

LEANDRO SANTOS BICALHO

Remissão completa de tumores de língua induzidos com células do tumor de Ehrlich por meio da Terapia Fotodinâmica mediada pela Alumínio-Cloro-Ftalocianina em formulação lipossomal

**Brasília
2010**

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

LEANDRO SANTOS BICALHO

**Remissão completa de tumores de língua induzidos
com células do tumor de Ehrlich por meio da Terapia Fotodinâmica
mediada pela Alumínio-Cloro-Ftalocianina em formulação lipossomal**

Dissertação de Mestrado apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Ciências da Saúde pelo programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Bentes de Azevedo
Co-Orientadora: Prof^a. Dra. Maria de Fátima Menezes Almeida Santos

Brasília
2010

LEANDRO SANTOS BICALHO

**Remissão completa de tumores de língua, induzidos
com células do tumor de Ehrlich, por meio da Terapia Fotodinâmica
mediada pela Alumínio-Cloro-Ftalocianina em formulação lipossomal.**

Dissertação de Mestrado apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Ciências da Saúde pelo programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Aprovado em 05 de novembro de 2010

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ricardo Bentes de Azevedo, Departamento de Genética e Morfologia, Instituto de Biologia, Universidade de Brasília.

Prof^a. Dra. Soraya Coelho Leal, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília

Prof. Dr. Paulo Tadeu de Souza Figueiredo, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília

*À Carolina, minha amada esposa, presente lindo de Deus na minha vida.
Obrigado pelo apoio, incentivo, força, amizade, compreensão e principalmente pelo
seu amor. Dividir a vida com você faz com que ela seja infinitamente melhor.*

Amo muito você!

AGRADECIMENTOS

A Deus o mais importante agradecimento por abençoar mais uma jornada da minha vida, por guiar meus passos para que os diversos obstáculos encontrados fossem superados e por permitir que este trabalho fosse concluído com êxito;

Aos meus pais Elízio e Elaine, exemplo de dedicação, trabalho e amor pela família, que sempre me ensinaram a trilhar os caminhos da vida e nunca mediram esforços para garantir meus estudos, sonhos e ideais. Hoje colho os frutos das sementes que juntos plantamos. É difícil transformar em palavras sentimentos tão intensos de amor e gratidão. Agradeço a Deus todos os dias por ter nascido neste lar. Amo vocês!

À minha linda Carol por tornar a minha vida melhor e completa com seu carinho, apoio e incentivo incondicional, dedicação, compreensão e amor demonstrados a cada dia;

Aos meus irmãos, que, muitas vezes, mesmo sem entender direito o que eu estava fazendo e aonde chegaria me incentivaram a dar mais este passo;

À minha avó Romilda que nunca deixou de me abençoar em todos os momentos da minha vida;

Aos meus sogros João e Eleuzina por me receberem e me apoiarem como um filho, dando o mesmo apoio, incentivo e exemplo que meus pais;

À minha querida cunhada Mariana por sempre me incentivar na busca de meus ideais e pó sua valiosa amizade;

Aos demais familiares por serem pessoas tão queridas;

À Universidade de Brasília por disponibilizar toda a estrutura, humana e física, para a minha formação acadêmica;

Ao meu orientador Prof. Dr. Ricardo Bentes Azevedo pela sabedoria, rigor científico e apurado senso crítico que muito contribuíram para a concretização deste trabalho. Agradeço pelo incentivo, amizade e exemplo pessoal quanto profissional, mas também por me ensinar a transformar desafios em grandes oportunidades;

À minha querida co-orientadora Prof^a. Dra. Maria de Fátima Menezes Almeida Santos que desde a iniciação científica sempre participou de forma ativa no meu crescimento acadêmico. Sua simplicidade e sabedoria foram e sempre serão qualidades valiosas a serem seguidas no desenvolvimento de um docente;

Ao Prof. Dr. Marcio José Poças Fonseca que me mostrou o caminho fascinante da pesquisa científica e me ensinou, com seriedade e dedicação de um mestre apaixonado por aquilo que faz, a grande lição do que é fazer ciência;

Aos professores Dr. Paulo Figueiredo, Dr^a. Soraya Coelho Leal e Dr^a Mônica Garcia, que compuseram a banca examinadora desta dissertação, pela leitura cuidadosa do meu trabalho e pelas valiosas observações e sugestões;

A todos os professores do Laboratório de Genética e Morfologia, pelos valiosos ensinamentos, pelo apoio e orientação que muito contribuíram para realização deste trabalho;

À dona Zélia, pela valiosa colaboração com as excelentes fotografias realizadas para ilustrar de forma clara e objetiva os experimentos e resultados desse estudo;

Ao Prof. Antônio Cláudio Tedesco e a sua equipe, em especial à Andrezza Simioni por terem gentilmente produzido as amostras utilizadas neste estudo, além de ter compartilhado informações fundamentais para o desenvolvimento dessa dissertação;

À Luciana Oliveira Pereira, pelo trabalho em conjunto desde a iniciação científica, por ser para mim uma verdadeira orientadora, que me ensinou de uma forma muito sensível e criteriosa como atuar no campo da pesquisa científica e especialmente por ser uma amiga com valor inestimável;

Ao João Paulo, pela importante participação em muitos dos experimentos, pela boa vontade e interesse em ajudar, por enriquecer este trabalho com valiosas sugestões e pela amizade;

Aos demais colegas do Laboratório de Morfologia e Morfogênese: Patrícia, Graziella, Luis, Larissa, Victoria, Maitê, Camila, Renata, Vera, Juliana, Jaqueline, Cláudio, Taynan e Carol. O exemplo de dedicação e perseverança de cada um de vocês me inspirou a seguir o mesmo caminho. Obrigado pelo trabalho em conjunto e pela agradável convivência;

À Flávia Portilho pela fundamental colaboração na manutenção e coleta das células do tumor de Ehrlich, pela enorme disposição em me ajudar e pela amizade;

Ao Prof. Dr. André Ferreira Leite pela amizade e por sua boa disposição em colaborar com meu trabalho e esclarecer minhas dúvidas sempre que o procurei;

Aos prof. Dr. Sacha pela fundamental ajuda no processo de obtenção e análise das imagens adquiridas no microtomógrafo;

Aos meus amigos Viviane Mendes, Rafael Sindeaux e Aline Portugal sempre dispostos a me ajudar. Agradeço de coração pela amizade sincera e por todo o apoio e incentivo;

Aos meus grandes amigos de infância e de sempre Darfe, Luciano, Hudson Igor, Bruno, Eduardo, Waltercides, André I, André II e Anderson agradeço o incentivo, a lealdade e a forte amizade que cultivamos;

À coordenação e aos funcionários da secretaria de pós-graduação em Ciências da Saúde pelo excelente trabalho na administração do curso;

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

Obrigado a todos que, de alguma forma, contribuíram para o sucesso deste trabalho!

*“De tudo ficaram três coisas:
A certeza de que estamos começando...
A certeza de que é preciso continuar...
A certeza de que podemos ser interrompidos
antes de terminar...
Façamos da interrupção um caminho novo...
Da queda, um passo de dança...
Do medo, uma escada...
Do sonho, uma ponte...
Da procura, um encontro!”*

(Fernando Sabino)

RESUMO

O câncer bucal é a neoplasia mais freqüente entre as de cabeça e pescoço e representa cerca de um terço de todas essas neoplasias. De acordo com estimativas atuais, cerca de 275.000 novos casos de câncer bucal são diagnosticados ao ano em uma escala mundial. Além dessa elevada incidência, aproximadamente 145.000 mortes por ano são causadas por essa doença, dos quais dois terços ocorrem em países em desenvolvimento. Os tratamentos mais utilizados para esses tumores são cirurgia, radioterapia, quimioterapia, ou uma combinação dessas modalidades terapêuticas. Devido ao grande comprometimento estrutural, funcional e estético que os tratamentos convencionais ocasionam, muitos estudos buscam novas metodologias para substituir ou auxiliar o tratamento do câncer de boca. A terapia fotodinâmica (TFD) é uma nova e promissora modalidade de tratamento do câncer que já vem sendo utilizada clinicamente com sucesso. Tendo como base o cenário atual das possibilidades terapêuticas para o tratamento das neoplasias bucais, o presente estudo teve como objetivo avaliar a efetividade da Terapia Fotodinâmica mediada pela Alumínio-Cloro-Ftalocianina (AICIFt) em formulação lipossomal na remissão de tumores. Para isso, foram induzidos tumores nas línguas de camundongos Balb-c por meio de injeções de células derivadas do tumor ascítico de Ehrlich. Após 48 horas da indução tumoral, os animais foram submetidos à TFD e a efetividade dessa terapia foi determinada pela análise clínica e histopatológica dos tumores. Essas análises mostraram que 100% dos animais tratados com a TFD apresentaram remissão completa dos tumores inicialmente induzidos. As análises histopatológicas mostraram que a TFD atua na destruição tumoral pela indução de citotoxicidade, o que leva a um intenso processo de necrose. Esse processo de necrose eliminou as células tumorais, mas também ocasionou degeneração do tecido muscular adjacente. Contudo, 21 dias após o término da TFD foi possível observar um processo de cicatrização, com a substituição do tecido muscular por tecido conjuntivo. Desta forma, a Terapia Fotodinâmica foi eficaz na remissão completa dos tumores induzidos nas línguas de camundongos Balb-c a partir de suspensões celulares do tumor ascítico de Ehrlich. Esses resultados indicam

excelentes perspectivas para a utilização da TFD mediada pela AICIFt em formulação lipossomal em ensaios clínicos posteriores.

Palavras-chave: Terapia Fotodinâmica (TFD); Câncer bucal; Alumínio-clorofalocianina (AICIFt); Necrose.

ABSTRACT

Oral cancer is the most frequent among the head and neck cancer; it represents one third of this type of pathology. Indeed, about 275.000 new cases of cancer of the oral cavity are being diagnosed every year resulting in 145.000 deaths per year; two thirds of it are found in less developed countries. The treatment of oral cavity cancer consists of surgery, and a combination of radio and chemotherapy. These treatments inevitably carry structural, functional, and esthetic compromising to patients. Therefore there is a need to study methods and ways to cope with the innumerable side effects and sequels of oral cancer treatments. Photodynamic therapy (PDT) is a new method with that has been utilized with promising clinical results. Therefore we studied the efficacy of PDT, mediated by Aluminium-Chloro-Ftalocianin in a liposome formulation, on tumor remission. Lingual tumors were induced in Balb-c mice with ascitic-derived Ehrlich cells; after 48 hours, the animals were treated with PDT and were evaluated both clinically and histopathologically. 100% of the PDT treated mice showed complete tumor remission; histopathology PDT acts through cytotoxicity which elicits an intense necrosis that destroys tumoral cells and some adjacent muscular tissue. Nevertheless, 21 days after PDT treatment there was indication of tissue regeneration with the replacement of muscle tissue by connective tissue. Thus, photodynamic therapy was effective in complete remission of tumors induced in the languages of Balb-c mice from cell suspensions of Ehrlich ascites tumor. These results encourage further studies of PDT in AICIFt liposome formulation to be used in clinical assays.

Keywords: Photodynamic therapy (PDT); Oral cancer; Aluminium-Chloro-Ftalocianin; Necrosis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Diagrama esquemático dos fatores que influenciam o funcionamento mandibular após os tratamentos tradicionais para o câncer de boca.

Figura 2. Mecanismo de ação da terapia fotodinâmica (TFD).

Figura 3. Representação esquemática do diagrama de Jablonski na Terapia Fotodinâmica.

Figura 4. Desenho experimental dos ensaios realizados neste trabalho.

Figura 5. Injeção intratumoral da AICIFt e posterior irradiação com laser em camundongos submetidos à TFD.

Figura 6. Espectros de absorvância da solução de AICIFt em formulação lipossomal neutra.

Figura 7. Espectros de emissão de fluorescência da solução de AICIFt em formulação lipossomal neutra.

Figura 8. Formação do oxigênio ($^1\text{O}_2$) pelo método de degradação $^1\text{O}_2$ -dependente do benzofurano.

Figura 9. Fração de internalização de lipossomos neutros contendo AICIFt em função do tempo.

Figura 10. Variação das áreas dos tumores em relação ao volume da suspensão de células tumorais.

Figura 11. Aspecto clínico dos tumores de língua após 48 horas da indução tumoral com células derivadas do tumor de Ehrlich.

Figura 12. Fotomicrografias de cortes histológicos de línguas de camundongos Balb-c. Aspecto histológico do tumor infiltrado entre as fibras musculares da língua de camundongos.

Figura 13. Microtomografia mostrando um corte coronal da língua de um camundongo com tumor induzido por células derivadas do tumor ascítico de Ehrlich.

Figura 14. Variação das áreas dos tumores antes e após os tratamentos.

Figura 15. Fotografias mostrando o tumor inicial após 48 horas da indução tumoral, a necrose tecidual da língua de um camundongo após a aplicação da TFD, a língua de um camundongo após regressão da necrose, a língua de camundongos do grupo controle pela vista dorsal e pela vista ventral.

Figura 16. Fotografia mostrando o aspecto macroscópico de línguas excisadas de camundongos submetidos à indução tumoral.

Figura 17. Percentual de perda de massa corporal dos diferentes grupos experimentais durante a realização dos ensaios clínicos.

Figura 18. Camundongos com tumores linguais.

Figura 19. Fotomicrografia de cortes histológicos de línguas de camundongos Balb-c com tumor presente nos grupos T2, T3 e T4.

Figura 20. Fotomicrografia de cortes histológicos de línguas de camundongos Balb-c submetidos à TFD.

Figura 21. Fotomicrografia de cortes histológicos de línguas de camundongos Balb-c.

Figura 22. Fotografia mostrando os linfonodos de um camundongo saudável, de um tratado com a terapia fotodinâmica e de outro do grupo controle.

Figura 23. Fotomicrografia de cortes histológicos de linfonodos cervicais de camundongos Balb-c

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais fotossensibilizadores utilizados clinicamente

Tabela 2. Grupos experimentais utilizados para a determinação da quantidade de células necessárias para a indução dos tumores linguais

Tabela 3. Grupos experimentais utilizados para avaliar a eficácia da Terapia Fotodinâmica na remissão de tumores induzidos na língua de camundongos Balb-c

Tabela 4. Procedimentos, soluções e tempos utilizados no processamento das peças histológicas

Tabela 5. Metodologia de coloração com os corantes Hematoxilina e Eosina

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AICIFt	Alumínio-Cloro-Ftalocianina
ANOVA	Análise de variância
CEMIB	Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica
DMEM	<i>Dulbeco's Eagle Modified Medium</i>
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ERO	Espécie reativa de oxigênio
FS	Fotossensibilizador
H&E	Hematoxilina e Eosina
HPD	Hematoporfirina
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LED	<i>Light-Emitting Diode</i>
OSCC	<i>Oral Squamous Cell Carcinoma</i>
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
pH	Potencial hidrogeniônico
TFD	Terapia fotodinâmica
UA	Unidade arbitrária
UnB	Universidade de Brasília
Unicamp	Universidade Estadual de Campinas

SUMÁRIO

1. Introdução	17
1.1. Câncer	18
1.2. Câncer bucal	21
1.3. Tratamento para o câncer bucal	23
1.4. Terapia Fotodinâmica	27
1.5. Mecanismos de ação fotoquímicos	28
1.6. Processos biológicos envolvidos na terapia fotodinâmica	31
1.7. Janela de absorção da luz para os tecidos biológicos	33
1.8. Fármacos fotossensibilizadores	35
1.9. Modelo de indução tumoral	37
2. Objetivos	39
3. Material e métodos	41
3.1. Formulação lipossomal de alumínio-cloro-ftalocianina	42
3.2. Espectros de absorbância e fluorescência da AICIFt	42
3.3. Capacidade de geração de oxigênio <i>singlet</i> pelo método de decaimento de benzofurano	43
3.4. Fonte de luz	43
3.5. Desenho experimental	44
3.6. Experimentos <i>in vitro</i>	45
3.6.1. Linhagem celular	45
3.6.2. Cultura de células	45
3.6.3. Determinação do perfil de internalização da AICIFt em formulação lipossomal pelas células OSCC-3	46
3.7. Experimentos <i>in vivo</i>	47
3.7.1. Modelo animal	47
3.7.2. Manutenção da linhagem de células do tumor de Ehrlich	48
3.7.3. Modelo de indução de tumores de língua a partir de células derivadas do tumor ascítico de Ehrlich	48

3.7.4. Microtomografias dos tumores induzidos na língua dos camundongos Balb-c	49
3.7.5. Terapia Fotodinâmica	50
3.8. Processamento histológico	52
3.9. Processo de coloração para microscopia de luz	53
3.10. Análise estatística	55
3.11. Aprovação do projeto pelo comitê de ética	55
4. Resultados	56
4.1. Caracterizações fotofísicas das amostras lipossomais de Alumínio-Cloro-Ftalocianina	57
4.2. Ensaio biológico <i>in vitro</i>	60
4.2.1. Determinação do perfil de internalização da AICIFt em formulação lipossomal pelas células OSCC-3	60
4.3. Resultados dos experimentos <i>in vivo</i>	61
4.3.1. Modelo de indução de tumores de língua a partir de células derivadas do tumor ascítico de Ehrlich	61
4.3.2. Microtomografias dos tumores induzidos na língua dos camundongos Balb-c	63
4.3.3. Terapia Fotodinâmica	64
4.3.3.1. Avaliação clínica	64
4.3.3.2. Avaliação Histopatológica	69
5. Discussão	76
6. Conclusões	87
7. Referências Bibliográficas	89
8. Anexos	106

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER

A integração harmoniosa dos vários processos envolvidos na proliferação e na diferenciação das células é indispensável para garantir o desenvolvimento e a manutenção do organismo. O rompimento dessa integração, portanto, pode resultar em uma série de doenças, entre as quais o câncer, uma denominação genérica que abrange mais de 200 tipos de doenças.

O desenvolvimento do câncer é um processo de múltiplas etapas, no qual as células sofrem profundas alterações metabólicas e comportamentais, que as levam a proliferar de maneira imprópria e excessiva. As células conseguem escapar da vigilância do sistema imunológico, invadir os tecidos e formar metástases distantes dos sítios iniciais de proliferação (1).

As alterações celulares referentes ao processo de carcinogênese resultam da acumulação de defeitos nos programas genéticos que controlam a proliferação celular, o ciclo de vida, as interações com as células vizinhas e a capacidade de burlar o sistema imune. Este processo implica na formação de uma massa de células desreguladas com a propriedade de passarem despercebidas pelos mecanismos que controlam o crescimento celular normal. Essa massa tumoral pode ser assintomática por um longo tempo, mas, com o progresso da lesão, ela altera funções fisiológicas do paciente e origina vários sintomas, que dependem da localização, do tamanho do tumor e da disseminação de células neoplásicas no organismo (2).

Estudos experimentais recentes relatam ser necessário um número mínimo de passos para o desenvolvimento de uma célula totalmente neoplásica. Deste

modo, três regras fundamentais devem ser violadas para que uma célula adquira características integralmente tumorais (3).

De acordo com a primeira regra, as células devem se dividir somente quando recebem sinais adequados. A maioria desses sinais, ou cascatas, funciona de forma combinada para garantir que a proliferação ocorra corretamente. Vale ressaltar que os diferentes tipos celulares utilizam diferentes combinações de circuitos de sinalização para regular o seu crescimento e proliferação. Entretanto, as células cancerígenas proliferam mesmo na ausência de sinais, pois descobrem formas de efetuar modificações, relativamente minoritárias, na maquinaria de controle intracelular (2, 4).

A segunda regra determina que as células devem ativar programas de autodestruição quando se encontram em situações de estresse impróprias para a replicação do DNA. Isso impede a replicação de células com genes que possam estar alterados e não permite que erros de replicação prossigam para as novas células. Para contornar esses programas de autodestruição, a célula tem que burlar os mecanismos de regulação da proliferação celular e interromper a segurança do organismo, que normalmente impede a divisão celular aberrante ou excessiva. Esses mecanismos de regulação da proliferação celular são controlados por dois genes principais, o RB1, também chamado de gene do retinoblastoma, e o TP53, cuja proteína é um sensor de estresse que impede a divisão das células quando seu ambiente é alterado. Quando estes mecanismos de regulação são removidos, as células continuam a se dividir sem que exista uma ordem para que parem a proliferação. Além disso, sem os mecanismos de controle do ciclo celular as vias de indução da apoptose também não são ativadas, o que permite a formação de uma massa de células de crescimento constante e desregulado (2, 4).

A regra número três determina que a maioria das células somáticas humanas pode se dividir apenas um número limitado de vezes. Para isso, existem mecanismos reguladores da divisão celular que impedem a replicação do DNA além de certo número de ciclos celulares. Um desses mecanismos envolve uma estrutura funcional localizada no final de cada cromossomo denominada de telômero. Os telômeros constituem curtas repetições de seqüências específicas de DNA localizadas na extremidade dos cromossomos que lhes confere proteção. A cada

ciclo de replicação celular, os telômeros perdem parte de sua seqüência de DNA, o que diminui sua capacidade de proteger os cromossomos. Com o tempo, os telômeros são totalmente perdidos e as deleções podem afetar regiões codificantes. Esse encurtamento progressivo dos cromossomos é considerado um dos fatores que limita ou impossibilita a divisão celular contínua e está associado ao processo normal de envelhecimento celular ou senescência. Nas células neoplásicas, a ativação de uma enzima chamada telomerase permite a adição de novas repetições no final dos cromossomos, o que dá às células a capacidade de se dividir sem limites e as torna imortais (4, 5).

Driblar as três regras fundamentais no controle da proliferação celular pode ser suficiente para que uma célula adquira características tumorais. Entretanto, ao nível molecular este processo é bastante complexo. Consideradas isoladamente, cada uma dessas mudanças pode perturbar a função celular normal e conduzir a célula para a apoptose. Assim, o problema central de uma célula em processo de transformação neoplásica é poder conduzir todas essas alterações moleculares de forma coordenada.

Quando uma célula no meio de uma grande população de células consegue sustentar uma mutação inicial, ela adquire uma vantagem proliferativa e/ou de sobrevivência comparada com as demais células que não possuem essa mutação. Com o tempo, os descendentes clonais dessa célula mutante dominam uma área localizada e deslocam as células que não possuem tal mutação, o que resulta na primeira expansão clonal. Quando esse clone se expande para um tamanho grande o suficiente (10^6 células) a ocorrência de uma segunda mutação ocorre, o que resulta em células com mais vantagens de proliferação e/ou sobrevivência. Assim, forma-se uma vez uma ampla população descendente e esse processo ocorre sucessivamente até a formação de uma massa de células com inúmeras mutações e grande potencial proliferativo denominada câncer (6, 7).

O câncer é hoje um dos principais problemas de saúde pública mundial. Dados epidemiológicos mostram que as neoplasias malignas são responsáveis por cerca de um oitavo do total de mortes no mundo. Vale ressaltar que nem todos os pacientes com diagnóstico de câncer morrem por causas relacionadas à doença, o que eleva ainda mais a incidência dessa doença. O câncer é hoje um dos principais

problemas de saúde pública mundial. Dados epidemiológicos apontam as neoplasias malignas como responsáveis por cerca de um oitavo do total de mortes no mundo, considerando-se todas as causas de morte. De acordo com o relatório da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC)/OMS (World Cancer Report 2008), o impacto global do câncer mais que dobrou em 30 anos. Atualmente, é uma das causas mais comuns de morbidade e mortalidade, apresenta cerca de 12,4 milhões de novos casos e mais de 7,5 milhões de mortes por ano no mundo. Mais de 20 milhões de pessoas no mundo vivem com um diagnóstico de câncer e mais da metade de todos os casos de câncer ocorrem nos países em desenvolvimento. O contínuo crescimento populacional, bem como o seu envelhecimento, afetará de forma significativa o impacto do câncer no mundo. Esse impacto recairá principalmente sobre os países de médio e baixo desenvolvimento. A IARC/OMS estimou que metade dos casos novos e cerca de dois terços dos óbitos por câncer ocorrerão nessas localidades (8).

1.2 CÂNCER BUCAL

Dentre os diversos tipos de câncer destaca-se o câncer de boca. Este está catalogado na Classificação Internacional de Doenças [CID-O-3] no grupo compreendido entre C00 e C08 (9). O câncer bucal refere-se a um subgrupo de tumores de cabeça e pescoço que se desenvolvem nos lábios, língua, glândulas salivares, gengivas, assoalho da boca, palato duro, mucosa bucal e outras localidades intra-bucais (10).

O câncer de boca é a neoplasia mais freqüente entre as de cabeça e pescoço e representa cerca de um terço de todas essas neoplasias. De acordo com estimativas atuais, cerca de 275.000 novos casos de câncer bucal são diagnosticados ao ano em uma escala mundial (11, 12). Além dessa elevada incidência, aproximadamente 145.000 mortes por ano são causadas por essa

doença dos quais dois terços ocorrem em países em desenvolvimento (13). A incidência de câncer bucal na América Latina, por exemplo, é de aproximadamente 4,6% da população (14).

No Brasil, segundo as estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA), são diagnosticados mais de 14.000 novos casos de câncer de boca por ano. Ainda segundo o INCA, essa neoplasia é a quinta mais incidente entre os homens e a sexta entre as mulheres (15). Vale ressaltar que no Brasil, a população masculina tem o terceiro maior risco do mundo para o desenvolvimento do câncer de boca ficando atrás apenas da França e da Índia (12).

Aproximadamente 80% das neoplasias bucais são atribuíveis a influências ambientais, principalmente aquelas relacionadas ao estilo de vida. Os principais fatores de risco relacionados ao câncer de boca são o consumo excessivo de tabaco e de álcool, independentemente do tipo de bebida alcoólica, do tipo de tabaco ou da sua forma de uso. Além disso, a literatura descreve uma associação sinérgica bem definida do uso conjunto dessas duas substâncias no processo de carcinogênese bucal (11, 16). Outros fatores como a exposição à radiação ultravioleta, a composição da dieta, infecções virais, fatores hereditários e as desigualdades sociais são também apresentados na literatura como potenciais fatores de risco para o desenvolvimento de neoplasias bucais (17-22). Desse modo, as diferenças de incidência de tumores bucais nas diferentes populações podem estar diretamente relacionadas aos diferentes graus de exposição aos fatores de risco por esses grupos (14). Vale ressaltar que, na maioria dos países, o câncer bucal é mais comum em homens do que em mulheres. Essa maior prevalência de homens com tumores bucais em relação às mulheres deriva muito provavelmente da maior exposição a fatores de risco para o câncer bucal por essa população (23, 24). Entretanto, a proporção de homens para mulheres diagnosticados com câncer bucal tem diminuído nas últimas décadas e atualmente apresenta uma proporção de 1,5:1 (25).

Dentre as lesões malignas localizadas na cavidade bucal, os carcinomas espinocelulares são os mais freqüentes e representam cerca de 90% dessas lesões. Os carcinomas espinocelulares são de origem epitelial e podem ser identificados e tratados com maior facilidade em suas fases iniciais de desenvolvimento. O

diagnóstico precoce desses tumores pode ser realizado com certa facilidade devido à acessibilidade da cavidade bucal para o exame clínico. Entretanto, a grande maioria dos tumores de boca é diagnosticada em fase avançada, o que contribui para uma taxa de sobrevida de apenas cinco anos. Mesmo nos países desenvolvidos essas taxas não melhoraram nas últimas décadas quando comparadas com outros tipos de câncer (26, 27).

1.3 TRATAMENTO PARA O CÂNCER BUCAL

Apesar de o câncer bucal representar um terço de todos os tumores malignos da região de cabeça e pescoço, as suas opções de tratamento não se mostraram diferentes nas últimas três décadas. Contudo, durante esse tempo ocorreu uma explosão no conhecimento sobre os diferentes aspectos do câncer bucal. Apesar desta evolução, a sobrevida dos pacientes diagnosticados com essa doença tem avançado pouco. Atualmente a sobrevida para o câncer bucal é de cinco anos em uma escala mundial. Essa taxa de sobrevida de cinco anos é observada em 80% dos pacientes tratados na fase inicial da doença, em 40% quando a doença atingiu os linfonodos cervicais e em menos de 20% dos pacientes acometidos por metástases distantes (27, 28).

O tratamento do câncer da cavidade bucal visa erradicar a massa tumoral, preservar ou restaurar a forma e a função do sistema estomatognático, minimizar as seqüelas do tratamento e, finalmente, evitar qualquer recidiva ou novo câncer primário subsequente. Para atingir estes objetivos, as modalidades terapêuticas atualmente disponíveis incluem cirurgia, radioterapia e quimioterapia (10). Existem também os tratamentos combinados entre essas terapias e as estratégias primárias e secundárias de prevenção, tais como mudanças de estilo de vida e quimioprevenção (29, 30). A escolha do tratamento inicial está relacionada às características do tumor primário, ao paciente e à equipe de tratamento. A decisão

pela modalidade terapêutica ideal deve considerar estes três conjuntos de parâmetros no planejamento do tratamento inicial (10).

Os fatores relacionados ao tumor que afetam a escolha do tratamento inicial para o câncer bucal incluem: a) o sítio primário; b) o tamanho, estadiamento tumoral; c) a localização, região anterior ou posterior; d) a proximidade ao osso, mandíbula ou maxila; e) o envolvimento das cadeias linfáticas cervicais; f) o tratamento prévio; g) o subtipo histológico da lesão, tipo, grau e profundidade da invasão tumoral (10, 27, 28, 31, 32).

As características do paciente também são decisivas na definição do tratamento inicial para o câncer bucal. Entre as mais relevantes podem ser citadas a idade (19), a condição médica geral, a tolerância e a aceitação do paciente ao tratamento (33), além do estilo de vida, como a ocupação do paciente (8, 17, 34, 35), os fatores dietéticos (18, 20, 36), o tabagismo e o etilismo (16, 25, 37).

A gestão do tratamento do câncer bucal exige o apoio de centros especializados, com equipes multidisciplinares bem capacitadas e materiais técnicos de suporte adequados. Sendo assim, a equipe hospitalar também é importante na escolha do tratamento inicial das neoplasias bucais. Especialistas em várias áreas do conhecimento, tais como cirurgia, radioterapia e quimioterapia, serviços de reabilitação, controle e acompanhamento odontológico, além de rigoroso apoio psico-social são determinantes para alcançar o sucesso como resultado do programa terapêutico (10, 32).

O tratamento cirúrgico é a opção de escolha para os casos de carcinoma espinocelular em estágios iniciais, porém, em estágios mais avançados destas lesões, é recomendada a utilização adjuvante de radioterapia e/ou quimioterapia (38). Os resultados obtidos por estes tratamentos indicam índices de cura entre 80 e 90% para os tumores em fase inicial de progressão. No entanto, apesar de proporcionarem um bom prognóstico, essas terapias ocasionam complicações pós-tratamento que podem afetar a estética e a função das regiões adjacentes à lesão tumoral e diminuir fortemente a qualidade de vida dos pacientes (29).

Mesmo com os procedimentos mais modernos de reconstrução cirúrgica, os tratamentos atuais para os tumores de cabeça e pescoço remetem a uma série de

efeitos colaterais diretamente relacionados à qualidade de vida dos pacientes. Esses efeitos colaterais são devidos às alterações, muitas vezes irreversíveis, em estruturas responsáveis pelas funções básicas da fala, mastigação, deglutição e respiração. Além disso, as regiões da cabeça e do pescoço, principalmente a região maxilo-mandibular, são muito perceptíveis do ponto de vista estético. Deste modo, defeitos estruturais nessas regiões promovem grandes complicações nas interações sociais e de auto-imagem (31). Nesses casos, alterações psicológicas e emocionais graves podem alterar a qualidade de vida dos pacientes tratados, afetando até mesmo o seu grau de recuperação (26). Os tratamentos, portanto, não devem buscar somente a cura da lesão neoplásica, mas a cura associada com o menor grau de morbidade funcional e estética possível.

Após o tratamento do câncer bucal, vários sintomas relacionados ao sistema estomatognático podem ser relatados pelos pacientes. Além da mutilação facial proveniente das ressecções cirúrgicas, as complicações mais frequentes relacionadas à radioterapia são: mucosite, candidose, infecções, xerostomia, cárie de radiação, disfagia, perda do paladar, trismo muscular, alterações vasculares e osteorradionecrose (39).

A Figura 1 ilustra diversos fatores que influenciam o funcionamento mandibular após os tratamentos tradicionais para o câncer de boca. A limitação da abertura bucal, por exemplo, afeta a função mandibular, prejudica a mastigação, a deglutição, a fala, a higiene bucal e até mesmo as avaliações odontológicas (40).

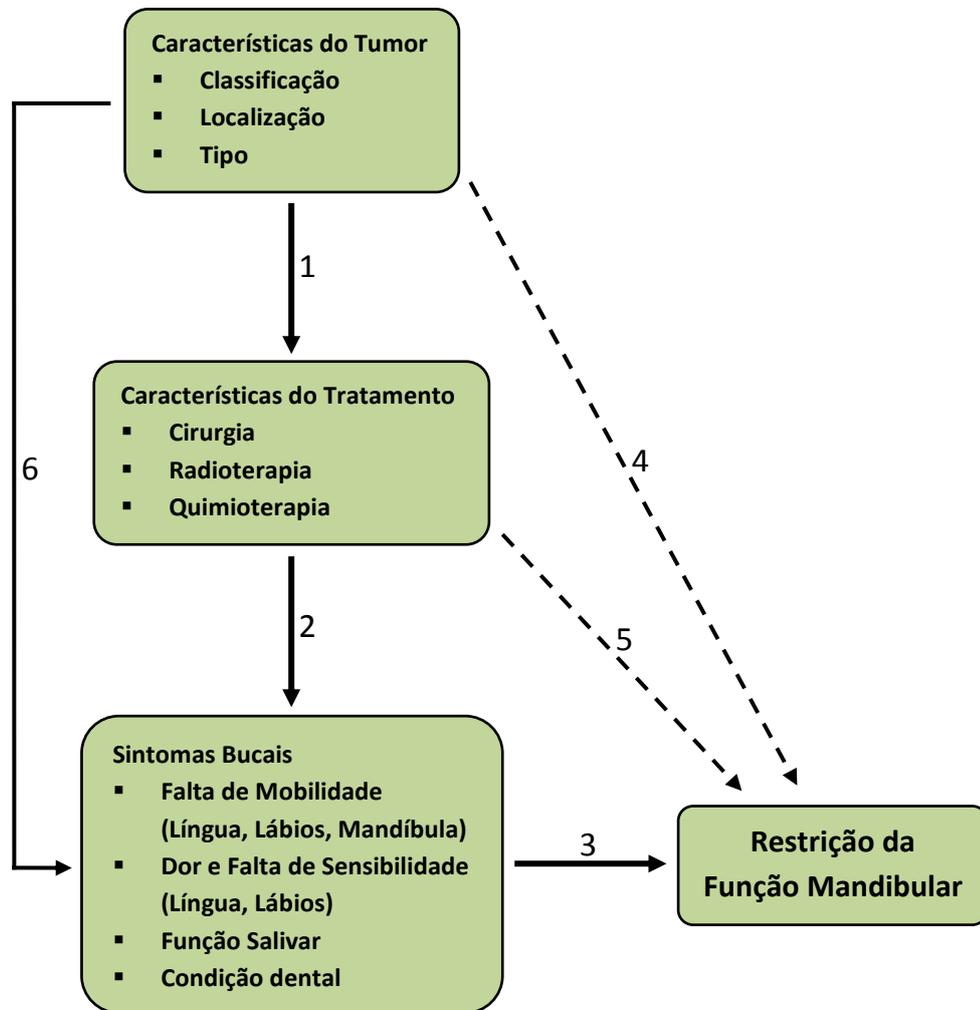


Figura 1. Diagrama esquemático dos fatores que influenciam o funcionamento mandibular após os tratamentos tradicionais para o câncer de boca. (1) Características do tumor que determinam as modalidades terapêuticas (cirurgia, radioterapia e/ou quimioterapia); (2) os tratamentos para o câncer bucal podem provocar efeitos adversos que levam aos sintomas bucais; (3) os sintomas bucais podem resultar em restrições do funcionamento mandibular; (4,5) algumas características do tumor ou do tratamento podem influenciar diretamente o funcionamento mandibular sem apresentar sintomas bucais; (6) as características do tumor podem induzir sintomas bucais diretamente. Adaptado de Kamstra e cols. (40).

1.4 TERAPIA FOTODINÂMICA

Todas as terapias utilizadas no tratamento do câncer têm mostrado eficiência, principalmente quando a doença é detectada nos seus estágios iniciais. Apesar desse sucesso, ainda existem inúmeros casos nos quais as técnicas convencionais se mostram bastante limitadas. Para muitos casos, a única opção tem sido a cirurgia radical, que compromete a função e a anatomia do órgão ou região residual. Isto mostra que o tratamento oncológico ainda tem espaço para muito desenvolvimento e inovação.

Atualmente, muitos grupos de pesquisa têm realizado esforços no sentido de desenvolver e implementar novas técnicas que possam ser empregadas nos tratamentos oncológicos. Uma destas novas modalidades é denominada de Terapia Fotodinâmica (TFD). Esta é uma alternativa de tratamento que cresceu de forma significativa nos últimos anos.

A vantagem da TFD sobre as modalidades convencionais de tratamento para o câncer está relacionada à seletividade dessa nova terapia pelo tecido tumoral. Os fármacos utilizados na TFD têm afinidade pelas células tumorais, o que resulta na destruição seletiva dos tumores e na preservação do tecido normal adjacente. Esta vantagem tem grande importância para as neoplasias da cavidade bucal porque as seqüelas dos procedimentos cirúrgicos e radioterápicos afetam as estruturas responsáveis pelas funções da fala, mastigação, deglutição e respiração (41).

Por se tratar de uma modalidade terapêutica minimamente invasiva, o custo operacional da TFD é significativamente inferior aos tratamentos tradicionais como a cirurgia, a radioterapia e a quimioterapia (42, 43). Além disso, em casos mais avançados de progressão do câncer bucal, a cirurgia, a radiação ionizante ou a quimioterapia não impedem o uso da TFD como terapia coadjuvante. Ao contrário da radiação ionizante, vários tratamentos com a TFD podem ser realizados por tempo indeterminado (42, 44).

1.5 MECANISMOS DE AÇÃO FOTOQUÍMICOS

O princípio da Terapia Fotodinâmica baseia-se na utilização de dois componentes individualmente não-tóxicos que são combinados para induzir efeitos celulares e teciduais de forma dependente de oxigênio (Figura 2). O primeiro componente da TFD é o fotossensibilizador (FS), uma molécula fotossensível que se localiza preferencialmente em células neoplásicas. O segundo componente consiste em uma fonte de luz (laser ou diodos emissores de luz – LED) de comprimento de onda específico que ativa o FS. O fotossensibilizador, então, transfere a energia proveniente da luz ao oxigênio molecular gerando espécies reativas de oxigênio (ERO), que são altamente reativas e ocasionam toxicidade celular. Estas reações ocorrem nas localidades imediatas do fotossensibilizador que absorveu a luz. Portanto, as respostas biológicas ao fotossensibilizador são ativadas somente em áreas específicas de tecido que foram expostas à luz (45).

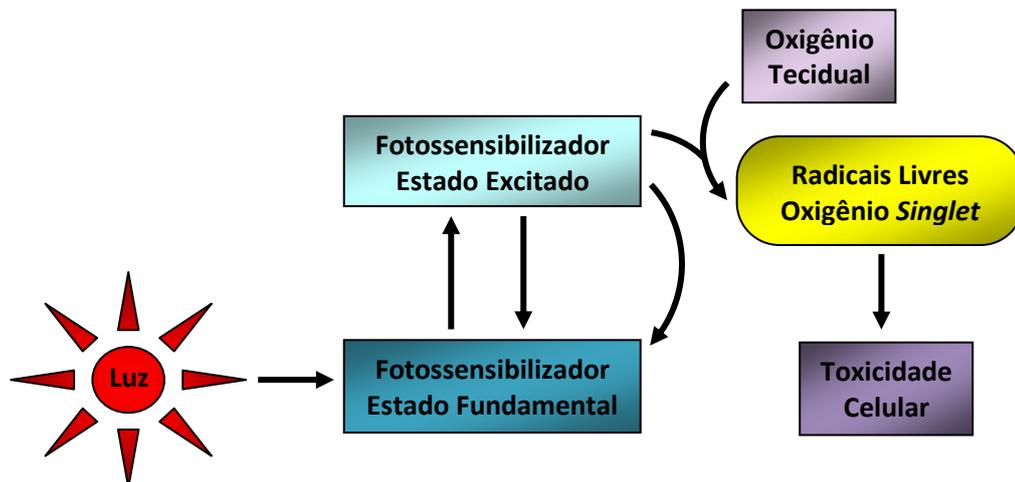


Figura 2. Mecanismo de ação da Terapia Fotodinâmica (TFD). A TFD utiliza três elementos básicos em seu mecanismo de ação: a luz, um fotossensibilizador e o oxigênio. Quando o fotossensibilizador é exposto à luz de comprimentos de onda específicos, ele é ativado para um estado excitado. Como o FS tende a retornar ao estado fundamental, ele acaba liberando energia que é transferida para o oxigênio formando as espécies reativas de oxigênio (ERO), tais como o oxigênio *singlet* e radicais livres. Estas ERO são altamente reativas e ocasionam toxicidade celular. Adaptado de Dolmans e cols. (45).

O efeito fotodinâmico pode ser demonstrado por meio de dois mecanismos denominados Tipo I e Tipo II. Os processos envolvidos em ambos os mecanismos estão resumidos na Figura 3 pelo diagrama de Jablonski (46, 47).

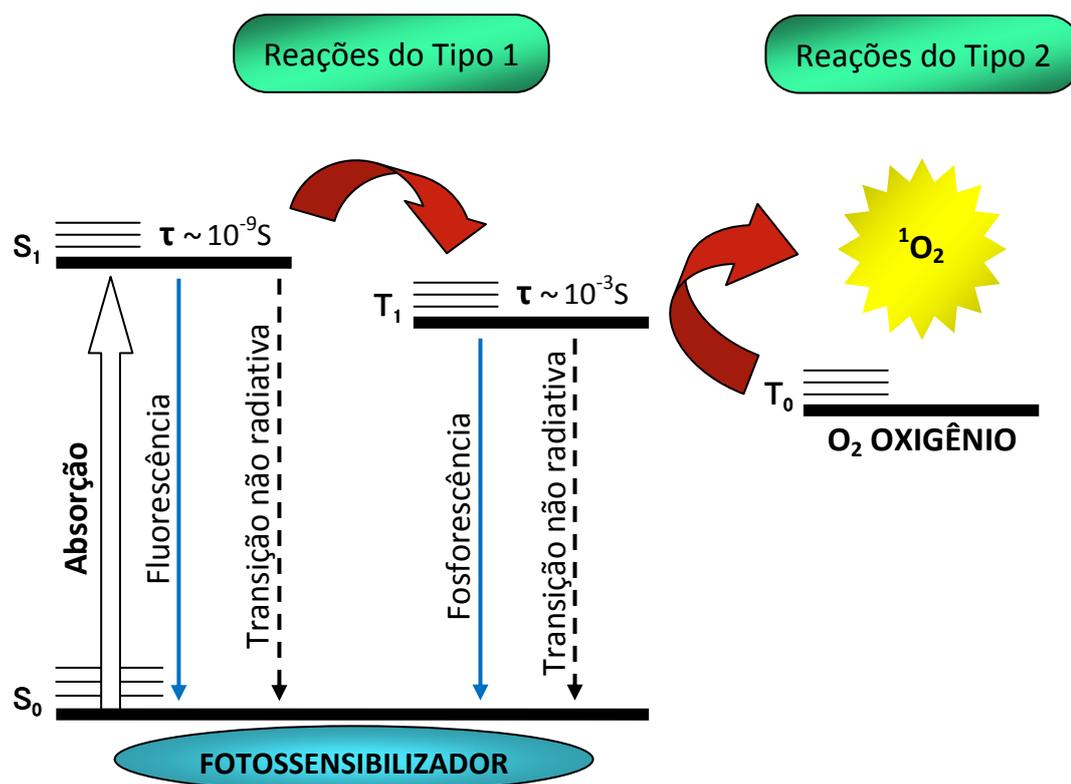


Figura 3. Representação esquemática do diagrama de Jablonski na Terapia Fotodinâmica. Após a absorção da luz, o fotossensibilizador (FS) é transformado a partir de seu estado fundamental (S_0) para um estado excitado (S_1). Na reação do Tipo I o FS excitado pode reagir diretamente com o substrato, como a membrana da célula ou uma molécula, transferindo um átomo de hidrogênio para formar radicais livres. Na reação do Tipo II o FS excitado pode transferir sua energia diretamente para o oxigênio, formando o oxigênio *singlet* (1O_2), uma espécie de oxigênio altamente reativa capaz de oxidar vários substratos.

Após absorver um fóton, a molécula do FS passa do estado fundamental (S_0) para o estado excitado *singlet* (S_1). Neste estado excitado o FS pode retornar ao estado fundamental emitindo um fóton de energia por meio de processos radiativos (fluorescência) e não-radiativos. O FS no estado excitado pode, ainda, inverter seu *spin* espontaneamente por meio do processo de cruzamento entre sistemas e passar do estado S_1 para o estado excitado *triplet* (T_1). Uma vez formado, o T_1

pode sofrer decaimento para o estado fundamental por processos radiativos (fosforescência) e não-radiativos (45).

O mecanismo Tipo I envolve a participação do FS em reações de transferência de elétrons entre a molécula do FS no seu estado excitado S1 ou T1 e o substrato. Esse processo resulta na formação de íons radicais que tendem a reagir instantaneamente com o oxigênio molecular e produzir uma mistura de intermediários de oxigênio altamente reativos como o radical superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila ($\bullet\text{OH}$), capazes de oxidar uma grande variedade de biomoléculas (45, 48).

O mecanismo do Tipo II caracteriza-se por apresentar reações de transferência de energia entre o FS no estado T1 e o oxigênio molecular, cujo estado fundamental também é *triplet* (T_0). Estas reações levam à formação de oxigênio *singlet* ($^1\text{O}_2$), uma espécie capaz de oxidar prontamente os constituintes e organelas celulares, o que resulta na morte das células cancerígenas(45).

Os dois mecanismos podem ocorrer simultaneamente, sendo que a proporção entre eles é altamente influenciada pelo FS, pelo substrato, pela concentração de oxigênio e pela ligação do FS com o substrato. No entanto, o mecanismo Tipo II aparenta ser mais eficiente porque possui maiores constantes de velocidade quando comparado às constantes de velocidade das reações de transferência de cargas (mecanismo Tipo I). Conseqüentemente, a energia transferida para outros compostos que possam competir com o oxigênio deve ter menor importância e, dessa forma, o mecanismo Tipo II acontece mais comumente (45, 49).

O oxigênio *singlet* produzido por uma reação fotoquímica é uma espécie altamente reativa de caráter eletrofílico. Essa forma reativa de oxigênio é capaz de induzir a oxidação de organelas celulares - as proteínas e os lipídios insaturados são seus principais alvos - o que resulta em danos irreversíveis às organelas celulares e na morte das células cancerígenas. Esta ERO também pode causar danos à vascularização do tumor, o que resulta na morte das células tumorais por hipóxia ou inanição e caracteriza uma forma indireta de morte celular tumoral induzida pela TFD (50, 51).

Por ser altamente reativo, o oxigênio *singlet* possui um curto tempo de vida nos sistemas biológicos ($<0,04\mu\text{s}$) e um potencial de difusão com um raio de ação bastante pequeno ($0,02\mu\text{m}$). O dano tecidual decorrente do tratamento fotodinâmico fica, portanto, restrito às células cancerígenas e à profundidade de penetração da luz utilizada para ativar o fotossensibilizador. Esse processo representa um grande diferencial comparado às outras terapias tradicionais de tratamento do câncer. Além de matar as células diretamente, os danos causados à membrana celular pela TFD podem induzir a liberação de mediadores inflamatórios e imunológicos, que iniciam uma cascata de eventos responsável pela morte celular de várias outras células tumorais (49).

1.6 PROCESSOS BIOLÓGICOS ENVOLVIDOS NA TERAPIA FOTODINÂMICA

Os efeitos anti-tumorais da TFD são multifatoriais e incluem três mecanismos distintos que contribuem para a destruição eficiente das células tumorais. No primeiro mecanismo, as ERO que são geradas pela TFD atuam diretamente na morte, por apoptose ou necrose, das células tumorais, caso o FS tenha sido captado pelas células do tumor. Alternativamente, de acordo com o segundo mecanismo, a TFD também pode danificar os vasos associados ao tumor. Esses danos levam a um processo de trombose e hemorragia que, posteriormente, ocasionam a morte da massa tumoral por falta de oxigênio e de nutrientes. Por último, a inflamação aguda, com a liberação de citocinas em resposta ao estresse induzido pela TFD, leva a uma invasão de leucócitos que pode contribuir para a destruição do tumor e, dessa forma, estimular o sistema imunológico a reconhecer e destruir as células tumorais, mesmo em locais isolados. Estes três mecanismos podem se influenciar mutuamente, mas a combinação de todos estes componentes é necessária para que a terapia fotodinâmica, utilizada para a regressão tumoral completa, seja considerada ideal em longo prazo, especialmente em tumores que possam ocasionar metástases (45, 52).

Nesse contexto, a ação do oxigênio *singlet* na célula alvo é importante, pois provoca falhas na integridade de sua membrana, com alterações na permeabilidade e conseqüentemente na função de transporte entre o meio intra e extracelular. Dependendo da localização subcelular do FS ativado pela luz, diferentes organelas como mitocôndrias ou lisossomos são danificados devido ao estresse oxidativo, o que resulta em morte das células (53).

Assim, as mitocôndrias são um dos principais alvos para o desencadeamento da apoptose, um tipo de morte celular desejado nos tratamentos com a TFD (54). Os danos oxidativos gerados pelos fotossensibilizadores à membrana mitocondrial induzem a perda de potencial de membrana e o intumescimento da organela. Nesta etapa, ocorre a liberação de citocromo-c e de outros fatores para o citosol, que ativam uma cascata de enzimas cuja função é preparar a célula para a morte celular programada. Como resultado, a célula apresenta diminuição do volume celular, condensação da cromatina e formação de corpos apoptóticos, que impedem o extravasamento do conteúdo citoplasmático para o meio extracelular. Após esse processo, os corpos apoptóticos são removidos pelos macrófagos (51, 52, 55, 56).

Por outro lado, o fármaco fotossensibilizador pode danificar outras estruturas celulares específicas, como os lisossomos ou o DNA. Neste caso, ocorre a morte celular por necrose. Neste tipo de morte celular, a célula aumenta gradativamente de volume até que a membrana citoplasmática se rompa e os constituintes celulares extravasem para o meio externo. Estes eventos ocorrem em minutos e danificam as células adjacentes, o que induz uma resposta inflamatória associada a edema e rubor do tecido irradiado (51, 52, 56, 57).

Além da influência fotoquímica direta nas células neoplásicas, existem outros importantes mecanismos de controle tumoral após a TFD. Como citado anteriormente, a reação fotodinâmica também pode ocasionar danos vasculares ao tumor, que incluem destruição do endotélio, alterações de perfusão, constrição dos vasos, extravasamento de macromoléculas e adesão de leucócitos. Esses danos à microvasculatura podem levar a uma diminuição significativa no fluxo sanguíneo, bem como a uma intensa hipóxia tecidual na região do tumor (53, 58-60).

Apesar de a TFD ser planejada para eliminar a massa tumoral, é interessante que ela também desencadeie uma reação imunológica de modo a auxiliar na eliminação de células tumorais remanescentes. Diversos estudos têm demonstrado que a TFD induz a expressão de diversas citocinas como a IL6, IL10 e TNF α , além da IL1 β , IL2, fator estimulante de colônia de granulócitos e fator de crescimento epidérmico, além de induzir a expressão de vários genes envolvidos na adesão celular e na apresentação de antígenos (50, 61).

Um fator importante que contribui para o desencadeamento de uma resposta imunológica induzida pela TFD é o dano pró-inflamatório gerado tanto na membrana celular, quanto na vascularização de tumores tratados e tecidos normais. Uma grande quantidade de fragmentos celulares é gerada no local do tumor dentro de um intervalo de tempo muito curto, o que ocasiona uma rápida e massiva invasão de células inflamatórias para o local tratado. Dentre essas células que foram recrutadas para o local em resposta aos sinais inflamatórios, destacam-se os macrófagos, que asseguram o reconhecimento de epítomos específicos por linfócitos T e sua ativação subsequente (61-63).

1.7 JANELA DE ABSORÇÃO DA LUZ PARA OS TECIDOS BIOLÓGICOS

Para serem utilizados como fármacos na TFD, os fotossensibilizadores devem ter a capacidade de gerar ERO após a exposição à luz, e esta luz deve ser preferencialmente absorvida pelo FS e pouco absorvida pelos tecidos. Desta forma, o comprimento de onda da radiação luminosa incidente utilizada no procedimento de irradiação deve considerar a capacidade de penetração da luz no tecido e também os máximos de absorção de luz pelo fármaco. Assim, os FS, para serem utilizados clinicamente, devem ser ativados por uma luz com comprimento de onda que se encontre na faixa do espectro eletromagnético do vermelho e infra-vermelho próximo (600-850 nm). Nessa faixa, conhecida como “janela” de absorção luminosa, a

absorção de fótons pelas moléculas presentes nos tecidos biológicos é mínima, enquanto que a absorção pelos FS é máxima, isso promove uma adequada transferência de energia para o oxigênio tecidual e gera, assim, as espécies reativas de oxigênio (64).

Atualmente, uma grande variedade de fontes de luz pode ser utilizada no procedimento de irradiação das lesões neoplásicas durante as sessões de TFD. Dentre essas fontes se destacam os lasers (lasers pulsados de argônio, lasers de vapor de metal e os *neodymium-doped yttrium aluminium garnet* - Nd:YAG). Além dessas fontes de luz, existem outras como o filamento de tungstênio, o arco de xenônio, as lâmpadas fluorescentes, além dos LED (64-66).

Os Lasers são as fontes de luz mais comumente utilizadas devido ao seu caráter monocromático, versatilidade no ajuste da potência (dosimetria) e possibilidade de seleção do comprimento de onda da radiação incidente. Além disso, podem ser facilmente acoplados em feixes e fibras ópticas, que podem se encaixar em aberturas de endoscópios e sondas guiadas por programas computacionais associados a tomografias para conduzir a luz até aos tecidos mais profundos. Essa associação do laser com as fibras ópticas permite a utilização da TFD na eliminação de tumores localizados em áreas inacessíveis à irradiação pela luz (67).

1.8 FÁRMACOS FOTOSSENSIBILIZADORES

As vantagens da TFD quando comparada aos métodos convencionais de tratamento do câncer estão relacionadas, principalmente, a sua baixa toxicidade e a sua capacidade de destruir os tumores de forma mais seletiva, causando menos danos locais e sistêmicos. Entretanto, as vantagens dessa modalidade terapêutica são diretamente condicionadas ao fármaco utilizado como fotossensibilizador. Os FS são os principais compostos para a efetividade da TFD, pois como citado anteriormente, ao serem excitados pela luz, produzem espécies altamente reativas,

que causam danos às biomoléculas e são responsáveis pela citotoxicidade dessa terapia (68, 69).

Vários FS já foram testados clinicamente na TFD, porém os resultados ainda sugerem a necessidade de novas pesquisas com o objetivo de desenvolver FS com propriedades ideais e mais eficazes. Os pré-requisitos para um FS ideal incluem pureza química, seletividade para células tumorais, estabilidade química e física, curto intervalo de tempo entre a administração e a máxima acumulação nos tecidos tumorais, ativação em comprimentos de onda com ótima penetração nos tecidos e excreção rápida pelo organismo. Os parâmetros fotofísicos desejáveis são um alto rendimento quântico de oxigênio *singlet* como também um longo tempo de vida do estado *triplet*, pois neste caso a produção de oxigênio *singlet* é mais efetiva (68, 70).

Algumas tentativas de classificação dos FS se baseiam nos períodos em que eles foram desenvolvidos (71). Os FS de primeira geração são compostos produzidos a partir da porfirina e incluem a Hematoporfirina (HPD) e seus derivados. Esses fármacos estão associados a várias limitações, como pouca seletividade, necessidade de grandes quantidades de droga para obtenção de uma adequada eficiência e fotossensibilidade cutânea elevada, fatores que limitam suas aplicações clínicas. A segunda geração de FS foi desenvolvida com base nas supostas deficiências das drogas de primeira geração. Desse modo, esses FS são considerados eficazes geradores de oxigênio *singlet*, e possuem um pico de absorção na faixa do espectro eletromagnético de 650-800 nm. Outras vantagens são a alta seletividade para os tecidos neoplásicos e a eliminação relativamente rápida do organismo, o que conseqüentemente diminui os efeitos colaterais. Estes fármacos possuem várias estruturas, incluindo as porfirinas, as porfirinas expandidas, derivados de clorinas, como também alguns corantes (72, 73). Estranhamente, a segunda geração de FS inclui os corantes, que na realidade foram aplicados primeiro na clínica.

A terceira geração de FS contém fármacos da primeira e da segunda geração conjugados com vários modificadores biológicos, tais como anticorpos e nanopartículas. Essa classificação dos FS em gerações pode levar a um entendimento errôneo de que os FS das novas gerações são melhores do que das anteriores. Entretanto, na realidade clínica, as comparações realizadas até hoje não

comprovam que os FS de terceira geração sejam melhores do que os demais fármacos das gerações anteriores. Além disso, muitos FS de segunda e terceira geração ainda não estão disponíveis comercialmente e por esse motivo não podem ser estudados e comparados clinicamente (72).

Uma outra forma de classificar os FS tem como base a estrutura química desses fármacos. Dessa forma, os FS são distribuídos em classes conforme as semelhanças químicas de seus compostos (70). As principais classes de fotossensibilizadores utilizados clinicamente estão representadas na Tabela 1, cada uma dessas classes de fármacos apresenta diferentes propriedades fotoquímicas e fotofísicas em relação aos mecanismos de ação e ativação pela luz.

Tabela 1 – Principais fotossensibilizadores utilizados clinicamente

Classe	Fármaco	Substância
Porfirina	<i>Photofrin</i> [®] , <i>Photogem</i> [®]	HpD
Porfirina	<i>Levulan</i> [®]	ALA
Porfirina	<i>Metvix</i> [®]	M-ALA
Porfirina	<i>Hexvix</i> [®]	H-ALA
Porfirina	<i>Visudyne</i> [®]	Verteporfin
Texafirina	<i>Antrin</i> [®] , <i>Lu-Tex</i>	Lutexaphyrin
Clorina	<i>Foscan</i> [®]	Temoporfin
Clorina	<i>LS11</i> , <i>Photolon</i> [®] , <i>Litx</i> TM , <i>Apoptosin</i> TM , <i>Laserphyrin</i>	Talaporfin
Clorina	<i>Photochlor</i>	HPPH
Ftalocianina	<i>Photosens</i> [®] , <i>Pc4</i>	Ftalocianina

Adaptado de Allison e cols. (72).

Entre as diversas classes de FS destacam-se as ftalocianinas. Compostos que possuem como base uma estrutura de porfirina com, geralmente, um átomo central que pode ser de zinco, silício ou alumínio. A presença desse átomo central aumenta a produção de oxigênio *singlet* quando essas substâncias são irradiadas.

As ftalocianinas possuem fortes bandas de absorção na faixa de 670 nm, capacidade fluorescente e podem ser ativadas clinicamente a 100 J/cm^2 . Além disso, dependendo da formulação, as ftalocianinas podem ser eliminadas pelo organismo em até 24 horas, o que reduz uma possível toxicidade desse fármaco. O tratamento com esse FS geralmente é iniciado uma hora após a aplicação do fármaco que por sua vez pode ser administrado por via tópica ou em soluções injetáveis. Entretanto, a maioria dos fármacos FS, em especial os derivados de ftalocianinas, são altamente hidrofóbicos, ou seja, pouco solúveis em soluções fisiológicas aquosas, e por isso devem ser associados a uma estrutura que facilite o seu transporte no ambiente fisiológico aquoso (72).

Nesse sentido, os principais desafios a serem superados na TFD são os sistemas de entrega de drogas. Devido ao fato dos FS serem altamente hidrofóbicos, várias estratégias de encapsulamento desses fármacos foram desenvolvidas para facilitar o seu transporte até ao tecido tumoral. Vale ressaltar que um sistema de entrega de drogas ideal deve ser biodegradável, apresentar imunogenicidade mínima, incorporar o FS sem perder ou alterar as suas atividades, além de proporcionar um ambiente no qual o FS possa ser liberado em forma monomérica, ou seja, minimizar a agregação do FS, o que diminuiria o rendimento quântico de oxigênio *singlet*. Além disso, o sistema de administração deve permitir a acumulação seletiva do FS dentro do tecido tumoral em concentrações terapêuticas, com pouca ou nenhuma captação pelas células não tumorais (73).

1.9 MODELO DE INDUÇÃO TUMORAL

A avaliação da eficiência de um protocolo terapêutico para o tratamento do câncer é extremamente complexa e envolve diversas etapas até que se comprove a sua efetividade clínica. A utilização de modelos animais experimentais no desenvolvimento de protocolos terapêuticos é um dos passos fundamentais para o

estabelecimento de ensaios clínicos em seres humanos. Um modelo experimental é uma tentativa de se mimetizar o desenvolvimento e o comportamento de uma doença humana em cobaias animais. Boa parte do conhecimento sobre a biologia das neoplasias malignas foi desenvolvida a partir destes modelos experimentais. Entender os mecanismos biológicos envolvidos na progressão do câncer é fundamental para melhorar o prognóstico dos pacientes afetados, bem como para a elaboração de novos protocolos terapêuticos (74).

O tumor de Ehrlich, um adenocarcinoma mamário de desenvolvimento espontâneo em camundongos, é considerado um importante modelo de neoplasia maligna experimental, pois pode ser transplantado para outros camundongos. As células desse tumor de origem epitelial proliferam em várias linhagens de camundongos na forma ascítica, quando inoculado intraperitonealmente, e na forma sólida, quando inoculado no subcutâneo. Assim, as células do tumor de Ehrlich têm sido utilizadas para o desenvolvimento de tumores experimentais em camundongos tanto na forma ascítica quanto na forma sólida, com indução dos tumores subcutâneos ou musculares (75, 76).

A utilização de neoplasias transplantáveis, como o tumor de Ehrlich, tem como vantagem o fato de determinar a quantidade e as características iniciais das células a serem inoculadas. Além disso, quando se realiza a indução de tumores por meio do transplante de células cancerosas, o desenvolvimento da neoplasia acontece de forma mais rápida e eficaz, o que restringe o tempo de experimentação científica (76, 77).

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Diante do exposto, o objetivo deste estudo consistiu em avaliar a eficácia da Terapia Fotodinâmica mediada pela Alumínio-Cloro-Ftalocianina em formulação lipossomal na remissão de tumores de língua induzidos em modelos experimentais *in vivo*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar um modelo experimental que mimetize o câncer de boca em camundongos Balb-c utilizando células derivadas do tumor ascítico de Ehrlich;
2. Avaliar a eficácia da Terapia Fotodinâmica mediada pela Alumínio-Cloro-Ftalocianina nos modelos *in vivo* por meio da avaliação clínica e histopatológica dos tumores induzidos por injeção de células derivadas do tumor ascítico de Ehrlich na musculatura lingual;
3. Avaliar as condições de sobrevivência dos camundongos Balb-c com tumores induzidos por injeção de células derivadas do tumor ascítico de Ehrlich na musculatura lingual e submetidos à terapia fotodinâmica.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 FORMULAÇÃO LIPOSSOMAL DE ALUMÍNIO-CLORO-FTALOCIANINA

As amostras de ftalocianinas lipossomais (AICIFt – alumínio-cloro-ftalocianina), sintetizadas na concentração de 5 μM de AICIFt, utilizadas nos experimentos deste estudo foram produzidas na Universidade de São Paulo – Campus de Ribeirão Preto (USP / Ribeirão Preto) e gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Antônio Cláudio Tedesco – USP / Ribeirão Preto.

3.2 ESPECTROS DE ABSORBÂNCIA E FLUORESCÊNCIA DA ALUMÍNIO-CLORO-FTALOCIANINA

Os espectros de absorvância e fluorescência do fármaco fotossensibilizador (AICIFt) utilizado neste estudo foram obtidos em leitora de placa SpectraMax M2. As leituras desses espectros foram realizadas em cubetas de quartzo com um volume de 700 μL . O equipamento foi configurado para realizar a leitura dos espectros entre 350 e 750 nm, com intervalo de 5 nm entre um ponto e outro.

3.3 CAPACIDADE DE GERAÇÃO DE OXIGÊNIO *SINGLET* PELO MÉTODO DE DECAIMENTO DE BENZOFURANO

Com o objetivo de determinar se a AICIFt utilizada neste estudo era capaz de induzir a produção de radicais livres, foi realizado um protocolo para detecção de oxigênio *singlet* ($^1\text{O}_2$) pelo método de degradação $^1\text{O}_2$ -dependente do benzofurano. O benzofurano é um reagente que tem um pico de absorbância em 410 nm e à medida que ocorre geração de oxigênio *singlet* esta absorbância decai de forma diretamente proporcional à geração desta espécie reativa.

A capacidade de geração de $^1\text{O}_2$ do fármaco fotossensibilizador foi mensurada após este ser irradiado com laser vermelho (660 nm), em diferentes doses de energia, após a adição de 5 μL de solução de benzofurano (1,5 mg/mL, em álcool) (Sigma-Aldrich) em 700 μL do fármaco fotossensibilizador (AICIFt). Antes e após o procedimento de irradiação a absorbância em 410 nm foi avaliada em leitora de placas (Espectra M2) para detectar a geração de espécies reativas. A geração de $^1\text{O}_2$ foi expressa como porcentagem de decaimento da absorbância do benzofurano em relação ao valor de absorbância do fármaco (AICIFt + solução de benzofurano) antes das irradiações. Neste experimento, o branco utilizado consistiu apenas do fármaco fotossensibilizador.

3.4 FONTE DE LUZ

A fonte de luz utilizada neste estudo para excitar as moléculas de ftalocianinas lipossomais foi obtida por meio do Laser Diodo (*BW&F-Tech in*) em comprimento de onda de 670 nm, acoplado à fibra ótica, com potência de 80 mW.

3.5 DESENHO EXPERIMENTAL

Neste estudo foram realizados experimentos *in vitro* e *in vivo*. A figura abaixo esquematiza o desenho experimental deste estudo.

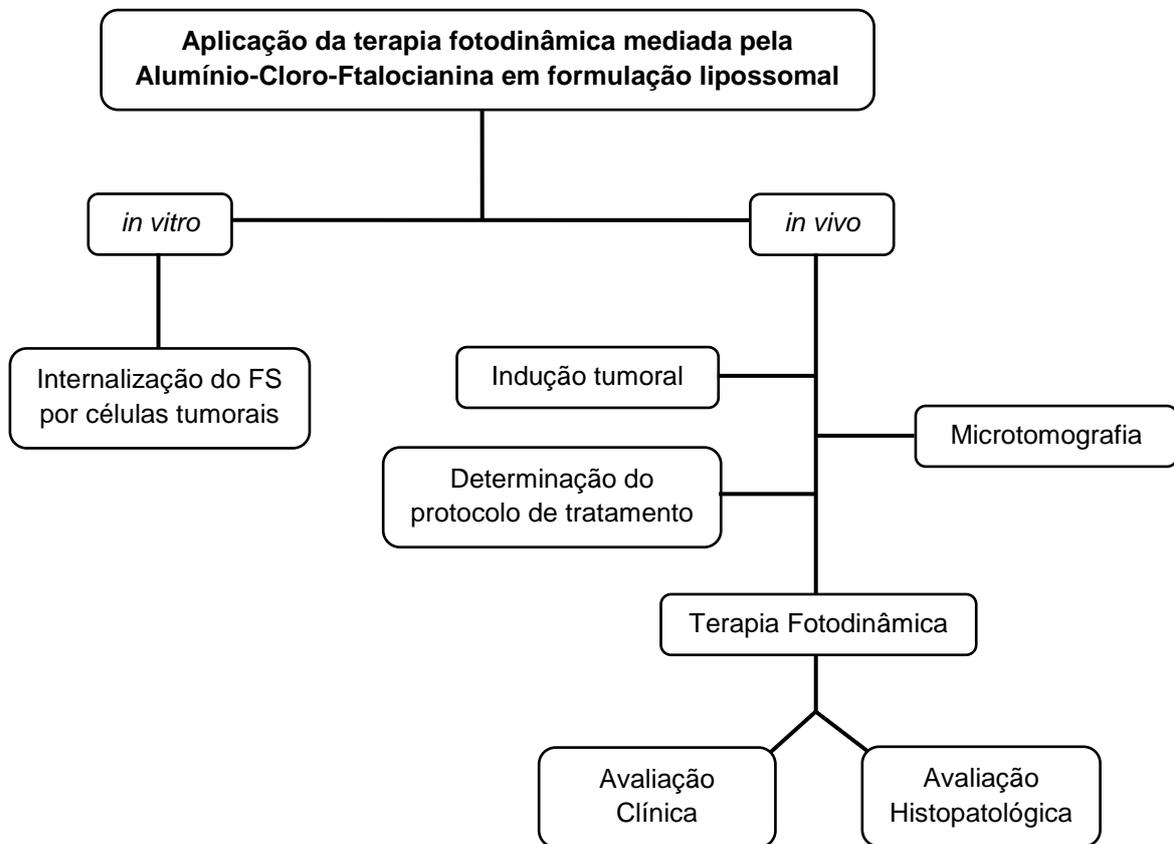


Figura 4. Desenho experimental dos ensaios realizados neste trabalho.

3.6 EXPERIMENTOS *IN VITRO*

3.6.1 Linhagem Celular

Nos experimentos *in vitro* realizados neste estudo, foi utilizada a linhagem celular OSCC-3 (*Oral Squamous Cell Carcinoma*), imortalizada em cultura a partir de um carcinoma espinocelular bucal humano. As células OSCC-3 foram generosamente cedidas pelo Professor Doutor B. J. Baum (National Institute of Health, Bethesda, USA) e mantidas no laboratório de Nanobiotecnologia do Departamento de Genética e Morfologia da Universidade de Brasília.

3.6.2 Cultura de Células

As células OSCC-3 foram mantidas em meio de cultura *DMEM* (*GIBCO-BRL*), em pH 7,4, suplementado com 10% de soro fetal bovino (*GIBCO-BRL*) e acrescido de 1% de antibióticos e antimicótico (*GIBCO-BRL* – 10.000 unidades de penicilina G sódica, 10 mg de sulfato de estreptomicina, 25 µg de anfotericina B dissolvidos em 1 mL de solução salina a 0,85%).

As culturas foram estabelecidas a partir de uma passagem inicial de 1×10^5 células em frascos de cultura de poliestireno de 25 cm² ou 2×10^5 células em frascos de 75 cm² e mantidas à 37 °C, em atmosfera de 5% de CO₂ e 80% de umidade. Para estabelecimento de subculturas, as células eram desprendidas do fundo do frasco por tratamento com solução de tripsina-EDTA contendo 2,5 g/L de tripsina

(1:250) e 0,38 g/L de EDTA em *Hank's Balanced Salt Solution* sem cloreto de cálcio, cloreto de magnésio ou sulfato de magnésio (*GIBCO-BRL*) por três minutos a 37 °C. A suspensão de células era transferida para um tubo de centrifuga contendo meio de cultura com soro fetal bovino para inativação da tripsina e, em seguida, centrifugada a 750 x *g* por cinco minutos. As células eram então contadas em câmara de *Neubauer* (*Boeco*, Germany) e repassadas para um novo frasco de cultura. Em seguida, as células eram levadas à estufa nas mesmas condições anteriormente descritas.

3.6.3 Determinação do Perfil de Internalização da AICIFt em Formulação Lipossomal pelas Células OSCC-3

De modo a determinar o tempo de internalização do fármaco fotossensibilizador (AICIFt) pelas células tumorais, antes de se iniciar a aplicação da terapia fotodinâmica foram realizados testes para traçar o perfil cinético de interação entre as vesículas lipossomais neutras e as células tumorais. Para isso, aproximadamente 1×10^5 células da linhagem celular OSCC-3 foram semeadas em cada poço de placas de cultura com 12 poços.

Depois de 24 horas, o meio de cultura foi removido e a cada poço foi adicionada uma alíquota da amostra lipossomal (300 μ L) dissolvida em meio de cultura (2 mL). As células eram expostas a AICIFt por 0, 5, 15, 30, 60 e 120 minutos. Após cada tempo de exposição, o meio de cultura contendo a amostra lipossomal dissolvida foi removido e os poços foram lavados duas vezes com solução salina tamponada com fosfato (PBS - NaCl 0,154 M; Na_2HPO_4 0,1 M; pH 7,4). As células foram então lisadas com Dimetil Sulfóxido (DMSO) para liberar a AICIFt internalizada. Após esse procedimento, 200 μ L do lisado celular foram coletados e colocados em leitora de placa (Espectra M2) de 96 poços. A quantificação da AICIFt

internalizada pelas células foi determinada por meio da fluorescência em seu maior pico de absorção (670 nm).

A porcentagem de internalização foi calculada tendo como referência a quantidade de solução lipossomal dissolvida em meio de cultura que correspondia a 100%. Assim, os valores de intensidade de fluorescência da AICIFt em relação aos diferentes tempos foram calculados a partir da quantidade inicial.

3.7 EXPERIMENTOS *IN VIVO*

3.7.1 Modelo Animal

O modelo animal utilizado neste estudo foi constituído de camundongos Balb-c machos, com 15 semanas de idade. Todos os animais foram obtidos do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp – SP, Brasil). Os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Genética e Morfologia da Universidade de Brasília, com temperatura controlada de 23°C, ciclo de claro e escuro a cada 12 horas e fornecimento de água e ração *ad libitum*.

3.7.2 Manutenção da Linhagem de Células do Tumor de Ehrlich

As células do tumor de Ehrlich crescem na forma ascítica quando inoculadas intraperitonealmente. Desta forma, a manutenção da linhagem de células do tumor de Ehrlich foi realizada a partir da inoculação intraperitoneal de 100 μL da suspensão celular desse tumor na concentração de 5×10^6 células/mL em dois camundongos Balb-c machos. Após sete dias, o tumor intraperitoneal já estava bem desenvolvido e pôde ser retirado para uma nova inoculação em outros animais. Para isso, os animais com tumor intraperitoneal eram anestesiados com a combinação de soluções de Ketamina e Xilazina em doses de 15 mg/kg e 5 mg/kg, respectivamente, e submetidos à punção abdominal para retirada das células tumorais. Após a remoção das células tumorais os animais eram sacrificados por deslocamento cervical. As células tumorais de Ehrlich eram contadas e inoculadas intraperitonealmente, na mesma concentração anteriormente descrita, em mais dois camundongos. Esse procedimento foi repetido de modo que a linhagem celular de Ehrlich fosse mantida durante todas as fases experimentais deste estudo.

3.7.3 Modelo de Indução de Tumores de Língua a partir de Células Derivadas do Tumor Ascítico de Ehrlich

De modo a determinar a quantidade de células necessárias para a indução dos tumores linguais, suspensões celulares do tumor ascítico de Ehrlich na concentração de 5×10^6 células/mL foram injetadas na borda lateral esquerda da língua de camundongos Balb-c, conforme descrito na Tabela 2. Para a realização dos experimentos e indução tumoral, os animais foram anestesiados com a

combinação de soluções de Ketamina e Xilazina em doses de 15 mg/kg e 5 mg/kg, respectivamente.

Tabela 2 - Grupos experimentais utilizados para a determinação da quantidade de células necessárias para a indução dos tumores linguais

Grupo experimental	Suspensão Celular (μL)
IA	10
IB	20
IC	50

Após 48 horas, tempo suficiente para a visualização clínica dos tumores, eles tinham seus tamanhos mensurados por meio de um paquímetro de alta precisão. Os tumores induzidos tinham tamanhos que variavam entre 2 e 8 mm. Além da determinação do tamanho dos tumores, observou-se que os animais com os maiores tumores apresentavam grandes dificuldades na alimentação.

Nesse contexto decidiu-se que os tumores seriam induzidos utilizando-se 10 μL da suspensão celular do tumor ascítico de Ehrlich na concentração de 5×10^6 células/mL, pois os animais desse grupo apresentavam os menores tumores e não tinham dificuldades para se alimentar.

3.7.4 Microtomografias dos Tumores Induzidos na Língua dos Camundongos Balb-c

Para avaliar a extensão das lesões tumorais induzidas na língua dos camundongos Balb-c, foram realizadas microtomografias computadorizadas, 48 horas após a indução tumoral. Para a realização das microtomografias, os animais (n=3) foram sacrificados por deslocamento cervical e em seguida suas línguas foram

removidas, envolvidas em filme de PVC e levadas ao microtomógrafo SkyScan MicroCT 1076 (SkyScan, Kontich, Bélgica), cujos parâmetros utilizados foram: 40 kV, 250 mA, tamanho do pixel de 18.1, filtro de Titânio de 0.025 mm e moldura em média de 4. A reconstrução das imagens foi realizada com o programa computacional NRecon software (SkyScan, Kontich, Bélgica).

3.7.5 Terapia Fotodinâmica

Após a indução tumoral, os animais (n = 30) foram divididos em cinco grupos experimentais conforme descritos na Tabela 3.

Tabela 3 – Grupos experimentais utilizados para avaliar a eficácia da Terapia Fotodinâmica na remissão de tumores induzidos na língua de camundongos Balb-c

Grupos Experimentais	Tumor Induzido	Tratamentos	
		AICIFt*	Laser**
T1	-	-	-
T2	+	-	-
T3	+	+	-
T4	+	-	+
T5	+	+	+

* Injeção intratumoral de 20 µl de solução de Alumínio-Cloro-Ftalocinina em formulação liposomal;

** aplicação do laser com comprimento de onda de 670 nm e energia total aproximada de 100 J/cm².

Os tratamentos foram iniciados 48 horas após a indução tumoral. Assim, os animais dos grupos T3 e T5 receberam uma injeção intratumoral de 20 μL de solução de Alumínio-Cloro-Ftalocinina em formulação lipossomal conforme ilustrado na Figura 5A. Os animais dos grupos T4 e T5 tiveram seus tumores irradiados com laser (Fig. 5B) cujo comprimento de onda era de 670 nm e possuía energia total aproximada de 100 J/cm^2 . Para o Grupo T5, a irradiação do tumor foi realizada 15 minutos após a injeção intratumoral do fármaco fotossensibilizador (AICIFt). O intervalo entre a injeção do fármaco e a irradiação do tumor foi determinado a partir dos dados obtidos nos estudos, *in vitro*, sobre a internalização da AICIFt. Os animais que desenvolveram tumor mas não receberam tratamento algum, Grupo T2, constituem o grupo controle positivo. O controle negativo, Grupo T1, é constituído de camundongos saudáveis, ou seja, sem tumor.

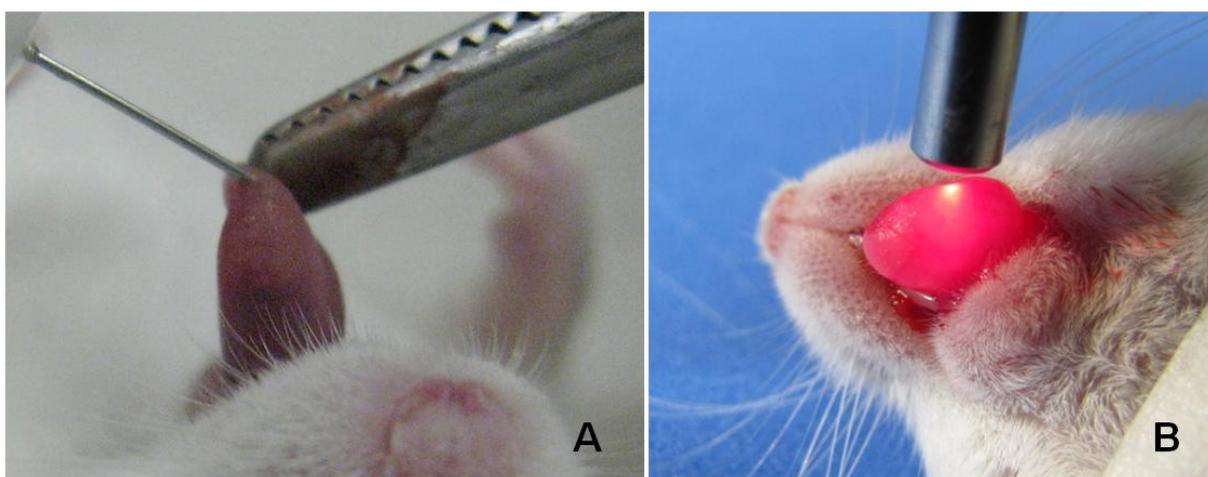


Figura 5. Injeção intratumoral da AICIFt (A) e posterior irradiação com laser (B) em camundongos submetidos à TFD.

As aplicações de fármaco e as irradiações com laser foram realizadas, para cada grupo experimental, a cada 72 horas por três vezes. O intervalo entre os tratamentos, assim como o número de tratamentos a serem realizados foi determinado a partir dos dados obtidos em ensaios prévios.

Durante todos os experimentos, os animais eram avaliados clinicamente quando se considerou a análise macroscópica dos tumores e a variação da massa corporal. Para isso, os animais foram pesados antes e ao final dos tratamentos.

Em todas as etapas experimentais, os animais eram submetidos a um protocolo anestésico com solução de Ketamina e Xilazina em doses aproximadas de 15mg/kg e 5mg/kg, respectivamente.

3.8 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

Após 24 horas do último tratamento, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical para que se efetuasse a dissecação e a remoção da língua e dos linfonodos cervicais para processamento e avaliação histopatológica. Em seguida, esses órgãos foram fixados com solução de paraformaldeído a 4% à temperatura ambiente por duas horas. Após a fixação inicial, os órgãos foram colocados em uma solução de álcool 70% e deixados à temperatura ambiente durante a noite. Foram realizadas duas trocas de álcool 70% para a retirada do excesso de paraformaldeído. Depois disso, os órgãos eram submetidos aos processos de desidratação, diafanização e inclusão em parafina conforme descrito na Tabela 4.

Tabela 4 – Procedimentos, soluções e tempos utilizados no processamento das peças histológicas

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

Depois de realizada a impregnação com parafina, os órgãos foram colocados em barras de Leuckhart com parafina derretida para a obtenção de blocos de parafina a serem usados na microtomia. Desse modo, foram realizados cortes histológicos semi-seriados com 5 µm de espessura utilizando-se um micrótomo Leica RM 2145. Os cortes foram então montados nas lâminas de microscopia e essas mantidas em estufa a 37°C durante um período mínimo de 12 horas para melhor aderência dos cortes.

3.9 PROCESSO DE COLORAÇÃO PARA MICROSCOPIA DE LUZ

Uma vez obtidos os cortes histológicos estes foram corados com Hematoxilina e Eosina (H&E) de base aquosa conforme descrito na Tabela 5.

Tabela 5 – Metodologia de coloração com os corantes Hematoxilina e Eosina

Procedimento	Solução	Tempo (segundos)
Reidratação	Xileno - 1	60
	Xileno - 2	60
	Xileno - 3	60
	Álcool 100%	60
	Álcool 90%	60
	Álcool 80%	60
	Álcool 70%	60
Coloração	Hematoxilina	40
	Água corrente	180
	Eosina	40
	Água corrente	20
Desidratação	Álcool 70%	60
	Álcool 80%	60
	Álcool 90%	60
	Xileno -1	60
	Xileno -2	60
	Xileno -3	60

Após o último banho de xileno, as lâminas foram recobertas com lamínulas utilizando-se Entellan[®] como meio de montagem, e colocadas para secar em estufa à 37 °C por 12 horas. Posteriormente, os órgãos foram analisados e fotografados em microscópio de luz Zeiss Axioskop, sendo as imagens capturadas pelo programa Axio Vison 40v 4.6.1.0. Copyring[®] 2002-2004.

3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism[®]. Os resultados da variação da massa corporal, das medições das áreas dos tumores e do perfil de internalização da AICIFt foram submetidos à análise de variância (ANOVA). Nos casos em que foram detectadas diferenças entre os grupos, foi aplicado o teste de Tukey com nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

3.11 APROVAÇÃO DO PROJETO PELO COMITÊ DE ÉTICA

Este trabalho de pesquisa foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética no uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília (UnB) de acordo com o processo UnBDOC nº 66063/2007, em anexo.

4 RESULTADOS

4 RESULTADOS

No presente estudo, cujo intuito foi o de avaliar a efetividade da Terapia Fotodinâmica mediada pela AICIFt em formulação lipossomal na remissão de tumores de língua induzidos em camundongos Balb-c, foram realizados diferentes ensaios e seus resultados estão descritos a seguir.

4.1 CARACTERIZAÇÕES FOTOFÍSICAS DAS AMOSTRAS LIPOSSOMAIS DE AICIFt

Uma das abordagens experimentais inicialmente realizadas foi a determinação do espectro eletromagnético em que o fotossensibilizador AICIFt absorve luz.

De acordo com a Figura 6, a AICIFt em formulação lipossomal neutra apresenta o mesmo perfil espectral de absorção de luz da AICIFt quando na forma monomérica, ou seja, entre 650 e 700 nm, com pico máximo de absorção a 670 nm.

Além da determinação da faixa de absorbância também foram avaliados os espectros de emissão de fluorescência da AICIFt em formulação lipossomal neutra. A análise mostrou que a AICIFt emite luz fluorescente com pico máximo em comprimento de onda de 670 nm (Figura 7).

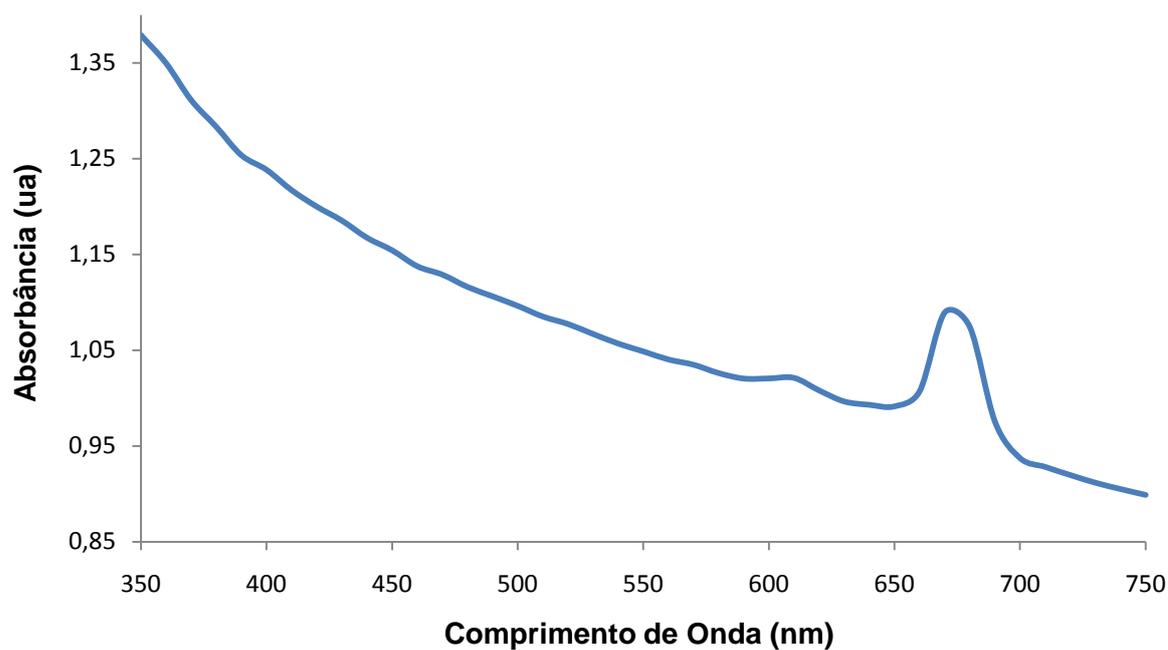


Figura 6. Espectros de absorvância (350-750 nm) da solução de AICIFt em formulação lipossomal neutra.

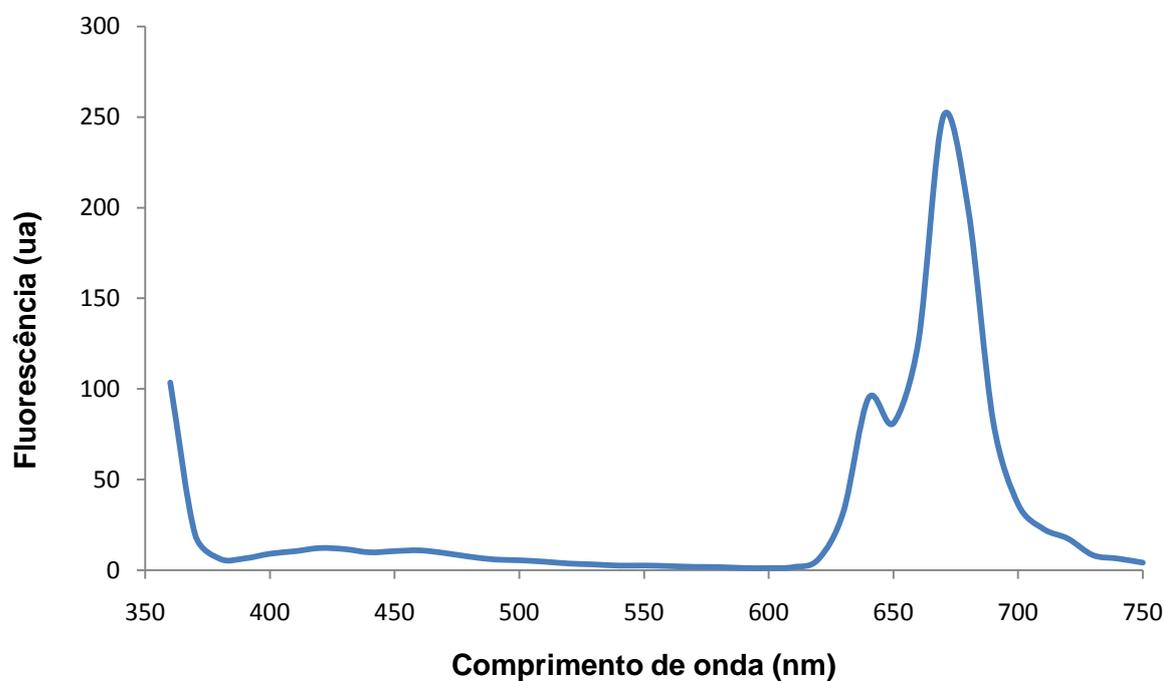


Figura 7. Espectros de emissão de fluorescência (350-750 nm), com excitação em 350 nm da solução de AICIFt em formulação lipossomal neutra.

De modo a determinar se a AICIFt utilizada neste estudo era capaz de induzir a produção de radicais livres, essencial para a Terapia Fotodinâmica, foi realizado um protocolo para detecção de oxigênio *singlet* ($^1\text{O}_2$) pelo método de degradação $^1\text{O}_2$ -dependente do benzofurano. Esse método avalia o decaimento da absorbância típica do benzofurano que ocorre em 410 nm. A Figura 8 representa os espectros de absorbância (350-750 nm) de uma solução lipossomal neutra que continha AICIFt submetida à irradiação de laser vermelho em diferentes fluências de energia. A mesma figura mostra que, com o aumento da oferta de energia ao fármaco fotossensibilizador, ocorre decaimento da absorbância do benzofurano. O decaimento da absorbância do benzofurano indica que ele reagiu com o oxigênio *singlet* do meio que foi gerado pela reação fotodinâmica.

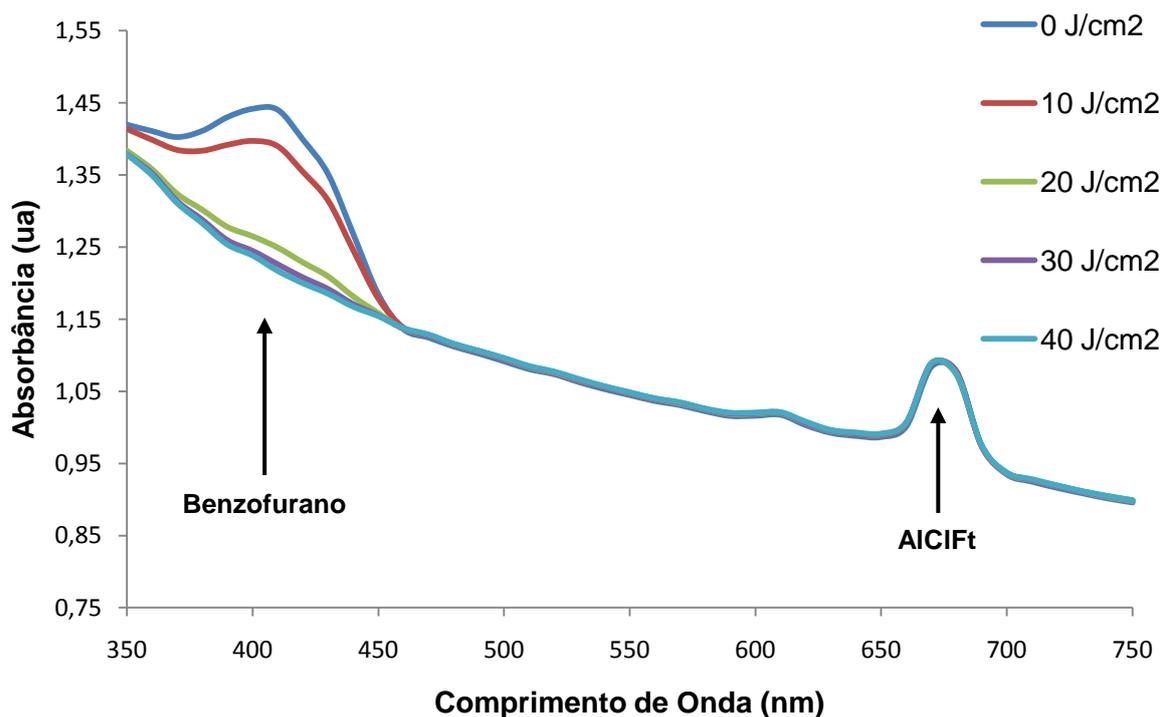


Figura 8. Formação do oxigênio *singlet* ($^1\text{O}_2$) pelo método de degradação $^1\text{O}_2$ -dependente do benzofurano. Espectros de absorbância (350-750 nm) de soluções lipossomais neutras contendo AICIFt com benzofurano submetidas à irradiação de laser vermelho em diferentes fluências de energia.

4.2 ENSAIOS BIOLÓGICOS *IN VITRO*

4.2.1 Determinação do Perfil de Internalização da Alumínio-Cloro-Ftalocianina em Formulação Lipossomal pelas Células OSCC-3

Para determinar em que tempo as células tumorais internalizavam maior quantidade da AICIFt, foram realizados testes para caracterizar o perfil cinético de internalização das vesículas lipossomais neutras pelas células OSCC-3.

Conforme mostra a Figura 9, aos cinco minutos as células OSCC-3 já tinham internalizado o fármaco. Entretanto, a internalização máxima da AICIFt foi detectada entre 15 e 30 minutos.

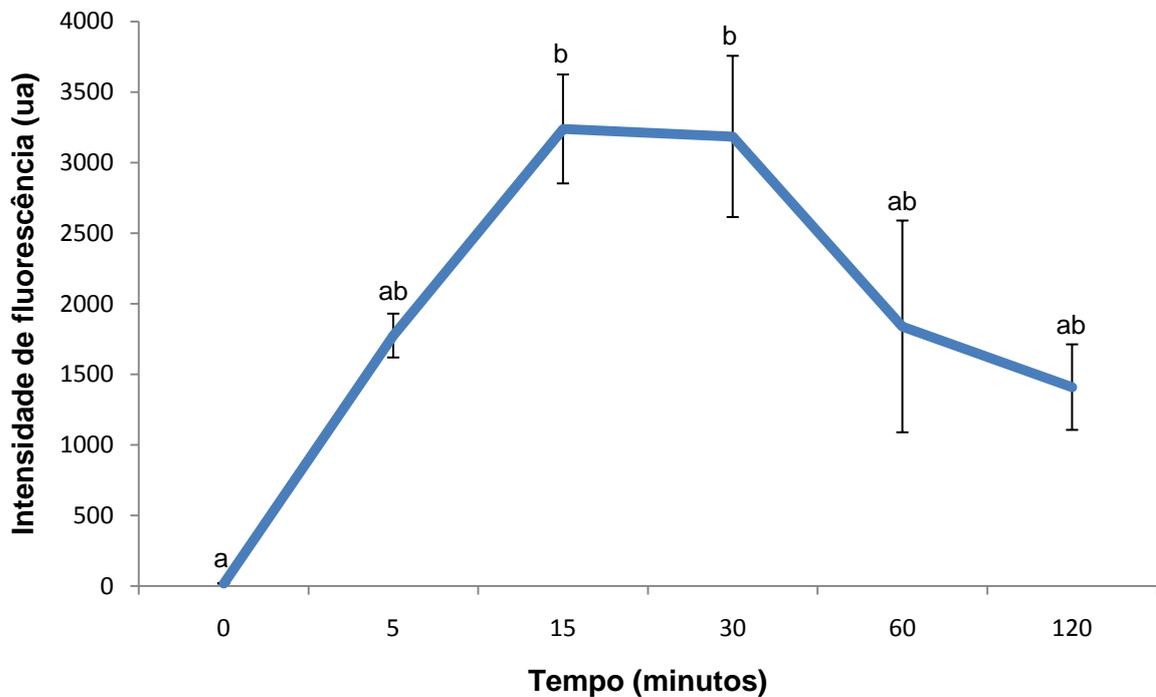


Figura 9. Fração de internalização de lipossomos neutros contendo AICIFt (5 μ M) em função do tempo. Letras diferentes denotam diferença significativa dos valores de intensidade de fluorescência da AICIFt em relação aos demais tempos ($p < 0,05$).

4.3 RESULTADOS DOS EXPERIMENTOS *IN VIVO*

4.3.1 Modelo de Indução de Tumores de Língua a partir de Células Derivadas do Tumor Ascítico de Ehrlich

De modo a determinar a quantidade de células necessárias para a indução dos tumores linguais, diferentes quantidades de suspensões celulares do tumor ascítico de Ehrlich foram injetadas nas línguas dos camundongos.

Após 48 horas, 100% dos animais desenvolveram tumores sólidos na borda lateral esquerda da língua. Conforme mostra a Figura 10, a área dos tumores variou de acordo com o volume da suspensão de células tumorais que foi aplicado na língua dos camundongos. Os maiores tumores foram os induzidos com 50 μ L da suspensão celular. Contudo, a área dos tumores que foram induzidos com 10 μ L se mostrou mais compatível com a proposta de um modelo animal para o tratamento do câncer de boca.

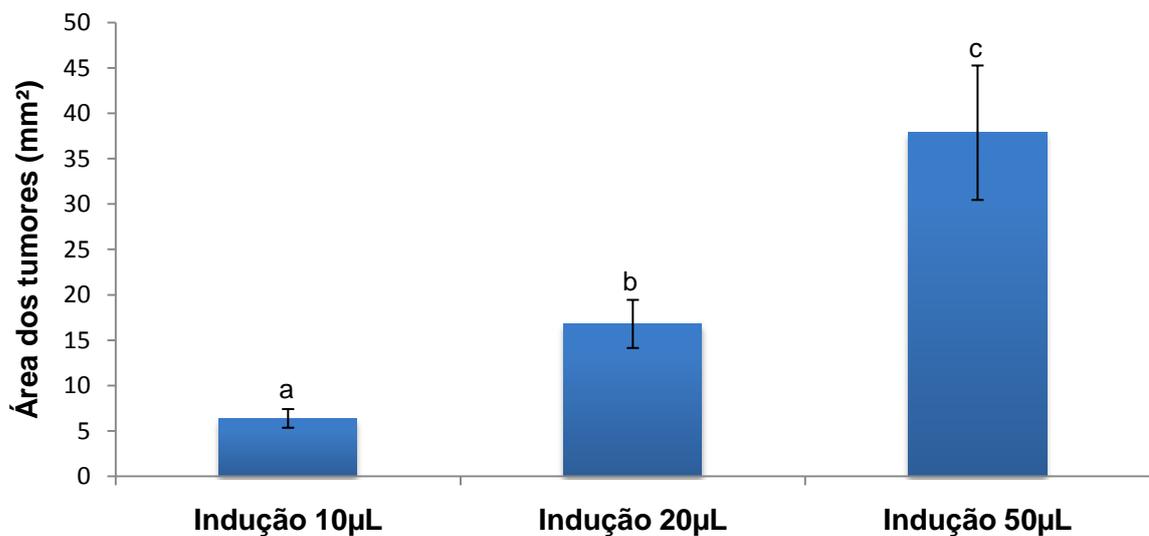


Figura 10. Variação das áreas dos tumores em relação ao volume da suspensão de células tumorais (5×10^6 células/mL). Letras diferentes denotam diferença significativa ($p < 0,05$).

O aspecto clínico da língua de animais que receberam 10, 20 e 50 μL de suspensão de células tumorais está ilustrado na Figura 11, seções A, B e C, respectivamente. Nota-se a presença de tumores (setas) além de processo inflamatório e edema moderado.

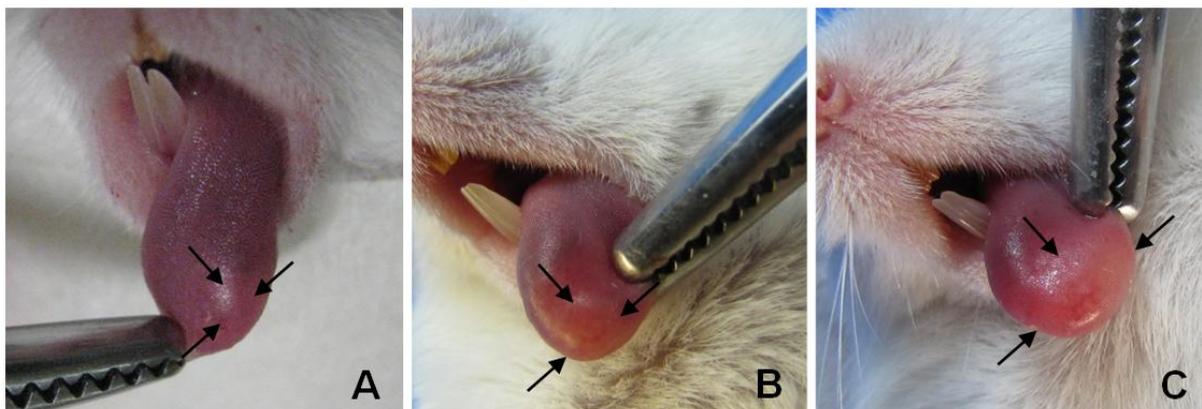


Figura 11. Aspecto clínico dos tumores de língua após 48 horas da indução tumoral com células derivadas do tumor de Ehrlich. (A) Tumor induzido com 10 μL , (B) tumor induzido com 20 μL e (C) tumor induzido com 50 μL da suspensão celular do tumor de Ehrlich (5×10^6 células/mL).

Depois de detectados os tumores do ponto de vista clínico, 48 horas após a indução tumoral, foram realizadas análises histopatológicas das línguas dos animais para confirmar o desenvolvimento da neoplasia.

A Figura 12A mostra a superfície dorsal da língua de um camundongo que não foi inoculado com células tumorais. Nesse corte histológico observa-se a língua revestida por epitélio estratificado queratinizado, abaixo do qual se encontra tecido conjuntivo associado a fibras musculares esqueléticas.

O estudo histopatológico da língua de camundongos Balb-c inoculados com células tumorais está contemplado nas figuras 12B, 12C e 12D. Na figura 12B, verifica-se a presença de tecido tumoral de contorno irregular abaixo da mucosa lingual. Em maior aumento (Fig. 12C), podem ser vistas células pleomórficas, com núcleos picnóticos, evidenciando características típicas de células tumorais. Tais detalhes podem ser melhor visualizados em maior aumento (Fig. 12D), com destaque para a presença de figuras mitóticas, como apontado pelas setas.

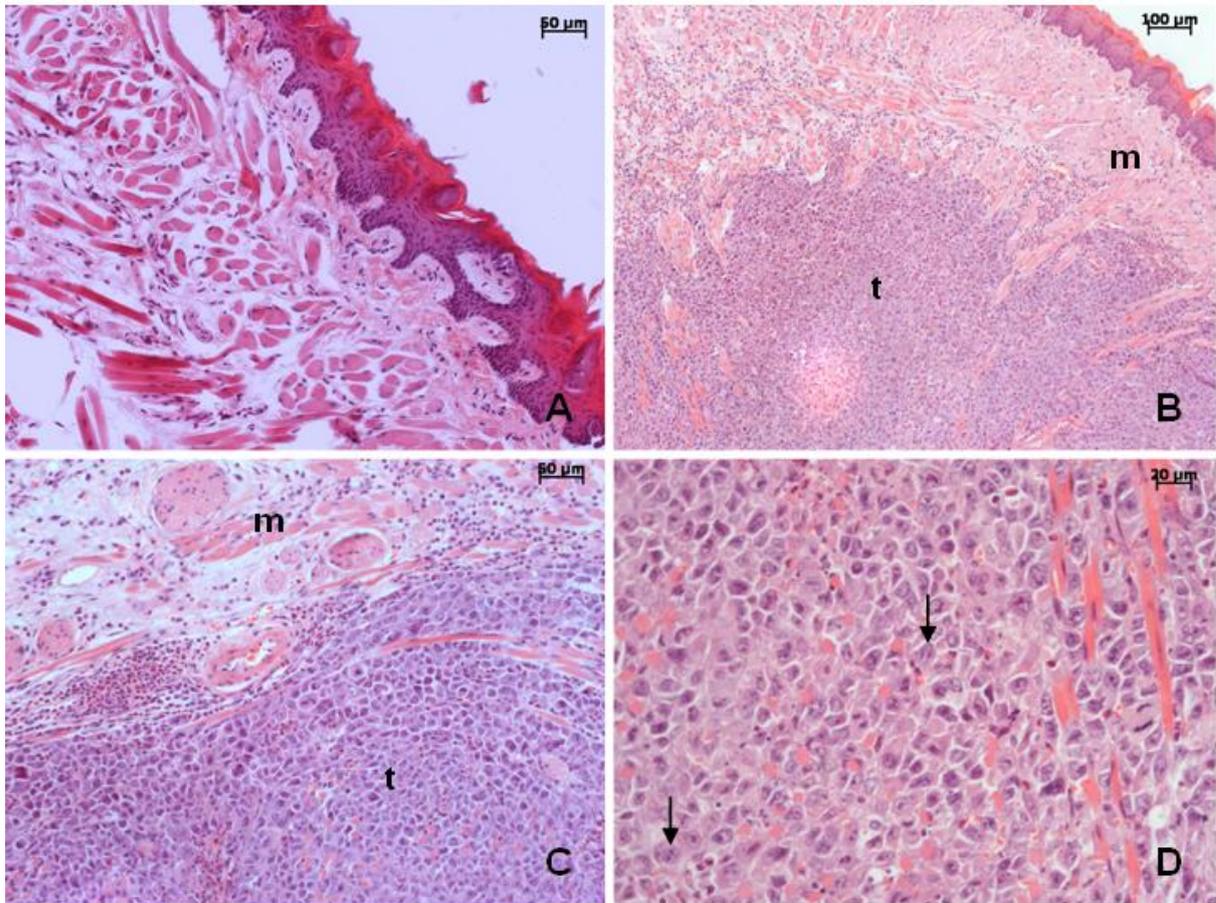


Figura 12. Fotomicrografias de cortes histológicos de línguas de camundongos Balb-c. (A) Superfície dorsal da língua de animais controle normal. (B, C e D) Aspecto histológico do tumor infiltrado entre as fibras musculares da língua de camundongos. Observa-se a invasão tumoral (t) em grande parte da língua, restando pequena porção de musculatura (m) íntegra. As setas indicam figuras mitóticas entre a grande massa de células tumorais.

4.3.2 Microtomografias dos Tumores Induzidos na Língua dos Camundongos Balb-c

Com base nos resultados descritos, decidiu-se que para avaliar a efetividade Terapia Fotodinâmica mediada pela AICIFt, os tumores de língua seriam induzidos com a aplicação de 10 µL da suspensão de células tumorais de Ehrlich, na concentração de 5×10^6 células/mL. Neste contexto, foram realizadas análises de imagens obtidas por meio de microtomografias computadorizadas de modo a

dimensionar a profundidade dos tumores. A Figura 13 ilustra a extensão de um tumor em um corte coronal. A partir das imagens obtidas e com auxílio do programa computacional *NRecon software* (SkyScan, Kontich, Bélgica) determinou-se o maior diâmetro e a profundidade dos tumores em aproximadamente 2,7 e 2,1 mm, respectivamente.

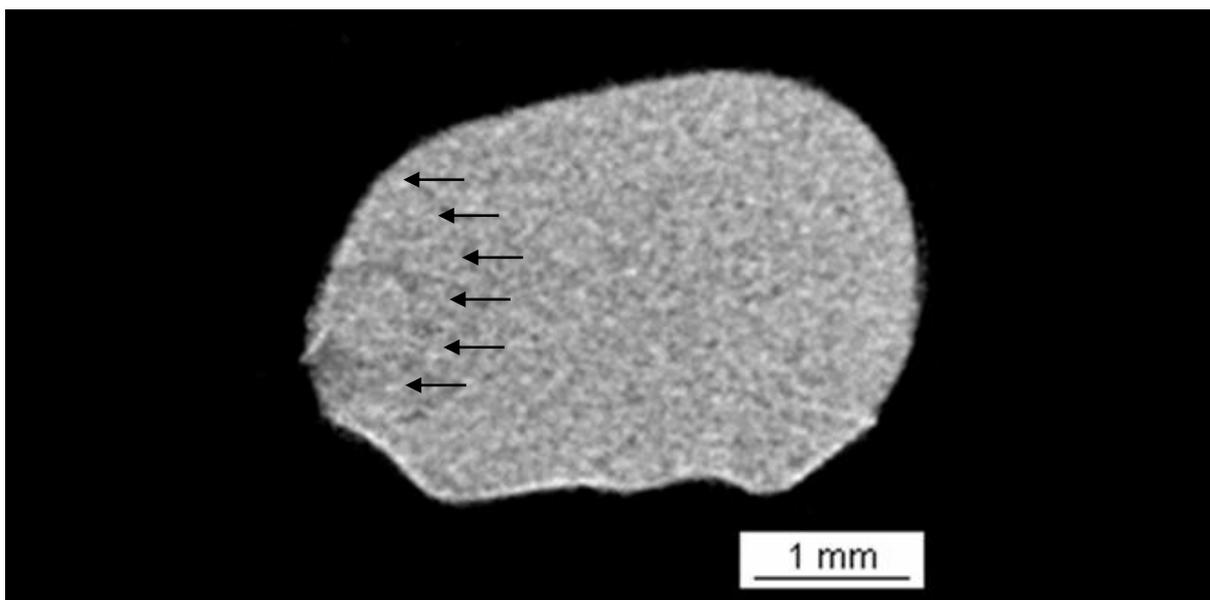


Figura 13. Microtomografia mostrando um corte coronal da língua de um camundongo com tumor induzido por células derivadas do tumor ascítico de Ehrlich. As setas indicam as possíveis margens da lesão tumoral.

4.3.3 Terapia Fotodinâmica

4.3.3.1 Avaliação Clínica

Na avaliação clínica dos camundongos utilizados neste estudo, foram considerados dois parâmetros: a variação dos tamanhos dos tumores e a quantidade de massa corporal dos animais.

Como pode ser observado na Figura 14, em todos os animais submetidos à TFD, Grupo T5, ocorreu a remissão completa dos tumores, ou seja, não foi observado clinicamente nenhum tumor em 100% dos animais desse grupo. Entretanto, os animais que não foram submetidos à TFD, grupos T2, T3 e T4, apresentaram um aumento significativo no tamanho dos tumores. Pode-se observar ainda que não há diferença estatística entre os tamanhos iniciais dos tumores de todos os grupos.

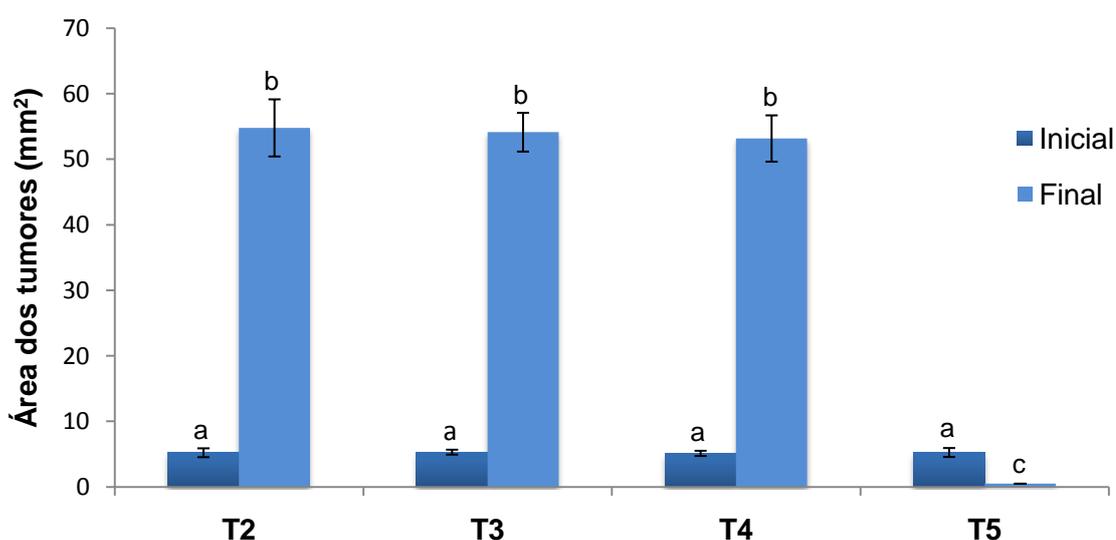


Figura 14. Variação das áreas dos tumores no início (48 horas após a indução tumoral) e após (9 dias após a indução tumoral) os tratamentos. Letras diferentes denotam diferença significativa ($p < 0,05$).

A variação do tamanho dos tumores também pode ser observada na Figura 15. Nos animais submetidos à Terapia Fotodinâmica, Grupo T5, os tumores (Fig. 15A) regrediram ao longo da terapia (Fig. 15B e C). Após o primeiro tratamento com a TFD, já foi possível observar na região onde se localizava o tumor intensa necrose tecidual (Fig. 15B), que regrediu depois de 72 horas (Fig. 15C). Contudo, os tumores dos camundongos que não foram submetidos à TFD (controle positivo), daqueles tratados somente com AICIFt e dos somente irradiados (sem a AICIFt), tiveram aumento progressivo do seu tamanho (Fig. 15D, E e F).

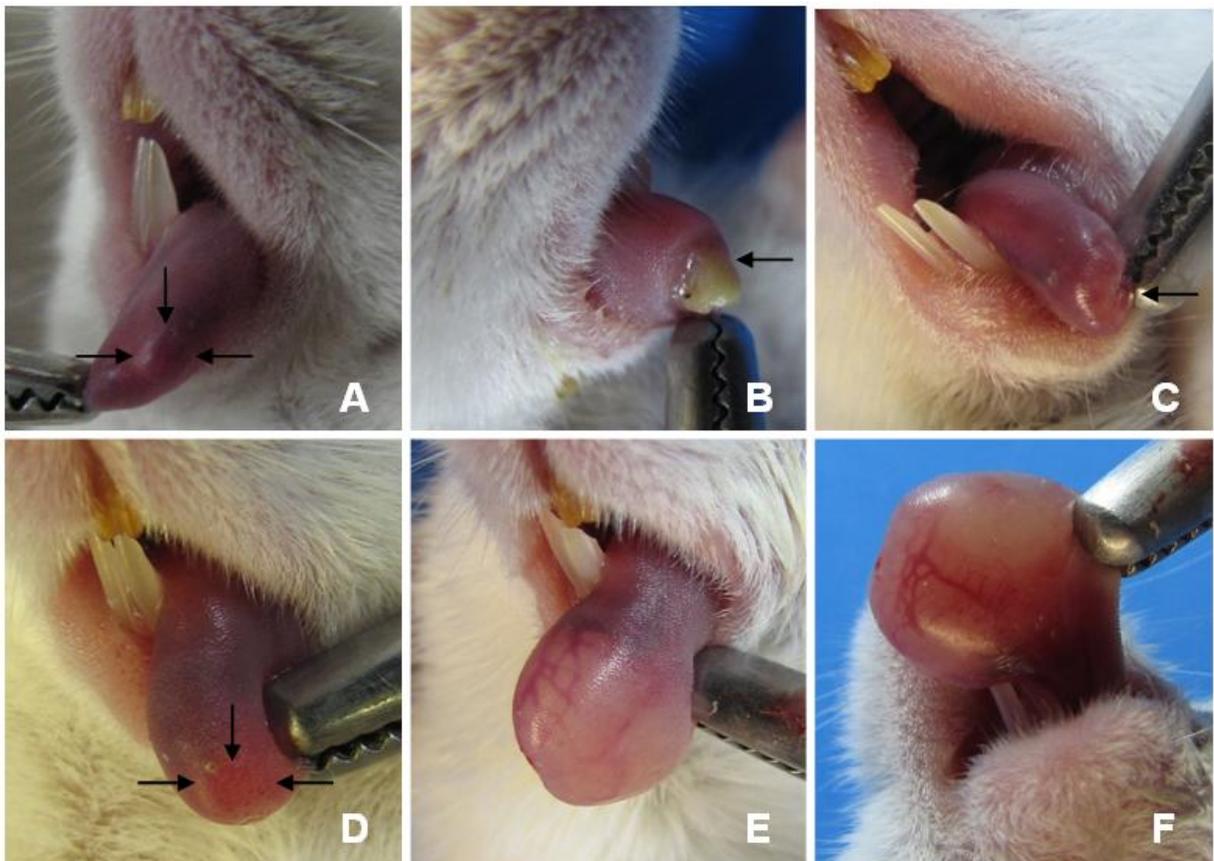


Figura 15. Fotografias mostrando o tumor inicial após 48 horas da indução tumoral (A e D), a necrose tecidual da língua de um camundongo após a aplicação da TFD (B), a língua de um camundongo após regressão da necrose (C), a língua de camundongos do grupo controle positivo pelas vistas dorsal (E) e ventral (F) após nove dias da indução dos tumores.

A Figura 16 ilustra também o aspecto macroscópico de línguas inoculadas com a suspensão de células do tumor de Ehrlich. Ao final dos experimentos foi possível observar a remissão clínica dos tumores quando estes eram submetidos à TFD (Fig. 16 A). Porém, quando os animais não eram submetidos a essa terapia, os tumores continuavam a crescer (Figura 16B).



Figura 16: Fotografia mostrando o aspecto macroscópico de línguas excisadas de camundongos submetidos à indução tumoral. (A) Língua de animal nove dias após a indução tumoral e depois de três tratamentos com a Terapia Fotodinâmica. (B) Língua de animal nove dias após a indução tumoral e não tratado.

A variação da massa corporal, outro parâmetro de avaliação clínica considerado neste estudo, está representada na Figura 17. Pode-se observar que os animais dos diversos grupos experimentais apresentavam diminuição significativa da quantidade de massa corporal. Entretanto, essa perda foi menor nos animais submetidos à TFD, Grupo T5 (11,37%) quando comparado com a dos animais que não foram submetidos à TFD, grupos T2 (28,14%), T3 (27,86%) e T4 (27,69%).

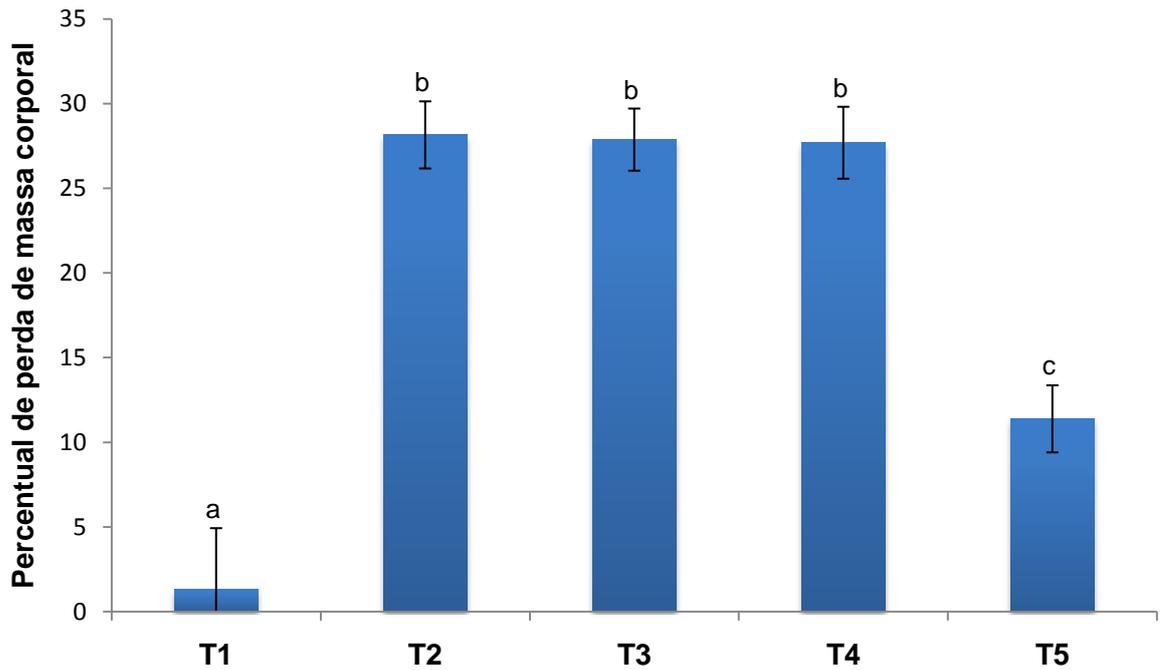


Figura 17: Percentual de perda de massa corporal dos diferentes grupos experimentais durante a realização dos ensaios clínicos. Letras diferentes denotam diferença significativa ($p < 0,05$). (T1) controle negativo; (T2) controle positivo; (T3) animais tratados somente com a AICIFt; (T4) animais tratados somente com o laser; (T5) animais submetidos à TFD.

Além da perda de massa corporal, os animais dos grupos T2, T3 e T4, ou seja, aqueles com tumor mas que não foram submetidos à TFD, apresentaram alopecia moderada (Fig. 18B) quando comparados com os dos grupos T1 e T5 (Fig. 18A).

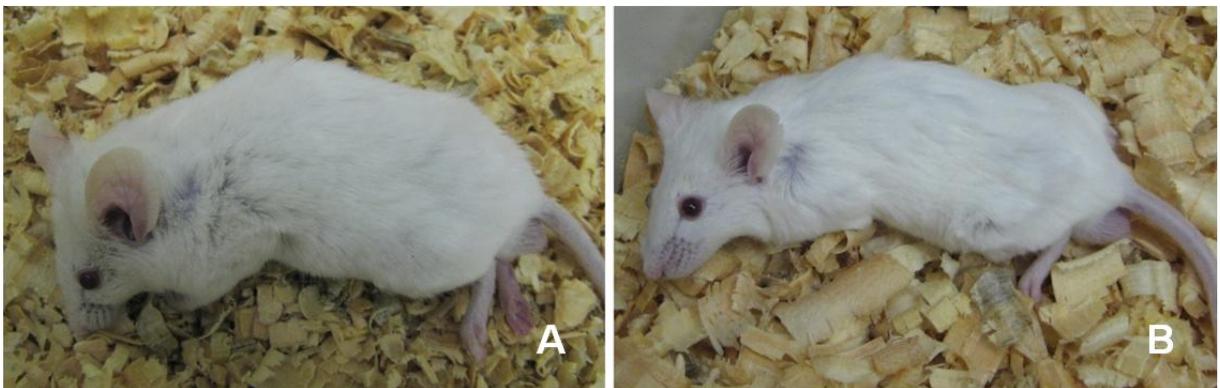


Figura 18. Camundongos com tumores linguais. (A) Animal submetido a três tratamentos com a TFD. (B) Animal não submetido TFD.

4.3.3.2 Avaliação Histopatológica

Além da avaliação clínica, foram realizadas análises histopatológicas das línguas dos animais para confirmar a remissão dos tumores submetidos à TFD. As fotomicrografias dos cortes histológicos das línguas corados com H&E estão representadas nas figuras 19 e 20.

A análise histopatológica dos tumores de língua dos animais dos grupos T2, T3 e T4, não submetidos à TFD, mostrou que estes tumores possuem aspecto semelhante (Fig.19). As células tumorais apresentaram intensa proliferação local, invadindo e destruindo a arquitetura tecidual do órgão, incluindo o tecido conjuntivo e o muscular. Antes do tratamento, o tecido neoplásico apresentou-se como uma massa sólida, de contorno irregular, abaixo da mucosa lingual (Fig. 19 A e B). Em maior aumento podem ser visualizadas áreas de necrose tecidual em regiões mais internas dos tumores (Fig. 19B, C, D, E e F), o que consiste em uma das características usuais do tumor de Ehrlich.

Nas áreas não necrosadas, o tecido tumoral apresenta células aparentemente viáveis, tanto na periferia quanto na porção central. Contudo, tais células se avizinham de outras com intenso pleomorfismo, núcleos grandes, alguns picnóticos, além da ocorrência freqüente de figuras de mitose (Fig.19F, setas), características típicas de células tumorais.

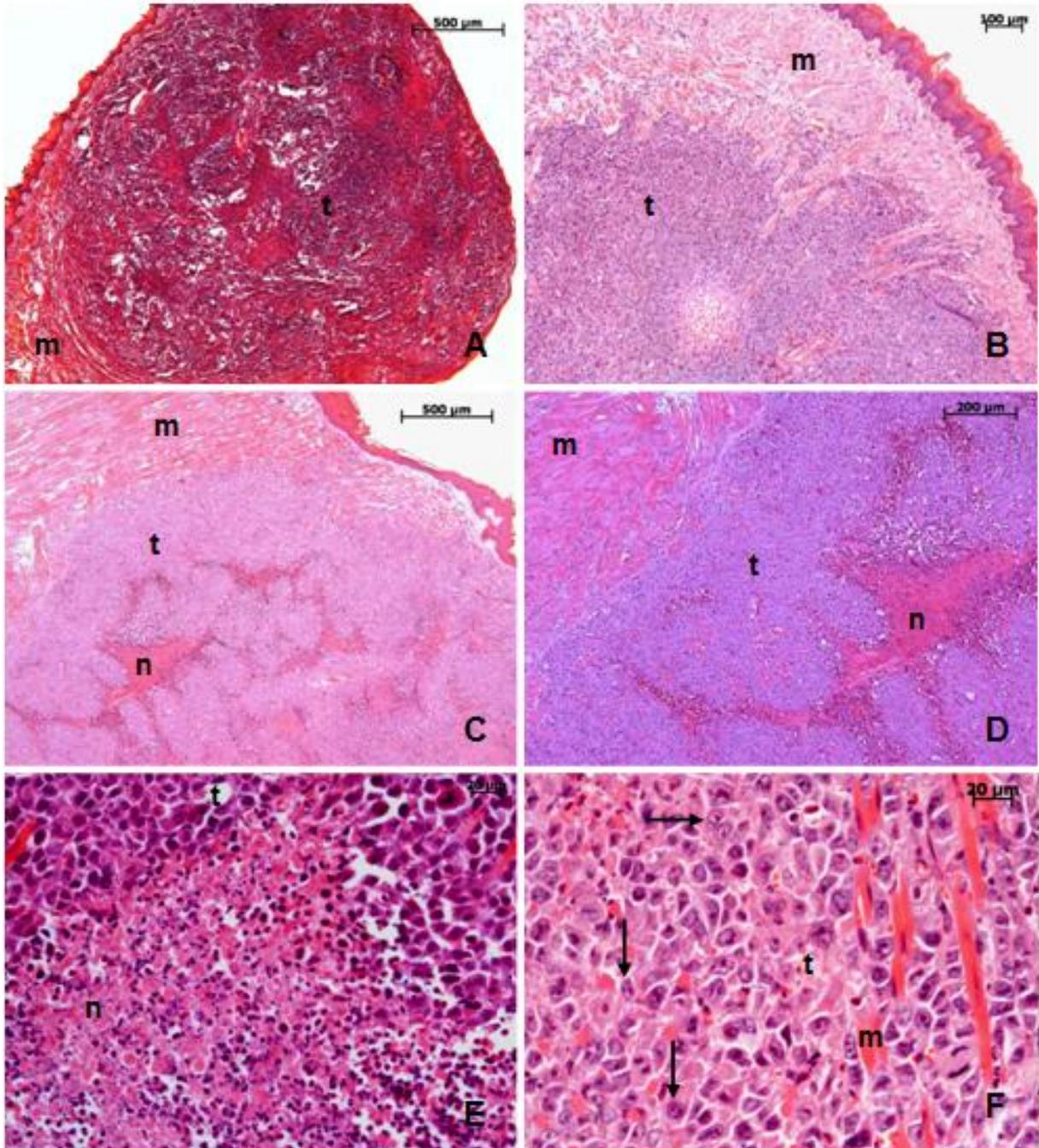


Figura 19. Fotomicrografia de cortes histológicos de línguas de camundongos Balb-c com tumor presente nos grupos T2, T3 e T4. (m) células musculares normais; (t) áreas de proliferação tumoral; (n) áreas de necrose. As setas indicam figuras de mitose.

A análise histopatológica das línguas dos camundongos submetidos à terapia fotodinâmica confirmou a remissão completa dos tumores de língua (Fig. 20B). Entretanto, 24 horas após o último tratamento, a análise morfológica evidenciou perda da arquitetura microscópica das línguas desses animais. O tecido muscular apresentava-se diminuído na quantidade de fibras que, além de menos numerosas, apresentavam-se adelgadas e, às vezes, com núcleos em sua região central. Verificou-se, concomitantemente, aumento do tecido conjuntivo entre as fibras musculares e presença de grande infiltrado inflamatório de células mononucleares (Fig. 20C e D), o que não era visto nos cortes histológicos de línguas provenientes de animais do grupo controle negativo (Fig. 20A). Em maior aumento, pode-se observar substituição do tecido muscular por células de citoplasma abundante e claro, indicativo de um processo de necrose coagulativa (Fig. 20C, D e E). Esse processo é melhor visualizado na Figura 20E e F, na qual observa-se a presença de células com núcleo pequeno, central e citoplasma opaco, o que sugere degradação de miofilamentos e degeneração de fibras musculares. Entre tais células, podem ser vistas áreas de material hialino, sugestivo de degradação de matriz conjuntiva (seta). Na Figura 20F (setas), podem ser observados em torno de fibras musculares degeneradas aglomerados de células inflamatórias, muito provavelmente removendo os fragmentos celulares provenientes da degeneração das fibras musculares causada pela necrose.

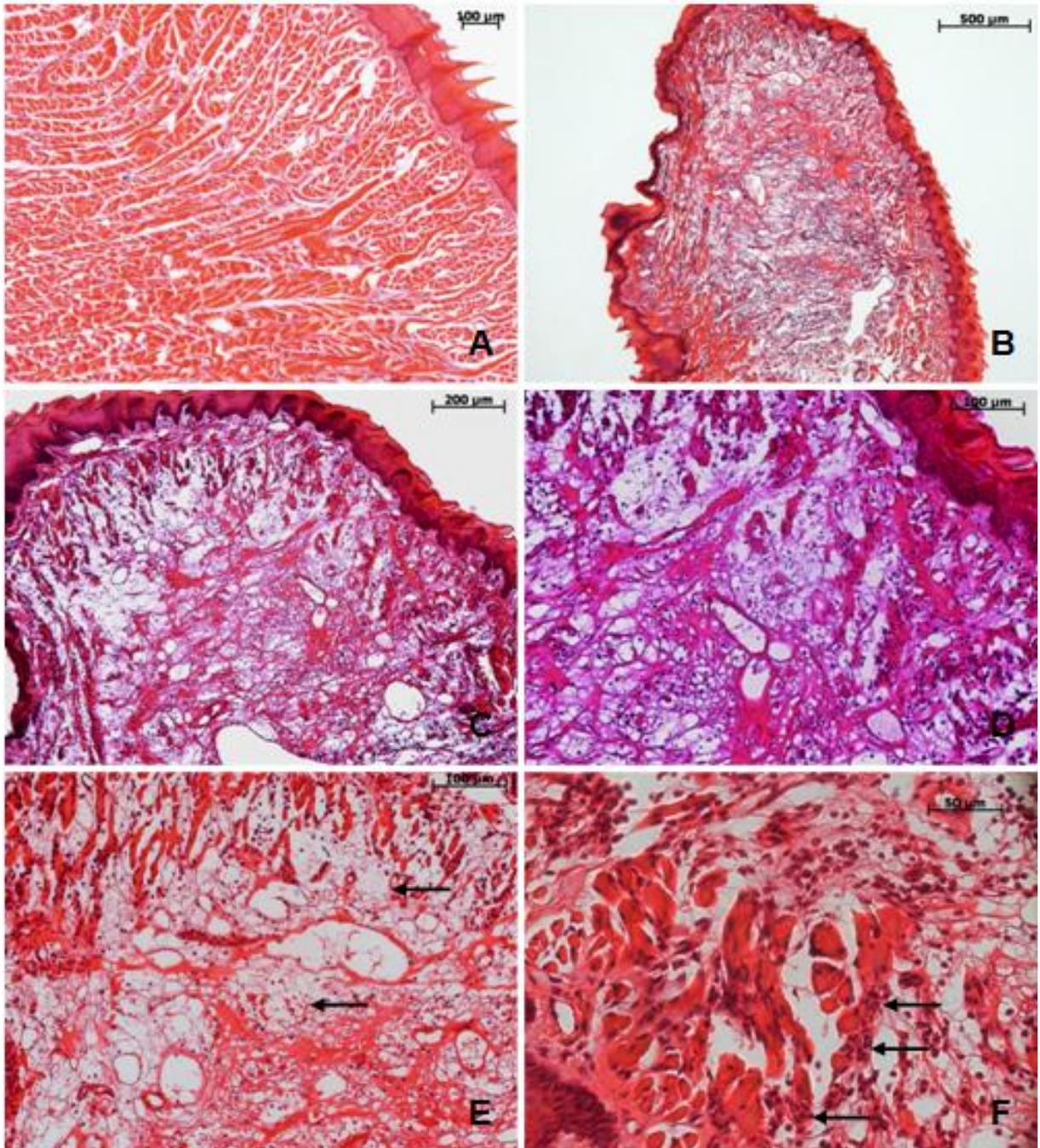


Figura 20. Fotomicrografia de cortes histológicos de línguas de camundongos Balb-c submetidos à TFD. As setas indicam áreas de material hialino, sugestivo de degradação de matriz conjuntiva (E) e aglomerados de células inflamatórias em torno de fibras musculares degeneradas (F).

A Figura 21 ilustra cortes histológicos obtidos 21 dias após o término da TFD (Fig. 21B, C e D), que podem ser comparados com a arquitetura normal das línguas dos animais controle negativo (Fig. 21A). Nas Figuras 21 B-D, verificam-se evidências de regeneração tecidual na língua dos animais tratados com a TFD. Observa-se que as fibras musculares já apresentam disposição em vários planos de corte, o que caracteriza o padrão de distribuição dessas fibras na língua dos animais saudáveis (controle negativo). Entretanto, em maior aumento, observa-se entre as fibras musculares a presença tecido conjuntivo bastante celular, o que denota processo de cicatrização.

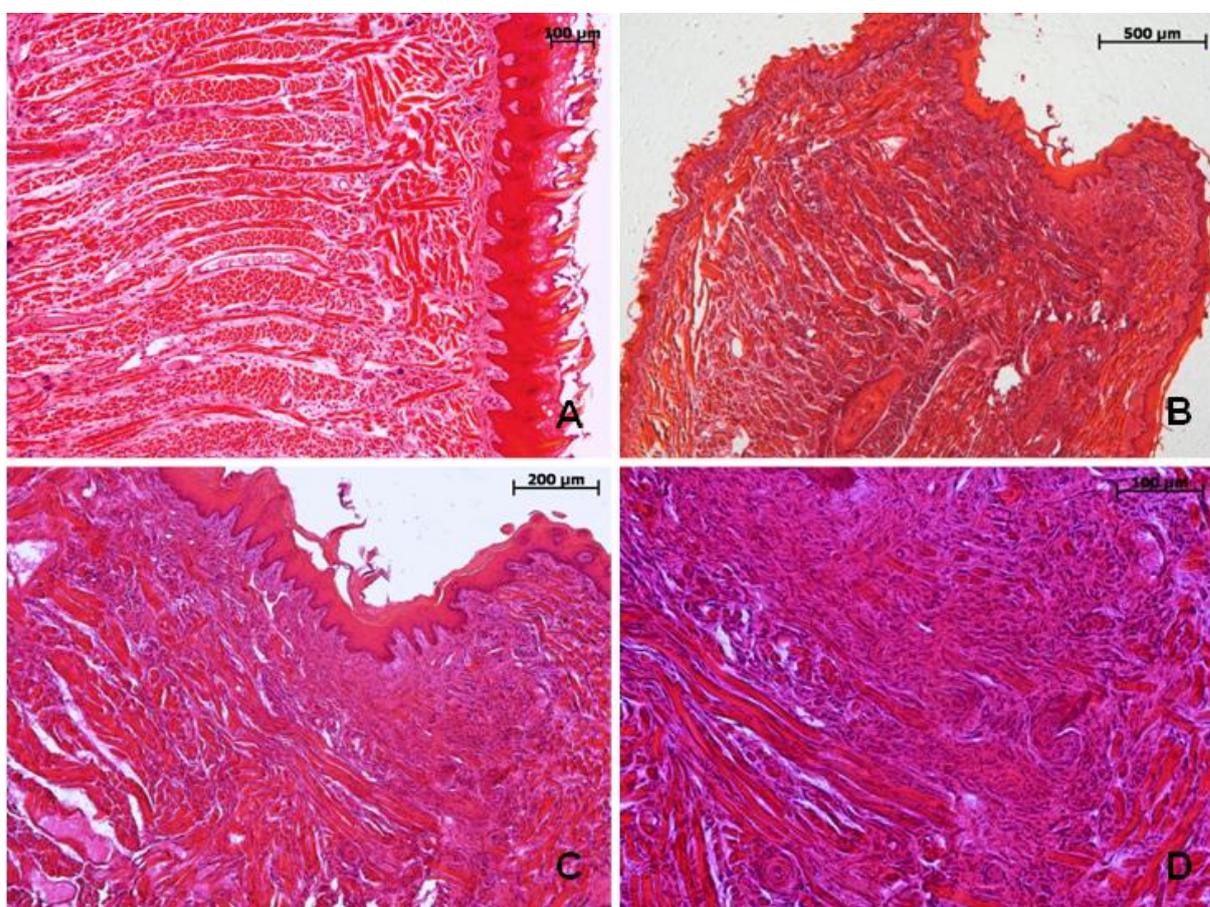


Figura 21. Fotomicrografia de cortes histológicos de línguas de camundongos Balb-c. (A) Controle negativo; (B, C e D) Grupo T5, 21 dias após o término da TFD.

Neste estudo, além das línguas, foram também avaliados os linfonodos cervicais. Conforme demonstra a Figura 22, os linfonodos cervicais dos animais que receberam a Terapia Fotodinâmica apresentavam-se ligeiramente aumentados (Fig.

22B, setas) quando comparados com os dos camundongos saudáveis (Fig. 22A, setas). Contudo, os animais do grupo controle positivo, animais com tumor e que não foram tratados, apresentavam linfonodos com aumento bastante acentuado, aspecto sugestivo de linfonodos metastáticos.

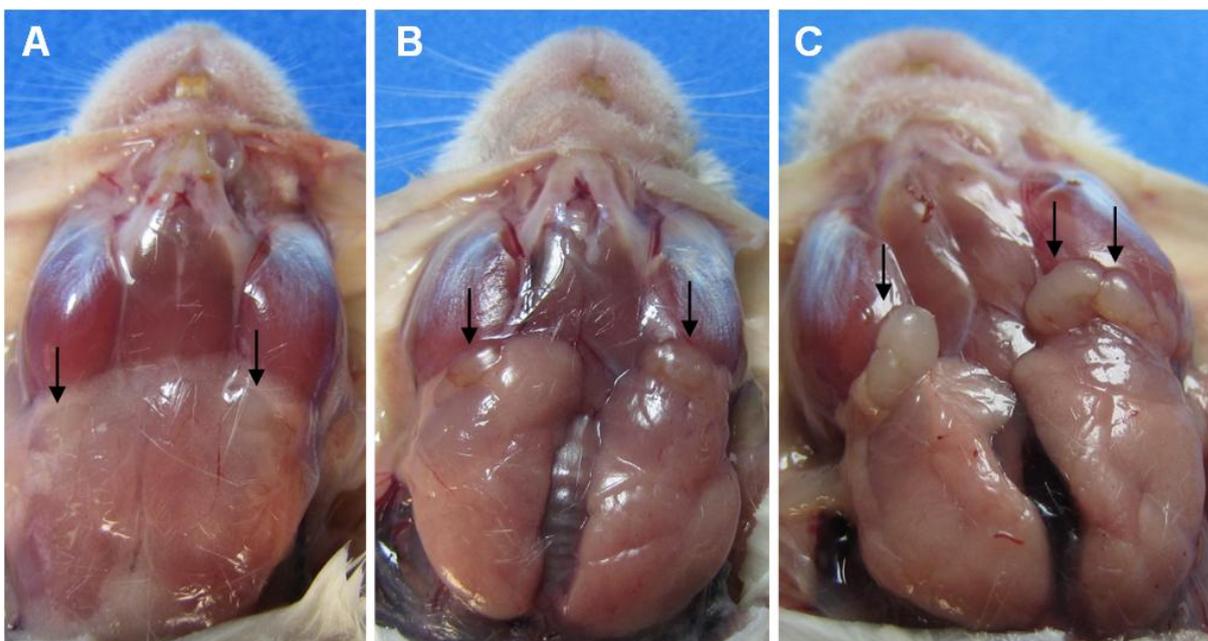


Figura 22: Fotografia mostrando os linfonodos de um camundongo saudável (A), de um tratado com a terapia fotodinâmica (B) e de outro do grupo controle positivo (C).

A Figura 23A ilustra a estrutura típica de um linfonodo cervical proveniente de um animal saudável (grupo controle negativo). Na Figura 23B, que ilustra um corte histológico de um linfonodo cervical de um animal submetido à TFD, pode ser observado tecido linfóide permeado por células com morfologia atípica.

A análise histopatológica dos linfonodos cervicais dos animais que não foram submetidos à terapia fotodinâmica, grupos T2, T3 e T4, mostra invasão de células tumorais nesses órgãos (Fig. 23C). Em maior aumento, observam-se células grandes, com citoplasma abundante e fracamente basofílico, características de células tumorais. Os núcleos dessas células apresentam-se hipocromáticos, grandes, variando de ovais a alongados (Fig. 23D, setas).

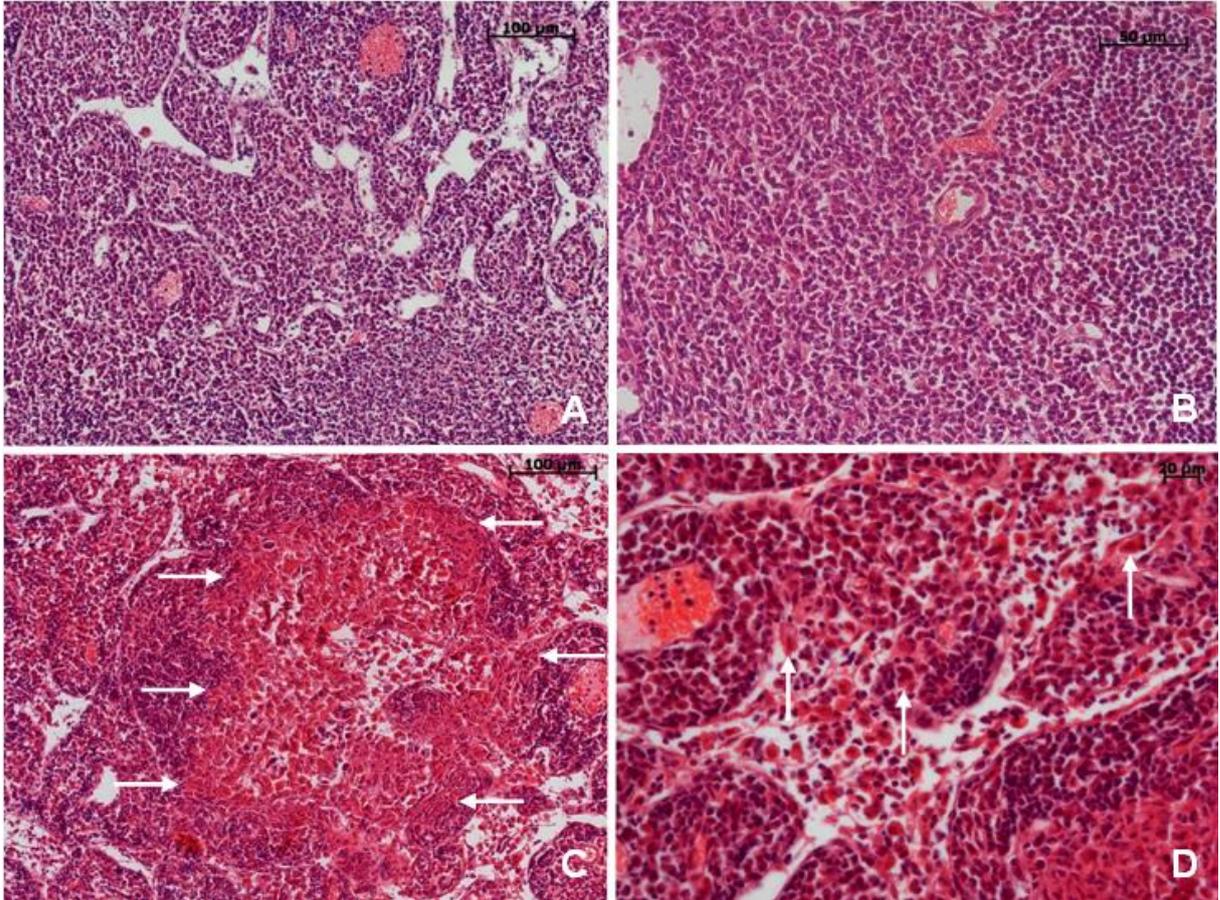


Figura 23. Fotomicrografia de cortes histológicos de linfonodos cervicais de camundongos Balb-c. (A) controle negativo; (B) submetidos à TFD; (C e D) controle positivo, tratados apenas com a AICIFt e somente irradiados. As setas indicam invasão de células tumorais nos linfonodos (C) e células com núcleos hipocromáticos, grandes, variando de ovais a alongados (D).

5 DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

A Terapia Fotodinâmica é uma modalidade terapêutica que envolve a absorção seletiva de um fármaco fotossensibilizador pelo tecido tumoral, seguida pela irradiação da lesão neoplásica por uma fonte de luz de comprimento de onda específico. A absorção da luz pelo fotossensibilizador na presença de oxigênio *singlet* desencadeia processos fotoquímicos que resultam na formação de espécies reativas de oxigênio. Essas espécies de oxigênio apresentam elevada reatividade, pois seus átomos possuem número ímpar de elétrons. Para atingir a estabilidade, as espécies de oxigênio tendem a ligar o elétron não pareado a outros presentes em estruturas próximas. Assim, as espécies reativas de oxigênio podem se ligar a constituintes celulares tais como lipídios membranares, proteínas e DNA. Ao reagir com essas biomoléculas, as espécies reativas de oxigênio podem ocasionar a morte celular e induzir a destruição do tumor (78, 79).

Nos últimos anos, tem havido uma intensa procura por novos fotossensibilizadores que possam ser usados na terapia fotodinâmica. Entre muitas outras características, um fotossensibilizador ideal deve ser uma substância quimicamente pura, com intensa absorção de luz na faixa do espectro eletromagnético entre 600 e 850 nm, além da seletividade de suas interações como os sistemas biológicos e rápida eliminação pelo organismo (68). Apesar da localização preferencial do fármaco no tecido tumoral ser um fator determinante para a efetividade da TFD, a hidrofobicidade do fotossensibilizador também deve ser considerada nessa terapia, pois fármacos com alta hidrofobicidade são pouco solúveis em soluções fisiológicas aquosas. Por outro lado, aqueles com baixa hidrofobicidade apresentam capacidade de interação com as membranas biológicas diminuída e, conseqüentemente, são menos internalizados pelas células. Vale lembrar que a porção apolar das membranas biológicas, formadas pelas cadeias de ácidos graxos dos fosfolípidos, forma uma barreira seletiva e de difícil transposição para estruturas moleculares hidrofílicas, e de passagem facilitada para moléculas hidrofóbicas. Estas interações entre os fármacos FS e as membranas biológicas foram observadas tanto em células eucarióticas (80, 81) quanto em procarióticas

(82), nas quais tanto o grau de internalização quanto o efeito citotóxico da TFD diminuem à medida que aumenta a hidrofobicidade dos fármacos FS utilizados. O aumento da solubilidade dos fotossensibilizadores em soluções fisiológicas, além do aumento da sua seletividade aos tecidos tumorais pode ser conseguido pelo uso de sistemas de liberação de fármacos como os lipossomos (83, 84). Vale ressaltar que fotossensibilizadores encapsulados permanecem mais tempo na circulação sanguínea.

No presente estudo, utilizou-se como fármaco fotossensibilizador uma ftalocianina de cloro-alumínio incorporada em um sistema de liberação lipossomal, a AICIFt. A presença de um íon metálico no centro da estrutura química desse FS faz com que ele reaja por mais tempo com as moléculas celulares (85, 86). A formulação lipossomal da AICIFt apresentou perfil espectral de absorção em região ótima de penetração da luz em tecidos biológicos, ou seja, entre 650 e 700 nm, com pico máximo em 670 nm. Da mesma forma, o perfil de emissão de fluorescência da AICIFt lipossomal também foi evidenciado na faixa de comprimento de onda de 670 nm. O fato de a AICIFt emitir fluorescência permite que esse fármaco possa ser monitorado dentro do organismo. Isso possibilita a determinação da sua concentração dentro de um tumor determinado ou, ainda, a sua utilização para identificar e mapear lesões tumorais (87-89).

Outro fator importante que deve ser considerado em um fotossensibilizador, para que ele possa ser utilizado na terapia fotodinâmica, é a sua capacidade de induzir a produção de radicais livres. Assim, outra abordagem deste estudo foi determinar, pelo método de degradação $^1\text{O}_2$ -dependente do benzofurano, se AICIFt era capaz de induzir a formação de oxigênio *singlet* quando irradiada. Por esse método, foi detectado que a AICIFt em formulação lipossomal, mesmo quando irradiada com $10\text{J}/\text{cm}^2$, induz a formação do oxigênio *singlet*. O oxigênio *singlet* é o principal responsável pela destruição de células tumorais durante o processo de fotossensibilização na TFD de neoplasias. Isso porque essa espécie reativa de oxigênio, como citado anteriormente, pode ligar-se a constituintes celulares. Assim, ao reagir com essas biomoléculas, o oxigênio *singlet* pode ocasionar a morte celular. Vale ressaltar que a interação do oxigênio *singlet* com as moléculas orgânicas não é específica, qualquer macromolécula dentro da célula pode ser um alvo em potencial para a TFD. Portanto, devido à multiplicidade de alvos, as células tumorais têm

maior dificuldade de desenvolverem resistência ao tratamento, sendo essa uma das vantagens da fotossensibilização. Nesse sentido, a terapia fotodinâmica tem sido utilizada para destruir células malignas e pré-malignas, de forma minimamente invasiva.

Uma vez determinadas as propriedades de absorvência, fluorescência e a capacidade de formação de oxigênio *singlet* da AICIFt, realizou-se um experimento *in vitro* para saber se a AICIFt em formulação lipossomal era internalizada por células tumorais. De acordo com os resultados, as células tumorais OSCC-3 internalizaram o fármaco já nos primeiros cinco minutos. A internalização máxima da AICIFt foi detectada entre 15 e 30 minutos. Por isso optou-se por irradiar os tumores 15 minutos após a aplicação do fármaco.

A retenção dos fotossensibilizadores pelas células tumorais é dependente de uma série de fatores, entre eles a estrutura química dos fármacos (90). Segundo Kessel e cols. (91) a retenção de FS em células tumorais aumenta com a diminuição da polaridade da molécula, fato que eleva a eficiência do FS. A AICIFt utilizada nesse estudo possui em sua molécula porções polares e apolares, mas a sua característica final é de uma substância com baixa polaridade, o que permite uma retenção desse fármaco em células tumorais considerada favorável para sua aplicação na TFD.

No que diz respeito aos parâmetros citados acima, a formulação lipossomal de AICIFt preencheu os requisitos necessários para ser considerado um fármaco fotossensível com potencial para ser utilizado na TFD.

Já está bem estabelecido na literatura o uso de modelos animais experimentais na indução da carcinogênese para estudar seus mecanismos. A utilização desses modelos animais no desenvolvimento de protocolos terapêuticos é um dos passos fundamentais para o estabelecimento de ensaios clínicos em seres humanos. Vários modelos animais para o desenvolvimento do câncer bucal foram propostos, inclusive modelos como hamster, ratos e camundongos. Neste estudo, utilizou-se como modelo animal camundongos Balb-c machos com 15 semanas de idade, ou seja, animais adultos e imunocompetentes.

Os tumores linguais nos camundongos Balb-c foram induzidos a partir de células do tumor ascítico de Ehrlich. O tumor de Ehrlich é primariamente um adenocarcinoma mamário de desenvolvimento espontâneo em camundongos. O tumor de Ehrlich tem sido utilizado como modelo no estudo da ação de componentes físicos, químicos e biológicos sobre o crescimento, patogênese, cinética, imunologia, bioquímica e terapêutica do câncer. Mesmo sendo um tumor indiferenciado, é possível que o tumor de Ehrlich seja influenciado por hormônios estrógenos. Por isso decidiu-se utilizar neste estudo somente camundongos machos, pois apresentam menores variações dos níveis desses hormônios do que as fêmeas (92, 93).

A utilização de neoplasias transplantáveis, como o tumor de Ehrlich, tem como vantagem o fato de se conhecer a quantidade e as características iniciais das células a serem inoculadas. Além disso, quando se realiza a indução de tumores por meio do transplante de células neoplásicas, o desenvolvimento da neoplasia acontece de forma mais rápida e eficaz, o que restringe o tempo de experimentação científica (94). Neste estudo, o modelo de indução tumoral a partir de células do tumor ascítico de Ehrlich mostrou ser um método simples, barato, rápido e eficaz para estudos de câncer de boca. Entretanto, esse modelo de indução tumoral apresentou algumas desvantagens como, por exemplo, grande potencial de invasão e também intensa capacidade metastática. Vale lembrar que, neste estudo, apenas 10 μ L de uma suspensão celular do tumor ascítico de Ehrlich, na concentração de 5x10⁶ células/mL, foram suficientes para induzir tumores sólidos na língua dos camundongos Balb-c em apenas 48 horas e metástases nos linfonodos cervicais nove dias depois da indução dos tumores.

A microtomografia é um novo método de diagnóstico por imagem, com uma resolução na ordem de micrômetros, que possui diversas aplicações, entre elas a avaliação de estruturas anatômicas e patológicas de pequenos animais experimentais (95-97). Por meio desse exame complementar pode-se obter imagens tridimensionais de tecidos moles e duros, o que é impossível na histomorfometria convencional. Segundo Mercer e cols. (98) a microtomografia permite a avaliação de diferenças espaciais nos espécimes analisados, devido a possibilidade de serem obtidas várias secções.

Os dados das microtomografias computadorizadas realizadas nesse estudo sugeriram que esses tumores já apresentavam o maior diâmetro e a profundidade em torno de 2,7 e 2,1 mm, respectivamente. Entretanto, esses resultados são preliminares, uma vez que para melhor determinar os limites desses tumores seria necessário o uso de um contraste específico para animais com o metabolismo tão alto como os camundongos. A falta de uma substância contrastante também não permitiu determinar o volume dos tumores, que foi o objetivo principal de se utilizar as microtomografias como exame complementar.

A qualidade e o aprimoramento das imagens da microtomografia são inquestionáveis, contudo, a microscopia de luz permite a observação de padrões morfológicos ou mesmo modificações histológicas como, por exemplo, respostas reacionais de um tecido ou disposição de fibras colágenas.

A análise ao microscópio de luz mostrou que os tumores induzidos nas línguas dos camundongos apresentaram alto índice mitótico e de invasividade, pequena quantidade de células inflamatórias, estroma escasso, além da presença de áreas de necrose em regiões centrais do tumor. Estas áreas de necrose estão relacionadas à morte de células neoplásicas, muito provavelmente devido à vascularização deficiente nas áreas mais centrais do tumor, já que as áreas adjacentes ao tecido conjuntivo, próximas a vasos sanguíneos, apresentavam proliferação celular intensa.

Os tumores induzidos nas línguas dos camundongos Balb-c foram submetidos à Terapia Fotodinâmica, cujas aplicações de fármaco e irradiações com laser foram realizadas, para cada grupo experimental, a cada 72 horas por três vezes. O intervalo entre os tratamentos, assim como o número de tratamentos a serem realizados, foram determinados a partir de dados obtidos em ensaios prévios. A remissão completa dos tumores induzidos foi observada somente quando o intervalo de tempo entre as aplicações da TFD foi de 72 horas.

De acordo com Busch (99), a TFD induz graves alterações agudas na fisiologia do tumor a partir do momento em que o FS é excitado. Essas alterações incluem efeitos sobre a oxigenação e o fluxo sanguíneo do tumor, que podem posteriormente determinar o resultado do tratamento. A hipóxia ocasionada pela TFD é conhecida como um dos mecanismos do efeito da TFD aos tecidos tumorais.

O dano vascular associado ao desenvolvimento de hipóxia após a TFD favorece a resposta ao tratamento, entretanto as conseqüências do dano vascular e da hipóxia durante a TFD podem ser mais complexas. Danos aos vasos sangüíneos durante a TFD podem comprometer o suprimento de oxigênio ao tumor. O oxigênio é necessário para a geração das espécies reativas de oxigênio, como o oxigênio *triplet*, que são fundamentais para provocar o dano tecidual aos (100).

Desta forma, é importante que o intervalo de tempo entre as aplicações da TFD seja suficiente para que o tecido tumoral recupere o oxigênio que foi consumido durante a primeira aplicação da terapia. Portanto, a segunda aplicação não deve ser realizada enquanto os tecidos tumorais não recuperarem o oxigênio, caso contrário essa segunda aplicação da TFD pode não ser efetiva devido à escassez de oxigênio tecidual. Como a TFD provoca danos tanto nas células tumorais como nos vasos sangüíneos associados ao tumor, a reposição de oxigênio se torna dificultada após a aplicação da TFD. Assim, o número de tratamentos a serem realizados e o intervalo entre eles devem ser cuidadosamente avaliados para que a TFD promova o máximo de dano aos tecidos tumorais.

A eficácia da Terapia Fotodinâmica mediada pela AICIFt foi avaliada considerando-se dois parâmetros: a análise clínica e a análise histopatológica das línguas.

Pela análise clínica determinou-se que os camundongos que foram submetidos à TFD apresentaram diminuição da massa corporal, muito provavelmente devido ao processo de necrose induzido pela ação fotodinâmica da terapia na língua desses animais. Como a necrose ocasiona severa sintomatologia dolorosa, esses camundongos provavelmente apresentaram essa perda de massa corporal devido à dificuldade na alimentação. Entretanto, 72 horas depois esse processo de necrose regrediu, o que permitiu que os animais pudessem se alimentar com menos dificuldade e recuperassem o peso corporal normal. Já os animais que não foram submetidos à terapia fotodinâmica apresentavam crescimento gradativo dos tumores e conseqüentemente maior dificuldade na alimentação, que persistiu por mais tempo. Isso talvez explique a diminuição da massa corporal mais acentuada do que nos animais submetidos à TFD.

A significativa perda de massa corporal em pacientes com câncer pode estar associada a outros fatores além da diminuição da ingestão de alimentos, tais como a diminuição da atividade física e acelerada degradação de proteínas, um processo denominado de caquexia neoplásica. Nesse processo, quando um organismo é portador de um tumor, ele torna-se energeticamente mais ineficiente, o que leva a um aumento do gasto energético. Desse modo, o consumo da glicose é transitório, o organismo começa a utilizar o glicogênio hepático e muscular o que pode manter as funções energéticas por até 72 horas de inanição (101). A partir daí, o organismo começa a utilizar outras fontes energia, o que se dá por meio da lipólise dos lipídios do tecido adiposo e da proteólise das proteínas musculares. O consumo desses tecidos leva à diminuição do tecido adiposo, diminuição da massa muscular e, conseqüentemente, à perda de massa corporal (102). Segundo van Bokhorst-de van der Schueren e cols. (103) o estado de desnutrição aguda com significativa perda de massa corporal é um sinal clínico bastante freqüente em pacientes com câncer, em especial pacientes com câncer bucal.

Além da perda de massa corporal os animais que não foram submetidos à TFD apresentaram perda de pêlos pelo corpo. Esse fenômeno de perda parcial de pêlos, denominado alopecia, não foi observado nos animais submetidos à TFD. De acordo com Rushton e cols. (104) a alopecia pode estar relacionada à deficiência de nutrientes como o ferro e alguns aminoácidos essenciais como a L-Lisina.

Pela avaliação clínica observou-se também a remissão completa dos tumores em 100% dos animais submetidos à TFD, o que foi confirmado pelas análises histopatológicas. Entretanto, a ação fotodinâmica da terapia alterou a arquitetura histológica das línguas desses animais. De acordo com Golab e cols. (105) e Korbélik e cols. (106) a TFD não é muito seletiva em termos de efeitos citotóxicos exercidos contra as células que formam o tumor. Portanto, tanto as células tumorais quanto as células normais adjacentes são letalmente danificadas pela TFD. Dentre as alterações observadas, destacam-se as das fibras musculares esqueléticas, principal tecido constituinte da língua. A degeneração dessas fibras musculares pode ser decorrente de distúrbios no metabolismo das proteínas, em que as fibras musculares estriadas apresentam coagulação das proteínas do sarcoplasma. Segundo Laurens e cols. (107), essa alteração no metabolismo das proteínas leva à

perda da estriação e ruptura das fibras musculares por dissolução do sarcoplasma, o que desencadeia a degeneração do tecido muscular e intensa reação inflamatória.

A principal via de morte tecidual observada nesse estudo foi a necrose. Tapajós e cols. (108) mostraram, em estudos *in vitro* com queratinócito bucais humanos, que a TFD mediada pela AICIFt induz morte celular por necrose. Essa necrose foi induzida por espécies reativas de oxigênio resultantes da reação fotodinâmica que reagiram diretamente com biomoléculas celulares, levando a alterações na permeabilidade da membrana plasmática. De acordo com Castano e cols. (63) a peroxidação lipídica é a causa primária para a ocorrência de necrose, pois a inativação da membrana mitocondrial desorganiza todo o sistema de transporte e de energia dentro da célula.

Além da ação fotodinâmica direta nas células, pode ter ocorrido também um dano aos vasos sangüíneos, o que ocasionou isquemia e hipóxia celular. Como conseqüência disso, as células neoplásicas e o tecido como um todo foram levados à necrose coagulativa, que eliminou a lesão. Resultados semelhantes foram obtidos por Longo e Cols. (109), que demonstraram a atuação direta da AICIFt sobre as células tumorais, o que provoca necrose tecidual, além de dano aos vasos sangüíneos associados ao tumor. Além disso, também foi relatado nesse estudo que a estrutura vascular normal dos tecidos não tumorais foi preservada, o que indica que o dano aos vasos sangüíneos foi seletivo aos vasos associados ao tumor. Kobayashi e cols. (110) demonstraram que a TFD induz danos no endotélio de pequenos vasos sangüíneos de tumores de língua em camundongos. Os autores mostraram ainda que, devido aos danos vasculares, ocorria hemorragia, trombose e exsudação fibrosa, fatores que desencadeavam a necrose.

As modificações induzidas pela TFD na membrana plasmática também desencadeiam a transdução de sinais que podem ativar ou inibir, entre outras, a secreção de citocinas pró-inflamatórias importantes na resposta imune contra os tumores (51, 63). Como citado anteriormente, as análises histopatológicas das línguas dos animais submetidos à TFD mostraram invasão de células inflamatórias no tecido necrosado.

Após 21 dias do término da TFD as análises histopatológicas indicavam ligeira regeneração do tecido muscular nas línguas dos animais submetidos à

terapia. Isso porque, nessa fase, o tecido muscular apresentava uma estrutura melhor organizada, inclusive com rearranjo das fibras musculares que se mostravam delgadas, possivelmente recém formadas e com direcionamento em três planos de corte.

Estudos de regeneração tecidual têm demonstrado que, apesar das células musculares não proliferarem, o músculo esquelético após lesão pode apresentar pequena capacidade regenerativa. Nesse processo, fatores liberados pelo músculo lesionado ativam células inflamatórias intramusculares e estas produzem sinais quimiotáticos que recrutam células inflamatórias da circulação. Os neutrófilos são as primeiras células inflamatórias a invadir o músculo lesionado, onde liberam bradicinina, prostaglandinas e histamina, o que causa vasodilatação e aumento da permeabilidade dos pequenos vasos. Após a infiltração de neutrófilos, os macrófagos invadem o tecido lesionado para fagocitá-lo e ativar células satélites. Uma vez ativadas, essas células proliferam e se fundem umas às outras para formar novas fibras musculares esqueléticas. Por fim ocorre a remodelação do tecido lesionado caracterizada pela maturação das miofibrilas e restauração da capacidade funcional das células musculares (107, 111).

Entretanto, a regeneração muscular visualizada nas línguas dos animais submetidos à TFD muito provavelmente não será completa, pois as análises histológicas mostraram a presença de bastante tecido conjuntivo celular nos locais onde deveriam existir fibras musculares, o que indica a ocorrência de um processo de cicatrização tecidual. Vale ressaltar que diante de grandes destruições teciduais, que ultrapassam os limites da regeneração, a reposição tecidual ocorre por meio da proliferação de células menos diferenciadas, como as pertencentes ao tecido conjuntivo. Nesse contexto, pode-se inferir que nesse estudo, a destruição tecidual provocada pela TFD foi intensa.

O sítio preferencial para a ocorrência de metástases provenientes de lesões malignas do terço anterior da boca são os linfonodos cervicais (112, 113). Por isso, neste estudo, além das línguas, também foram avaliados os linfonodos cervicais de modo a verificar a possível ocorrência de metástase. A análise histopatológica dos linfonodos cervicais mostrou invasão de células neoplásicas nesses linfonodos, o

que indica um processo de metástase nos animais que não foram submetidos à TFD.

Contudo, nos animais submetidos à TFD, apesar de se observar algumas células com morfologia atípica, a análise não foi conclusiva em relação à ocorrência de metástase nesses animais. Isso porque a densidade celular nos linfonodos desses animais se assemelhava à do controle negativo, o que dificultou diferenciar se realmente existiam células neoplásicas. A análise por imunohistoquímica poderia confirmar se ocorreu metástase ou ainda se a TFD foi capaz de inibir esse processo.

Diante ao exposto acima, é plausível acreditar que os resultados obtidos neste estudo, quando somados a outros da literatura, possam contribuir para o desenvolvimento de estratégias que definam um protocolo para a aplicação da Terapia Fotodinâmica como tratamento dos cânceres de cabeça e pescoço, em especial o do câncer de boca.

6 CONCLUSÕES

6. Conclusões

De acordo com os resultados obtidos neste estudo, é lícito concluir que:

1. A Terapia Fotodinâmica foi eficaz na remissão completa dos tumores induzidos nas línguas de camundongos Balb-c a partir de suspensões celulares do tumor ascítico de Ehrlich.
2. A toxicidade induzida pela Terapia Fotodinâmica ocorre por meio de necrose
3. Após o processo de necrose tecidual induzido pela Terapia Fotodinâmica ocorre regeneração tecidual com a formação de cicatrização de tecido conjuntivo.
4. Os animais submetidos à Terapia Fotodinâmica apresentaram boas condições de sobrevivência, inclusive em relação a alimentação e ao peso corporal.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Merlo LM, Pepper JW, Reid BJ, Maley CC. Cancer as an evolutionary and ecological process. *Nat Rev Cancer*. 2006 Dec;6(12):924-35.
2. Malumbres M, Barbacid M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer*. 2009 Mar;9(3):153-66.
3. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000 Jan 7;100(1):57-70.
4. World Health Organization. World Cancer Report 2008. International agency for research on Cancer. Lyon 2008.
5. Artandi SE, DePinho RA. Telomeres and telomerase in cancer. *Carcinogenesis*. 2009 Jan;31(1):9-18.
6. Weinberg RA. Coevolution in the tumor microenvironment. *Nat Genet*. 2008 May;40(5):494-5.
7. Weinberg RA. Mechanisms of malignant progression. *Carcinogenesis*. 2008 Jun;29(6):1092-5.

8. Petersen PE. Oral cancer prevention and control--the approach of the World Health Organization. *Oral Oncol.* 2009 Apr-May;45(4-5):454-60.
9. Fritz A, Percy C, Jack A, et al. International classification of diseases for oncology, 3rd ed. Geneva: World Health Organization. 2000.
10. Shah JP, Gil Z. Current concepts in management of oral cancer--surgery. *Oral Oncol.* 2009 Apr-May;45(4-5):394-401.
11. Tsantoulis PK, Kastrinakis NG, Tourvas AD, Laskaris G, Gorgoulis VG. Advances in the biology of oral cancer. *Oral Oncol.* 2007 Jul;43(6):523-34.
12. Warnakulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncol.* 2009 Apr-May;45(4-5):309-16.
13. Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM. GLOBOCAN 2002: Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide. IARC CancerBase No 5 Version 2.0 Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. 2004.
14. de Camargo Cancela M, Voti L, Guerra-Yi M, Chapuis F, Mazuir M, Curado MP. Oral cavity cancer in developed and in developing countries: population-based incidence. *Head Neck.* 2009 Mar;32(3):357-67.
15. Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2010: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer. – Rio de Janeiro: INCA. Biblioteca Virtual em Saúde - BVS/MS (<http://bvsms.saude.gov.br/bvs/controlecancer>). 2009.

16. Marron M, Boffetta P, Zhang ZF, Zaridze D, Wunsch-Filho V, Winn DM, et al. Cessation of alcohol drinking, tobacco smoking and the reversal of head and neck cancer risk. *Int J Epidemiol*. 2009 Feb;39(1):182-96.
17. Conway DI, McKinney PA, McMahon AD, Ahrens W, Schmeisser N, Benhamou S, et al. Socioeconomic factors associated with risk of upper aerodigestive tract cancer in Europe. *Eur J Cancer*. 2009 Feb;46(3):588-98.
18. Garavello W, Lucenteforte E, Bosetti C, La Vecchia C. The role of foods and nutrients on oral and pharyngeal cancer risk. *Minerva Stomatol*. 2009 Jan-Feb;58(1-2):25-34.
19. Goldenberg D, Brooksby C, Hollenbeak CS. Age as a determinant of outcomes for patients with oral cancer. *Oral Oncol*. 2009 Aug;45(8):e57-61.
20. Lucenteforte E, Garavello W, Bosetti C, La Vecchia C. Dietary factors and oral and pharyngeal cancer risk. *Oral Oncol*. 2009 Jun;45(6):461-7.
21. Popovic B, Jekic B, Novakovic I, Lukovic L, Konstantinovic V, Babic M, et al. Cancer genes alterations and HPV infection in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2010 Jun 23.
22. Shaw R, Robinson M. The increasing clinical relevance of human papillomavirus type 16 (HPV-16) infection in oropharyngeal cancer. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2010 Aug 18.

23. Kojima A, Maeda H, Sugita Y, Tanaka S, Kameyama Y. Human papillomavirus type 38 infection in oral squamous cell carcinomas. *Oral Oncol.* 2002 Sep;38(6):591-6.
24. Liu L, Kumar SK, Sedghizadeh PP, Jayakar AN, Shuler CF. Oral squamous cell carcinoma incidence by subsite among diverse racial and ethnic populations in California. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008 Apr;105(4):470-80.
25. Warnakulasuriya S. Living with oral cancer: epidemiology with particular reference to prevalence and life-style changes that influence survival. *Oral Oncol.* 2010 Jun;46(6):407-10.
26. Chandu A, Smith AC, Rogers SN. Health-related quality of life in oral cancer: a review. *J Oral Maxillofac Surg.* 2006 Mar;64(3):495-502.
27. Lung T, Tascau OC, Almasan HA, Muresan O. Head and neck cancer, treatment, evolution and post therapeutic survival - Part 2: a decade's results 1993-2002. *J Craniomaxillofac Surg.* 2007 Mar;35(2):126-31.
28. Kalavrezos N, Bhandari R. Current trends and future perspectives in the surgical management of oral cancer. *Oral Oncol.* 2010 Jun;46(6):429-32.
29. Choong N, Vokes E. Expanding role of the medical oncologist in the management of head and neck cancer. *CA Cancer J Clin.* 2008 Jan-Feb;58(1):32-53.

30. Messadi DV, Wilder-Smith P, Wolinsky L. Improving oral cancer survival: the role of dental providers. *J Calif Dent Assoc.* 2009 Nov;37(11):789-98.
31. Crozier E, Sumer BD. Head and neck cancer. *Med Clin North Am.* 2010 Sep;94(5):1031-46.
32. Genden EM, Ferlito A, Silver CE, Takes RP, Suarez C, Owen RP, et al. Contemporary management of cancer of the oral cavity. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2010 Jul;267(7):1001-17.
33. Ruddy K, Mayer E, Partridge A. Patient adherence and persistence with oral anticancer treatment. *CA Cancer J Clin.* 2009 Jan-Feb;59(1):56-66.
34. Warnakulasuriya S. Significant oral cancer risk associated with low socioeconomic status. *Evid Based Dent.* 2009;10(1):4-5.
35. Warnakulasuriya S. Causes of oral cancer--an appraisal of controversies. *Br Dent J.* 2009 Nov 28;207(10):471-5.
36. Meurman JH. Infectious and dietary risk factors of oral cancer. *Oral Oncol.* 2010 Jun;46(6):411-3.
37. Warnakulasuriya S, Dietrich T, Bornstein MM, Casals Peidro E, Preshaw PM, Walter C, et al. Oral health risks of tobacco use and effects of cessation. *Int Dent J.* 2010 Feb;60(1):7-30.

38. Calabrese L, Giugliano G, Bruschini R, Ansarin M, Navach V, Grosso E, et al. Compartmental surgery in tongue tumours: description of a new surgical technique. *Acta Otorhinolaryngol Ital.* 2009 Oct;29(5):259-64.
39. Ord RA, Blanchaert RH, Jr. Current management of oral cancer. A multidisciplinary approach. *J Am Dent Assoc.* 2001 Nov;132 Suppl:19S-23S.
40. Kamstra JI, Jager-Wittenaar H, Dijkstra PU, Huisman PM, van Oort RP, van der Laan BF, et al. Oral symptoms and functional outcome related to oral and oropharyngeal cancer. *Support Care Cancer.* 2010 Aug 13.
41. Biel MA. Photodynamic therapy treatment of early oral and laryngeal cancers. *Photochem Photobiol.* 2007 Sep-Oct;83(5):1063-8.
42. Hopper C, Niziol C, Sidhu M. The cost-effectiveness of Foscan mediated photodynamic therapy (Foscan-PDT) compared with extensive palliative surgery and palliative chemotherapy for patients with advanced head and neck cancer in the UK. *Oral Oncol.* 2004 Apr;40(4):372-82.
43. Wineland AM, Stack BC, Jr. Modern methods to predict costs for the treatment and management of head and neck cancer patients: examples of methods used in the current literature. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* 2008 Apr;16(2):113-6.
44. Luksiene Z. Photodynamic therapy: mechanism of action and ways to improve the efficiency of treatment. *Medicina (Kaunas).* 2003;39(12):1137-50.

45. Dolmans DE, Fukumura D, Jain RK. Photodynamic therapy for cancer. *Nat Rev Cancer*. 2003 May;3(5):380-7.
46. Jarvi MT, Niedre MJ, Patterson MS, Wilson BC. Singlet oxygen luminescence dosimetry (SOLD) for photodynamic therapy: current status, challenges and future prospects. *Photochem Photobiol*. 2006 Sep-Oct;82(5):1198-210.
47. Samia AC, Dayal S, Burda C. Quantum dot-based energy transfer: perspectives and potential for applications in photodynamic therapy. *Photochem Photobiol*. 2006 May-Jun;82(3):617-25.
48. Price M, Terlecky SR, Kessel D. A role for hydrogen peroxide in the pro-apoptotic effects of photodynamic therapy. *Photochem Photobiol*. 2009 Nov-Dec;85(6):1491-6.
49. Nyst HJ, Tan IB, Stewart FA, Balm AJ. Is photodynamic therapy a good alternative to surgery and radiotherapy in the treatment of head and neck cancer? *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2009 Mar;6(1):3-11.
50. Castano AP, Demidova TN, Hamblin MR. Mechanisms in photodynamic therapy: part two--cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2005;2(1):1-23.
51. Garg AD, Nowis D, Golab J, Agostinis P. Photodynamic therapy: illuminating the road from cell death towards anti-tumour immunity. *Apoptosis*. 2010 Sep;15(9):1050-71.

52. Robertson CA, Evans DH, Abrahamse H. Photodynamic therapy (PDT): a short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT. *J Photochem Photobiol B*. 2009 Jul 17;96(1):1-8.
53. Bhuvanewari R, Gan YY, Lucky SS, Chin WW, Ali SM, Soo KC, et al. Molecular profiling of angiogenesis in hypericin mediated photodynamic therapy. *Mol Cancer*. 2008;7:56.
54. Choi H, Lim W, Kim JE, Kim I, Jeong J, Ko Y, et al. Cell death and intracellular distribution of hematoporphyrin in a KB cell line. *Photomed Laser Surg*. 2009 Jun;27(3):453-60.
55. Buytaert E, Dewaele M, Agostinis P. Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy. *Biochim Biophys Acta*. 2007 Sep;1776(1):86-107.
56. Plaetzer K, Kiesslich T, Oberdanner CB, Krammer B. Apoptosis following photodynamic tumor therapy: induction, mechanisms and detection. *Curr Pharm Des*. 2005;11(9):1151-65.
57. Rich T, Allen RL, Wyllie AH. Defying death after DNA damage. *Nature*. 2000 Oct 12;407(6805):777-83.
58. Bobrov N, Cavarga I, Longauer F, Rybarova S, Fedorocko P, Brezani P, et al. Histomorphological changes in murine fibrosarcoma after hypericin-based photodynamic therapy. *Phytomedicine*. 2007 Feb;14(2-3):172-8.

59. Ferrario A, von Tiehl KF, Rucker N, Schwarz MA, Gill PS, Gomer CJ. Antiangiogenic treatment enhances photodynamic therapy responsiveness in a mouse mammary carcinoma. *Cancer Res.* 2000 Aug 1;60(15):4066-9.
60. Krammer B. Vascular effects of photodynamic therapy. *Anticancer Res.* 2001 Nov-Dec;21(6B):4271-7.
61. Wong TW, Tracy E, Oseroff AR, Baumann H. Photodynamic therapy mediates immediate loss of cellular responsiveness to cytokines and growth factors. *Cancer Res.* 2003 Jul 1;63(13):3812-8.
62. Almeida RD, Manadas BJ, Carvalho AP, Duarte CB. Intracellular signaling mechanisms in photodynamic therapy. *Biochim Biophys Acta.* 2004 Sep 20;1704(2):59-86.
63. Castano AP, Mroz P, Hamblin MR. Photodynamic therapy and anti-tumour immunity. *Nat Rev Cancer.* 2006 Jul;6(7):535-45.
64. Mang TS. Lasers and light sources for PDT: past, present and future. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy.* 2004;1(1):43-8.
65. Barolet D. Light-emitting diodes (LEDs) in dermatology. *Semin Cutan Med Surg.* 2008 Dec;27(4):227-38.
66. Brancalion L, Moseley H. Laser and non-laser light sources for photodynamic therapy. *Lasers Med Sci.* 2002;17(3):173-86.

67. Chen J, Keltner L, Christophersen J, Zheng F, Krouse M, Singhal A, et al. New technology for deep light distribution in tissue for phototherapy. *Cancer J*. 2002 Mar-Apr;8(2):154-63.
68. Allison RR, Bagnato VS, Sibata CH. Future of oncologic photodynamic therapy. *Future Oncol*. 2010 Jun;6(6):929-40.
69. Castano AP, Demidova TN, Hamblin MR. Mechanisms in photodynamic therapy: part one--photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2004;1(4):279-93.
70. Allison RR, Downie GH, Cuenca R, Hu X-H, Childs CJH, Sibata CH. Photosensitizers in clinical PDT. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2004;1(1):27-42.
71. Juzeniene A, Peng Q, Moan J. Milestones in the development of photodynamic therapy and fluorescence diagnosis. *Photochem Photobiol Sci*. 2007 Dec;6(12):1234-45.
72. Allison RR, Sibata CH. Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: a clinical review. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2010 Jun;7(2):61-75.
73. Chatterjee DK, Fong LS, Zhang Y. Nanoparticles in photodynamic therapy: an emerging paradigm. *Adv Drug Deliv Rev*. 2008 Dec 14;60(15):1627-37.
74. Mognetti B, Di Carlo F, Berta GN. Animal models in oral cancer research. *Oral Oncol*. 2006 May;42(5):448-60.

75. Love WG, Duk S, Biolo R, Jori G, Taylor PW. Liposome-mediated delivery of photosensitizers: localization of zinc (II)-phthalocyanine within implanted tumors after intravenous administration. *Photochem Photobiol.* 1996 May;63(5):656-61.
76. Jaganathan SK, Mondhe D, Wani ZA, Pal HC, Mandal M. Effect of honey and eugenol on Ehrlich ascites and solid carcinoma. *J Biomed Biotechnol.* 2010;2010:989163.
77. Stewart HL, Snell KC, Dunham LJ, Schylen SM. Transplantable and transmissible tumors of animals. *British Journal of Surgery.* 1959;46(200):658-.
78. Bhowmick R, Girotti AW. Signaling events in apoptotic photokilling of 5-aminolevulinic acid-treated tumor cells: inhibitory effects of nitric oxide. *Free Radic Biol Med.* 2009 Sep 15;47(6):731-40.
79. Yoshida T, Tokashiki R, Ito H, Shimizu A, Nakamura K, Hiramatsu H, et al. Therapeutic effects of a new photosensitizer for photodynamic therapy of early head and neck cancer in relation to tissue concentration. *Auris Nasus Larynx.* 2008 Dec;35(4):545-51.
80. Peng Q, Berg K, Moan J, Kongshaug M, Nesland JM. 5-Aminolevulinic acid-based photodynamic therapy: principles and experimental research. *Photochemistry and photobiology.* 1997;65(2):235-51.
81. Peng Q, Warloe T, Berg K, Moan J, Kongshaug M, Giercksky KE, et al. 5-Aminolevulinic acid-based photodynamic therapy. *Cancer.* 1997;79(12):2282-308.

82. Kussovski V, Mantareva V, Angelov I, Orozova P, Wöhrle D, Schnurpfeil G, et al. Photodynamic inactivation of *Aeromonas hydrophila* by cationic phthalocyanines with different hydrophobicity. *FEMS microbiology letters*. 2009;294(2):133-40.
83. de Leeuw J, de Vijlder HC, Bjerring P, Neumann HA. Liposomes in dermatology today. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2009 May;23(5):505-16.
84. Derycke AS, de Witte PA. Liposomes for photodynamic therapy. *Adv Drug Deliv Rev*. 2004 Jan 13;56(1):17-30.
85. Barbugli PA, Siqueira-Moura MP, Espreafico EM, Tedesco AC. In vitro phototoxicity of liposomes and nanocapsules containing chloroaluminum phthalocyanine on human melanoma cell line. *J Nanosci Nanotechnol*. 2010 Jan;10(1):569-73.
86. Rosenthal I. Phthalocyanines as photodynamic sensitizers. *Photochem Photobiol*. 1991 Jun;53(6):859-70.
87. Gupta S, Dwarakanath BS, Muralidhar K, Koru-Sengul T, Jain V. Non-monotonic changes in clonogenic cell survival induced by disulphonated aluminum phthalocyanine photodynamic treatment in a human glioma cell line. *J Transl Med*.8:43.
88. Wainwright M. Photodynamic therapy: the development of new photosensitisers. *Anticancer Agents Med Chem*. 2008 Apr;8(3):280-91.

89. Nunes SM, Sguilla FS, Tedesco AC. Photophysical studies of zinc phthalocyanine and chloroaluminum phthalocyanine incorporated into liposomes in the presence of additives. *Braz J Med Biol Res.* 2004 Feb;37(2):273-84.
90. Brun PH, DeGroot JL, Dickson EF, Farahani M, Pottier RH. Determination of the in vivo pharmacokinetics of palladium-bacteriopheophorbide (WST09) in EMT6 tumour-bearing Balb/c mice using graphite furnace atomic absorption spectroscopy. *Photochem Photobiol Sci.* 2004 Nov-Dec;3(11-12):1006-10.
91. Kessel D. Photodynamic therapy and neoplastic disease. *Oncol Res.* 1992;4(6):219-25.
92. Palermo-Neto J, de Oliveira Massoco C, Robespierre de Souza W. Effects of physical and psychological stressors on behavior, macrophage activity, and Ehrlich tumor growth. *Brain Behav Immun.* 2003 Feb;17(1):43-54.
93. Silva AE, Serakides R, Ferreira E, Moraes JR, Ocarino Nde M, Cassali GD. [Effect of hypothyroidism on the solid form of Ehrlich tumor in intact or castrated adult female mice]. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2004 Dec;48(6):867-74.
94. Dunham LJ, Stewart HL. A survey of transplantable and transmissible animal tumors. *J Natl Cancer Inst.* 1953 Apr;13(5):1299-377.
95. Boyde A, De Clerck NM, Sasov A. MicroCT of bones and soft tissues. *Microsc Anal (UK Ed).* 2000:76, 0.

96. De Clerck NM, Meurrens K, Weiler H, Van Dyck D, Van Houtte G, Terpstra P, et al. High-resolution X-ray microtomography for the detection of lung tumors in living mice. *Neoplasia*. 2004 Jul-Aug;6(4):374-9.
97. Paulus MJ, Gleason SS, Kennel SJ, Hunsicker PR, Johnson DK. High resolution X-ray computed tomography: an emerging tool for small animal cancer research. *Neoplasia*. 2000 Jan-Apr;2(1-2):62-70.
98. Mercer CE, Anderson P, Davis GR. Sequential 3D X-ray microtomographic measurement of enamel and dentine ablation by an Er:YAG laser. *Br Dent J*. 2003 Jan 25;194(2):99-104; discussion 89.
99. Busch TM. Local physiological changes during photodynamic therapy. *Lasers Surg Med*. 2006 Jun;38(5):494-9.
100. Henderson BW, Gollnick SO, Snyder JW, Busch TM, Kousis PC, Cheney RT, et al. Choice of oxygen-conserving treatment regimen determines the inflammatory response and outcome of photodynamic therapy of tumors. *Cancer Res*. 2004 Mar 15;64(6):2120-6.
101. Tisdale MJ. Metabolic abnormalities in cachexia and anorexia. *Nutrition*. 2000 Oct;16(10):1013-4.
102. Argiles JM, Busquets S, Garcia-Martinez C, Lopez-Soriano FJ. Mediators involved in the cancer anorexia-cachexia syndrome: past, present, and future. *Nutrition*. 2005 Sep;21(9):977-85.

103. van Bokhorst-de van der Schueren MAE, Quak JJ, von Blomberg-van der Flier BME, Kuik DJ, Langendoen SI, Snow GB, et al. Effect of perioperative nutrition, with and without arginine supplementation, on nutritional status, immune function, postoperative morbidity, and survival in severely malnourished head and neck cancer patients. *Am J Clin Nutr.* 2001 February 1, 2001;73(2):323-32.
104. Rushton DH. Nutritional factors and hair loss. *Clin Exp Dermatol.* 2002 Jul;27(5):396-404.
105. Golab J, Wilczynski G, Zagodzón R, Stokłosa T, Dąbrowska A, Rybczyńska J, et al. Potentiation of the anti-tumour effects of Photofrin-based photodynamic therapy by localized treatment with G-CSF. *Br J Cancer.* 2000 Apr;82(8):1485-91.
106. Korbelik M. PDT-associated host response and its role in the therapy outcome. *Lasers Surg Med.* 2006 Jun;38(5):500-8.
107. Laurens N, Koolwijk P, de Maat MP. Fibrin structure and wound healing. *J Thromb Haemost.* 2006 May;4(5):932-9.
108. Tapajos EC, Longo JP, Simioni AR, Lacava ZG, Santos MF, Morais PC, et al. In vitro photodynamic therapy on human oral keratinocytes using chloroaluminum-phthalocyanine. *Oral Oncol.* 2008 Nov;44(11):1073-9.
109. Longo JPF, Lozzi SP, Simioni AR, Morais PC, Tedesco AC, Azevedo RB. Photodynamic therapy with aluminum-chloro-phthalocyanine induces necrosis and vascular damage in mice tongue tumors. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology.* 2009;94(2):143-6.

110. Kobayashi W, Liu Q, Nakagawa H, Sakaki H, Teh B, Matsumiya T, et al. Photodynamic therapy with mono-L-aspartyl chlorin e6 can cause necrosis of squamous cell carcinoma of tongue: experimental study on an animal model of nude mouse. *Oral Oncol.* 2006 Jan;42(1):46-50.
111. Grefte S, Kuijpers-Jagtman AM, Torensma R, Von den Hoff JW. Skeletal muscle development and regeneration. *Stem Cells Dev.* 2007 Oct;16(5):857-68.
112. Bello IO, Soini Y, Salo T. Prognostic evaluation of oral tongue cancer: means, markers and perspectives (I). *Oral Oncol.* 2010 Sep;46(9):630-5.
113. Scully C, Bagan JV. Recent advances in Oral Oncology. *Oral Oncol.* 2007 Feb;43(2):107-15.

ANEXO A – DOCUMENTO DE APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA - UnB
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - IB
COMITÊ DE ÉTICA NO USO ANIMAL - CEUA

Brasília, 25 de setembro de 2007

DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado “**APLICAÇÃO DA TERAPIA FOTODINÂMICA EM MODELOS *IN VIVO***”, UNBDOC nº 66063/2007, sob responsabilidade do Prof. Ricardo Bentes de Azevedo, foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.


Profa. Anamélia Lorenzetti Bocca
Coordenadora do CEUA

