ANA RITA PINHEIRO BARCESSAT

**Análise da expressão de marcadores de morte celular em lesões
potencialmente malignas orais induzidas com 4-NQO e tratadas
com terapia fotodinâmica**

São Paulo

2013

ANA RITA PINHEIRO BARCESSAT

**Análise da expressão de marcadores de morte celular em lesões
potencialmente malignas orais induzidas com 4-NQO e tratadas
com terapia fotodinâmica**

Versão corrigida

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obter o título de Doutor, pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Área de Concentração: Patologia Bucal
Orientadora: Profa. Dra. Luciana Corrêa

São Paulo

2013

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo da Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Barcessat, Ana Rita Pinheiro.

Análise da expressão de marcadores de morte celular em lesões potencialmente malignas orais induzidas com 4-NQO e tratadas com terapia fotodinâmica / Ana Rita Pinheiro Barcessat ; orientadora Luciana Corrêa. -- São Paulo, 2013.

89 p. : fig., tab. , graf.; 30 cm.

Tese (Doutorado) -- Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração: Patologia Bucal. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida.

1. Patologia bucal. 2.Terapia fotodinâmica. 3. Lesões cancerizáveis. 4. Imunohistoquímica. I. Corrêa, Luciana. II. Título.

Barcessat, A.R.P. Análise da Expressão de marcadores de morte celular em lesões potencialmente malignas induzidas com 4-NQO e tratadas com terapia fotodinâmica. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Odontologia. Área de concentração Patologia Bucal

Aprovado em: / /2013

Banca Examinadora

Prof.^a(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof.^a(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof.^a(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof.^a(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof.^a(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

À Marina, Mateus, Caíque Barcessat Maneschy, meus filhos, meus bens mais preciosos e Igor Maneschy, meu grande companheiro, que abriram mão para que este trabalho pudesse se concretizar de algo da mais alta relevância e que não se dispensa: a atenção da mãe e da esposa e que acabaram também dedicando parte de suas vidas para que tudo fosse possível, dedico este trabalho e tudo o que ele significa.

É dedicado ainda a todas as mães e pais que se desdobram para seguir a carreira acadêmica com todas as suas dificuldades, conciliando com a educação de seus filhos e especialmente à minha mãe Ana Maria de Paula Pinheiro Barcessat, que soube administrar, manter e conciliar sua carreira com o papel de mãe para possibilitar que hoje a minha chegasse até aqui.

Aos pesquisadores da região amazônica que não desanimam diante da adversidade, que conseguem superar desafios a cada dia e que se mantêm humildes para sempre aprender e que, principalmente, se mantêm no norte do Brasil acreditando que podem fazer parte do seu desenvolvimento.

AGRADECIMENTOS

À Professora Denise Zezell (IPEN) que conhecendo meu perfil de trabalho, uniu as pontas do quebra cabeça, vislumbrando e indicando o orientador desta tese e pela cooperação técnica.

À Professora Luciana Corrêa que livre de ideias pré-concebidas, de mente e coração abertos aceitou, adaptou e transformou a ideia deste trabalho em realidade, abrindo as portas de seu laboratório a partir do qual pude adentrar a Universidade de São Paulo, transformando um ideal em verdade para alguém que vem de uma realidade tão diversa, além do exemplo e do aprendizado intenso.

À Professora Martha Simões Ribeiro (IPEN), a tia da LILT, com quem iniciei os primeiros passos na terapia fotodinâmica e que esteve presente em todos os momentos para sanar as dúvidas, acalmar e apoiar sempre que necessário.

À Professora Marília Martins pelo” lápis e papel “cujos desenhos didaticamente me auxiliaram no universo da Patologia Bucal, em nome da qual agradeço a todos os professores da disciplina por sua colaboração direta ou indireta na minha formação: Profª Marina Magalhães em cujo dinamismo me espelho, Prof. Fábio Daumas pela paciência com que me acompanhou na primeira rotina do serviço de anatomopatologia e pelo acesso ao laboratório de biologia molecular, Profª Suzana Orsini cuja calma , tranquilidade e gentileza me permitiram acreditar que é possível viver bem mesmo diante das adversidades , Prof. Décio cujas tiradas inteligentes estiveram presentes em muitas de minhas reflexões, Profª Andréa Mantesso uma das pessoas mais inteligentes com que já convivi, Profª Karen Ortega pela simplicidade , bom humor, carinho com que sempre me tratou.

Aos professores Cristina Delboni e João Gualberto e funcionários do departamento de cirurgia e traumatologia buco-maxilo-facial Édison, Belira, Rosely e Ana, pelo carinho pela amizade e pelo auxílio num dos momentos mais difíceis da confecção deste trabalho que foi a parte experimental em biotério.

Aos Técnicos do Laboratório Elisa Santos, Juvani Lago e Adriana Paris pela paciência e carinho com que me ensinaram as técnicas necessárias à elaboração dos resultados aqui apresentados desde as primeiras navalhadas no micrótomo à quantificação proteica.

Às queridas Zilda, Néia e Nair que sempre prontas a ajudar, me auxiliaram com seus exemplos cada uma a seu modo

À amiga Michella Lima por toda a dedicação, apoio e preocupação e à sua família Kleber e Clara Lasmar que alegraram os dias pesados em nome da qual agradeço aos colegas de curso que também auxiliaram de forma direta ou indireta, sem os quais os dias demorariam mais a passar e certamente não teriam sido tão divertidos, pelo carinho pela compreensão pelas horas de desabafo agradeço a cada um de vocês: Alessandra, Bianca, Carina, Carla, Fabiana, Fábio, Felipe, Flávia, Gabi, Gustavo, Karin, Kauê, Léo, Lília, Luciana, Lucyene e a todos os demais a quem eu porventura tenha esquecido de nominar, mas que certamente não deixei de pensar, pessoas que como eu estão dedicando uma parte de suas vidas à esse crescimento intelectual, mas acima de tudo se tornando pessoas melhores.

Ao Prof. Moacir Novelli que além de ter aberto mão de muitas de suas horas livres... sempre me alertou para o que é importante de verdade.

Especialmente agradeço :

À amiga Maria Emília Chaves pela amizade e pelo suporte no Amapá que me permitiram permanecer em São Paulo finalizar esta tese.

Aos irmãos Nara e José Luís Barcessat pelo apoio e paciência ao longo desses anos .

À minha mãe Ana Paula que me ensinou com seu exemplo o que significa coragem, que sempre esteve presente nos momentos mais importantes permitindo que o trabalho, enfim, que a vida seguisse sempre.

Ao Francisco Edigar e à Vany que se deslocaram de suas casas para proporcionar o suporte doméstico sem o qual finalizar este doutorado seria inviável.

Ao Igor Maneschy sempre companheiro e compreensivo na alegria e na tristeza e pelo suporte também na logística que possibilitou o desenvolvimento desse trabalho.

À todos aqueles que de alguma forma auxiliaram nessa realização compartilhando os momentos, apoiando nas horas fundamentais sem que nada em troca fosse oferecido, diminuindo o fardo do dia –dia , tornando essa caminhada mais alegre obrigada a todos vocês : Tânia, Austy ainda pela revisão do abstract, Edna Reis e Ivie Maneschy , Celeste Marcondes e Toshio , Sara e Luigi, Fábio e Fabíola...

Agradeço ainda à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico- CNPQ pelo suporte financeiro e à Universidade Federal do Amapá-UNIFAP pela liberação das atividades docentes.

“Só se pode viver perto do outro, e conhecer outra pessoa,
sem perigo de ódio, se a gente tem amor. Qualquer amor já é
um pouquinho de saúde, um descanso nessa loucura”.

Guimarães Rosa

RESUMO

Barcessat, A.R.P. Análise da Expressão de marcadores de morte celular em lesões potencialmente malignas induzidas com 4-NQO e tratadas com terapia fotodinâmica [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2013. Versão corrigida

As lesões potencialmente malignas orais (LPMO) constituem processos com chances de malignização e, portanto, o acompanhamento rigoroso e a retirada das lesões em situações de displasia são mandatórios. A terapia fotodinâmica (PDT) tem sido apontada como uma alternativa promissora e não invasiva para o tratamento dessas lesões. O princípio terapêutico da PDT envolve a geração de altos níveis de estresse oxidativo, pela associação de uma substância fotoativa com a energia eletromagnética e o oxigênio tecidual. É capaz de inviabilizar, através de cascatas de morte ainda pouco esclarecidas, células com alterações metabólicas significativas. A maioria dos trabalhos aponta a necessidade de várias sessões de PDT para erradicar as LPMO, porém o intervalo entre as sessões ainda é discutível. O objetivo deste trabalho foi estabelecer a relação anatomocronológica de marcadores de morte celular (caspase 3, beclin 1 e RIP 1) e de proteína de reparo do DNA durante o ciclo celular (PCNA) presentes após a PDT, com o intuito de verificar a cinética morte/proliferação celular e sugerir o intervalo de tempo entre as sessões de PDT mais adequado para a repetição da terapia. Para tanto, LPMOs foram induzidas por intermédio da aplicação tópica de 4-nitroquinolina-1-óxido (4-NQO) na mucosa lingual de ratos e posteriormente tratadas com PDT mediada pela administração tópica do ácido 5-aminolevulínico (5-ALA) e laser comercial (660nm, 90J. cm⁻², 1000mW. cm⁻²). O efeito da PDT foi analisado nos tempos experimentais de 6h, 24h, 48h e 72h após a primeira sessão de PDT, e em 6h e 72h após uma segunda sessão. Nesses períodos, as línguas foram avaliadas clínica e histopatologicamente em relação ao percentual de redução das lesões induzidas e à morfologia do tecido, bem como por meio de análise imuno-histoquímica para PCNA; caspase 3 clivada (presente na apoptose), Beclin 1 (presente na autofagia) e RIP 1 (presente na necroptose). Foi determinada a porcentagem de células positivas para esses marcadores no epitélio da mucosa lingual. Não houve remissão

completa das lesões nas duas sessões de PDT, mas a segunda sessão acarretou diminuição em torno de 50% no tamanho das lesões. O período de 6h após a PDT foi o que exibiu significativa atrofia epitelial, bem como a maior porcentagem de células positivas para todos os marcadores analisados, incluindo o PCNA, em ambas as sessões. Caspase 3, beclin 1 e RIP 1 exibiram significativa diminuição da expressão em 24h. O PCNA exibiu aumento significativo no período 72h, e nos dois períodos do segundo ciclo. Como não houve a presença de necrose, a expressão aumentada de RIP 1 foi associada ao processo de apoptose e autofagia. Concluiu-se que a PDT mediada pelo 5-ALA provocou aumento da expressão de caspase 3, beclin 1 e RIP 1 em LPMO nas primeiras 6h após a terapia. Nesse modelo de PDT, essas proteínas parecem interagir em mecanismos de morte por apoptose e por autofagia, mas não por necrose. Considera-se o intervalo de 24h como o mais adequado para novo ciclo com os presentes parâmetros, sem que se estenda além de 72h.

Palavras-chave: Terapia fotodinâmica. 4-nitroquinolina-1-óxido. Lesões potencialmente malignas. Beclin 1. RIP 1. Caspase 3. PCNA. Imuno-histoquímica.

ABSTRACT

Barcessat, A.R.P. Analysis of cellular death biomarkers expression in potentially malignant lesions induced with 4-NQO and treated with photodynamic therapy. [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2013. Versão corrigida

The potentially malignant oral lesions (PMOL) are processes with great chances for cancer transformation and therefore the close monitoring and removal of lesions in cases of dysplasia are mandatory. Photodynamic therapy (PDT) has been identified as a promising and noninvasive treatment for these injuries. The therapeutic principle of PDT involves the generation of high levels of oxidative stress, by association of a photoactive substance with electromagnetic energy and tissue oxygen. It can kill metabolically changed cells through cascades of death which are still unclear. Most studies indicate the need of several PDT sessions to eradicate PMOL, however the interval between sessions is not consensual. The aim of this study was to establish the anatomical and chronological relationship between cellular death biomarkers (caspase 3, beclin 1 and RIP 1) and a DNA repair protein during cell cycle (PCNA) present after PDT, aiming to check the kinetic death/cell proliferation and suggest the time interval between PDT sessions more suitable to repetition of the PDT. For this purpose, PMOLs were induced by 4-nitroquinoline-1-oxide (4-NQO) topical application on the lingual mucosa of rats and further treated with PDT mediated by topical administration of 5-aminolevulinic acid (5-ALA) and a commercial laser (Twin flex-MM Optics São Carlos-Brazil 660nm, 90J.cm⁻², 1000mW.cm⁻²). The effect of PDT was analyzed at 6h, 24h, 48h and 72h after the first session, and at 6h and 72h after a second session. In these periods, the tongues have been evaluated clinically and histopathologically regarding the percentage reduction of lesions induced and tissue morphology as well as by immunohistochemical analysis for PCNA, cleaved caspase 3 (present in apoptosis), Beclin 1 (present in autophagy) and RIP (present in necroptosis). The percentage of positive cells for these markers was determined in the epithelium of the tongue mucosa. There was no complete remission of lesions after two PDT sessions, but the second session resulted in a decrease of around 50% in lesion size. The period of 6 hours after PDT was the one in which significant

epithelial atrophy was exhibited, as well as the highest percentage of positive cells for all tested markers, including PCNA in both sessions. Caspase 3, beclin 1 and RIP 1 exhibited a significant decrease of the expression at 24 hours. PCNA showed significant increase in the 72-hour period and after 6h and 72h from the second session. As there was no necrosis, the increased expression of RIP 1 has been linked to apoptosis and autophagy. It was concluded that PDT mediated by 5-ALA promoted increased expression of caspase 3, beclin 1 and RIP 1 at the PMOLs in the first 6 hours after therapy. For this PDT model, these proteins appear to interact with mechanisms of death by apoptosis and autophagy, but not necrosis. It is considered the range of 24h as the most suitable for another cycle with these parameters of PDT, which should not be extended beyond 72 hours.

Keywords: Photodynamic Therapy. 4-nitroquinoline-1-oxide. Potentially malignant lesions. Beclin 1. RIP 1 . Caspase 3. PCNA. Immunohistochemistry.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4-NQO	4-nitroquinolina -1-óxido
5-ALA	Ácido 5-aminolevulínico
µm	Micrometro
µs	Microssegundo
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Caspase 3	Proteases específicas para cisteína e ácido aspártico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
Fs	Fotosensibilizador
FDA	do inglês :Food and Drug Administration – Administração de drogas e alimentos
LPMO	Lesão Potencialmente Maligna Oral
ms	Milissegundo
Nd:YAG	Laser neodímio YAG
NCCD	do inglês: National Council for Cellular Death – Concelho nacional para morte celular
PBG	Porfobilinogênio
PCNA	Antígeno nuclear de proliferação celular
PDT	Terapia Fotodinâmica
PpIX	Protoporfirina IX
PROTO	Protoporfirinogênio IX
RIP 1	do inglês: Receptor integrating protein kinases
ROS	do inglês reactive oxygen species -Espécies reativas de oxigênio
SOD	Superóxido-dismutase
URO III	Uroporfirinogênio III
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

LISTA DE SÍMBOLOS

$^3\text{O}_2$	oxigênio tripleto
S^n	estado singleto
S^0	estado fundamental
T^1	Estado Tripleto
$^1\text{O}_2$	oxigênio singleto
O_2^-	ânion superóxido
H_2O_2	peróxido de hidrogênio

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1 Terapia fotodinâmica (PDT) mediada pelo ácido	
5-aminolevulínico-ALA	18
2.2 Mecanismos de proliferação e morte celular na PDT	21
2.2.1 Proliferação e PCNA	22
2.2.2 Apoptose e caspase 3	24
2.2.3 Autofagia e beclin 1 (BECN1)	27
2.2.4 Necrose e RIP 1	29
2.3 Lesões potencialmente malignas orais (LPMO) e PDT	31
2.4 Modelos experimentais de indução LPMO	33
3 PROPOSIÇÃO	35
4 MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1 Grupos experimentais.....	36
4.2 Indução das lesões potencialmente malignas com 4-NQO	37
4.3 Monitoração das lesões.....	38
4.4 Protocolo de PDT	38
4.5 Eutanásia e retirada do material de análise	39
4.6 Análise histopatológica	40
4.7 Análise imuno-histoquímica.....	41
4.8 Análise estatística	43
5 RESULTADOS.....	44
5.1 Análise clínica das lesões induzidas e tratadas com PDT	44
5.2 Análise histopatológica	45
5.3 Medidas de espessura do epitélio	48
5.4 Análise descritiva da expressão imuno-histoquímica	49

5.4.1 PCNA	49
5.4.2 Caspase 3	51
5.4.3 Beclin.....	53
5.4.4 RIP 1	55
5.5 Índice de células epiteliais positivas nos testes	
imuno-histoquímicos	57
5.5.1 PCNA	57
5.5.2 Caspase 3	58
5.5.3 Beclin.....	59
5.5.4 RIP 1	60
5.5.5 Análise de todos os marcadores concomitantemente	61
6 DISCUSSÃO	63
7 CONCLUSÕES	69
REFERÊNCIAS.....	70
APÊNDICE.....	82
ANEXO	89

1 INTRODUÇÃO

Terapias alternativas, também chamadas complementares e integrativas, tais como a crioterapia, a terapia sonodinâmica, a fitoterapia e a terapia fotodinâmica têm sido estudadas para o tratamento de vários tumores (1). A terapia fotodinâmica, do inglês *Photodynamic Therapy* (PDT), vem sendo utilizada na oncologia desde meados da década de 70, quando Dougherty (2) realizou trabalhos envolvendo o tratamento de metástases tumorais em pele. (3). Recentemente a PDT também tem sido empregada no tratamento de lesões cancerígenas precoces e potencialmente malignas na cavidade oral e faringe (4).

O princípio da técnica baseia-se no fato de que a interação da luz com um composto de baixa toxicidade no escuro (fotossensibilizador - Fs) e o oxigênio endógeno ($^3\text{O}_2$) resulta em espécies reativas de oxigênio (ROS), as quais, quando em excesso e acima do limite de anti-oxidação, são capazes de inviabilizar células (5). O Fs se acumula seletivamente nas áreas tumorais (de maior atividade metabólica), o que provoca a morte das células alteradas, com pouco ou nenhum dano às células normais. Caracteriza-se como um método físico-químico para o tratamento local do câncer ou de lesões potencialmente malignas, que vem sendo empregado em pacientes com tumores de tamanho reduzido para os quais tratamentos convencionais (radioterapia e quimioterapia) são ineficazes ou não-indicados, ou ainda para a redução do tamanho da lesão, viabilizando uma cirurgia posterior (6).

A maioria dos protocolos de aplicação da PDT em tumores utiliza administração endovenosa do Fs (7), cujo efeito indesejado é a sensibilização prolongada (por até semanas) (8, 9). Para lesões extra-ósseas na cavidade oral, em função do acesso facilitado ao tecido, aplicações tópicas têm sido realizadas, contornando o inconveniente da fotossensibilização (10).

Por muito tempo, o tipo de morte celular gerado pela PDT foi entendido como sendo predominantemente por necrose; contudo modalidades diversas de morte celular, tais como autofagia e apoptose, têm sido associadas a PDT, sem haver consenso ainda a esse respeito (11, 12).

É sabido que a PDT atua em cascatas de indução de apoptose, provoca a lise

celular e inibe a angiogênese, porém esses mecanismos em modalidades terapêuticas com administração tópica do Fs necessitam de maiores esclarecimentos(13).

As lesões potencialmente malignas orais (LPMO) têm sido tratadas clinicamente com PDT principalmente pelo fato de esta permitir a erradicação local das áreas de displasia sem causar perda excessiva de tecido saudável e formação de cicatrizes extensas. Por causa disso, a PDT tem sido considerada atualmente uma terapia promissora para o tratamento das LPMO (14), demonstrando certo grau de sucesso devido a frequências consideráveis de remissão completa e baixo índice de recidivas. Contudo são poucos os trabalhos clínicos que comprovem sua eficácia e, em geral, o número de pacientes é pequeno, o acompanhamento clínico breve e os protocolos bastante variáveis.

Como o mecanismo de morte celular induzida pela PDT ainda é muito discutido na literatura, e pelo fato de não haver número significativo de estudos nessa área aplicada às LPMO, o presente trabalho teve como proposta avaliar a expressão de marcadores de morte celular em LPMO induzidas em ratos e tratadas com protocolo de PDT tópico. A idéia foi verificar como um protocolo de PDT viável de ser realizado em consultório odontológico afeta células epiteliais displásicas na mucosa oral no decorrer do tempo. Como a maioria dos trabalhos aponta a necessidade de várias sessões de PDT para erradicar as LPMO, o ponto central nessa análise foi determinar em qual momento há queda importante da taxa de morte celular que indicasse a necessidade de retomada da terapia. Toda a estratégia de análise foi com base no fato de que o conhecimento sobre a cinética celular de proliferação e morte poderia contribuir para o estabelecimento do intervalo entre as sessões e, conseqüentemente, para o aprimoramento dos protocolos clínicos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Terapia fotodinâmica (PDT) mediada pelo ácido 5-aminolevulínico-ALA

A PDT consiste na associação de um Fs, coloquialmente denominado corante, com energia eletromagnética ressonante e oxigênio, a qual gera um efeito fotodinâmico, ou seja, o Fs absorve fótons da fonte de luz e seus elétrons passam então a um estado excitado (de mais energia), porém instável, chamado estado singleto (S^n) (15).

A molécula de Fs excitada ou perderá energia e retornará ao estado fundamental (S^0) emitindo fluorescência, ou, por inversão de Spin, alcançará um estado de menor energia denominado “triplete” (T^1), o qual possui tempo de vida mais longo (da ordem de μs -ms) (16). Nesse estágio a molécula fotossensibilizadora pode: a) novamente sofrer decaimento eletrônico e voltar ao nível fundamental (S^0); b) sofrer reações de redução e oxidação com seu ambiente através da transferência de elétrons para componentes do sistema, gerando íons-radicais de vida curta, denominados espécies reativas de oxigênio (ROS), que tendem a reagir com o oxigênio no estado fundamental (3O_2), resultando em produtos oxidados (fenômeno denominado reação tipo I); ou c) transferir sua energia de excitação ao oxigênio molecular (3O_2), o que leva à formação do oxigênio singleto (1O_2), molécula instável, altamente reativa e citotóxica, com meia vida bastante curta (menor que 40 ns) e um raio de ação de aproximadamente 20 nm (fenômeno denominado reação tipo II) (16-18) (Figura 2.1).

Uma das ROS que surgem a partir das reações tipo I é o ânion superóxido (O_2^-), que pode ser enzimaticamente convertido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio (O_2) numa reação catalisada pela enzima superóxido-dismutase (SOD) (19). O ânion superóxido e outras ROS, juntamente com o oxigênio singleto funcionam como moléculas oxidantes que reagem prontamente com as moléculas do sistema biológico, modificando, por reações oxidativas, resíduos de aminoácidos e lipídios insaturados, ou ainda danificando o DNA quando consegue atingir o núcleo celular (16, 20-22).

Dependendo da localização subcelular das ROS, os efeitos oxidativos são transformados em respostas adaptativas ou em morte celular (23). O dano celular se dá diretamente pelo acúmulo do Fs em alvos intracelulares vitais como a membrana plasmática, as membranas mitocondriais, as cisternas do retículo endoplasmático, o complexo de Golgi e os lisossomos. Não há consenso de que os Fs se acumulem no núcleo celular, o que indica ser a PDT pouco danosa ao DNA nuclear (24).

Há evidências de que os acúmulos de Fs nas membranas mitocondriais e no retículo endoplasmático induzem processos de apoptose, ao mesmo tempo em que ocorre bloqueio dessa cascata quando esse acúmulo se dá na membrana ou nos lisossomos, induzindo a célula à necrose. Há indícios também de que ocorre ativação de autofagia na célula como forma de defesa contra a disseminação dos efeitos deletérios das ROS para as organelas após a irradiação (12).

O efeito fotodinâmico sempre está na dependência da tríade Fs, energia eletromagnética ressonante e oxigênio tecidual, de forma que esses elementos gerem mínimas alterações aos tecidos quando utilizados isoladamente (4).

O Fs acumula-se seletivamente em áreas de maior atividade metabólica, o que provoca a destruição das células alteradas com pouco dano às células normais (10). Como a maioria dos Fs se localiza nas membranas, os lipídios são os principais alvos das ROS. Devido a essa preferência por lipídeos, a maioria dos Fs tem preferência pelas membranas mitocondriais, as quais são abundantemente encontradas em células tumorais e ainda no arcabouço microvascular (25).

O ácido 5-aminolevulínico (5-ALA), mais comumente utilizado em PDT oncológica para lesões orais e dermatológicas, é uma das poucas substâncias viáveis para a aplicação tópica que já está no mercado, apesar de sua natureza hidrofílica que dificulta a penetração na célula (26).

Essa substância está aprovada pela *Food and Drug Administration* (FDA) nos Estados Unidos (27), e pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), para o tratamento de lesões em pele, tais como queilite actínica e carcinoma basocelular.

O 5-ALA é precursor do Fs endógeno protoporfirina IX (PpIX), um dos últimos produtos da biossíntese do grupo heme, que ocorre na maioria das células animais. (28). A PpIX é uma porfirina natural presente na hemoglobina, no citocromo c das mitocôndrias e em outras biomoléculas. O 5-ALA é o primeiro intermediário na via de

A excitação máxima da porfirina ocorre na banda de Soret (banda de absorção intensa perto de 400 nm). A penetração tecidual desse comprimento de onda restringe-se às camadas superficiais dos tecidos. Devido a essa restrição, as irradiações para as protoporfirinas têm sido feitas mais comumente com outras fontes de excitação, localizadas na faixa do vermelho (620-770 nm) (29, 30). Em nível celular, o 5-ALA é captado nas membranas por transporte ativo (31). Imediatamente após sua administração, a PpIX intracelular aumenta rapidamente nos primeiros minutos, com pico em 45min, seguido de uma ligeira diminuição e saturação em torno de 60-120min em cultura de células. A localização inicial da PpIX após administração do 5-ALA é na membrana plasmática, depois perinuclear e por fim nas mitocôndrias após as primeiras horas de incubação do 5-ALA (30). O elevado período de tempo para a indução da PpIX se dá em função das propriedades hidrofílicas do 5-ALA, que não permitem sua penetração na membrana celular com facilidade, sendo necessárias também altas concentrações do produto (29).

2.2 Mecanismos de proliferação e morte celular na PDT

Os mecanismos de morte e proliferação celular envolvidos no efeito fotodinâmico ainda não estão completamente esclarecidos. No mesmo tempo em que avançam estudos clínicos e pesquisas de novas tecnologias de administração de PDT, de Fs e de fontes de luz, pesquisas em áreas biológicas básicas também são desenvolvidas com o intuito de ampliar o entendimento do comportamento do tecido frente às diversas modalidades de PDT.

O nível de destruição tecidual e de citotoxicidade após a PDT depende da molécula fotossensibilizadora, de sua localização no momento da irradiação, da dose total administrada, do tempo de exposição à luz, do tempo de pré-irradiação, do tipo de tumor e do seu nível de oxigenação. Tais fatores relacionam-se à modulação dos três processos independentes que derivam da PDT, quais sejam: destruição tumoral direta, isquemia tumoral por destruição de vasos de suporte e ativação da resposta imune (4, 23).

A citotoxicidade tumoral gerada pela PDT envolve o recrutamento de mediadores do processo de apoptose e necrose (32). Um dos efeitos da PDT na célula consiste em causar destruição da proteína Bcl-2, uma proteína regulatória da permeabilidade da membrana mitocondrial(18, 22). A PDT também provoca dano seletivo à mitocôndria e pode iniciar uma resposta apoptótica rápida se boa parte das proteínas necessárias ao ciclo apoptótico estiverem intactas; do contrário, resposta necrótica poderá ocorrer (12, 24).

Outro fator que contribui substancialmente para a redução tumoral é a inibição da angiogênese (18), uma vez que os Fs têm predileção por células com alta atividade metabólica, como é o caso dos endoteliócitos (6). Assim, episódios de isquemia prolongada estariam atrelados também ao processo de morte celular, tanto por apoptose quanto por necrose (33).

As ROS geradas durante o processo fotodinâmico ativam cascatas de sinalização celular que podem levar à morte por uma ou mais vias, eliminando células alteradas. Por serem espécies de meia vida muito curta, especialmente o oxigênio singleto, a ação das ROS acaba por se restringir ao local em que o Fs se localiza. Assim os Fs que têm preferência pelas mitocôndrias levam a célula principalmente à apoptose, enquanto os que se localizam nos lisossomos ou nas membranas, em geral, sinalizam para outras vias como a da necrose e da autofagia (34, 35).

Serão apresentados a seguir alguns trabalhos relacionando a PDT com a expressão do PCNA e de alguns marcadores de morte celular selecionados no presente trabalho, a saber, caspase 3, beclin e RIP 1 .

2.2.1 Proliferação e PCNA

O antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) é uma proteína nuclear de 36kD, co-fator da DNA polimerase delta, com importante papel na manutenção da estabilidade genômica durante a replicação do DNA (36).

Danos ao DNA que atrasam o forquilha de replicação, por exemplo, induzem

a ubiquitinação do PCNA, ativando um desvio da área danificada a fim de evitar colapso nas forquilhas de replicação, que poderiam produzir fitas quebradas e rearranjos cromossômicos. Por isso a ubiquitinação do PCNA é um processo de forte regulação proteica (37). No ciclo celular, essa proteína aparece em altas concentrações nas fases G1 tardia e S precoce, sendo quase indetectável em células na fase M (38).

A imunomarcagem para o PCNA tem sido muito utilizada na avaliação da proliferação celular de diversos tumores e como marcador de ciclo celular para estabelecimento de prognóstico (37).

A cinética das células tumorais após PDT mediada pelo Photogem® (porfirina sódica) sistêmico e laser Nd:YAG (630 nm, 10 Hz, modo contínuo) em dose contínua foi comparada à dose fracionada em modelo de xenotransplante. Foi analisada a expressão do PCNA, entendido no estudo como um marcador de atividade proliferativa, e do VEGF (fator de crescimento endotelial vascular), aplicado como um indicador de hipóxia tecidual em tumores. Não houve diferença nos índices de PCNA entre 24h e 72 após a PDT quando comparados com os índices basais do tumor. Houve necrose somente após 24h na dose fracionada e aumento na expressão de VEGF em 3 e 6h após PDT (39). Outro trabalho também demonstra aumento na secreção de VEGF após PDT sistêmica em cérebros animais saudáveis com o mesmo Fs, porém com baixas densidades de energia ($2\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$ e $4\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$) (40).

Outro acréscimo nas taxas de VEGF nos períodos iniciais de 0-6h após PDT foi observado utilizando-se oligômeros de hematoporfirinas e Nd:YAG (630 nm). Necrose tumoral pôde ser percebida a partir de 24h, porém com presença de células neoplásicas remanescentes. O dano às células vasculares tumorais foi investigado a partir da imunomarcagem do PCNA, que se apresentou significativamente reduzido em 24h. Houve retorno aos níveis basais em 48h em função das células tumorais remanescentes (41).

Lesões de carcinoma epidermóide bucal e displasias epiteliais orais foram tratadas com PDT mediada pelo Photofrin® (porfímero sódico - mistura complexa de hematoporfirinas) administrado sistemicamente e irradiação com laser eximer ($100\text{--}200\text{ J}/\text{cm}^2$). As biópsias dessas lesões feitas para o diagnóstico histopatológico

foram submetidas a análise imuno-histoquímica para PCNA, VEGF, CD34 e fator VIII (marcadores de células endoteliais), com o intuito de verificar qual desses marcadores poderia prever os efeitos clínicos da PDT. Somente a expressão do VEGF demonstrou ter associação com os resultados clínicos obtidos com a PDT, no sentido da imunomarcagem ter aumentado nos pacientes com melhores resultados clínicos (42, 43).

Na mesma linha do estudo anterior, outro trabalho avaliou se a expressão das proteínas Bak, Mcl-1, caspase 3, caspase-8, caspase-9 (relativas à apoptose) p53, p21 ou PCNA (relacionadas à proliferação) em leucoplasias e hiperplasias verrucosas orais poderia ser útil para prever os resultados clínicos da PDT mediada por ALA tópico. Autores realizaram estudo imuno-histoquímico dos marcadores antes da PDT, compararam entre os grupos de pacientes que apresentaram respostas completas ou parciais à ALA-PDT e concluíram que somente a relação entre os índices de marcação Bak/Mcl-1 poderia ser útil como fator preditivo de eficácia clínica da PDT (44).

2.2.2 Apoptose e caspase 3

Células privadas de fatores de manutenção de sobrevivência, células senescentes ou ainda danificadas entram num processo ordenado e não inflamatório de morte denominado de apoptose (45). Esse processo leva à fragmentação do DNA nuclear e à degradação das estruturas intracelulares. Morfologicamente está associado à retração das células e agregação das organelas (o que confere intensa eosinofilia à microscopia óptica), condensação da cromatina seguida de periferização e agregação à carioteca, fragmentação do núcleo e formação dos corpos apoptóticos, não havendo, porém, fragmentação da membrana celular (23)

Duas famílias de proteínas principais estão envolvidas na apoptose: a família Bcl-2, que controla a integridade da membrana mitocondrial, e as caspases, que participam da cascata de reações que culminam com a desorganização do núcleo celular (46).

A apoptose pode ser deflagrada por duas vias: ou pela ligação de receptores

de morte na membrana plasmática (ligantes de morte pertencentes à superfamília do fator de necrose tumoral – TNF- α) (denominada via extrínseca), ou pela liberação de fatores pró-apoptóticos (por exemplo citocromo c) da mitocôndria para o citosol (via intrínseca). Ambas as vias provocam a ativação de caspases (do inglês *cysteine aspartic acid-specific proteases*, proteases específicas para cisteína e ácido aspártico). Estas existem na forma inativa (denominadas pró-caspases) e quando ativadas são capazes de promover alterações na morfologia celular. Podem ser do tipo iniciadoras, formadas a partir da ocupação de receptores na membrana celular (caspases 8, 9 e 10), ou efetoras (caspases 3, 6 e 7), ativadas pelas caspases iniciadoras e responsáveis pela destruição da célula, pois possuem um domínio N-terminal curto denominado DED (domínio efetor de morte) que promove a fragmentação nuclear e a degradação do citoesqueleto (47-49).

O *National Council for Cellular Death* (NCCD), na classificação funcional de modalidades de morte, aponta a ativação das caspases 3, 6 e 7 como uma das principais características bioquímicas de apoptose (50-52).

Em revisão sobre os mecanismos de morte celular gerados pela PDT, Agostinis et al. (2004) (53) apontam que esta terapia parece interferir diretamente na via intrínseca da apoptose, por promover aumento da permeabilidade mitocondrial devido a ação das ROS, com subsequente liberação de fatores ativadores das caspases, tais como citocromo c. Ao mesmo tempo, as células fotossensibilizadas exibem colapso do potencial de membrana mitocondrial e queda de ATP na mitocôndria, levando a célula à morte. Os autores posicionam que o mecanismo exato de como a PDT contribui diretamente para esse aumento de permeabilidade mitocondrial não é sabido, mas há indícios de que esse mecanismo esteja ligado à afinidade de algumas proteínas de membrana mitocondrial a agentes fotossensibilizadores, bem como à sensibilidade dos poros à fotoxidação, principalmente ao oxigênio singlete. Nesta revisão ainda é descrita a ativação de proteínas pró-apoptóticas da superfamília Bcl-2 (*Bax* e *Bak*), tanto pelas ROS quanto pelo oxigênio singlete. Essas proteínas, quando ativadas, também desencadeiam o aumento da permeabilidade mitocondrial e a liberação de fatores pró-apoptóticos. Além disso, a ação das ROS geradas pela PDT ativa as proteínas *Bax* e *Bak* localizadas na membrana do retículo endoplasmático, aumentando também a permeabilidade dessa organela, a qual libera Ca^{2+} para o citosol. Este atua

diretamente na abertura de poros mitocondriais, com consequente liberação de citocromo c e ativação de caspases. Vale dizer ainda que a PDT promove inibição da proteína anti-apoptótica Bcl-2, ou pelo Fs ou pelas ROS ou por ambos, desencadeando também a apoptose (53).

A expressão da caspase 3 parece oscilar em função da dose de irradiação e da quantidade de Fs. Em estudo com cultura de células de carcinoma epidermóide oral tratadas com PDT mediada pelo feoforbide a, houve aumento da caspase 3 e de outros elementos indicativos da presença de apoptose (liberação de citocromo c, fragmentação do DNA), bem como diminuição da expressão de Bcl-2, logo após a PDT (54).

Outro trabalho verificou a expressão da caspase 3 em PDT mediada pela clorina Cp6 em carcinomas epidermóides bucais induzidos em hamsters, e constatou que nos tumores nos quais foi aplicada mais baixa dose de Fs (1,0 mg/kg) não houve aumento da caspase 3. A maioria das células exibiu um padrão morfológico de necrose. Já quando concentrações mais altas de Fs foram utilizadas (1,5 mg/kg), houve aumento da caspase 3, indicando ativação dessa cascata e, provavelmente, de apoptose (55).

Com relação à apoptose causada pela PDT mediada pelo 5-ALA, vários trabalhos envolvendo diversos tipos celulares (células de glioma, de carcinoma de cólon, de linfoma) indicam que a morte celular é oriunda de via mitocondrial, com liberação do citocromo c para o citoplasma. Os mecanismos, contudo, desse processo ainda estão sendo discutidos (56, 57).

A apoptose causada pelo 5-ALA parece estar atrelada ao fato de que a PpIX tem afinidade pelo receptor benzodiazepínico periférico (PBR), o qual faz parte da membrana mitocondrial. Quando ocupado esse receptor, há abertura de poros na membrana, o que favorece o aumento da permeabilidade e a liberação de fatores pró-apoptóticos, os quais ativam as caspases efetoras (58).

Chen et al. (2011) demonstrou que a PDT mediada pelo 5-ALA provocou apoptose de células de carcinoma oral humano cultivadas, a qual foi derivada da ativação da cascata MAPK (*mitogen activation protein kinases*). Nessa cascata, a apoptose foi originada principalmente da ativação da quinase n-terminal JNK e não tanto da quinase p38 e da quinase ERK (59).

Morte celular por apoptose foi analisada via teste de TUNEL e imunohistoquímica para caspase 3 em lesões de queratose actínica tratadas com 5-ALA-PDT. As principais alterações foram identificadas 24h após o tratamento, não sendo encontrada expressão de caspase 3 nem positividade para TUNEL em tempos experimentais de uma e três horas após PDT, tampouco após 7 dias (60).

2.2.3 Autofagia e beclin 1(BECN1)

A autofagia (do grego “autoingestão”) acontece em todas as células dos metazoários em condições basais, sendo uma espécie de controle de qualidade ou um mecanismo de eliminação de resíduos celulares, bem como um mecanismo de proteção em condições de estresse celular, principalmente de deficiência nutricional, hipóxia e estresse oxidativo (61). A autofagia pode ser de três tipos: 1) mediada por chaperonas, com translocação proteica através da membrana dos lisossomos; 2) microautofagia, que envolve a captura de fragmentos do citosol para o interior dos lisossomos; 3) e macroautofagia, ou autofagia clássica, que se caracteriza pela formação e acúmulo de dupla membrana de vesículas intermediárias, sendo esse o principal e mais conhecido mecanismo (62)

O processo de autofagia está subdividido em etapas de indução, alongação e maturação. Um processo característico da autofagia é a formação de organelas multimembranares denominadas inicialmente de fagóforos, os quais se alongam e se fecham sobre si mesmos formando os autofagossomos ou vacúolos autofágicos, responsáveis por carregar os resíduos citoplasmáticos e levá-los até os lisossomos (63)

A proteína beclin 1(ou BECN1), juntamente com a PI3-K (*phosfatidilinositol-3 kinase*) e a Atg14 (proteína de autofagia), forma um complexo que regula o processo de nucleação e formação das vesículas, isto é, a formação do fagóforo no início do processo e que pode ser inibido pela família Bcl-2, Bcl2/Bcl-XL (proteínas anti-apoptóticas) na ausência de estímulo estressante. A beclin 1 pode ser considerada marcadora de autofagia (63, 64).

A indução de autofagia pela PDT parece ser acionada pelas ROS, havendo

morte celular devido à formação em excesso de autofagossomos para eliminar as organelas danificadas pelos processos oxidativos. Há trabalhos que evidenciam ser esse processo, quando induzido pela PDT, independente da apoptose e outros que mostram haver concomitância entre apoptose e autofagia (11). A Bcl-2 inibe a beclin 1, o que indica que a célula, ao inibir a apoptose, também inibe a autofagia. Estudos indicam que, durante a PDT cujo fotossensibilizador concentra-se no retículo endoplasmático, há ativação da beclin 1 e indução da mitofagia, a autofagia mitocondrial, levando a célula à morte tanto por autofagia quanto por apoptose. A autofagia ainda é pouco abordada nos estudos básicos sobre PDT e lesões orais, e seu mecanismo ainda precisa ser elucidado (11, 53). Parece, contudo, ter papel crucial para limitar a progressão dos tumores da cavidade oral, já que sua expressão aumentada tem sido relacionada a melhor prognóstico em carcinoma epidermóide humano (65) e em carcinoma adenóide cístico (66).

Em cultura de células de carcinoma epidermóide bucal, foi realizada PDT mediada pelo feoforbide a, observando-se altos níveis de formação de organelas vesiculares acídicas, sugestivas de autofagia, bem como altos níveis de apoptose. Foi realizada inibição da autofagia, o que favoreceu o aumento dos índices de necrose nas culturas. Os autores concluíram que a PDT mediada pelo feoforbide a em cultura de células de carcinoma bucal é eficiente para eliminar as células tumorais por intermédio de apoptose e que a autofagia está presente nesse processo, protegendo a célula contra a necrose (54).

Em outro estudo foi analisado o efeito da PDT mediada pelo hexil 5-ALA em tumor renal induzido em camundongo. Os autores observaram alta expressão de caspase 3 e nenhuma alteração do PCNA. Por microscopia eletrônica de transmissão, detectaram danos severos nas mitocôndrias, grande quantidade de vacúolos, corpos apoptóticos e grânulos de lipofucsina. Concluíram que o efeito desse tipo de PDT foi de apoptose mitocondrial e autofagia (67).

A PDT mediada pelo 5-ALA foi realizada em cultura de células de feocromocitoma (PC12) e de adenocarcinoma de pulmão (CL10), com o intuito de se verificar o papel da AMPK (*AMP-activated protein kinase*), uma proteína responsável por estabelecer a homeostase celular após depleção energética severa, por intermédio da inibição do anabolismo e a estimulação de vias catabólicas produtoras de energia, bem como por estimular a autofagia. Os autores verificaram a presença

de autofagossomos após 2h da PDT. A inibição da autofagia acarretou um aumento drástico do índice de viabilidade celular. Concluindo que a autofagia ocupa um papel central no mecanismo de morte causado pela PDT-5-ALA (68).

Não foi encontrado nenhum trabalho que relacionasse especificamente a expressão da beclin 1 com a PDT.

2.2.4 Necrose e RIP 1

A morte celular por necrose há muito vem sendo caracterizada como um processo acidental e patológico que ocorre geralmente após injúria celular química ou física, associada a alterações bruscas do metabolismo e da estrutura da célula. É caracterizada por inchaço celular, picnose do núcleo, perda da integridade da membrana e extravasamento dos componentes intracelulares, incluindo enzimas que podem ser detectadas no meio extracelular, tais como lactato desidrogenase e fosfatase alcalina. Há resposta inflamatória ao tecido necrótico, o qual é constituído basicamente por proteínas desnaturadas, coaguladas e insolúveis (69, 70).

Há um tipo de necrose que pode também ocorrer de forma regulada, envolvendo uma sequência precisa de sinais, denominada necroptose ou necrose programada (52, 71). Esse termo é empregado para uma modalidade de morte celular associada à ativação das proteínas RIP 1 e RIP 3 (membros da família RIP, do inglês *receptor integrating protein kinases*) e à morfologia da morte por autofagia. A necroptose foi descrita pela primeira vez por Degterev *et al.* (72) como um tipo de morte que ocorre em geral quando uma célula por algum motivo não está apta a morrer por apoptose (69, 70).

A família RIP é composta por sete proteínas que possuem um domínio quinase e, dentre estas, a RIP 1 está associada a receptores de morte (pertencentes a superfamília fator de necrose tumoral – TNF e Fas) e a receptores Toll-like que iniciam cascatas específicas de morte celular (73). Quando esses receptores são ocupados, formam um complexo com a RIP 1 (denominado complexo I) e esta sofre ubiquitinação com várias moléculas associadas aos receptores de morte (por

exemplo, TRAF2/5, *receptor associated factor 2/5*) e também com proteínas antiapoptóticas (tais como as IAPs, *inhibitor of apoptosis proteins*). Esse complexo ativa as vias do NFkB e da MAPK (74, 75), iniciando um processo de antiapoptose. Seguinte a endocitose desses receptores, ocorre a fragmentação desse complexo e a deubiquitinação da RIP1. Esta forma um segundo complexo (complexo II, denominado DISC, *death-inducing signaling complex*) agora com outras moléculas associadas ao receptor de morte TNF- α (como TRADD, *TNF- α receptor-associated death domain*, e FADD, *Fas-associated death domain*), bem como com a caspase 8. O DISC pode levar a célula a apoptose ou a necrose. A caspase 8, quando ativada, promove a clivagem da RIP 1 e ao mesmo tempo, a inibição do NFkB, favorecendo a apoptose. Contudo, em situações de alta produção de ROS e de déficit energético, em que há inibição da caspase 8 ou a sua não-formação, a RIP 1 não forma o complexo II e sofre fosforilação juntamente com a RIP 3, formando um complexo protéico denominado “necroptossoma” (75). Ainda não está claro como o necroptossoma leva a célula à necrose, mas há indícios de que ele pode provocar despolarização da membrana mitocondrial, aumento abrupto de estresse oxidativo e aumento da permeabilidade da membrana lisossomal e da membrana plasmática (73, 75). Além disso, um dos efeitos do necroptossoma é a ativação da JNK (*c-Jun NH2-terminal kinase*), o que prejudica o funcionamento mitocondrial quanto altas taxas de ROS estão presentes na célula, originando um *feedback* positivo de alta produção de ROS intracelular, levando à necrose (75). Pode haver também liberação de citocinas e liberação de Ca^{2+} para o citosol, os quais em conjunto interferem na bicamada lipídica da membrana plasmática e na integridade proteica do citoesqueleto (73).

Recentemente estudos têm demonstrado que a autofagia contribui para a necroptose. O complexo formado pela RIP 1 com a caspase 8 e a conseqüente ativação da JNK e de c-Jun leva a ativação da autofagia. Esta aumenta substancialmente os níveis de ROS, o que contribui para as modificações estruturais irreversíveis na célula. Assim, a autofagia juntamente com a necroptose funcionariam com um *feedback* positivo em *looping*, direcionando a célula a morte (75).

Não foram encontrados estudos envolvendo as RIP e PDT oncológica aplicada a tumores epiteliais, nem na cavidade oral nem em outros órgãos,

tampouco, trabalhos com a RIP 1 isoladamente. Foram identificados somente trabalhos com cultura de células analisando a expressão da RIP 3, os quais são descritos a seguir.

Em cultura de células de osteossarcoma, foi realizada PDT mediada pelo 5-ALA em células deficientes de RIP 3 e em células com expressão normal dessa proteína. Contrariamente às hipóteses formuladas pelos autores, as células com expressão normal de RIP 3 tiveram maior índice de sobrevivência após a PDT do que as células deficientes, bem como maior quantidade de expressão de LC3-II (marcador da formação de autofagossomos). Os autores interpretaram a ativação da autofagia nas células RIP 3 eficientes como sendo um efeito protetor contra os danos causados pela PDT, já que a autofagia, antes de levar a morte, exerce uma ação de retirada de proteínas e organelas defeituosas, incrementando a sobrevivência celular. As células RIP 3 eficientes ainda exibiram maior quantidade de clivagem das caspases 3, 7, 8 e 9 e do PARP (poli(ADP-ribose) polimerase) e, portanto, maior índice de apoptose. Os autores concluíram que a RIP 3 parece ter um papel importante na apoptose pós-PDT, sendo essencial sua presença para ativação da via das caspases. Assim a RIP 3, mais que um mediador da necroptose, teria um papel protetor facilitando a autofagia e um efeito crucial para a instituição da morte mediada por caspases (76)

Outro estudo demonstrou que a necrose induzida em células cultivadas de glioblastoma após tratamento com PDT mediada pelo 5-ALA é dependente da presença de RIP 3, a qual forma agregados com a RIP 1 após a fotossensibilização. A morte mediada pela PDT foi caspase-independente e causada principalmente pelo oxigênio singlete. Os autores ainda descrevem baixos níveis de caspase 8 e de FADD, proteínas presentes na formação do complexo I e II na necroptose estimulada pelo TNF- α . Concluem que provavelmente o necroptossoma formado após a PDT pode ter componentes diferentes daqueles até então descritos (77).

2.3 Lesões potencialmente malignas orais (LPMO) e PDT

As LPMO incluem um grupo variado de manifestações, que se apresentam brancas (leucoplasias) ou branco-avermelhadas (eritroleucoplasias), cuja adoção como diagnóstico clínico implica que foram descartadas outras doenças com sinais clínicos semelhantes e que sabidamente não acarretam risco para o desenvolvimento de câncer (78).

As LPMOs exibem ampla gama de aspectos histológicos, que variam de somente hiperqueratose a lesões muito próximas de carcinoma. O risco de malignização das LPMO ainda é bastante discutido, com alguns fatores de risco atrelados a esse processo, tais como fumo, consumo de álcool, presença de displasia e recorrência das lesões (79). É consenso ser crucial o acompanhamento clínico cuidadoso dessas lesões, bem como a erradicação principalmente daquelas com diagnóstico histopatológico de displasia (80).

Criocirurgia, ablação com laser de alta potência, administração tópica e sistêmica de vitaminas e outras substâncias (retinóides, beta caroteno, outros carotenóides etc.), bem como a PDT são algumas das modalidades terapêuticas propostas para o tratamento das LPMO, além da cirurgia convencional (14).

A PDT no manejo das leucoplasias tem demonstrado certa eficácia em função de sua capacidade de redução da lesão e de seu caráter não invasivo no tratamento de áreas extensas e superficiais, gerando cicatrizes reduzidas e baixos índices de recidiva. Destaca-se também por apresentar alta seletividade por células com metabolismo aumentado, com pouco ou nenhum dano ao tecido normal, além de não exibir efeito cumulativo (80-82).

No contexto da rotina do consultório odontológico, a PDT tópica é particularmente mais interessante para as lesões orais do que a modalidade sistêmica, uma vez que a administração do Fs não requer o isolamento do paciente em ambientes sem luz (essa condição é necessária nas administrações endovenosas do Fs, para minimizar os efeitos sistêmicos gerados pela fotossensibilidade). Sua execução também é viável na medida em que existem Fs comerciais adequados aos comprimentos de onda dos lasers vermelhos comumente utilizados na prática odontológica (660nm, 635 nm dentre outros) (82). Um ponto negativo da PDT tópica é a utilização de Fs que demandam longo tempo de espera para que atinjam o pico ideal para irradiação. O ácido 5-ALA, por exemplo, demanda longo intervalo (de 1,5h a 3h) entre a aplicação do produto e a irradiação, para que

ocorra sua penetração e a formação da molécula fotosensibilizadora, a PpIX. A dificuldade consiste na manutenção do produto sobre a lesão na mucosa oral sem que ele seja dissolvido pela saliva (83, 84).

São escassos os trabalhos relatados na literatura com relação aos índices de resposta obtidos com a PDT para as LPMO. Nos últimos dez anos, foram relatados achados clínicos de cerca de 280 pacientes, com índices de resposta completa satisfatória entre 25 e 100% e índices de recidiva entre 0 e 48% (85-89). Remissões clínicas completas das LPMOs têm sido mostradas a partir de três sessões semanais de PDT mediada pela administração tópica do ácido 5-ALA (84, 87). Contudo o intervalo entre as sessões e o protocolo de irradiação, incluindo o fracionamento ou não dos parâmetros, ainda são bastante discutíveis.

2.4 Modelos experimentais de indução de lesões potencialmente malignas orais

Os modelos para a indução de lesões malignas e potencialmente malignas na cavidade oral em modelos animais incluem xenotransplantes, animais transgênicos, modelos metastáticos e indução química. Essa é a modalidade mais utilizada para indução de carcinoma epidermóide bucal em ratos, camundongos e hamsters (90-92) por gerar lesões muito similares às presentes em humanos e por haver forte associação da patogênese do câncer bucal com o tabagismo e o etilismo. Contudo, é importante mencionar ser consenso que atualmente não há modelos ideais para mimetizar o processo multivariado do câncer nem no aspecto clínico nem no histológico (90, 93).

Dentre os carcinógenos químicos mais utilizados para a indução tumoral em roedores, estão o dimetil-1,2-benzantraceno 4 (DMBA) e o 4-nitroquinolina 1 óxido (4-NQO). As biotransformações geradas por esses compostos químicos incluem a formação de grandes adutos na fita de DNA e a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), acarretando mutações e fissuras no ácido nucléico, donde provém sua mutagenicidade (94, 95). O efeito genotóxico do 4-NQO é semelhante ao do tabaco na cavidade oral. Os tumores originados pelo fumo em humanos e os

tumores originados pelo 4-NQO em animais expressam biomarcadores semelhantes (p53, PCNA, AGNOR etc), bem como possuem características histopatológicas comuns, tanto nas etapas iniciais quanto nas avançadas. Considera-se assim que a semelhança do comportamento biológico entre ambos os tumores é a principal vantagem desse tipo de indução, o que possibilita o estudo das fases clássicas de indução, promoção e progressão tumoral (93, 96-98).

A forma de administração do carcinógeno pode ser tópica, via aplicações de solução de 4-NQO em propilenoglicol na mucosa 2-3 vezes por semana (95, 99), ou sistêmica, na qual o carcinógeno é adicionado à água de beber e administra-se *ad libitum* (100, 101). O modelo tópico é mais trabalhoso em função do manuseio dos animais e parece promover índices relativamente mais baixos de incidência de tumores orais do que o sistêmico (102). Para aumentar a incidência de lesões malignas tem-se lançado mão, nos modelos em água, da associação com arecolina (500 µg/mL) (103).

As LPMO induzidas pelo 4-NQO se assemelham às leucoplasias orais humanas, com a formação de placa branca na mucosa oral que histologicamente exhibe tanto alterações arquiteturais (estratificação epitelial irregular, perda de polaridade e projeções epiteliais em gota, mitoses altas), quanto alterações citológicas (variação de tamanho e forma do núcleo e da célula, aumento da proporção núcleo/citoplasma), alterações que permitem classificá-las como displasias epiteliais (93, 95).

O tempo de indução das LPMO a partir do 4-NQO varia substancialmente na literatura, mas entre 12 e 20 semanas é possível detectar as lesões clinicamente (95, 104, 105). Acredita-se que essas variações são em decorrência das diversas doses de 4-NQO descritas, bem como da falta de padronização da aplicação tópica. Esses modelos têm sido utilizados para se estudar a biologia do câncer, incluindo sua histopatologia e os biomarcadores da carcinogênese, bem como para se testar modalidades terapêuticas e de diagnóstico(92).

Os estudos mostram assim que agente mutagênico 4-NQO em modelo animal de roedores é eficaz para gerar carcinoma epidermóide bucal e LPMO em um padrão aceitável de similaridade.

3 PROPOSIÇÃO

3.1 Objetivo geral

Estabelecer a relação anatomocronológica de marcadores de morte celular presentes após PDT mediada 5-ALA em LPMO induzidas quimicamente.

3.2 Objetivos específicos

- a) Estabelecer a porcentagem de redução das lesões em função dos tempos experimentais de 6h, 24h, 48h e 72 horas após a aplicação da PDT.
- b) Verificar a expressão imuno-histoquímica das proteínas PCNA, caspase 3, beclin 1 e RIP 1 em cada um desses períodos.
- c) Determinar o intervalo de tempo após a PDT em que há predomínio de morte celular.
- d) Sugerir o intervalo de tempo entre as sessões de PDT com base na expressão dos marcadores estudados.

4 MATERIAL E MÉTODO

Os procedimentos descritos a seguir foram previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP) (certificado nº 157) (Anexo A).

Previamente ao delineamento dos grupos amostrais, foi realizado experimento para caracterização do modelo de indução com 4-NQO, em que foi feita análise histopatológica semanal da mucosa lingual. Esse experimento foi instituído para se verificar as alterações teciduais provocadas pelo carcinógeno de acordo com o tempo, com o intuito de comprovar se o período de até 16 semanas era suficiente para induzir lesões displásicas compatíveis com o descrito na literatura, considerando-se as condições locais de biotério e o tipo/idade do animal. Paralelamente, foram feitos testes bioquímicos e hematológicos para determinar o grau de toxicidade sistêmica do 4-NQO. Os dados desse experimento encontram-se detalhados no Apêndice A.

4.1. Grupos experimentais

Oitenta e quatro ratos (Wistar), machos, com cerca de 200g, foram aleatoriamente divididos em:

- a) Grupo PDT – Composto por 42 animais, nos quais foram induzidas LPMO a partir da aplicação tópica de solução de 4-NQO e posteriormente tratadas com PDT.
- b) Grupo controle positivo – Composto por 32 animais nos quais foram induzidas LPMO a partir da aplicação tópica de solução de 4-NQO, porém sem tratamento com PDT.
- c) Grupo controle negativo: composto por 10 animais submetidos às mesmas condições experimentais, porém sem indução de lesões e sem tratamento de PDT.

Os tempos experimentais nos quais ocorreram eutanásias foram 6h, 24h, 48h e 72 horas após a PDT (8 animais para cada período). Após 72h da PDT, outros 10 animais foram submetidos a um segundo ciclo de PDT, cinco dos quais sofreram eutanásia 6h após esse segundo tratamento e outros cinco, após 72h do mesmo.

O Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo forneceu os animais, que foram alimentados com ração comercial (Labina®, Purina, Bayer, Brasil) e com água *ad libitum*, submetidos a ciclos de 12 horas de claro e escuro e mantidos em gaiolas individuais durante todo o experimento.

4.2 Indução das lesões potencialmente malignas com 4-NQO

4-nitroquinolina-1-óxido (4-NQO) (Sigma, Aldrich, USA) foi diluído em propilenoglicol na concentração de 5mg/ml e aplicado na mucosa lingual (dorso e ventre) dos animais utilizando pincel tipo “microbrush”, 3x por semana, durante 16 semanas (95, 99, 105).

A quantidade de solução empregada em cada aplicação girou em torno de 0,15 mg, calculada por intermédio da pesagem do material presente no “microbrush”. Todo o procedimento de manipulação do carcinógeno foi executado seguindo-se rigorosamente os cuidados de biossegurança recomendados pelo fabricante, com utilização de duas luvas, máscaras de proteção antigases, óculos de proteção e avental branco recoberto por avental descartável. Encaminharam-se os resíduos da solução, bem como todo o material utilizado e contaminado, para incineração. Os animais ficaram isolados no biotério em estante individual. A indução foi interrompida na semana anterior à PDT.

4.3 Monitoração das lesões

Após 16 semanas de aplicação do 4-NQO, o volume da língua e as lesões induzidas foram medidas utilizando-se um paquímetro. Somente as lesões com diâmetro maior ou igual a 5 mm foram selecionadas para serem tratadas com PDT. O volume da língua foi calculado por intermédio da multiplicação espessura X distância de uma borda lateral a outra X distância do ápice à base, obtendo um valor em mm³. O tamanho das lesões foi determinado pela mensuração do seu maior diâmetro (em mm). No caso de lesões múltiplas, somente a lesão de maior tamanho foi medida. Realizaram-se as mensurações imediatamente antes da PDT e no momento da eutanásia, para fins de comparação dos efeitos do tratamento na língua como um todo e no tamanho das lesões. Somente um operador realizou as medições de forma cega.

4.4 Protocolo de PDT

Para a execução da PDT, o animal foi previamente anestesiado com injeção intraperitoneal de quetamina (0,1ml/g) e xilazina (0,01ml/g). Após confirmação de sedação profunda, foi aplicada topicamente, no local da lesão, solução de 5-ALA (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA) na concentração de 20% em veículo de EDTA e solução fisiológica homogeneizada com lanolina e vaselina líquida (106). O ALA foi mantido por 2h na superfície da mucosa, sendo renovado a cada 30 minutos, seguindo-se a irradiação (107, 108). A potência de saída do laser foi verificada através de um equipamento de aferição do tipo “power meter” (Power max 600 – Molelectron- USA). Para confirmar a presença da maior quantidade de PpIX no grupo PDT em relação aos controles, foi realizado ensaio de fluorescência para a PpIX. Os dados desse ensaio encontram-se no Apêndice B, em que se constata maior índice de fluorescência nas amostras com 5-ALA.

A irradiação foi realizada com laser de diodo (660nm, MM Optics, São Carlos, Brasil), com os parâmetros descritos abaixo (Quadro 4.1). A área do ponto irradiado correspondeu à área do spot do laser (109, 110).

Comprimento de onda λ (nm)	660
Potência (mW)	40
Energia (J/ponto)	3,6
Densidade de energia por ponto (J/cm ²)	90
Área do ponto (cm ²)	0,04
Tempo por ponto (min)	1,5
Nº de irradiações	1
Nº de pontos irradiados	2
Densidade de potência mW/cm ²	1000

Quadro 4.1 – Parâmetros da fonte de ativação da PDT

O segundo ciclo de PDT foi realizado com esse mesmo protocolo após 72 horas para um grupo de 10 animais.

Os animais dos grupos controles sofreram anestesia e foram mantidos em condições semelhantes ao grupo PDT.

4.5 Eutanásia e retirada do material de análise

Os animais do grupo PDT sofreram eutanásia, em câmara de CO₂, nos períodos de 6h, 24h, 48h e 72h após a PDT na primeira sessão, e em 6h e 72h na segunda sessão. Os grupos controles (positivo e negativo) sofreram eutanásia no período coincidente a 72h após PDT. A língua foi então retirada, seccionada longitudinalmente com uma das metades congelada e a outra fixada em paraformaldeído a 20% em solução tampão de fosfato de sódio dibásico anidro e monobásico de pH 7,0, sempre preparada no mesmo dia da utilização e os fragmentos foram enviados para processamento histológico.

4.6 Análise histopatológica

O material foi fixado por no mínimo 24h e no máximo 48h, a partir do que foi seccionado no plano sagital mediano e processado para inclusão em parafina. Primeiramente foram feitos 2 banhos de 10 minutos na solução tampão do formol (fosfato de sódio dibásico anidro e monobásico) e, a seguir, para iniciar a

desidratação do tecido, as peças foram imersas em banhos crescentes de etanol (do etanol 30% com duração de 10 min até o etanol 70%). Em seguida, foram introduzidas em processador histológico automático (Leica 1010, Alemanha) para continuar em cadeia crescente de banhos em etanol até o etanol absoluto. Foi realizado então banho com etanol/xilol 50%, dois banhos em xilol e, por fim, imersão em parafina com ponto de fusão em 60°C, confeccionando-se os blocos de tecido. Cortes de 3µm foram obtidos em micrótomo e, a seguir, foram corados automaticamente em hematoxilina e eosina por intermédio de máquina de coloração (Sakura Finetek, USA Inc.), sendo então analisados em microscopia de luz convencional.

A fim de se estabelecer as alterações morfológicas celulares após PDT no epitélio da mucosa lingual (face ventral), dois examinadores realizaram a leitura das lâminas de modo cego, observando os seguintes elementos: grau de hiperqueratose, hiperplasia da camada basal, atrofia, perda da polaridade das células da camada basal, vacuolização celular, hipercromatismo nuclear, perda da coesão celular e inflamação no tecido conjuntivo. Esses elementos foram graduados de forma subjetiva mediante prévia calibração entre os dois examinadores, classificando-se em: 0 – ausente; 1 – discreto (menos de 25% do campo exibindo a alteração); 2 – moderado (entre 25% e 75% do campo exibindo a alteração); 3 – intenso (mais de 75% do campo exibindo a alteração). As regiões de interesse foram analisadas em aumento de 100X e 400X.

Três cortes histológicos adicionais do mesmo espécime foram obtidos, corados em HE e submetidos a morfometria. Foi quantificada a área epitelial (queratina e demais camadas) em quatro campos sucessivos (aumento de 400X), por intermédio da delimitação manual utilizando ferramenta apropriada no software Image J (111). Pelo mesmo método, foi quantificada a área somente de queratina em todos os grupos. Todo o procedimento foi realizado por um único operador de modo cego.

4.7 Análise imuno-histoquímica

O método da estreptavidina-biotina foi utilizado para o estudo imuno-histoquímico com os anticorpos anti-caspase3, anti-RIP 1 , anti-beclin- 1 e anti-PCNA. Os protocolos utilizados para cada anticorpo estão descritos no Quadro 4.2.

Anticorpo	Clone	Titulação	Período de incubação	Pré-tratamento	Controle do anticorpo
Anti-caspase3 Abcam Inc	Monoclonal (E87)	1:50	1h	Banho-maria 95°C, 40min tampão de ácido cítrico pH 6.0, 0,01M	Carcinoma de cérvix uterino
Anti-RIP 1 (H-207) Santa Cruz Biotechnology Inc	Policlonal	1:25	1h	Banho-maria 97°C, 45min tampão de ácido cítrico, pH 6.0, 0,01M	Intestino delgado
Anti Beclin 1 Abcam Inc	Policlonal	1:50	1h	Banho-maria 95°C, 40min tampão de ácido cítrico, pH 6, 0,01M	Cérebro
Anti-PCNA Dako	Monoclonal (PC10)	1:100	1 h	Banho-maria 95°C, 30min tampão de ácido cítrico, pH 6.0, 0,01M	Carcinoma epidermóide bucal

Quadro 4.2 – Protocolos utilizados nas reações de imuno-histoquímica

Três cortes de 3µm de espessura foram estendidos em lâminas de vidro previamente tratadas com 3-aminopropil-trietoxissilano (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA), com finalidade de aumentar a adesividade da superfície da lâmina. A técnica imuno-histoquímica foi iniciada com a desparafinização dos cortes, seguindo o procedimento de dois banhos consecutivos de xilol, o primeiro por 30 minutos a 60° C e o segundo, de 15 minutos a temperatura ambiente. A reidratação das amostras ocorreu através de banhos de 3-5 minutos em cadeia decrescente de concentração de etanóis em temperatura ambiente, começando em etanol absoluto e terminando em 85%. Em seguida, foi feita remoção de pigmento formólico em banho de 5 minutos em solução a 10% de hidróxido de amônio em etanol. Após lavagem em

água destilada, seguiu-se para a etapa de recuperação antigênica, que ocorreu através do calor úmido sem fervura em banho-maria microprocessado (Quimis, São Paulo, Brasil), os parâmetros de tempo e temperatura para cada anticorpo estão no Quadro 4.2. As lâminas foram mergulhadas em tampão de ácido cítrico (0,01M) pH 6,0, preparado sempre no dia da reação. Finalizada essa etapa, as lâminas foram mantidas em temperatura ambiente por 20 minutos, para redução da temperatura e, a seguir, lavadas em água destilada. O bloqueio da peroxidase endógena foi a etapa seguinte, feito com dois banhos (de 15 minutos cada) em solução de peróxido de hidrogênio/metanol a 6% v/v, sem lavagem intermediária, seguindo-se de 5 minutos em água destilada e 3 banhos de 5 minutos em solução salina de TRIS. O tampão da reação foi TRIS em solução salina (2-amino-2-hidroximetilpropano 1,3 diol – TRIS 50 mM e cloreto de sódio - NaCl 150 mM, pH 7,6), utilizado em toda a reação. Três imersões sucessivas de 5 minutos em tampão de TRIS foram realizadas antes de cada etapa a seguir. Apesar de a diluição dos anticorpos primários ter sido feita em soro de albumina bovina sérica-BSA 1%, optou-se ainda pela etapa de bloqueio de proteínas inespecíficas, por se tratar de amostra animal. Este foi realizado com BSA 5% por 1h antes do anticorpo, com o objetivo de reduzir a marcação de fundo nas reações. A incubação dos anticorpos primários ocorreu na sequência. Cada anticorpo foi processado em lotes de 16 lâminas por vez pelo mesmo operador, mantendo cada grupo experimental na mesma reação. Os anticorpos primários foram incubados por 60 minutos a temperatura ambiente em câmara úmida com proteção contra luz. As titulações encontram-se no Quadro 4.2. A incubação com anticorpo de ligação biotinilado e com o complexo terciário (estreptavidina-biotina) deu-se por 30 minutos cada etapa (LSAB kit peroxidase K0690, Dako Corporation, Carpinteria, CA, EUA), com 3 imersões de 5 minutos em tampão TRIS entre cada uma, seguido de 10 minutos de incubação com diaminobenzidina (Dako Liquid DAB Plus, Dako Corporation, Carpinteria, CA, EUA), lavagem e contracoloração com hematoxilina de Mayer. A desidratação foi realizada com banhos sucessivos de 5 minutos em cadeia crescente de etanóis começando no 70% até o absoluto, passando 2 vezes pela solução de xilol, para proceder-se a montagem com lamínulas de vidro e meio de montagem sintético Erv- Mount® (Easy Path, São Paulo, Brasil).

Para se obter um dado quantitativo da expressão imuno-histoquímica,

utilizou-se método de contagem manual avaliando-se o percentual de células positivas num universo de 1000 células por amostra. As células consideradas positivas para PCNA, beclin 1 e RIP 1 foram as que exibiram marcação nuclear nítida, sendo quantificados esses núcleos. Como a marcação de caspase3 foi predominantemente citoplasmática, adotou-se como critério quantificar somente as células em que os núcleos fossem visíveis e cuja delimitação da periferia celular estivesse nítida pela própria marcação. Na ausência desses critérios, essa célula foi considerada negativa. A contagem foi realizada em aumento de 400X, utilizando-se zoom de aproximação de até 200X e ferramenta de contagem manual de partículas do software Image J (111). Em todas as contagens, a intensidade de marcação não foi considerada. Todo o procedimento foi realizado por um único operador de modo cego.

4.8 Análise estatística

Fez-se a estatística descritiva utilizando média e desvio-padrão para os dados numéricos obtidos na medida da língua/lesão, área do epitélio, bem como para as porcentagens obtidas na quantificação das células. Para os dados de intensidade dos elementos presentes na análise histopatológica, foi adotada mediana e valores mínimo e máximo. Foi realizado teste de Kruskal-Wallis, para comparações múltiplas, e teste não-paramétrico de Mann-Whitney, para análises dois-a-dois. O nível de significância adotado foi de 5%.

5 RESULTADOS

5.1 Análise clínica das lesões induzidas e tratadas com PDT

Após 16 semanas de aplicação tópica do 4-NQO, as superfícies ventral e dorsal da língua exibiram placa branca hiperqueratótica, por vezes de limites indefinidos (Figura 5.1).

Figura 5.1 - Aspecto clínico das lesões induzidas com 4-NQO na mucosa lingual de ratos. A: Aspecto inicial. B: Placa branca hiperqueratótica após 16 semanas de indução

As lesões com 5mm ou mais foram tratadas com PDT e, no momento da eutanásia, a medida linear das mesmas e o volume da língua foram obtidos e comparados com as medidas antes do tratamento. A Tabela 5.1 contém a média de variação dessas medidas em cada grupo e período experimental. Nota-se aumento significativo de volume da língua em PDT 6h e 24h em relação a PDT 48h ($p=0,0012$) e 72h ($p=0,0043$), bem como em 6h do segundo ciclo de PDT em relação a 72h desse ciclo ($p=0,0209$). Observa-se também que houve diminuição significativa (da ordem de 50%) do maior diâmetro da lesão no segundo ciclo de PDT, tanto em 6h quanto em 72h, em relação a todos os períodos experimentais do primeiro ciclo. No primeiro ciclo, não houve diminuição significativa da lesão entre os períodos entre si e em relação ao controle positivo.

Tabela 5.1 – Média ($\pm$ desvio-padrão) das medidas e da porcentagem de variação do volume da língua e do maior diâmetro da lesão para cada um dos grupos e períodos experimentais

	Língua				Lesão			
	Início (mm ³)	Fim (mm ³)	% variação	Valor de p	Início (mm)	Fim (mm)	% variação	Valor de p
PDT 6h	292,6 $\pm$ 54,7	511,3 $\pm$ 111,1	176,9 $\pm$ 39,3	0,0002	9,6 $\pm$ 3,0	6,8 $\pm$ 2,1	71,7 $\pm$ 5,2	0,0029
PDT 24h	254,2 $\pm$ 68,0	505,7 $\pm$ 176,1	211,1 $\pm$ 94,8		11,1 $\pm$ 4,0	8,1 $\pm$ 3,0	72,8 $\pm$ 13,4	
PDT 48h	314,7 $\pm$ 57,0	305,5 $\pm$ 89,2	96,4 $\pm$ 14,9 ^a		10,8 $\pm$ 2,7	8,2 $\pm$ 2,1	77,3 $\pm$ 14,0	
PDT 72h	369,2 $\pm$ 116,0	256,4 $\pm$ 86,6	72,9 $\pm$ 30,8 ^a		10,0 $\pm$ 2,5	8,2 $\pm$ 2,1	82,6 $\pm$ 15,5	
2ºciclo 6h	263,0 $\pm$ 62,2	540,0 $\pm$ 129,6	211,9 $\pm$ 70,1		14,7 $\pm$ 2,3	7,2 $\pm$ 0,9	49,7 $\pm$ 7,9 ^c	
2ºciclo 72h	407,2 $\pm$ 143,1	285,5 $\pm$ 46,0	74,6 $\pm$ 22,1 ^b		9,2 $\pm$ 2,2	5,5 $\pm$ 1,7	59,0 $\pm$ 8,6 ^c	

Controle positivo: Língua: 319,4 $\pm$ 89,4 mm³. Lesão: 8,5 $\pm$ 1,4mm.

Valor de p para o teste de Kruskal-Wallis.

a= estatisticamente significante em relação a PDT 6h.

b = estatisticamente significante em relação a 6h Ciclo2.

c= estatisticamente significante em relação a todos os períodos experimentais do primeiro ciclo de PDT.

5.2 Análise histopatológica

A indução experimental com 4-NQO provocou a formação de atipia celular no epitélio da mucosa lingual, com predomínio de hiperchromatismo nuclear, inversão de polaridade da camada basal, projeções em gota, hiperqueratose e áreas de atrofia epitelial. No Apêndice A encontra-se a variação de intensidade desses fenótipos para cada semana de indução com 4-NQO. A Tabela 5.2 mostra a mediana dos valores de intensidade atribuídos para cada alteração morfológica observada nos epitélios após a PDT. Nesse grupo, em geral as alterações morfológicas celulares foram significativamente mais intensas do que o controle positivo, com exceção para os itens vacuolização celular e inflamação, em que não foi observada diferença. Em geral, os períodos de 6h e 24h após PDT no primeiro ciclo exibiram maior intensidade de hiperplasia da camada basal, perda da polaridade das células da camada basal e hiperchromatismo nuclear do que os demais períodos de PDT. No segundo ciclo de PDT, destaca-se maior intensidade de hiperqueratose e de inflamação, apesar de esse último item não ter significância na análise estatística. A figura 5.2 ilustra essas alterações morfológicas.

Tabela 5.2 - Valores da mediana (mínimo e máximo) da intensidade das alterações morfológicas observadas à microscopia óptica no epitélio da face ventral das línguas (grupos controle positivo e PDT)

Alteração morfológica	Controle positivo*	PDT						Valor de p
		6h	24h	48h	72h	2º ciclo 6h	2º ciclo 72h	
Hiperqueratose	1 (0-1)	2 (1-3)	2 (1-3)	1 (1-2)	2 (2-2)	3 (2-3)	2 (2-3)	0.0024
Hiperplasia da camada basal	2 (1-2)	3 (2-3)	3 (2-3)	1 (1-3)	2 (1-2)	3 (2-3)	2,5 (2-3)	0.0040
Atrofia	2 (1-3)	1 (2-0)	1 (0-3)	2 (1-3)	2 (1-3)	2 (1-2)	1,5 (1-3)	0.0390
Perda de polaridade das células da camada basal	2 (1-3)	3 (2-3)	2 (2-3)	1 (1-1)	1 (1-1)	1 (1-2)	1 (1-1)	0.0002
Projeções em gota	2 (2-2)	3 (3-3)	3 (2-3)	1 (1-2)	2 (2-2)	2 (2-2)	1,5 (1-2)	0.0007
Vacuolização celular	1 (1-2)	3 (2-3)	2 (2-3)	1 (0-2)	1 (1-2)	1 (0-3)	2,5 (2-3)	0.0621
Hipercromatismo nuclear	3 (3-3)	3 (3-3)	3 (3-3)	2 (1-2)	2 (2-3)	3 (2-3)	3 (3-3)	0.0002
Perda da coesão celular	0 (0-0)	1 (1-2)	1 (0-3)	2 (1-3)	1 (0-1)	1 (0-3)	1,5 (0-3)	0.0387
Inflamação	2 (1-2)	2 (0-2)	1 (0-3)	2 (1-3)	2 (1-3)	3 (3-3)	2,5 (1-3)	0.0814

Gradação: 0 = ausente; 1 = discreta; 2 = moderada; 3 = intensa. Valor de p referente ao teste de Kruskal-Wallis.

* A gradação da intensidade nesse grupo foi determinada comparando-se com os períodos experimentais de PDT (de maneira cega) e não constituem referência para comparações com o grupo controle negativo. Para a comparação entre grupo controle negativo e grupo controle positivo vide Apêndice A.

Figura 5.2 – Exemplos de alterações morfológicas observadas no epitélio da mucosa lingual após a PDT. No controle positivo nota-se hiperplasia da camada basal, hiperchromatismo nuclear, células vacuolizadas e hiperqueratose discreta. As alterações após a PDT incluem hiperplasia da camada basal, vacuolização dessas células e perda de coesão entre elas, perda da nitidez da camada espinhosa e exocitose em alguns períodos (Hematoxilina-eosina, 400X. Escala – 50µm).

5.3 Medidas de espessura do epitélio

As médias de espessura do epitélio da face ventral da língua nos grupos controle e PDT encontram na tabela 5.3. Há diferenças significativas entre os grupos tanto para a espessura do epitélio como um todo ($p=0,0071$) quanto para a camada de queratina ($p=0,0026$). O grupo PDT 6h exibiu a menor espessura, diferindo estatisticamente do grupo controle positivo (epitélio - $p=0,0104$, camada de queratina - $p=0,0023$) e dos demais períodos experimentais de PDT (24h – $p=0,0078$ e $p=0,0038$; 48h – $p=0,0109$ e $p=0,0055$; 72h – $p=0,0128$ e $p=0,0034$; 2º ciclo 6h – $p=0,0235$ e $p=0,0108$). O segundo ciclo de PDT exibiu medidas menores do epitélio como um todo em relação ao primeiro ciclo (a partir de 24h), porém as diferenças foram significantes somente a entre PDT 72h e 2º ciclo 72h ($p=0,0472$).

Tabela 5.3 - Média ($\pm$ desvio-padrão) da espessura (μ m) do epitélio como um todo e da camada de queratina nos grupos controles e PDT

Grupo	Espessura epitelial	Valor de p	Espessura da camada de queratina	Valor de p
Controle negativo				
Controle positivo	33.89 $\pm$ 4.82 ^a		10.05 $\pm$ 2.45 ^a	
PDT 6h	21.84 $\pm$ 5.70		5.05 $\pm$ 1.66	
PDT 24h	34.40 $\pm$ 7.76 ^a	0.0071	9.40 $\pm$ 1.66 ^a	0.0055
PDT 48h	33.51 $\pm$ 10.46 ^a		8.28 $\pm$ 1.76 ^a	
PDT 72h	34.17 $\pm$ 7.06 ^a		9.36 $\pm$ 0.79 ^a	
2º ciclo 6h	30,88 $\pm$ 2,83 ^{a,b}		14,45 $\pm$ 9,91 ^a	
2º ciclo 72h	27,19 $\pm$ 3,34 ^c		15,37 $\pm$ 9,66 ^a	

Valor de p para o teste Kruskal-Wallis.

a= estatisticamente significante em relação a PDT 6h.

b = estatisticamente significante em relação ao controle positivo.

c = estatisticamente significante em relação a PDT 72h.

5.4 Análise descritiva da expressão imuno-histoquímica

5.4.1 PCNA

Na reação imuno-histoquímica para o PCNA nota-se expressão no núcleo das células localizadas predominantemente na camada basal e com intensidade variada. No controle negativo, a expressão do PCNA restringe-se a camada basal do epitélio, com alguns núcleos positivos intercalados por outros negativos. No controle positivo, a intensidade de marcação torna-se mais acentuada, e é visível o maior número de núcleos positivos. Nos epitélios tratados com PDT, principalmente nas primeiras 6h, há intensa marcação dos núcleos da camada basal, a qual se encontra hiperplasiada, bem como de alguns núcleos nas camadas superiores. Depois de 72h de PDT, a expressão de PCNA é bem inferior em relação à observada em 6h e o controle positivo. Já no segundo ciclo de PDT, a intensidade de expressão aumenta, principalmente em 72h. A figura 5.3 exibe os padrões de marcação observados para os diferentes grupos experimentais.

Figura 5.3- Expressão imuno-histoquímica do PCNA nos diferentes grupos e períodos experimentais-(Estreptavidina-biotina, 400X). Escala = 50µm. Vide descrição no texto acima

5.4.2 Caspase 3

A expressão imuno-histoquímica da caspase 3 em geral foi citoplasmática em com padrão difuso em todos os grupos e períodos analisados, estando restrita às camadas basal e suprabasal do epitélio. No controle negativo, a expressão foi ausente e no controle positivo, discreta e difusa. Houve maior intensidade nos grupos tratados com PDT, principalmente em 6h de ambos os ciclos. Nesses períodos, foi possível visualizar a concentração da expressão imuno-histoquímica na periferia celular, delimitando as células. A Figura 5.4 exibe a expressão imuno-histoquímica da caspase 3 para os diferentes grupos e períodos experimentais.

Figura 5.4-Expressão imuno-histoquímica da caspase 3 nos diferentes grupos e períodos experimentais (Estreptavidina-biotina, 400X). Escala = 50 μm . Vide descrição no texto acima

5.4.3 Beclin

A expressão imuno-histoquímica da beclin 1 exibiu um padrão granular no citoplasma das células da camada basal, e homogêneo, com intensidade variada, nos núcleos das células das camadas superficiais. Aparentemente, o período experimental de 6h após a PDT de ambos os ciclos exibem maior intensidade, principalmente por terem mais células com citoplasma positivo. O controle positivo exibiu vários núcleos nas camadas superficiais positivos para a proteína, e algumas células da camada basal com positividade no citoplasma, porém várias células nessa camada não exibem a marcação. Nos períodos de 72h de ambos os ciclos de PDT, há redução da intensidade de expressão.

Figura 5.5 - Expressão imuno-histoquímica da beclin 1 nos diferentes grupos e períodos experimentais (Estreptavidina-biotina, 400X). Escala = 50μm. Vide descrição no texto acima

5.4.4 RIP 1

A expressão imuno-histoquímica da RIP 1 também foi citoplasmática na camada basal e nuclear nas camadas superiores. O controle positivo exhibe marcação discreta, principalmente na camada basal. Em PDT 6h de ambos os ciclos e PDT 48h há aumento da intensidade de marcação em relação ao controle positivo. Nos períodos de 6h, o padrão nuclear estende-se com mais frequência às camadas superiores do que os demais grupos e períodos. Já em PDT 24h e PDT 72h de ambos os ciclos, a marcação nuclear apresenta-se ausente ou muito discreta.

Figura 5.6 - Expressão imuno-histoquímica RIP 1 nos diferentes grupos e períodos experimentais (Estreptavidina-biotina, 400X). Escala = 50μm. Vide descrição no texto acima

5.5 Índices de células epiteliais positivas nos testes imuno-histoquímicos

5.5.1 PCNA

O gráfico 5.1 exibe a porcentagem média de células epiteliais positivas para PCNA. No grupo controle positivo, a porcentagem média foi significativamente maior do que no controle negativo ($p=0,0054$) e significativamente menor do que em PDT 6h ($p=0,0034$). Esse último grupo exibiu porcentagem significativamente maior também em relação a PDT 24h ($p=0,0201$), 48h ($p=0,0012$) e 72h ($p=0,0034$). No segundo ciclo de PDT, a porcentagem média se eleva bastante em relação aos demais grupos. O período de 6h do segundo ciclo exibiu porcentagem significativamente maior em relação a PDT 6h ($p=0,0034$) e ao controle positivo ($p=0,0013$), e não diferiu do período de 72h do segundo ciclo ($p=0,1745$).

Gráfico 5.1- Porcentagem média ($\pm$ desvio-padrão) de células epiteliais positivas para PCNA segundo os grupos e períodos experimentais

5.5.2 Caspase 3

O gráfico 5.2 exibe a porcentagem média de células epiteliais positivas para caspase 3. A expressão dessa proteína foi significativamente maior no controle positivo do que no negativo ($p=0,0472$). No grupo PDT, o período experimental em que houve maior porcentagem foi o de 6h, o qual foi estatisticamente diferente em relação a todos os demais períodos do primeiro ciclo de PDT (24h – $p=0,0026$, 48h – $p=0,0491$ e 72h – $p=0,0395$) e em relação ao controle positivo ($p=0,0021$). Entre os períodos de 24h e 72h do primeiro ciclo de PDT não houve diferenças significativas. No segundo ciclo de PDT, a porcentagem média de células positivas no período de 6h aumenta novamente, porém não difere estatisticamente do período de 72h do primeiro ciclo e é significativamente menor do que a observada para a PDT 6h primeiro ciclo ($p=0,0404$). Entre os dois períodos do segundo ciclo de PDT (6h e 72h) não houve diferenças estatísticas.

Gráfico 5.2 - Porcentagem média ($\pm$ desvio-padrão) de células epiteliais positivas para caspase 3 segundo os grupos e períodos experimentais

5.5.3 Beclin 1

O gráfico 5.3 contém a porcentagem média de células epiteliais positivas quantificadas para a proteína beclin 1. Nota-se que, no controle negativo, a porcentagem é significativamente bem baixa em relação ao controle positivo ($p=0,0090$). A maior porcentagem foi observada para o grupo PDT período de 6h, a qual foi significativamente maior do que PDT 24h e 48h ($p=0,0090$) e PDT 72h ($p=0,0163$). A menor porcentagem após a PDT foi para o período de 24h, com diferenças significativas para PDT 48h ($p=0,0379$) e PDT 72h ($p=0,0163$). No segundo ciclo de PDT, em 6h houve aumento da porcentagem de células positivas, a qual foi semelhante à taxa observada nas 6h do primeiro ciclo ($p=0,1745$). Em 72h do segundo ciclo, a porcentagem diminuiu, sendo significativamente menor do que as 72h do primeiro ciclo ($p=0,0081$).

Gráfico 5.3 - Porcentagem média ($\pm$ desvio-padrão) de células epiteliais positivas para a proteína beclin 1 segundo os grupos e períodos experimentais

5.5.4 RIP 1

O gráfico 5.4 contém a porcentagem de células epiteliais positivas para a proteína RIP 1 em relação aos grupos e períodos experimentais. Apesar de o controle positivo exibir média maior, não houve diferenças significativas em relação ao controle negativo. A maior porcentagem foi observada para o grupo PDT 6h, a qual foi estatisticamente diferente de todos os demais períodos experimentais do primeiro ciclo de PDT ($p=0,0090$ para todos os cruzamentos). No segundo ciclo de PDT, houve um pico de células positivas também em 6h, cuja porcentagem não diferiu estatisticamente do período de 6h do primeiro ciclo. Em 72h do segundo ciclo de PDT, há uma queda da porcentagem, mas esta não difere estatisticamente do período de 6h do segundo ciclo, nem do período de 72h do primeiro ciclo de PDT.

Gráfico 5.4 - Porcentagem média ($\pm$ desvio-padrão) de células epiteliais positivas para a proteína RIP 1 segundo os grupos e períodos experimentais

5.5.5 Análise de todos os marcadores concomitantemente

O gráfico 5.5 exibe a curva da porcentagem média de células epiteliais positivas para cada uma das proteínas analisadas. Considerando-se os controles, a maior frequência de células positivas foi para o PCNA, com diferenças significativas em relação aos demais marcadores tanto para o controle negativo (teste de Kruskal-Wallis, $p=0,0002$), quanto para o controle positivo (teste de Kruskal-Wallis, $p=0,0019$). No grupo PDT do primeiro ciclo, a porcentagem de positividade para caspase 3 foi estatisticamente maior do que todas as demais proteínas no período de 6h (PCNA – $p=0,0294$; beclin 1 – $p=0,0034$; RIP 1 – $p=0,0285$); no período de 24h, houve predomínio significativo da caspase 3 em comparação a beclin 1 ($p=0,0106$) e RIP 1 ($p=0,0285$), mas não em relação a PCNA. No período de 48h, não houve diferenças entre as proteínas; já no período de 72h, o PCNA foi significativamente mais expresso em relação a beclin 1 ($p=0,0472$) e RIP 1 ($p=0,0090$), mas não em relação a caspase 3 ($p=0,6015$). No segundo ciclo de PDT, em 6h e 72h houve aumento substancial da porcentagem de células positivas para PCNA, o qual foi significativo em relação a todas as demais proteínas ($p=0,0090$ para todos os cruzamentos); nesse período ainda, a porcentagem de caspase 3 foi significativamente maior do que a de beclin 1 ($p=0,0107$ para 6h e 72h) e RIP 1 ($p=0,0090$ para 6h e 72h), e entre essas duas não houve diferenças. Destaca-se em 72h a queda de expressão de beclin 1 e RIP 1 em relação a 6h, o que não foi observado para caspase 3 e PCNA.

GRÁFICO ERRADO (BECLIN)

Gráfico 5.5 - Porcentagem média ($\pm$ desvio-padrão) de células epiteliais positivas para PCNA caspase 3, beclin 1 e RIP 1 nos diferentes grupos e períodos experimentais

6 DISCUSSÃO

A proposta deste trabalho foi analisar, em termos anatomocronológicos, a expressão imuno-histoquímica de PCNA, caspase 3, beclin 1 e RIP 1 em LPMO tratadas com PDT mediada pelo 5-ALA. O intuito dessa análise foi depreender como se expressam esses marcadores no decorrer do tempo após a PDT, para sugerir o período-chave em que poderia haver uma possível recuperação do epitélio. Esta foi entendida como representada pela alta expressão de PCNA e pela baixa expressão dos demais marcadores. A importância dessa análise, além de incluir o fato de potencialmente contribuir para o entendimento do mecanismo da PDT mediada pelo 5-ALA, reside também na possibilidade de se poder modificar ou comprovar o intervalo entre as sessões de PDT, as quais já são executadas na clínica de forma empírica.

O protocolo de PDT adotado provocou modificações clínicas que sugerem o início de um processo de remissão das lesões induzidas, a qual foi visível clinicamente com mais evidência no segundo ciclo. Houve redução significativa da lesão da ordem de 50% na segunda sessão de PDT, o que indica a necessidade de mais de uma sessão para depreender a eficácia terapêutica desse protocolo.

O único sinal clínico evidente da ação da primeira sessão de PDT sobre as lesões foi o aumento de volume da língua em 6h e 24h. Provavelmente este foi derivado do intenso edema intersticial oriundo da vasodilatação provocada pela terapia. Contudo, nessa sessão inicial, principalmente 6h após a irradiação, já se observaram alterações morfológicas celulares no epitélio que modificaram o quadro de atipia induzido pelo 4-NQO. Hiperplasia da camada basal, hiperchromatismo nuclear e vacuolização celular podem indicar alta proliferação acompanhada por degeneração celular. Vale dizer que não se entende ter havido aumento do grau de atipia celular, nem maior indício de malignização, muito embora não tenham sido realizados testes com outros marcadores mais indicados para se verificar malignização em lesões displásicas.

A resultante dessas transformações instituídas pela PDT no presente trabalho parece tender a atrofia epitelial, atestada pela significativa redução da espessura epitelial na PDT 6h e nos períodos do segundo ciclo de PDT. Contudo, a

recuperação dessa espessura parece ser ainda bem eficiente, já que os demais períodos do primeiro ciclo (de 24h a 72h) exibem epitélios com dimensão similar e, por vezes, maior do que o controle positivo. De fato, a expressão ainda alta de PCNA pode contribuir para suportar essa afirmação, a qual será melhor discutida adiante. Assim, com base nesses resultados morfológicos, podemos inferir que o protocolo de PDT adotado acarretou mudanças na cinética de manutenção da espessura epitelial, bem como foi eficiente para iniciar a redução das lesões a partir do segundo ciclo, mas não gerou o quadro de necrose e de intensa atrofia epitelial descrito em estudos clínicos de carcinomas epidermóides bucais tratados com PDT. Podemos considerar então que a fluência adotada ou o tempo de irradiação podem ter sido baixos, acarretando efeito subletal ou somente de apoptose nas células. Por outro lado, há indícios de que exista relação entre o aspecto clínico da lesão e a eficácia do PDT mediada pelo 5-ALA. Estudo clínico com hiperplasia verrucosa oral demonstrou que são necessárias 3 a 4 sessões de PDT (LED-635-nm, 100 mW/cm² 100 J/cm²) para a remissão total de lesões de até 1,5cm, e que lesões ortoqueratinizadas podem demandar mais sessões (112). Provavelmente as lesões induzidas no presente trabalho, com extensão entre 8 e 14mm, também seguem a regra descrita para a hiperplasia verrucosa oral, aliada ao fato de também estarem hiperqueratinizadas.

Pela análise descritiva da imuno-histoquímica, houve alterações no padrão de marcação dos antígenos estudados nos tempos experimentais de PDT em relação aos controles negativos e positivos. Em geral houve aumento da intensidade de expressão e extensão para as camadas suprabasal e espinhosa após a PDT, principalmente no tempo de 6h. Esse aspecto foi parcialmente confirmado pelas diferenças significantes observadas na contagem de células positivas, a seguir comentadas.

O aumento significativo de células positivas para PCNA após 6h da PDT, e mais ainda em 6h do segundo ciclo, pode ser interpretado não tanto como um aumento da proliferação celular, mas sim como a instalação de um processo de manutenção da estabilidade genômica (36) diante da agressão intensa provocada pelas ROS em excesso. Como o PCNA é encontrado em grande quantidade na fase G1 tardia e na fase S, a divisão celular não é confirmada por esse marcador, mas pode-se afirmar que houve acionamento de correções proteicas e do DNA

necessárias à proliferação. Provavelmente esta deve estar ocorrendo nas células viáveis, haja vista a equiparação da espessura do epitélio ao controle positivo no segundo ciclo, apesar de ter havido drástica redução em 6h após a PDT do primeiro ciclo. Esse resultado concorda parcialmente com o descrito por Uehara et al. 1999 em xenotransplante de carcinoma epidermóide bucal, em que foi também detectado aumento da porcentagem de células positivas para PCNA, porém esta se deu entre 48h e 72h após a PDT. Provavelmente diferenças entre a cinética de proliferação tumoral e das lesões displásicas expliquem essas discrepâncias, bem como as diferenças de protocolo de PDT. Em outros trabalhos sobre o PCNA e a PDT em carcinoma epidermóide bucal não houve diferenças na quantidade de expressão de células positivas para PCNA entre o controle e os períodos experimentais após PDT, tanto para a PDT mediada pelo 5- ALA (113) quanto na mediada pelo Photofrin® (39). Assim, há certa concordância em assumir que as células displásicas viáveis após a PDT não perdem sua capacidade de proliferação, fato no qual podem residir as explicações das recidivas após a PDT em vários tumores.

O incremento da expressão do PCNA veio acompanhada da alta porcentagem de células positivas para caspase 3 no presente trabalho. Em 6h após a PDT, houve o pico da expressão da caspase 3, a qual exibiu redução significativa nos demais períodos, porém ainda manteve-se maior que o controle positivo. Como a caspase 3 é ativada no fim da cascata da apoptose, e pelo fato de ter sido utilizado um anticorpo que marca a caspase 3 clivada, portanto ativa, pode-se inferir que nesse período provavelmente houve alto índice de apoptose. No segundo ciclo a porcentagem de células também foi alta, mas não atingiu os níveis observados em 6h do primeiro ciclo. A tendência de aumento de caspase 3 observada no primeiro ciclo coincide com vários trabalhos na literatura utilizando diferentes técnicas de PDT e células ou tecido de carcinoma epidermóide bucal (36, 41, 54, 114).

Assim, o presente trabalho confirmou a tendência já descrita na literatura de que parece ser predominante a apoptose após a PDT em técnicas que não induzam muita necrose. Já no segundo ciclo de PDT, houve o aumento de células positivas para outros marcadores de morte celular, envolvendo tanto apoptose quanto necroptose e autofagia, descritos a seguir.

Tal qual a caspase 3, a porcentagem de células positivas para beclin 1 também foi significativamente maior após 6h da PDT, tanto no primeiro quanto no

segundo ciclo, indicando que houve acionamento de proteínas envolvidas com a autofagia, mais precisamente com a formação do fagóforo em tempo coincidente com a caspase 3. Esse resultado assemelha-se a outro descrito na literatura utilizando células em cultura de carcinoma epidermóide bucal, as quais foram tratadas com PDT mediada pelo feoforbide1(54), e em estudos com PDT mediada por 5-ALA em outros tumores(67, 68). A concomitância de ativação de apoptose e autofagia tem sido recentemente discutida na literatura (11),havendo uma tendência a se admitir que ambos os processos podem ser acionados simultaneamente, e que as proteínas relacionadas a autofagia também participam da morte celular mediada por caspases.

A porcentagem de células positivas para RIP 1 foi maior também em 6h após a PDT, tanto no primeiro quanto no segundo ciclo, indicando também um acionamento da via da necroptose pela PDT, em geral em tempos coincidentes com o aumento da expressão dos demais marcadores. Um estudo já comprovara o aumento da expressão da RIP-3 em cultura de células de glioblastoma tratadas com PDT mediada pelo 5-ALA (0,5mM ALA, 3h incubação, 2.3Jcm^{-2}), bem como um alto índice de necrose (76). Contudo, não se observa a presença de necrose nos tecidos analisados, nem mesmo em nível microscópico, o que leva a supor que provavelmente o aumento da expressão da RIP 1 tenha muito mais relação com a apoptose e a autofagia, do que propriamente com a necrose. De fato, em outro trabalho com PDT mediada pelo 5-ALA (1mM ALA, 3h incubação, $20,61\text{J/cm}^2$) em células de osteossarcoma, realizado pelo mesmo grupo de autores do estudo anterior (76), ficou comprovada a importância da RIP-3 na ativação de caspases e na formação de autofagossomos, mais até do que na instituição de necrose. Provavelmente essas diferenças entre os dois trabalhos estejam atreladas a discrepâncias de sensibilidade à PDT existente entre os dois tipos celulares (células de glioblastoma e células de osteossarcoma), bem como a variações na técnica de PDT. Assim, pode-se interpretar que a PDT mediada pelo 5-ALA acarretou, no presente estudo, significativa expressão da RIP 1 logo após sua instituição, e que essa expressão provavelmente esteja mais atrelada a apoptose e autofagia do que propriamente à necrose.

Na análise concomitante dos marcadores, observa-se que em 6h após a PDT houve predomínio significativo de células expressando caspase 3 em relação

às demais proteínas, o que se permite inferir que nesse tempo houve predomínio da apoptose sobre possíveis mecanismos de reparo do DNA e de proliferação celular. Vale dizer que o intervalo de 6h após a irradiação estabelecido neste trabalho foi arbitrário, tendo-se como base outro estudo que demonstrou não haver expressão de caspase 3 e de PCNA nas primeiras três horas após a irradiação (60).

Por outro lado, pode-se dizer que de 24h a 72h esse efeito de apoptose é atenuado, e que prevalecem agora correções do DNA com vista a progressão no ciclo celular, já que há redução expressiva de todos os marcadores relacionados a morte e significativamente maior quantidade de células positivas para PCNA. Já no segundo ciclo de PDT, apesar de persistir maior expressão da caspase 3 em relação aos demais marcadores de morte celular, parece haver uma tendência de acionamento de correções genômicas mais exacerbado do que o primeiro ciclo, inclusive sobrepujando as taxas de apoptose e também as taxas de PCNA observadas no controle positivo. Nesse sentido, pode-se dizer que as células expressam proteínas de proteção e correção genômica de forma diferente da observada no primeiro ciclo, fato que pode estar atrelado a possíveis mecanismos de resistência à PDT. Mais estudos são necessários para esclarecer essa tendência de maior expressão de PCNA em um segundo ciclo de PDT.

Dentre os períodos analisados, o período mais significativo de retorno à renovação epitelial parece ser o de 72h após a PDT. Não houve diferença entre os índices de caspase 3 e PCNA nesse período, mas houve entre esse marcador e RIP 1 e beclin 1. Vale dizer que a expressão de PCNA ainda se manteve abaixo da do controle positivo, o que pode indicar que a PDT, apesar do dano rápido provocado pelo oxigênio singlete, ativa outras cascatas exercendo ainda efeito tardio sobre as células. Contudo, esse efeito é bem mais atenuado do que no início do processo. Assim pode-se mencionar que não se recomenda estender mais do que 72h a instituição de uma segunda sessão de PDT. Pela queda na expressão de todos os marcadores em 24h após a PDT, podendo-se também sugerir que o período ideal para essa segunda dose seria 24h após a primeira, somando-se os efeitos pró-apoptóticos instituídos em 6h nesse período de depleção das proteínas. Alguns trabalhos, ainda que com protocolos distintos, já têm seguido esse regime de 24h de intervalo entre as sessões de PDT para carcinoma epidermóide bucal, com porfirina sistêmica (39,43) e para hiperplasia verrucosa oral, com ALA (83, 86), o que parece

surtir efeito positivo sobre a remissão das lesões.

Em suma, o presente trabalho demonstrou que a PDT mediada pelo 5-ALA provocou aumento da expressão de caspase 3, beclin 1 e RIP 1 em LPMO nas primeiras 6h após a terapia. Nesse modelo de PDT, essas proteínas parecem interagir em mecanismos de morte por apoptose e por autofagia, mas não por necrose. Para a condição clínica criada no presente trabalho, sugere-se como intervalo ideal para a instituição da próxima sessão o período de 24h, e como intervalo crítico indicativo de intensa recuperação celular, o período de 72h.

7 CONCLUSÕES

1. A PDT mediada pelo 5-ALA, aplicado topicamente em LPMO induzidas, foi capaz de gerar redução significativa das lesões (da ordem de 50%) após uma segunda sessão da terapia.
2. O aumento da expressão de beclin 1 e RIP 1 acompanhou o de caspase 3, indicando haver predomínio de apoptose e de autofagia, mas não de necrose, nos processos de morte celular induzidos pela PDT.
3. O aumento do percentual de células positivas para caspase 3, beclin1, RIP 1 e PCNA ocorreu principalmente 6h após PDT, com diminuição significativa dessa positividade que ocorreu em 24h após a PDT.
4. Em função dos achados da cinética celular nas LPMO após a terapia, considera-se o intervalo de 24h entre as sessões de PDT como o mais adequado, sem que se estenda além de 72h.

REFERÊNCIAS¹

1. Buchholz J, Kaser-Hotz B. Combined photodynamic therapy and hyperthermia with water-filtered infrared light for the treatment of cutaneous squamous cell carcinoma in 15 cats: A pilot study. *Kleintierpraxis*. 2010;55(5):248-54.

2. Dougherty TJ, Marcus SL. Photodynamic therapy. *Eur J Cancer*. 1992;28A(10):1734-42. Review.

3. Biel MA. Photodynamic therapy treatment of early oral and laryngeal cancers. *Photochem Photobiol*. 2007;83(5):1063-8.

- Biel MA. Photodynamic therapy treatment of early oral and laryngeal cancers. *Photochem Photobiol*. 2007 Sep-Oct;83(5):1063-8. Review.

4. Kessel D. Adventures in photodynamic therapy: 1976-2008. *J Porphyr Phthalocyanines*. 2008 Jul 24;12(8):877-880.

5. Machado AED. Photodynamic therapy: Principles, potential of application and perspectives. *Quimica Nova*. 2000;23(2):237-43.

6. Krosi G, Korbelik M, Krosi J, Dougherty GJ. Potentiation of photodynamic therapy-elicited antitumor response by localized treatment with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Cancer Res*. 1996 Jul 15;56(14):3281-6.

7. Gao F, Bai Y, Ma SR, Liu F, Li ZS. Systematic review: photodynamic therapy for unresectable cholangiocarcinoma. *J Hepatobiliary Pancreat Sci*. 2010 Mar;17(2):125-31.

8. Bourré L, Rousset N, Thibaut S, Eléouet S, Lajat Y, Patrice T. PDT effects of m-THPC and ALA, phototoxicity and apoptosis. *Apoptosis*. 2002 Jun;7(3):221-30.

9. Thibaut S, Bourré L, Hernot D, Rousset N, Lajat Y, Patrice T. Effects of BAPTA-AM, Forskolin, DSF and Z.VAD.fmk on PDT-induced apoptosis and m-THPC phototoxicity on B16 cells. *Apoptosis*. 2002 Apr;7(2):99-106.

¹ De acordo com Estilo Vancouver.

10. Mitton D, Ackroyd R. A brief overview of photodynamic therapy in Europe. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2008 Jun;5(2):103-11.
11. Buytaert E, Callewaert G, Vandenheede JR, Agostinis P. Deficiency in apoptotic effectors Bax and Bak reveals an autophagic cell death pathway initiated by photodamage to the endoplasmic reticulum. *Autophagy*. 2006 Jul-Sep;2(3):238-40.
12. Buytaert E, Dewaele M, Agostinis P. Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy. *Biochim Biophys Acta*. 2007 Sep;1776(1):86-107.
13. Bhowmick R, Girotti AW. Signaling events in apoptotic photokilling of 5-aminolevulinic acid-treated tumor cells: inhibitory effects of nitric oxide. *Free Radic Biol Med*. 2009 Sep 15;47(6):731-40.
14. Lodi G, Sardella A, Bez C, Demarosi F, Carrassi A. Interventions for treating oral leukoplakia. *Cochrane Database Syst Rev*. 2006 Oct 18;(4):CD001829. Review.
15. Sharma SK, Mroz P, Dai T, Huang YY, St Denis TG, Hamblin MR. Photodynamic Therapy for Cancer and for Infections: What Is the Difference? *Isr J Chem*. 2012 Sep;52(8-9):691-705.
16. Agostinis P, Berg K, Cengel KA, Foster TH, Girotti AW, Gollnick SO, Hahn SM, Hamblin MR, Juzeniene A, Kessel D, Korbelik M, Moan J, Mroz P, Nowis D, Piette J, Wilson BC, Golab J. Photodynamic therapy of cancer: an update. *CA Cancer J Clin*. 2011 Jul-Aug;61(4):250-81.
17. Tamietti BF, Machado AH, Maftoun-Costa M, Da Silva NS, Tedesco AC, Pacheco-Soares C. Analysis of mitochondrial activity related to cell death after PDT with AIPCS(4). *Photomed Laser Surg*. 2007 Jun;25(3):175-9.
18. Castano AP, Mroz P, Hamblin MR. Photodynamic therapy and anti-tumour immunity. *Nat Rev Cancer*. 2006 Jul;6(7):535-45. Review.
19. Nowis D, Makowski M, Stokłosa T, Legat M, Issat T, Gołab J. Direct tumor damage mechanisms of photodynamic therapy. *Acta Biochim Pol*. 2005;52(2):339-52.

20. Garg AD, Nowis D, Gołab J, Agostinis P. Photodynamic therapy: illuminating the road from cell death towards anti-tumour immunity. *Apoptosis*. 2010 Sep;15(9):1050-71.
21. Nowis D, Legat M, Grzela T, Niderla J, Wilczek E, Wilczynski GM, Głodkowska E, Mrówka P, Issat T, Dulak J, Józkowicz A, Waś H, Adamek M, Wrzosek A, Nazarewski S, Makowski M, Stokłosa T, Jakóbisiak M, Gołab J. Heme oxygenase-1 protects tumor cells against photodynamic therapy-mediated cytotoxicity. *Oncogene*. 2006 Jun 8;25(24):3365-74.
22. Allison RR. PDT frontiers. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2009 Jun;6(2):135-6.
23. Kessel D, Oleinick NL. Photodynamic therapy and cell death pathways. *Methods Mol Biol*. 2010;635:35-46.
24. Maftoum-Costa M, Naves KT, Oliveira AL, Tedesco AC, da Silva NS, Pacheco-Soares C. Mitochondria, endoplasmic reticulum and actin filament behavior after PDT with chloroaluminum phthalocyanine liposomal in HeLa cells. *Cell Biol Int*. 2008 Aug;32(8):1024-8.
25. Detty MR, Gibson SL, Wagner SJ. Current clinical and preclinical photosensitizers for use in photodynamic therapy. *J Med Chem*. 2004 Jul 29;47(16):3897-915. Review.
26. Firczuk M, Nowis D, Gołab J. PDT-induced inflammatory and host responses. *Photochem Photobiol Sci*. 2011 May;10(5):653-63.
27. Kvaal SI, Warloe T. Photodynamic treatment of oral lesions. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*. 2007;26(2):127-33. Review.
28. Dougherty TJ, Potter WR. Of what value is a highly absorbing photosensitizer in PDT? *J Photochem Photobiol B*. 1991 Jan;8(2):223-5. Review.
29. Torezan L, Niwa AB, Neto CF. [Photodynamic therapy in dermatology: basic principles]. *An Bras Dermatol*. 2009 Sep-Oct;84(5):445-59.
30. Luksiene Z, Eggen I, Moan J, Nesland JM, Peng Q. Evaluation of protoporphyrin IX production, phototoxicity and cell death pathway induced by hexylester of 5-aminolevulinic acid in Reh and HPB-ALL cells. *Cancer Lett*. 2001 Aug 10;169(1):33-9.

31. Stell AJ, Dobson JM, Langmack K. Photodynamic therapy of feline superficial squamous cell carcinoma using topical 5-aminolaevulinic acid. *J Small Anim Pract.* 2001 Apr;42(4):164-9.
32. Huang YY, Vecchio D, Avci P, Yin R, Garcia-Diaz M, Hamblin MR. Melanoma resistance to photodynamic therapy: new insights. *Biol Chem.* 2013 Feb 1;394(2):239-50.
33. Reeves KJ, Reed MW, Brown NJ. The role of nitric oxide in the treatment of tumours with aminolaevulinic acid-induced photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B.* 2010 Dec 2;101(3):224-32.
34. Almeida RD, Manadas BJ, Carvalho AP, Duarte CB. Intracellular signaling mechanisms in photodynamic therapy. *Biochim Biophys Acta.* 2004 Sep 20;1704(2):59-86. Review.
35. Morgan J, Oseroff AR. Mitochondria-based photodynamic anti-cancer therapy. *Adv Drug Deliv Rev.* 2001 Jul 2;49(1-2):71-86. Review.
36. Chen J, Bozza W, Zhuang Z. Ubiquitination of PCNA and its essential role in eukaryotic translesion synthesis. *Cell Biochem Biophys.* 2011 Jun;60(1-2):47-60.
37. Stoimenov I, Helleday T. PCNA on the crossroad of cancer. *Biochem Soc Trans.* 2009 Jun;37(Pt 3):605-13.
38. Naryzhny SN. Proliferating cell nuclear antigen: a proteomics view. *Cell Mol Life Sci.* 2008 Nov;65(23):3789-808.
39. Togashi H, Uehara M, Ikeda H, Inokuchi T. Fractionated photodynamic therapy for a human oral squamous cell carcinoma xenograft. *Oral Oncol.* 2006 May;42(5):526-32.
40. Zhang X, Jiang F, Zhang ZG, Kalkanis SN, Hong X, deCarvalho AC, Chen J, Yang H, Robin AM, Chopp M. Low-dose photodynamic therapy increases endothelial cell proliferation and VEGF expression in nude mice brain. *Lasers Med Sci.* 2005 Sep;20(2):74-9.
41. Uehara M, Inokuchi T, Sano K, ZuoLin W. Expression of vascular endothelial growth factor in mouse tumours subjected to photodynamic therapy. *Eur J Cancer.* 2001 Nov;37(16):2111-5.

42. Uehara M, Ikeda H, Nonaka M, Sumita Y, Nanashima A, Nonaka T, Asahina I. Predictive factor for photodynamic therapy effects on oral squamous cell carcinoma and oral epithelial dysplasia. *Arch Oral Biol*. 2011 Nov;56(11):1366-72.
43. Uehara M, Inokuchi T, Sano K, Sekine J, Ikeda H. Cell kinetics of mouse tumour subjected to photodynamic therapy--evaluation by proliferating cell nuclear antigen immunohistochemistry. *Oral Oncol*. 1999 Jan;35(1):93-7.
44. Yu CH, Chen HM, Lin HP, Chiang CP. Expression of Bak and Bak/Mcl-1 ratio can predict photodynamic therapy outcome for oral verrucous hyperplasia and leukoplakia. *J Oral Pathol Med*. 2012 Sep 14.
45. Martin SJ. Getting the measure of apoptosis. *Methods*. 2008 Mar;44(3):197-9.
46. Moor AC. Signaling pathways in cell death and survival after photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B*. 2000 Aug;57(1):1-13. Review.
47. Creagh EM, Conroy H, Martin SJ. Caspase-activation pathways in apoptosis and immunity. *Immunol Rev*. 2003 Jun;193:10-21. Review.
48. Logue SE, Martin SJ. Caspase activation cascades in apoptosis. *Biochem Soc Trans*. 2008 Feb;36(Pt 1):1-9.
49. Morgan J, Potter WR, Oseroff AR. Comparison of photodynamic targets in a carcinoma cell line and its mitochondrial DNA-deficient derivative. *Photochem Photobiol*. 2000 Jun;71(6):747-57.
50. Galluzzi L, Maiuri MC, Vitale I, Zischka H, Castedo M, Zitvogel L, Kroemer G. Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell Death Differ*. 2007 Jul;14(7):1237-43.
51. Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, Dawson TM, Dawson VL, El-Deiry WS, Fulda S, Gottlieb E, Green DR, Hengartner MO, Kepp O, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Lu X, Madeo F, Malorni W, Mehlen P, Nuñez G, Peter ME, Piacentini M, Rubinsztein DC, Shi Y, Simon HU, Vandenabeele P, White E, Yuan J, Zhivotovsky B, Melino G, Kroemer G. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ*. 2012 Jan;19(1):107-20.

52. Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, El-Deiry WS, Golstein P, Green DR, Hengartner M, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Malorni W, Nuñez G, Peter ME, Tschopp J, Yuan J, Piacentini M, Zhivotovsky B, Melino G; Nomenclature Committee on Cell Death 2009. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ.* 2009 Jan;16(1):3-11.

53. Agostinis P, Buytaert E, Breyssens H, Hendrickx N. Regulatory pathways in photodynamic therapy induced apoptosis. *Photochem Photobiol Sci.* 2004 Aug;3(8):721-9.

54. Ahn MY, Yoon HE, Kwon SM, Lee J, Min SK, Kim YC, Ahn SG, Yoon JH. Synthesized Pheophorbide a-mediated photodynamic therapy induced apoptosis and autophagy in human oral squamous carcinoma cells. *J Oral Pathol Med.* 2013 Jan;42(1):17-25.

55. Dube A, Sharma S, Gupta PK. Evaluation of chlorin p6 for photodynamic treatment of squamous cell carcinoma in the hamster cheek pouch model. *Oral Oncol.* 2006 Jan;42(1):77-82.

56. Inoue K, Karashima T, Kamada M, Shuin T, Kurabayashi A, Furihata M, Fujita H, Utsumi K, Sasaki J. Regulation of 5-aminolevulinic acid-mediated protoporphyrin IX accumulation in human urothelial carcinomas. *Pathobiology.* 2009;76(6):303-14.

57. Furre IE, Møller MT, Shahzidi S, Nesland JM, Peng Q. Involvement of both caspase-dependent and -independent pathways in apoptotic induction by hexaminolevulinate-mediated photodynamic therapy in human lymphoma cells. *Apoptosis.* 2006 Nov;11(11):2031-42.

58. Oleinick NL, Morris RL, Belichenko I. The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how. *Photochem Photobiol Sci.* 2002 Jan;1(1):1-21. Review.

59. Chen HM, Liu CM, Yang H, Chou HY, Chiang CP, Kuo MY. 5-aminolevulinic acid induce apoptosis via NF- κ B/JNK pathway in human oral cancer Ca9-22 cells. *J Oral Pathol Med.* 2011 Jul;40(6):483-9.

60. Nakaseko H, Kobayashi M, Akita Y, Tamada Y, Matsumoto Y. Histological changes and involvement of apoptosis after photodynamic therapy for actinic keratoses. *Br J Dermatol.* 2003 Jan;148(1):122-7.

61. Ganley IG, Lam du H, Wang J, Ding X, Chen S, Jiang X. ULK1.ATG13.FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy. *J Biol Chem.* 2009 May 1;284(18):12297-305.
62. Altman BJ, Rathmell JC. Metabolic stress in autophagy and cell death pathways. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012 Sep 1;4(9):a008763.
63. Elgendy M, Sheridan C, Brumatti G, Martin SJ. Oncogenic Ras-induced expression of Noxa and Beclin 1 promotes autophagic cell death and limits clonogenic survival. *Mol Cell.* 2011 Apr 8;42(1):23-35..
64. Salminen A, Kaarniranta K, Kauppinen A. Beclin 1 interactome controls the crosstalk between apoptosis, autophagy and inflammasome activation: Impact on the aging process. *Ageing Res Rev.* 2012 Dec 7;12(2):520-534.
65. Kapoor V, Paliwal D, Baskar Singh S, Mohanti BK, Das SN. Deregulation of Beclin 1 in patients with tobacco-related oral squamous cell carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012 Jun 15;422(4):764-9.
66. Liang LZ, Ma B, Liang YJ, Liu HC, Zheng GS, Zhang TH, Chu M, Xu PP, Su YX, Liao GQ. High expression of the autophagy gene Beclin 1 is associated with favorable prognosis for salivary gland adenoid cystic carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 2012 Sep;41(8):621-9.
67. Arum CJ, Gederaas OA, Larsen EL, Randeberg LL, Hjelde A, Krokan HE, Svaasand LO, Chen D, Zhao CM. Tissue responses to hexyl 5-aminolevulinate-induced photodynamic treatment in syngeneic orthotopic rat bladder cancer model: possible pathways of action. *J Biomed Opt.* 2011 Feb;16(2):028001.
68. Ji HT, Chien LT, Lin YH, Chien HF, Chen CT. 5-ALA mediated photodynamic therapy induces autophagic cell death via AMP-activated protein kinase. *Mol Cancer.* 2010 Apr 28;9:91..
69. Chaabane W, User SD, El-Gazzah M, Jaksik R, Sajjadi E, Rzeszowska-Wolny J, Los MJ. Autophagy, apoptosis, mitoptosis and necrosis: interdependence between those pathways and effects on cancer. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2013 Feb;61(1):43-58.
70. Skulachev VP. Bioenergetic aspects of apoptosis, necrosis and mitoptosis. *Apoptosis.* 2006 Apr;11(4):473-85. Review.

71. Vandenabeele P, Declercq W, Van Herreweghe F, Vanden Berghe T. The role of the kinases RIP1 and RIP3 in TNF-induced necrosis. *Sci Signal*. 2010 Mar 30;3(115):re4.
72. Degterev A, Huang Z, Boyce M, Li Y, Jagtap P, Mizushima N, Cuny GD, Mitchison TJ, Moskowitz MA, Yuan J. Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nat Chem Biol*. 2005 Jul;1(2):112-9.
73. Festjens N, Vanden Berghe T, Cornelis S, Vandenabeele P. RIP1, a kinase on the crossroads of a cell's decision to live or die. *Cell Death Differ*. 2007 Mar;14(3):400-10. Review.
74. Chavez-Valdez R, Martin LJ, Northington FJ. Programmed Necrosis: A Prominent Mechanism of Cell Death following Neonatal Brain Injury. *Neurol Res Int*. 2012;2012:257563.
75. Wu W, Liu P, Li J. Necroptosis: an emerging form of programmed cell death. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2012 Jun;82(3):249-58.
76. Coupienne I, Fettweis G, Piette J. RIP3 expression induces a death profile change in U2OS osteosarcoma cells after 5-ALA-PDT. *Lasers Surg Med*. 2011 Sep;43(7):557-64.
77. Coupienne I, Fettweis G, Rubio N, Agostinis P, Piette J. 5-ALA-PDT induces RIP3-dependent necrosis in glioblastoma. *Photochem Photobiol Sci*. 2011 Dec;10(12):1868-78.
78. Warnakulasuriya S. Causes of oral cancer--an appraisal of controversies. *Br Dent J*. 2009 Nov 28;207(10):471-5.
79. van der Waal I, Schepman KP, van der Meij EH. A modified classification and staging system for oral leukoplakia. *Oral Oncol*. 2000 May;36(3):264-6.
80. Lodi G, Porter S. Management of potentially malignant disorders: evidence and critique. *J Oral Pathol Med*. 2008 Feb;37(2):63-9.
81. Jerjes W, Hamdoon Z, Hopper C. Photodynamic therapy in the management of potentially malignant and malignant oral disorders. *Head Neck Oncol*. 2012 Apr 30;4:16. Review.

82. Quon H, Grossman CE, Finlay JC, Zhu TC, Clemmens CS, Malloy KM, Busch TM. Photodynamic therapy in the management of pre-malignant head and neck mucosal dysplasia and microinvasive carcinoma. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2011 Jun;8(2):75-85.
83. Chen HM, Chen CT, Yang H, Lee MI, Kuo MY, Kuo YS, Wang YP, Tsai T, Chiang CP. Successful treatment of an extensive verrucous carcinoma with topical 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy. *J Oral Pathol Med*. 2005 Apr;34(4):253-6.
84. Chen HM, Yu CH, Tu PC, Yeh CY, Tsai T, Chiang CP. Successful treatment of oral verrucous hyperplasia and oral leukoplakia with topical 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy. *Lasers Surg Med*. 2005 Aug;37(2):114-22. 22.
85. Sieroń A, Adamek M, Kawczyk-Krupka A, Mazur S, Ilewicz L. Photodynamic therapy (PDT) using topically applied delta-aminolevulinic acid (ALA) for the treatment of oral leukoplakia. *J Oral Pathol Med*. 2003 Jul;32(6):330-6.
86. Chen HM, Chen CT, Yang H, Kuo MY, Kuo YS, Lan WH, Wang YP, Tsai T, Chiang CP. Successful treatment of oral verrucous hyperplasia with topical 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy. *Oral Oncol*. 2004 Jul;40(6):630-7.
87. Lin HP, Chen HM, Yu CH, Yang H, Wang YP, Chiang CP. Topical photodynamic therapy is very effective for oral verrucous hyperplasia and oral erythroleukoplakia. *J Oral Pathol Med*. 2010 Sep;39(8):624-30.
88. Jerjes W, Upile T, Hamdoon Z, Mosse CA, Akram S, Hopper C. Photodynamic therapy outcome for oral dysplasia. *Lasers Surg Med*. 2011 Mar;43(3):192-9.
89. Jerjes W, Upile T, Hamdoon Z, Alexander Mosse C, Morcos M, Hopper C. Photodynamic therapy outcome for T1/T2 N0 oral squamous cell carcinoma. *Lasers Surg Med*. 2011 Aug;43(6):463-9.
90. Mognetti B, Di Carlo F, Berta GN. Animal models in oral cancer research. *Oral Oncol*. 2006 May;42(5):448-60.
91. mith LP, Thomas GR. Animal models for the study of squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive tract: a historical perspective with review of their utility and limitations. Part A. Chemically-induced de novo cancer, syngeneic animal models of HNSCC, animal models of transplanted xenogeneic human tumors. *Int J Cancer*. 2006 May 1;118(9):2111-22. Review.

92. Thomas GR, Smith LP. Animal models for the study of squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive tract: a historical perspective with review of their utility and limitations part B. Transgenic mouse models. *Int J Cancer*. 2006 May 15;118(10):2379-80. Review.
93. Kanojia D, Vaidya MM. 4-nitroquinoline-1-oxide induced experimental oral carcinogenesis. *Oral Oncol*. 2006 Aug;42(7):655-67.
94. Vairaktaris E, Papakosta V, Derka S, Vassiliou S, Nkenke E, Spyridonidou S, Vylliotis A, Lazaris A, Kokkori A, Moulavassili P, Loukeri S, Perrea D, Donta I, Yapijakis C, Patsouris E. H-ras and c-fos exhibit similar expression patterns during most stages of oral oncogenesis. *In Vivo*. 2008 Sep-Oct;22(5):621-8.
95. Schoop RA, Noteborn MH, Baatenburg de Jong RJ. A mouse model for oral squamous cell carcinoma. *J Mol Histol*. 2009 Jun;40(3):177-81.
96. Nauta JM, Roodenburg JL, Nikkels PG, Witjes MJ, Vermey A. Comparison of epithelial dysplasia--the 4NQO rat palate model and human oral mucosa. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 1995 Feb;24(1 Pt 1):53-8.
97. Hawkins BL, Heniford BW, Ackermann DM, Leonberger M, Martinez SA, Hendler FJ. 4NQO carcinogenesis: a mouse model of oral cavity squamous cell carcinoma. *Head Neck*. 1994 Sep-Oct;16(5):424-32.
98. Suwaki N, Child ES, Elphick LM, Mann DJ. Dose-dependent changes in cyclin D1 in response to 4-nitroquinoline 1-oxide-induced DNA damage. *Arch Biochem Biophys*. 2010 May;497(1-2):55-61.
99. Srinivasan P, Sabitha KE, Shyamaladevi CS. Modulatory efficacy of green tea polyphenols on glycoconjugates and immunological markers in 4-Nitroquinoline 1-oxide-induced oral carcinogenesis-A therapeutic approach. *Chem Biol Interact*. 2006 Aug 25;162(2):149-56.
100. Hong Y, Li C, Xia J, Rhodus NL, Cheng B. p16(CDKN2A) expression during rat tongue carcinogenesis induced by 4-nitroquinoline-1-oxide. *Oral Oncol*. 2009 Jul;45(7):640-4.
101. Fracalossi AC, Comparini L, Funabashi K, Godoy C, Iwamura ES, Nascimento FD, Nader HB, Oshima CT, Ribeiro DA. Ras gene mutation is not related to tumour invasion during rat tongue carcinogenesis induced by 4-nitroquinoline 1-oxide. *J Oral Pathol Med*. 2011 Apr;40(4):325-33.

102. Tang XH, Su D, Albert M, Scognamiglio T, Gudas LJ. Overexpression of lecithin:retinol acyltransferase in the epithelial basal layer makes mice more sensitive to oral cavity carcinogenesis induced by a carcinogen. *Cancer Biol Ther.* 2009 Jul;8(13):1212-3.
103. Chang NW, Pei RJ, Tseng HC, Yeh KT, Chan HC, Lee MR, Lin C, Hsieh WT, Kao MC, Tsai MH, Lin CF. Co-treating with arecoline and 4-nitroquinoline 1-oxide to establish a mouse model mimicking oral tumorigenesis. *Chem Biol Interact.* 2010 Jan 5;183(1):231-7.
104. Gannot G, Buchner A, Keisari Y. Interaction between the immune system and tongue squamous cell carcinoma induced by 4-nitroquinoline N-oxide in mice. *Oral Oncol.* 2004 Mar;40(3):287-97.
105. Sioga A, Economou L, Kaklamanos EG, Antoniadis V, Keramidas G, Manthos A, Antoniadis K. Ultrastructural changes of the palatal mucosa following application of 4-nitroquinoline-1-oxide (4NQO) in rats subjected to major salivary gland excision. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006 Apr;101(4):487-98.
106. Emilio C. Comparação da eficácia do ácido aminolevulínico com a de seu metil éster utilizando-se a terapia fotodinâmica no tratamento de carcinoma espinocelular felino. [tese] São Paulo: Universidade de São Paulo, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, 2008.
107. Szeimies RM, Sassy T, Landthaler M. Penetration potency of topical applied delta-aminolevulinic acid for photodynamic therapy of basal cell carcinoma. *Photochem Photobiol.* 1994 Jan;59(1):73-6.
108. Mallia RJ, Subhash N, Sebastian P, Kumar R, Thomas SS, Mathews A, Madhavan J. In vivo temporal evolution of ALA-induced normalized fluorescence at different anatomical locations of oral cavity: application to improve cancer diagnostic contrast and potential. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2010 Sep;7(3):162-75.
109. Chen X, Zhao P, Chen F, Li L, Luo R. Effect and mechanism of 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy in esophageal cancer. *Lasers Med Sci.* 2011 Jan;26(1):69-78.
110. Zsebik B, Symonowicz K, Saleh Y, Ziolkowski P, Bronowicz A, Vereb G. Photodynamic therapy combined with a cysteine proteinase inhibitor synergistically decrease VEGF production and promote tumour necrosis in a rat mammary carcinoma. *Cell Prolif.* 2007 Feb;40(1):38-49.

111. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods*. 2012 Jul;9(7):671-5.
112. Yu CH, Chen HM, Hung HY, Cheng SJ, Tsai T, Chiang CP. Photodynamic therapy outcome for oral verrucous hyperplasia depends on the clinical appearance, size, color, epithelial dysplasia, and surface keratin thickness of the lesion. *Oral Oncol*. 2008 Jun;44(6):595-600.
113. Xie Y, Wei ZB, Zhang Z, Wen W, Huang GW. Effect of 5-ALA-PDT on VEGF and PCNA expression in human NPC-bearing nude mice. *Oncol Rep*. 2009 Dec;22(6):1365-71.
114. Dube A, Sharma S, Gupta PK. Tumor regression induced by photodynamic treatment with chlorin p(6) in hamster cheek pouch model of oral carcinogenesis: Dependence of mode of tumor cell death on the applied drug dose. *Oral Oncol*. 2011 Jun;47(6):467-71.

APÊNDICE A – Dados da indução experimental das LPMO feita com 4-NQO

Previamente a execução dos grupos experimentais com PDT, foi feita análise semanal das alterações morfológicas provocadas pelo 4-NQO na mucosa lingual de vinte e cinco animais. Para caracterizar o quadro de atipia, foi utilizada gradação de 0 – ausente; 1 – discreta (1 a 25% do epitélio exibindo a alteração); 2 – moderada (26% a 50% do epitélio exibindo a alteração); 3 – intensa (mais de 50% do epitélio exibindo a alteração). A gradação foi realizada por dois examinadores calibrados, de forma cega. Não foi adotada nenhuma classificação previamente estabelecida para gradação de displasia em LPMO (por exemplo, a da OMS), por não se conseguir empregar todos os critérios necessários, principalmente no que concerne a estratificação epitelial em terços. A Tabela A.1 apresenta esses dados.

Tabela A.1 – Mediana (valor mínimo e máximo) dos valores atribuídos para a gradação das alterações histológicas presentes nas lesões induzidas com 4-NQO

ALTERAÇÃO HISTOLÓGICA	SEMANAS					VALOR DE P
	4	5	6	15	16	
Hiperqueratose	0 (0-1)*	3 (3-3)	3 (3-3)	2 (2-3)	3 (3-3)	0.0163
Hiperplasia da camada basal	1 (1-1)*	2 (2-2)	2 (2-2)	3 (2-3)	3 (2-3)	0.0180
Atrofia epitelial	0 (0-0)*	2 (1-3)	3 (2-3)	2 (2-3)	0 (0-0)**	0.0262
Perda de polaridade das células basais	0 (0-0)*	1 (0-1)*	2 (2-3)	3 (2-3)	2 (1-2)	0.0214
Projeções em gota	0 (0-0)*	2 (1-2)	2 (1-3)	2 (2-3)	3 (3-3)	0.0263
Vacuolização celular	1 (0-1)	2 (1-2)	2 (1-2)	2 (1-2)	1 (0-2)	0.3464
Hipercromatismo nuclear	1 (1-1)*	3 (3-3)	3 (3-3)	3 (3-3)	3 (3-3)	0.0073
Perda coesão celular	0 (0-0)*	2 (2-3)	2 (2-3)	2 (1-2)	2 (2-2)	0.0366
Perda de nitidez da camada espinhosa	3 (3-3)	3 (3-3)	3 (3-3)	1 (1-3)	0 (0-1) ^Δ	0.0202
Inflamação	0 (0-0)	2 (0-3)	1 (1-1)	0 (0-0)	0 (0-1)	0.2798

Valor de p para o teste de Kruskal-Wallis. Significante quando $p < 0,05$.

* Estatisticamente significativo quando comparado com 5, 6, 15 e 16 semanas.

** Estatisticamente significativo quando comparado com 5, 6 e 15 semanas.

Δ Estatisticamente significativo quando comparado com 4, 5 e 6 semanas.

Nota-se que as alterações epiteliais são observadas a partir da quinta semana, com predomínio de hiperqueratose, hipercromatismo nuclear e perda de nitidez da camada espinhosa. Observa-se também que há certa inflamação nesse período, a qual desaparece nas demais semanas. Na sexta semana, a atrofia epitelial é intensa, porém na 16ª semana não há mais redução da espessura do

epitélio. São marcantes nesse período a hiperqueratose, hiperplasia da camada basal, projeções em gota e hiperchromatismo nuclear. A Figura A.1 exibe exemplos dessas alterações.

Figura A.1 - Exemplos de alterações histológicas indicativas de atipia celular observadas durante a indução de LPMO utilizando aplicação tópica de 4-NQO (Hematoxilina-eosina, 400X). Escala - 50µm

Todos os animais submetidos ao tratamento com 4-NQO exibiram lesões compatíveis com leucoplasias, porém três deles em um total de oitenta e quatro (3,57%), que chegaram até o final do período experimental exibiram carcinoma epidermóide, doze (12,5%), de um total de noventa e seis animais, foram a óbito em função do tratamento.

Para controlar os efeitos sistêmicos gerados pelo 4-NQO, os animais foram pesados semanalmente. A média de massa corpórea dos animais tratados com 4-NQO em 16 semanas foi de 136.5 ± 18.2 g e do controle, 211.3 ± 15.4 g ($p=0,0004$). Diante da perda de massa corpórea, foram feitas análise hematológicas e bioquímicas séricas. A Tabela A.2 mostra os dados obtidos.

Tabela A.2 – Média ($\pm$ desvio-padrão) dos valores hematológicos e bioquímicos para o controle (sem tratamento com 4-NQO) e os animais de 16 semanas de tratamento com 4-NQO

	CONTROLE	4-NQO	VALOR DE P*
Análise hematológica			
Eritrócitos totais ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	4.5 ± 0.4	4.6 ± 0.3	0.7389
Leucócitos totais ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	6.7 ± 1.4	3.4 ± 0.9	0.0027
Linfócitos (%)	73.8 ± 6.0	75.45 ± 5.05	0.9468
Monócitos (%)	4.2 ± 0.7	1.66 ± 0.8	0.0005
Neutrófilos (%)	21.0 ± 4.1	22.6 ± 5.0	0.5485
Eosinófilos (%)	0.4 ± 0.2	0.2 ± 0.1	0.5938
Análise bioquímica sérica			
Proteínas totais (g/dL)	5.7 ± 0.5	6.5 ± 0.4	0.0415
Albumina (g/dL)	3.1 ± 0.1	3.5 ± 0.2	0.0157
Alanina aminotransferase - ALT (U/mL)	127 ± 13	190 ± 20	0.0055
Aspartato aminotransferase - AST (U/mL)	49 ± 17	68 ± 9	0.0308
Creatinina (mg/dL)	0.87 ± 0.03	0.95 ± 0.09	0.1228

Valor de p para o teste de Mann-Whitney. Estatisticamente significativo quando $p < 0,05$.

Os animais tratados com 4-NQO exibiram significativamente menor quantidade de leucócitos, em particular de monócitos, bem como maior quantidade de proteínas totais, albumina, ALT e AST.

A análise anatomopatológica incluiu a observação de fígado, rins, baço, pâncreas e glândula salivar submandibular, com o intuito de se verificar a existência de sinais de toxicidade. Constatou-se que os animais de 16 semanas sob tratamento com 4-NQO exibiram alterações hepáticas, tais como inflamação portal e hiperplasia do ducto biliar, degeneração vacuolar panlobular e necrose focal, as quais foram compatíveis com os resultados de ALT, AST, proteínas totais e albumina. Foram observadas também degeneração hialina tubular na camada medular renal e degeneração vacuolar em algumas regiões da cortical. A alteração marcante ocorreu

no baço, em que se notou nítida hipoplasia da polpa branca e diminuição da celularidade na polpa vermelha, o que foi relacionado a menor quantidade de leucócitos no exame hematológico. A Figura A.2 exhibe exemplos dessas alterações. Pâncreas e glândulas salivares exibiram aspecto de normalidade.

Figura A.2 – Exemplos de alterações indicativas de toxicidade pelo 4-NQO no fígado, rins e baço (Hematoxilina-eosina, 400X). Escala - 50µm.

Após esses testes preliminares, concluiu-se que o período de 16 semanas de indução foi adequado para gerar lesões com aspecto de leucoplasia, as quais exibiram atipia nos cortes histológicos. Concluiu-se também que a aplicação tópica do 4-NQO gerou efeitos sistêmicos importantes no animal, como perda de massa corpórea, imunossupressão em nível hematológico e esplênico e toxicidade hepática. Esses efeitos devem ser melhor elucidados, bem como o seu real papel na carcinogênese induzida pelo 4-NQO.

APÊNDICE B – Quantificação da indução de protoporfirina IX pelo 5-ALA

A quantificação da protoporfirina IX foi realizada por meio de ensaio de fluorescência através de um leitor de microplaca (Synergy™ HT, BioTek).

Após a retirada e hemi-secção das línguas uma das partes foi crioprotegida (Isopentano – Sigma Aldrich, Saint Louis, USA), inserida em nitrogênio líquido para transporte e armazenada em freezer a - 80° C. As amostras, pesando em média 13,0 miligramas, foram imersas em água destilada e centrifugadas a 13.000 rpm a 4° C por 10 min, 200 µl do sobrenadante foi adicionado em microplaca de 96 poços a partir da qual procedeu-se a leitura de fluorescência e outros 10 µl foram utilizados para obter a quantificação de proteína total pelo método do biureto (BCA- Pierce, USA) com albumina bovina sérica como padrão.

Procedeu-se a leitura das unidades relativas de fluorescência (URF) através do software Gen™ 5 os comprimentos de onda de excitação e de emissão foram ajustados para o espectro compatível com o da PpIX (400 ± nm e 635 ± 40 nm respectivamente). As URF detectadas foram padronizadas para a concentração (µg/ml) de proteína total da amostra: $(URF/\mu g.ml^{-1} * 100)$ e comparadas entre si .

O Gráfico B.1 mostra a média da porcentagem de Unidades relativas de fluorescência (URF)

Gráfico B.1 - Porcentagem de URF na mucosa normal na mucosa tratada com 4-NQO e na mucosa tratada com 4-NQO e com 5-ALA

Houve diferenças significativas entre o índice de fluorescência observado entre os três grupos (Kruskal-Wallis, $p=0,0073$). Observou-se que a mucosa tratada 4-NQO e 5-ALA exibiu índice de fluorescência maior quando comparada a mucosa tratada somente com 4-NQO ($p=0,0105$) e com a mucosa normal ($p=0,0209$). Houve diferenças também entre a mucosa normal e a tratada com 4-NQO ($p=0,0107$). Por esse teste, confirmamos a presença de PpIX em maior quantidade no grupo tratado com 5-ALA.

ANEXO A – Certificado Comissão de Ética no uso de animais

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – e-mail: cepsieb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **157** nas fls. **96** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **Luciana Corrêa**, Coordenador(a) da Linha de pesquisa "*Estudo in vivo do efeito da terapia fotodinâmica em lesões orais induzidas*" do qual participam o(s) alunos **Ana Rita Pinheiro Barcessat**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)** em **15.02.2011, com validade de 3 anos**.

São Paulo, 17 de fevereiro de 2011.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEUA - ICB/USP

Prof. Dr. ARIEL MARIANO SILBER
Secretário
CEUA - ICB/USP