

LARISSA NAVES DUARTE DE MELO

**PERFIL TRANSCRICIONAL DE CÉLULAS DERIVADAS DE
CARCINOMA EPIDERMÓIDE BUCAL APÓS TERAPIA
FOTODINÂMICA MEDIADA POR ALUMÍNIO-CLORO-
FTALOCIANINA**

BRASÍLIA

2012

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

LARISSA NAVES DUARTE DE MELO

**PERFIL TRANSCRICIONAL DE CÉLULAS DERIVADAS DE CARCINOMA
EPIDERMÓIDE BUCAL APÓS TERAPIA FOTODINÂMICA MEDIADA
POR ALUMÍNIO-CLORO-FTALOCIANINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal da Universidade de Brasília como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Biologia Animal.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Maria de Fátima Menezes Almeida Santos

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

BRASÍLIA

2012

Dedico este trabalho à minha família pelo exemplo de coragem, dedicação e persistência em suas metas. Em especial aos meus avós Tarcízio e Lourdes, que nos ensinaram desde cedo a importância do estudo e não mediram esforços para que todos nós alcançássemos nossos objetivos.

AGRADECIMENTOS

À minha querida mãe, que a partir de seu exemplo, me ensinou o valor da dedicação e da força de vontade. Obrigada pelo apoio incondicional e valiosos conselhos;

Aos meus irmãos João Pedro e Cecília por tornarem os meus dias muito mais alegres;

Aos demais familiares por serem pessoas de tão agradável convivência e sempre torcerem por mim;

Ao meu namorado Gustavo, pela compreensão e boa vontade em sempre me ajudar. O seu incentivo é fundamental para mim;

À minha querida Nina, por alegrar toda a família e pela constante companhia nos estudos durante as madrugadas;

Às minhas grandes amigas Débora e Kamila, por estarem sempre ao meu lado quando que precisei;

Às minhas amigas tão especiais Juliana, Maitê, Patrícia e Shélida, que compartilharam comigo todos esses anos de laboratório e que com certeza irão acompanhar todos os meus próximos passos;

À minha orientadora Prof^ª. Dra. Maria de Fátima Menezes de Almeida Santos, pela orientação, atenção e apoio durante todos os momentos da realização deste trabalho;

Ao meu querido co-orientador Prof. Ricardo Bentes de Azevedo, que me iniciou na pesquisa e que participou com carinho de todas as etapas desse trabalho. Agradeço a oportunidade de trabalhar ao seu lado, sempre aprendendo com sua sabedoria e idéias inovadoras;

Às professoras Adriana C. Bonomo, Rosângela V. de Andrade e Daniela M. de Oliveira, que gentilmente aceitaram participar da banca examinadora da defesa dessa dissertação. Tenho certeza que as suas observações serão muito valiosas;

À querida Jaque por ter contribuído muito para a minha formação, sempre com boa vontade e carinho;

A todos os colegas do Laboratório de Nanobiotecnologia: Camila, Grazi, Victoria, Ludmilla, Maria Luiza, Renatinha, Nat, Khéllida, Vanessa, Beatriz, Juliana, Karen, Paolín, Diego, Taynan, Luís, João Paulo. Vocês tornaram o meu cotidiano muito mais agradável, com excelentes conversas e encontros;

À Simoneide S. Silva por me ensinar a acreditar no invisível. A sua participação neste trabalho foi essencial;

Aos colegas do Laboratório de Terapia Gênica, que me acolheram com tanto carinho em seu local de trabalho. Em especial ao Prof. Dr. Ricardo Titze, que permitiu o meu acesso em seu laboratório, sempre com muita cordialidade;

À Senhora Zélia, peça fundamental para o funcionamento do Laboratório de Nanobiotecnologia. Não sei o que faríamos sem a sua competência e constante disposição em nos ajudar;

Ao Prof. Dr. Antônio Carlos Tedesco, em especial à Andreza Simione, por terem gentilmente cedido as amostras do fármaco utilizadas nesse trabalho;

À coordenação e aos funcionários do Programa de Pós-graduação em Biologia Animal da Universidade de Brasília pela presteza e eficiência com que atuam;

Aos órgãos de financiamento CAPES, CNPq, FINEP e FAP-DF por permitirem o desenvolvimento deste trabalho;

*“Não ande apenas pelo caminho traçado, pois ele
conduz somente até onde os outros já foram.”*

(Alexander Graham Bell)

RESUMO

A Terapia Fotodinâmica (TFD) tem sido estudada como um tratamento alternativo para o carcinoma epidermóide bucal (OSCC). A TFD atua quando um fármaco fotossensibilizante é excitado por uma fonte de luz, gerando espécies reativas de oxigênio na presença de oxigênio molecular. O conhecimento sobre a modulação gênica das células OSCC após a TFD poderia aumentar tanto a efetividade quanto a especificidade desse tratamento. Nesse estudo, o perfil transcricional das células OSCC-3 foi analisado após incubação com o fotossensibilizante alumínio-cloro-ftalocianina (AlClPc), após a irradiação com laser de comprimento de onda de 670nm e após a TFD. Também foram investigados a citotoxicidade e genotoxicidade pelo ensaio de metabolização mitocondrial, integridade de membrana, morfologia celular, apoptose e fragmentação de DNA. As alterações na expressão gênica foram analisadas por PCR-Array. Foram avaliados genes relacionados com oncogênese, supressão tumoral, adesão celular, ciclo celular, apoptose, invasão e metástase e resposta imune. Os resultados mostraram redução na viabilidade celular após a TFD principalmente por necrose. A TFD aumenta o dano ao DNA 8h após o tratamento. A AlClPc altera de forma discreta a expressão gênica quando comparada ao controle. Já a irradiação suprimiu a maioria dos genes analisados quando avaliados 2h após o tratamento. Em contraste, a TFD estimulou a maioria dos genes avaliados em 8h, sugerindo que as células sobreviventes poderiam adotar um comportamento mais agressivo. Em conclusão, as alterações do perfil gênico das células OSCC-3 indicam que a TFD mediada por AlClPc deve ser utilizada como terapia principal somente em tumores pequenos, em que há a chance de que haja células sobreviventes seja mínima, ou de maneira adjuvante a outra terapia.

Palavras-chave: terapia fotodinâmica; alumínio-cloro-ftalocianina lipossomal; câncer bucal; expressão gênica.

ABSTRACT

Photodynamic therapy (PDT) has been studied as an alternative treatment of oral squamous cell carcinoma (OSCC), based on the excitation of a photosensitizer drug by a light source allowing it to interact with biomolecules generating reactive oxygen species in the presence of molecular oxygen. The knowledge of gene modulation of OSCC cells after PDT could increase both effectiveness and specificity of this treatment. In this study, the transcriptional profile of OSCC cells was analyzed after incubation with the photosensitizer chloroaluminum-phthalocyanine (AlClPc), after the irradiation with a 670nm laser and after PDT. It were also investigated the cytotoxic and genotoxic by the mitochondrial metabolism, membrane integrity, cell morphology, apoptosis and DNA fragmentation. Gene expression alterations were analyzed by PCR-array. The genes evaluated were related to oncogenesis, tumor suppression, cell adhesion, cell cycle, apoptosis, invasion and metastasis and immune response. The results showed reduction in cell viability after PDT mainly by a necrotic cell death. PDT also increases DNA damage at 8h. The photosensitizer AlClPc discreetly alter the gene expression when compared to control. The irradiation suppressed most genes expression analyzed mostly at 2h. In contrast, PDT stimulated almost all genes at 8h when compared to tumor, suggesting that survival cells could adopt a more aggressive behavior. In conclusion, gene profile alterations of OSCC-3 cells indicate that PDT mediated by AlClPc should be used as the main therapy only in small tumors with minimal chance of survival tumors cells or as an adjuvant therapy.

Keywords: photodynamic therapy; chloroaluminum phthalocyanine liposomal; oral cancer; gene expression.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Seletividade do fármaco para área tumoral.....	7
Figura 2. Mecanismo de ação da TFD.....	8
Figura 3. Desenho experimental por etapas.....	20
Figura 4. Desenho experimental do PCR-Array.....	30
Figura 5. Perfil eletroforético do RNA das células OSCC-3 em 2h.....	33
Figura 6. Estabilidade do fotossensibilizante AICIPc lipossomal avaliada por fluorescência.....	40
Figura 7. Estabilidade do fotossensibilizante AICIPc lipossomal avaliada por sua capacidade de gerar ERO.....	41
Figura 8. Avaliação da citotoxicidade do fotossensibilizante AICIPc lipossomal no escuro em células OSCC-3.....	42
Figura 9. Avaliação do efeito fotodinâmico da TFD mediada pelo fotossensibilizante AICIPc lipossomal em células OSCC-3.....	43
Figura 10. Determinação do protocolo da TFD.....	44
Figura 11. Citotoxicidade induzida pela TFD nas células OSCC-3 avaliada por meio de análise de metabolismo celular – MTT.....	45
Figura 12. Citotoxicidade induzida pela TFD nas células OSCC-3 avaliada por meio da análise de integridade da membrana.....	46
Figura 13. Citotoxicidade induzida pela TFD nas células OSCC-3 avaliada por meio da análise da morfologia celular em microscopia óptica em contraste de fases.....	48
Figura 14. Citotoxicidade induzida pela TFD nas células OSCC-3 avaliada por meio da análise da morfologia celular em citômetro de fluxo.....	48

Figura 15. Detecção da apoptose induzida nas células OSCC-3 pela TFD...	49
Figura 16. Avaliação da fragmentação de DNA induzida pela TFD.....	50
Figura 17. Perfil de expressão gênica das células OSCC-3 induzido pelo fotossensibilizante AICIPc lipossomal.....	53
Figura 18. Perfil de expressão gênica das células OSCC-3 induzido pela irradiação com o laser em comprimento de onda de 670nm.....	55
Figura 19. Perfil de expressão gênica das células OSCC-3 induzido pela TFD mediada por AICIPc lipossomal.....	58
Figura 20. Vias biológicas alteradas nas células OSCC-3 após tratamento com AICIPc, Laser e TFD.....	71
Figura 21. Representação gráfica dos principais resultados de avaliação do perfil transcricional obtidos em cada grupo experimental.....	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estimativas das taxas brutas de incidência de câncer para o ano de 2012 (INCA 2012).....	2
Tabela 2. Grupos experimentais utilizados para definir o protocolo de aplicação para a Terapia Fotodinâmica.....	26
Tabela 3. Genes avaliados no perfil transcricional de células OSCC-3 após TFD pelo ensaio de PCR-Array.....	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
AICIPc	Alumínio-cloro-ftalocianina
CAA	Células apresentadoras de antígenos
CDK	<i>Cyclin dependent kinases</i>
cDNA	<i>Complementary deoxyribonucleic acid</i>
CEB	Carcinoma epidermóide bucal
CO ₂	Dióxido de carbono
Ct	<i>Threshold cycle</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
EMT	<i>Ephitelial mesenquimal transition</i>
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
FSC	<i>Forward scatter</i>
GST	Genes supressores tumorais
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
INCA	Instituto Nacional do Câncer
INCT	Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5 difeniltertrazolim brometo
NIH	<i>National Institute of Health</i>
¹ O ₂	Oxigênio singlete

O ₂	Oxigênio
OH [·]	Radical hidroxila
OMS	Organização Mundial da Saúde
OSCC-3	<i>Oral squamous cell carcinoma 3</i>
PCR-Array	<i>Polymerase chain reaction array</i>
qRT-PCR	<i>Quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RNase	Ribonuclease
SOD	Superóxido dismutase
SSC	<i>Side scatter</i>
TFD	Terapia fotodinâmica
UV	<i>Ultraviolet</i>
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Câncer	2
1.2 Carcinoma epidermóide bucal	4
1.3 Tratamentos para o carcinoma epidermóide bucal	5
1.4 Terapia Fotodinâmica.....	6
1.4.1 Mecanismo de ação da Terapia Fotodinâmica	7
1.4.2 Fotossensibilizantes	9
1.4.3 Fonte de luz	10
1.5 Terapia Fotodinâmica, resistência celular e alterações genéticas ..	11
2 OBJETIVOS	17
3 MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1 Desenho experimental	20
3.2 Fotossensibilizante alumínio-cloro-ftalocianina	21
3.3 Linhagem celular	21
3.3.1 Manutenção e propagação das células	22
3.4 Avaliação da estabilidade do fotossensibilizante	22
3.4.1 Determinação da fluorescência	23
3.4.2 Produção de espécies reativas de oxigênio	23
3.4.3 Ensaio de citotoxicidade no escuro e efeito fotodinâmico ...	24
3.5 Definição do protocolo de aplicação da TFD	25
3.6 Ensaio de citotoxicidade	27
3.6.1 Análise do metabolismo celular	27
3.6.2 Análise da integridade da membrana celular	27

3.6.3 Análise da morfologia celular	28
3.7 Detecção de apoptose	28
3.8 Análise da fragmentação do DNA	29
3.9 Análise estatística	30
3.10 Análise da expressão gênica	30
3.10.1 Extração de RNA	31
3.10.2 Purificação do RNA	32
3.10.3 Avaliação quantitativa e qualitativa do RNA extraído	32
3.10.4 Síntese do cDNA	33
3.10.5 PCR-Array	34
3.10.6 Análise dos dados do PCR-Array	37
4 RESULTADOS	
4.1 Avaliação da estabilidade do fotossensibilizante	38
4.1.1 Determinação da fluorescência	39
4.1.2 Produção de espécies reativas de oxigênio	40
4.1.3 Ensaio de citotoxicidade no escuro e estabilidade do efeito fotodinâmico	41
4.2 Definição do protocolo de aplicação da TFD	42
4.3 Ensaio de citotoxicidade	43
4.3.1 Análise do metabolismo celular	45
4.3.2 Análise da integridade da membrana celular	45
4.3.3 Análise da morfologia celular	46
4.4 Detecção de apoptose	47
4.5 Análise da fragmentação do DNA	49
4.6 Análise da expressão gênica após Terapia Fotodinâmica.....	50

4.6.1 Expressão gênica no grupo AICIPc.....	52
4.6.2 Expressão gênica no grupo Laser.....	54
4.6.3 Expressão gênica no grupo TFD.....	56
5 DISCUSSÃO.....	59
6 CONCLUSÃO.....	77
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	80

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Câncer

O envelhecimento populacional está levando ao aumento da incidência de doenças degenerativas em todo o mundo, principalmente de câncer. De acordo com a Organização Mundial de Saúde - OMS, estima-se que, no ano de 2030 haverá 27 milhões de casos incidentes de câncer. No Brasil, a estimativa de incidência de câncer para o ano de 2012, também válida para o ano de 2013, será de 518.510 novos casos, sendo desses 257.870 em indivíduos do sexo masculino e 260.640 em indivíduos do sexo feminino, conforme mostra a Tabela 1 (Instituto Nacional de Câncer - INCA, 2012).

Tabela 1. Estimativas para o ano de 2012, também válidas para o ano de 2013, das taxas brutas de incidência de câncer, em 100.000 habitantes, segundo localização tumoral e o sexo (INCA 2012).

Localização Primária Neoplasia Maligna	Estimativa dos Casos Novos							
	Homens				Mulheres			
	Estados		Capitais		Estados		Capitais	
	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta
Próstata	60.180	62,54	15.660	75,26	-	-	-	-
Mama Feminina	-	-	-	-	52.680	52,50	18.160	78,02
Colo do Útero	-	-	-	-	17.540	17,49	5.050	21,72
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.210	17,90	4.520	21,85	10.110	10,08	3.060	13,31
Cólon e Reto	14.180	14,75	4.860	23,24	15.960	15,94	5.850	25,27
Estômago	12.670	13,20	3.200	15,34	7.420	7,42	2.170	9,47
Cavidade Oral	9.990	10,41	2.760	13,34	4.180	4,18	1.130	4,92
Laringe	6.110	6,31	1.540	7,56	-	-	-	-
Bexiga	6.210	6,49	1.900	9,28	2.690	2,71	880	3,72
Esôfago	7.770	8,10	1.500	7,26	2.650	2,67	520	2,27
Ovário	-	-	-	-	6.190	6,17	2.220	9,53
Linfoma não Hodgkin	5.190	5,40	1.560	7,66	4.450	4,44	1.560	6,85
Glândula Tireoide	-	-	-	-	10.590	10,59	3.490	14,97
Sistema Nervoso Central	4.820	5,02	1.190	5,82	4.450	4,46	1.200	5,23
Leucemias	4.570	4,76	1.180	5,81	3.940	3,94	1.180	5,02
Corpo do Útero	-	-	-	-	4.520	4,53	1.700	7,39
Pele Melanoma	3.170	3,29	810	4,05	3.060	3,09	790	3,46
Outras Localizações	43.120	44,80	11.100	53,33	38.720	38,61	10.320	44,50
Subtotal	195.190	202,85	51.780	248,60	189.150	188,58	59.280	254,86
Pele não Melanoma	62.680	65,17	14.620	70,39	71.490	71,30	15.900	68,36
Todas as Neoplasias	257.870	267,99	66.400	318,79	260.640	259,86	75.180	323,22

*Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10

O câncer corresponde a um grupo de doenças decorrentes de desordens celulares induzidas por fatores externos, como agentes químicos, físicos ou biológicos, e internos, como fatores genéticos. Esses fatores podem ser responsáveis pela transformação de uma célula normal em uma célula cancerígena ao provocarem alterações genéticas e epigenéticas que ocorrem em genes específicos em determinado tipo celular. A ocorrência dessas alterações envolve ganho ou perda de função ou comprometimento da manutenção da integridade genômica. As principais características das células cancerígenas são: proliferação descontrolada, em que há produção dos seus próprios sinais de crescimento ignorando os fatores de inibição destinados a ela, capacidade de evasão da morte celular programada, indução da formação de novos vasos sanguíneos, e por fim, capacidade de invadir tecidos produzindo metástases tumorais (Hanahan et al., 2000; Weinberg, 2008).

Desse modo, o processo da carcinogênese passa por três estágios: iniciação, promoção e progressão. No estágio de iniciação, células saudáveis são expostas a substâncias carcinogênicas, que podem induzir alterações genéticas permanentes e cumulativas nas células. No estágio de promoção, as células geneticamente alteradas inicialmente passam por transformação maligna e início da expansão clonal sob a influência de agentes oncogênicos promotores, que podem atuar como mitógenos para a transformação celular. No estágio de progressão, ocorre aumento progressivo da instabilidade genética das células alteradas, levando à proliferação irreversível e descontrolada dessas células, formando uma massa tumoral (Ruddon, 2007).

1.2 Carcinoma epidermóide bucal

Dentre os diversos tipos de câncer destaca-se o câncer bucal, um problema global com taxas progressivamente maiores a cada ano (Warnakulasuriya et al., 2009). O câncer bucal inclui os cânceres de lábio, de mucosa bucal, de gengiva, de palato duro, de língua, glândulas salivares e de assoalho da boca (Tsantoulis et al., 2007).

O carcinoma epidermóide bucal - CEB - é o câncer bucal mais frequente, correspondendo a 90% dos cânceres dessa região. No Brasil, a estimativa de novos casos de CEB para o ano de 2012 é de 14.170 segundo o INCA, sendo desses mais de 70% em indivíduos do sexo masculino. O hábito de fumar e o etilismo são os principais fatores sociais e comportamentais relacionados ao CEB, sendo que o uso concomitante de tabaco e álcool pode aumentar em até 100 vezes a incidência deste tipo de câncer (Massano et al., 2006; Korostoff et al., 2011). O acesso limitado ao sistema de saúde pública também é um fator que deve ser considerado, pois o diagnóstico dessa doença é realizado na maioria das vezes de forma tardia, o que prejudica seu prognóstico (Brener et al., 2007).

Apesar dos avanços terapêuticos, as taxas de sobrevivência ao câncer bucal são extremamente baixas e não alteraram nos últimos 50 anos (Solomon et al., 2010). É importante ressaltar que a gravidade e a taxa de sobrevivência ao CEB são influenciadas pela localização e pelo estágio do tumor primário, além da presença ou não de metástase nos linfonodos regionais e em tecidos distantes (O'Donnell et al., 2005).

1.3 Tratamentos para o carcinoma epidermóide bucal

Os métodos terapêuticos aplicáveis ao câncer de boca são principalmente a cirurgia e a radioterapia, que podem ser utilizadas isoladamente ou de forma associada. Em estágios iniciais o CEB pode ser tratado com cirurgia ou radioterapia. Porém, em estágios mais avançados, esse tipo de câncer geralmente é tratado com cirurgia seguida de radioterapia (Nyst et al., 2009). Quando a ressecção cirúrgica não é possível, a radioterapia é utilizada juntamente com quimioterapia. Entretanto, nenhum dessas terapias tem se mostrado capaz de erradicar as células neoplásicas sem afetar os tecidos saudáveis adjacentes (Salmon et al., 2003; Fu-min et al., 2004).

Apesar do avanço das técnicas de reconstrução facial, as ressecções cirúrgicas ainda podem deixar deformidades estéticas e funcionais no paciente; além de facilitar também a instalação de infecções, sangramentos, parestesia, paralisia, trombose e embolia pulmonar (Campana et al., 2006). Já a radioterapia, dependendo da localização do tumor, pode afetar o tecido ósseo e estruturas anatômicas como glândulas salivares. Esse tratamento geralmente induz aumento de infecções focais, mucosite severa, hipossalivação, osteorradionecrose e perda do paladar, constituindo problemas que interferem diretamente no tratamento e na qualidade de vida do paciente (Vissink et al., 2003). A quimioterapia também induz efeitos adversos como mucosite, risco aumentado de infecções e osteonecrose, além de induzir ainda a aplasia de medula óssea (Poznak et al., 2010).

Diante do exposto, diversos estudos têm sido desenvolvidos para elaborar novas formas de tratamento para o câncer. Nesse contexto, a Terapia Fotodinâmica destaca-se como uma nova abordagem terapêutica no tratamento do câncer e tem sido

oferecida como proposta de inovação tecnológica com fins de suplantar as dificuldades atuais.

1.4 Terapia Fotodinâmica

A Terapia Fotodinâmica - TFD - consiste na aplicação sistêmica ou localizada de uma substância fotossensibilizante seguida por sua excitação por uma luz de comprimento de onda específico. Desta forma, há o desencadeamento de uma reação fotoquímica entre o fotossensibilizante e o oxigênio molecular, sendo o resultado dessa reação a formação de espécies reativas de oxigênio, ERO, que causam danos às células tumorais (Tresscheijn et al., 2007). Essa terapia é descrita como um tratamento mais seletivo ao tecido tumoral por induzir menores efeitos colaterais em outras estruturas do organismo. Essa seletividade pode se dar tanto pelo acúmulo preferencial do fármaco fotossensibilizante no tecido tumoral (Bhuvaneswari et al., 2009), quanto pelo fato de a irradiação ser direcionada à área específica da neoplasia. Vale lembrar que para suprir o tumor e permitir seu crescimento, as células tumorais estimulam a produção de fatores pró-angiogênicos como o fator de crescimento vascular endotelial - VEGF (Cook et al., 2010). Essa nova vascularização inclui a formação de vasos imperfeitos que permitem mais facilmente o fluxo do fármaco quando comparados com os vasos maduros presentes nas regiões sadias, conforme ilustrado na Figura 1. Associado a isso, a baixa presença de vasos linfáticos no tumor também permite a presença mais prolongada do fármaco nessa região (Wang et al., 2008).

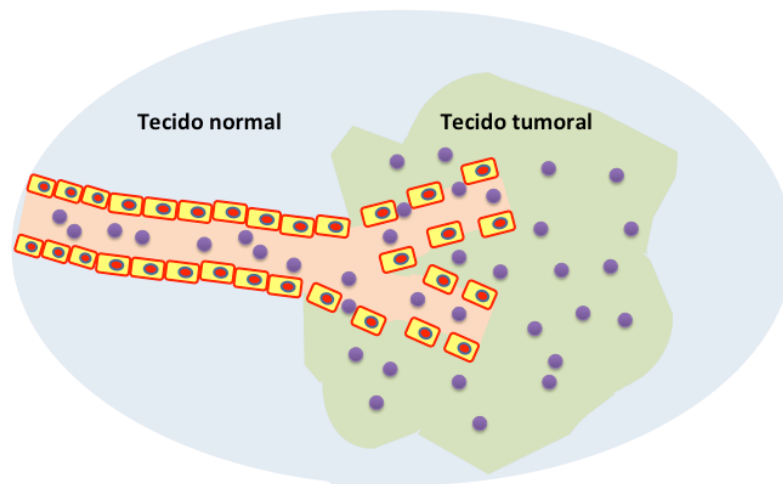


Figura 1. Seletividade do fármaco para área tumoral. Vasos imaturos da região tumoral permitem com mais facilidade o acúmulo passivo do fármaco vindo da corrente sanguínea nos tecidos. Figura adaptada de Wang et al., 2009.

1.4.1 Mecanismo de ação da Terapia Fotodinâmica

Conforme ilustrado na Figura 2, a ação da TFD, ou seja, o efeito fotodinâmico ocorre quando o fármaco fotossensibilizante ao ser irradiado absorve fótons da fonte de luz e seus elétrons passam a um estado excitado. Ao retornar ao seu estado fundamental, na presença de oxigênio, o fotossensibilizante transfere a energia ao oxigênio ou biomoléculas, gerando espécies altamente reativas, que podem oxidar componentes celulares (Dolmans et al., 2003).

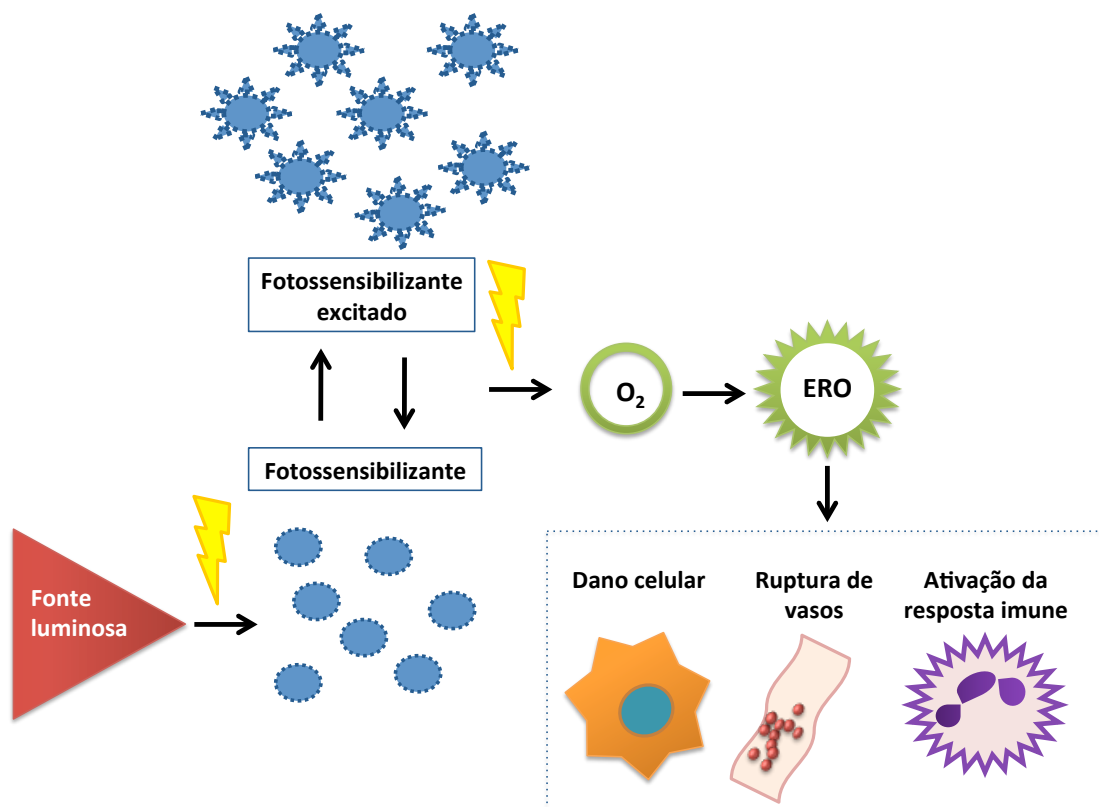


Figura 2. A TFD requer a interação entre três elementos: fonte luminosa, fotossensibilizante e oxigênio. Quando o fotossensibilizante é irradiado em comprimento de onda específico, ele passa a um estado excitado. Ao retornar a sua situação fundamental energética, ele pode excitar moléculas presentes nas células, gerando espécies reativas de oxigênio - ERO. Essas ERO são capazes de promover dano celular, ruptura de vasos e ativação da resposta imunológica.

Esse efeito fotodinâmico ocorre por meio de duas reações, denominadas de reação do Tipo I e do Tipo II. Na reação do Tipo I, o fotossensibilizante excitado transfere energia para o oxigênio ou biomoléculas, produzindo radicais livres ou outras espécies reativas de oxigênio, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH^\cdot). Na reação do Tipo II, o fotossensibilizante excitado transfere energia diretamente ao oxigênio tripleto para formar seu estado excitado, denominado oxigênio singlete (1O_2). As ERO tendem a interagir com estruturas próximas para atingir a estabilidade energética, comportando-se como receptores ou como doadores de elétrons. Assim, essas moléculas podem ligar-se a constituintes celulares tais como

lipídios de membranas, proteínas e DNA, ocasionando a morte celular de forma direta e rompendo os vasos sanguíneos responsáveis pela nutrição tumoral, que por sua vez podem induzir uma resposta imunológica do organismo (Dolmans et al., 2003; Triesscheijnet al., 2006).

1.4.2 Fotossensibilizantes

O sucesso da TFD está relacionado, entre outros fatores, à escolha do fármaco fotossensibilizante. Para ser considerado ideal, o fármaco fotossensibilizante deve apresentar alguns pré-requisitos tais quais: estabilidade físico-química, acumulação preferencial na área tumoral, pureza química, rápida excreção pelo organismo e alto rendimento de geração de ERO (Allison et al., 2004; Allison et al., 2010).

Diversos fotossensibilizantes já foram desenvolvidos e a classificação deles tem como base o período em que foram sintetizados. Os fármacos fotossensibilizantes de primeira geração são compostos derivados da porfirina e estão associados a diversos fatores que limitam suas aplicações clínicas como pouca seletividade, necessidade de grandes quantidades para obtenção de uma adequada eficiência e fototoxicidade cutânea elevada (Nowis et al., 2005).

A segunda geração de fotossensibilizantes foi desenvolvida com o objetivo de aprimorar os resultados obtidos com os fármacos de primeira geração. Esses novos fotossensibilizantes constituem principalmente porfirinas, derivados de clorinas e corantes (Chatterjee et al., 2008). Entre as diversas classes de fotossensibilizantes de segunda geração destacam-se as ftalocianinas, um grupo de compostos que absorve luz fortemente na faixa do vermelho visível, ou seja, entre 650-680nm. Por absorverem luz em um comprimento de onda mais elevado do que os

fotossensibilizantes de primeira geração, as ftalocianinas conseguem ser excitadas além da superfície tumoral, ou seja, em planos mais profundos do tecido. Além disso, a ser associação da ftalocianina a metais como o zinco, o alumínio, o cloro e o silício, aumentam a sua eficácia durante a fotossensibilização (Tomazini et al., 2007).

Entretanto, a maioria dos fotossensibilizantes, em especial os derivados de ftalocianinas, é altamente hidrofóbica, ou seja, pouco solúvel em soluções aquosas. Desta maneira, os fotossensibilizantes hidrofóbicos devem ser associados a uma estrutura que facilite o seu transporte no ambiente fisiológico (Kiesslich et al., 2006). Assim começaram a ser desenvolvidos os denominados fotossensibilizantes de terceira geração, que são os fármacos da primeira e da segunda geração conjugados com modificadores, como anticorpos ou nanopartículas (Allison et al., 2010).

Entre os sistemas de entrega drogas, destacam-se os lipossomas, compostos formados por uma bicamada de fosfolípídeos que podem inclusive ser associados a anticorpos, gerando um sistema que proporciona maior direcionamento do fotossensibilizante e induz menor quantidade de efeitos adversos (Derycke et al, 2004).

1.4.3 Fonte de luz

A fonte de luz é outro fator relevante para a TFD, por estar envolvida tanto com o sucesso do tratamento quanto com sua toxicidade (Alisson et al., 2008). O primeiro pré-requisito é que a luz seja emitida no comprimento de onda de absorção do fotossensibilizante, como citado anteriormente entre 650-680nm para as ftalocianinas. Além disso, a fonte de luz deve ser aplicada em potência adequada e com dose total de energia suficiente para induzir a destruição do tumoral (Mang et al.,

2008). A dose total de energia aplicada durante a irradiação da TFD é dependente tanto do tempo de irradiação quanto da área tumoral, bem como da potência aplicada, conforme demonstrado na equação abaixo:

$$\text{Dose total de energia (J/cm}^2\text{)} = \frac{\text{potência (Watts)} \times \text{tempo (segundos)}}{\text{área (cm}^2\text{)}}$$

Dentre as diversas fontes de luz que podem ser utilizadas para irradiar tecidos tumorais destacam-se os laser, pois emitem fótons com mesmo comprimento de onda e se propagam em uma única direção o que possibilita que a radiação seja focalizada em regiões diminutas. As variações do tempo de irradiação e da potência do laser podem alterar tanto os efeitos fotodinâmicos, como maior ou menor indução do sistema imunológico, quanto a taxa de citotoxicidade do tratamento (Huang et al., 2008; Singh et al, 2010).

1.5 Terapia Fotodinâmica, resistência celular e alterações genéticas

A variação da sensibilidade da TFD em diferentes tipos de câncer pode ser explicada por diferentes mecanismos protetores desenvolvidos pela célula tumoral. Estudos descrevem três principais mecanismos de resistência celular à TFD, sendo o primeiro deles a expressão de fatores antioxidantes pela célula tumoral como a glutathiona (Sattler et al., 2009). O segundo mecanismo é a expressão de enzimas envolvidas no metabolismo das ERO, como a superóxido dismutase - SOD (Golab et al., 2003). Por fim, o terceiro mecanismo está relacionado à alteração de síntese de

proteínas codificadas por genes induzidos ou suprimidos durante o estresse celular causado pela TFD (Agostinis et al., 2011).

A expressão de genes de diferentes classes funcionais pode ser alterada pela TFD, entre eles os que codificam proteínas envolvidas no processo de apoptose, ciclo celular, invasão e metástase, adesão celular e angiogênese. A expressão alterada de genes pode induzir a célula a um fenótipo tumoral mais agressivo, levando o tumor a apresentar maior resistência ou maior susceptibilidade ao tratamento. De uma maneira geral, a TFD pode alterar a expressão de dois grandes grupos de genes denominados oncogenes e genes supressores tumorais, GST, que atuam de maneira oposta na carcinogênese: o primeiro estimulando e o segundo inibindo esse processo.

Os genes que codificam os sinais indutores de proliferação e diferenciação celular, ou seja, proteínas que são fatores de crescimento, receptores de fatores de crescimento, elementos de sinalização das vias intracelulares, fatores de transcrição e reguladores de apoptose, são denominados de proto-oncogenes (Macdonald et al., 2004). Entretanto, quando expressos em um contexto temporal anormal, em quantidades excessivas, ou de forma aberrante podem desencadear proliferação celular descontrolada, inibição da diferenciação celular e bloqueio da apoptose, induzindo um processo de carcinogênese. Nesse caso, esses genes, são denominados de oncogenes (Croce, 2008).

A existência de um sistema de controle bem-desenhado dita que os componentes que promovem um processo sejam contra-balanceados por outros que se opõem a esse processo: enquanto os oncogenes atuam estimulando a proliferação celular, os GST atuam inibindo-a (Weinberg, 2008). Desse modo, os GST constituem um grupo de genes que age de maneira preventiva ao aparecimento de tumores no organismo. Eles atuam suprimindo a carcinogênese ao inibir a proliferação celular ou ao induzir a

apoptose. Quando os GST não estão expressos, as células adquirem a capacidade de sobreviver e proliferar mesmo em situações inapropriadas (Hanahan et al., 2000).

Uma vez estimulada a proliferação celular, diversos mecanismos moleculares serão acionados na tentativa de controlar o processo de divisão celular. Esse controle é realizado por proteínas ciclinas e também por cinases dependentes de ciclina - Cdk, que criam pontos de checagem em cada nova fase do ciclo celular. Enquanto os genes que codificam as Cdk são considerados proto-oncogenes, os inibidores de Cdk são considerados GST. Um exemplo disso é o gene p16 que quando suprimido, aumenta a atividade do complexo Cdk 4 - Ciclina D levando a ativação do fator de transcrição E2F que estimula a produção da Ciclina E, responsável pela progressão da fase G1 para a fase S (Molinolo et al., 2009). Outra proteína envolvida no mecanismo de checagem do ciclo celular é a p53. Ela atua como um GST restringindo a formação do tumor ao ativar um inibidor de CDK em resposta a danos no DNA ou induzindo uma morte celular programada, a apoptose (Wesierska-Gadek et al., 2009).

A apoptose é iniciada pela liberação da proteína citocromo C ou por sinalização dos receptores de morte celular, ambos ativando a cascata de caspases. As caspases por sua vez clivam substratos celulares levando a alterações bioquímicas e morfológicas características de células apoptóticas. A liberação do citocromo C é promovida pela família das proteínas Bcl-2, que durante a apoptose, induzem a abertura de canais na membrana das mitocôndrias permitindo a liberação da proteína citocromo C da mitocôndria para o citosol das células. Já os receptores de morte celular podem sinalizar um processo apoptótico ao serem ativados por ligantes específicos (Liu et al., 2011). A proteína Mdm-2 está normalmente ligada à proteína p53, o que faz com que essa última permaneça no citoplasma. Ao ser clivada pela

casca de caspases, a proteína Mdm-2 libera a p53, que se transloca para o núcleo ativando a transcrição de genes pró-apoptóticos como o BAX (Lahav et al., 2004).

A resistência à morte celular programada é uma característica de células malignas, o que faz da apoptose um alvo para vários tratamentos antineoplásicos (Mroz et al., 2011). O objetivo desses tratamentos seria tratar o tumor sem comprometer o equilíbrio imunológico do organismo. Por outro lado, a morte celular por necrose alerta o sistema de resposta do hospedeiro ao chamar atenção para o trauma local, rompe com a homeostase e pode promover a remoção dos remanescentes celulares pelo próprio sistema de defesa do corpo. Desta forma, a morte por necrose é alvo para terapias que buscam conciliar o tratamento em si com o aumento da resposta do próprio organismo. No caso da TFD, o efeito terapêutico pode estar relacionado com a ativação da resposta imune inespecífica, resultado da superexpressão de genes que codificam proteínas pró-inflamatórias e repressão de genes que codificam proteínas antiinflamatórias, denominadas citocinas. Exemplos de citocinas envolvidas na regulação positiva da inflamação são as interleucinas IL-1 β e IL-6, e na regulação negativa, a interleucina IL-10 (Mroz et al., 2010). Estudos têm demonstrado ativação da resposta imune específica contra o tumor tratado pela TFD. Nessa resposta, os fragmentos celulares gerados após a terapia são recolhidos por células apresentadoras de antígenos, CAA, como macrófagos e células dendríticas. As CAA são reconhecidas por linfócitos T que geram clones com antígenos antitumorais, levando a uma resposta do organismo mais específica para o tumor (Harrold-Kim et al., 2006). Acredita-se que ocorrerá não só uma ablação tumoral como também a prevenção em longo prazo de micrometástases (Harrold-Kim et al., 2006; Solomon et al., 2009).

O potencial metastático do CEB é um evento biológico relacionado a alterações do citoesqueleto das células e da expressão de algumas moléculas de adesão, como caderinas e glicoproteínas (Oliveira et al., 2010). A expressão reduzida dessas moléculas de adesão está associada à maior invasão e agressividade do tumor, o que é um dos aspectos mais desafiadores para o sucesso do tratamento antineoplásico.

Para que ocorra a invasão tumoral, além da perda de adesão celular, deve haver a degradação da membrana basal e também a transição epitélio-mesenquimal - EMT. Os dois primeiros permitem a entrada das células cancerígenas em vasos sanguíneos e linfáticos presentes no tecido conjuntivo subjacente. Já a EMT é a alteração no fenótipo das células tumorais que ocorre com a finalidade de essas se tornarem mais móveis e invasivas. A célula tumoral, que originalmente teria características epiteliais, passa a expressar genes que codificam proteínas típicas de células mesenquimais como a N-caderina, metaloproteinases, vimetina, fibronectina, receptor de fator de crescimento derivado de plaquetas e integrinas (Weinberg, 2008). O gene CDH1, por exemplo, que codifica a proteína E-caderina, responsável pela adesão entre células epiteliais, está suprimido ou inativado em carcinomas invasivos (Ziober et al., 2006).

Considerando que o estresse oxidativo promovido pela TFD pode induzir alterações no padrão da expressão gênica é plausível acreditar que as células que resistiram a TFD poderiam também apresentar alterações no padrão de expressão gênica. Entretanto, pouco ou nada se sabe dos impactos da TFD na expressão gênica global em células de carcinoma epidermóide bucal submetidas à TFD. A quantificação da expressão de genes poderia fornecer mais informações e contribuir na determinação de marcadores relacionados ao mecanismo de ação da TFD e assim

permitir o uso mais eficiente dessa terapia de modo a inibir a recidiva de câncer, como por exemplo, do CEB.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

Diante do exposto, o objetivo geral deste estudo consistiu em analisar o perfil transcricional de células derivadas de carcinoma epidermóide bucal humano após Terapia Fotodinâmica mediada pelo fotossensibilizante alumínio-cloro-ftalocianina em formulação lipossomal.

Para tal foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

1. Determinar a estabilidade do fotossensibilizante AICIPc lipossomal por meio de ensaios fotofísicos, fotoquímicos e fotobiológicos em células OSCC-3;
2. Determinar o protocolo subletal da TFD em células OSCC-3, estabelecendo a concentração de AICIPc e a potência de irradiação;
3. Verificar a citotoxicidade induzida pela TFD nas células OSCC-3 por meio da avaliação do metabolismo mitocondrial, da integridade de membrana e morfologia celular em 2h, 4h e 8h;
4. Avaliar a taxa de apoptose nas células OSCC-3 submetidas à TFD por citometria de fluxo em 2h, 4h e 8h;
5. Avaliar, por citometria de fluxo, se a TFD induz fragmentação no DNA nas células OSCC-3 em 2h, 4h e 8h;
6. Avaliar em 2h, 4h e 8h, a expressão de genes relacionados a oncogênese, supressão tumoral, adesão celular, ciclo celular, invasão e metástase e apoptose após tratamento com AICIPc, laser e TFD em células OSCC-3 por meio do ensaio de PCR-Array.

MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Desenho experimental

As etapas metodológicas deste estudo foram realizadas de acordo com o desenho experimental ilustrado na Figura 3.

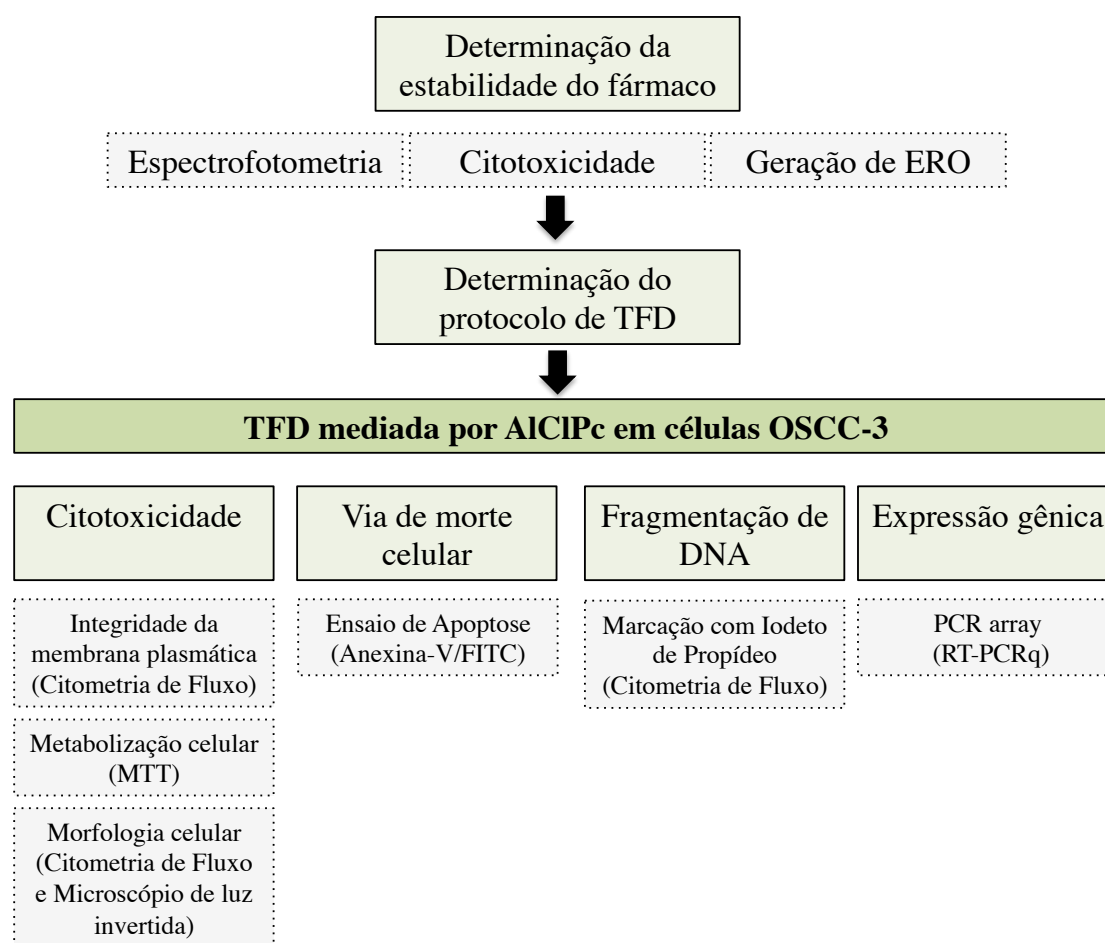


Figura 3. Desenho experimental deste estudo, mostrando a metodologia utilizada em cada etapa.

3.2 Fotossensibilizante alumínio-cloro-ftalocianina

O fármaco alumínio-cloro-ftalocianina em formulação lipossomal, AlClPc lipossomal, foi gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Antônio Carlos Tedesco, USP – Ribeirão Preto e transportado a Brasília por via aérea. O fármaco foi mantido, em um tubo vedado, no escuro e a temperatura ambiente, no Laboratório de Nanobiotecnologia até o momento de ser utilizado. Devido à variação de tempo entre a síntese da AlClPc lipossomal e a chegada à Brasília, neste estudo todos os ensaios foram realizados a partir do 10º dia após a síntese do fármaco com o objetivo de padronizar os experimentos.

3.3 Linhagem celular

A linhagem celular OSCC-3 foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. BJ Baum do National Institute of Health – NIH (Bethesda, MD, USA) e desde então mantida no banco de células do Laboratório de Nanobiotecnologia da Universidade de Brasília. As células derivadas de carcinoma epidermóide bucal são a variação maligna mais relevante de queratinócitos. Essas células são utilizadas em estudos *in vitro* e também *in vivo*, já que possuem potencial tumorigênico em camundongos imunossuprimidos (Rheinwald et al., 1981). Dentre essas células, está a linhagem celular OSCC-3, que foi estabelecida a partir da cultura primária de um CEB pouco diferenciado (Petro et al., 2004).

3.3.1 Manutenção e propagação das células

As células OSCC-3 foram mantidas em estufa a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂ e 80% de umidade utilizando-se dois meios de cultura: um para a manutenção das células e outro durante os experimentos de TFD. O primeiro foi o Dulbecco's modified Eagles' medium – DMEM (GIBCO, Auckland, NZ) suplementado com 10% de soro fetal bovino (GIBCO, Auckland, NZ) e 1% de antibiótico PenStrep composto por penicilina 100U/ml e estreptomicina 100µg/ml (GIBCO, Auckland, NZ). O segundo foi o DMEM com baixa concentração de glicose e sem vermelho fenol suplementado com 10% de soro fetal bovino (GIBCO, Auckland, NZ) e 1% de antibiótico semelhante ao descrito acima. A diluição do fármaco até a concentração de interesse foi realizada utilizando-se o meio de cultura DMEM sem adição de vermelho fenol, que evitaria a perda de energia por fenômenos físicos como a reflexão durante a irradiação das células o que acarretaria em menor excitação do fotossensibilizante e menores efeitos fotodinâmicos.

Uma vez atingidos 80-90% de confluência, as células foram soltas do fundo das placas por tratamento com solução de Tripsina 0,125% / EDTA 0,02% (GIBCO, Auckland, NZ), contadas em câmara de Neubauer e transferidas para novas placas de cultura (TRP, Trasadingen, SUI).

3.4 Avaliação da estabilidade do fotossensibilizante

Antes da realização da TFD foram realizados ensaios para verificar a estabilidade da AICIPc lipossomal. Essa estabilidade foi determinada avaliando-se o espectro de fluorescência do fármaco, além de sua capacidade em gerar espécies

reativas de oxigênio 10, 15, 30 e 60 dias após a sua síntese. Estes ensaios foram realizados de forma independente por duas vezes, cada uma em triplicata, a temperatura ambiente, na presença de O₂ atmosférico e na ausência de luz.

3.4.1 Determinação da fluorescência

A fluorescência da AICIPc lipossomal foi mensurada por espectrofotometria. Para tanto, uma alíquota de 150µL dessa formulação na concentração 5µM foi colocada em uma microplaca de cultura de 96 poços preta. O fármaco foi então excitado a um comprimento de onda de 355nm no espectrofotômetro SpectraMax M2 (Molecular Devices, USA) e a emissão da fluorescência em 680nm foi captada pelo software SoftMax pro 5.2©.

3.4.2 Produção de espécies reativas de oxigênio

A geração de espécies reativas de oxigênio induzidas pelo fármaco AICIPc após irradiação com laser foi determinada por meio do teste de decaimento do benzofurano. O benzofurano, cujo pico de absorbância ocorre em 410nm, se decompõe na presença de espécies reativas de oxigênio, reduzindo a sua absorbância de maneira proporcional à quantidade de ERO geradas. Esse fato permite uma quantificação percentual desses compostos. Assim, para esse ensaio, foi preparada uma solução de benzofurano (Sigma-aldrich, Saint Louis, MO, USA) em uma concentração de 1,5mg/mL diluído em etanol. Na sequência, 5µL da solução benzofurano/etanol foram adicionados a 150µL da formulação de AICIPc lipossomal e o conjunto foi irradiado com laser diodo a uma potência de 40mW e comprimento

de onda de 660nm (MMOptics, São Carlos, SP), durante um minuto. Logo em seguida era mensurada a absorvância do benzofurano a 410nm em espectrofotômetro SpectraMax M2.

3.4.3 Ensaio de citotoxicidade no escuro e efeito fotodinâmico

Com o intuito de complementar os estudos de estabilidade da AICIPc lipossomal, ensaios de citotoxicidade nas células OSCC-3 foram realizados na ausência, citotoxicidade no escuro, e presença de irradiação, efeito fotodinâmico. Para isso, a citotoxicidade no escuro e o efeito fotodinâmico da AICIPc lipossomal foram avaliados 10, 15 e 30 dias após a sua síntese e determinados pelo ensaio colorimétrico de MTT - 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5 difeniltertrazolim brometo (Invitrogen, Carsbad, CA, USA). O teste do MTT avalia a metabolização celular, pois uma vez internalizado pela célula, pode ser reduzido por enzimas mitocondriais a uma substância de coloração púrpura insolúvel em água – formazan. É importante salientar que apenas as células eucarióticas viáveis, com mitocôndrias ativas, reduzem o MTT, de maneira que a colorimetria do formazan permite estimar a quantidade de células vivas.

Para esse ensaio, 10^4 células por poço foram mantidas em uma placa de 96 poços e incubadas com AICIPc lipossomal na concentração de $5\mu\text{M}$. Após 30 min de incubação, o fármaco foi removido dos poços e as células foram incubadas com meio de cultura por 2h para o ensaio de citotoxicidade no escuro. Já para o ensaio de efeito fotodinâmico, após os 30 min de incubação com a AICIPc lipossomal, as células foram irradiadas em meio de cultura por um minuto a uma potência de 40mW com laser diodo com comprimento de onda de 660nm (MMOptics, São Carlos, SP) e

novamente incubadas por 2h em estufa de CO₂. Após o período de incubação de ambos os ensaios, adicionou-se a cada poço contendo as células, 150µL de uma solução de MTT a 10% diluído em meio de cultura e as células foram novamente incubadas por 3h. Na sequência, o meio de cultura foi removido e os cristais de formazan presentes nas células foram solubilizados com 200µL de dimetilsulfóxido – DMSO, por três minutos. A absorbância foi então mensurada no espectrofotômetro SpectraMax M2 (Molecular Devices, USA) a 595nm. Os ensaios foram realizados de forma independente por duas vezes, cada um em triplicata, e os resultados estão expressos como porcentagem de células viáveis. A quantidade células vivas no grupo sem tratamento foi considerada como 100% de viabilidade.

3.5 Definição do protocolo de aplicação da TFD

Considerando que a AIClPc lipossomal nas condições descritas na seção 3.4.3 mostrou-se citotóxica, foi necessário a realização de ensaios que possibilitassem determinar um protocolo de aplicação da TFD que, apesar de apresentar citotoxicidade, mostrasse também um número suficiente de células sobreviventes para os ensaios de alteração da expressão gênica. Para isso, as células foram expostas ao fármaco em três diferentes concentrações – 1,25µM, 2,5µM e 5µM, por 30 minutos. Após esse tempo, as células foram irradiadas, por um minuto com laser diodo com comprimento de onda de 670nm (BWF light source – Tech in) em três diferentes potências – 40mW, 60mW e 80mW. Em seguida as células foram incubadas em estufa de CO₂ por duas horas e em seguida submetidas ao ensaio de citotoxicidade MTT, conforme descrito na seção 3.4.3. A Tabela 2 ilustra os tratamentos a que as células foram submetidas para a realização desses experimentos.

Uma vez definido o protocolo para a TFD, todos os experimentos que se seguiram utilizaram os parâmetros de concentração do fármaco e de potência de irradiação estabelecidos. Para todos eles, o fármaco foi utilizado na concentração de 2,5 μ M e a irradiação realizada com laser diodo (BWF light source – Tech in) com comprimento de onda de 670nm, na potência de 80mW e dose total de energia de 2,4J/cm².

Tabela 2: Grupos experimentais utilizados para definir o protocolo de aplicação para a Terapia Fotodinâmica.

Grupos experimentais	Concentração da AIClPc (μ M)	Potência do laser (mW)
Controle	-	-
TFD [1,25/40]	1,25	40
TFD [2,50/40]	2,50	40
TFD [5,00/40]	5,00	40
TFD [1,25/60]	1,25	60
TFD [2,50/60]	2,50	60
TFD [5,00/60]	5,00	60
TFD [1,25/80]	1,25	80
TFD [2,50/80]	2,50	80
TFD [5,00/80]	5,00	80

Os ensaios de análise da integridade da membrana celular, metabolismo celular, morfologia celular, detecção de apoptose e fragmentação do DNA foram realizados em placas de cultura de 24 poços, contendo cada poço 10⁵ células. Para a

análise de alteração da expressão gênica, as células OSCC-3 foram mantidas em placas de cultura de 6 poços, contendo cada poço 4×10^5 .

3.6 Ensaios de citotoxicidade

3.6.1 Análise do metabolismo celular

Após 2h, 4h e 8h do tratamento, o metabolismo celular foi avaliado por meio do teste do MTT, conforme descrito na seção 3.4.3 e nas condições estabelecidas na seção 3.5. Os ensaios foram realizados de forma independente por duas vezes, cada um em triplicata e a quantidade de células vivas no grupo sem tratamento foi considerada como 100% de viabilidade.

3.6.2 Análise da integridade da membrana celular

Neste ensaio, após serem submetidas ao tratamento e incubadas por duas, quatro ou oito horas, as células foram centrifugadas e ressuspensas em 300 μ L de tampão fosfato salino – PBS (NaCl 1,5 M; Na₂HPO₄ 0,1 M; NaN₃ 0,02%, pH 7,2). A essa suspensão celular foram adicionados 30 μ L de uma solução de iodeto de propídeo tamponado a 20 μ g/mL (Invitrogen, Carsbad, CA, USA). Depois de cinco minutos, foi realizada a leitura em citômetro de fluxo (Cyflow Space, Partec, Germany) no comprimento de onda de 560 a 580nm (canal FL-2) pelo software FloMax 2.4f©. As células que estavam com a membrana celular rompida permitiram a entrada do iodeto de propídeo, que se liga ao DNA, emitindo alta fluorescência quando excitado pelo

laser. Os ensaios foram realizados de forma independente por duas vezes, cada um em triplicata e a quantidade total de células analisadas foi considerada como 100%.

3.6.3 Análise da morfologia celular

A análise da morfologia das células foi realizada por citometria de fluxo e no microscópio de luz invertida. A citometria de fluxo permite determinar a granulosidade, SSC, e o tamanho, FSC, das células. Para a avaliação de SSC e FSC, duas horas após o tratamento, as células controle e tratadas foram ressuspensas em PBS e analisadas no citômetro de fluxo Cyflow Space (Partec, Germany). Os resultados obtidos foram capturados pelo software FloMax 2.4f©.

O microscópio de luz invertida (Unico, NJ, USA) é uma ferramenta que permite a visualização de características morfológicas como formato, tamanho, adesão e padrão de crescimento das células. Desta forma, duas horas após o tratamento, as placas de cultura contendo as células do grupo controle e tratado foram levadas ao microscópio de luz invertida, em que foram observadas no aumento de 25X com contraste de fases. As células foram fotografadas utilizando-se a câmera Moticam 2300 com resolução de 3.0 megapixels (Motic, China). Cada ensaio de morfologia foi realizado uma única vez em triplicata.

3.7 Detecção de apoptose

Para este ensaio, as células após serem submetidas à TFD e incubadas por 2h, 4h e 8h, foram lavadas duas vezes com PBS e ressuspensas com 5µL de tampão de ligação fornecido pelo Kit Apotarget® (Invitrogen, Carsbad, CA, USA). A essas

suspensões de células foram adicionados 5 μ L de Anexina-V conjugada com isotiocianato de fluoresceína - Anexina-V/FITC - e 10 μ L de iodeto de propídeo. Após 15 min mantidas a temperatura ambiente e ao abrigo da luz, foram adicionados às suspensões celulares mais 400 μ L do tampão de ligação. Em seguida, as células foram levadas ao citômetro de fluxo Cyflow Space (Partec, Germany), em que a fluorescência dos compostos foi capturada nos canais FL-1 (515-530nm) e FL-2 (560-580nm). A Anexina-V se liga à fosfatidilserina, que é um composto fosfolípido exposto na superfície das células nos períodos iniciais da apoptose. A marcação com iodeto de propídeo permite remover da análise as células que foram positivas para a Anexina-V porque estão com a membrana celular rompida. Os ensaios foram realizados de forma independente por duas vezes, cada um em triplicata e a quantidade total de células analisadas foi considerada como 100%.

3.8 Análise da fragmentação do DNA

A análise de fragmentação do DNA foi realizada por meio de citometria de fluxo. Após serem submetidas à TFD e incubadas por 2h, 4h e 8h, as células foram centrifugadas, ressuspensas em 200 μ L de solução tamponada de iodeto de propídeo 20 μ g/mL (iodeto de propídeo dissolvido em PBS suplementado com citrato de sódio 0,1% m:v, TritonX 0,1% m:v, pH 7,4) e mantidas ao abrigo da luz por 30 min. Após esse período, as células foram levadas ao citômetro de fluxo Cyflow Space (Partec, Germany) para a leitura no comprimento de onda de 560 a 580nm (canal FL-2). Nesse ensaio, as células ao serem expostas ao tampão rompem suas membranas expondo o núcleo o que facilita a ligação do iodeto de propídeo ao DNA. Assim, as moléculas de DNA íntegras emitem maior fluorescência quando comparado a moléculas de DNA

fragmentado. Os ensaios foram realizados de forma independente por duas vezes, cada um em triplicata.

3.9 Análise estatística

Os dados obtidos nos ensaios de estabilidade, citotoxicidade, apoptose e fragmentação do DNA foram submetidos a análise de variância (ANOVA). Nos casos em que foram detectadas diferenças entre os tratamentos, foi aplicado o teste de Tukey com nível de significância de $p < 0,05$.

3.10 Análise da expressão gênica

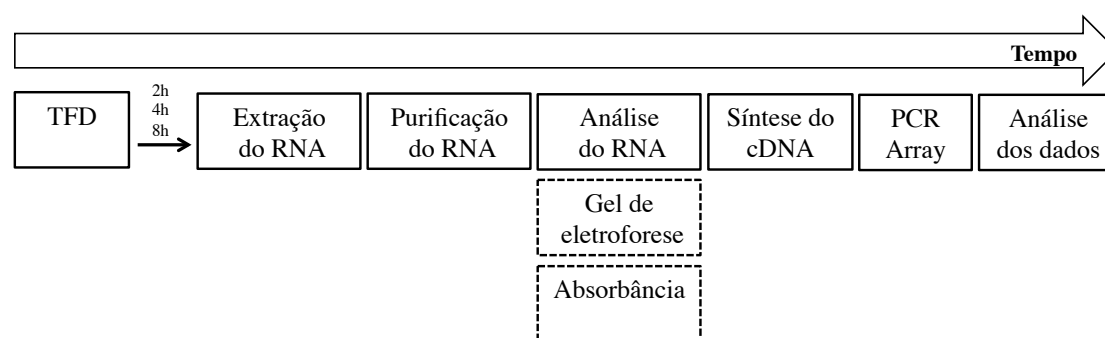


Figura 4. Desenho experimental da sequência de metodologias utilizadas até a obtenção dos dados de PCR-Array.

A expressão gênica foi analisada por meio do ensaio de PCR-Array, em que se analisa a expressão de genes envolvidos em vias biológicas de interesse utilizando qRT-PCR. A sequência da metodologia para esse ensaio está delineada na Figura 4. Para realização desse ensaio, as células foram tratadas nas condições descritas na seção 3.5 e avaliadas 2h, 4h e 8h após o tratamento. Os ensaios foram realizados de forma independente por duas vezes, cada um em triplicata. Com o objetivo de obter uma quantidade de RNA total suficiente para os experimentos de PCR-Array, as

triplicatas de um mesmo experimento foram realocadas em um mesmo eppendorf, gerando no total duas amostras de dias diferentes por grupo experimental. Desta forma, para cada grupo, foram realizados dois experimentos de qRT-PCR.

3.10.1 Extração de RNA

Para análise da expressão gênica, o RNA das células foi extraído utilizando-se o método do reagente TRIZOL (Invitrogen, Carsbad, CA, USA), que rompe as células mantendo a integridade do RNA. Para isso, o sobrenadante das células foi recolocado em eppendorfs e centrifugado na centrífuga MIKRO 22 (Hettich, Tuttlingen, Germany) a 4 °C, 630g por 3 min. Foi adicionado 1mL de TRIZOL em cada poço. Após a homogeneização, a suspensão foi realocada nos respectivos eppendorfs, homogeneizada novamente e armazenada a -20 °C até o período de extração.

Para a extração de RNA, os eppendorfs foram descongelados a temperatura ambiente. Adicionou-se 200µL de clorofórmio em cada eppendorf com agitação manual por 15 seg, seguida de centrifugação a 4 °C, 14.500g por 15 min. O sobrenadante incolor formado após a centrifugação foi removido e a ele foram adicionados 500µL de isopropanol. Após 10 min, foi realizado novo ciclo de centrifugação seguindo os parâmetros já descritos e todo o sobrenadante foi removido. Uma lavagem com etanol 75% gelado foi realizada seguida de centrifugação nas condições de 4 °C, 5600g por 5 min, remoção do sobrenadante e secagem dos eppendorfs em temperatura ambiente. Por fim, foi adicionado 15µL de água livre de RNase e DNase ao precipitado e cada eppendorf mantido em -20 °C.

3.10.2 Purificação do RNA

O RNA total de cada amostra foi purificado utilizando-se o Kit RNeasy Mini (Qiagen, Hilden, Germany) após ter sido tratado com a enzima DNase do Kit RNase-free DNase set (Qiagen, Hilden, Germany) conforme instruções do fabricante.

3.10.3 Avaliação quantitativa e qualitativa do RNA extraído

A qualidade e a quantidade do RNA extraído foram avaliadas por uma corrida de gel de eletroforese e em espectrofotômetro.

Para a corrida do gel de eletroforese, 2 μ L de cada amostra de RNA foi misturada a 3 μ L do tampão de amostra (TBE 50%, Glicerol 50%, Azul de bromofenol e Xileno Cianol) e 5 μ L de água. O gel de agarose (50mL de TBE, 0,5g de agarose e 4 μ L de Brometo de Etídeo) foi vertido em uma cuba de eletroforese horizontal (Thermo scientific, Portsmouth, NH, USA). Dez microlitros de cada amostra foram colocados em um poço do gel de agarose. Após a 15 min de corrida, o gel foi avaliado em um transiluminador de luz UV (Técnica Permatron, Joinville, SC, BRA) para verificação da integridade das bandas de RNA ribossomal em 18s e 28s, conforme representado na Figura 5. Todas as amostras utilizadas apresentaram o mesmo padrão de corrida quando submetidas ao experimento.

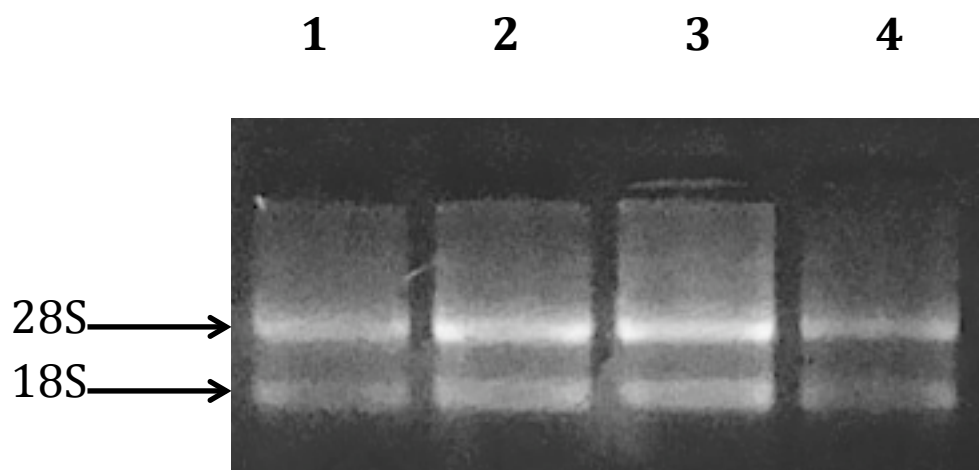


Figura 5. Imagem ilustrativa do perfil eletroforético do RNA extraído de células OSCC-3 em 2h. Poço 1: células controle; Poço 2: células incubadas com AICIPc lipossomal; Poço 3: células irradiadas; e Poço 4: células submetidas à TFD. Verificou-se integridade das bandas de RNA ribossomal em 18S e 28S conforme indicado pelas setas.

Dois microlitros do eluído de RNA foram diluídos com 8 μ L de água para a leitura em espectrofotômetro Biomate 3S® (ThermoFisher scientific, Waltham, MA, USA) em uma cubeta de quartzo. A absorvância foi avaliada em 260nm e 280nm, formando um índice a partir da razão $A_{260}:A_{280}$, necessário para a avaliação da integridade do RNA. Somente as amostras que apresentaram índice maior que 1.8 e menor que 2 foram utilizadas. A concentração de cada amostra em ng/ μ L foi obtida e somente as amostras que tiveram mais que 1 μ g de RNA total foram usadas para a síntese de cDNA.

3.10.4 Síntese do cDNA

Um micrograma de cada amostra foi utilizado para síntese do cDNA seguindo os protocolos estabelecidos pelo Kit RT²First Strand (Qiagen, Hilden, Germany). A eliminação de DNA genômico da amostra foi feita anteriormente à síntese de cDNA. O coquetel de síntese de cDNA foi adicionado à mistura anterior e incubada por

15min a 42 °C e 5 min a 95 °C no termociclador MyCycler Thermal Cycler® (Bio Rad, Hercules, CA, USA). Ao final, adicionou-se 91µL de água livre de DNase e RNase à nova mistura e o cDNA foi utilizado em seguida para os experimentos de PCR-Array ou estocado overnight a -20°C.

3.10.5 PCR-Array

Ao abrigo de luz, o cDNA obtido foi misturado aos componentes do kit RT² SYBR Green / ROX qPCR Master Mix (Qiagen, Hilden, Germany). Cada amostra de cDNA foi suficiente para preencher uma microplaca de 96 poços (25µL da amostra por poço) contendo primers do kit RT² Profiler PCR-Array do tipo PAHS 502C – Human oncogenes & Tumor suppressor genes. Os genes avaliados durante o experimento estão descritos na Tabela 3. O PCR em tempo real foi realizado em um equipamento 7500 FAST (Applied Biosystems, USA) com a programação: 1 ciclo de 10min a 95 °C e 40 ciclos de 15 seg a 95 °C e 1 min a 60 °C. Os dados de cada placa foram salvos em uma planilha de dados e posteriormente analisados.

Para cada placa de PCR-Array, foram avaliados cinco genes de controle reconhecidamente expressos em todas as células do organismo e necessários para a manutenção das funções básicas celulares. Esses genes foram o beta-2-microglobulina (B2M), o hipoxantina fosforibosiltransferase 1 (HPRT1), o proteína ribossomal L13a (RPL13A), o gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e o beta actina (ACTB). Além disso, foram avaliados três controles da técnica relativos a contaminação genômica de DNA, transcrição reversa e controle positivo da amplificação.

Tabela 3. Genes avaliados no perfil transcricional de células OSCC-3 após TFD pelo ensaio de PCR-Array.

Gene	Descrição	Gene Bank
ABL1	C-abl oncogene 1, não-receptor de tirosina quinase	NM_005157
AKT1	V-akt Oncogene homólogo ao vírus de timoma murino 1	NM_005163
APC	Polipose adenomatosa do cólon	NM_000038
ATM	Ataxia telangiectasia mutada	NM_000051
BAX	Proteína associada a BCL2	NM_004324
BCL2	Linfoma de células B2	NM_000633
BCL2L1	BCL2- semelhante 1	NM_138578
BCR	Região do conjunto do limite de quebra	NM_004327
BRCA1	Câncer de mama 1, início adiantado	NM_007294
BRCA2	Câncer de mama 2, início adiantado	NM_000059
CASP8	Caspase 8, cisteína peptidase relacionado à apoptose	NM_001228
CCND1	Ciclina D1	NM_053056
CDH1	Caderina 1, tipo 1, E-caderina	NM_004360
CDK4	Quinase 4 ciclina dependente	NM_000075
CDKN1A	Inibidor de quinase 1A ciclina dependente	NM_000389
CDKN2A	Inibidor de quinase 2A ciclina dependente	NM_000077
CDKN2B	Inibidor de quinase 2B ciclina dependente	NM_004936
CDKN3	Inibidor de quinase 3 ciclina dependente	NM_005192
CTNNB1	Catenina beta 1 (proteína associada à caderina)	NM_001904
E2F1	E2F fator de transcrição 1	NM_005225
EGF	Fator de crescimento epidermal	NM_001963
ELK1	Membro da família de oncogenes ETS	NM_005229
ERBB2	V-erb-b2 oncogene homólogo ao vírus da leucemia eritroblástica 2	NM_004448
ESR1	Receptor de estrógeno 1	NM_000125
ETS1	V-ets oncogene homólogo ao vírus da eritroblastose 1	NM_005238
FHIT	Gene frágil da tríade da histidina	NM_002012
FOS	FBJ Oncogene homólogo ao vírus de osteossarcoma murino	NM_005252
FOXD3	Forkhead box D3	NM_012183
HGF	Fator de crescimento de hepatócitos	NM_000601
HIC1	Hipermetilado no câncer 1	NM_006497
HRAS	V-Ha-ras Oncogene homólogo ao vírus do sarcoma de Harvey em ratos	NM_005343
IGF2R	Receptor de fator de crescimento semelhante à insulina 2	NM_000876
JAK2	Janus quinase 2	NM_004972
JUN	Jun proto-oncogene	NM_002228
JUNB	Jun B proto-oncogene	NM_002229
JUND	Jun D proto-oncogene	NM_005354
KIT	V-kit Oncogene homólogo ao vírus do sarcoma Hardy-Zuckerman 4 em gatos	NM_000222
KITLG	KIT ligante	NM_003994
KRAS	V-Ki-ras2 Oncogene homólogo ao vírus do sarcoma Kirsten em ratos	NM_004985

MCL1	Sequência 1 de leucemia de células mielóides (Relacionado à BCL-2)	NM_021960
MDM2	Proteína homóloga a ligante de p53 em murinos	NM_002392
MEN1	Neoplasia endócrina múltipla 1	NM_000244
MET	Met proto-oncogene (Receptor do Fator de crescimento de hepatócitos)	NM_000245
MGMT	O-6-metilguaninametiltransferase	NM_002412
MLH1	MutL homólogo 1, Câncer de cólon, não-polipose tipo 2(E. coli)	NM_000249
MOS	V-mos Oncogene homólogo ao vírus do sarcoma Moloney em murinos	NM_005372
MYB	V-myb Oncogene homólogo ao vírus de mieloblastose em aves	NM_005375
MYC	V-myc Oncogene homólogo ao vírus de mielocitomatose em aves	NM_002467
MYCN	V-myc Oncogene relacionado a mielocitomatose viral	NM_005378
NF1	Neurofibromina 1	NM_000267
NF2	Neurofibromina 2	NM_000268
NFKB1	Gene indutor de fator nuclear κ em células B do tipo 1	NM_003998
NFKBIA	Inibidor de gene indutor de fator nuclear κ em células B do tipo 1, alfa	NM_020529
NRAS	Oncogene homólogo a neuroblastoma RAS viral	NM_002524
PIK3C2A	Fosfoinositol-3-quinase, alfa polipeptídeo	NM_002645
PIK3CA	Fosfoinositol-3-quinase, catalítico, alfa polipeptídeo	NM_006218
PML	Leucemia promielocítica	NM_033238
PRKCA	Proteína quinase C, alpha	NM_002737
RAF1	V-raf-1 Oncogene homólogo ao vírus da leucemia em murinos 1	NM_002880
RARA	Receptor de ácido retinóico, alpha	NM_000964
RASSF1	Família membro da associação do Ras 1	NM_007182
RB1	Retinoblastoma 1	NM_000321
REL	V-rel Oncogene homólogo ao vírus da reticuloendoteliose em aves	NM_002908
RET	Ret proto-oncogene	NM_020630
ROS1	C-ros oncogene 1 , receptor de tirosina quinase	NM_002944
RUNX1	Fator de transcrição 1 relacionado à Runt	NM_001754
RUNX3	Fator de transcrição 3 relacionado à Runt	NM_004350
S100A4	S100 proteína ligante do cálcio A4	NM_002961
SERPINB5	Serpin inibidor de peptidase , tipo B (ovalbumina), membro 5	NM_002639
SH3PXD2A	SH3 e PX domínio 2A	NM_014631
SMAD4	SMAD membro da família 4	NM_005359
SRC	Oncogene homólogo ao sarcoma viral V-src (Schmidt-Ruppin A-2) em aves	NM_005417
STAT3	Transdutor de sinal e ativador de transcrição 3	NM_003150
STK11	Serina/Treonina quinase 11	NM_000455
TGFB1	Fator de crescimento transformador, beta 1	NM_000660
TNF	Fator de necrose tumoral	NM_000594
TP53	Proteína tumoral p53	NM_000546
TP73	Proteína tumoral p73	NM_005427
TSC1	Esclerose tuberosa 1	NM_000368
VHL	Supressor de tumor Von Hippel-Lindau	NM_000551
WT1	Wilms tumor 1	NM_000378
WWOX	Domínio WW contendo oxido-redutase	NM_016373
XRCC1	Reparo de raio-X complementado por reparo em células de hamster chinês 1	NM_006297
ZHX2	Zinc fingers e homeoboxes 2	NM_014943

3.10.6 Análise dos dados do PCR-Array

Foram avaliadas no total 24 placas de PCR-Array sendo elas de quatro grupos experimentais avaliados nos tempos 2h, 4h e 8h, e em dois experimentos independentes. Cada placa gerou valores de Ct (Threshold cycle), relacionados ao ciclo em que o sinal das cópias amplificadas atingia sinal de fluorescência significativamente superior à do background. Os valores de Ct foram agrupados e submetidos à análise no software RT² Profiler PCR-Array data analysis 3.4 disponível no website <http://www.SABiosciences.com/pcrarraydataanalysis.php>. Desta forma, a partir dos valores de Ct foram gerados valores de Fold-Change - dados normalizados pela razão entre os Ct da amostra teste e os Ct da amostra controle - e de Fold-Regulation - resultados do Fold-Change representados de uma maneira biologicamente significativa, em que os valores positivos representam superexpressão e os negativos supressão. Foram desconsiderados para a análise os genes expressos com valores de Ct menores que 35.

Somente foram utilizados os dados advindos de amostras em que os controles da contaminação genômica de DNA, do controle positivo de PCR e da transcrição reversa, mostraram resultados satisfatórios. Para a avaliação da contaminação genômica do DNA, as amostras utilizadas tiveram Ct maior que 35. As amostras utilizadas apresentaram Ct do controle positivo da amplificação por PCR entre 18 e 22. Para avaliar a eficiência da síntese de cDNA a partir do RNA, foi estabelecido um cálculo em que a média dos Ct do controle de transcrição reversa foi diminuída pela média dos Ct do controle positivo. Para ser utilizada, a amostra deveria apresentar diferença menor que cinco.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

No presente estudo, cujo intuito foi analisar o perfil transcricional de células OSCC-3 submetidas à TFD, foram realizados diversos experimentos cujos resultados estão descritos a seguir.

4.1 Avaliação da estabilidade do fotossensibilizante

Uma das abordagens experimentais inicialmente realizadas consistiu em avaliar a estabilidade do fotossensibilizante AIClPc lipossomal. Essa estabilidade foi determinada avaliando-se os espectros de fluorescência do fármaco, além da capacidade do mesmo em gerar espécies reativas de oxigênio, 10, 15, 30 e 60 dias após a sua síntese. A estabilidade do fármaco foi também determinada avaliando-se a sua capacidade em induzir toxicidade na ausência, citotoxicidade no escuro, e na presença de irradiação, efeito fotodinâmico, ambos realizados por meio do teste de MTT, 10, 15 e 30 dias após a síntese do fármaco.

4.1.1 Determinação da fluorescência

A fluorescência da AICIPc lipossomal foi avaliada no seu comprimento de onda máximo de emissão, 680nm. Como ilustra a Figura 6, o fármaco apresentou redução respectivamente de 16,2%, 36,2% e 22,5% da fluorescência avaliada nos dias 15, 30 e 60 após a sua síntese, quando comparado ao dia 10. A fluorescência do fotossensibilizante aferida no dia 30 foi também diferente da aferida nos dias 15 e 60.

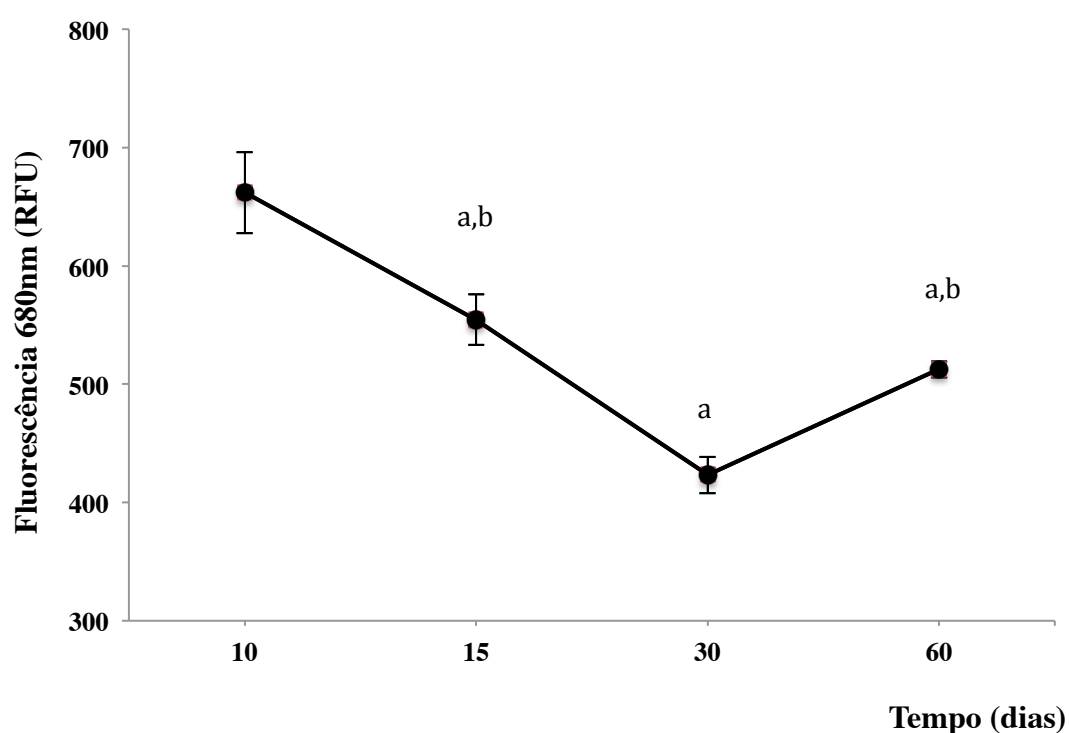


Figura 6. A avaliação da estabilidade do fotossensibilizante AICIPc lipossomal realizada por meio do ensaio de fluorescência. Em um espectrofotômetro, o fármaco foi excitado a 355nm e a fluorescência emitida a 680nm foi aferida. Os dados representados correspondem a média de dois experimentos independentes realizados em triplicata. A barra representa o desvio padrão e foi considerada significativa a diferença em que o valor de $p < 0,05$. ^a Resultado estatisticamente significativo em comparação ao resultado obtido no dia 10. ^b Resultado estatisticamente significativo em comparação ao resultado obtido no dia 30.

4.1.2 Produção de espécies reativas de oxigênio

Este ensaio foi realizado pelo método do decaimento da absorbância do composto benzofurano, que avaliado no comprimento de onda de 410nm é proporcional à presença de ERO gerados, permitindo uma quantificação destes. Como mostrado na Figura 7, o percentual de ERO gerado nos dias 10, 15, 30 e 60 foi de 62,2%, 63,01%, 60,2% e 46,2%, respectivamente. Esses dados mostram que 60 dias após a síntese, o fármaco está com a sua eficácia diminuída.

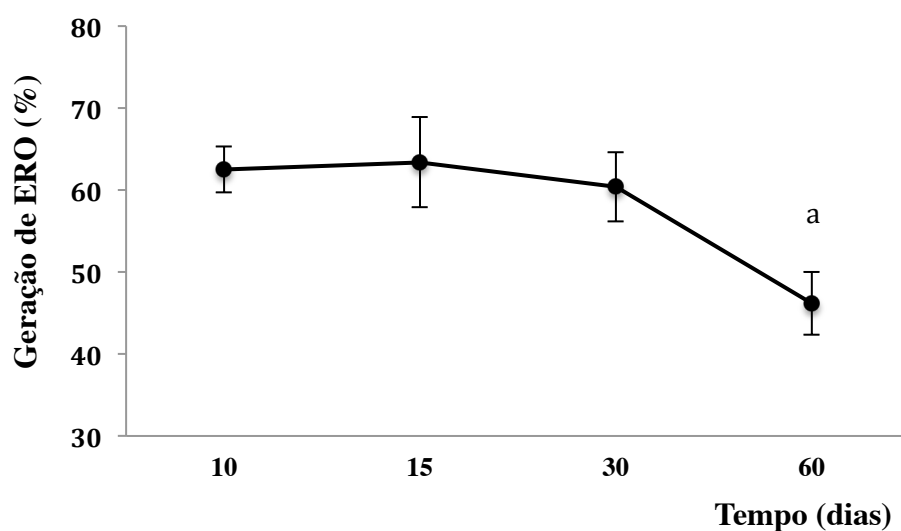


Figura 7. A estabilidade do fotossensibilizante AICIPc lipossomal foi determinada por meio da sua capacidade de gerar ERO. A absorbância do fármaco com o composto benzofurano foi avaliada antes e depois do mesmo ser irradiado por laser diodo a 660nm em um espectrofotômetro a 410nm. A alteração da absorbância do composto é proporcional à geração de ERO. Os dados representados correspondem a média de dois experimentos independentes realizados em triplicata. A barra representa o desvio padrão e foi considerada significativa a diferença em que o valor de $p < 0,05$. ^a Resultado estatisticamente significativo em comparação aos resultados obtidos nos dias 10, 15 e 30.

4.1.3 Ensaio de citotoxicidade no escuro e estabilidade do efeito fotodinâmico

A citotoxicidade no escuro e a eficácia fotodinâmica do fármaco AICIPc lipossomal foram avaliadas neste estudo e os resultados estão representadas nas Figuras 8 e 9, respectivamente. O índice de citotoxicidade no escuro, que indica a citotoxicidade induzida pela AICIPc lipossomal sem irradiação, não alterou até o 30º dia, a frequência de células viáveis foi em média 48%.

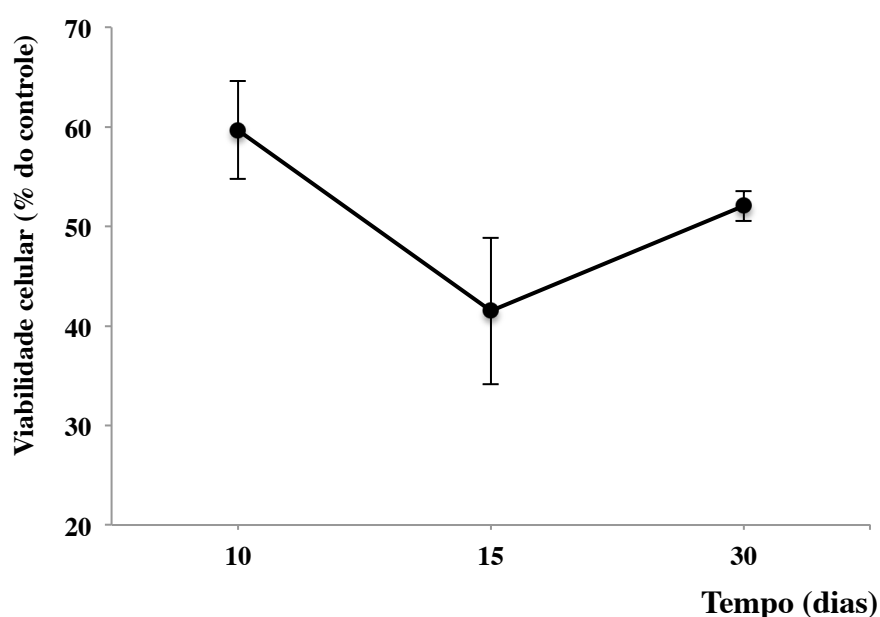


Figura 8. A citotoxicidade no escuro do fotossensibilizante AICIPc lipossomal em células OSCC-3 foi determinada por meio da avaliação da capacidade das mitocôndrias dessas células em metabolizar o composto MTT. Nesse ensaio, as células foram incubadas com o fármaco e não foram irradiadas. Os dados representados correspondem a média de dois experimentos independentes realizados em triplicata. A barra representa o desvio padrão e foi considerada significativa a diferença em que o valor de $p < 0,05$. Os resultados obtidos entre os tempos experimentais não foram estatisticamente significativos.

A eficácia fotodinâmica da AICIPc lipossomal avaliada por meio da determinação da viabilidade celular reduziu aproximadamente 20% no 30º dia após a

sua síntese. Já nos dias 5, 10 e 15 as taxas de viabilidade permaneceram semelhantes, com média de 22% de células vivas.

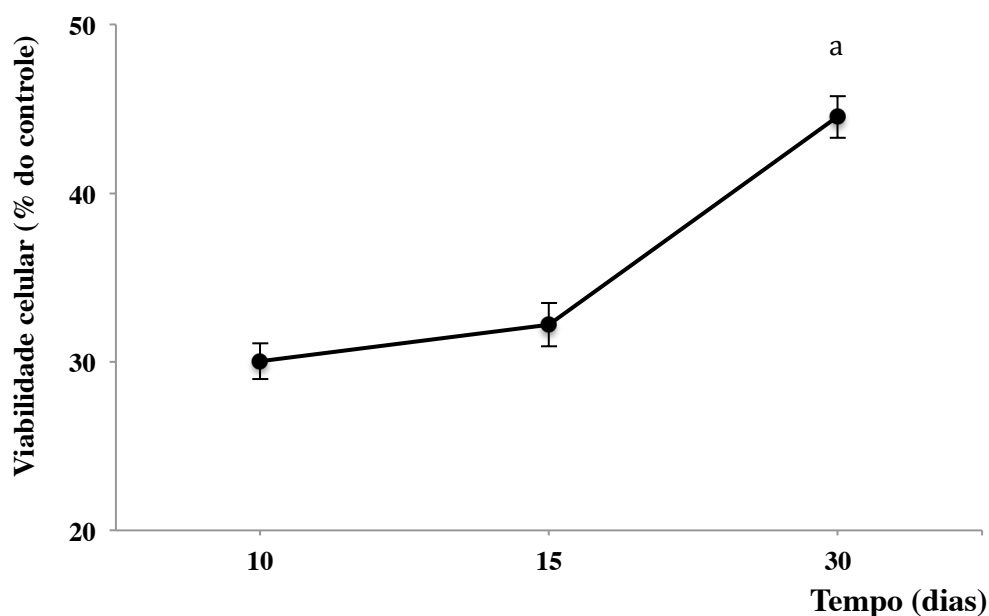


Figura 9. O efeito fotodinâmico da TFD mediada pelo fotossensibilizante AICIPc lipossomal em células OSCC-3 foi determinado por meio da avaliação da capacidade das mitocôndrias dessas células em metabolizar o composto MTT. Nesse ensaio, as células foram incubadas com o fármaco e também irradiadas com laser diodo a 660nm. Os dados representados correspondem a média de dois experimentos independentes realizados em triplicata. A barra representa o desvio padrão e foi considerada significativa a diferença em que o valor de $p < 0,05$. ^a Resultado estatisticamente significativo em comparação aos resultados obtidos nos dias 10 e 15.

4.2 Definição do protocolo de aplicação da TFD

Após a TFD, como ilustrado anteriormente há intensa redução do número de células viáveis. Porém, para avaliar o perfil transcricional das células OSCC-3 submetidas à TFD é necessário que existam células remanescentes suficientes para a extração do RNA. Desta forma, foram testados protocolos subletais da TFD variando-se a concentração do fármaco e a potência de irradiação do laser. Conforme ilustrado na Figura 10, a maior eficácia fotodinâmica demonstrada pela TFD foi aferida no

grupo de células irradiado com luz laser a uma potência de 80mW. Na concentração de 5 μ M, a frequência de células viáveis foi de 20% e na de 2,5 μ M foi de 28%. Já na concentração de 1,25 μ M a frequência de células viáveis foi de 39%. Esta última mostrou-se significativamente diferente da apresentada pelos outros grupos. Diante desses dados, decidiu-se utilizar o protocolo em que as células seriam tratadas com o fármaco na concentração de 2,5 μ M e irradiadas com potência de 80mW.

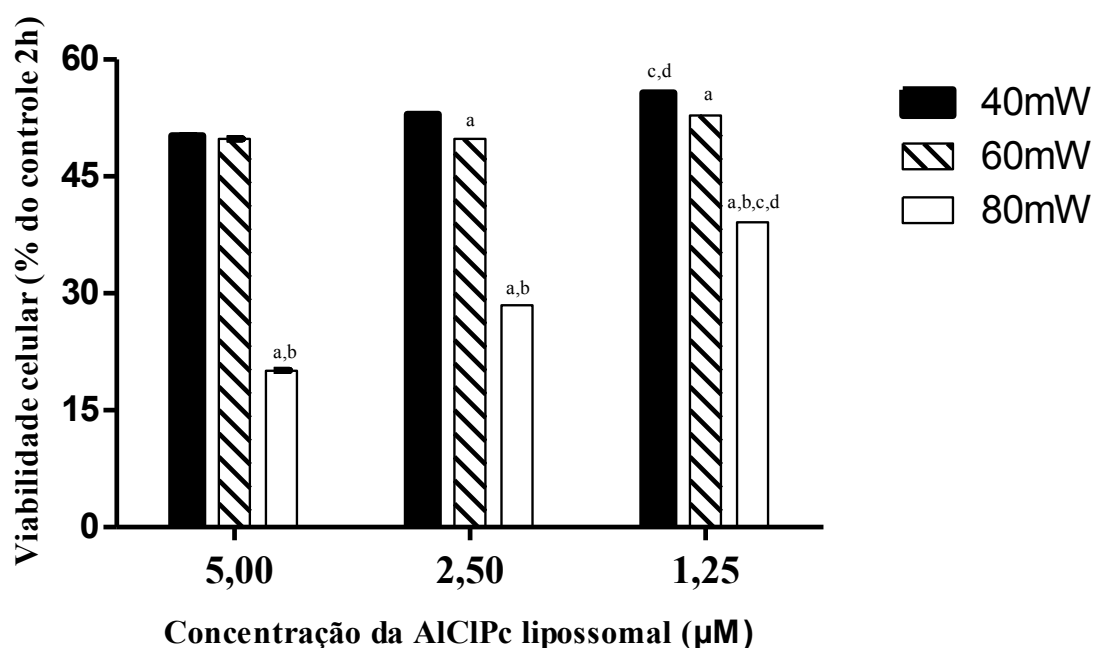


Figura 10. A determinação do protocolo da TFD foi realizada por meio da avaliação do metabolismo celular - MTT, em que diferentes potências da irradiação e concentrações da AICIPc lipossomal foram avaliados. Os dados representados correspondem a média de dois experimentos independentes realizados em triplicata cada um. A barra representa o desvio padrão e foi considerada significativa a diferença em que o valor de $p < 0,05$. ^a Resultado estatisticamente significativo em relação à irradiação de 40mW, em uma mesma concentração do fármaco. ^b Resultado estatisticamente significativo em relação à irradiação de 60mW, em uma mesma concentração do fármaco. ^c Resultado estatisticamente significativo em relação à concentração de 5 μ M, dentro da mesma potência de irradiação. ^d Resultado estatisticamente significativo em relação à concentração de 2,5 μ M, dentro da mesma potência de irradiação.

4.3 Ensaios de citotoxicidade

Com o objetivo de avaliar se a morte celular induzida pela TFD alteraria em função do tempo, o ensaio de citotoxicidade foi realizado, além de 2h, nos tempos experimentais 4h e 8h. Essa citotoxicidade foi avaliada por meio da análise do metabolismo celular, da integridade de membrana e da morfologia celular.

4.3.1 Análise do metabolismo celular

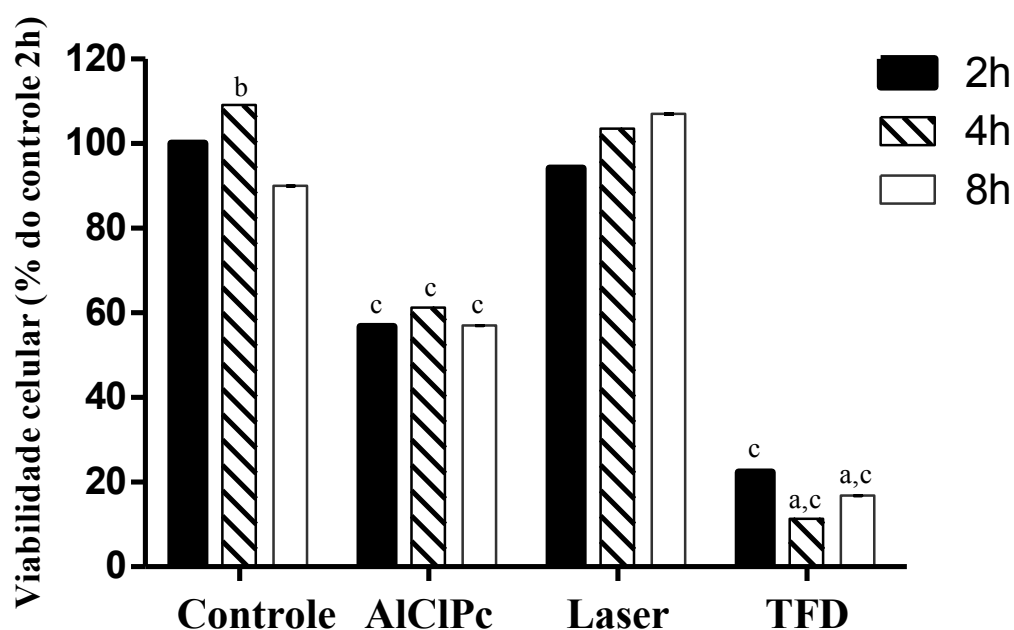


Figura 11. Citotoxicidade induzida pela TFD nas células OSCC-3 avaliada por análise do metabolismo celular – MTT. Os dados representados correspondem a média de dois experimentos independentes realizados em triplicata. A barra representa o desvio padrão e foi considerada significativa a diferença em que o valor de $p < 0,05$. ^a Resultado estatisticamente significativo em relação ao tempo experimental de 2h, dentro do mesmo grupo experimental. ^b Resultado estatisticamente significativo em relação ao tempo experimental de 8h, dentro do mesmo grupo experimental. ^c Resultado estatisticamente significativo em relação ao controle, dentro do mesmo tempo experimental.

Como ilustrado na Figura 11, a TFD reduziu a frequência de células viáveis quando comparado ao grupo Controle do mesmo tempo experimental. A frequência de células viáveis foi de 22,3% (2h), 11,3% (4h) e 16,8% (8h), sendo a encontrada em 2h significativamente diferente da encontrada em 4h e 8h.

4.3.2 Análise da integridade da membrana celular

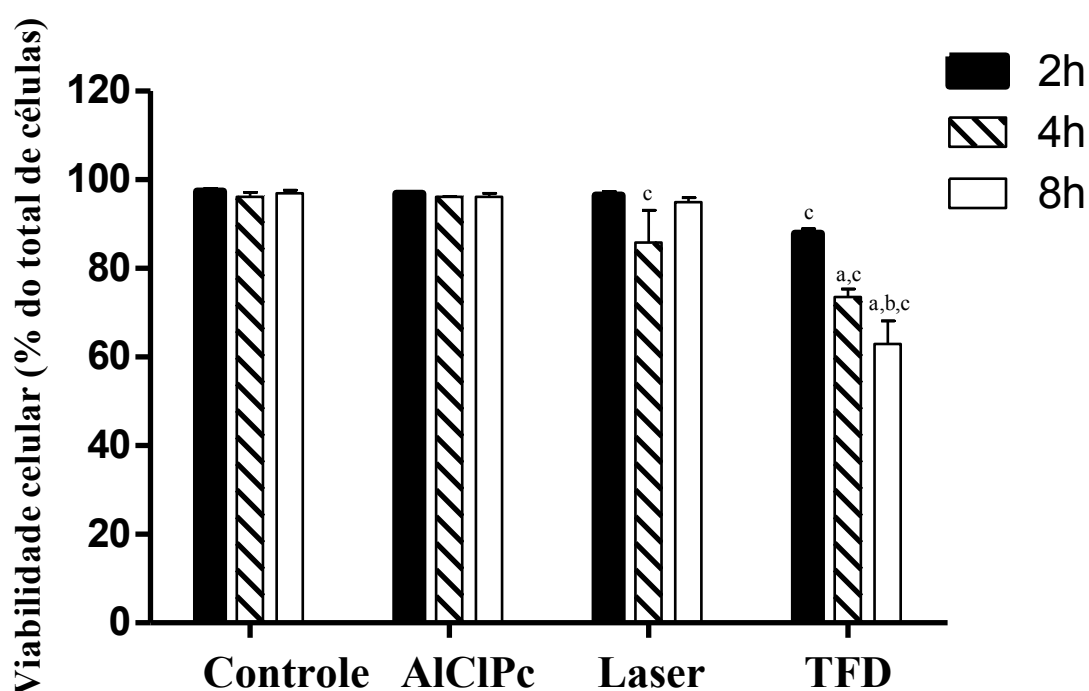


Figura 12. Citotoxicidade induzida pela TFD nas células OSCC-3 determinada por meio da análise da integridade da membrana celular. Para esse ensaio as células foram incubadas com iodeto de propídeo e avaliadas em citômetro de fluxo. Os dados representados correspondem a média de dois experimentos independentes realizados em triplicata. A barra representa o desvio padrão e foi considerada significativa a diferença em que o valor de $p < 0,05$. ^a Resultado estatisticamente significativo em relação ao tempo experimental de 2h, dentro do mesmo grupo experimental. ^b Resultado estatisticamente significativo em relação ao tempo experimental de 4h, dentro do mesmo grupo experimental. ^c Resultado estatisticamente significativo em relação ao controle, dentro do mesmo tempo experimental.

Em relação à integridade da membrana celular, 12,16% das células submetidas à TFD apresentaram rompimento de membrana em 2h, 26,48% em 4h e 37,03% em 8h - Figura 12. Os grupos experimentais Controle e AICIPc apresentaram aproximadamente 100% de células com membranas celulares íntegras. As células do grupo Laser avaliadas em 2h e 8h também permaneceram com as membranas íntegras. Porém as células do grupo Laser avaliado em 4h mostraram redução de 14,1% no número de células vivas.

4.3.3 Análise da morfologia celular

A análise morfológica das células OSCC-3 após TFD foi avaliada ao Microscópio de luz invertida- Figura 13 - e ao Citômetro de fluxo - Figura 14.

Ao microscópio as células OSCC-3 apresentaram forma poligonal que variaram de um pouco alongada a mais arredondada de acordo com a confluência da cultura. O núcleo dessas células estava esférico ou ovóide, apresentando um ou outro nucléolo mais evidente (Figura 13-A). Entretanto quando submetidas à TFD essas células apresentaram alteração no tamanho, encolhimento citoplasmático e rompimento de membrana celular. Além disso, perderam a capacidade adesão à placa de cultura (Figura 13-B).

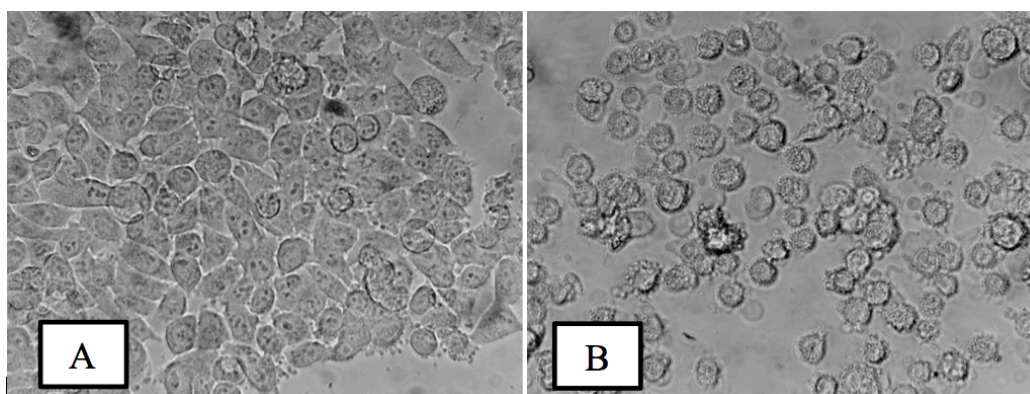


Figura 13. Morfologia celular avaliada em microscopia óptica em contraste de fases, com aumento de 25 vezes. Em A, células OSCC-3 do grupo controle apresentando forma poligonal típica com nucléolos bem evidentes e adesão às células adjacentes e à placa de cultura. Em B, células OSCC-3 submetidas à TFD mediada por AICIPc lipossomal apresentando redução citoplasmática, morfologia arredondada, rompimento de membrana e perda de adesão à placa de cultura. Esse experimento foi realizado uma única vez, em triplicata.

(A)(B)

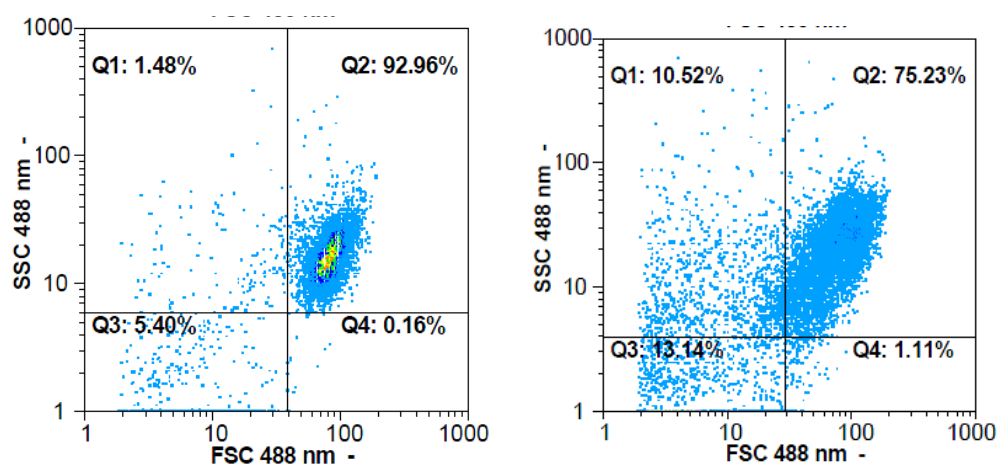


Figura 14. Análise da morfologia celular por citometria de fluxo. Em A, células OSCC-3 do grupo controle apresentando uma população mais homogênea quanto à granulosidade e tamanho celular. Em B, células OSCC-3 submetidas à TFD mediada por AICIPc lipossomal mostraram um padrão mais heterogêneo, com maior quantidade de debris celulares e maior dispersão da população das células. Esse experimento foi realizado uma única vez, em triplicata.

No citômetro de fluxo, a análise morfológica foi realizada a partir da definição do tamanho e da granulosidade das células do grupo controle, ou seja, as que não receberam tratamento. No grupo Controle, 92% da população celular localizavam-se no quadrante Q2, Figura 14-A, ou seja, apresentavam tamanhos e granulosidade

típicos. Como mostra a Figura 14-B, a TFD induziu alterações como redução do tamanho e da granulosidade em cerca de 25% das células (quadrantes Q1, Q3 e Q4).

4.4 Detecção de apoptose

Para avaliar se a TFD induzia apoptose nas células OSCC-3, foi realizado um ensaio em que as células eram marcadas com Anexina-V/FITC. Os dados estão expressos na Figura 15. Os grupos TFD 2h e 8h mostraram aumento significativo no índice de apoptose quando comparados aos respectivos controles. Ao analisar o mesmo grupo experimental nos diferentes tempos, nota-se que em 4h ocorre redução da taxa de apoptose e essa taxa se mantém até 8h.

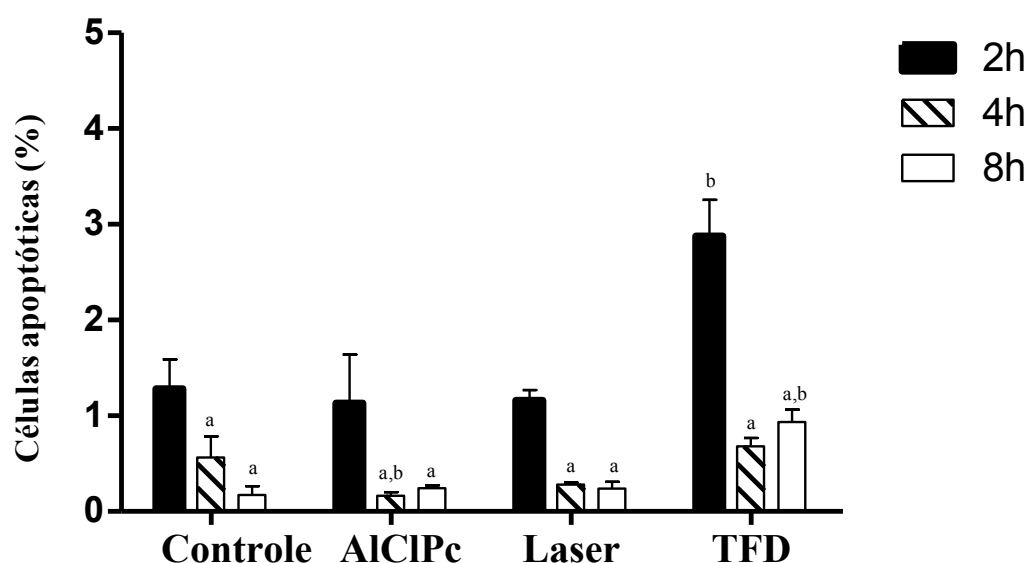


Figura 15. Detecção da apoptose induzida nas células OSCC-3 pela TFD mediada pela AICIPc lipossomal por meio do ensaio de Anexina-V/FITC. A Anexina-V/FITC reconhece a fosfatidilserina, que é exposta pelas células nos casos de apoptoses iniciais. Para que não fosse contabilizada a marcação da Anexina-V/ FITC e da fosfatidilserina em casos de células com rompimento de membrana, foi realizada simultaneamente a marcação com iodeto de propídeo. Os dados representados são a média de dois experimentos independentes realizados em triplicata. A barra representa o desvio padrão e foi considerada significativa a diferença em que o valor de $p < 0,05$. ^aResultado estatisticamente significativo em relação ao tempo experimental de 2h, dentro do mesmo grupo experimental. ^bResultado estatisticamente significativo em relação ao controle, dentro do mesmo tempo experimental.

4.5 Análise da fragmentação do DNA

O ensaio para detecção de DNA fragmentado foi realizado para avaliar a genotoxicidade da TFD em células OSCC-3 em 2h, 4h e 8h. A taxa de DNA fragmentado no grupo TFD 8h foi de 22% enquanto que no respectivo controle foi de 17,7%, sendo essa diferença significativa. Quando comparados dentro do mesmo grupo experimental, os grupos Controle 8h e AICIPc 8h mostraram redução significativa de DNA fragmentado. As células tratadas com o Laser apresentaram respectivamente 12,38% e 10,4% de DNA fragmentado em 2h e 8h, enquanto que em 4h a taxa de DNA fragmentado foi de 21,24%, conforme mostra a Figura 16.

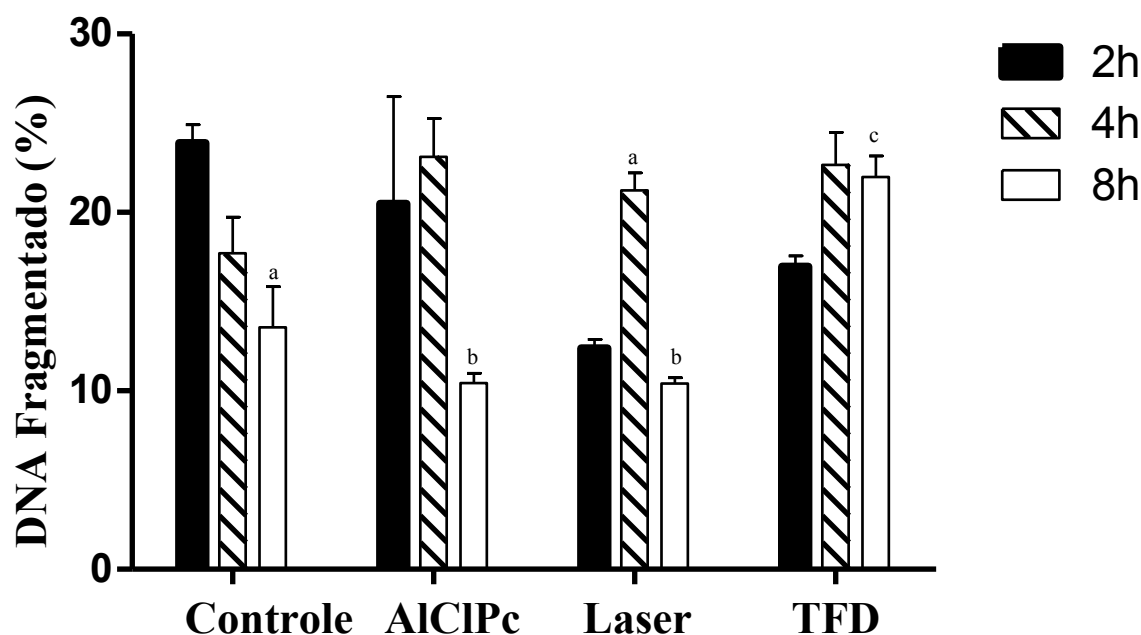


Figura 16. Avaliação da fragmentação de DNA induzida pela TFD em células OSCC-3 avaliada pelo ensaio de marcação com Iodeto de propídeo em Citômetro de fluxo após a permeabilização da membrana celular. Os dados representados correspondem a média de dois experimentos independentes realizados em triplicata. A barra representa o desvio padrão e foi considerada significativa a diferença em que o valor de $p < 0,05$. ^a Resultado estatisticamente significativo em relação ao tempo experimental de 2h, dentro do mesmo grupo experimental. ^b Resultado estatisticamente significativo em relação ao tempo experimental de 4h, dentro do mesmo grupo experimental. ^c Resultado estatisticamente significativo em relação ao controle, dentro do mesmo tempo experimental.

4.6 Análise da expressão gênica após Terapia Fotodinâmica

A análise do padrão de expressão gênica demonstrou que a exposição das células OSCC-3 ao fotossensibilizante AICIPc lipossomal, à irradiação com $2,4\text{J}/\text{cm}^2$ e à TFD, alterou a expressão de dezenas de genes avaliados. As células dos grupos tratados foram comparadas às células do grupo controle, sem tratamento, de seus respectivos tempos experimentais gerando duas classes de genes: os suprimidos e os superexpressos. Os resultados estão expressos nas Figuras 17, 18 e 19.

4.6.1 Expressão gênica no grupo AICIPc

O grupo AICIPc mostrou 29, 13 e 7 genes suprimidos nos tempos de 2h, 4h e 8h, respectivamente. Quanto aos genes superexpressos, esses foram 7, 6 e 17 nos tempos de 2h, 4h e 8h, respectivamente, esses dados estão expostos na Figura 17. Vinte e três genes não foram determinados ou tiveram Ct maior que o valor de corte.

Duas horas após a incubação com a AICIPc, a maior parte dos genes analisados mostrou algum nível de supressão. Os principais genes suprimidos foram BRCA2, CCND1, ELK1 e PRKCA.

O gene BRCA2 é um conhecido supressor tumoral, que codifica uma proteína envolvida com processos de reparo do DNA. O gene CCND1 codifica uma proteína da família das ciclinas, estas são reguladoras do ciclo celular, e desta maneira é classificado como GST. Já o ELK1 e o PRKCA são proto-oncogenes, o primeiro é um fator de transcrição e o segundo está envolvido em diversos processos celulares como adesão e ciclo celular.

Em 4h, o perfil da expressão da maioria dos genes foi semelhante ao encontrado nas células do grupo controle. Vale ressaltar que, quando a expressão gênica estava alterada, ela era sutil, tanto para os genes superexpressos quanto para os suprimidos. Alguns genes superexpressos foram o BRCA1, CASP8 e CTNNB1. Assim como o BRCA2, o BRCA1 codifica uma proteína supressora tumoral e participa da manutenção da estabilidade genômica. Já a proteína codificada pelo gene CASP8 está relacionada com o processo de morte celular por apoptose. O gene CTNNB1 está envolvido com a regulação do crescimento e adesão celular de células epiteliais.

Oito horas após o tratamento, as células incubadas com o fotossensibilizante também apresentaram alterações discretas quando comparadas às células sem tratamento. A maioria dos genes superexpressos em 4h mostrou o mesmo padrão de expressão em 8h. Outros genes superexpressos em 8h foram o MEN1, o MLH1 e o SERPINB5, todos considerados supressores tumorais.

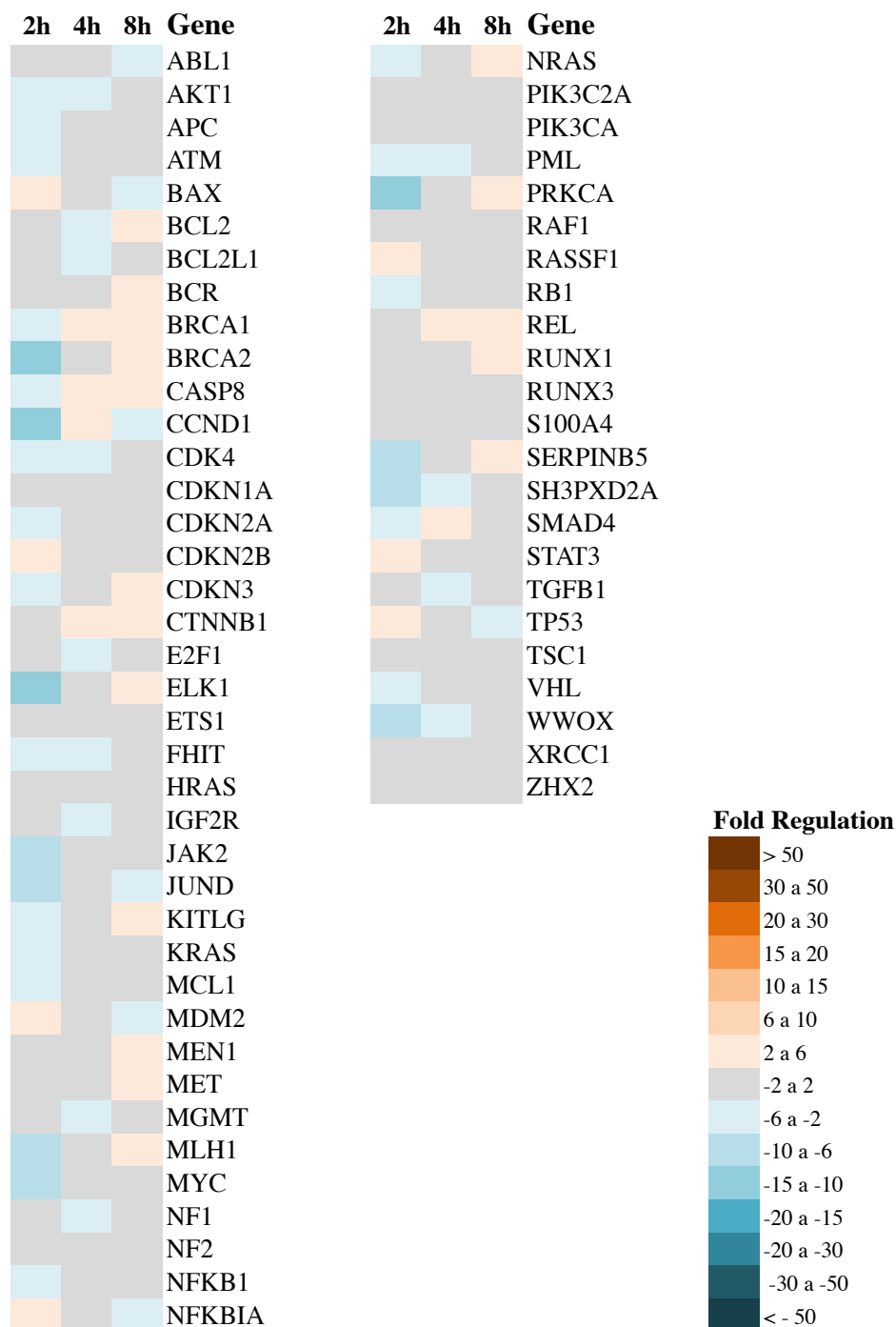


Figura 17. Perfil de expressão gênica das células OSCC-3 após incubação com o fotossensibilizante AIClPc lipossomal. Os resultados foram obtidos por meio do ensaio de PCR-Array, em que 84 genes de interesse foram avaliados por qRT-PCR. Cada cor da escala representa um intervalo de Fold-Regulation que mostra a comparação entre o grupo tratado, no caso somente com o fármaco, e o grupo controle. Esses resultados são representativos de dois experimentos independentes, em que as triplicatas de cada um deles foram agrupadas.

4.6.2 Expressão gênica no grupo Laser

As células somente irradiadas, ou seja, do grupo Laser, apresentaram 45 e 38 genes suprimidos nos tempos de 2h e 8h, respectivamente. Os genes superexpressos foram de 11 e 12 nos tempos de 2h e 8h, respectivamente. Dez genes não foram determinados ou tiveram Ct maior que o valor de corte. Os resultados estão ilustrados na Figura 18.

Em duas horas, os principais genes suprimidos foram BRCA2, CASP8, CCND1, MLH1, TNF, ELK1, PRKCA, SERPINB5 e SH3PXD2A, sendo os últimos quatro os mais suprimidos. O gene TNF codifica uma proteína pró-inflamatória multifuncional também relacionada com proliferação e diferenciação celular, apoptose e metabolismo de lipídios. A proteína codificada pelo gene SH3PXD2A, relacionada à motilidade celular, pode tanto desempenhar uma função oncogênica quanto de supressão tumoral. Já os genes MDM2, CDKN2B e BAX foram os mais superexpressos. Quando em altos níveis celulares, a proteína mdm2 inativa a proteína supressora tumoral p53, atuando desta forma como facilitadora da oncogênese. A proteína codificada por CDKN2B, p15, está envolvida em processos como o ciclo celular e invasão/metástase, atuando em ambos como supressora tumoral. O gene BAX codifica uma proteína pró-apoptótica pertencente à família BCL2.

Os genes alterados 8h após o tratamento, em sua maioria, mantiveram o padrão de supressão ou superexpressão que mostraram em 2h, mas de maneira mais discreta, ou seja, com valores de fold-regulation menores. Esse fato foi observado nos genes CCND1, ELK1, MLH1, PRKCA, SERPINB5 e SH3PXD2A, entre outros. Entretanto, o gene TNF não seguiu essa tendência, apresentando um aumento expressivo da supressão em 8h.

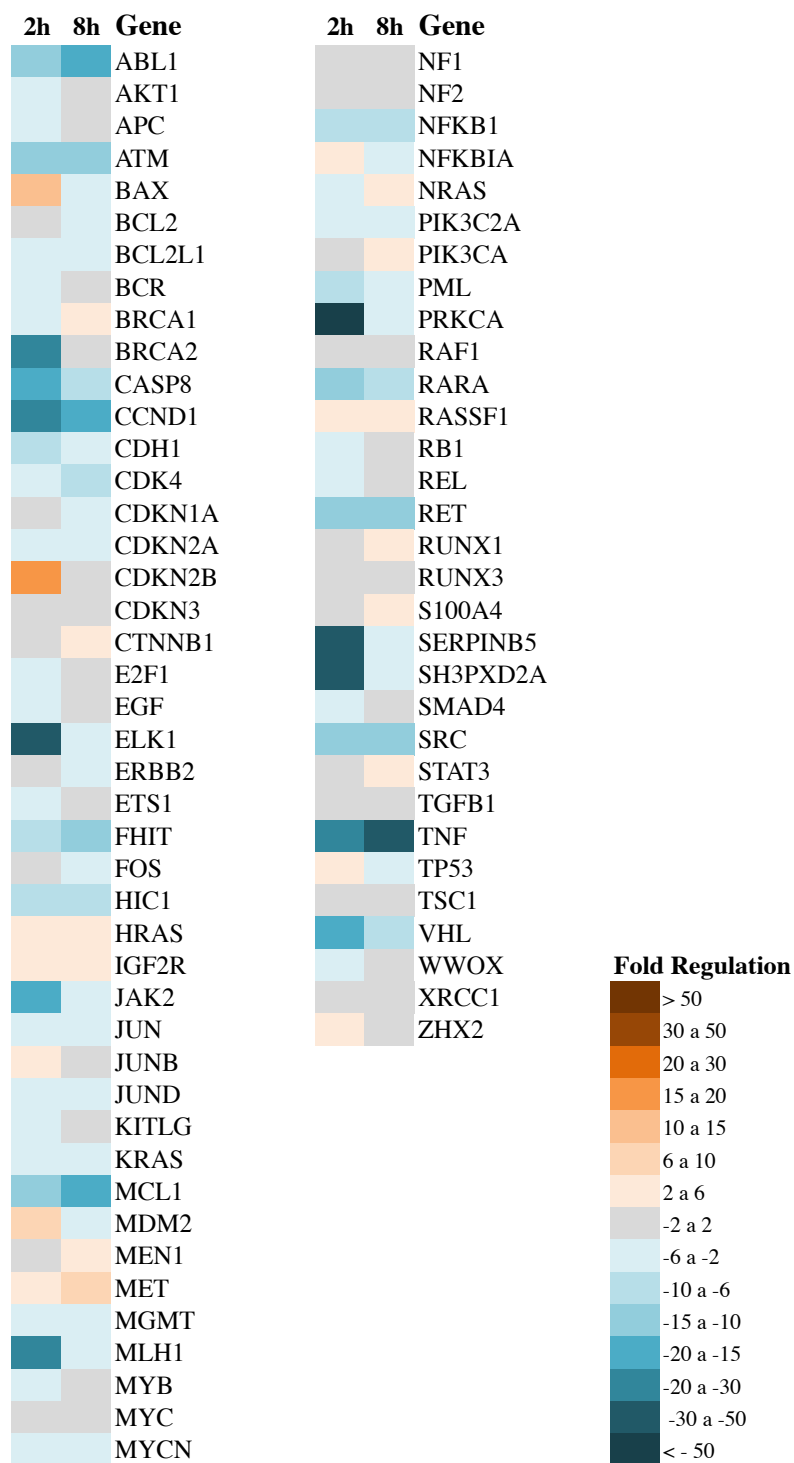


Figura 18. Perfil de expressão gênica das células OSCC-3 após irradiação com laser diodo em comprimento de onda de 670nm. Os resultados foram obtidos por meio do ensaio de PCR-Array, em que 84 genes de interesse foram avaliados por qRT-PCR. Cada cor da escala representa um intervalo de Fold-Regulation que mostra a comparação entre o grupo tratado, no caso somente irradiado, e o grupo controle. Esses resultados são representativos de dois experimentos independentes, em que as triplicatas de cada um deles foram agrupadas.

4.6.3 Expressão gênica no grupo TFD

As células do grupo TFD mostraram 20, 2 e 3 genes suprimidos nos tempos de 2h, 4h e 8h, respectivamente. Já com relação aos genes superexpressos estes foram de 5, 13 e 46 nos tempos de 2h, 4h e 8h, respectivamente, conforme ilustrado na Figura 19. Dezenove genes não foram determinados ou tiveram Ct maior que o valor de corte.

Em duas horas, a maioria dos genes apresentou valores de fold-regulation semelhantes ao grupo controle. Algumas discretas supressões foram observadas nos genes MET, MYC e PRKCA. Os genes MET e MYC são proto-oncogenes.

Seguindo o padrão encontrado em duas horas, a maioria dos genes avaliados em 4h apresentou valores de fold-regulation também semelhantes ao grupo controle. Algumas discretas superexpressões foram observadas nos genes FOS, JUN e TNF. Os dois primeiros são proto-oncogenes cujos produtos dimerizam formando o fator de transcrição AP-1, relacionado a diversos processos celulares como diferenciação, proliferação e morte celular.

As maiores alterações na expressão gênica aconteceram em oito horas, em que quase todos os genes apresentaram superexpressão. Os níveis mais altos foram observados principalmente nos genes BCL2, BCR, ESR1, FOS, JUN, TNF e WWOX. O produto do gene BCL2 é uma proteína da membrana mitocondrial que bloqueia a morte celular por apoptose. Apesar de o gene BCR estar relacionado com casos de leucemia mielóide crônica, a função da proteína codificada por ele ainda não está bem esclarecida. Já o gene ESR1 codifica uma proteína da família de fatores de transcrição E2F, cruciais para o controle do ciclo celular e ação de proteínas supressoras

tumorais. A proteína formada a partir do gene WWOX participa de uma série de funções celulares como degradação de proteínas, transcrição e reparo de RNA.

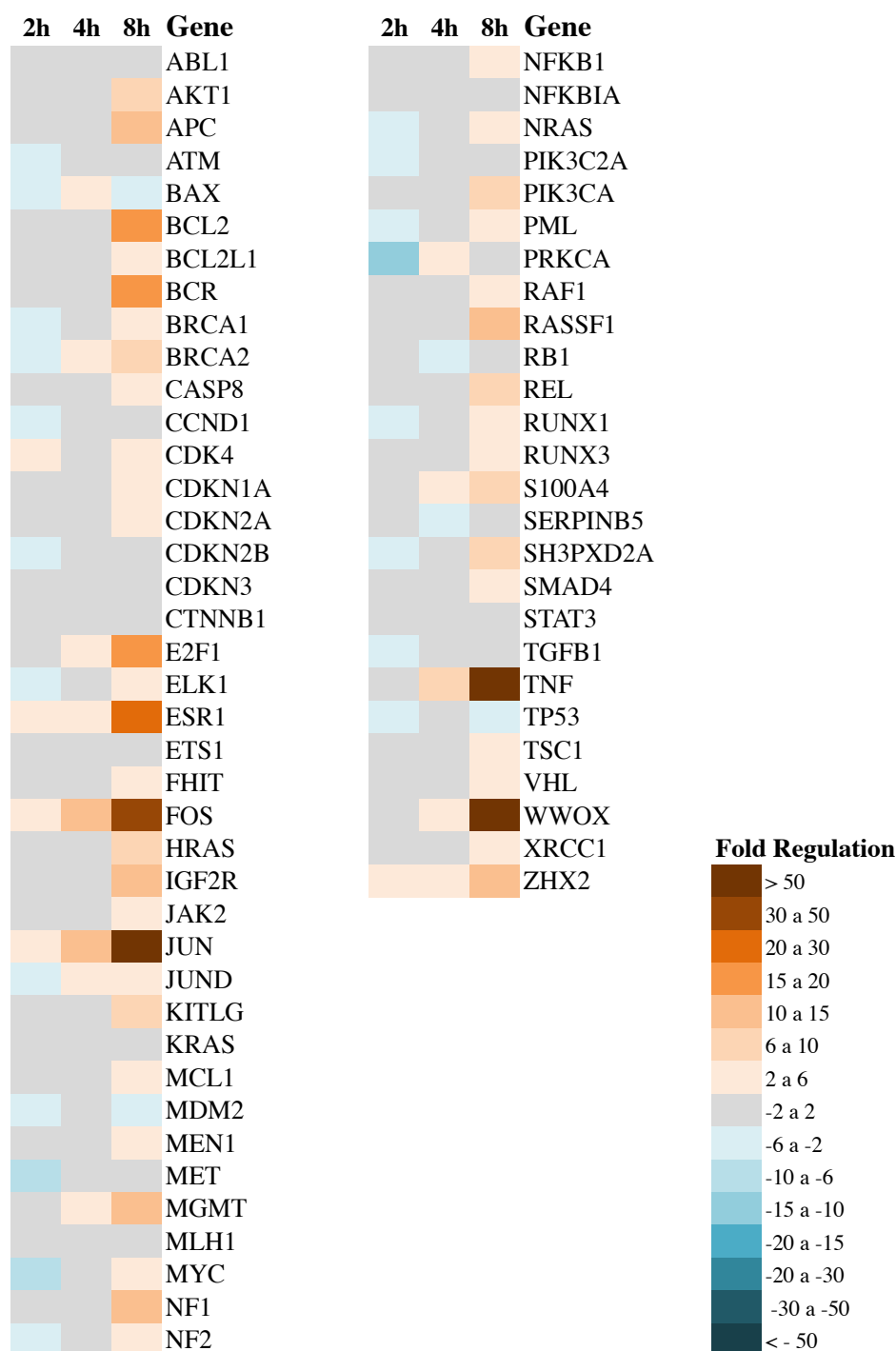


Figura 19. Perfil de expressão gênica das células OSCC-3 submetidas à TFD, ou seja, incubadas com AIClPc lipossomal e irradiada com laser diodo a 670nm. Os resultados foram obtidos por meio do ensaio de PCR-Array, em que 84 genes de interesse foram avaliados por qRT-PCR. Cada cor da escala representa um intervalo de Fold-Regulation que mostra a comparação entre o grupo tratado, no caso submetido à TFD, e o grupo controle. Esses resultados são representativos de dois experimentos independentes, em que as triplicatas de cada um deles foram agrupadas.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

A Terapia fotodinâmica é um tratamento seletivo caracterizado pela excitação de um fármaco fotossensibilizante por irradiação em comprimento de onda específico gerando espécies reativas de oxigênio. As ERO são moléculas instáveis que podem se ligar a constituintes celulares como membranas lipídicas, proteínas celulares e material genético. Quando interagem com essas estruturas celulares, as ERO podem causar morte celular, induzindo a destruição tumoral (Wei et al., 2007).

Nos últimos anos, foram estudados diversos compostos com o intuito de que eles se tornassem novos agentes fotossensíveis para serem aplicadas na TFD. Dentre eles, o fotossensibilizador AICIPc em formulação lipossomal (Barbugli et al., 2010), que tem mostrado eficiência durante a TFD tanto em células procarióticas quanto em células eucarióticas (Tapajós et al., 2008; Longo et al., 2011). Os estudos acima descritos demonstraram alta citotoxicidade da TFD mediada pela AICIPc lipossomal. Entretanto, em ambos os casos, foram observadas células sobreviventes à terapia cujo comportamento depois de submetidas à TFD ainda não estava elucidado. Desta forma, principalmente no tratamento de neoplasias, essa questão se tornou de extrema importância para se determinar o prognóstico da TFD a partir da resposta tumoral.

Das linhagens celulares derivadas de carcinoma epidermóide, as células OSCC são consideradas a de maior potencial maligno (Rheinwald et al., 1981). A linhagem OSCC-3, utilizada neste estudo, foi estabelecida a partir de uma cultura primária de um carcinoma epidermóide bucal pobremente diferenciado (Petro et al., 2004). Desde então, as células OSCC vêm sendo utilizadas em estudos relativos à carcinogênese (Hasina et al., 2003), investigação da existência de deleções de gene

supressores de tumor (Uzawa et al., 2001), tratamentos antitumorais (Kumar et al., 2005) e citotoxicidade (González et al., 2005).

Assim como outras neoplasias, o carcinoma epidermóide bucal consiste em uma população celular heterogênea de variados comportamentos biológicos. Parâmetros clínicos e patológicos não são suficientes para determinar as características biológicas do tumor (Tsui et al., 2009). Além disso, sabe-se que a expressão de um único marcador genético pode não ser um indicador confiável para avaliar o prognóstico tumoral. Desta forma, a análise de múltiplos marcadores moleculares é essencial para uma avaliação mais precisa do comportamento tumoral. Neste estudo, com o objetivo de se estabelecer um perfil transcricional para as células OSCC-3 submetidas à TFD mediada pela AICIPc lipossomal, foi realizado o ensaio de PCR-Array, em que a expressão de um painel de genes envolvidos em vias biológicas é avaliada por qRT-PCR.

Por ser um composto hidrofóbico, o uso do fotossensibilizante AICIPc em fluídos biológicos está condicionado ao encapsulamento em sistemas de entrega de fármacos como os lipossomas. Desse modo, com a degradação da estrutura lipídica dos lipossomas, a AICIPc tende a se agregar no meio aquoso e com isso a sua emissão de fluorescência fica diminuída e conseqüentemente a sua capacidade de induzir geração de ERO também (Gupta et al., 2011). Considerando que a síntese do fármaco AICIPc lipossomal foi realizada na Universidade de São Paulo e esse enviado à Brasília em tempos diferentes para cada amostra, estabeleceu-se o décimo dia após a síntese do composto como tempo inicial da avaliação.

Embora a eficácia da AICIPc sobre células tumorais estivesse bem estabelecida como demonstrado nos estudos anteriores, ainda não se conhecia por quanto tempo esse fotossensibilizante mantinha sua estabilidade após a síntese, de

modo que permitisse seu uso para a TFD. Nesse sentido, antes de se analisar o perfil transcricional das células OSCC-3 submetidas ao tratamento, ensaios de fluorescência, geração de ERO, citotoxicidade no escuro e efeito fotodinâmico foram realizados para determinar por quanto tempo a AICIPc lipossomal mantinha suas propriedades fotofísicas, fotoquímicas e fotobiológicas.

Como ilustrado na Figura 6, o fotossensibilizante apresentou redução da fluorescência nas avaliações feitas a partir do 15º dia. Entretanto, o reflexo dessa redução na produção de ERO só foi observado no sexagésimo dia. Para confirmar se a quantidade de ERO geradas entre o 15º dia e o 30º era suficiente para manter o efeito fotodinâmico da TFD nas células, foram realizados ensaios de citotoxicidade no escuro, sem irradiação, e efeito fotodinâmico, TFD, ambos *in vitro*.

Os dados de citotoxicidade no escuro obtidos por meio da análise da atividade mitocondrial (MTT), mostraram que a redução do metabolismo celular induzida pela AICIPc não altera ao longo do tempo. Já a eficácia fotodinâmica, ou seja, da AICIPc irradiada, diminui no trigésimo dia. Não há na literatura dados sobre a estabilidade dessa formulação, por isso não é possível comparar as informações obtidas neste estudo. Levando em consideração os resultados descritos acima, optou-se por utilizar o fármaco até o 15º dia após a sua síntese, padronizando os experimentos para que houvesse efetividade da TFD.

A efetividade da TFD é um fator dependente tanto da concentração do fármaco quanto da potência da luz aplicada durante a irradiação (Zhu et al., 2008). Por isso, uma vez determinada a estabilidade da AICIPc lipossomal, ainda se fez necessário determinar a concentração em que ela seria utilizada nos experimentos posteriores. Além disso, diferentes doses de energia foram testadas ao se alterar a

potência de aplicação do laser. Desta maneira, definiu-se um protocolo de aplicação da TFD em que haveria células suficientes sobreviventes ao tratamento para uma análise de expressão gênica.

O protocolo de escolha foi o que manteve a eficácia do tratamento utilizando uma menor quantidade de AICIPc - $2,5\mu\text{M}$ e irradiadas a 80mW . Com esse delineamento experimental, atingiu-se o índice de 30% de células sobreviventes à TFD, sendo essa taxa de sobrevivência suficiente para fornecer a quantidade de RNA total necessária aos experimentos. Estudos prévios demonstraram que 30% da quantidade das células cultivadas forneceriam a quantidade aproximada de $1\mu\text{g}$ de RNA, quantidade essa recomendada pelo fabricante do PCR-Array. Tapajós et al (2008) conseguiram aproximadamente 100% de morte celular em queratinócitos humanos utilizando a concentração de AICIPc lipossomal de $5\mu\text{M}$ e irradiação a uma potência de 40mW . A diferença de morte celular encontrada entre este estudo e o de Tapajós foi devida principalmente ao maior tempo de irradiação desse segundo, o que culminou em uma maior dose total de energia destinada às células submetidas à TFD.

Vale ressaltar que tanto a concentração do fotossensibilizante quanto a potência de irradiação podem alterar a eficiência da TFD. Além disso, a via de morte induzida e a ativação do sistema imunológico são outras duas variáveis dependentes da modulação do protocolo do tratamento (Buytaert et al., 2007). Wilson et al (1992), ao tratarem um carcinoma basocelular com a administração do fotossensibilizante Photofrin® na concentração de 2mg/kg e irradiá-lo com energia de 36 J/cm^2 , constataram recidiva em 100% dos casos. Por outro lado, ao diminuírem a dose de Photofrin® para 1mg/kg , puderam irradiar a uma potência de 288 J/cm^2 devido a menor chance de reação de fototoxicidade, sendo a recidiva nesse caso de apenas 11%.

A partir da definição dos parâmetros de aplicação da TFD, os ensaios que se seguiram utilizaram o protocolo em questão. Com o objetivo de avaliar a alteração da citotoxicidade ao longo dos tempos experimentais de 2h, 4h e 8h, foram realizados os ensaios de análise de metabolismo mitocondrial, integridade de membrana e morfologia celular. A definição dos tempos experimentais teve como base o estudo realizado por Sanovic et al (2009), que definiram o intervalo de 3h a 5h como o de maiores alterações na expressão gênica de células de carcinoma epidermóide humano após TFD mediada por hipericina.

Os ensaios de metabolismo mitocondrial e integridade de membrana mostraram redução de viabilidade das células submetidas à TFD a partir de 4h. Entretanto, a citotoxicidade encontrada no primeiro ensaio foi muito maior do que a encontrada no segundo, mostrando que a TFD afeta mais a atividade mitocondrial do que a integridade da membrana das células. Da mesma forma, quando avaliadas somente as células submetidas à AICIPc sem irradiação, foi observada diminuição da metabolização mitocondrial. Entretanto quase 100% das membranas celulares se encontravam íntegras. Uma das explicações possíveis para esse fato é a localização intracelular da AICIPc, que por ser lipossolúvel, teria acúmulo preferencial no citoplasma, mais especificadamente em mitocôndrias (Lam et al., 2001; Okunaka et al., 2007), o que de alguma forma poderia afetar o metabolismo celular. Não foram encontrados dados na literatura que permitem elucidar de que forma a presença da AICIPc alteraria as funções mitocondriais.

Entretanto, a alteração no metabolismo mitocondrial gerado pela presença do fármaco AICIPc no interior das células, não se refletiu na morfologia celular. Já as células submetidas à TFD, quando avaliadas ao Microscópio de luz invertida, mostraram diminuição do volume citoplasmático com perda dos prolongamentos e

perda de adesão à placa de cultura, o que poderia sugerir o início de um processo apoptótico. Segundo Grivicich et al (2007), durante o processo apoptótico, as células sofrem retração que induz perda da aderência com a matriz e com as células vizinhas, embora haja a manutenção da morfologia das organelas citoplasmáticas. Os dados da Microscopia de luz invertida foram corroborados com a análise morfológica realizada no Citômetro de fluxo, em que somente o grupo TFD apresentou alteração de tamanho e granulosidade das células. Diaz et al (2008) descrevem que as células em apoptose apresentam redução de tamanho e valores de granulosidade geralmente constantes.

Considerando que os dados acima indicavam que a TFD mediada pela AICIPc lipossomal induzia morte celular por apoptose, realizou-se o ensaio de Anexina-V/FITC com o objetivo de confirmar esses dados. Entretanto a maior taxa de apoptose encontrada nas células submetidas à TFD foi de 3%, excluindo a apoptose como a principal via de morte induzida. Outra característica da apoptose é a fragmentação internucleossômica do DNA (Mroz et al., 2011).

As células OSCC-3, assim como outras células tumorais, se caracterizam por apresentarem grande instabilidade genética (Colotta et al., 2009). Essa instabilidade se reflete nas taxas de fragmentação do DNA encontradas no grupo controle (11,73% em 8h). Campos-da-Paz et al (2008) também mostraram que células OSCC-3 não tratadas apresentam 13,55% de fragmentação do DNA avaliada pelo ensaio cometa.

Foi observada no grupo tratado somente com o laser uma redução da fragmentação do DNA que poderia ser explicada pela ação terapêutica do laser de baixa potência, que pode atuar como anti-inflamatório, analgésico e biomodulador. Seu mecanismo de ação está relacionado à modulação da atividade mitocondrial, da síntese de DNA/RNA, aceleração do metabolismo celular, entre outros (Yazdani et

al., 2012). O modelo mais aceito na literatura para descrever os efeitos biológicos da laserterapia é o de Tina Karu et al. (1987), que sugeriu que ocorreriam mudanças fotoquímicas em moléculas fotorreceptoras componentes da cadeia respiratória, acelerando a produção energética.

A TFD induziu fragmentação DNA somente em 8h quando comparada ao respectivo controle. Provavelmente, os efeitos da TFD se refletem primeiramente no citoplasma celular, uma vez que essa é a localização preferencial do fármaco AICIPc. Desse modo, o efeito da TFD no DNA nuclear das células, como a fragmentação, somente ocorreria em um segundo momento. As células dos grupos controle, AICIPc e laser apresentaram diminuição da taxa de fragmentação do DNA em 8h. Esses dados poderiam sugerir a ocorrência de um processo de reparo do material genético.

De acordo com Friedberg et al (2003), a estratégia das células para lidar com o dano no DNA consiste basicamente em três etapas: (i) reconhecimento do dano, (ii) avaliação da intensidade do dano e (iii) a implementação de uma resposta. Desta forma, a fragmentação do DNA pode ativar tanto um sistema de reparo quanto iniciar um processo apoptótico. Porém durante o processo de reparo podem ocorrer rearranjos gênicos e conseqüentemente alteração no perfil de expressão gênica (Cooke et al., 2003), considerado um dos fatores determinantes para que as células desenvolvam resistência à TFD.

Os mecanismos de resistência à TFD estão relacionados com a diminuição da internalização do fotossensibilizante pela célula, a inativação das ERO por enzimas antioxidantes e finalmente a alteração na expressão de diversos genes que podem modular respostas biológicas (Agostinis et al., 2011; Casas et al., 2011). Diante do exposto e das dúvidas que ainda estavam presentes quanto ao comportamento das células OSCC-3 sobreviventes à TFD, decidiu-se avaliar o perfil de expressão de

genes envolvidos nos processos de oncogênese, supressão tumoral, adesão celular, ciclo celular, invasão e metástase, apoptose e resposta imunológica. Algumas das vias acima estão representadas na Figura 20.

As células tratadas somente com o fotossensibilizante AICIPc lipossomal mostraram alterações na expressão gênica mais acentuadas 2h após o tratamento. Nesse tempo, os principais genes suprimidos foram o BCRA2, o CCND1, o ELK1 e o PRKCA. A proteína Brca2 modula a atividade da proteína Rad51 que está envolvida no reparo de quebras induzidas ou naturais no DNA (Siaud et al., 2011). Essa inibição do reparo em 2h não comprometeriam as células tratadas com AICIPc, uma vez que nesse tempo experimental não houve fragmentação do DNA. Embora as células não tenham apresentado comprometimento do DNA, a supressão do gene CCND1 reflete na ausência do complexo Ciclina D/CDK4/6, que quando ativo é responsável por fosforilar a proteína supressora tumoral retinoblastoma (Rb). Por sua vez, Rb é responsável por liberar o fator de transcrição E2F para a Ciclina E, necessária para a transição de fase G1 para S (Choi et al., 2008). Desse modo, a AICIPc em 2h estaria induzindo uma estagnação na fase G1 por inibir a replicação do DNA. A superexpressão da Ciclina D1 tem sido descrita em 25-70% dos cânceres bucais e está associada a um comportamento tumoral mais agressivo (Choi et al., 2008). Da mesma forma, a supressão do gene ELK1 mostra que a AICIPc inibe a proliferação celular, uma vez que a proteína codificada por esse gene estimula a formação do fator de transcrição AP-1, responsável por regular entre outros processos a síntese protéica (Dam et al., 2001). O proto-oncogene PRKCA, também suprimido pelo tratamento com AICIPc, é regulador positivo do gene AKT1. A não-indução de AKT1 está associada à diminuição da proliferação e à sobrevivência celular. Estudos mostram que quando a proteína Akt1 é superexpressa, o CEB apresenta maior agressividade

(Irie et al., 2005; Watanabe et al., 2009; Oliveira et al., 2011). Desta forma, a supressão desses genes indica alterações que podem refletir na progressão do ciclo celular, afetando crescimento e proliferação dessas células.

Em 4h e 8h, a AICIPc lipossomal induziu alteração, superexpressão e supressão, pouco expressiva no genes avaliados. Embora existam estudos relacionando o perfil gênico e o tratamento com TFD, em nenhum deles foi utilizado o fármaco AICIPc em formulação lipossomal. Luna et al (2008) avaliaram a expressão gênica em células murinas RIF-1 após o tratamento com TFD mediada pelo Photofin®. Já Sanovic et al (2009) estudaram o perfil gênico de células de carcinoma epidermóide de pele A-431 após TFD realizada com o fármaco hipericina. Ambos os estudos não avaliaram a expressão gênica causada apenas pelo fotossensibilizante, inviabilizando comparações.

Além dos genes BRCA2, CCND1, ELK1 e PRKCA, as células tratadas com o laser apresentaram os genes CASP8, MLH1, TNF, SERPINB5 e SH3PXD2A suprimidos em 2h. A enzima Casp8 está envolvida no processo apoptótico ao clivar a proteína Bid, permitindo que essa proteína truncada interaja com o produto dos genes BAX/BAD, conhecidos pró-apoptóticos (Nehra et al., 2010; Liu et al., 2011). A proteína codificada por MLH1 interage fisicamente com a proteína do gene BRCA1, cujo papel é semelhante àquele descrito para BRCA2 (Macdonald et al., 2008). Já o produto do gene TNF está relacionado a diversas funções biológicas, entre eles proliferação e diferenciação celular. Em carcinomas, a presença de TNF indica um possível processo de transição epitélio-mesenquimal, em que as células tumorais adquirem um fenótipo mais indiferenciado com o objetivo de interagir com o conjuntivo adjacente (Yang et al., 2009; Li et al., 2012). Os achados do gene SH3PXD2A validam os resultados encontrados com a expressão do TNF. A proteína

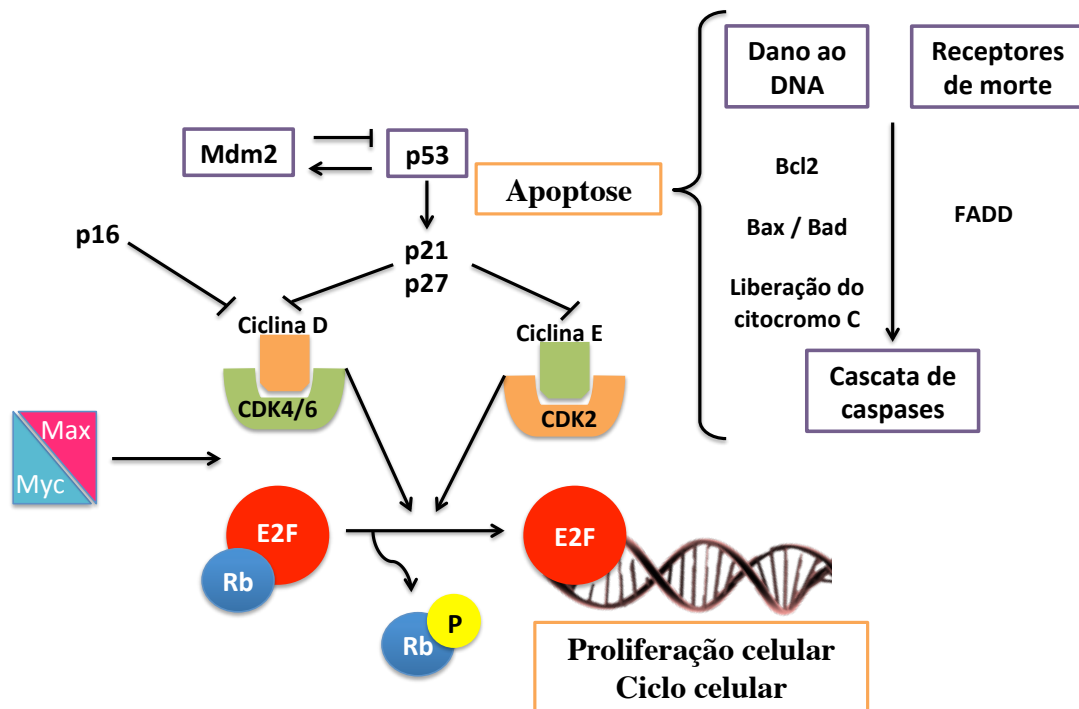
codificada por SH3PXD2A interage com ADAM12, que faz parte das famílias das desintegrinas responsáveis pela degradação de E-caderina, mantenedora da adesão celular. Entretanto, a supressão do gene SERPINB5 deve resultar em uma menor supressão do gene RAC1, cuja proteína é uma GTPase envolvida em processos de motilidade e diferenciação celular (Sanjeev et al., 2010; Makrodouli et al., 2011). Sabe-se que o SERPINB5 possui atividade supressora tumoral ao dificultar a propriedades metastáticas de células epiteliais. Shur et al (2007) mostraram que esse gene está seis vezes mais expresso em carcinomas epidermóides bucais quando comparado à células não-tumorais. Desta forma, a supressão do SH3PXD2A, assim como a do TNF, dificultaria o processo de invasão e metástase, dados não ratificados pelos encontrados na avaliação de SERPINB5. É importante salientar que esses achados não são capazes de definir o comportamento invasivo das células OSCC-3, visto que outros mecanismos estão envolvidos no processo de metástase.

Dentre os genes superexpressos, estavam o BAX, o CDKN2B e o MDM2. Este último é um proto-oncogene antagonista de p53. A proteína Mdm2 se liga a subunidades de p53 desencadeando ubiquitilação destas e sua exportação ao citoplasma, onde são degradadas no proteossomos (Lahav et al., 2004; Wesierska-Gadek et al., 2009). Assim com a superexpressão de MDM2, poderia se esperar uma diminuição em p53. Porém esse fato não foi confirmado nem com a análise gênica de TP53, que mostrou níveis desse gene semelhantes ao das células controle, tampouco com a elevada expressão de BAX, gene pró-apoptótico estimulado por p53. Vale ressaltar que embora o gene esteja induzido, o aumento na concentração de seu produto demandará um intervalo de tempo. Por exemplo, níveis citoplasmáticos elevados de p53 poderiam induzir a superexpressão de MDM2 em um processo de feedback. Essa afirmação é suportada pelos achados do ensaio de Anexina-V, em que

as células do grupo laser não se mostraram em apoptose. Outro gene com expressão aumentada foi o CDKN2B cuja proteína p15, conhecida inibidora da progressão do ciclo celular por impedir a progressão da célula da fase G1 para a fase S ao formar complexos com CDK4 e CDK6 (Aswini et al., 2009). Desta forma, muito provavelmente as células submetidas à irradiação com o laser apresentaram estagnação do ciclo celular 2h após o tratamento. Essa parada do ciclo pode ter ocorrido para que as células se recuperassem dos danos que sofreram, o que pode ser confirmado pela diminuição da fragmentação do DNA encontrada nesse tempo.

Como o objetivo principal da laserterapia de baixa potência é acelerar o metabolismo das células, na literatura, os estudos utilizando esse tratamento em células neoplásicas são raros. Em células não-tumorais, é descrito que a irradiação estimula o crescimento celular por regular a expressão de genes associados à proliferação, reparo de DNA e metabolismo celular (Vladmirov et al., 2004; Rampini et al., 2008; Yzdane et al., 2012). Desta forma, o receio de que haja estímulo das células neoplásicas durante a irradiação, que por algum motivo não internalizaram o fotossensibilizante, não é condizente com os dados encontrados para as células OSCC-3. Neste estudo, quando analisadas em 8h, as células mantiveram o padrão de expressão encontrado em 2h, com exceção do TNF que se tornou ainda mais suprimido.

(A)



(B)

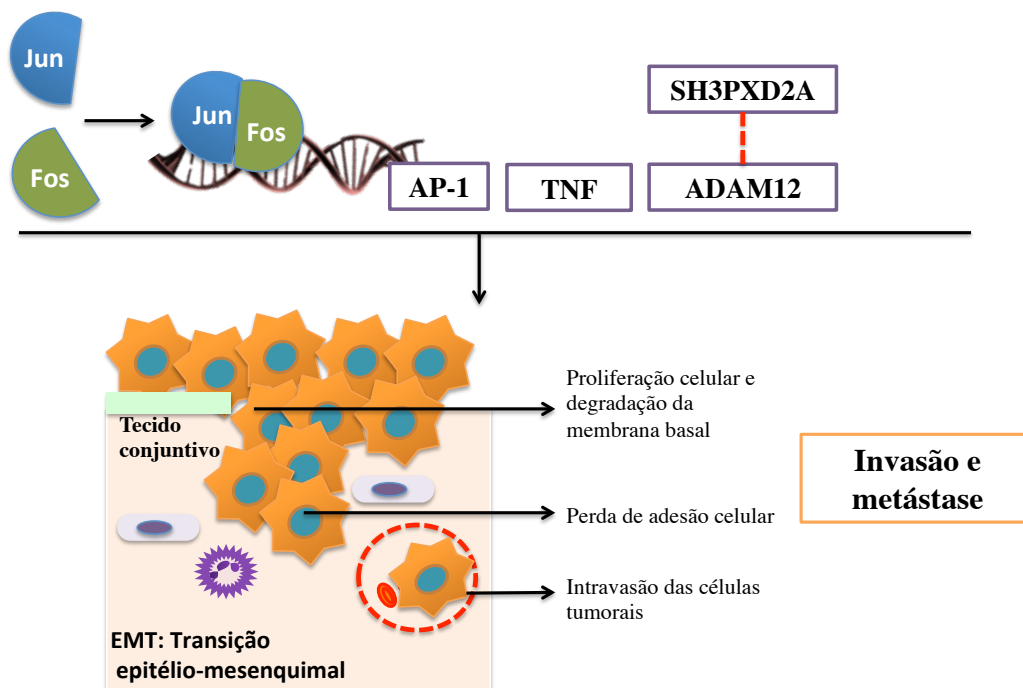


Figura 20. Vias biológicas alteradas nas células OSCC-3 após tratamento com AICIPc, Laser e TFD. Em (A) genes relacionados com proliferação celular, ciclo celular e apoptose. Em (B) genes relacionados com proliferação celular, invasão e metástase.

As células submetidas à TFD apresentaram perfil transcricional diferente daquelas tratadas com seus componentes – fotossensibilizante e laser – isoladamente. Em 2h, a maioria dos genes avaliados apresentou expressão próxima da encontrada em células não tratadas. As maiores alterações na expressão gênica foram observadas nos genes MET, MYC e PRKCA, que se encontraram discretamente suprimidos. O MET é um proto-oncogene codificador do receptor do fator de crescimento de hepatócito. Esse receptor quando ativado, promove estímulo de proliferação, sobrevivência e motilidade celular (Choi et al., 2008). Desse modo, a supressão do Met nas células OSSC-3 após 2h, pode ser relacionada com a inibição da proliferação dessas células. Nesse período, o tratamento estaria apresentando um efeito mais citostático do que citotóxico, uma vez que os baixos níveis de Met poderiam manter as células em G2, não permitindo que elas passem para fase M. Estudos mostram que a supressão de MET inibe a proliferação de hepatócitos e células de melanoma (Factor et al., 2010, Vergani et al., 2011).

O proto-oncogene MYC, cuja proteína é um fator de transcrição quando dimerizado com a proteína Max, atua no ciclo celular ao promover a passagem das células da fase G1 para S (Riggelen et al., 2010). Desse modo, a supressão de MYC observada em 2h, estaria relacionada com a parada do ciclo celular e consequente inibição da proliferação. Diferentemente dos resultados encontrados neste estudo, Sanovic et al (2009) encontraram MYC aumentado a partir de 3h após TFD mediada por hipericina em células de carcinoma de pele. Esse mesmo grupo, em 2007, descreveu a supressão de MYC após a TFD mediada por ácido 5-aminolevulínico (ALA) nessas mesmas células, demonstrando que as características do fotossensibilizante são determinantes para definir o perfil transcricional das células submetidas à TFD (Ruhdorfer et al., 2007). A hipótese de que a TFD estaria inibindo

a proliferação celular em 2h também é reforçada pela supressão do gene PRKCA nesse tempo experimental.

Assim como em 2h, o perfil gênico encontrado em 4h mostrou alterações discretas em relação às células controle. Embora em 2h os dados indicassem o efeito citostático da TFD, esse efeito não foi confirmado por meio da expressão gênica avaliada em 4h. Isso porque estavam induzidos, embora discretamente, genes relacionados ao crescimento e proliferação das células como FOS, JUN e TNF. Os dois primeiros são proto-oncogenes, que quando dimerizam formam o fator de transcrição AP-1 (Dam et al., 2001). A ligação de AP-1 com o DNA é responsável por ativar diversas vias relacionadas com a tumorigênese. A participação de AP-1 nesse processo está relacionada ao fato de este, além de estimular o crescimento celular, aumentar a síntese de metaloproteinases e dessa forma facilitar o processo de invasão e metástase (Rorke et al., 2010). O complexo AP-1 pode ser detectado tanto em linhagens celulares derivadas de OSCC quanto em displasias bucais, e ainda relacionado com a transformação maligna de OSCC em modelos murinos (Choi et al., 2007). No entanto, Kick et al. (1996) ao descreverem a indução de FOS e JUN após TFD, mostraram que a superexpressão desses genes não implica necessariamente em um AP-1 ativo capaz de se ligar ao DNA. Assim, o aumento do RNA mensageiro de JUN e FOS não pode ser descrito como fator determinante na agressividade das células OSCC-3. Contudo, a indução do gene TNF poderia significar uma rota alternativa a AP-1, também capaz de aumentar a invasividade dessas células após TFD.

Em 8h, as células OSCC-3 apresentaram perfil de indução mais acentuada quando comparado aos tempos anteriores. Além de FOS, JUN e TNF, que estavam ainda mais superexpressos, estavam também induzidos os genes BCL2, BCR, ESR1 e

WWOX. O gene BCL2 codifica uma proteína da membrana externa da mitocôndria que bloqueia a liberação do citocromo C, atuando assim como um inibidor de apoptose (Brown et al., 2003; Grivicich et al., 2007). Assim, a sua superexpressão após a TFD poderia suprimir a morte celular levando a um acúmulo de células defeituosas que ao proliferarem formariam novas massas tumorais. Esse dado está de acordo com os achados do ensaio de Anexina-V, que mostrou morte celular por apoptose somente em 3% das células submetidas à TFD. A função da proteína codificada por BCR ainda não está bem definida (Macdonald et al., 2004). Estudos sugerem que talvez ela possua um papel na regulação do ciclo celular, promovendo sobrevivência e proliferação celular, além do já conhecido envolvimento na leucemia mielóide crônica (Hearvy et al., 2006; Croce et al., 2008).

Outro gene superexpresso nesse tempo foi o ESR1, que codifica um receptor de estrógeno. É sabido que o estrógeno é um hormônio que estimula a proliferação de células epiteliais do sistema reprodutor. Embora o estrógeno e seus receptores estejam mais associados à função reprodutiva, eles também podem atuar em outros órgãos. Marocchio (2010), por exemplo, demonstrou por meio de imunohistoquímica a presença de receptores de estrógeno do tipo beta em células OSCC. Desta forma, mais uma vez, tem-se a TFD estimulando a expressão de genes envolvidos com a proliferação e conseqüentemente, maior agressividade tumoral.

Dentre as diversas vias de sinalização celular, da qual a proteína codificada pelo gene WWOX participa, pode-se destacar o seu papel na degradação de proteínas e apoptose, atuando como um supressor tumoral (Pimenta et al., 2008). Entre as proteínas degradadas, está a codificada por JUN (Cheng et al., 2010). É plausível supor que o aumento citoplasmático da proteína c-jun em 4h tenha implicações no aumento da expressão de WWOX, como forma de regular os níveis celulares dessa

proteína. Além disso, o RNAm do WWOX é um molécula extremamente longa, o que aumenta as chances de ocorrerem erros durante o processamento pós-transcricional resultando em um transcrito aberrante (Pimenta et al., 2008). Segundo Venables et al (2004) transcritos aberrantes dessa molécula têm sido associados a diversas doenças, entre elas o câncer. Logo, apesar da função supressora de tumor, o aumento expressivo de WWOX pode não estar associado à apoptose, já que o transcrito aberrante poderia resultar em uma proteína não funcional.

Diante do exposto, observou-se que tanto a AIClPc quanto o laser alteraram a expressão gênica principalmente 2h após o tratamento, em que foram suprimidos principalmente genes relacionados à regulação do ciclo celular e proliferação. Já a TFD apresentou maiores alterações 8h após o tratamento. Os genes relacionados ao estímulo de proliferação e invasão celular foram os mais superexpressos, além do WWOX que é um supressor tumoral, mas que também está envolvido em diversas outras funções celulares. A Figura 20 ilustra os resultados descritos acima.

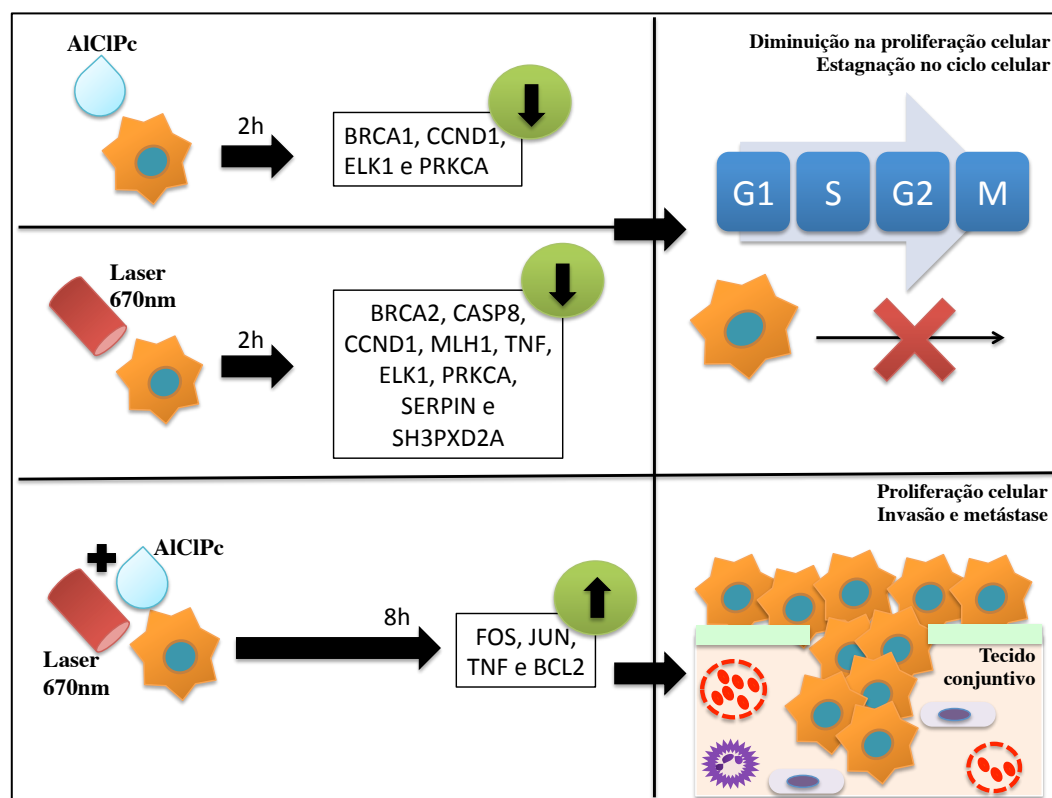


Figura 21. Representação gráfica dos principais resultados de avaliação do perfil transcricional obtidos em cada grupo experimental.

Esses dados evidenciam como são diversificadas as respostas celulares ao estresse, entre eles o estresse oxidativo provocado pela TFD. A avaliação do perfil transcricional das células OSCC-3 submetidas à AICIPc, ao laser e à TFD permitiu inferir quais vias biológicas sejam possivelmente ativadas por cada tratamento. Porém faz-se necessário determinar se as alterações no perfil gênico resultariam em alterações na quantidade do produto gênico funcional.

Assim somados aos resultados obtidos neste estudo, a determinação dos produtos gênicos talvez possa contribuir para o desenvolvimento de estratégias que tornem a TFD mais direcionada às células tumorais, com maior eficiência, e consequentemente com maior previsibilidade de sucesso para o tratamento de câncer bucal.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

Diante do exposto, o objetivo geral deste estudo consistiu em analisar o perfil transcricional de células derivadas de carcinoma epidermóide bucal após Terapia Fotodinâmica mediada por AICIPc em formulação lipossomal.

Com base nos resultados obtidos neste estudo, pode-se concluir que:

- O fotossensibilizante AICIPc em formulação lipossomal permanece estável, ou seja, mantém as suas propriedades fotofísicas, fotoquímicas e fotobiológicas até o 15º dia após a sua síntese;
- A AICIPc na concentração de 2,5µM e a potência de irradiação de 80mW proporcionaram uma TFD subletal;
- A TFD mediada pela AICIPc inibição do metabolismo mitocondrial, desintegração da membrana celular e alterações morfológicas como retração citoplasmáticas e perda de adesão;
- A TFD induziu morte celular por apoptose em no máximo 3% das células;
- A TFD induziu fragmentação de DNA detectada somente em 8h;
- A AICIPc induziu supressão dos genes BRCA1, CCND1, ELK1 e PRKCA em 2h. O laser induziu supressão de BRCA2, CASP8, CCND1, MLH1, TNF, ELK1, PRKCA, SERPIN e SH3PXD2A, e superexpressão de MDM2, CDKN2B e BAX em 2h. Desta

maneira, concluiu-se que nesses dois grupos - AIClPc e Laser - as principais alterações no perfil de expressão gênica ocorreram na regulação do ciclo celular e também da proliferação das células OSCC-3 nas primeiras horas após os tratamentos.

- A TFD induziu supressão discreta de MET, MYC e PRKCA em 2h e superexpressão de FOS, JUN e TNF em 4h e 8h, e de BCL2, BCR, ESR1 e WWOX em 8h, mostrando que o perfil transcricional induzido pela TFD está relacionado principalmente ao estímulo de proliferação celular e de processos de invasão e metástase.
- Diante do exposto, as alterações na expressão de genes de células OSCC-3 submetidas à TFD medida pela AIClPc lipossomal indicam que as células sobreviventes ao tratamento podem adquirir um comportamento mais agressivo. Desta forma, a TFD deve ser utilizada como terapia principal em situações em que a chance de sobrevivência de células tumorais após o tratamento seja mínima, como em pequenas massas tumorais ou ainda em um protocolo considerado mais letal para as células.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agostinis P, Berg K, Cengel KA, et al. Photodynamic therapy: an update. **CA Cancer J Clin** (2011) 61:250-281.

Allison RR, Downie GH, Cuenca R, et al. Photosensitizers in clinical PDT. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy** (2004) 1:27-42.

Allison RR, Mota HC, Bagnato VS, et al. Bio-nanotechnology and photodynamic therapy—State of the art review. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy** (2008) 5:19-28.

Allison RR, Sibata CH. Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: a clinical review. **Photodiagnosis Photodynamic Therapy**. 2010 Jun;7(2):61-75.

Allison RR, Bagnato VS, Sibata CH. Future of oncologic photodynamic therapy. **Future Oncol** (2010) 6:929-40.

Aswini YB. The genomics of oral cancer and wound healing. **J Indian Soc Pedod Prevent Dent** (2009) 27:2-5.

Baniwal SK, Khalid O, Gabet Y, et al. Runx2 transcriptome of prostate cancer cells: insights into invasiveness and bone metastasis. **Molecular Cancer** (2010) 9:258-276.

Barbugli PA, Siqueira-Moura MP, Espreafico EM, et al. In Vitro Phototoxicity of Liposomes and Nanocapsules Containing Chloroaluminum Phthalocyanine on Human Melanoma Cell Line. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology** (2010) 10:569–573.

Barge J, Decréau R, Julliard M, et al. Killing efficacy of a new silicon phthalocyanine in human melanoma cells treated with photodynamic therapy by early activation of mitochondrion-mediated apoptosis. **Experimental Dermatology** (2004) 13:33-44.

Bhuvanewari R, Gan YY. The effect of photodynamic therapy on tumor angiogenesis. **Cell Mol Life Sci** (2009) 66:2275–2283.

Brener S, Jeunon FA, Barbosa AA, et al. Carcinoma de células escamosas bucal: uma revisão de literatura entre o perfil do paciente, estadiamento clínico e tratamento proposto. **Revista Brasileira de Cancerologia** (2007) 53:63-69.

Brown M, Wilson G. Apoptosis genes and resistance to cancer therapy. **Cancer Biology and Therapy** (2003)5:477-490.

Buytaert E, Dewaele M, Agostinis P. Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy. **Biochimica et Biophysica Acta** (2007) 1776:86-107.

Campana JP, Meyers AD. The surgical management of oral cancer. **Otolaryngol Clin Am** (2006) 39:331-348.

Campos-da-Paz M, Pereira LO, Bicalho LS, et al. Interaction of bracken-fern extract with vitamin C in human submandibular gland and oral epithelium cell lines. **Mutation Research** (2008) 652:158-163.

Casas A, Venosa GD, Hasan T, et al. Mechanisms of Resistance to Photodynamic Therapy. **Current Medicinal Chemistry** (2011) 18:2486-2515.

Chang JY, He RY, Lin HP, et al. Signaling from membrane receptors to tumor suppressor WW domain-containing oxidoreductase. **Experimental Biology and Medicine** (2010) 235:796-804.

Chatterjee DK, Fong LS, Zhang Y. Nanoparticles in photodynamic therapy: an emerging paradigm. **Adv Drug Deliv Rev** (2008)60:1627-37.

Choi S, Myers JN. Molecular Pathogenesis of Oral Squamous Cell Carcinoma: Implications for Therapy. **J Dent Res** (2008) 87:14-32.

Colotta F, Allavena P, Sica A, et al. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. **Carcinogenesis** (2009) 30:1073-1081.

Cook KM, Figg WD. Angiogenesis inhibitors: current strategies and future prospects. **CA Cancer J Clin** (2010) 60:222-243.

Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, et al. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. **The FASEB Journal** (2003) 17:1195-1214.

Croce CM. Oncogenes and cancer. **N. Engl J Med** (2008) 358:502-511.

Dam H, Castellazzi M. Distinct roles of Jun:Fos and Jun:ATF dimers in oncogenesis. **Oncogene** (2001) 20:2453-2464.

Derycke ASL, Witte PAM. Liposomes for photodynamic therapy. **Advanced Drug Delivery Reviews** (2004) 56:17-30.

Diaz D, Prieto A, Reyes E, et al. Flow Cytometry Enumeration of Apoptotic Cancer Cells by Apoptotic Rate Methods in Molecular Biology. **Apoptosis and Cancer. Totowa: Humana Press Inc** (2008).

Dolmans DE, Fukumura D, Jain RK. Photodynamic therapy for cancer. **Nature Reviews** (2003) 3:380-387.

Oikonomou E, Koc M, et al. BRAF and RAS oncogenes regulate Rho GTPase pathways to mediate migration and invasion properties in human colon cancer cells: a comparative study. **Molecular Cancer** (2011) 10:118-139.

Factor VM, Seo D, Ishikawa T, et al. Loss of c-Met Disrupts Gene Expression Program Required for G2/M Progression during Liver Regeneration in Mice. **PLoS One** (2010) Publicação eletrônica DOI 10.1371.

Friedberg EC. DNA damage and repair. **Nature** (2003) 421:436-440.

Frigerio S, Deho P, Mondellini P, et al. Identification of MET and SRC Activation in Melanoma Cell Lines Showing Primary Resistance to PLX4032. **Neoplasia** (2011) 13:1132-1142.

Fu-Min F, Wen-Ling T, Chih-Yen C, et al. Health-related quality of life outcome for oral cancer survivors after surgery and postoperative radiotherapy. **Jpn J Clin Oncol** (2004) 11:641-646.

Golab J, Nowis D, Skrzycki M, et al. Antitumour effects os photodynamic therapy are potentiated by 2-methoxyestradiol. A superoxide dismutase inhibitor. **J Biol Chem** (2003) 278:407-414.

Gonzáles de Mejia E, Song YS, Ramires-Mares MV, et al. Effect of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) tea on topoisomerase inhibition and oral carcinoma cell proliferation. **J Agricult Food Chem** (2005) 53:1966-1973.

Grivicich I, Regner A, Rocha AB. Apoptosis: Programmed Cell Death. **Revista Brasileira de Cancerologia** (2007) 53:335-343.

Gupta S, Dwarakanath BS, Chaudhury NK, et al. In vitro and in vivo targeted delivery of photosensitizers to the tumor cells for enhanced photodynamic effects. **J Can Research and Therapeutics** (2011) 7:314-324.

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. **Cell** (2000) 100:57-70.

Harrold-Kim P. Tumor ablation with photodynamic therapy: introduction to mechanism and clinical applications. **J Vasc Interv Radiol** (2006) 17:1448-1448.

Hasina R, Hullet K, Bicciano S, et al. Plasminogen activator inhibitor-2: a molecular biomarker for head and neck cancer progression. **Cancer Res** (2003) 63:555-559.

Hervy M, Hoffman L, Beckerle MC. From the membrane to the nucleus and back again: bifunctional focal adhesion proteins. **Cell Biology** (2006) 18:524-532.

Huang N, Cheng G, Li X, et al. Influence of drug-light-interval on photodynamic therapy of port wine stains - simulation and validation of mathematic models. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy** (2008) 5:120-126.

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro (2011).

Irie HY, Pearline RV, Grueneberg D, et al. Distinct roles of Akt1 and Akt2 in regulating cell migration and epithelial–mesenchymal transition. **The Journal of Cell Biology** (2005) 171:1023–1034.

Karu T. Photobiological fundamentals of low-power laser therapy. **J of Quantum Electronics** (1987) 10:1703-1717.

Kick G, Messer G, Plewig G, et al. Strong and prolonged induction of c-jun and c-fos proto-oncogenes by photodynamic therapy. **British Journal of Cancer** (1996) 74:30-36.

Kiesslich T, Berlanda J, Plaetzer K, et al. Comparative characterization of the efficiency and cellular pharmacokinetics of Foscan and Fosfolip based photodynamic therapy in human biliary tract cancer cell lines. **Photochemical & Photobiological Sciences** (2007) 6:619-627.

Kim HR, Luo Y, Li G, et al. Enhanced apoptotic response to photodynamic therapy after bcl-2 transfection. **Cancer Res** (1999) 59:3429-3432.

Korostoff A, Reder L, Masood R, et al. The role of salivary cytokine biomarkers in tongue cancer invasion and mortality. **Oral Oncology** (2011) 47:282-287.

Kumar P, Benedict R, Urzua F. Combination treatment significantly enhances the efficacy of antitumor therapy by preferentially target in angiogenesis. **Lab Invest** (2005) 85:756–767.

Lahav G, Rosenfeld N, Sigal A, et al. Dynamics of the p53-Mdm2 feedback loop in individual cells. **Nature genetics** (2004) Publicação eletrônica DOI 10.1038.

Lam M, Oleinick NL, Nieminen et al. Photodynamic therapy-induced apoptosis in epidermoid carcinoma cells. **The Journal of biological chemistry** (2001) 276:47379-47386.

Li CW, Xia Q, Huo L, et al. Epithelial-mesenchyme transition induced by TNF- α requires NF- κ B mediated transcriptional upregulation of Twist1. **Cancer Res** (2012) Publicação eletrônica DOI 10.1158.

Liu J, Uematsu H, Tsuchida N, et al. Essential role of caspase-8 in p53/p73-dependent apoptosis induced by etoposide in head and neck carcinoma cells. **Molecular Cancer** (2011) 10:95-108.

Longo JPF, Leal SC, Simioni AR, et al. Photodynamic therapy disinfection of carious tissue mediated by aluminum-chloride-phthalocyanine entrapped in cationic liposomes: an in vitro and clinical study. **Lasers Med Sci** (2011) Publicação eletrônica DOI 10.1007.

Luna MC, Wong S, Corner CJ. Photodynamic therapy mediated induction of early response genes. **Cancer Res** (1994) 54:1374-1380.

Macdonald F, Ford CHJ, Casson AG. Molecular biology of cancer. 2 ed. **Oxon: Garland Science/BIOS Scientific Publishers** (2004).

Mang, T. Dosimetrics concepts for PDT. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy** (2008) 5:217-223.

Marocchio LS. Análise da expressão de receptores hormonais (androgênio, estrogênio alfa e beta) e da aromatase em carcinomas epidermóides de boca (Tese de doutorado). São Paulo (2010).

Massano J, Regateiro FS, Januário G, et al. Oral squamous cell carcinoma: Review of prognostic and predictive factors. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod** (2006) 102:67-76.

Molinolo AA, Amornphimoltham P, Squarize CH, et al. Dysregulated Molecular Networks in Head and Neck Carcinogenesis. **Oral Oncol** (2009) 45:324-334.

Mroz P, Hamblin MR. The immunosuppressive side of PDT. **Photochem Photobiol Sci** (2011) 10:751-758.

Mroz P, Yaroslavsky A, Kharkwal GB, et al. Cell death pathways in photodynamic therapy of cancer. **Cancers** (2011) 3:2516-2539.

Nehra R, Riggins RB, Shajahan AN, et al. BCL2 and CASP8 regulation by NF- κ B differentially affect mitochondrial function and cell fate in antiestrogen-sensitive and -resistant breast cancer cells. **FASEB J** (2010) 24:2040–2055.

Nowis D, Makowski M, Stoktosa T, et al. Direct tumor damage mechanisms of photodynamic therapy. **Acta Biochimica Polonica** (2005) 52:339-352.

Nyst HJ, Tan IB, Stewart FA, et al. Is photodynamic therapy a good alternative to surgery and radiotherapy in the treatment of the head and neck cancer? **Photodiagnosis and Photodynamic therapy** (2009) 6:3-11.

O'Donnell RK, Kupferman M, Wei SJ, et al. Gene expression signature predicts lymphatic metastasis in squamous cell carcinoma of the oral cavity. **Oncogene** (2005) 24:1244-1251.

Okunaka T, Usuda J, Ichinose S, et al. A possible relationship between the anti-cancer potency of photodynamic therapy using the novel photosensitizer ATX-s10-NA(II) and expression of the vascular endothelial growth factor in vivo. **Oncology reports** (2007) 18:679-683.

Oliveira LR, Ribeiro-Silva-A. Prognostic significance of immunohistochemical biomarkers in oral squamous cell carcinoma. **Int J Oral Maxillofac. Surg** (2011) 40:298-307.

Petro BJ, Tan RC, Tyner AL, et al. Differential expression of the non-receptor tyrosine kinase BRK in oral squamous cell carcinoma and normal oral epithelium. **Oral Oncology** (2004) 40:1040-1047.

Pimenta FJ, Cordeiro GT, Pimenta LGGS, et al. Molecular alterations in the tumor suppressor gene WWOX in oral leukoplakias. **Oral Oncology** (2008) 44:753-758.

Pimenta FJGS. Análise molecular do gene WWOX em leucoplasia bucal (Tese de doutorado). Belo Horizonte (2008).

Poznak, C. V. Osteonecrosis of the jaw and bevacizumab therapy. **Breast Cancer Res Treat.** (2010) 122:189-191.

Rampini MP, Ferreira EMS, Ferreira CG, et al. Low-power laser therapy in the prevention of induced oral mucositis: literature review. **Rev Bra de cancerologia** (2009) 55:59-68.

Rheinwald JG, Beckett MA. Tumorigenic keratinocytes lines requiring anchorage and fibroblast support cultured from human squamous cell carcinomas. **Cancer research** (1981) 41: 1657-1663.

Riggelen JV, Yetil A, Felsher DW. MYC as a regulator of ribosome biogenesis and protein synthesis. **Nature Review - Cancer** (2010) 10: 301-309.

Rorke EA, Adhikary G, Jans R, et al. Factor Inactivation in the Suprabasal Epidermis Causes Increased Epidermal Hyperproliferation and Hyperkeratosis but Reduced Carcinogen-Dependent Tumor Formation. **Oncogene** (2010) 29:5873–5882.

Ruhdorfer S, Sanovic R, Sander V, et al. Gene expression profiling of the human carcinoma cell line A-431 after 5-aminolevulinic acid-based photodynamic treatment. **Int J Oncol** (2007) 30:1253-1262.

Ruddon, R. *Câncer Biology*. 4th ed. New York: Oxford University Press (2007) 530 p

Salmon SE, Sartorelli AC. Quimioterapia do câncer. **Farmacologia básica e clínica**. 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara (2003) 55:803-832.

Sanovic R, Krammer B, Grumboeck S, et al. Time-resolved gene expression profiling of human squamous cell carcinoma during apoptosis process induced by photodynamic treatment with hypericin. **Int J of Oncology** (2009) 35:921-939.

Sattler UG, Mueller-Klieser W. The anti-oxidant capacity of tumour glycolysis. **Int J Radiat Biol** (2009) 85:963-971.

Siaud N, Barbera MA, Egashira A, et al. Plasticity of BRCA2 Function in Homologous Recombination: Genetic Interactions of the PALB2 and DNA Binding Domains. *PLoS Genetics* (2011) Publicação eletrônica DOI 10.02409.

Singh G, Alqawi O, Espiritu M. Metromic PDT and the cell death pathways. Photodynamic therapy: **Methods in Molecular Biology** (2010) 5:65-69.

Solomon MC, Carnelio S, Gudattu V. Molecular analysis of oral squamous cell carcinoma: a tissue microarray study. **Indian J Cancer** (2010) 47:166-172.

Suhr ML, Dysvik B, Bruland O, et al. Gene expression profile of oral squamous cell carcinomas from Sri Lankan betel quid users. **Oncology Reports** (2007) 18:1061-1075.

Tapajós ECC, Longo JPF, Simioni AR, et al. In vitro photodynamic therapy on human oral keratinocytes using chloroaluminum-phthalocyanine. **Oral Oncology** (2008) 44:1073–1079.

Tomazini MV, Souza CS, Garcia SB, et al. Topical photodynamic therapy with zinc phthalocyanine: evaluation of fluorescence intensity, skin absorption, skin histological and immunohistochemical changes in animal model. **An Bras Dermatol** (2007) 82:535-541.

Triesscheijn M, Baas P, Schellen JHM, et al. Photodynamic therapy in oncology. **The oncologist** (2006) 11:1034-1044.

Tsantoulis PK, Kastrinakis NG, Tourvas AD, et al. Advances in the biology of oral cancer. **Oral oncology** (2007) 43:523-534.

Tsui IFL, Garnis C, Poh CF. A dynamic oral cancer field - unraveling the underlying biology and its clinical implication. **Am J Surg Pathol** (2009) 11:1732-1738.

Uzawa N, Akanuma D, Neghishi A, et al. Homozygous deletions on the short arm of chromosome 3 in human oral squamous cell carcinomas. **Oral Onc** (2001) 37:351-356.

Venables JP. Aberrant and alternative splicing in cancer. **Cancer Res** (2004) 64:7647-7654.

Vergani E, Vallacchi V, Frigerio S, et al. Identification of MET and SRC Activation in Melanoma Cell Lines Showing Primary Resistance to PLX4032. **Neoplasia** (2011) 13:1132-1142.

Vissink A, Burlage FR, Spijkervet FKL, et al. Prevention and treatment of the consequences of head and neck radiotherapy. **Crit Rev Oral Biol Med** (2003) 3:213-225.

Vladimirov YA, Osipov AN, Klebanov GI. Photobiological Principles of Therapeutic Applications of Laser Radiation. **Biochemistry** (2004) 69:103:113.

Wang X, Yang L, Chen Z, et al. Application of nanotechnology in cancer therapy and imaging. **CA cancer J Clin** (2008) 58:97-110.

Warnakulasuriya, S. Causes of oral cancer – an appraisal of controversies. **British Dent J** (2009) 207:471-475.

Watanabe S, Kazumich S, Okazaki Y, et al. Activation of PI3K-AKT pathway in oral epithelial dysplasia and early cancer of tongue. **Bull Tokyo Dent Coll** (2009) 50:125-133.

Wei LH, Baumann H, Tracy E, et al. Interleukin-6 trans signalling enhances photodynamic therapy by modulating cell cycling. **British Journal of Cancer** (2007) 97:1513-1522.

Weinberg, RA. **A Biologia do Câncer**. Porto alegre: Artmed (2008).

Wesierska-Gadek J, Walzi E, Doleckova I, et al. Oncogenes do not fully override cell-intrinsic traits: pronounced impact of the cellular programme. **Cancer microenvironment** (2009) 2:215-225.

Wilson BD, Mang TS, Stoll H, et al. Photodynamic therapy for the treatment of Basal cell carcinoma. **Arch of Dermatol** (1992) 128:1597-1601.

Yang J, Shao Y, Wei D, et al. Correlation between Expressions of Tumor Necrosis Factor α and Angiogenesis in Human Oral Squamous Cell Cancer. **China Research on Prev and Treat** (2009) 11:925-927.

Yazdani SO, Golestaneh AF, Shafiee A, et al. Effects of low level laser therapy on proliferation and neurotrophic factor gene expression of human schwann cells in vitro. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology** (2012) 107:9-13.

Zhu TC, Finlay JC. The role of photodynamic therapy (PDT) physics. **Med Phys** (2008) 35:3127-3136.

Ziober AF, Falls EM, Ziober BL. The extracellular matrix in oral squamous cell carcinoma: friend or foe? **Head & Neck** (2006) Publicação eletrônica DOI 10.1002.