

ERIKA DOS SANTOS CARVALHO

**TERAPIA FOTODINÂMICA UTILIZANDO O
CLORIDRATO DE AMINOLEVULINATO DE METILA
NO MODELO DE CÂNCER BUCAL EM MURINO
INDUZIDO POR CÉLULAS DE WALKER 256**

BRASÍLIA, 2008

ERIKA DOS SANTOS CARVALHO

**TERAPIA FOTODINÂMICA UTILIZANDO O
CLORIDRATO DE AMINOLEVULINATO DE METILA
NO MODELO DE CÂNCER BUCAL EM MURINO
INDUZIDO POR CÉLULAS DE WALKER 256**

**Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde, da Faculdade de
Ciências da Saúde da Universidade de
Brasília, como requisito para a
obtenção do título de Mestre em
Ciências da Saúde.**

**Orientadora: Professora Doutora
Nilce Santos de Melo**

BRASÍLIA, 2008

**Dedico os anos de trabalho ao meu eterno amor
Gabriel, pelo incentivo e apoio incondicionais.**

Agradecimentos

A Deus, responsável por todas as dádivas em minha vida

Ao meu marido, grande amor, fonte da minha inspiração e dos meus sonhos, agradeço por existir na minha vida. Ao seu lado, não existe medo, apenas segurança e superação. Realizamos uma bela conquista. Amo você para sempre! Nossa vida é como uma pena jogada ao vento: não sabemos aonde vamos, flutuamos ao sabor do destino. Ao seu lado, meu eterno amor, o desafio torna-se saboroso; a dificuldade, diversão; a dor, sorriso. Agradeço, também, aos nossos vindouros filhos, que esperam, ansiosamente, a conclusão deste trabalho, para fazer parte de nossas vidas.

À professora doutora Nilce Santos de Melo, constante fonte de saber. O que seria de um aluno sem um mestre, sábio, que o guia e o instrui, principalmente nos momentos de angústia? Difícil retratar em palavras o que a senhora, professora Nilce, significa para mim. Indubitavelmente, levarei, em meu coração, e como ensinamento precípuo, a postura profissional de excelência, que conduz o seu trabalho. Seria injusto agradecer somente pelo que fez por mim durante a minha dissertação e a minha vida acadêmica. A senhora deixou marcas indeléveis, não apenas cristalizadas pelo conhecimento científico, mas, também, pela conduta ética e moral.

Agradeço à minha família, alicerces perene. À minha mãe, guerreira e entusiasta, que me ensinou a viver com intensidade em todos os momentos. Ao meu pai, presente de Deus, obrigada por existir em minha vida. Ao meu querido irmão Bruno, à minha cunhada Thalita e à minha linda sobrinha Maria Luíza, pela amizade e carinho.

Ao meu avô Martinho, pelos incessantes ensinamentos transmitidos com amor e retidão. Buscarei atingir, em minha vida, a versatilidade de seus conhecimentos. À minha avó Orisa, pelo amor imensurável e carinho infinito. Obrigada pelas orações e pelos exemplos que, mesmo silenciosos, reverberaram profundamente em meu coração! A vocês, o agradecimento de uma vida.

Ao meu avô Alberto (*in memoriam*), que desbravou, primordialmente, os caminhos da Odontologia, pelas histórias narradas como professor da cátedra de Anatomia de Cabeça e Pescoço, da Universidade Federal do Rio de Janeiro e da Universidade Fluminense. À minha avó Neide, modelo de serenidade.

Aos meus tios Marco e Marisa, e primos Marcello e Manuella, sempre presentes em minha vida, pela torcida e auxílio. Vocês representam todos os tios e primos que, apesar da distância, estão em meu coração.

Aos meus sogros Paulo e Anita, pelo amor e apoio irrestritos. Aos meus cunhados Rafael e Bruno, pelo companheirismo.

Às amigas Gabriela, Vanessa e Renata, pelos inesquecíveis momentos de debates.

Aos técnicos de laboratório da Universidade de Brasília, Dedé e Glorinha, pelo carinho, atenção e dedicação. Vocês ajudaram a tornar a minha pesquisa realidade!

Ao Paulo, fotógrafo da Faculdade de Saúde da Universidade de Brasília, pela paciência, e por transformar os meus ratos em astros!

À professora Eliete e à patologista Dra Leonora, pelo auxílio no processo de aprendizado.

Ao professor Luiz Alberto Simeoni, pela ajuda especial com as referências bibliográficas.

Aos responsáveis pelos laboratórios de Cirurgia Experimental, Farmacologia Molecular e Odontologia, da Universidade de Brasília, pelo espaço cedido para o desenvolvimento da pesquisa.

Agradeço ao apoio da CAPES, pela bolsa de estudo concedida.

À Universidade de Brasília, minha segunda casa, pelo orgulho e prazer de nela estudar e trabalhar.

**"Nunca ande pelo caminho traçado, pois ele
conduz somente até aonde os outros já foram."
(Alexander Graham Bell)**

Resumo

A indução de câncer em animais e o cultivo de células neoplásicas são abordagens importantes para a investigação da dinâmica tumoral, bem como para a avaliação da terapia fotodinâmica. O objetivo da dissertação foi desenvolver modelo experimental de câncer de boca, pela inoculação, na língua de ratos wistar, de células de Walker 256, para posterior avaliação dos efeitos da terapia fotodinâmica nas lesões malignas. Foram utilizados 14 ratos wistar, machos, com 12 semanas de vida, isogênicos, pesando cerca de 200 gramas. Para a manutenção e o armazenamento de células de Walker 256, foram utilizados 2 ratos. Os 12 animais restantes foram inoculados com células de Walker 256 na língua. No dia 8 da inoculação do tumor, os murinos foram tratados da seguinte forma: grupo I, sem tratamento; grupo II, aplicação de laser de arsenieto de gálio-alumínio (100 J/cm^2); grupo III, aplicação de azul de metileno e laser de arsenieto de gálio-alumínio (100 J/cm^2); grupo IV, aplicação de cloridrato de aminolevulinato de metila e laser de arsenieto de gálio-alumínio (75 J/cm^2). Os animais foram mortos no dia 10 da inoculação. A análise histopatológica revelou a presença de neoplasia maligna de origem indeterminada e de comportamento agressivo em todos os ratos. O efeito da terapia fotodinâmica nos grupos III e IV apresentou resultado indeterminado, embora com substancial presença de apoptose, diferenças

no padrão de necrose e no quadro hemorrágico, sugerindo resposta sistêmica dos medicamentos.

Palavras-chave: células de Walker 256; terapia fotodinâmica; azul de metileno; cloridrato de aminolevulinato de metila; laser de arsenieto de gálio-alumínio.

Abstract

The induction of cancer in animals and the cultivation of neoplastic cells are important approaches for the investigation of the tumor growth dynamics, as well as for the evaluation of the photodynamic therapy. The objective of the dissertation was to develop an experimental model of mouth cancer by the inoculation of Walker 256 cells on wistar mice tongues for the subsequent evaluation of the effects of photodynamic therapy in malign lesions. Fourteen, 12-week-old, isogenic male wistar mice, weighing about 200 grams each, were used. For the maintenance and storage of Walker 256 cells, 2 mice were used in the investigation. The 12 remaining animals were inoculated with Walker 256 cells on their tongues. On inoculation day 8 of the tumor, the murines were treated in the following way: group I, without any treatment; group II, with the application of Gallium-Aluminum-Arsenide laser (100 J/cm²); group III with the application of blue methilen and Gallium-Aluminum-Arsenide laser (100 J/cm²); group IV with the application of methyl aminolevulinato hydrochloride and Gallium-Aluminum-Arsenide laser (75 J/cm²). The animals were dead on day 10 of the inoculation. The histopatologic analysis revealed the presence of uncertain origin and aggressive behavior malign neoplasm in all mice. The effect of photodynamic therapy in groups III and IV presented uncertain results, although with substantial presence of apoptose, besides

differences in the necrosis pattern and in the hemorrhagic picture, suggesting systemic reaction to medicine.

Key words: Walker 256 cells; photodynamic therapy; blue methilen; methyl aminolevulinato hydrochloride; Gallium-Aluminum-Arsenide laser.

Lista de Figuras

Figura 1 Alocação dos animais.....	33
Figura 2 Balança para controle de peso.....	33
Figura 3A Inoculação no peritônio do rato número 2.....	33
Figura 3B Punção do líquido peritoneal do rato número 2.....	33
Figura 4A Eppendorf com solução.....	33
Figura 4B Inoculação na língua de cada animal.....	33
Figura 5A Aparelho de laser de arsenieto de gálio-alumínio.....	34
Figura 5B Forma de aplicação do laser.....	34
Figura 6A Seringa de insulina contendo azul de metileno.....	34
Figura 6B Aplicação de 0,1 ml de azul de metileno.....	34
Figura 7A Cloridrato de aminolevulinato de metila tópico.....	34
Figura 7B Aplicação tópica cloridrato de aminolevulinato de metila.....	34
Figura 8 Dia 0 da inoculação.....	41
Figura 9 Dia 2 da inoculação.....	41
Figura 10 Dia 4 da inoculação.....	41
Figura 11 Dia 6 da inoculação.....	41
Figura 12A Dia 8 da inoculação.....	41
Figura 12B Dia 8 da inoculação outro ângulo fotográfico.....	41
Figura 13 Câmara de éter utilizada na morte dos animais.....	42
Figura 14 Espécime de língua sem inoculação.....	42
Figura 15 Espécime do Grupo I.....	42
Figura 16 Espécime do Grupo II.....	42
Figura 17 Espécime do Grupo III.....	42
Figura 18 Espécime do Grupo IV.....	42
Figura 19 Apresentação microscópica língua sem inoculação.....	46
Figura 20 Lâmina do Grupo I.....	46
Figura 21A Lâmina do Grupo II.....	46
Figura 21B Lâmina do Grupo II.....	46
Figura 22A Lâmina do Grupo III.....	46
Figura 22B Lâmina do Grupo III.....	46
Figura 23A Lâmina do Grupo III.....	47
Figura 23B Lâmina do Grupo III.....	47
Figura 24A Lâmina do Grupo IV.....	47
Figura 25B Lâmina do Grupo IV.....	47

Lista de Tabelas

Tabela 1	Ficha de análise microscópica modificada.....	33
Tabela 2	Ficha de análise microscópica modificada.....	34
Tabela 3	Análise do controle de peso grupo I.....	39
Tabela 4	Análise do controle de peso grupo II.....	39
Tabela 5	Análise do controle de peso grupo III.....	40
Tabela 6	Análise do controle de peso grupo IV.....	40
Tabela 7	Resultado da análise microscópica.....	46
Tabela 8	Resultado da análise microscópica.....	46
Tabela 9	Resultado da análise microscópica.....	47

Lista de Gráficos

Gráfico 1	Análise do controle de peso grupo I.....	41
Gráfico 2	Análise do controle de peso grupo II.....	41
Gráfico 3	Análise do controle de peso grupo III.....	42
Gráfico 4	Análise do controle de peso grupo IV.....	42

Sumário

Resumo.....	i
Abstract.....	iii
Lista de figuras.....	v
Lista de tabelas.....	vi
Lista de gráficos.....	vii
1. Introdução.....	1
2. Revisão de literatura.....	4
2.1 Câncer.....	4
2.2 Câncer bucal.....	4
2.3 Modelos experimentais de câncer bucal.....	6
2.4 Modelo de tumor de Walker 256.....	9
2.5 Tratamentos para o câncer bucal.....	10
2.6 Terapia fotodinâmica.....	11
2.6.1 Histórico.....	11
2.6.2 Laser.....	13
2.6.3 Fotossensibilizadores.....	17
3. Proposição.....	23
4. Material e métodos.....	24
4.1 Animais.....	24
4.2 Dieta dos animais.....	25
4.3 Procedência, armazenamento e manutenção das células tumorais de Walker.....	25
4.4 Inoculação das células de Walker 256 na língua dos animais.....	27
4.5 Laser utilizado no experimento.....	28
4.6 Fotossensibilizadores utilizados no experimento.....	28
4.7 Experimento.....	30
4.8 Avaliação e morte dos animais.....	31
4.9 Exame anatomopatológico dos animais.....	32
5. Resultados.....	37
5.1 Análise macroscópica.....	37
5.2 Análise microscópica.....	45
6. Discussão.....	50
7. Conclusões.....	62

Referências.....	64
Anexo.....	70

1. Introdução

1. Introdução

Os dados acerca da sobrevida do paciente com câncer de boca, a despeito das novas tecnologias, permanecem inalterados há mais de quarenta anos. O crescente número de casos, associado às pequenas taxas de sobrevida, motiva a busca de novos tratamentos, na tentativa de minimizar as conseqüências da doença, evitando seqüelas terapêuticas, amenizando os efeitos colaterais e, conseqüentemente, proporcionando melhor qualidade de vida aos pacientes.

Os tratamentos disponibilizados para o câncer de boca podem provocar seqüelas temporárias ou permanentes, agudas ou crônicas. As reações agudas, que ocorrem durante o curso do tratamento, são, em geral, reversíveis. As complicações tardias, comumente irreversíveis, resultam em incapacidade permanente, em piora da qualidade de vida, e variam em intensidade, sendo, em geral, classificadas em leves, moderadas e graves (Creak et al., 2005).

Os pacientes portadores de câncer de boca sofrem com as conseqüências do tratamento cirúrgico mutilador, com os efeitos colaterais da radioterapia e da quimioterapia. O paciente, após o tratamento, angustia-se com o retorno ao convívio social, devido às deformações físicas causadas pela terapia. As seqüelas e os efeitos colaterais do tratamento oncológico são significativos em pacientes portadores de câncer de boca,

cujo diagnóstico ocorre, freqüentemente, em estágio tardio, o que implica a utilização de terapias agressivas.

O tipo microscópico de câncer de boca prevalente é o carcinoma espinocelular, que apresenta características agressivas quanto ao comportamento. A localização mais freqüente desse tipo de tumor, em algumas casuísticas, ocorre na língua (Amorim filho et al., 2003). No entanto, outros tipos histológicos de tumores, embora mais raros, podem ser encontrados na boca, como, a título de exemplo, as manifestações de: linfoma, leucemia, osteossarcoma, melanoma intra-bucal e carcinosarcoma (Boros et al., 2004).

No desenvolvimento de pesquisas sobre a gênese e o comportamento da neoplasia maligna, pode-se induzir carcinoma espinocelular no modelo experimental. Todavia, o processo é demorado, podendo durar até 28 semanas. Somente a partir da indução e do aparecimento clínico do câncer no animal é que se torna possível testar determinada modalidade terapêutica. Os agentes químicos envolvidos nessa indução são, geralmente, o 7,2-diametilbenzoantroceno e o 4-nitroquinolina-N-óxido (Mognetti et al., 2006).

O carcinosarcoma em murinos pode, ao contrário, ser facilmente induzido pela utilização de células conhecidas como Walker 256. A inoculação das células no animal induz neoplasia bem caracterizada,

facilmente mantida em laboratório, de crescimento rápido e uniforme, raramente apresentando regressões. A eficiência foi comprovada em testes terapêuticos para outros sítios de acometimento, como a bexiga, o pulmão, o estômago e o intestino (Moraes et al., 2000).

O modelo de câncer de boca induzido por células de Walker 256 possibilita o estudo do comportamento metastizante do tumor, da reabsorção óssea e também de terapias oncológicas alternativas, como, por exemplo, a terapia fotodinâmica, que usa substâncias fotossensibilizadoras para induzir necrose tecidual ou apoptose, seletivamente, nas células neoplásicas. A terapia fotodinâmica parece ser viável como tratamento conservador para o câncer de boca, configurando quadro de preservação de órgãos, podendo, no futuro, substituir as terapias convencionais. Na terapia fotodinâmica os danos aos tecidos adjacentes são minimizados pela seletividade do fotossensibilizador, que tende a se acumular em células neoplásicas (Castano et al., 2004).

O trabalho objetiva caracterizar, na língua de ratos wistar, o modelo de câncer induzido por células de Walker 256, e avaliar a ação terapêutica fotodinâmica dos agentes químicos azul de metileno e cloridrato de aminolevulinato de metila, usados como fotossensibilizadores ativados pelo laser de baixa intensidade, do tipo diodo, meio ativo semiconductor de arsenieto de gálio-alumínio, modo de emissão contínua, comprimento de onda infravermelho 780nm, potência óptica de 60mw, luz guia vermelha.

2. Revisão de literatura

2. Revisão de literatura

2.1 Câncer

O número de casos de câncer tem aumentado de maneira considerável em todo o mundo, principalmente a partir do século passado, configurando-se, na atualidade, como um dos mais relevantes problemas de saúde pública mundial, e tornando-se uma das principais causas de morte no Brasil. A frequência de distribuição dos diferentes tipos de câncer apresenta-se variável, em função das características de cada região, enfatizando-se a necessidade do estudo das variações geográficas nos padrões da doença, para adequado monitoramento e controle (Guerra et al., 2005).

No Brasil, estima-se que em 2008 a incidência do câncer atingirá, aproximadamente, 470.000 novos casos. O tipo mais incidente será o câncer de pele não-melanoma, com 115.010 casos. Em seguida, o câncer de próstata, com 49.530 novos casos; mama, com 49.400; pulmão, com 27.270; cólon e reto, com 26.990; estômago, com 21.800 e colo de útero, com 18.680 (Inca, 2007).

2.2 Câncer bucal

Câncer de boca é uma denominação que inclui os cânceres de lábio e da cavidade oral. O câncer de lábio é mais frequente em pessoas brancas,

sendo comum no lábio inferior. O câncer em outras regiões da boca acomete, principalmente, tabagistas. Os riscos aumentam quando o tabagista é, também, alcoólatra (Amorim filho et al., 2003).

A principal causa de prognósticos desfavoráveis é o fato das neoplasias malignas serem diagnosticadas tardiamente, isto é, quando já se encontram em estádios avançados (Epstein, Zhang et al., 2002). A faixa etária de maior prevalência do câncer bucal figura entre 50-60 anos, com predileção para o gênero masculino (Amorim filho et al., 2003).

Os tumores malignos que acometem cabeça e pescoço correspondem a 10% de todas as neoplasias humanas, das quais 40% estão situadas na cavidade oral e orofaringe, sendo a base da língua o segundo sítio mais afetado (Inca, 2007).

As neoplasias malignas de boca, observadas em ambiente clínico, são ulceradas ou nodulares, de crescimento progressivo e indolor nas fases iniciais, causando uma série de sintomas conseqüentes à invasão de estruturas adjacentes. Citam-se, amiúde, em fases tardias, dor, perdas dentárias, sialorréia, trismo, sangramento, disfonia, linfadenopatia cervical e emagrecimento (Dedivitis, França et al., 2004).

Vários fatores determinantes são detectados e investigados a respeito da etiologia do câncer de boca. O conhecimento dos riscos constitui a base para prevenção efetiva da doença. Mesmo sendo o câncer de boca uma doença multifatorial, o tabaco e o álcool são agentes de risco importantes

não só para o desenvolvimento da neoplasia, como também para o prognóstico (Dedivitis et al., 2004).

Existem várias reações adversas à radioterapia, citando-se, a título de exemplo, mucosite, candidose, disgeusia, cáries por radiação, osteorradionecrose, necrose do tecido mole e xerostomia. Os mencionados efeitos colaterais irão depender da dose, do local irradiado, do fracionamento, da idade e das condições clínicas do paciente (Jham & Freire, 2006).

O tratamento multidisciplinar, incluindo a equipe médica, o cirurgião-dentista, o fonoaudiólogo, o nutricionista e o psicólogo é a melhor alternativa para minimizar, ou prevenir tais complicações (Jham & Freire, 2006).

2.3 Modelos experimentais de câncer bucal

Os modelos experimentais em pesquisa podem ser definidos como a materialização de parte da realidade. Devem apresentar precisão adequada, por meio de comprovação prévia e também pela demonstração das limitações que envolvem os aspectos concretos da vida (Ferreira, 2003).

No esforço de procurar novas alternativas terapêuticas, várias técnicas têm sido estabelecidas para melhorar os modelos experimentais de câncer de boca. São descritos na literatura os seguintes modelos de indução de câncer bucal: uso de substância química, transplantação e modelo

genético. Nenhum modelo animal retratará fielmente o câncer em humanos, mas há possibilidade de auxílio na investigação da progressão da doença, elaboração de diagnóstico e tratamento (Mognetti et al., 2006).

As substâncias químicas carcinogênicas mais utilizadas são 4-nitroquinolina-N-óxido e 7,12-dimetilbenzoantroceno. Apesar de serem quimicamente distintas, ambas produzem câncer quando aplicadas sistêmica ou topicamente, induzindo tumores com características morfológicas similares (Chen et al., 2002).

O modelo de indução química sistêmica, pelo carcinógeno 7,2-dimetilbenzoantroceno, induz o aparecimento de lesões malignas em aproximadamente 13 semanas. Não obstante, o agente indutor é inadequado para avaliar o potencial metastático (Lima, 1999).

O composto 7,2-dimetilbenzoantroceno comporta-se, experimentalmente, como um agente iniciador da carcinogênese. Os carcinógenos químicos se ligam ao DNA e causam mutações. O principal mecanismo de ação dos carcinógenos químicos consubstancia-se na formação de compostos covalentes com o DNA, o que aumenta a probabilidade de ocorrerem erros durante a replicação (Lima, 1999).

A carcinogênese química realiza-se por intermédio de dois estágios: iniciação, que é a transformação celular promovida pela substância cancerígena, tornando-a potencialmente capaz de se multiplicar de modo autônomo; e promoção, que consiste na proliferação ou expansão das

células iniciadas. Ao contrário da iniciação, a promoção é sempre um processo mais demorado, e o promotor não se liga ao DNA nem provoca mutações, possuindo a propriedade de irritar os tecidos e de provocar reações inflamatórias e proliferativas (Lima, 1999).

O carcinógeno 4-nitroquinolina-N-óxido, ao ser administrado na água de camundongos duas vezes por semana, na concentração final de 0,001%, induz o aparecimento de lesões malignas em aproximadamente 16 semanas (Vered et al., 2003). O referido carcinógeno produz efeitos mutagênicos e carcinogênicos, ambos mediados pela formação intracelular de espécies reativas de oxigênio, pela ação direta do 4-nitroquinolina-N-óxido sobre o DNA celular (Kanojia & Vaidya, 2006).

Existem trabalhos que demonstram que lesões induzidas por 4-nitroquinolina-N-óxido apresentam vantagens quando comparadas às induzidas por 7,2-diametilbenzoantroceno, tais como: melhor visualização da transformação neoplásica e verossimilhança histológica com tumores humanos (Vered et al., 2005).

Utiliza-se, também, como modelo, o camundongo atímico ou *nude mouse*. O animal apresenta ausência de timo ou timo rudimentar, sendo portador de deficiência de imunidade celular por linfócitos-T, tolerando a integração de heterotransplantes. Trata-se de mutação de um gene recessivo autossômico, situado no cromossomo 11 (Ferreira et al., 2005). A imunodeficiência torna os animais vulneráveis à morte, cristalizando fator

limitante para alguns tipos de pesquisas (Ferreira, Hochman et al., 2005). Outro modelo empregado é a transplantação de células, seguida por vários protocolos, que usam células de carcinoma escamoso e de carcinoma adenóide cístico em camundongos imunodeprimidos (Umeda et al., 2001).

A indução de câncer em animais e o cultivo de células neoplásicas são abordagens importantes para se investigar a dinâmica tumoral, bem como as alterações causadas no organismo portador de tumor. Um dos modelos animais mais utilizados em ratos wistar é o tumor de Walker 256 (Black et al., 1994).

2.4 Modelo de tumor de Walker 256

O tumor de Walker 256 surgiu espontaneamente na glândula mamária de ratas albinas prenhes (Dornelas et al., 2006). As células tumorais na forma ascítica podem ser injetadas intraperitonealmente em outros animais, para o desenvolvimento do tumor ascítico. As mesmas células podem, ainda, ser injetadas em diferentes órgãos e tecidos, sempre com o desenvolvimento de tumor sólido (Moraes et al., 2000).

O carcinossarcoma de Walker 256 é uma neoplasia bem caracterizada, facilmente mantida em laboratório e de crescimento rápido. Possui comportamento biológico agressivo, sendo localmente invasivo e com alto poder de desenvolver metástase por via linfática e hematogênica (Moraes et al., 2000). Existem trabalhos sobre o tumor de Walker,

mormente no que tange ao comportamento biológico, às alterações bioquímicas e aos efeitos metabólicos (Vido et al., 2000), (Guimarães et al., 1999). É utilizado, também, como modelo experimental em pulmão (Neto et al., 2002), estômago (Oliveira et al., 1998), rim (Silva et al., 2002), cavidade oral (Alves et al., 2004) e fígado (Zarur et al., 2004).

2.5 Tratamentos para o câncer bucal

A associação de cirurgia e radioterapia pós-operatória constitui o tratamento padrão no carcinoma espinocelular das vias aerodigestivas superiores em estágio avançado. A doença é definida pela presença de tumor primário extenso (acima de 4cm em seu maior diâmetro ou infiltração de estruturas adjacentes), de metástases regionais, características que configuram o estágio clínico III ou IV (Creak et al., 2005).

O cerne do problema das terapias convencionais reverbera na mutilação que se segue à cirurgia ou à necrose tecidual, que pode acometer pacientes submetidos à radioterapia. O tratamento cirúrgico do carcinoma espinocelular de língua e assoalho, localmente avançado, nos estádios T3 e T4, inclui o esvaziamento cervical. Mesmo na ausência de metástases clinicamente identificáveis, indica-se o esvaziamento eletivo, pois a taxa de metástases ocultas é superior a 30% (Creak et al., 2005).

O tratamento do câncer bucal, conforme salientado alhures, depende do estadiamento da lesão e das condições clínicas do paciente. No caso de

tumores inacessíveis ou com margem cirúrgica comprometida, ou, ainda, de pacientes sem condições clínicas para a realização de cirurgia, a radioterapia é o tratamento mais indicado (Creak et al., 2005).

Os pacientes submetidos à radioterapia de cabeça e pescoço apresentam efeitos colaterais debilitantes, tais como letargia, caquexia, xerostomia, disfasia, alteração no paladar, faringite, mucosite (Siddiqui et al., 2007).

2.6 Terapia fotodinâmica

2.6.1 Histórico

Pesquisas relatam que a luz solar é utilizada com finalidade terapêutica desde os primórdios da civilização. Substâncias fotossensibilizadoras eram obtidas de plantas que, aplicadas sobre a derme, promoviam a absorção de luz solar, objetivando a cura da discromia causada pelo vitiligo. Diversas formas de terapia com luz solar foram difundidas pelos árabes, gregos e romanos, para tratamento de doenças de pele. Até hoje, utilizam-se medicamentos que interagem com a luz. Há, também, inúmeros medicamentos fotossensíveis (Brugnera Junior & Pinheiro, 1998).

A primeira geração de drogas para a terapia fotodinâmica, à base de derivados hematoporfíricos, surgiu na década de 50. Na década de 60, foi

verificado acúmulo de porfirinas preferencialmente em tumores, implantados em camundongos e ratos, observando-se que a incidência de luz proporcionava regressão da doença (Simplício, 2002).

A partir da década de 70, várias preparações de derivados porfirínicos começaram a ser testados para uso em terapia fotodinâmica, culminando com o desenvolvimento do Photofrin II (Simplício, 2002).

Na década de 90, a aplicação tópica de nova geração de precursores da hematoporfirina (fotossensibilizadores endógenos), como o ácido 5-aminolevulínico e o cloridrato de aminolevulinato de metila, foi empregada em terapia fotodinâmica. As referidas substâncias não são, essencialmente, fotossensibilizadores, mas, sim, precursores metabólicos da Protoporfirina IX (Simplício, 2002).

Atualmente, nos pró-fármacos sensibilizadores aprovados para utilização em oncologia, encontram-se derivados de hematoporfirina (polímero sódico), ativo contra cânceres de pulmão, gástrico superficial, adenocarcinoma esofágico, cervical e de bexiga. Além disso, registram-se, também, derivados de metiltetraidroxiifenilclorina (temoporfin), ativo contra cânceres de cabeça e pescoço, e de ácido 5-aminolevulínico, ativo contra queratose actínica. Consigna-se, por fim, os derivados de metil 5-aminolevulinato, ativo contra queratose actínica e carcinoma de células basais (Brown et al., 2004, Detty et al., 2004, Gold & Goldman, 2004).

2.6.2 Laser

As fontes de radiação, empregadas para ativação do fotossensibilizante, são, em geral, lasers. A melhor fonte de radiação caracteriza-se pelo custo reduzido, com o máximo de absorção da medicação, sem efeitos térmicos significativos. Os lasers de diodo afiguram-se, também, como alternativa de custo intermediário. Existem lasers de diodo cobrindo o espectro visível vermelho e infravermelho, podendo, assim, atender a boa parte dos agentes fototerapêuticos já existentes no mercado. Tais lasers são capazes de fornecer luz pulsada de considerável potência, com precisão sobre o tecido a ser irradiado, graças a sistemas de distribuição baseados em feixes de fibras ópticas (Machado, 2000).

Os aparelhos de laser, em geral, possuem os seguintes componentes: uma fonte de energia, um meio ativo (sólido, líquido ou gasoso) e um tubo de ressonância (cavidade óptica que possui espelhos nas extremidades) A energia, que é liberada pela fonte, excita os átomos contidos no meio ativo do aparelho. Os átomos excitados retornam espontaneamente ao estado denominado metaestabilidade (excitação intermediária) e, a seguir, ao repouso (Brugnera Junior & Pinheiro, 1998).

O laser possui propriedades singulares, que o diferencia de outras fontes luminosas. Citam-se as características abaixo discriminadas:

- Monocromaticidade: a luz laser é pura e composta de uma cor. A cor da luz é definida pelo respectivo comprimento de onda, que interage, de forma específica, com o tecido. Os átomos utilizados são idênticos, gerando fótons de mesmo comprimento de onda.
- Coerência: as ondas possuem a mesma fase. Há uniformidade de luz.
- Colimação: as ondas são direcionadas em paralelo, ou seja, viajam na mesma direção (Brugnera Junior & Pinheiro, 1998).

O laser é emitido em ondas cujo comprimento é igual ao meio ativo que o gerou. A unidade de medida é o joule por centímetro quadrado (J/cm^2). O ponto mais alto da onda é chamado crista, e, o mais baixo, vale. O comprimento de onda refere-se a distância entre duas cristas sucessivas, sendo a frequência medida pelo número de cristas (Brugnera Junior & Pinheiro, 1998). Os meios ativos podem ser:

- Gasosos: dióxido de carbono, argônio, criptônio e hélio neônio;
- Isolantes: cromo, cristais de neodímio, érbio e hólmio;
- Corantes: rodamina e cumarina;
- Semicondutores: diodos; e
- Excímer: KrF, XeCl, HF e CO.

A melhor luz utilizada para ativar o fotossensibilizante na terapia fotodinâmica é o laser. Entre as vantagens do laser, como fonte de luz, estão a estabilidade, a coerência e a previsibilidade (Parise & Buzaid,

2006). Outra fonte de luz que poderia ser utilizada é o diodo emissor de luz.

Uma alternativa adicional razoável é a utilização de diodo emissor de luz, disponível no mercado em todas as regiões espectrais, incluindo-se a do vermelho. As fontes à base de diodo emissor de luz, apesar de apresentarem potência muito inferior ao laser, são mais baratas (Mang, 2004).

O mecanismo de interação da terapia fotodinâmica ocorre quando uma molécula aromática absorve luz de energia. A molécula pode sofrer uma transição eletrônica ao estado de singlete excitado. Dependendo da estrutura molecular e do ambiente, a molécula pode perder energia por intermédio de processos físicos ou eletrônicos, retornando ao estado fundamental, ou pode sofrer transição para o estado tripleto excitado (Eduardo & Novaes, 2004).

A terapia fotodinâmica é a combinação de uma droga fotossensibilizante que se acumula preferencialmente nas células tumorais, com uma luz laser que ativa a medicação, gerando formas de oxigênio tóxicos, que ocasionam, por fim, a apoptose ou a necrose tecidual (Simplício, 2002).

O oxigênio singlete, produzido no processo da terapia fotodinâmica, pode reagir com os lipídios insaturados, proteínas e aminoácidos. Tais biomoléculas são as principais constituintes das membranas biológicas. São, também, alvos celulares destruídos na terapia fotodinâmica. Portanto,

as mencionadas reações ocasionam mudanças da permeabilidade celular, provocando lise das células e, em consequência, a morte do tecido tumoral (Ribeiro, 2005).

A resposta terapêutica do azul de metileno foi investigada *in vivo* por injeção local dentro do tumor (adeno-carcinoma, G-3), em ratos, na concentração de 1% de azul de metileno, diluída a 0,01% em cloreto de sódio isotônico. O tratamento com 1% de azul de metileno e irradiação de diodo emissor de luz de comprimento de onda de 662 nm, gerando uma dose total de 100 J/cm², resultou na destruição do tumor em 79% dos animais tratados. Parece que o diodo emissor de luz induziu a reação de azul de metileno, produzindo oxigênio singlete (Orth et al., 2000).

Ensaio clínico consideraram que a terapia fotodinâmica pode tornar-se uma opção de tratamento de pacientes com câncer (Cheung et al., 2004). Estudo recente comprovou que o fotossensibilizante cloridrato de aminolevulinato de metila é eficaz no tratamento de lesões iniciais, resultando em satisfação estética para o paciente. No trabalho, foram avaliados, em 2 estudos multicêntricos, controlados com placebo, um total de 119 pacientes, dos quais 62 foram tratados com a terapia fotodinâmica (Parise & Buzaid, 2006)

2.6.3 Os fotossensibilizadores

A eficiência do tratamento de terapia fotodinâmica depende dos seguintes fatores: seletividade e retenção do fotossensibilizador, intensidade da radiação eletromagnética, eficiência da absorção dos fótons ativadores e da transferência de energia de excitação da molécula fotossensibilizadora, e efeito oxidante na molécula (Eduardo & Novaes, 2004).

As características gerais das drogas usadas em terapia fotodinâmica são: elevada afinidade e penetração no tecido doente em detrimento do tecido saudável, absorção molar na região espectral entre 600 e 1000nm, fotossensibilidade não prolongada, simplicidade na formulação, reprodutibilidade, estabilidade do formulado, rápida eliminação do corpo, características fotofísicas favoráveis, baixa citotoxicidade, facilidade de manuseio sintético, custos reduzidos, roteiros de validação, além de produção em escala industrial (Simplício, 2002).

Consubstancia-se como pré-requisito fundamental dos fotossensibilizantes, a quantidade de droga localizada no tecido alvo. Os fotossensibilizadores são absorvidos por células normais e neoplásicas, mas são retidos por mais tempo nas últimas. O mecanismo da seletividade prolongada ainda não está elucidado. O aumento da permeabilidade vascular, assim como a drenagem linfática insuficiente nos tecidos neoplásicos contribui para retenção das drogas (Luksiene, 2003).

As investigações clínicas e terapêuticas sugerem que a terapia fotodinâmica é eficaz, além de possuir algumas vantagens, como a baixa incidência de efeitos colaterais e o bom resultado estético da área tratada. Parece ser uma alternativa útil, até o presente momento, no tratamento de tumores cutâneos superficiais de grande extensão ou localizados em áreas anatômicas de difícil acesso (Bakos et al., 2003).

Exsurge, como característica importante dos fotossensibilizadores, o estado tripleto. A droga fotoativadora excitada deve reagir com o ambiente por transferência eletrônica/reações redox, ou transferir energia de excitação a uma molécula de oxigênio, produzindo o altamente reativo oxigênio singleto, ocorrendo necrose ou apoptose. O fotossensibilizador danifica os alvos tumorais pelo efeito da oxidação (Eduardo & Novaes, 2004).

O fotossensibilizante, excitado por um fóton, inicia uma cascata de reações químicas, formando produto oxidativo (reação tipo I) e oxigênio singleto (reação tipo II), levando, ainda, à citotoxicidade direta ou ao dano vascular e, subseqüentemente, à regressão tumoral (Eduardo & Novaes, 2004).

O sistema de liberação de drogas pode ocorrer por meio de dois mecanismos principais, de tipos I e II. No mecanismo tipo I, há a transferência do elétron entre o fotossensibilizador no estado tripleto excitado e o substrato ou moléculas do solvente, gerando radicais ou íons-

radicais em reação de transferência de elétrons ou átomo de hidrogênio. No mecanismo de tipo II, o oxigênio singlete é responsável pela fotoinativação das células do tumor, sendo gerado por meio de processo de transferência de energia durante uma colisão do sensibilizador excitado com o oxigênio tripleto (Machado, 2000).

O azul de metileno é um corante da classe das fenotiazinas. Desperta interesse devido à sua propriedade eletrocatalítica em face da NADH₄, que é a coenzima das enzimas dehidrogenases. Devido às suas características fotofísicas, fototóxicas e em função da alta afinidade da membrana mitocondrial celular, o composto fenotiazínico de azul de metileno tem-se mostrado uma opção de fotoativador potencial para a aplicação médica, como droga na terapia fotodinâmica. O azul de metileno se liga significativamente na membrana mitocondrial, que é constituída por 20-30% em massa de cardiolipina, um fosfolípido aniônico dimérico e tetrainsaturado (Orth et al., 2000).

Recentemente, um esforço considerável foi direcionado na compreensão das interações de azul de metileno. Tais estudos podem ser promissores na área de terapia fotodinâmica. Apesar dos aspectos físico-químicos e biomédicos estudados *in vitro* e *in vivo*, a influência das características das membranas na ligação e organização da droga, relevante para os mecanismos de fotossensibilização, não é completamente entendida em nível molecular (Orth et al., 2000).

O ácido 5-aminolevulínico apresenta um radical metil que, ao penetrar na célula, é rapidamente demetilado. Em passo subsequente, o ácido 5-aminolevulínico e o cloridrato de aminolevulinato de metila seguem a mesma via de biossíntese do heme celular. Esses precursores da Protoporfirina IX apresentam algumas vantagens em relação a outros fotossensibilizadores utilizados em terapia fotodinâmica, tais como: rapidez na degradação pelo organismo, eliminação de possíveis riscos da fotossensibilização em tecidos saudáveis, baixas doses de administração (Machado, 2000).

O cloridrato de aminolevulinato de metila não é um fotossensibilizante por si próprio. Ele tem como alvo a via biossintética do heme, no qual o ácido aminolevulínico e outras espécies levulínicas são transformados via porfirinas fotoativas ao heme. A síntese do heme ocorre na mitocôndria e no citosol das células (Peng et al., 2001).

As propriedades farmacodinâmicas do cloridrato de aminolevulinato de metila são do grupo farmacoterapêutico 16.1.9, medicamentos antineoplásicos, imunomoduladores, citotóxicos. Após a aplicação tópica do cloridrato de aminolevulinato de metila, verifica-se um acúmulo intracelular de porfirinas nas lesões cutâneas tratadas. As porfirinas intracelulares são fotoativas, consubstanciadas por compostos fluorescentes que, por ativação da luz e na presença de oxigênio, produzem oxigênio singlete, responsável pela destruição de constituintes celulares,

especificamente a mitocôndria. A ativação pela luz das porfirinas acumuladas desencadeia uma reação fotoquímica tóxica para as células afetadas expostas à radiação (Peng et al., 2001).

A formação fisiológica do ácido aminolevulínico, desde a glicina e a succinil-coenzima "A" pela enzima intramitocondrial ácido aminolevulínico sintase, é o primeiro passo dessa via. Devido à baixa ligação enzima-substrato e feedback negativo pelo heme intracelular, o ácido aminolevulínico sintase é uma enzima com taxa-limite de conservação para síntese do heme. O cloridrato de aminolevulinato de metila aplicado externamente penetra na pele e, através do ácido aminolevulínico sintase, é finalmente convertido em porfirinas. O mecanismo exato de ação do cloridrato de aminolevulinato não é totalmente entendido. O cloridrato de aminolevulinato também pode ser hidrolisado para ácido aminolevulínico pela estearase, apesar de não haver ainda evidência direta. De maneira alternativa, o cloridrato de aminolevulinato de metila pode entrar na via biossintética do heme diretamente como éster. O cloridrato de aminolevulinato de metila pode, ainda, ter efeitos indiretos nas enzimas dessa via e afetar o processo de regulação (Peng et al., 2001).

A localização subcelular do fotossensibilizador também é um fator determinante para ocorrer a necrose ou a apoptose. O oxigênio singlete, produto da fotooxidação das drogas na terapia fotodinâmica, é ativador do

mecanismo de morte celular. Vários estudos demonstram que os fotossensibilizadores podem se acumular em locais diversos dentro da célula, tais como na mitocôndria, onde os danos provocam morte por apoptose; ou nas membranas plasmáticas, cuja destruição levaria a célula à necrose (Gupta et al., 2003).

Apoptose é uma forma regulada de morte celular fisiológica, que depende da expressão de suicídio maquinário celular, no qual uma cascata de caspases é induzida à morte (Wising et al., 2005). Morfologicamente, os elementos cruciais do processo são: condensação da cromatina, encolhimento celular e produção de corpos apoptóticos, sendo estes engolfados por células circunvizinhas e, por fim, fagocitados (Nowis et al., 2005).

O tratamento com a terapia fotodinâmica pode resultar em apoptose ou necrose celular (Kaneko et al., 2004). Em muitos tratamentos com terapia fotodinâmica, observam-se que os agentes fotossensibilizadores atuam na mitocôndria (Ribeiro et al., 2005). Tal característica se reveste de fundamental relevância, pois a referida organela possui papel fundamental no processo apoptótico (Valls et al., 2005).

3. Proposição

3. Proposição

Objetivo Geral:

Desenvolver modelo experimental de rápida indução de neoplasia, pela inoculação, na língua de ratos wistar, de células de Walker 256, para posterior avaliação dos efeitos da terapia fotodinâmica nas lesões malignas.

Objetivos específicos:

- Induzir, experimentalmente, neoplasia maligna pela inoculação de células de Walker 256 na língua de ratos wistar;
- Analisar, clínica e morfológicamente, as alterações teciduais presentes na língua de ratos wistar, após a inoculação das células de Walker 256;
- Realizar tratamento, com terapia fotodinâmica, em neoplasia maligna na língua de ratos wistar, usando azul de metileno, seguido da aplicação de laser;
- Tratar, com terapia fotodinâmica, neoplasia maligna na língua de ratos wistar, usando cloridrato de aminolevulinato de metila, seguido da aplicação de laser; e
- Comparar, clínica e histopatologicamente, os resultados da terapia fotodinâmica nos diferentes grupos.

4. Material e Métodos

4. Material e Métodos

A pesquisa em tela foi aprovada pelo Comitê de Ética no uso animal, localizado no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, em 30 de maio de 2006, em consonância com o processo protocolado sob o número 33971/2006, conforme anexo.

O experimento foi realizado no laboratório de cirurgia experimental da Faculdade de Medicina, localizado na Universidade de Brasília, sob a supervisão da veterinária responsável, seguindo os cuidados de assepsia e biossegurança.

4.1 Animais

Utilizaram-se 16 ratos da espécie *rattus norvegicus albinus*, da linhagem *wistar*, machos, com 12 semanas de vida, isogênicos, pesando, cada um, cerca de 200 gramas. Foram adquiridos do biotério da Faculdade de Ciências da Saúde, situado na Universidade de Brasília. Dos 16 animais, 2 foram utilizados para a manutenção das células tumorais de Walker no peritônio e 2 para estudo piloto, a fim de aferir a quantidade de células que seriam inoculadas na língua dos ratos wistar.

Os 12 ratos wistar foram alocados, em grupos de três, em caixa de polietileno 40 x 60 x 18 cm, sendo nela mantidos, para a devida ambientação, durante três dias – que antecederam o início do experimento

– sob idênticas condições, com ciclo de luz de 12h/dia, temperatura e umidade constantes e ruído mínimo (**Figura1**). Os animais foram pesados no início do experimento e a cada dois dias, para controle do peso (**Figura 2**), e fotografados com propósito analítico.

4.2 Dieta dos animais

Utilizou-se a ração labina (Agribands Purina do Brasil/LTDA), que contém 23% de proteína, 8% de minerais, 5% de fibras e traços de vitaminas. Foram empregadas ração sólida e água, ambas *ad libitum*. A alimentação dos animais ficou sob constante observação durante todo o experimento.

4.3 Procedência, armazenamento e manutenção das células tumorais de Walker 256

A linhagem “A” do tumor de Walker 256 (originária do The Crist Hospital Line, Nacional Cancer Institute Bank, Cambridge, Mass., USA) foi fornecida pelo Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental, Unidade Laser, da Faculdade de Ciências Médicas, da Universidade Estadual de Campinas, para o Departamento de Nutrição da Universidade de Brasília, sendo gentilmente cedida pela mestre Vanessa Cunha Taveira para o Departamento de Odontologia.

As células foram recebidas em um eppendorf contendo líquido hemorrágico peritoneal com células de Walker 256. O eppendorf estava congelado no freezer a -80°C . Houve o descongelamento, realizado, em aproximadamente 15 minutos, na temperatura ambiente. O eppendorf continha 0,7 ml de líquido hemorrágico peritoneal com células de Walker 256, misturado em 0,3 ml de glicerina bidestilada, resultando em 1,0 ml. A solução de 1,0 ml foi inoculada no peritônio do rato wistar número 1. Depois de quatro dias, coletou-se o líquido hemorrágico peritoneal com células de Walker 256, por meio de punção. Logo após a punção, as células foram separadas por centrifugação, suspensas em solução salina, sendo uma alíquota retirada para contagem das células na presença de azul de tripam. Após a contagem das células, foi inoculado 1,0 ml da solução (0,7 ml de líquido hemorrágico peritoneal com células de Walker + 0,3 ml de glicerina bidestilada) no peritônio do rato wistar número 2, o que corresponde a, aproximadamente, quatro milhões de células tumorais de Walker 256 (**Figura 3A**). Quatro dias depois, removeu-se, por meio de punção, o líquido hemorrágico peritoneal com células de Walker 256 (**Figura 3B**), passando-se ao armazenamento dos frascos (eppendorf) da seguinte forma: em cada eppendorf colocou-se 0,7 ml de líquido hemorrágico peritoneal com células de Walker 256, misturado em 0,3 ml de glicerina bidestilada, que resultou em 1,0 ml. Em seguida, a substância homogênea foi conservada em freezer a -80°C . As alíquotas estocadas na

temperatura citada poderão, futuramente, servir para inoculação no peritônio, bem como em outros órgãos. A manutenção das células do tumor de Walker 256 consiste na inoculação de 1,0 ml do líquido hemorrágico no peritônio de ratos wistar (Novaes, 1999).

4.4 Inoculação das células de Walker 256 na língua dos animais

Inicialmente, realizou-se estudo piloto com 2 ratos da espécie *rattus norvegicus albinus*, da linhagem *wistar*, machos, com 12 semanas de vida, isogênicos, pesando, cada um, cerca de 200 gramas, com o objetivo de verificar a quantidade de células a serem inoculadas na língua. No rato 1, como descrito no trabalho de Alves, injetou-se 0,1 ml de sangue com células de Walker 256, totalizando, aproximadamente, 10^6 células/ml, (Alves et al., 2004). No rato 2, inoculou-se 0,05 ml, portanto, metade das células utilizadas no rato 1. Observou-se que no rato 2 a progressão do tumor foi mais lenta em comparação com o rato 1. Os dois animais foram mortos no dia 10 da inoculação. Dessa forma, optou-se pelo procedimento utilizado no rato 1, tendo em vista a célere progressão do tumor.

O procedimento de inoculação na língua dos 12 ratos wistar foi desenvolvido da seguinte forma: depois de pesados, os animais foram anestesiados na câmara de éter. Posteriormente, o eppendorf que estava estocado em freezer a -80°C , na proporção de 0,7 ml de líquido hemorrágico peritoneal com células de Walker 256, misturado com 0,3 ml

de glicerina bidestilada, totalizando 1,0 ml da solução (**Figura 4A**), foi descongelado, em aproximadamente 15 minutos, na temperatura ambiente. Posteriormente, injetou-se 0,1 ml, com uma seringa de insulina, na língua de cada rato wistar (**Figura 4B**).

Com fulcro no procedimento acima descrito, foram inoculadas, em cada língua, aproximadamente 10 células/ml de células de Walker 256. O dia da inoculação foi padronizado como dia 0.

4.5 Laser utilizado no experimento

A fonte de radiação empregada para ativação do fotossensibilizante, no presente trabalho, foi o laser de arsenieto de gálio-alumínio, com comprimento de onda infravermelho de 780nm, denominado, comercialmente, mucolaser (**Figura 5A**).

As características do mucolaser são: laser de baixa intensidade, do tipo diodo, meio ativo semiconductor de arsenieto de gálio-alumínio, modo de emissão contínua, opções de potência P1 (30mW) e P2 (60mW), tempo de aplicação variável, luz guia vermelha, classificação de potencial de periculosidade IIIB, penetração de 2 a 3 cm, *time* digital pré-programável, sonorizador programável, pontas autoclaváveis, três óculos de proteção exclusivos, uma caneta que apresenta bico removível para limpeza, área do *spot* do feixe com 0,04mm².

O laser apresenta um detector de caneta no painel frontal para teste da potência, que auxilia o profissional a verificar a correta quantidade de joules, quando acionado por um toque no pedal.

O laser foi aplicado em toda a área do tumor, respeitando a circunscrição da ponteira. A forma de aplicação foi pontual, por cm^2 (**Figura 5B**). O aparelho foi utilizado na potência 2, que resulta em $4,5 \text{ J/cm}^2$ a cada 3 segundos.

Seguiu-se o protocolo do artigo de Orth, utilizando-se a dose de laser nos grupos II e III, de 100 J/cm^2 (Orth et al., 2000). Já a dose administrada no grupo IV, de 75 J/cm^2 , foi ministrada de acordo com protocolo fornecido pelo fabricante do medicamento.

4.6 Fotossensibilizadores utilizados no experimento

Foram utilizados dois fotoativadores: azul de metileno e cloridrato de aminolevulinato de metila, cujo nome comercial é metvix. A escolha do azul de metileno deve-se ao fato de apresentar baixo custo, fácil aquisição e simples manipulação. Por outro lado, o cloridrato de aminolevulinato de metila representa um dos medicamentos mais modernos para terapia fotodinâmica.

O azul de metileno 1% vetec ($\text{C}_{16} \text{H}_{16} \text{Cl}_2 \text{N}_3 \text{SX H}_2\text{O}$) foi manipulado da seguinte forma: 1 g de azul de metileno misturado em 100 ml de soro fisiológico a 0,9 NaCl (Orth et al., 2000).

O cloridrato de aminolevulinato de metila é um creme, de cor bege a amarelo pálido, que contém 160 mg/g de aminolevulinato de metilo (na forma de cloridrato), equivalente a 16% de aminolevulinato de metilo na forma de cloridrato. Os excipientes incluem o álcool cetosteárico (40 mg/g), o parahidroxibenzoato de metilo (E 218; 2 mg/g), o parahidroxibenzoato de propilo e o óleo de amendoim (30 mg/g).

O cloridrato de aminolevulinato de metila possui autorização para introdução no mercado Galderma International – sucursal em Portugal, Avenida Duque D'ávila, 185 – 3^oc 1050-082, Lisboa, número da autorização de introdução no mercado aprovado em 7/8/2006 – INFARMED.

4.7 Experimento

Os animais, no dia do tratamento, foram anestesiados com 10% de ketamina e 2% de xilazina. A anestesia foi mantida durante todo o procedimento.

Realizou-se o tratamento dos grupos no dia 8 da inoculação, consoante se observa na descrição abaixo:

Grupo I: Três animais com carcinoma de Walker 256 na língua, sem tratamento.

Grupo II: Três animais com carcinoma de Walker 256 na língua, tratados pela aplicação única e pontual de laser, em dose final de 100 J/cm^2 em cada área da lesão, abrangendo integralmente o tumor.

Grupo III: Três animais com carcinoma de Walker 256 na língua, tratados com terapia fotodinâmica, utilizando-se o fotossensibilizador injetável azul de metileno (**Figura 6A**), com uma dose de 0,1 ml em todo o tumor (**Figura 6B**), seguido de aplicação pontual de laser, uma hora depois, em dose final de 100 J/cm^2 em cada área da lesão, abrangendo integralmente o tumor.

Grupo IV: Três ratos com carcinoma de Walker 256 na língua, tratados com terapia fotodinâmica, utilizando-se o fotossensibilizador cloridrato de aminolevulinato de metila tópico (**Figura 7A**) em toda a lesão (**Figura 7B**), seguido de aplicação pontual de laser três horas depois, em dose final de 75 J/cm^2 em cada área da lesão, abrangendo todo o tumor.

4.8 Avaliação e morte dos animais

A evolução do carcinosarcoma de Walker 256 foi constantemente supervisionada por meio da avaliação clínica do aparecimento de lesões bucais nos animais, registrada na ficha clínica e por fotografias.

Os animais foram observados diariamente por um período de 10 dias, sendo pesados e fotografados nos dias 0, 2, 4, 6, 8 e 10.

Tendo em vista a célere progressão do tumor de Walker, os animais foram mortos no dia 10 da inoculação, por inalação de éter etílico em câmara de vidro fechada. As línguas foram removidas e fixadas em formalina a 10%.

4.9 Exame anatomopatológico dos animais

Os cortes foram padronizados de forma sagital, corados pela técnica de rotina, com hematoxilina e eosina, no laboratório de Odontologia da Universidade de Brasília. Os blocos foram seccionados no micrótomo rotativo American Optical, na espessura de 5 μ m, e analisados no microscópio óptico Axi o Shop 2 Plus Zeiss. O programa utilizado para captação das imagens foi o Win TV 2000.

As lâminas foram avaliadas, de acordo com as tabelas abaixo, por quatro examinadores: a pós-graduanda e três patologistas, de modo cego em relação aos grupos a que pertenciam as lâminas.

Tabela 1 Ficha de análise microscópica modificada (Silva et al., 2006)

Análise	Parâmetros
Infiltrado inflamatório	<input type="checkbox"/> Discreto + <input type="checkbox"/> Moderado ++ <input type="checkbox"/> Intenso +++
Necrose	<input type="checkbox"/> Superficial + <input type="checkbox"/> Moderada ++ <input type="checkbox"/> Profunda +++
Hemorragia	<input type="checkbox"/> Discreta + <input type="checkbox"/> Moderada ++ <input type="checkbox"/> Intensa +++
Mitoses bizarras	<input type="checkbox"/> Discreta + <input type="checkbox"/> Moderada ++ <input type="checkbox"/> Intensa +++

Tabela 2 Ficha de análise microscópica modificada (Silva et al., 2006)

Análise	Parâmetros
Úlcera	<input type="checkbox"/> Ausente <input type="checkbox"/> Presente
Apoptose	<input type="checkbox"/> Ausente <input type="checkbox"/> Presente
Hipercromatismo	<input type="checkbox"/> Ausente <input type="checkbox"/> Presente
Pleomorfismo	<input type="checkbox"/> Ausente <input type="checkbox"/> Presente
Invasão perivascular	<input type="checkbox"/> Ausente <input type="checkbox"/> Presente
Invasão neural	<input type="checkbox"/> Ausente <input type="checkbox"/> Presente
Invasão muscular	<input type="checkbox"/> Ausente <input type="checkbox"/> Presente



Figura 1 Alocação dos animais durante o experimento.



Figura 2 Balança para controle de peso dos animais.



Figura 3A Inoculação de 1,0 ml de líquido hemorrágico no peritônio do rato número 2.



Figura 3B Punção do líquido peritoneal do rato número 2.

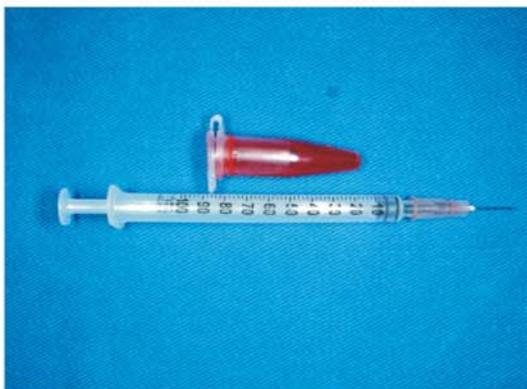


Figura 4A Eppendorf com solução de 0,7 ml de líquido hemorrágico peritoneal com células de Walker + 0,3 ml de glicerina bidestilada, totalizando 1,0 ml. Seringa de insulina utilizada para inoculação na língua do animal.



Figura 4B Inoculação de 0,1 ml da solução do eppendorf da figura 4A na língua de cada animal.



Figura 5A Aparelho de laser de arsenieto de gálio-alumínio, com comprimento de onda de 780nm.



Figura 5B Forma de aplicação do laser.



Figura 6A Seringa utilizada contendo azul de metileno.



Figura 6B Aplicação de 0,1 ml de azul de metileno.



Figura 7A Cloridrato de aminolevulinato de metila.



Figura 7B Aplicação tópica do cloridrato de aminolevulinato de metila.

5. Resultados

5. Resultados

5.1 Análise macroscópica

Os animais foram criteriosamente avaliados, fotografados e pesados nos dias 0, 2, 4, 6, 8 e 10. O dia da inoculação foi padronizado como dia 0.

No dia 0 do experimento, os animais foram fotografados (**Figura 8**), pesados, anestesiados na câmara de éter e, posteriormente, inoculou-se tumor de Walker 256 na língua.

Os murinos, no dia 2 do experimento, continuaram a alimentar-se e a beber água. Clinicamente, foi observado aumento de volume na língua em todos os grupos (**Figura 9**).

Os ratos wistar, no dia 4 do experimento, apresentaram contínuo aumento de volume na língua e início de perda de peso (**Figura 10**).

No dia 6 do experimento, observou-se decréscimo na ingestão de ração, redução de peso, sangramento e majoração do volume da língua dos ratos (**Figura 11**).

Todos os animais, no dia 8 de acompanhamento e avaliação (**Figura 12A**), apresentaram intenso sangramento, redução de peso, trismo, necrose, áreas ulceradas, dificuldade de alimentação, aumento de volume da língua, além de acúmulo de placa bacteriana na língua, mucosa jugal e dentes (**Figura 12B**).

Durante o procedimento de avaliação do tumor de Walker 256, após a conclusão do tratamento, morreram, no dia 9, 1 rato do grupo IV e 1 rato do grupo II. No dia 10, morreu 1 rato do grupo II. Nos casos em epígrafe, não houve oportunidade de realizar-se necrópsia.

No dia 10 da pesquisa, os animais foram pesados e mortos na câmara de éter (**Figura 13**). Realizou-se, como procedimento subsequente, a necrópsia da língua de todos os 9 animais. Macroscopicamente, a necrópsia da língua dos animais apresentou os seguintes resultados:

- A (**Figura 14**) ilustra a língua de um rato wistar que não sofreu inoculação de células de Walker 256, não pertencendo à pesquisa, servindo, tão-somente, como meio de comparação com as outras línguas necropsiadas.
- Espécime do Grupo I, inoculado com células de Walker 256, sem tratamento (**Figura 15**).
- Espécime do Grupo II, inoculado com células de Walker 256, tratado com laser (**Figura 16**).
- Espécime do Grupo III, inoculado com células de Walker 256, tratado com azul de metileno e laser (**Figura 17**).
- Espécime do Grupo IV, inoculado com células de Walker 256, tratado com cloridrato de aminolevulinato de metila e laser (**Figura 18**).

O crescimento tumoral na língua foi observado em todos os 12 animais implantados.

Segue, abaixo, a análise do controle de peso de todos os animais da pesquisa:

Tabela 3 Controle do peso grupo I - Sem tratamento

Dias da inoculação	Rato 1	Rato 2	Rato 3
0	219,66g	222,48g	225,57g
2	219,66g	222,48g	225,57g
4	230,26g	232,03g	229,43g
6	221,28g	217,24g	222,85g
8	210,86g	196,74g	191,52g
10	178,70g	176,28g	180,31g

Tabela 4 Controle do peso grupo II - Tratamento com laser

Dias da inoculação	Rato 1	Rato 2	Rato 3
0	207,72g	156,32g	189,33g
2	207,72g	156,32g	189,33g
4	241,26g	186,39g	216,51g
6	230,83g	187,02g	210,82g
8	201,15g	168,72g	186,02g
10	morreu	145,53g	morreu

Tabela 5 Controle do peso grupo III - Tratamento com azul de metileno seguido da aplicação de laser

Dias da inoculação	Rato 1	Rato 2	Rato 3
0	202,38g	237,94g	277,87g
2	202,38g	237,94g	277,87g
4	205,81g	246,99g	291,69g
6	203,81g	228,30g	284,77g
8	177,62g	192,85g	246,23g
10	160,43g	171,20g	219,71g

Tabela 6 Controle do peso grupo IV - Tratamento com cloridrato de aminolevulinato de metila seguido da aplicação de laser

Dias da inoculação	Rato 1	Rato 2	Rato 3
0	185,60g	248,21g	209,53g
2	185,60g	248,21g	209,53g
4	179,09g	231,54g	209,51g
6	193,71g	207,98g	215,13g
8	184,96g	176,54g	229,94g
10	146,94g	morreu	222,37g

Gráfico 1 Análise do controle de peso grupo I - Sem tratamento

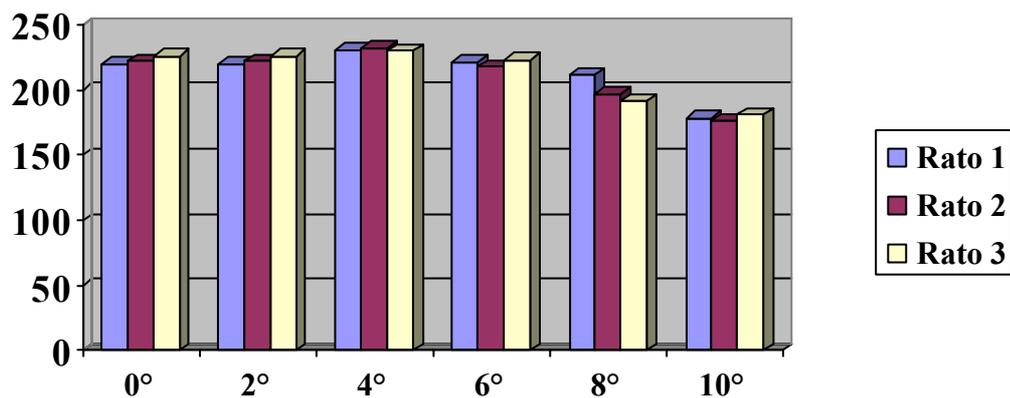


Gráfico 2 Análise do controle de peso grupo II- Tratamento com laser

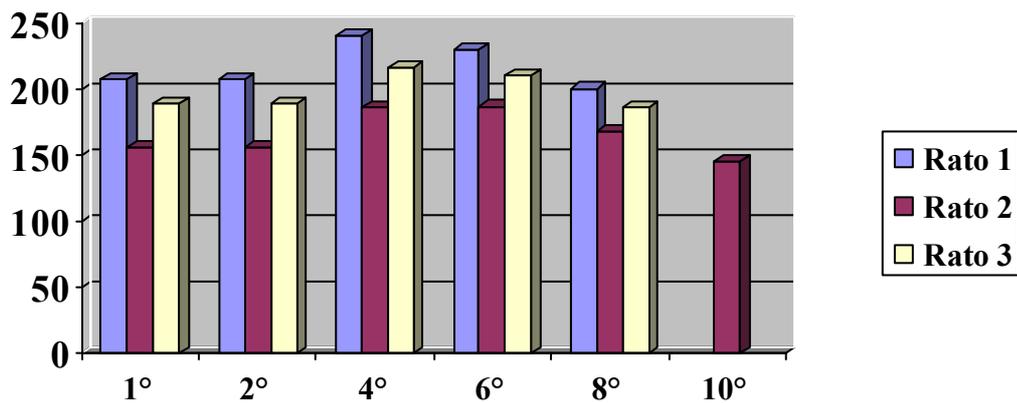


Gráfico 3 Análise do controle de peso grupo III- Tratamento com azul de metileno seguido da aplicação de laser

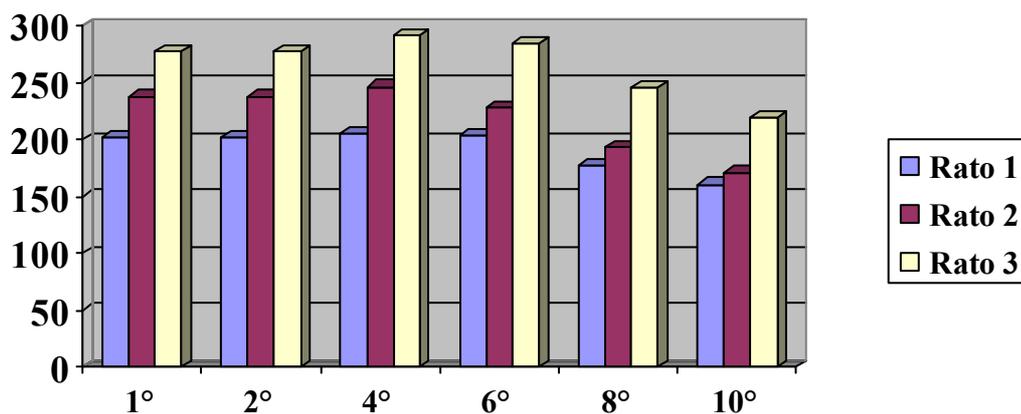


Gráfico 4 Análise do controle de peso grupo IV- Tratamento com cloridrato de aminolevulinato de metila seguido da aplicação de laser

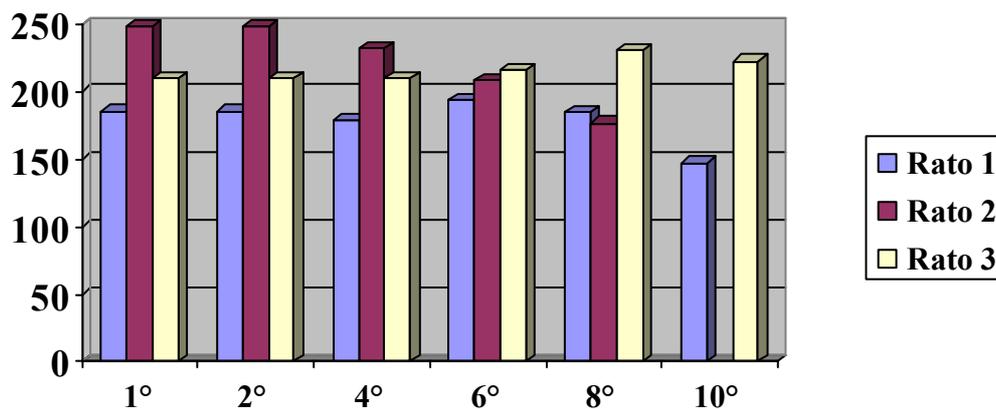




Figura 8 Dia 0 da inoculação.



Figura 9 Dia 2 da inoculação.



Figura 10 Dia 4 da inoculação.



Figura 11 Dia 6 da inoculação.



Figura 12A Dia 8 da inoculação.



Figura 12B Dia 8 da inoculação.



Figura 13 Câmara de éter utilizada na morte dos animais.



Figura 14 Espécime de língua normal de um rato wistar que não pertencia à pesquisa, apenas para comparar com os grupos da dissertação.



Figura 15 Espécime do Grupo I, sem tratamento.



Figura 16 Espécime do Grupo II, tratado com laser.



Figura 17 Espécime do Grupo III, tratado com azul de metileno e laser.



Figura 18 Espécime do Grupo IV, tratado com cloridrato de aminolevulinato de metila e laser.

5.2 Análise Microscópica

A **(Figura 19)** apresenta o resultado de uma lâmina microscópica de tecido da língua de um rato wistar que não sofreu inoculação de células de Walker 256, não pertencendo à pesquisa, servindo, tão-somente, como meio de comparação com as outras lâminas.

Os cortes histológicos de todos os grupos caracterizaram-se pela evidente proliferação de neoplasia maligna indiferenciada, composta por células redondas de escasso citoplasma, núcleo volumoso, bordas definidas, cromatina frouxa e nucléolos bem definidos, hipercromatismo e mitoses atípicas, resultados da inoculação das células de Walker 256 na língua dos 12 ratos wistar, como ilustra a **(Figura 20)**. Como o grupo I não recebeu tratamento, as lâminas apresentaram as características em mote.

Nas **(Figuras 21A & B)**, ilustram as lâminas do grupo II, tratado apenas com laser, o resultado de neoplasia maligna indiferenciada, composta por células redondas, frouxamente dispostas, com escasso citoplasma, núcleo volumoso e hipercromatismo, mas sem presença de apoptose.

Nas **(Figuras 22A & B)**, ilustram as lâminas do grupo III, tratado com azul de metileno e laser, alterações nucleares compatíveis com apoptose, além da existência de extensas áreas hemorrágicas **(Figuras 23A & B)**.

Nas (**Figuras 24A & B**), ilustram as lâminas do grupo IV, tratado com cloridrato de aminolevulinato de metila e laser, corpos apoptóticos.

As tabelas abaixo demonstram os resultados da análise microscópica

Tabela 7 Resultado da análise microscópica

Grupos	Infiltrado inflamatório	Necrose	Hemorragia	Mitoses
I	Intenso	Profunda	Moderada	Intensa
II	Discreto	Moderada	Moderada	Intensa
III	Discreto	Superficial	Intensa	Intensa
IV	Discreto	Superficial	Moderada	Intensa

Tabela 8 Resultado da análise microscópica

Grupos	Úlcera	Apoptose	Hipercromatismo	Pleomorfismo
I	Presente	Ausente	Presente	Presente
II	Presente	Ausente	Presente	Presente
III	Presente	Presente	Presente	Presente
IV	Presente	Presente	Presente	Presente

Tabela 9 Resultado da análise microscópica

Grupos	Invasão perivascular	Invasão neural	Invasão muscular
I	Presente	Presente	Presente
II	Presente	Presente	Presente
III	Presente	Presente	Presente
IV	Presente	Presente	Presente

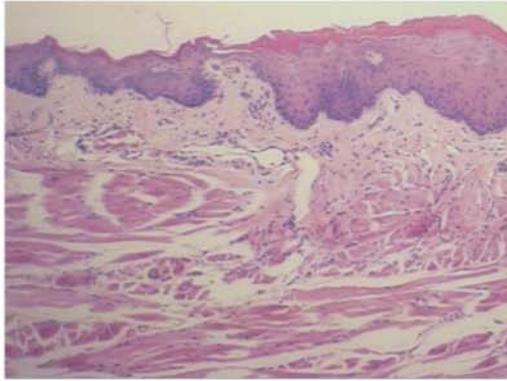


Figura 19 Apresentação microscópica dos tecidos normais da língua de um rato wistar que não pertencia à pesquisa, apenas para comparação com os grupos da dissertação HE 10X.

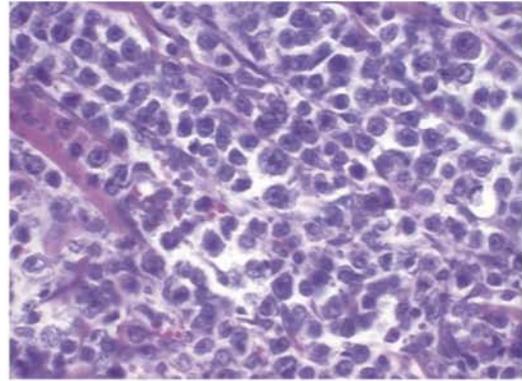


Figura 20 Neoplasia maligna indiferenciada, composta de células redondas, de escasso citoplasma, núcleo volumoso, de bordas definidas, cromatina frouxa, nucléolos bem definidos, hiperchromatismo e mitoses atípicas, resultado da inoculação das células de Walker 256 na língua dos ratos HE 20X.

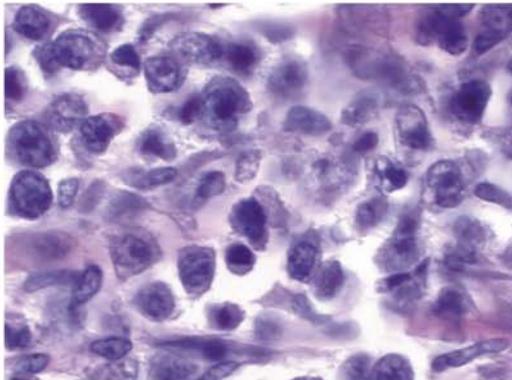


Figura 21A Grupo II, tratado apenas com laser - neoplasia maligna indiferenciada, composta de células redondas, frouxamente dispostas, com escasso citoplasma, núcleo volumoso e hiperchromatismo, mas sem evidência de apoptose. Células neoplásicas do tumor de Walker HE 100X.

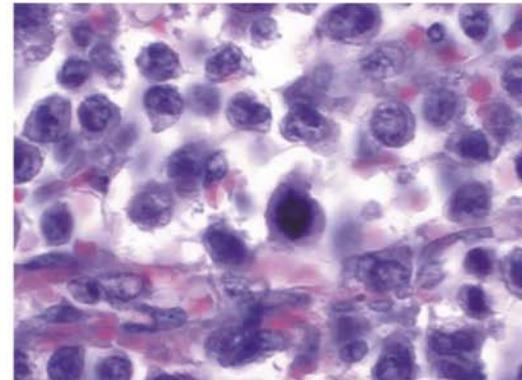


Figura 21B Grupo II, tratado apenas com laser - neoplasia maligna indiferenciada, composta de células redondas, frouxamente dispostas, com escasso citoplasma, núcleo volumoso e hiperchromatismo, mas sem evidência de apoptose. Células neoplásicas do tumor de Walker HE 100X.

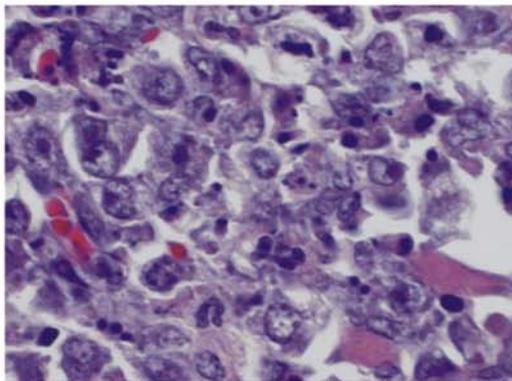


Figura 22A Grupo III, tratado com azul de metileno e laser - evidência de alterações nucleares compatíveis com apoptose. Células neoplásicas do tumor de Walker HE 100X.

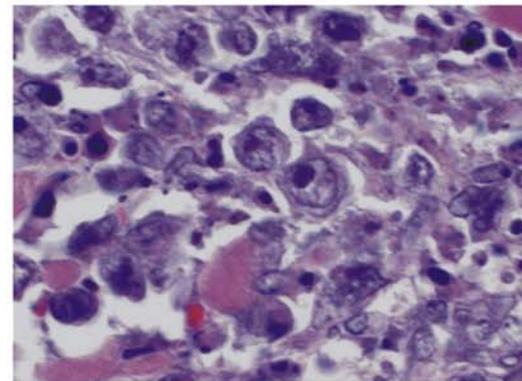


Figura 22B Grupo III, tratado com azul de metileno e laser - evidência de alterações nucleares compatíveis com apoptose. Células neoplásicas do tumor de Walker HE 100X.

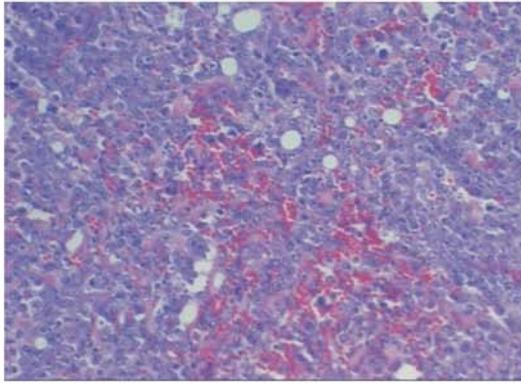


Figura 23A Grupo III, tratado com azul de metileno e laser - evidência de extensas áreas hemorrágicas. Células neoplásicas do tumor de Walker HE 20X.

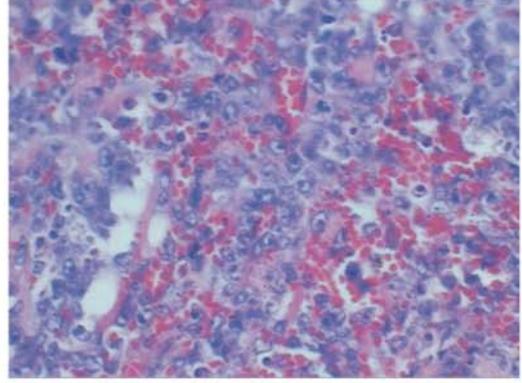


Figura 23B Grupo III, tratado com azul de metileno e laser - evidência de extensas áreas hemorrágicas. Células neoplásicas do tumor de Walker HE 40X.

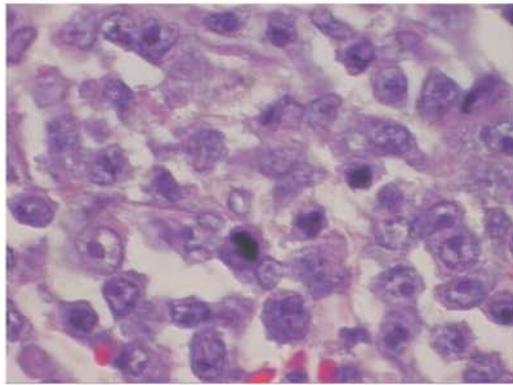


Figura 24A Grupo IV, tratado com cloridrato de aminolevulinato de metila e laser - evidência de corpos apoptóticos. Células neoplásicas do tumor de Walker HE 100X.

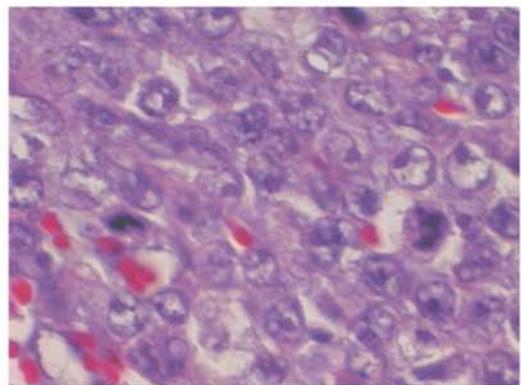


Figura 25B Grupo IV, tratado com cloridrato de aminolevulinato de metila e laser - evidência de corpos apoptóticos. Células neoplásicas do tumor de Walker HE 100X.

6. Discussão

6. Discussão

A indução de câncer em modelos animais é um método importante para se investigar a dinâmica tumoral e a avaliação de tratamentos. A indução com uso de fármacos específicos como o 7,2-dimetilbenzoantroceno e o 4-nitroquinolina-N-óxido são factíveis, porém demandam tempo excessivo para o desenvolvimento do tumor e somente após essa fase é possível testar uma terapia (Kanojia & Vaidya, 2006). Além disso, os carcinógenos químicos, diretos e indiretos, nem sempre causam mutação, mesmo quando se ligam ao DNA, pois o organismo dispõe de sistema de reparação de DNA, apresentando índice de “pega” muito variável (Kanojia & Vaidya, 2006).

A indução de câncer em modelos animais, utilizando células tumorais injetadas diretamente no órgão, como o tumor de Walker 256, é um modelo de neoplasia empregado para estudar o efeito de agentes citotóxicos, medicações e imunossupressores. O tumor de Walker 256 também tem a vantagem de ser facilmente obtido *in vivo*, pela inoculação de células em ratos. Falhas de inoculação ou regressão espontânea são pouco frequentes (Moraes, et al., 2000).

A escolha do modelo animal com a utilização de ratos wistar fundamenta-se na facilidade de aquisição e baixo custo. O rato é um modelo de manuseio relativamente simples e exige poucos cuidados. Além

disso, apresenta fácil índice de “pega”. Por essas razões, foi escolhido para o estudo em foco.

As células são facilmente mantidas em laboratório, possuem crescimento tumoral célere e, ao serem injetadas no animal, promovem o desenvolvimento de um tumor com características neoplásicas malignas evidentes e índice de “pega” de 100% em ratos wistar (Black et al., 1994, Moraes et al., 2000, Silva et al., 2004, Alves et al., 2004).

No presente trabalho, evidenciou-se que em todos os grupos havia tumor bem estabelecido, configurando-se 100% de índice de “pega”, de acordo com a observação clínica. Entretanto, na análise histopatológica realizada no grupo IV, observou-se ausência de tumor em lâminas, correspondente a 1 animal do grupo. Infere-se, como possível explicação, que os cortes tenham sido realizados de forma superficial ou tenham contornado o tumor. Pode ter ocorrido, também, erro de processamento da peça durante a inclusão, pois, clinicamente, verificou-se a existência de tumor em todos os animais, conforme visto nas figuras clínicas, caracterizado pelo aumento volumétrico, alteração da forma e quadruplicação do volume da língua. Nas referidas lâminas, a análise microscópica revelou tecido conjuntivo com aspecto de normalidade, presença de glândulas serosas e mucosas, epitélio íntegro e inúmeros mastócitos. Mesmo assim, como havia outras lâminas com nítida presença

de tumor em animal do grupo IV, deduz-se que o índice real de “pega” continuou a ser 100%.

Encontrou-se idêntico resultado, no tocante ao índice de “pega” de 100% e de desenvolvimento do tumor, na única pesquisa para indução de câncer de boca usando células de Walker 256 (Alves et al., 2004). Nos modelos de tumor de fígado, bexiga, rim e pulmão, com células de Walker 256, também foram observados índice de “pega” de 100% (Dornelas et al., 2006, Neto et al., 2002, Silva et al., 2002, Zarur et al., 2004). Os resultados observados acerca do alto índice de “pega” parecem ocorrer em virtude do comportamento agressivo do tumor, devido às variantes. O tumor de Walker 256 apresenta duas variantes, “A” e “B”, que são diferentes no tocante à agressividade. No presente trabalho, utilizou-se a variante “A”, por ser mais agressiva.

Os mecanismos envolvidos na progressão e até mesmo na regressão (espontânea ou não) no modelo de tumor de Walker 256 ainda não são completamente entendidos. A variante “A” possui propriedade agressiva e pode induzir efeitos sistêmicos, como anorexia, retenção de água, seguida por perda de peso e morte. Tais resultados sugerem que a agressiva variante “A” é relacionada com a modulação de citocina. As citocinas são glicoproteínas solúveis, de pequeno peso molecular, produzidas pelos macrófagos e linfócitos do hospedeiro, em resposta a estímulos tumorais, que atuam como mensageiras intercelulares. Níveis circulantes

mensuráveis de citocinas ocorrem, geralmente, em situações de hiperestímulo da produção, e, provavelmente, refletem perda dos mecanismos de homeostase (De Almeida Salles Perroud et al., 2006)

As citocinas têm sido associadas à chave principal de fatores tumorais envolvidos na caquexia do câncer (Argiles et al., 2003) e, com a progressão da doença, é possível que passem a circular em outros tecidos e venham a atuar como fatores endócrinos (Ockenga & Valentini, 2005). Na presente dissertação, ao final do dia 9, os animais apresentavam-se caquéticos, debilitados e com extenso tumor na língua, ocorrendo, em consequência, a morte de 3 ratos wistar.

Durante o procedimento de avaliação do tumor de Walker 256, depois do tratamento, morreram, no dia 9 da inoculação, 1 rato do grupo IV e 1 rato do grupo II. Ademais, no dia 10 da inoculação, morreu 1 rato do grupo II. Registra-se que não houve oportunidade de realizar necrópsia nesses ratos, em face do momento em que morreram.

No presente trabalho, ocorreu a morte de 3 animais no dia 9 da inoculação de tumor de Walker 256 na língua. Obteve-se, portanto, sobrevida de 75% dos ratos. Diferentemente, nas pesquisas de Alves e Silva, a sobrevida dos animais foi de 14 dias pós-implante de tumor de Walker 256 na cavidade oral e no rim direito. Somente 50% dos animais estavam vivos até o final do experimento, determinando-se uma mediana de sobrevida de 14 dias (Alves et al., 2004, Silva et al., 2002).

Quando induzido tumor de Walker 256 no fígado, foi observado por Zarur que os animais foram a óbito entre o sétimo e o décimo quinto dia, com sobrevida média de 10,0 dias (Zarur et al., 2004). No pulmão, a sobrevida média foi de 10,1 dias e a mediana de 10 dias (Neto et al., 2002). A média de sobrevida em inoculação no estômago dos animais portadores de tumor de Walker 256 foi de $13,2 \pm 1,98$ dias (Oliveira et al., 1998). Considerando a baixa sobrevida, infere-se que a utilização de mais animais diminuiria as limitações encontradas.

De fato, não foi possível determinar com precisão os resultados da terapia fotodinâmica, tendo em vista que 3 animais do grupo teste morreram. Poder-se-ia argumentar que a amostra foi pequena. Porém, tal fato justifica-se pela dificuldade de obtenção e alto custo do cloridrato de aminolevulinato de metila.

Impende salientar que o objetivo de caracterizar o modelo de tumor de Walker 256, em consonância com o trabalho de Alves, foi alcançado (Alves et al., 2004). Além disso, também foi possível realizar o tratamento nos grupos II, III e IV.

Na presente dissertação, é relevante ressaltar a presença de dois marcos na caracterização do modelo de tumor de Walker 256. No dia 4 da inoculação, verificou-se início de perda de peso dos animais (**Tabelas 3, 4, 5 & 6**), com exceção dos ratos 1 e 3, do grupo IV. Acrescenta-se o fato de que todos os ratos, no dia 8 da inoculação, apresentaram excessivo

sangramento, redução de peso severa, acúmulo de placa bacteriana na língua, mucosa jugal e dentes, dificuldade de alimentação, aumento de quatro vezes do volume da língua, além de áreas com úlcera e trismo **(Figuras 8, 9, 10, 11, 12A & 12B)**. Não há outros trabalhos com tumores de boca para subsidiar eventuais comparações. Existe, tão-somente, um estudo de carcinossarcoma de Walker 256 na cavidade oral de ratos, caracterizado pelo aspecto histomorfológico de reabsorção óssea e dentária (Alves et al., 2004). O referido trabalho serve como parâmetro de comparação, apesar das diferenças de procedimentos.

Como observado por Alves, trata-se de modelo de rápida indução e de manifestação tumoral agressiva, podendo ser empregado para a análise da ação *in vivo* de drogas antitumorais e de esquemas terapêuticos, ou para o estudo de invasão e reabsorção ósseas (Alves et al., 2004).

Registre-se que, no trabalho em mote, os cortes histológicos de todos os grupos caracterizaram-se pela proliferação de neoplasia maligna agressiva, ocupando praticamente toda a língua do rato, composta de células redondas com escasso citoplasma, núcleo volumoso e nucléolos evidentes. As bordas do núcleo estavam bem definidas e a cromatina fina dava-lhe um aspecto claro. Brigatte observou dados histopatológicos consoantes com os descritos na dissertação (Brigatte et al., 2007).

Na presente pesquisa, o tumor se desenvolveu abaixo do epitélio, invadindo e substituindo o tecido muscular do rato, com invasão clara de

tecido neural e vascular. Por vezes, observou-se a invasão de células tumorais no epitélio, provocando sua destruição e gerando extensas áreas com úlceras, características típicas de um tumor biologicamente agressivo. Não houve, porém, características morfológicas que permitissem a classificação do tumor como carcinosarcoma .

A descrição exposta acima corresponde a um diagnóstico de neoplasia maligna de origem indeterminada. Não se observou, nas lâminas avaliadas, evidente participação do epitélio no tumor, o que descaracteriza o termo carcinosarcoma. Moraes considerou que o tipo histológico encontrado não apresentava características de adenocarcinoma ou carcinosarcoma, mas, sim, de tumor indiferenciado, de pequenas células redondas, provavelmente por modificações nas sucessivas inoculações (Moraes et al., 2000).

As poucas descrições histopatológicas encontradas na literatura são condizentes com os resultados dessa dissertação. Brigatte realizou descrição morfológica de neoplasia agressiva, de células redondas, que, embora localizada em outro órgão, foi absolutamente semelhante à desenvolvida nos animais testados no experimento em foco (Brigatte et al., 2007).

Observou-se no presente experimento, também, áreas com ulceração, necrose e extensas hemorragias. Nas áreas com úlceras, verificou-se a presença de extensas áreas de exsudato fibrinolento, eventualmente

permeado por biofilmes microbianos e circundados por infiltrado inflamatório mononuclear, com esparsos neutrófilos. Destaca-se que no grupo I, inoculado com células de Walker 256, sem receber tratamento, havia, na área do tumor, intenso infiltrado inflamatório. Nos outros três grupos, o infiltrado inflamatório era discreto (**Tabelas 7 & 8**).

As áreas de necrose eram profundas no grupo I, sem tratamento, e superficiais somente nos grupos III e IV, que receberam tratamento com terapia fotodinâmica. O grupo II, que recebeu a aplicação de laser, apresentou necrose moderada (**Tabela 7**). Embora tenha apresentado resultado variável entre os grupos, em relação a característica de necrose, não há como inferir que esse resultado foi obtido pela eficácia do tratamento, pois o tumor estava presente em todos os grupos, mesmo depois das terapias.

Ferreira ressaltou ponto importante em relação à terapia fotodinâmica: não foi descoberta a relação entre a penetração luminosa e a necrose, assim como a extensão da necrose e a concentração do fotossensibilizador (Ferreira, 2003).

O perfil hemorrágico do tumor pôde ser evidenciado em todos os grupos. De forma similar ao descrito para as áreas com necrose, houve diferenças que podem ser devidas ao tratamento utilizado. No grupo III, as áreas hemorrágicas eram extensas, sugerindo, inclusive, padrão de angiogênese.

A eficácia da terapia fotodinâmica no tratamento do câncer depende de vários fatores, como o tipo do fotossensibilizador, a concentração da droga e a localização intracelular. A morte das células, causada pelo agente citotóxico oxigênio singlete, pode dar-se pela indução de apoptose e necrose, reações inflamatórias, reações imunes, além da ocorrência de alterações vasculares dos vasos do tumor e da vizinhança saudável, resultando na morte indireta das células tumorais, via indução da hipoxia ou inanição. Para alguns fotossensibilizadores, o mecanismo de efeito terapêutico mais importante é o vascular (Triesscheijn et al., 2006).

No experimento, ficou evidente a apoptose nos grupos III e IV, que correspondem aos tratamentos com azul de metileno e laser, e cloridrato de aminolevulinato de metila e laser. Os grupos I e II não apresentaram apoptose (**Tabela 8**). No entanto, não há como inferir se esse resultado teria significância na eficácia da terapêutica, tendo em vista que o tumor estava presente mesmo depois da aplicação do laser, embora com evidente morte celular do tipo apoptose. Permite-se, portanto, sugerir a utilização dos medicamentos azul de metileno e cloridrato de aminolevulinato de metila, como alternativas terapêuticas em novas pesquisas, com base na forte indução de morte celular por apoptose.

Apoptose é uma forma regulada de morte celular fisiológica, que é dependente da expressão de suicídio maquinário intrínseco celular, no qual uma cascata da caspases é induzida (Wising et al., 2005). Células que

sofrem apoptose apresentam mudanças morfológicas típicas, incluindo deformação do núcleo, condensação da cromatina, formação de protuberância na membrana plasmática e fragmentação de DNA (Zhou et al., 1996).

Uma característica importante dos fotossensibilizadores consubstancia-se no estado tripleto. A droga fotoativadora excitada deve reagir com o ambiente por transferência eletrônica/reações redox, ou transferir energia de excitação a uma molécula de oxigênio, produzindo o altamente reativo oxigênio singlete, ocorrendo necrose ou apoptose. O fotossensibilizador danifica os alvos tumorais pelo efeito da oxidação (Eduardo & Novaes, 2004).

O mecanismo que leva à concentração das drogas fotoativas nas células tumorais não está completamente esclarecido, variando de acordo com o tipo de medicamento estudado. Basicamente, a dificuldade de estudo da terapia fotodinâmica está na presença de múltiplos alvos no interior da célula (Morgan & Oseroff, 2001). O medicamento fotoativador, que se localiza preferencialmente nas mitocôndrias, ocasiona a apoptose da célula, enquanto que a medicação que se localiza nos lisossomos ou nas membranas, em geral, promovem tanto a apoptose quanto a necrose (Moor, 2000). Não foi objeto do estudo em tela avaliar o local de ação dos medicamentos, mas, sim, tratar os grupos III e IV com a terapia fotodinâmica. Clinicamente, após o tratamento, as línguas dos animais dos

grupos citados diminuíram de volume, mas, microscopicamente, observou-se a presença de neoplasia maligna.

Diante dos resultados e da morte dos animais dos grupos II e IV, não foi possível avaliar a eficácia da terapia fotodinâmica. Obteve-se resultado indeterminado, embora com substancial presença de apoptose e diferença no padrão de necrose dos grupos III e IV.

Considerando o trabalho de Alves sobre o modelo de carcinossarcoma na cavidade oral e os resultados encontrados no presente trabalho (Alves et al., 2004), infere-se que o tumor de Walker 256 é um bom modelo para câncer bucal, tendo em vista as seguintes características:

- facilidades de manutenção das células tumorais;
- elevado índice de “pega”;
- desenvolvimento do tumor; e
- agressividade da neoplasia.

Por outro lado, a desvantagem para o estudo do câncer bucal é a tipagem histopatológica (pode não representar o comportamento biológico de um modelo, induzido por 4-nitroquinolina-N-óxido ou 7,2-diametilbenzoantroceno, que resulte em carcinoma espinocelular).

O carcinossarcoma em boca é muito raro. Há relatos de seu envolvimento apenas na glândula submandibular (Boros et al., 2004). O tratamento para o carcinossarcoma, tal como o utilizado em carcinoma

espinocelular, é cirúrgico (Boros et al., 2004, Dedivitis et al., 2004), o que indica alguma semelhança entre ambos.

A escolha do modelo deve ser definida pela finalidade do estudo. Enfim, considerando os aspectos positivos e negativos, o modelo caracterizado na presente dissertação pode constituir ferramenta importante para o estudo do câncer de boca.

7. Conclusões

7. Conclusões

Considerando os resultados obtidos pelo modelo experimental em murinos, conclui-se que foi caracterizada rápida indução de neoplasia maligna, pela inoculação, na língua de ratos wistar, de células de Walker 256, para posterior avaliação dos efeitos da terapia fotodinâmica, nos seguintes termos:

- Foi possível induzir, experimentalmente, neoplasia maligna pela inoculação de células de Walker 256 na língua de ratos wistar;
- Analisaram-se, clínica e morfológicamente, as alterações teciduais presentes na língua de ratos wistar, após a inoculação das células de Walker 256. Macroscopicamente, observou-se que ocorre aumento de volume da língua (**Figuras 8, 9, 10, 11, 12A & 12B**), perda de peso (**Tabelas 3, 4, 5 & 6**). A análise histopatológica evidenciou a presença de neoplasia maligna de origem indeterminada e de comportamento agressivo. Os cortes histológicos de todos os grupos caracterizaram-se pela evidente proliferação de neoplasia maligna, apresentando células redondas de escasso citoplasma e núcleo volumoso, bordas definidas, cromatina frouxa e nucléolos bem definidos, além de amplas áreas de necrose, hemorragias e extensas áreas ulceradas;

- Realizou-se tratamento, com terapia fotodinâmica, em neoplasia maligna na língua de ratos wistar, usando azul de metileno, seguido da aplicação de laser;
- Tratou-se, com terapia fotodinâmica, neoplasia maligna na língua de ratos wistar, usando cloridrato de aminolevulinato de metila, seguido da aplicação de laser;
- Não foi possível comparar, clínica e histopatologicamente, os resultados da terapia fotodinâmica nos diferentes grupos, pelas limitações das amostras. As evidências morfológicas da presença de apoptose e necrose são insuficientes para atestar a eficácia dos medicamentos, bem como para definir a terapêutica apropriada; e

Faz-se mister o desenvolvimento de novos estudos com as células de Walker 256, com o desiderato de analisar a viabilidade da terapia fotodinâmica em neoplasia maligna agressiva.

Referências

- Alves APNN, Guedes RC, Costa-Lotufo LV, Moraes MEA, Pessoa CO, Ferreira FVA & Moraes MO (2004). Modelo experimental de tumor na cavidade oral de ratos com carcinossarcoma de Walker 256. *Acta Cir Bras* 19: 1-11.
- Amar A, Curioni OA, Franzi SA, Ortelado DK & Rapoport A (2005). Neck dissection in squamous cell carcinoma of the tongue. *Rev Bras Otorrinolaringol* 71: 29-31.
- Amorim Filho FS, Andrade Sobrinho J, Rapoport A, Novo NF & Juliano Y. Estudo clínico-epidemiológico do carcinoma epidermóide da base da língua (2003). *Rev Bras Otorrinolaringol* 69: 175-179.
- Argiles JM, Busquets S & Lopez-Soriano FJ (2003). Cytokines in the pathogenesis of cancer cachexia. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 6: 401-406.
- Bakos RM, Bakos L, Ferlin E, Cestari T, Orlandini T, Rezende R, Peukert C, Berti C & Di Domenico E (2003). Terapêutica fotodinâmica com ácido delta-aminolevulínico em neoplasias queratinocíticas superficiais. *Anais Bras Dermat* 78: 197-207.
- Black JM, Nesheim MC & Kinsella JE (1994). Dietary level of maize oil affects growth and lipid composition of Walker 256 carcinosarcoma. *Br J Nutr* 71: 283-294.
- Boros LF, Júnior JB, Boros LF, Boros LH & Silva PA (2004). Adenoma Pleomórfico de glândula salivar menor do palato. *Odontol Clin-Cientif* 3: 67-72.
- Brigatte P, Sampaio SC, Gutierrez VP, Guerra JL, Senhorini IL, Curi R & Cury Y (2007). Walker 256 tumor-bearing rats as a model to study cancer pain. *J Pain* 8: 412-421.
- Brown SB, Brown EA & Walker I (2004). The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment. *Lancet Oncol* 5: 497-508.
- Brugnera JR & Pinheiro ALB (1998). Histórico e classificação dos lasers. Laser na odontologia moderna. 1ª. Edição. *Pancast*: São Paulo, 19-76.
- Castano AP, Demidova TN & Hamblin MR (2005). Mechanisms in photodynamic therapy: part one – photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 2: 191-106.
- Chen YK, Hsue SS & Lin LM (2002). The mRNA expression of inducible nitric oxide synthase in DMBA-induced hamster buccal-

- pouch carcinomas using reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Oral Pathol Med* 31: 82-86.
- Cheung J, Todd M, Turnbull R, Allison B, Mornin L, Carvalho AM, Spurr G & Hsiang Y (2004). Longer term assessment of photodynamic therapy for intimal hyperplasia: a pilot study. *J Photochem Photobiol B* 73: 141-147.
- Creak AL, Harrington K & Nutting C (2005). Treatment of recurrent head and neck cancer: re-irradiation or chemotherapy. *Clin Oncol R Coll Radiol* 17: 138-147.
- De Almeida Salles Perroud AP, Ashimine R, De Castro GM, Guimarães F, Vieira KP, Aparecida Vilella C, Samico Cavalcanti TC & De Lima Zollner R (2006). Cytokine gene expression in Walker 256: a comparison of variants A (aggressive) and AR (regressive). *Cytokine* 36: 123-133.
- Dedivitis RA, França CM, Mafra ACB, Guimarães FT & Guimarães AV (2004). Clinic and epidemiologic characteristics in the with squamous cell carcinoma of the mouth and oropharynx. *Rev Bras Otorrinolaringol* 70: 35- 40.
- Detty MR, Gibson SL & Wagner SJ (2004). Current clinical and preclinical photosensitizers for use in photodynamic therapy. *J Med Chem* 47: 3897-3915.
- Dornelas CA, Almeida PR, Nascimento GL, Lima EB & Moraes MO (2006). Experimental model of Walker 256 carcinosarcoma in rats bladder. *Acta Cir Bras* 21: 38-42.
- Eduardo MBP & Novaes HMD (2004). Análise de conformidades às normas técnicas de proteção radiológica dos serviços de radioterapia no Estado de São Paulo, Brasil. *Cad. Saúde Pública* 20: 256-267.
- Epstein JB, Zhang L & Rosin M (2002). Advances in the diagnosis of oral premalignant and malignant lesions. *J Can Dent Assoc* 68: 617-621.
- Ferreira J (2003). Análise da necrose em tecidos normais fotossensibilizados pós terapia fotodinâmica - estudo in vivo. *Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP)*. Universidade de São Paulo - Ribeirão Preto: Ribeirão Preto.
- Ferreira LM, Hochman B & Barbosa MVJ (2005). Modelos experimentais em pesquisa. *Acta Cir Bras* 20: 28-34.
- Gold MH & Goldman MP (2004). 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy: where we have been and where we are going. *Dermatol Surg* 30:1077-1083.
- Guerra MR, Gallo CVM, Azevedo G & Mendonça S (2005). The risk of cancer in Brazil: tendencies and recent epidemiologic studies. *Revista Brasileira de Cancerologia* 51: 227-234.

- Guimarães F, Rettori O, Vieira-Matos AN & Fernandes GA (1999). The influence of septal lesions on sodium and water retention induced by Walker 256 tumor. *Braz J Med Biol* 32: 309-317.
- Gupta S, Dwarakanath BS, Muralidhar K & Jain V (2003). Cellular uptake, localization and photodynamic effects of haematoporphyrin derivative in human glioma and squamous carcinoma cell lines. *J Photochem Photobiol B* 69: 107-120.
- Inca (2007). Estimativas 2008: Incidência de Câncer no Brasil.: Rio de Janeiro.
- Jham BC & Freire AR (2006). Complicações bucais da radioterapia em cabeça e pescoço. *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia* 72: 704-708.
- Kaneko T, Chiba H, Yasuda T & Kusama K (2004). Detection of photodynamic therapy-induced early apoptosis in human salivary gland tumor cells in vitro and in a mouse tumor model. *Oral Oncol* 40: 787-792.
- Kanojia D & Vaidya MM (2006). 4-nitroquinoline-1-oxide induced experimental oral carcinogenesis. *Oral Oncol* 42: 655-667.
- Lima NL (1999). Estudo das alterações morfológicas causadas pela indução concomitante de DMBA e bebidas alcoólicas de alto teor na carcinogênese química bucal. *Faculdade de odontologia de Bauru (USP)*. Universidade de São Paulo - Bauru: Bauru.
- Luksiene Z (2003). Photodynamic therapy: mechanism of action and ways to improve the efficiency of treatment. *Medicina Kaunas* 39: 1137-1150.
- Machado AEH (2000). Terapia Fotodinâmica: Princípios, Potencial de Aplicação e Perspectivas. *Química Nova* 23: 237-243.
- Mang TS (2004). Lasers and light sources for PDT: past, present and future. *Photodiag and Photodyn Ther* 1: 43-48.
- Mognetti B, Di Carlo F, Berta GN (2006). Animal models in oral cancer research. *Oral Oncol* 42: 448-60.
- Moor AC (2000). Signaling pathways in cell death and survival after photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B* 57: 1-13.
- Moraes SP, Cunha A, Reis Neto JA, Barbosa H, Roncolato CAP & Duarte RF (2000). Modelo experimental de tumor de Walker. *Acta Cir Bras (on line)* 15.
- Morgan J & Oseroff AR (2001). Mitochondria-based photodynamic anti-cancer therapy. *Adv Drug Deliv Rev* 49: 71-86.
- Neto A, Pessoa BBGP, Aguiar SA, Furtado BM, Moraes MO & Ribeiro RA (2002). Modelo de tumor de pulmão em rato com o carcinossarcoma de Walker. *Acta Cir Bras* 17:1-16.

- Novaes MRCG (1999). Efeitos da suplementação nutricional com L-arginina no tumor de Walker 256. *Faculdade de saúde (UNB). Universidade de Brasília - Brasília: Brasília.*
- Nowis D, Makowski M, Stoklosa T, Legat M, Issat T & Golab J (2005). Direct tumor damage mechanisms of photodynamic therapy. *Acta Biochim Pol* 52: 339-352.
- Ockenga J & Valentini L (2005). Review article: anorexia and cachexia in gastrointestinal cancer. *Aliment Pharmacol Ther* 22: 583–594.
- Oliveira PFM, Henriques IA, Rodrigues-Filho F, Almeida PRC & Moraes MO (1998). Estabelecimento de um modelo de tumor experimental pela inoculação do tumor de Walker em estômago de rato. *Acta Cir. Bras* 13: 243-248.
- Orth K, Beck G, Genze F & Ruck A (2000). Methylene blue mediated photodynamic therapy in experimental colorectal tumors in mice. *J Photochem Photobiol B* 57: 186-192.
- Parise Júnior O & Buzaid AC (2006). Terapia fotodinâmica - uma nova opção no tratamento dos carcinomas superficiais de cabeça e pescoço. *Rev Bras Cirug Cabeça e Pescoço* 35: 121 - 125.
- Pariser DM, Lowe NJ, Stewart DM, Jarratt MT, Lucky AW, Pariser RJ & Yamauchi PS (2003). Photodynamic therapy with topical methyl aminolevulinate for actinic keratosis: results of a prospective randomized multicenter trial. *J Am Acad Dermatol* 48: 227-232.
- Peng Q, Soler AM, Warloe T, Nesland JM & Giercksky KE (2001). Selective distribution of porphyrins in skin thick basal cell carcinoma after topical application of methyl 5-aminolevulinate. *J Photochem Photobiol B* 62: 140-145.
- Ribeiro JN. Avaliação da atividade fotodinâmica de porfirinas para uso em terapia fotodinâmica. *Instituto de química (Unicamp). Universidade Estadual de Campinas - Campinas: Campinas.*
- Ribeiro DA, Salvadori DMF & Marques MEA (2005). Abnormal expression of bcl-2 and bax in rat tongue mucosa during the development of squamous cell carcinoma induced by 4-nitroquinoline 1-oxide. *Int J Exp Pathol* 86: 375-381.
- Siddiqui F, Pajak TF, Watkins-Bruner D, Konski AA, Coyne JC, Gwede CK, Garden AS, Spencer SA, Jones C & Movsas B (2007). Pretreatment Quality of Life Predicts for Locoregional Control in Head and Neck Cancer Patients: A Radiation Therapy Oncology Group Analysis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 70: 353–360.
- Silva LFG, Soares FSD, Anselmo JNN, Fe DMM, Cavalcante JLBG, Moraes MO & Vasconcelos PRL (2002). Modelo de tumor experimental em rim de ratos. *Acta Cir Bras* 17: 62-66.

- Silva SL, Silva SF, Farias IN, Mota RS, Carvalho RA, Moraes MO, Moraes ME & Campos Hde H (2004). Rapamycin even when combined with cyclosporine attenuates tumor growth but does not induce regression of established walker sarcomas. *Transplant Proc* 36: 934-937.
- Silva SL, Silva SFR, Farias IN, Mota RS, Moraes ME, Campos HdH, FVF & Filho MOM (2006). Um novo modelo de isolamento do tumor de Walker utilizando o gradiente de Ficoll-Hypaque. *Acta Cirúrgica Brasileira* 21: 101-105.
- Simplicio F (2002). Terapia Fotodinâmica: Aspectos farmacológicos, aplicações e avanços recentes no desenvolvimento de medicamentos. *Quim Nova* 25: 801-807.
- Triesscheijn M, Baas P, Schellens JH & Stewart FA (2006). Photodynamic therapy in oncology. *Oncologist* 11: 1034-1044.
- Umeda M, Yokoo S, Komori T, Nishimatsu N, Shibuya Y & Fujioka M (2001). Experimental model of invasion and metastasis by orthotopic transplantation of oral squamous and adenoid cystic carcinomas into the tongue of nude mice. *Br J Oral Maxillofac Surg* 39: 376-380.
- Valls V, Peiro C, Muñoz P & Saez GT (2005). Age-related changes in antioxidant status and oxidative damage to lipids and DNA in mitochondria of rat liver. *Process Biochem* 40: 903-908.
- Vered M, Daniel N, Hirshberg A & Dayan D (2003). Histomorphologic and morphometric changes in minor salivary glands of the rat tongue during 4-nitroquinoline-1-oxide-induced carcinogenesis. *Oral Oncol* 39: 491-496.
- Vered M, Yarom N & Dayan D (2005). 4NQO oral carcinogenesis: animal models, molecular markers and future expectations. *Oral Oncol* 41: 337-339.
- Vido AA, Cavalcanti TC, Guimarães F, Vieira-Matos AN & Rettori O (2000). The hemolytic component of cancer anemia: effects of osmotic and metabolic stress on the erythrocytes of rats bearing multifocal inoculations of the Walker 256 tumor. *Braz J Med Biol Res* 33: 815-822.
- Wising C, Azem J, Zetterberg M, Svensson LA, Ahlman K & Lagergard T (2005). Induction of apoptosis/necrosis in various human cell lineages by Haemophilus ducreyi cytolethal distending toxin. *Toxicon* 45: 767-776.
- Zarur JM, Barreto MSF, Diogenes CA, Nascimento GL & Moraes MO (2004). Quimioembolização transarterial hepática: modelo experimental de tumor em ratos. *Acta Cir Bras* 19: 511-516.
- Zhou C, Shunji C, Jinsheng D, Junlin L, Jori G & Milanesi C (1996). Apoptosis of mouse MS-2 fibrosarcoma cells induced by

photodynamic therapy with Zn (II)-phthalocyanine. *J Photochem Photobiol B* 33: 219-223.