.

