FLÁVIA CRISTINA PERILLO ROSIN

**Resistência de células de carcinoma epidermóide bucal à terapia fotodinâmica
mediada pelo ácido 5-aminolevulínico**

São Paulo

2015

FLÁVIA CRISTINA PERILLO ROSIN

**Resistência de células de carcinoma epidermóide bucal à terapia fotodinâmica
mediada pelo ácido 5-aminolevulínico**

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 Ciências Odontológicas.

Área de Concentração: Patologia Oral e Maxilofacial e Pacientes Especiais.

Orientador: Profa. Dra. Luciana Corrêa

São Paulo
2015

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

Rosin, Flávia Cristina Perillo.

Resistência de células de carcinoma epidermóide bucal à terapia fotodinâmica mediada pelo ácido 5-aminolevulínico / Flávia Cristina Perillo Rosin ; orientador Luciana Corrêa. -- São Paulo, 2015.

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

Tese (Doutorado) -- Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas. Área de Concentração: Patologia Oral e Maxilofacial e Pacientes Especiais. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida.

1. Carcinoma de células escamosas. 2. Terapia fotodinâmica. 3. Apoptose. I. Corrêa, Luciana. II. Título.

Rosin FCP. Resistência de células de carcinoma epidermóide bucal à terapia fotodinâmica mediada pelo ácido 5-aminolevulínico. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências Odontológicas.

Aprovado em: / /2015

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a)._____

Instituição: _____ Julgamento:_____

Prof(a). Dr(a)._____

Instituição: _____ Julgamento:_____

Prof(a). Dr(a)._____

Instituição: _____ Julgamento:_____

Dedico este trabalho aos meus pais Rosana e Waldemar que sempre priorizaram minha educação muitas vezes abrindo mão dos próprios sonhos, sou muito grata por tudo que fizeram por mim. Pela amizade, confiança, estímulos e fé constante e pelo amor incondicional.

Dedico ao Rodrigo, meu querido esposo, um verdadeiro companheiro que sempre esteve ao meu lado mesmo nos momentos difíceis me incentivando a continuar em frente e nunca desistir. Sem você nada disso seria possível.

Dedico ao meu querido irmão Felipe, que mesmo de longe sempre esteve presente na minha vida me apoiando. Por todo amor, carinho.

AGRADECIMENTOS

A minha Orientadora, Prof^a. Dr^a. Luciana Corrêa, por sempre ouvir e discutir comigo todas as questões e dúvidas que surgiram durante o desenvolvimento desta tese e por ser essa pessoa tão generosa, inteligente e acessível. Admiro-a muito como pessoa e pesquisadora.

Ao Prof. Dr. Moacir Novelli, que durante suas visitas ao laboratório sempre alegrava meu dia e por compartilhar comigo um pouco da sua imensa sabedoria.

Aos professores da Disciplina de Patologia Oral e Maxilofacial: Prof^a Dr^a Marília Trierveiler Martins, Prof. Dr. Fabio Daumas Nunes, Prof^a Dr^a Karem Lopez Ortega, Prof^a Dr^a Marina Helena Cury Gallottini, Prof^a Dr^a Suzana Cantanhede Orsini Machado com quem tive o prazer de conviver durante os três anos de doutorado e muito aprender nas reuniões anatomo-clínica e no programa de aperfeiçoamento de ensino.

A Zilda, Néia, Vinícius e Fátima pela ajuda nos momentos de dúvidas.

A Cida, a secretária da Radiologia, por toda ajuda e apoio. Muito obrigada pela amizade.

Aos queridos Biólogos Adriana, Elisa e Juvani por todo apoio que me deram nas técnicas laboratoriais e pela amizade.

Ao professor Dr. João Gualberto, Prof^a Dr^a Cristina Deboni e ao secretário da disciplina Edson por terem cedido o espaço físico do biotério da disciplina de cirurgia o que possibilitou o desenvolvimento da parte *in vivo* desta tese.

Ao Laboratório de Parasitologia e ao Técnico Henrique do Instituto Butantan, por terem disponibilizado o microscópio Confocal de Varredura a Laser (Processo FAPESP 00/11624-5), o que possibilitou a digitalização das lâminas de Imunofluorescência dessa tese.

A todos os meus colegas de Pós-Graduação com quem tive o prazer de conviver durante esses anos: Ana, Bruno, Carina, Carol, Douglas, Daniela, Danielle, Fernanda, Lourdes, Priscila, Lília, Letícia, Karin, Sintique, Stéfanie, Fabiana, Renata. Agradeço em especial Rita, Luciana, Cibeles, Gabriela, Marina, Karla, Lara que se tornaram grandes amigas.

A Ana Rita e Luciana que foram tão importantes no início do meu doutorado, obrigado pela acolhida, por toda ajuda e pela amizade.

A Cibeles, sem voc4 não teria conseguido finalizar esse trabalho, pelo seu companheirismo, amizade e pelas nossas conversas que me ajudaram a enfrentar os desafios pessoais e os que surgiram no desenvolvimento desta tese.

A Marina, a 4nica companheira de profiss4o da P4s, que sempre esteve disposta a me ajudar e me ouvir, pela amizade, carinho e companheirismo. Pelos nossos caf4s da manh4 que sempre tornava meu dia mais leve e agrad4vel.

A Karla, pelo bom humor constante que sempre alegrava meu dia, por sempre me ouvir, me apoiar e pelos nossos cafezinhos.

A Gabriela, por sempre estar ao meu lado me dando for4a e apoio, pelos nossos almo4os di4rios na copa do departamento que tornavam meu dia mais alegre e por todo carinho e amizade.

A Lara, pela amizade e por todo carinho e apoio. Por ser essa pessoa t4o agrad4vel e acess4vel por sempre estar disposta a me ouvir.

A Lourdes pela amizade e por toda ajuda que me deu na parte *in vivo* desse trabalho.

Ao Douglas, por sempre estar disposto a me ajudar e responder as tantas d4vidas de Western Blot que surgiram nesse trabalho.

A Funda4o de Amparo de a Pesquisa do Estado de S4o Paulo (Fapesp) (Proc. Fapesp n. 2014/10380-8) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Cient4fico e Tecnol4gico (CNPQ) (Proc. CNPQ n. 161020/2013-5) pelo suporte financeiro.

Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos”.

Isaac Newton

RESUMO

Rosin FCP. Resistência de células de carcinoma epidermóide bucal à terapia fotodinâmica mediada pelo ácido 5-aminolevulínico [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2015. Versão Corrigida.

O carcinoma epidermóide bucal (CEC) é uma neoplasia maligna com alta morbidade e mortalidade e de difícil tratamento. O tratamento convencional para o CEC inclui cirurgia e radioterapia, seguida ou não de quimioterapia. Apesar de serem amplamente difundidos, esses tratamentos podem ser ineficazes para alguns CECs resistentes. A terapia fotodinâmica (PDT) oncológica tem sido utilizada para o tratamento adjuvante do CEC bucal, principalmente nos casos menos invasivos e que necessitam de redução do tumor para a ressecção cirúrgica. Contudo, semelhantemente aos tratamentos convencionais, a PDT pode também induzir o aparecimento de populações celulares resistentes, fato já descrito para carcinoma cutâneo, adenocarcinoma de cólon e adenocarcinoma mamário. A hipótese de que células de CEC bucal possam desenvolver resistência à PDT ainda não foi testada. Portanto, o objetivo deste trabalho foi verificar se células de CEC bucal (SCC9) desenvolvem resistência a ciclos repetidos de PDT mediada pelo ácido 5-aminolevulínico (5-ALA-PDT) e avaliar se nesse processo ocorre modificação da expressão de marcadores relacionados a sobrevivência celular (NFκB, Bcl-2, iNOS, mTOR e Akt). Foi utilizada linhagem de células de CEC bucal (SCC9), submetida às seguintes condições: 1) Controle – células cultivadas sem nenhum tratamento; 2) ALA – células incubadas com 5-ALA (1mM durante 4 horas); 3) LED - tratadas com iluminação LED (630nm, 5,86J/cm², 22,5J, 150mW, 150s); 4) PDT - tratadas com 5-ALA-PDT, com os protocolos do grupo ALA e LED combinados, gerando dose letal de 90%. Inicialmente foi realizado somente um ciclo de PDT, sendo avaliada a viabilidade celular em todos os grupos após 24, 48, 72 e 120h da irradiação. Também foi realizado ensaio de detecção da fragmentação de DNA (TUNEL) e análise por imunofluorescência da expressão das proteínas NFκB, Bcl-2, iNOS, pmTOR e pAkt nas células viáveis. Como resultado desse primeiro tratamento com 5-ALA-PDT, observou-se que as células sobreviventes ao tratamento apresentaram intensa

marcação para pmTOR e exibiram potencial de crescimento durante o período analisado. Após esses ensaios, as células que sobreviveram a essa primeira sessão foram coletadas, replaqueadas e novamente cultivadas, sendo então submetidas a novo ciclo de 5-ALA-PDT. Esse processo foi realizado 5 vezes, variando-se a intensidade de irradiação à medida que se observava aumento na viabilidade celular. As populações celulares que exibiram viabilidade 1,5 vezes maior do que a detectada no primeiro ciclo PDT foram consideradas resistentes ao tratamento. Os mesmos marcadores analisados no primeiro ciclo de PDT foram novamente avaliados nas populações resistentes. Foram obtidas quatro populações celulares resistentes, com viabilidade de até 4,6 vezes maior do que a do primeiro ciclo de PDT e irradiação com LED que variou de 5,86 a 9,38J/cm². A população mais resistente apresentou ainda menor intensidade de protoporfirina IX, maior capacidade de migração e modificação na morfologia nuclear. As populações resistentes testadas exibiram aumento na expressão de pNFκB, iNOS, pmTOR e pAkt, mas não da proteína anti-apoptótica Bcl-2. Ensaio *in vivo* foi também conduzido em ratos, nos quais CEC bucal foi quimicamente induzido e tratado ou não com 5-ALA-PDT. Houve intensa expressão imuno-histoquímica das proteínas pNFκB, Bcl-2, iNOS, pmTOR e pAkt em relação ao controle não tratado, nas células adjacentes à área de necrose provocada pela PDT. Concluiu-se que as células de CEC bucal tratadas com 5-ALA-PDT a uma dose de 90% de letalidade desenvolveram viabilidade crescente após ciclos repetidos do tratamento, bem como exibiram superexpressão de proteínas relacionadas à sobrevivência celular, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Esses fatos, aliados à maior capacidade de migração, sugerem a aquisição de fenótipo de resistência à 5-ALA-PDT. Esse aspecto deve ser cuidadosamente considerado no momento da instituição dessa terapia para os CECs bucais.

Palavras-chave: Carcinoma epidermóide bucal. Terapia fotodinâmica oncológica. Resistência tumoral. Via de sinalização Akt/mTOR. Apoptose. Autofagia.

ABSTRACT

Rosin FCP. Resistance of oral squamous cell carcinomas to 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2015. Versão Corrigida.

Oral squamous cell carcinoma (SCC) is a malignant tumor with high morbidity and mortality rates, and it is difficult to treat. Conventional treatment for oral SCCs includes surgery and radiotherapy that may be followed by chemotherapy. Although these treatments are widely used, they are ineffective against some resistant tumors. Oncologic photodynamic therapy (PDT) has been used as an adjuvant treatment for oral SCCs, especially in less invasive cases that require tumor reduction before surgical resection. However, like conventional treatments, PDT can induce the occurrence of resistant cell populations such as cutaneous carcinomas and colon and breast adenocarcinomas. The hypothesis that oral SCCs develop resistance to PDT has not yet been tested. Therefore, the aims of this study were to investigate whether oral SCCs (SCC9) develop resistance to several cycles of 5-aminolevulinic acid-mediated PDT (5-ALA-PDT) and to determine whether the expression of markers associated with cell survival (NF κ B, Bcl-2, iNOS, mTOR, and Akt) is altered during this process. An oral SCC (SCC9) cell line was used, which was subjected to the following conditions: 1) Control: cultured without any treatment; 2) ALA: incubated with 5-ALA (1 mM for 4 h); 3) LED: treated with LED light (630 nm, 5.86 J/cm², 22.5 J, 150 mW, 150 s); and 4) PDT: treated with 5-ALA-PDT (with the protocols of the ALA and LED groups combined) generating a lethal dose of 90%. Initially, only one cycle of PDT was administered, and cell viability was determined in all groups 24, 48, 72, and 120 h after irradiation. Subsequently, the DNA fragmentation detection assay (TUNEL) and immunofluorescence analysis of the expression of proteins NF κ B, Bcl-2, iNOS, pmTOR, and pAkt were performed on viable cells. The fraction of cells that survived the first treatment with 5-ALA-PDT exhibited intense staining for pmTOR and growth potential during the testing period. After these assays, the cells that survived the first cycle were collected, plated, and cultured and were subjected to another cycle of 5-ALA-PDT. This process was repeated five times at various irradiation intensities, and

cell viability gradually increased. The cell populations that exhibited 1.5-times higher viability than that detected after the first PDT cycle were considered to be resistant to treatment. The markers analyzed after the first PDT cycle were again assessed in the resistant populations. Four resistant cell populations were obtained with a viability of up to 4.6-times higher than that of the first PDT cycle and LED light treatment, which varied between 5.86 and 9.38J/cm². The most resistant population exhibited lower intensity of protoporphyrin IX, higher migration capacity, and changes in nuclear morphology. The resistant populations tested showed increased expression of pNFκB, iNOS, pmTOR, and pAkt, but not of the anti-apoptotic Bcl-2 protein. Moreover, an *in vivo* assay was conducted in rats; oral SCCs were chemically induced and treated with 5-ALA–PDT. The intensity of the immunohistochemical expression of proteins pNFκB, Bcl-2, iNOS, pmTOR, and pAkt in cells adjacent to the area with necrosis caused by PDT was higher than that observed in the untreated control. In conclusion, oral SCCs treated with 5-ALA–PDT at a lethal dose of 90% exhibited increasing viability after several treatment cycles and overexpression of proteins associated with cell survival both *in vitro* and *in vivo*. These results, together with the higher migration capacity, suggest the acquisition of the phenotype of resistance to 5-ALA–PDT. This aspect should be carefully considered when initiating this therapy for oral SCCs.

Keywords: Oral squamous cell carcinoma. Photodynamic therapy for cancer. Tumor resistance. Akt/mTOR signaling pathway. Apoptosis. Autophagy.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	19
2.1 Parte I - Características gerais do CEC bucal	19
2.2 Parte II - Via PI3K/AKT/mTOR e seu papel na resistência à terapia antineoplásica	21
2.2.1 PI3K	21
2.2.2 Akt	22
2.2.3 mTOR	24
2.2.4 Via PI3K/Akt/mTOR como um todo	29
2.2.5 PI3K/AKT/mTOR e resistência do carcinoma epidermóide bucal a quimioterapia e radioterapia	30
2.3 Parte III - Proteínas Bcl-2, NFκB e iNOS: relação com a resistência tumoral e o CEC bucal	33
2.3.1 Proteína anti-apopótica Bcl-2	33
2.3.2 Fator de transcrição NFκB	36
2.3.3 Óxido nítrico sintase induzível (iNOS)	40
2.4 Parte IV - Terapia fotodinâmica oncológica, CEC bucal e resistência tumoral	42
2.4.1 Terapia fotodinâmica oncológica	42
2.4.2 Terapia fotodinâmica e CEC bucal	48
2.4.3 Mecanismos de resistência tumoral à terapia fotodinâmica	49
2.5 Hipótese	60

3 PROPOSIÇÃO	63
4 MATERIAL E MÉTODOS	65
4.1 Ensaios <i>in vitro</i>	65
4.1.1 Cultivo celular	65
4.1.2 PDT mediada pelo 5-ALA	66
4.1.3 Modelo de resistência à PDT	67
4.1.4 Viabilidade celular	70
4.1.5 Ensaio TUNEL	71
4.1.6 Dupla marcação com TUNEL e imunofluorescência	72
4.1.7 Ensaio de migração celular	73
4.1.8 Análise da morfologia celular	74
4.1.9 Quantificação da protoporfirina IX	75
4.1.10 Imunofluorescência após indução de resistência à PDT	76
4.1.11 Quantificação de proteínas por Western blotting	77
4.2 Ensaio <i>in vivo</i>	79
4.2.1 Indução do CEC em língua utilizando 4NQO	79
4.2.2 Terapia fotodinâmica mediada pelo 5-ALA	80
4.2.3 Eutanásia, processamento e análise histológica	81
4.2.4 Análise imuno-histoquímica	81
4.2.5 Quantificação da área de marcação imuno-histoquímica	83
4.3 Análise estatística	84
5 RESULTADOS	85
5.1 Ensaios <i>in vitro</i>	85
5.1.1 Viabilidade celular após o primeiro ciclo de PDT	85

5.1.2 Ensaio de TUNEL após o primeiro ciclo de PDT	86
5.1.3 Dupla marcação com TUNEL e imunofluorescência	87
5.1.4 Viabilidade celular no ensaio de resistência tumoral	89
5.1.5 Ensaio de migração celular após obtenção de células resistentes a PDT	90
5.1.6 Análise morfológica das células resistentes a PDT	91
5.1.7 Quantificação de protoporfirina (PpIX) após obtenção de células resistentes a PDT	92
5.1.8 Quantificação por Western blotting e análise por imunofluorescência das proteínas pNFκB, Bcl-2, iNOS, pmTOR e pAkt após obtenção de células resistentes a PDT	95
5.2 Ensaio <i>in vivo</i>	103
5.2.1 Análise histológica dos tumores de CEC induzidos	103
5.2.2 Expressão imuno-histoquímica das proteínas NFκB, Bcl-2, iNOS, mTOR e Akt in vivo após um ciclo de PDT	105
6 DISCUSSÃO	111
7 CONCLUSÕES	123
REFERÊNCIAS	125
APÊNDICE	145
ANEXOS	149

1 INTRODUÇÃO

O carcinoma epidermóide (CEC) bucal representa mais de 90% de todas as neoplasias malignas da cavidade oral. É considerada uma neoplasia de difícil tratamento, o qual geralmente consiste de ressecção cirúrgica acompanhada de radio ou quimioterapia (da Silva et al., 2011). Uma das complicações dos tratamentos convencionais é o aparecimento de radio ou quimiorresistência. Cerca de 1/3 dos casos tratados com cirurgia, radioterapia e/ou quimioterapia podem exibir recorrências locais ou regionais, bem como metástases (Greenberg et al., 2003). Nas situações de resistência do CEC bucal à quimioterapia, as células tumorais adquirem um fenótipo que induz a redução da acumulação do fármaco no seu interior, seja por meio de mecanismos de eliminação ou de inativação da droga, seja por intermédio da diminuição da absorção do quimioterápico (Solyanik, 2010). Na resistência tanto a quimioterapia quanto a radioterapia, ocorre também ativação de vias de sinalização que induzem mecanismos de reparo das estruturas celulares e inibição de processos de morte celular (Hazlehurst et al., 2003). Dentre as vias ativadas, o eixo de sinalização PI3K/Akt/mTOR possui um papel fundamental na indução desse fenótipo resistente no CEC bucal (Ettl et al., 2015; Nakagawa et al., 2014). Tal via está associada à indução de proliferação celular, à supressão da apoptose e à inibição da autofagia (Vivanco; Sawyers, 2002).

A terapia fotodinâmica (PDT) oncológica tem sido considerada uma alternativa promissora no tratamento do CEC bucal (Biel, 2007). Há relatos clínicos que descrevem alta frequência de remissão completa do tumor e alta sobrevida após a utilização dessa terapia em pacientes com CEC bucal de estadiamento clínico considerado de bom prognóstico (T1N0M0 e T2N0M0) (Biel, 2007; Ikeda et al., 2013). O princípio terapêutico da PDT é baseado na interação de uma molécula denominada fotossensibilizador (Fs) com a luz e o oxigênio molecular, induzindo altos níveis de estresse oxidativo. A ação intensa de espécies reativas de oxigênio provoca a morte celular direta, tanto por apoptose quanto por necrose ou autofagia, levando à destruição do tumor. As células tumorais podem também exibir danos irreversíveis derivados de isquemia originária de alterações vasculares pós-PDT, bem como serem

destruídas pelo sistema imune, por intermédio de reações antitumorais específicas acionadas também após essa terapia (Agostinis et al., 2011). Uma das vantagens da PDT para o CEC bucal consiste na possibilidade de se associar essa terapia com a cirurgia, levando à diminuição do tumor e tornando-o ressecável (Biel, 2010). Há ainda associações da PDT com a quimioterapia, também com resultados promissores. Apesar de ainda existirem poucos trabalhos clínicos randomizados comparando a eficácia desse tratamento para o CEC bucal em relação aos tratamentos convencionais, para outros tumores como tumores cutâneos (Babilas et al., 2006), de esôfago (Qumseya et al., 2013), próstata (Nathan et al., 2002; Moore et al., 2006) pulmão (Simone et al., 2012) e bexiga (Bader et al., 2013), a PDT tem sido amplamente difundida e utilizada.

Há, contudo, estudos na literatura demonstrando que é possível desenvolver populações celulares resistentes a PDT. Esses mecanismos, ainda pouco descritos e elucidados, parecem se assemelhar àqueles presentes no processo de resistência à quimioterapia ou à radioterapia. Os estudos demonstram ativação de vias celulares relacionadas à sobrevivência celular, ou seja, que promovem evasão da apoptose e proliferação celular. Por exemplo, menção tem sido feita à superexpressão de Akt (Song et al., 2013), NF κ B (Kuliková et al., 2010), iNOS (Bhowmick; Girotti, 2013) e proteína anti-apoptótica Bcl-2 (Shen et al., 2005) em situações de indução de resistência tumoral em linhagens celulares diversas, com protocolos de PDT variados. Apesar de a literatura ser escassa nessa área, os trabalhos têm evidenciado também que algumas linhagens de células tumorais desenvolvem resistência à PDT e outras não, o que suscita vários questionamentos sobre as variáveis que levam a essas diferenças. Dentre essas variáveis destaca-se o tipo de tumor, o tipo de FS e o protocolo de iluminação utilizado.

Não há relatos na literatura do desenvolvimento de células de CEC bucal resistentes a PDT, nem tampouco quando a PDT é mediada pelo ácido 5-aminolevulínico (5-ALA) nesses tumores. Esse FS tem sido utilizado para casos de lesões potencialmente malignas na cavidade bucal (Chen et al., 2005; Tsai et al., 2004), bem como para carcinomas verrucosos e CEC pouco invasivos (Chen et al., 2010; Fan et al., 1996). Há estudos demonstrando que ciclos repetidos de PDT mediada pelo 5-ALA (5-ALA-PDT) podem gerar resistência em células de CEC cutâneo (Milla et al., 2011) e de adenocarcinoma mamário murino (Casas et al., 2006).

Porém não encontramos nenhum trabalho que tenha avaliado se células de CEC bucal desenvolvem resistência a essa terapia, nem tampouco as vias de sinalização que poderiam estar associadas a essa resistência. Assim, a proposta deste trabalho é verificar se células de CEC bucal, quando cultivadas após ciclos repetidos de 5-ALA-PDT, desenvolvem resistência a uma dose que gera 90% de letalidade, bem como se há modificação da expressão de proteínas relacionadas a proliferação celular, evasão da apoptose e inibição da autofagia.

2 REVISÃO DA LITERATURA

A presente revisão de literatura está dividida em três grandes partes. Na **Parte I - Características gerais do CEC bucal** (item 2.1), há uma breve introdução ao CEC bucal. Na **Parte II - Via PI3K/AKT/mTOR e seu papel na resistência à terapia antineoplásica** (item 2.2), é feita uma abordagem da via de sinalização do Akt e sua relação com o mTOR, bem como do papel desse conjunto de proteínas no processo de resistência tumoral a quimioterapia e radioterapia; nessa seção, inicialmente cada conjunto de fatores da via é tratado de forma individual (itens 2.2.1 a 2.2.3), para então se descrever a via como um todo (itens 2.2.4 e 2.2.5). Na **Parte III - Proteínas Bcl-2, NFκB e iNOS e sua relação com a resistência tumoral e o CEC bucal** (item 2.3), são feitas considerações a respeito do papel da proteína anti-apoptótica Bcl-2 (item 2.3.1), do fator de transcrição NFκB (item 2.3.2) e da enzima iNOS (item 2.3.3) na carcinogênese e na resistência tumoral; são feitos também comentários sobre esse tema e o CEC bucal. Por fim, na **Parte IV - Terapia fotodinâmica oncológica, CEC bucal e resistência tumoral** (2.4), há um breve comentário sobre as características da PDT (item 2.4.1), sobre a eficácia dessa terapia no CEC bucal (item 2.4.2) e sobre os mecanismos de resistência descritos para alguns tumores tratados com PDT (item 2.4.3). Nesse último item, as proteínas comentadas nas partes II e III agora são abordadas no contexto de resistência à PDT.

2.1 Parte I - Características gerais do CEC bucal

O câncer bucal é considerado o oitavo câncer mais incidente no mundo (Peterson, 2009), representando um problema de saúde pública, com uma elevada incidência de mortalidade e uma sobrevida em 5 anos menor que 50% (Lambert et al., 2011). Estima-se no ano de 2015 uma incidência mundial de 325 mil casos e uma taxa de mortalidade de aproximadamente 157 mil (Ferlay et al., 2013).

O sítio anatômico mais acometido é a língua e o tipo histológico mais comum é o CEC, o qual representa 90% de todos os casos de câncer de boca (da Silva et al., 2011). Os fatores de risco para o CEC da cavidade oral estão associados principalmente ao consumo de tabaco e álcool. Outros fatores incluem uma dieta com baixo consumo de frutas e vegetais, condições socioeconômicas baixas e susceptibilidade genética (Warnakulasuriya, 2009).

A instituição do tratamento do CEC está condicionada ao estadiamento clínico do tumor: quando diagnosticados em estágios iniciais, ou seja, tumores menores ou iguais a 4 cm de diâmetro e que não invadem estruturas circundantes ou linfonodos, geralmente o tratamento é somente cirúrgico ou radioterápico; contudo, quando os tumores são diagnosticados em um estágio mais avançado, a conduta é multiterapêutica, envolvendo geralmente ressecção cirúrgica seguida de radiação adjuvante, com ou sem quimioterapia (Belcher et al., 2014; Eid et al., 2014). As sequelas funcionais e estéticas que podem advir do tratamento geram um impacto profundo na qualidade de vida do paciente, principalmente em sua saúde psicológica (Lambert et al., 2011).

O modelo mais vigente para explicar a carcinogênese envolvendo a mucosa bucal inclui a presença de múltiplas etapas de transformação no epitélio bucal. Inicialmente o epitélio da mucosa é afetado por alterações genéticas acumulativas que induzem a progressão para um epitélio displásico, com potencial risco para malignização. Esta se inicia com o carcinoma *in situ* (restrito ao epitélio, sem invasão para a lâmina própria), o qual em seguida pode progredir para um tumor invasivo na lâmina própria (Molinolo et al., 2009). Durante esse processo, as células adquirem um fenótipo de alta sobrevivência e intensa proliferação e disseminação. As capacidades funcionais adquiridas pelas células tumorais incluem permanência de respostas proliferativas, evasão dos genes supressores de tumor, resistência a morte celular, potencial replicativo ilimitado, indução de angiogênese, capacidade de invasão e metástase, reprogramação do metabolismo energético e evasão da sinalização imune (Hanahan; Weinberg, 2011).

Alterações em vários genes envolvidos na indução dessas características fenotípicas foram descritas para o câncer bucal, tais como genes que regulam o ciclo celular ou oncoproteínas (Ras, Myc, ciclinas, quinases dependentes de ciclinas); genes supressores tumorais (p53 e pRB); genes relacionados a proteínas pró-

sobrevivência (telomerase, fatores de crescimento e seus receptores, como por exemplo EGFR), proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2) e proteínas pró-apoptóticas (Bax, Fas, capases); alterações em fatores de transcrição (por exemplo, NF κ B); ou vias de transdução de sinais que induzem o crescimento celular e inibição da apoptose (por exemplo, a via do PI3K/Akt/mTOR) (Khan; Bisen, 2013).

O presente estudo tem por foco analisar um desses fenótipos tumorais — a resistência tumoral —, com base principalmente na expressão de proteínas da via de sinalização PI3K/Akt/mTOR. Essa via será a seguir abordada.

2.2 Parte II - Via PI3K/AKT/mTOR e seu papel na resistência à terapia antineoplásica

Uma das vias de sinalização mais envolvidas com a resistência à terapia antineoplásica é a via PI3K/Akt/mTOR. A via de sinalização fosfoinositídeo-3 quinase (PI3K)/Akt/mTOR está envolvida na regulação das principais capacidades adquiridas e compartilhadas pelas células tumorais descritas acima: sobrevivência, migração, proliferação e metabolismo, assim como angiogênese e recrutamento de células inflamatórias (Fruman; Rommel, 2014). Serão a seguir abordadas individualmente cada uma das famílias de proteínas relacionadas a essa via e o papel delas no processo de resistência tumoral.

2.2.1 PI3K

A PI3K constitui uma família de quinases responsável pela transdução de sinais de vários fatores de crescimento e citocinas em mensagens intercelulares. É uma família de lipídios quinases caracterizada pela sua habilidade de fosforilar grupo 3'-OH do anel inositol de fosfolipídeos (Simpson et al., 2015). É dividida em classes de acordo com sua especificidade pelo substrato e função; a classe I, mais especificamente IA, é a mais estudada, pois está frequentemente desregulada no câncer, sendo então abordada no presente trabalho. A classe IA de PI3K são

heterodímeros compostos de duas subunidades diferentes: uma regulatória (p85) e uma catalítica (p110). A subunidade regulatória medeia a ligação com receptores de membrana. Em resposta a estimulação por fatores de crescimento e a ativação de receptores de membrana plasmática, p85 interage diretamente com os receptores ativados ou com proteínas adaptadoras, enquanto a subunidade catalítica é a responsável pela geração dos fosfolipídios, como PIP3 (Liu et al., 2009; Vivanco; Sawyers, 2002).

A PI3K é crucial na ativação da proteína Akt, pois é responsável pela geração de lipídios intermediários que induzem a translocação do Akt para a membrana plasmática (Liu et al., 2009). O Akt será abordado a seguir.

2.2.2 Akt

O Akt, também conhecido como “proteína quinase B (PKB)”, é uma serina/treonina quinase da família de proteínas AGC. Consiste de três isoformas — Akt1, Akt2 e Akt3 — codificadas por três genes distintos, com homologia de mais de 80% na sequência de aminoácidos. As três isoformas compartilham uma arquitetura comum: um domínio catalítico de homologia a plectrina, conhecido como domínio PH, em sua região aminoterminal, e um domínio regulatório em sua região carboxiterminal (Porta et al., 2014). O Akt regula vários processos celulares cruciais no desenvolvimento de neoplasias, incluindo sobrevivência, proliferação e crescimento celular. Seu papel na sobrevivência celular é mediado através da fosforilação de proteínas, ativando a inibição ou inativando a indução de fatores essenciais de apoptose. Por exemplo, o Akt fosforila e inativa as proteínas proapoptóticas BAD e procaspase 9. Fosforila também a FKHR (um membro da família de proteínas “forkhead”), o que previne a translocação dessa proteína para o núcleo e a ativação de seus genes alvos, tais como Fas ligante e BIM, importantes na cascata apoptótica (Vivanco; Sawyers, 2002; Porta et al., 2014).

Além de inibir a apoptose, o Akt pode influenciar a sobrevivência celular por meio de seus efeitos indiretos em dois reguladores chaves da morte celular por apoptose: NF κ B e p53. O Akt fosforila e ativa I κ B cinase (IKKs), um regulador positivo

de NF κ B, o que induz sua dissociação da proteína inibitória de NF κ B (o I κ B), permitindo que transloque para o núcleo e aja em genes alvos, importantes na indução da sobrevivência celular (Figura 2.1). A importância da participação do NF κ B na sobrevivência celular e na carcinogênese será descrita posteriormente no item 2.3.2. Quanto ao p53, este pode ser regulado negativamente pelo Akt por meio da fosforilação da proteína MDM2, que ubiquitina p53 induzindo sua degradação proteossômica (Manning; Cantley, 2007).

Além da sua participação na sobrevivência celular, uma das funções mais bem conservadas do Akt é a indução de proliferação celular. Ele promove a progressão do ciclo celular por vários mecanismos, dentre eles: a) fosforilação das proteínas inibidoras de ciclinas dependente de quinases (CDKs) como p21 e p27; estas são então sequestradas do citosol, fato que atenua seu efeito inibitório na progressão do ciclo celular; b) aumento da expressão e estabilidade da ciclina D1, por intermédio do estímulo a transcrição e tradução dessa proteína e da fosforilação e inibição do GSK3, que seleciona a ciclina D1 para degradação proteossômica (Figura 2.1) (Nicholson; Anderson, 2002).

O Akt possui também um importante papel no crescimento celular, ou seja, no aumento da massa ou do tamanho das células, por meio da regulação da proteína-alvo da rapamicina em mamíferos, o mTOR (Figura 2.2). Essa proteína será descrita a seguir.

Fonte: Adaptado de Manning e Cantley (2007), p 1265.

Figura 2.1 - Esquema da ação do AKT sobre substratos alvos

Nota: A inibição ou ativação desses substratos atinge moléculas responsáveis por sobrevivência, proliferação e crescimento celular, bem como por angiogênese.

2.2.3 mTOR

O mTOR é uma serina/treonina quinase que pertence à família de proteínas PI3K. O mTOR regula o crescimento e a proliferação celular em resposta aos níveis de nutrientes e de fatores de crescimento. Essa quinase pode estar presente na célula em dois complexos: mTORC1 e mTORC2 (Sabatini, 2006). O complexo mTORC1 é o mais bem caracterizado, sendo constituído de 6 proteínas: mTOR (subunidade catalítica), raptor, pras40, depor, mlst8 e tti1/tel2. Esse complexo promove o crescimento celular (volume e tamanho celular) por meio da modulação da síntese de proteínas, da produção de ribossomos, do metabolismo celular e da autofagia. Já o complexo mTORC2 é constituído por mTOR, rictor, mSin1, protor1/2, depor, mlst8, tti1/tel2. Uma das funções desse complexo é regulação do citoesqueleto de actina. Ele também tem sido considerado como membro da via PI3K/Akt. Por meio dele ocorre fosforilação e ativação de um dos sítios requeridos para ativação de Akt (o sítio

da ser473) em resposta a fatores de crescimento. Diferentemente do mTORC1, esse complexo é insensível a disponibilidade de nutrientes e a rapamicina (Figura 2.2) (Laplante; Sabatini, 2012). A ativação de ambos os complexos também tem sido relacionado a motilidade, invasão e metástase tumoral (Zhou; Huang, 2011).

Figura 2.2 - Complexos mTORC1 e mTORC2 nos quais se encontra a proteína mTOR

Nota: A ativação do complexo mTORC1 depende da inibição de TSC2 e PRAS40 pelo Akt. Quando isso ocorre, esse complexo inicia a modulação de síntese proteica, lipídica e de lisossomos, bem como é responsável pela inibição da autofagia. Já a ativação do complexo mTORC2 por fatores de crescimento em receptores tirosina-quinases promove a fosforilação do Akt no sítio Ser473, contribuindo para mecanismos de sobrevivência e proliferação celular.

O mTOR, particularmente o complexo mTORC1, promove o crescimento celular inibindo a autofagia (Xu et al., 2014). A autofagia é um processo de degradação de componentes celulares realizada por lisossomos. Existem três tipos de autofagia: a macroautofagia, a microautofagia e autofagia mediada por chaperona. Dos três tipos, a macroautofagia frequentemente referida somente como autofagia, é o processo predominante no câncer e o mais bem estudado. Nessa forma de autofagia, componentes citoplasmáticos são envolvidos por vesículas de dupla membrana e então disponibilizados para os lisossomos. As etapas desse processo incluem

formação e expansão de uma membrana de isolamento conhecida como fagóforo (fases denominadas "nucleação" e "alongamento" da vesícula, respectivamente); em seguida as bordas dos fagóforos se fundem (etapa de "conclusão"), formando uma vesícula de dupla membrana conhecida como "autofagossomo", que então sequestra o material citoplasmático; o autofagossomo se funde com o lisossomo, originando uma estrutura chamada "autolisossomo", na qual o material capturado e a membrana interna são degradados (Radogna et al., 2015) (Figura 2.3).

A autofagia acontece em níveis basais em todas as células como um mecanismo de reciclagem de proteínas e organelas. Essa via é regulada positivamente quando as células precisam de nutrientes intracelulares e energia em situações de estresse celular. Essa via é induzida também para eliminar componentes citoplasmáticos nocivos durante estresse oxidativo, infecções ou acúmulo de agregados de proteínas (Levine; Kroemer, 2008). Sob condições de estresse celular, o complexo mTORC1 é inibido e inicia-se o processo autofágico. ULK1/ATG1 e PI3K classe III são ativados e induzem o começo da formação do fagóforo; a proteína beclin-1 desempenha um importante papel nessa etapa inicial. No segundo passo, o alongamento da vesícula ocorre através de dois sistemas de conjugação, a ligação covalente de ATG12 com ATG5, e ATG8 com fosfolipídios da membrana plasmática (Poillet-Perez et al., 2015). O complexo mTORC1 pode interferir nesse processo de duas maneiras distintas: fosforilando e suprimindo o complexo ULK1/ATG13/FIP200 (complexo necessário na iniciação da autofagia) e regulando DAP1 (um supressor da autofagia) (Figura 2.3) (Laplante; Sabatini, 2012).

Figura 2.3 - Esquema ilustrativo da autofagia

Nota: A ativação desse mecanismo depende da ativação do complexo PI3K Classe III, do qual faz parte a proteína beclin 1. Esse complexo promove, juntamente com o complexo ULK, a formação do fagóforo, por intermédio do acomplamento de proteínas LC3-III, p62 e da família ATG. O fagóforo envolve as organelas a serem lisadas, originando uma vesícula de dupla membrana (autofagossomo), a qual depois se funde com lisossomos, promovendo a degradação das organelas. Esse mecanismo é inibido pelo complexo mTORC1 e pela proteína DAP1.

No câncer, a autofagia pode desempenhar tanto um papel pró como anti-sobrevivência. Durante as primeiras fases da carcinogênese, ela é entendida como sendo supressor tumoral; em tumores já estabelecidos, ela exerce um papel de sobrevivência celular. Em células normais, a autofagia funciona como um mecanismo de vigilância ao remover organelas danificadas e agregados de proteínas; essa remoção promove o controle da quantidade de espécies reativas de oxigênio e dos danos ao DNA, o que confere proteção às células suscetíveis contra a transformação maligna. Uma vez que a transformação maligna ocorreu, a autofagia promove progressão do tumor e resistência a terapia antineoplásica. Essa função da autofagia pode ser apoiada pelo fato que: 1) a autofagia aumenta a resistência das células tumorais a condições endógenas que normalmente induziriam a morte celular, tais como hipóxia e escassez de nutrientes; 2) a autofagia torna as células neoplásicas menos sensíveis a morte celular induzida por terapias antineoplásicas; 3) induz a sobrevivência das células que entram em estado de senescência em resposta a essas terapias; 4) promove a manutenção de células-tronco tumorais (Choi, 2012; Zhi; Zhong, 2015; Galluzzi et al., 2015).

No câncer bucal, têm sido relatados os dois viéses do processo de autofagia — de indutor do crescimento e de supressor tumoral. Como indutor de crescimento

tumoral, estudos imuno-histoquímicos demonstraram que a alta expressão de proteínas relacionadas a autofagia (ATG9A e ATG16L1), em amostras de CEC bucal de 90 pacientes, foi associada a baixa sobrevida e a presença de recidiva (Tang et al., 2013). Esse mesmo grupo ainda demonstrou que, em estágios avançados de CEC bucal, bem como em tumores de maior tamanho e em casos de presença de metástase linfonodal e maior grau de indiferenciação, há superexpressão de ATG16L1 (Tang et al., 2014). Os autores concluíram que a superexpressão das proteínas ATG e ATG16L1 no CEC bucal pode indicar um fenótipo agressivo tumoral, com pior sobrevida e com menor tempo de recorrência. Já a autofagia como supressor tumoral foi analisada em estudo envolvendo cultivo de linhagens celulares de CEC de língua (SCC9 e SCC15) e estudo da expressão da beclin-1. O silenciamento dessa proteína nas células cultivadas promoveu proliferação, migração e invasão celular, ao passo que superexpressão desta inibiu esses processos, indicando que a beclin-1 desempenha um papel de supressor tumoral nessas linhagens CEC (Weng et al., 2014).

A expressão de mTOR no CEC bucal tem sido associada a pior prognóstico. Um estudo avaliou a expressão imuno-histoquímica dessa proteína na sua forma fosforilada em 72 espécimes de CEC bucal. A expressão de pmTOR foi observada em 63,9% dos casos. Os pacientes com alta expressão dessa proteína tiveram uma sobrevida global menor. Os autores concluíram que pmTOR pode servir com um marcador biológico confiável na identificação de subgrupos de CEC bucal com alto risco de recidivas e metástases (Monteiro et al., 2013). Outro estudo também avaliou a expressão imuno-histoquímica do pmTOR em 70 casos de CEC bucal. Nesse trabalho, essa proteína foi superexpressa em 52,8% dos casos e foi correlacionada com estágio do tumor, metástases para linfonodos regionais e taxa de sobrevida. Os efeitos da inibição dessa proteína através da droga everolimus foram também avaliados *in vitro*. A incubação das células com everolimus reduziu a expressão de pmTOR, a proliferação celular, a capacidade de migração, levando a pior desempenho na migração celular ("scratch assay"), e a capacidade de invasão. Os autores concluíram que a inibição de pmTOR através do everolimus pode ser uma estratégia promissora no tratamento de CEC bucal (Naruse et al., 2015).

2.2.4 Via PI3K/Akt/mTOR como um todo

A Figura 2.4 ilustra os principais elementos protéicos envolvidos na via PI3K/Akt/mTOR. Inicialmente ocorre ativação da PI3K por intermédio da ligação de fatores a receptores tirosina quinases. Esses receptores podem ser EGFR, HER2, ErbB3, PDGFR, VEGFR e IGF-1R (Yuan; Cantley, 2008; Simpson et al., 2015), os quais são então fosforilados e induzem o recrutamento de PI3K para a membrana plasmática. Ao ser ativado, o PI3K induz a fosforilação do fosfoinositol 4,5 bifosfato (PIP₂), gerando fosfatidilinositol 3,4,5 tris-fosfato (PIP₃), um segundo mensageiro lipídico essencial para a translocação de Akt para a membrana plasmática (Liu et al., 2009; Vivanco; Sawyers, 2002). Um inibidor dessa fase é o PTEN, uma fosfatase de lipídios que desfosforila PIP₃ para PIP₂. A translocação do Akt é seguida pela sua mudança conformacional, o que desmascara seu sítio catalítico e permite sua posterior fosforilação em dois sítios regulatórios diferentes: Thr308 e Ser473. A fosforilação em Thr308 e Ser473 é mediada pelas quinases PDK1 e PDK2, respectivamente. A fosforilação da Ser473 é também mediada pelo complexo mTORC2 (Toker; Marmiroli, 2014). Nesse momento, do ponto de vista de resistência tumoral, o Akt passa a ser o protagonista, já que promove a progressão do ciclo celular, a transcrição de genes pró-sobrevivência (por exemplo, Bcl-2), por intermédio da translocação de NF κ B para o núcleo celular, a inibição indireta da apoptose e o estímulo à síntese protéica e a inibição da autofagia por meio da ativação de mTOR (Figura 2.4).

No presente trabalho, foi analisada a expressão das proteínas Akt, Bcl-2, NF κ B e mTOR no contexto da resistência tumoral do CEC bucal. Esse contexto será descrito a seguir.

Figura 2.4 – Via de sinalização PI3K/Akt/mTOR

Nota: 1 - O PI3K é ativado em resposta a ativação de receptores de tirosina quinases presentes na membrana plasmática que respondem a proteínas oncogênicas e fatores de crescimento. Sua ativação induz a conversão do lipídio PIP2 em PIP3 que, por sua vez, recrutam o Akt e as quinases que induzem a fosforilação do Akt (PDK1 e PDK2). O PTEN é um inibidor negativo da via, uma vez que desfosforila PIP3 para PIP2. 2 - O Akt inibe as proteínas inibidoras do ciclo celular, p21 e p27, por meio de sua fosforilação, sequestrando-as no citoplasma e induzindo sua degradação. Com isso, as ciclinas (ex. ciclina D1) induzem a progressão do ciclo celular da fase G1 para S. 3 - Akt fosforila IKK, que por sua vez fosforila IκB, marcando-o para degradação proteossômica dependente de ubiquitina, permitindo assim que o NFκB seja translocado para o núcleo, onde irá induzir a transcrição de genes pró-sobrevivência (ex. Bcl-2). 4 - Akt promove a fosforilação inibitória de proteínas pró-apoptóticas (Bax, Bad, Fas, caspase 9). 5 - A Akt promove a inibição da GSK3b, a qual é responsável pela inibição de Mcl-1, um fator antiapoptótico. A inibição da GSK3b também permite a estabilização da ciclina D no núcleo celular. 6 - Akt promove a fosforilação e ativação de mTOR que induz a síntese de proteínas, progressão do ciclo celular e inibição da autofagia. A fosforilação da PI3K em resposta a sinalização por fatores de crescimento é atribuída também ao complexo mTORC2.

2.2.5 PI3K/AKT/mTOR e resistência do carcinoma epidermóide bucal a quimioterapia e radioterapia

A resistência a terapia antineoplásica é considerada um fenômeno complexo que envolve diversos mecanismos, dentre eles inibição da morte celular por apoptose, redução da acumulação do fármaco na célula e ativação de várias vias de sinalização celular (Burris, 2013; Brown; Toker, 2015). A resistência a quimioterápicos pode

ocorrer através dos seguintes mecanismos: 1) diminuição da concentração intracelular de fármacos, por intermédio, por exemplo, da superexpressão de transportadores de drogas; 2) alterações no alvo da droga devido a mutações, ou superexpressão deste; 3) aumento da detoxificação (por exemplo, por intermédio da ativação de glutaniona); 4) mudanças no reparo de DNA; 5) alterações em proteínas relacionadas com o ciclo celular, como p27 e p21; e 6) mudanças na taxa entre membros pró e anti-apoptóticos da família Bcl-2 (Hazlehurst et al., 2003). Uma das formas mais significantes de resistência a quimioterápicos é a ação de proteínas de membranas, especialmente transportadores de cassete de ligação de ATP (proteínas ABC), que expulsam a droga do ambiente intracelular e modulam sua distribuição e absorção, mantendo a concentração intracelular abaixo do limiar que induz a morte celular (Luqmani, 2005).

Os danos ao DNA desencadeados pelos quimioterápicos podem induzir a ativação da via PI3K/Akt/mTOR. Essa via tem sido considerada como principal contribuinte para a resistência a quimioterapia e tem sido associada à redução da quimiossensibilidade, principalmente pela indução do aumento da expressão de proteínas anti-apoptóticas (Burris, 2013; Brown; Toker, 2015). Além de sua ação na resistência a quimioterapia, as funções pró-sobrevivência desencadeadas pela ativação dessa via contribuem também para a radiorresistência. Isso pode ser comprovado pelo fato de que a inibição de PI3K/Akt aumenta a sensibilidade das células tumorais à radioterapia, por meio da diminuição de mecanismos de reparo e indução da morte celular por apoptose (Hein et al., 2014).

Essa via é considerada a mais frequentemente mutada em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço (Liu et al., 2013). Mutações inativando PTEN têm sido relatadas nessa neoplasia, as quais induzem à regulação positiva de Akt (Simpson et al., 2015). O aumento da ativação do Akt é um dos eventos moleculares mais comuns em tumores sólidos, levando ao aumento da sobrevivência, proliferação e agressividade dos tumores (Toulany; Rodemann, 2013). No CEC bucal, a expressão de Akt fosforilado tem sido associada a pior prognóstico (Lim et al., 2005). A expressão dessa quinase no CEC bucal está associada a metástase linfonodal, maior tamanho do tumor e baixa sobrevida (Pontes et al., 2015).

Estudos da participação da PI3K/Akt/mTOR na resistência às terapias convencionais do CEC bucal (quimioterapia e radioterapia) são bem escassos. Um

estudo utilizando modelo de indução de dessensibilização ao agente quimioterápico 5-fluorouracil (5-FU) em cultivo de células de CEC bucal mostrou que a adesão celular a componentes da matriz extracelular tem um papel importante na indução da resistência a quimioterapia. No estudo, houve intensa expressão de fibronectina nas culturas de células de CEC bucal 5-FU-resistentes em comparação às 5-FU sensíveis. A adesão à fibronectina aumentou essa resistência e promoveu a ativação de Akt/NF κ B mediada pela integrina β 1. Por outro lado, a inibição da adesão à fibronectina suprimiu essa ativação e aumentou a apoptose. Os autores concluíram que a fibronectina pode ser um importante alvo no desenvolvimento de terapias para casos resistentes de CEC bucal (Nakagawa et al., 2014).

Com relação à resistência a radioterapia em CEC de cabeça e pescoço, a PI3K/Akt/mTOR tem sido associada a três principais mecanismos: radorresistência intrínseca; proliferação das células tumorais como um mecanismo de repopulação tumoral pós-radioterapia; e hipóxia. Sua participação na radorresistência intrínseca está associada à indução de mecanismos de reparo de DNA, visto que a quebra da dupla fita de DNA é a principal causa de morte celular induzida pela radiação ionizante (Bussink et al., 2008). Após a irradiação, o Akt ativado é translocado do citoplasma para o núcleo, onde interage e forma um complexo funcional com a principal enzima de reparo da quebra da dupla fita de DNA, a proteína quinase dependente de DNA (DNA-PKcs). Nesse complexo Akt estimula a atividade dessa enzima, que induz o reparo dos componentes danificados do DNA e a resistência a essa terapêutica (Toulany; Rodemann, 2013). Já a proliferação celular pós-irradiação tem sido associada a alta expressão de EGFR e ativação das vias RAS/RAF/MAPK e PI3K/Akt (Bussink et al., 2008). Associação entre a expressão de EGFR e radorresistência foi demonstrada em linhagens celulares de CEC de cabeça e pescoço. Células resistentes a radioterapia expressaram mais EGFR ativado (pEGFR) do que células radiosensíveis, o que demonstrou ser o "status" de ativação do receptor EGFR um fator determinante da resposta dessas células a radioterapia (Jedlinski et al., 2013). Outro estudo demonstrou a participação da via do Akt na radorresistência utilizando uma linhagem de células de CEC bucal humano radorresistente e outra radiosensível. Após a radiação, a linhagem radorresistente exibiu intensa sinalização de PI3K/Akt e perda da expressão de PTEN em comparação à linhagem radiosensível. O bloqueio de pAkt promoveu maior radiosensibilidade na linhagem

resistente. Os autores concluíram que a superativação de PI3K/Akt parece ser uma das principais razões de radiorresistência no CEC bucal (Ettl et al., 2015).

O mecanismo de aquisição de radiorresistência em ambientes sob hipóxia pode ser explicado pelo fato de que a hipóxia promove instabilidade genética, induzindo invasão e metástase das células tumorais. A via do Akt tem um importante papel nesse mecanismo, pois controla a expressão de importantes marcadores moleculares de hipóxia. Alterações na expressão gênica durante a hipóxia é principalmente orquestrada pelo fator induzido por hipóxia 1 (HIF-1), um fator de transcrição que regula vários processos celulares incluindo proliferação, angiogênese, metabolismo de glicose e inibição da apoptose. Esse fator de transcrição é bloqueado na ausência de Akt, o que indica ser a expressão dessa proteína dependente da ativação do Akt (Bussink et al., 2008).

2.3 Parte III - Proteínas Bcl-2, NF κ B e iNOS: relação com a resistência tumoral e o CEC bucal

2.3.1 Proteína anti-apoptótica Bcl-2

A apoptose é um processo fisiológico de morte celular essencial para o desenvolvimento do tecido normal e da homeostase. Contudo, esse processo encontra-se frequentemente desregulado no câncer, e a evasão da morte celular por apoptose tem sido considerada um dos mecanismos chaves no desenvolvimento e progressão das neoplasias (Hanahan; Weinberg, 2011). A apoptose é caracterizada pela ativação de proteases denominadas caspases, que promovem clivagem de proteínas celulares vitais, condensação da cromatina, fragmentação nuclear e formação de bolhas citoplasmáticas revestidas por membrana (os chamados "corpos apoptóticos", os quais são eliminados por fagócitos) (Correia et al., 2015).

A apoptose pode ser desencadeada por duas vias de sinalização distintas: a extrínseca e a intrínseca ou mitocondrial (Figura 2.5). A via extrínseca, também chamada de via de receptor de morte, é desencadeada em resposta à presença de ligantes em receptores de morte celular pertencentes à família do receptor fator de necrose tumoral (TNF). A ativação desse receptor induz a montagem do complexo de sinalização indutor de morte (DISC), que, por sua vez, recruta pró-caspase 8 e o domínio de morte associado a Fas (FADD), levando à clivagem e ativação de caspase-8. A caspase 8 ativa as caspases efetoras (caspases 3, 6 e 7), as quais induzem a fragmentação de DNA e apoptose (Khan et al., 2014). A via intrínseca é iniciada dentro da célula, mais especificamente dentro da mitocôndria. Ela é ativada em resposta a sinais de estresse celular, tais como danos ao DNA, estresse oxidativo, defeitos no ciclo celular e ausência de fatores crescimento. É regulada pela família de proteínas Bcl-2, as quais regulam a liberação do citocromo c por meio do aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial externa. A permeabilização da membrana mitocondrial externa induz a ativação de uma cascata de caspases que culmina na ativação da caspase efetora caspase 3 (Radogna et al., 2015) (Figura 2.5).

Figura 2.5 - Esquema ilustrativo da apoptose induzida por via extrínseca e intrínseca

Nota: Na via extrínseca, a ativação de receptores TRAIL, TNF ou FAS leva à formação do complexo sinalizador indutor de morte (DISC), o qual recruta FADD e pró-caspase 8. Há então ativação das caspases efetoras 3, 6 e 7, que levam à fragmentação do DNA e à apoptose. Na via intrínseca, a injúria celular ativa proteínas da família Bcl-2 (Bax e Bak), as quais levam à liberação do citocromo c para fora da mitocôndria. A conjugação com Apaf1 e pró-caspase 9 forma o apoptossomo no citosol, o qual então ativa a caspase 9 e esta, as caspases efetoras de apoptose. As proteínas Bax e Bak são inibidas pelas proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 e Mcl-1.

A família de proteínas Bcl-2 inclui 3 subfamílias funcionalmente e estruturalmente distintas: 1) proteínas pró-apoptóticas Bax e Bak, que medeiam a permeabilização da membrana mitocondrial externa; 2) proteínas anti-apoptóticas Bcl-2, Bcl-xl, Mcl-1 e A1, que inibem a permeabilização da membrana mitocondrial externa; 3) proteínas BH3 apenas, incluindo BAD, BID, BIM, BMF, Noxa e PUMA, que promovem a apoptose por intermédio da oligomerização de Bax e Bak ou pela neutralização dos membros da família anti-apoptótica (Correia et al., 2015).

No presente estudo, foi verificada a expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2 no contexto de resistência tumoral do CEC bucal. A expressão dessa proteína nesse contexto já foi avaliada anteriormente. Um estudo observou que há aumento na expressão imuno-histoquímica dessa proteína em lesões de CEC de língua em comparação a mucosa com características de normalidade. Contudo, esse aumento não foi relacionado com o estágio clínico nem com o grau histológico do tumor. Nesse

mesmo estudo os autores avaliaram a expressão de Bcl-2 em uma linhagem de CEC de língua resistente a cisplatina. Essa linhagem foi estabelecida através da incubação com concentrações crescentes do quimioterápico (1-10 μ M) por um período de seis meses. A resistência a cisplatina nessa linhagem foi nove vezes maior que a população original (população parental). Houve um aumento na expressão de Bcl-2 nessas células em comparação com a população parental. Os autores concluíram que o aumento de Bcl-2 nas lesões de CEC de língua indica uma resistência intrínseca desse tumor, o que provavelmente contribui para a resistência a cisplatina (Zhang et al., 2012).

A participação de proteínas da família Bcl-2 na resistência a radioterapia também já foi demonstrada. Um estudo utilizando células radorresistentes e radiosensíveis de CEC bucal verificou que, após a irradiação, nas células radiosensíveis houve indução de morte celular por apoptose, o que pôde ser observado pelo aumento na expressão das caspases 3 e 7 nessas células. Já nas células radioresistentes, houve uma regulação positiva do mRNA de survivina e Bcl2A1, um membro da família de proteínas Bcl-2 com funções anti-apoptóticas (Ettl et al., 2015). Outro estudo avaliou o efeito da inibição de Bcl-2 em combinação com a radioterapia em linhagens celulares de cabeça e pescoço. A incubação com o inibidor de Bcl-2 após a irradiação aumentou os índices de apoptose nessas células, indicando um efeito sinérgico entre a radiação e o inibidor de Bcl-2. Em conjunto, esses resultados demonstram que o Bcl-2 provavelmente está associado a resistência a radioterapia nessas células, e que a combinação do inibidor de Bcl-2 com a radiação sensibiliza as células a morte celular por apoptose induzida por essa terapêutica (Zerp et al., 2015).

2.3.2 Fator de transcrição NF κ B

Outra via que possui um papel de destaque no desenvolvimento e progressão de neoplasias é a via do NF κ B. O fator de transcrição NF κ B é composto por 5 membros — RelA (p65), RelB, c-Rel, NF κ B1 (p50 e seu precursor p105) e NF κ B2

(p52 e seu precursor p100) —, que podem interagir formando homo ou heterodímeros. Eles partilham um domínio de homologia Rel, que é responsável pela ligação ao DNA e pela dimerização e ligação com a proteína inibitória I κ B. Dos cinco membros da família, p105 e p100 são consideradas moléculas precursoras e precisam sofrer processamento proteossômico para originar proteínas maduras (p50 e p52, respectivamente); essas moléculas são classificadas como classe I de NF κ B. Já as subunidades p65, RelB e c-Rel são sintetizadas na sua forma madura, sendo então classificadas como classe II (Dolcet et al., 2005).

Nas células normais, o NF κ B está associado a proteína inibitória I κ B e fica localizado no citoplasma, permanecendo inativo até que a célula receba um estímulo que induza sua ativação, tais como citocinas pró-inflamatórias e produtos bacterianos e virais. Em resposta a esses estímulos, a proteína I κ B se torna fosforilada pelas proteínas IKK. Sua fosforilação resulta em sua ubiquitinação e posterior degradação proteossômica, permitindo que o NF κ B seja translocado para o núcleo, onde irá induzir a transcrição dos seus genes alvos, tais como genes que regulam a resposta imune, a proliferação e a sobrevivência celular (Baldwin, 2001).

A ativação de NF κ B pode ser desencadeada através de diferentes mecanismos moleculares, denominados "via canônica ou clássica" ou "via alternativa" (Figura 2.6), as quais diferem em relação aos dímeros formados. Na via clássica, a ativação é conseguida pela liberação do I κ B, seguido de sua posterior degradação. Os dímeros livres, que nessa via são principalmente p50/p65 e p50/c-Rel, são translocados para o núcleo, onde exercem ação sob seus genes alvos. Já na sinalização alternativa, a ativação de NF κ B é realizada por intermédio do processamento de p100 e IKK: IKK α fosforila p100, selecionando-a para ubiquitinação e posterior degradação proteossômica, dando origem ao p52; este forma o dímero transcricionalmente ativo p52/RelB (Jing; Lee, 2014). Uma vez no núcleo, o NF κ B deve sofrer várias modificações pós-traducionais, para que seja capaz de induzir a transcrição dos seus genes alvos. Tais modificações incluem fosforilação, acetilação e metilação (Erstad; Cusack Jr, 2013).

Figura 2.6 - Esquema ilustrativo das duas vias de ativação de NFκB

Nota: O NFκB fica inativo no citoplasma celular, ligado a IκB. Quando há sinalização do meio extracelular por citocinas e lipopolissacarídeos (LPS), por exemplo, ocorre fosforilação de IκB. Essa proteína então degrada e os dímeros p50 e p65 ficam livres para translocar para o núcleo, sendo transportados pela proteína importina. Na via alternativa, a proteína inibitória p100 é degradada a p52. Esse dímero, juntamente com RelB, é translocado então para o núcleo. Uma vez no núcleo, esses dímeros se ligam a sítios κB do DNA, promovendo a ativação de genes alvos.

A ativação de NFκB tem sido associada a vários aspectos da carcinogênese, incluindo controle de apoptose, ciclo celular e diferenciação e migração celular. O NFκB pode suprimir a apoptose tanto na via extrínseca quanto na via intrínseca, promovendo inibição e degradação de caspases, indução das proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 e IAPs (inibidoras da apoptose – c-IAP 1, 2 e 3), inibição de receptores de morte, inibição do gene supressor tumoral p53 e produção de moléculas anti-oxidantes (nesse caso para minimizar os danos celulares induzidos por espécies reativas de oxigênio). Com relação à progressão do ciclo celular, o NFκB promove a regulação positiva das ciclinas D1, D2 e D3 e c-Myc (Dolcet et al., 2005; Erstad; Cusack Jr, 2013).

Esse fator de transcrição também tem sido associado à redução da sensibilidade a quimioterapia e radioterapia. Em resposta ao dano de DNA que é induzido pelas terapias convencionais o NFκB induz a transcrição de genes como Bcl-

2, Bcl-xl, COX-2, ciclina D1 e survivina, relacionados a funções de sobrevivência celular e, portanto, de resistência tumoral (Erstad; Cusack Jr, 2013).

Não foram encontrados artigos científicos em língua inglesa que tratassem especificamente de CEC bucal, resistência tumoral e NF κ B. Foi localizado somente um estudo envolvendo análise imuno-histoquímica para NF κ B e COX2 em casos de lesões potencialmente malignas orais e CEC. Esse trabalho demonstrou que há aumento gradativo da expressão de NF κ B e COX2 da mucosa bucal normal para as lesões potencialmente malignas e destas para o CEC. A expressão de ambas as proteínas foi associada significativamente nessas lesões. Os autores concluíram que essas proteínas podem constituir alvo terapêutico, principalmente nas lesões iniciais de CEC (Sawhney et al., 2007). Outro estudo demonstrou a participação desse fator de transcrição em células de câncer de cabeça e pescoço sensíveis e resistentes ao quimioterápico cisplatina. Nas células sensíveis a expressão de NF κ B se restringiu ao citoplasma, enquanto nas células resistentes a expressão foi basicamente nuclear. As células tratadas com o quimioterápico exibiram importantes mudanças na morfologia nuclear. As células sensíveis exibiram aumento no tamanho do núcleo, enquanto as células resistentes reponderam ao tratamento reduzindo o tamanho do núcleo. As células resistentes também apresentaram níveis reduzidos BCRA1, uma proteína que possui um importante papel na indução da morte celular em situações de danos extensivos ao DNA, sendo translocada para o núcleo, onde induz a parada do ciclo celular e a apoptose. As células resistentes também apresentaram redução da desatilação da histona H3, um marcador de relaxamento da cromatina, ou seja, essas células respondem ao tratamento induzindo a condensação da cromatina. A inibição da atividade de NF κ B nas células resistentes aumentou o tamanho do núcleo após o tratamento e resultou na acumulação da acetil-histona 3 e no aumento de BRCA1. O silenciamento desse fator de transcrição também aumentou a morte celular após o tratamento. A indução farmacológica da acetilação da histona preveniu esse fator de transcrição de induzir resistência à cisplatina. Em conjunto esses resultados indicam que o NF κ B promove resistência tumoral pela modulação da organização da cromatina e dos fatores acetil-histona 3 e BRCA1 (Almeida et al., 2014).

2.3.3 Óxido nítrico sintase induzível (iNOS)

O óxido nítrico é uma molécula multifuncional gasosa e um radical livre altamente reativo, presente em quase todas as células do corpo humano. Ele regula vários processos biológicos, tanto em condições fisiológicas quanto patológicas, incluindo funções vasculares (angiogênese, fluxo sanguíneo, permeabilidade vascular, interação leucócitos-endotélio e agregação plaquetária) e funções neurológicas (neurotransmissão e desenvolvimento do sistema nervoso); em concentrações elevadas pode causar citotoxicidade (citostase e citólise) (Fukumura et al., 2006). A biossíntese do NO é realizada por uma família de enzimas denominadas "óxido nítrico sintase (NOS)", que catalisam a conversão de L-arginina a L-cutrulina e óxido nítrico. Existem três isoformas de NOS, das quais duas são constitutivas: a NOS neuronal (NOS1 ou nNOS), expressa em neurônios, e a NOS endotelial (NOS3 ou eNOS), expressa no endotélio. A terceira isoforma é induzível (iNOS ou NOS2). As isoformas "constitutiva" e "induzível" compartilham uma homologia de cerca de 50% dos aminoácidos (Singh; Grupta, 2011). Todas as isoformas dependem do substrato L-arginina e dos cofatores/coenzimas NADPH, BH₄, FAD, FMN, oxigênio e protoporfirina IX para sintetizar NO (Lechner et al., 2005).

O iNOS pode gerar altas concentrações de NO (em nível micromolar) por períodos prolongados (Janakiram; Rao, 2012). Ele é induzido em resposta a vários estímulos, tais como endotoxinas e lipossacarídeos, hipóxia, estresse oxidativo e mediadores pró-inflamatórios. Dentre estes, são importantes para a indução de iNOS o fator de necrose tumoral α (TNF- α), a interleucina 1 β (IL-1 β) e o interferon γ (IFN- γ) (Lowenstein; Padalko, 2004).

O papel do NO no câncer é incerto; ele pode tanto estimular como inibir a progressão tumoral, dependendo da atividade e localização das suas isoformas, da sua concentração, bem como do tempo de exposição e da sensibilidade da célula tumoral (Lechner et al., 2005). A concentração de NO parece ser um fator chave na ação dessa enzima sobre as células tumorais: baixas concentrações (<50 nM) estimulam o crescimento celular e inibem a apoptose; em concentrações intermediárias (entre 100nM e 300nM), há ativação de proteínas que favorecem o

crescimento tumoral, como Erk e HIF-1 α ; já altas concentrações (>300nM) inibem o crescimento e estimulam a apoptose, ativando p53 (Thomas et al., 2004). A produção de NO em baixas concentrações fisiológicas também tem sido associada a ativação de outras vias que desempenham importantes papéis na indução da sobrevivência celular, incluindo a via do Akt/mTOR. Um estudo demonstrou que a indução de níveis fisiológicos de NO em cultura de células de câncer de mama humano promoveu a ativação da cascata de sinalização do mTOR, com consequente aumento da síntese de proteínas, bem como provocou intensa expressão de ciclina D1, a qual esteve associada com a regulação positiva de pAkt (Pervin et al., 2007).

O NO está envolvido em diferentes estágios das transformações celulares que levam à malignização, tais como na transformação das células normais por meio da ativação de oncogenes e da perda da atividade anti-oncogênica; no crescimento das células já transformadas por intermédio da indução de dediferenciação e proliferação; na progressão do tumor a partir de lesões pré-neoplásicas; na angiogênese desencadeada por fatores angiogênicos liberados pelas células tumorais em si ou pelo tecido circundante; e na invasão local e metástase (Fukumura et al., 2006; Lechner et al., 2005).

O iNOS é a isoforma de NOS mais comumente expressa em neoplasias incluindo câncer de cólon, mama, próstata, bexiga e pele (Janakiram; Rao, 2012). No câncer bucal sua expressão foi correlacionada a pior estadiamento do tumor, metástase linfonodal e angiogênese em um estudo imuno-histoquímico envolvendo biópsias de CEC humano (Sappayatosok et al., 2009). Outros trabalhos demonstraram que houve aumento na expressão dessa enzima em CEC bucal quando este foi comparado a lesões displásicas bucais e epitélio normal, sugerindo que o aumento de iNOS e a geração de NO possuem um importante papel no desenvolvimento do CEC na mucosa bucal (Connely et al., 2005; Varghese et al., 2010).

No CEC de cabeça e pescoço a expressão em baixa concentração de iNOS e do óxido nítrico tem sido associada ao desenvolvimento de resistência a quimioterapia. Um estudo avaliou a participação de NO em altas (70 μ M no meio de cultura) e baixas (20 μ M no meio de cultura) concentrações em células de carcinoma de faringe (Fadu). O tratamento dessas células com NO em alta concentração inibiu

o crescimento das células, aumentando a morte celular por apoptose. Já a incubação das células com essa molécula em baixa concentração promoveu efeito contrário, inibindo a apoptose por meio do aumento da proteína anti-apoptótica survivina e estimulando a proliferação celular. Esses resultados indicaram que a superexpressão de NO promove a morte celular, enquanto baixos níveis dessa molécula induzem uma reposta celular citoprotetora (Fetz et al., 2009).

Nesse mesmo trabalho foi avaliada o papel do iNOS durante o tratamento com cisplastina. Baixos níveis dessa molécula neutralizaram os efeitos citotóxicos do tratamento, enquanto altos níveis de NO em combinação com esse quimioterápico aumentaram a morte celular por apoptose. A inibição da proteína survivina bloqueou os efeitos anti-apoptóticos de NO. O aumento da expressão de iNOS também foi relacionado com o aumento na expressão imuno-histoquímica de survivina em espécimes de carcinoma de cabeça e pescoço. Os autores concluíram que estratégias terapêuticas contra o eixo iNOS/survivina pode ser uma alternativa interessante no tratamento do câncer de cabeça e pescoço (Fetz et al., 2009).

2.4 Parte IV - Terapia fotodinâmica oncológica, CEC bucal e resistência tumoral

2.4.1 Terapia fotodinâmica oncológica

A PDT é um procedimento terapêutico que envolve inicialmente a administração (tópica ou sistêmica) de um fotossensibilizador (Fs) ou indutor deste. Em seguida realiza-se irradiação do local com uma luz de comprimento de onda adequado ao Fs, levando a ativação deste. Essa ativação, na presença de oxigênio, leva à intensa geração de espécies reativas de oxigênio, que induzem por sua vez a morte celular. Essa citotoxicidade é seletiva, ou seja, células com uma capacidade proliferativa maior (por exemplo, células tumorais) e células que se multiplicam

rapidamente (por exemplo, bactérias) captam preferencialmente o Fs, sendo então mais vulneráveis ao efeito da PDT (St Denis et al., 2011).

O diagrama de Jablonski, em uma versão adaptada (Figura 2.7), é o modelo utilizado para explicar o nível de energia das moléculas fotoexcitadas; nesse modelo é também demonstrada a formação de metabólitos intermediários originários da reação dessa molécula fotoexcitada com o oxigênio presente no interior da célula. Após a absorção de fótons, o Fs passa de seu estado singlete fundamental não-excitado (S_0) para um estado singlete excitado (S_2), que imediatamente sofre um relaxamento vibracional e atinge um estado de excitação menor (S_1), cuja meia vida é curta (nanossegundos). Nesse momento, as moléculas de Fs podem retornar novamente a seu estado fundamental através da emissão de luz (fluorescência) ou podem se converter para um estado tripleto (T_1) de menor energia. Nesse estado tripleto, as moléculas podem emitir luz visível (fosforescência) e também voltar ao estado fundamental. O estado tripleto tem meia vida mais longa (de micro a milissegundos) e pode reagir com o oxigênio celular por intermédio de dois mecanismos classificados como “tipo I” e “tipo II”. Ambos os mecanismos podem ocorrer simultaneamente, e a taxa entre os dois irá depender do tipo de Fs usado e das concentrações de substrato e oxigênio (Buytaert et al., 2007; Castano et al., 2004). Na reação do tipo I, o Fs, em seu estado tripleto, reage com substratos biológicos formando radicais livres, os quais reagem, por sua vez, com o oxigênio molecular originando radicais de anion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radicais hidroxilas (OH^-). Na reação do tipo II, o Fs, em seu estado tripleto, transfere energia diretamente para o oxigênio molecular no estado fundamental, formando espécies de oxigênio singlete (1O_2 , 3O_2) altamente reativas. Essas espécies reativas de oxigênio (EROs) induzem, então, a morte celular por diversas vias (Castano et al., 2004).

Figura 2.7 - Diagrama de Jablonski, referente aos níveis energéticos de moléculas fotoativadas (FS), adaptado para ilustrar os metabólitos intermediários da reação do fotossensibilizador excitado com o oxigênio celular durante a PDT

Um Fs ideal deve ser um composto único a fim de obter uma boa estabilidade no seu armazenamento. Deve ter um pico de absorção de fótons entre 600 e 800 nm, pois a absorção acima desses comprimentos de onda não fornece energia suficiente para excitar o oxigênio singlete. Não deve ser tóxico na ausência de excitação da luz, e deve ser rapidamente eliminado dos tecidos normais, minimizando assim os efeitos colaterais. Com relação às propriedades da luz, a escolha desta deve ser baseada no espectro de absorção do Fs e nas características da lesão (localização, tamanho, acessibilidade e propriedades ópticas do tecido). A eficácia clínica da PDT depende de uma dosimetria complexa, que deve incluir a dose de luz total, o tempo de exposição à luz e o modo de entrega desta (única ou fracionada) (Agostinis et al., 2011).

Nenhum dos três componentes principais da PDT (Fs, luz e oxigênio) é individualmente tóxico, mas juntos desencadeiam uma reação fotoquímica que resulta na geração de EROs, como descrito anteriormente, que pode levar à eliminação do tumor por três mecanismos distintos: 1) as EROs podem matar as células tumorais diretamente por apoptose ou necrose; 2) a PDT causa dano aos vasos associados ao tumor, privando as células tumorais de nutrientes e oxigênio, o que leva à morte celular devido a isquemia; 3) a PDT pode ativar uma resposta imune específica para o tumor, incrementando a defesa de sinalização contra as células tumorais (Castano et al., 2006).

A localização intracelular do Fs coincide com o sítio primário de dano celular devido à meia vida extremamente curta do oxigênio singlete e sua difusão limitada nos sistemas biológicos (Castano et al., 2004). A citotoxicidade gerada pela PDT resulta de dano irreversível em membrana plasmática, mitocôndria, lisossomos, complexo de Golgi e retículo endoplasmático. Alguns Fs são seletivos para determinadas estruturas celulares e promovem diferentes tipos de morte celular. Por exemplo, os Fs que se alojam nas mitocôndrias ou no retículo endoplasmático tendem a promover apoptose, enquanto os Fs localizados na membrana plasmática ou nos lisossomos tendem a induzir morte celular por necrose. O processo autofágico pode também ser desencadeado em resposta à PDT por Fs localizados nos lisossomos, retículo endoplasmático ou mitocôndria. A ativação a autofagia na PDT ainda não é muito conhecida. Há trabalhos demonstrando que Fs localizados na mitocôndria e retículo endoplasmático induzem a formação de autofagossomos nas células. A inibição da proteína anti-apoptótica Bcl-2 pelo Fs fotoativado na mitocôndria tem sido associada a esse fenômeno. A Bcl-2, em níveis normais, reage com a beclin e previne que essa proteína inicie a formação do autofagossomo. Assim, ao ser inibida a Bcl-2 pela PDT, a formação do autofagossomo pode ser desencadeada (Buytaert et al., 2007; Reiners et al., 2010).

O objetivo da PDT, portanto, é a destruição seletiva de células anormais enquanto preserva estruturas normais, por meio da fotossensibilização dessas células, seja através da administração de fotossensibilizadores exógenos (por exemplo, porfirinas, clorinas e ftalocianinas), seja pela administração de precursores de vias de biossíntese endógena (por exemplo, o ácido 5-aminolevulínico, 5-ALA) (Kormeili et al., 2004). O 5-ALA é um pré-Fs encontrado naturalmente no organismo que leva à síntese de porfirinas endógenas durante a formação do grupo heme. O 5-ALA é formado na mitocôndria por meio da succinil-coenzima A e da glicina; após várias reações enzimáticas é convertido em protoporfirina IX (PpIX) dentro da mitocôndria (Figura 2.8); a adição de íon ferro a PpIX pela enzima ferroquelatase induz a formação do grupo heme (Krammer; Plaetzer, 2007). A síntese de PpIX é controlada por um mecanismo de "feedback" negativo, no qual o grupo heme sintetizado reage com sítios da enzima 5-ALA sintetase, impedindo que esta entre na mitocôndria e perpetue o ciclo de síntese de porfirinas. O 5-ALA de origem exógena (administrado topicamente ou por via endovenosa) ultrapassa esse sistema de "feedback", não

permitindo que o grupo heme exerça sua função inibidora sobre a 5-ALA sintetase. Assim, há alta produção de PpIX, que passa a se acumular na célula (Figura 2.8) (Wachowska et al., 2011). Vale dizer que, devido à sua natureza hidrofílica, o 5-ALA não penetra facilmente pela membrana plasmática, sendo necessárias altas concentrações com longos tempos de incubação para se atingir um nível terapêutico ideal (Luksiene et al., 2001).

Figura 2.8 – Resumo da biossíntese da protoporfirina IX a partir do ácido 5-aminolevulínico de origem endógena e exógena

Nota: O 5-ALA é formado no interior da mitocôndria e é transportado para o citosol, onde é convertido a coproporfinogênio III por meio de várias reações enzimáticas. Quando o 5-ALA é de origem exógena, essa conversão ocorre diretamente no citosol. O coproporfinogênio III então é transportado para a mitocôndria, onde é convertido a protoporfirina IX.

O acúmulo preferencial de PpIX nos tumores em comparação a tecidos saudáveis é oriundo de vários fatores, tais como maior absorção celular do 5-ALA, menor atividade de enzimas ligadas à síntese do grupo heme e menor disponibilidade de ferro; esses fatores conferem redução da síntese do grupo heme, o que promove o acúmulo de PpIX na célula (Wachowska et al., 2011). A produção de PpIX pela via de síntese de heme é duas a 10 vezes maior em células malignas ou pré-malignas do que em células normais (Kormeili et al., 2004).

A PpIX possui vários picos de absorção, tais como 405, 510, 545, 580, 670 e 700nm; contudo o de maior interesse na PDT oncológica é a banda de Soret (na luz azul em 405nm). Devido à baixa penetração tecidual do comprimento de onda de 405nm, estudos com PDT têm utilizado fontes de luz no espectro do vermelho (620 e 635nm), que possui uma maior penetração tecidual (Torezan et al., 2009).

A produção de PpIX é realizada na mitocôndria, portanto a citotoxicidade da PDT mediada pelo 5-ALA (5-ALA-PDT) tem sido associada a mecanismos de morte por via mitocondrial. Contudo, a PpIX produzida na mitocôndria é rapidamente difundida para outros sítios intracelulares. Dois mecanismos de morte celular são então sugeridos: a via mitocondrial e a via induzida pelo estresse ao retículo endoplasmático. O tratamento com 5-ALA-PDT induz o acionamento da via mitocondrial por meio do aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial, da liberação do citocromo c, da ativação das caspases 3 e 9 e da subsequente fragmentação do DNA. A outra via envolve perda da homeostase de cálcio: danos no retículo endoplasmático promovem a liberação do cálcio armazenado nessa organela para o citosol, gerando a ativação maciça de enzimas que promovem a destruição de membranas, incluindo a mitocondrial; esse fenômeno ativa o processo apoptótico dependente de cálcio (Grebenová et al., 2003). A autofagia também tem sido associada a 5-ALA-PDT, por mecanismo ainda quase nada conhecido. Um trabalho demonstrou que células de osteossarcoma, quando tratadas com 5-ALA-PDT, exibiram alta taxa de apoptose e de autofagia, mas não de necrose. Os autores verificaram que a proteína RIP3, a princípio moduladora de processos de necrose, foi altamente associada a apoptose e a autofagia, nesse último caso promovendo a superexpressão de LC3-II, relacionada a formação de autofagossomos (Coupienne et al., 2011a).

2.4.2 Terapia fotodinâmica e CEC bucal

O tratamento convencional do CEC bucal frequentemente está associado a mecanismos de resistência terapêutica. Cerca de 1/3 dos casos tratados com cirurgia, radioterapia ou quimioterapia podem apresentar recidivas locais ou regionais, bem como metástases (Greenberg et al., 2003). Trabalhos clínicos recentes têm demonstrado que a PDT pode se constituir uma alternativa viável para o tratamento de CEC bucal. A PDT mediada pelo 5-ALA tem sido usado no tratamento de lesões potencialmente malignas (Chen et al., 2005; Tsai et al., 2004) e CEC bucal pouco invasivos (Chen et al., 2010; Fan et al., 1996) com resultados clínicos promissores (Biel, 2007; Jerjes et al., 2011a). Quando comparada às terapias convencionais (cirurgia, radio e quimioterapia), a PDT tem como vantagem o fato de ser uma técnica minimamente invasiva, que leva à destruição do tumor com preservação do tecido sadio. Essa é uma característica importante no tratamento de CEC bucal, pois os tratamentos convencionais, principalmente cirúrgicos, podem levar a perda excessiva de tecido sadio, resultando em sequelas estéticas e funcionais significantes (Biel, 2007).

Os protocolos de PDT para o tratamento de CEC bucal variam bastante. A administração de 5-ALA tem sido feita topicamente ou por via endovenosa com concentrações que giram em torno de 20% na alicação tópica (Chen et al., 2010) e 60mg/kg na aplicação sistêmica (Fan et al., 1996). O período de incubação do Fs varia entre 1,5h (Chen et al., 2010) a 2h (Fan et al., 1996), seguida por irradiação com uma luz de comprimento de onda na faixa de 630-635nm. Os parâmetros para a irradiação também são variáveis, com faixa de densidade de energia entre 100J/cm² (Fan et al., 1996) e 200J/cm² (Chen et al., 2010; Fan et al., 1996). Devido à baixa penetração do 5-ALA nas células e a baixa penetração da luz em 630nm (estima-se que a luz consiga atingir uma profundidade de 0,5 cm na mucosa bucal) (Konopka; Goslinski, 2007), a PDT mediada pelo 5-ALA tem sido utilizada no tratamento de lesões superficiais; tumores com profundidade maior que 2 mm não têm indicação para serem tratados com PDT utilizando 5-ALA de maneira tópica (Biel, 2010). Lesões mais profundas de CEC bucal têm sido tratadas com a administração sistêmica de Fs de segunda geração, como o m-tetrahidroxifenilclorina (mTHPC), seguido por irradiação a 652 nm (Jerjes et al., 2011b; Biel, 2006). Esses protocolos, contudo, também possuem

limitações inerentes à penetração do Fs e da luz, o que ainda restringe a indicação da PDT diante da ampla gama de situações clínicas de CEC bucal (Jerjes et al., 2012).

Apesar de a PDT ser uma alternativa interessante no tratamento do CEC bucal, há relatos na literatura de recidiva após esse tratamento. Esse fato sugere que existem situações em que as células tumorais do CEC bucal podem ser resistentes à PDT (de Visscher et al., 2013; Durbec et al., 2013). Em um estudo, o tratamento cirúrgico convencional de CEC T1 e T2 foi comparado com a PDT. A taxa de cura nos pacientes tratados com PDT e cirurgia foi de 86% e 76%, respectivamente, nos tumores em T1. Para os tumores em T2, a taxa de cura foi 63% com PDT e 78% com cirurgia. Pacientes com CEC T2 tratados com PDT exibiram maior taxa de necessidade de retratamentos devido a recidivas do tumor. Além disso, 14% dos pacientes tratados com PDT e 8% dos pacientes tratados com cirurgia exibiram metástase regional (de Visscher et al., 2013).

Não é sabido ainda se existem células de CEC bucal naturalmente resistentes à PDT (possuem uma resistência intrínseca) ou se elas podem desenvolver essa resistência durante o tratamento (resistência adquirida) (Zamarrón et al., 2015). Para alguns tumores, esse fato já está mais esclarecido, conforme apresentado a seguir.

2.4.3 Mecanismos de resistência tumoral à terapia fotodinâmica

É possível desenvolver *in vitro* células resistentes à PDT (resistência adquirida) por intermédio de ciclos repetitivos de tratamento em que gradativamente se aumenta a concentração do Fs e/ou o tempo de exposição a essa molécula, ou se mantém fixa a concentração do Fs, ampliando-se a dose de luz (Casas et al., 2011). Na Tabela 2.1 estão descritos os principais trabalhos relacionados a resistência à PDT. Em geral, os modelos de cultura de células utilizados para se obter populações celulares resistentes são similares àqueles empregados para testar drogas quimioterápicas e protocolos radioterápicos (Zamarrón et al., 2015). Para a PDT, nesses modelos o primeiro ciclo de tratamento elimina a maioria das células; contudo uma pequena porcentagem delas, entre 1 e 10%, pode sobreviver, sendo estas responsáveis pelo repovoamento da cultura após seu recultivo. Depois de vários ciclos de PDT, em que

gradativamente se aumenta a dose, e o recultivo das células sobreviventes, origina-se uma linhagem que exhibe um fenótipo mais “agressivo”, provavelmente derivado de alterações genéticas ou epigenéticas que modificam os padrões de migração, proliferação e morte celular (Zamarrón et al., 2015). Para definir uma população resistente, os critérios variam bastante. Em geral, considera-se resistente uma população que exhibe viabilidade 1,5 vezes maior do que sua parental após uma dose letal de 90% (DL90) (Zamarrón et al., 2015; Singh et al., 2001).

O desenvolvimento de resistência à PDT depende do tipo de Fs e da sua localização intracelular, bem como da linhagem celular empregada. Não foi identificada ainda nenhuma característica celular que possa ser preditiva de desenvolvimento de resistência à PDT. Acredita-se que a estrutura do Fs é um ponto chave no desenvolvimento da resistência, e essa característica provavelmente está relacionada com a sua localização subcelular (Casas et al., 2011).

Os trabalhos descritos na literatura, em geral, utilizaram Fs com localização na mitocôndria, basicamente porfirinas, no desenvolvimento de resistência a PDT (Casas et al., 2011). Em um estudo envolvendo três linhagens celulares humanas diferentes (neuroblastoma - ATCC-SK-N-MC, adenocarcinoma de colón - ATCC-HT29 e carcinoma de bexiga - ATCC-HT136) e três Fs diferentes (Azul do Nilo A, Photofrin e alumínio-ftalocianina tetrasulfonada - AIPcS₄), foi investigada a resistência intrínseca à PDT de cada linhagem em relação a cada Fs, bem como a tendência de haver resistência adquirida a essa terapia em função do tipo de tumor e do Fs. Os autores definiram como resistentes as populações celulares que exibissem viabilidade 1,5 vezes maior do que a de suas parentais diante de DL90. Para o Azul do Nilo A, a maior resistência intrínseca foi para a HT29; para o Photofrin, foi a HT136, e para o AIPcS₄, a SK-N-MC. Esse resultado indica ser essencial a seleção correta de cada Fs para cada tipo de tumor. Quanto à resistência adquirida, para a HT29 foi possível obter 4 linhagens resistentes a PDT, duas tratadas com Azul do Nilo A, uma com Photofrin e outra com AIPcS₄, após 8 a 11 ciclos de PDT. Já para a HT136, foi possível obter somente uma linhagem resistente, esta com Azul do Nilo A, após 9 ciclos de PDT. A linhagem SK-N-MC não exibiu nenhuma resistência. A HT29 e a HT136 tratadas com Azul do Nilo A foram as mais resistentes, gerando uma viabilidade celular quando utilizada DL90 de até 2,8 vezes maior do que a observada no primeiro ciclo de PDT. Os autores concluíram que a resistência tumoral à PDT é dependente do Fs e que

provavelmente existam mecanismos específicos de aquisição de resistência em função do tipo de tumor (Singh et al., 2001).

Alterações do efeito do 5-ALA sobre populações resistentes à PDT também têm sido relatadas. Por exemplo, em um trabalho utilizando linhagem celular de adenocarcinoma de mama murino, foi possível desenvolver clones celulares resistentes à 5-ALA-PDT. Clones resistentes foram isolados a partir do tratamento com ALA a 0,6mM e várias doses de luz (0,36-5,4J/cm²), visando alcançar níveis de sobrevivência entre 5-10%. As células sobreviventes foram coletadas 24 horas depois do tratamento e foram novamente plaqueadas. Após 2 semanas de crescimento, as células foram submetidas novamente a outro ciclo de tratamento. A população final recebeu 13 ciclos de tratamento, e oito clones foram isolados por diluição limitante. Dentre os oitos clones, foram selecionados o quarto e o oitavo, que apresentaram um aumento de 4,7 e 4,2 vezes na resistência. Esses clones resistentes apresentaram um aumento de duas vezes no volume celular, uma morfologia mais fibroblática, menor quantidade de PpIX, maior teor de proteínas e um aumento no número de mitocôndrias e no consumo de oxigênio (Casas et al., 2006). Alterações na mitocôndria também foram relatadas em células de fibrossarcoma resistentes a PDT mediada por Photofrin. Nesse trabalho as células foram submetidas a 8 ciclos de tratamento com concentrações crescentes do Fs. As mitocôndrias das células resistentes eram menores, mais elétron-densas, e apresentavam densidade de cristas maior do que a população parental. A quantidade de ATP e a atividade da succinato desidrogenase eram maiores na população resistente, contudo não foram encontradas diferenças no consumo de oxigênio. Considerando o fato de que a mitocôndria é alvo da PDT mediada por porfirinas, os autores concluíram que alterações na estrutura e função dessa organela podem estar relacionadas aos mecanismos de resistência a essa terapia (Sharkey et al., 1993).

Outro estudo utilizando um éster de ALA, o Me-ALA, desenvolveu uma população resistente de carcinoma epidermóide de pele (SCC13) depois de 10 ciclos de tratamento. A concentração de Me-ALA também foi mantida fixa (1mM, 4 horas de incubação) e a dose de luz aumentou gradativamente (7 a 25J/cm²). As definições das doses para induzir a resistência foram baseadas em uma taxa de viabilidade de 5 a 10%. As células sobreviventes foram coletadas 24h depois do tratamento e replaqueadas. Quando as células cresceram elas foram submetidas a um novo ciclo

de tratamento. Duas populações resistentes foram selecionadas: a população final, submetida a 10 ciclos de tratamento, e a população intermediária, submetida a cinco ciclos de tratamento. A quinta geração e a décima geração de tratamento apresentaram aumento na razão de resistência de 8,5 vezes e 9,5 vezes, respectivamente, em comparação com a primeira geração de tratamento. A intensidade de fluorescência da PpIX mensurada por citometria de fluxo foi menor nas populações resistentes submetidas a cinco ciclos e 10 ciclos quando comparada a da população parental, limitando assim a fotossensibilização. Com relação à localização subcelular, a PpIX foi localizada na membrana plasmática, na mitocôndria e nos lisossomos em todas as populações analisadas; na geração 5, a PpIX localizava-se também em vacúolos intracelulares, sugerindo que esses vacúolos poderiam estar agindo como sítios de sequestro do Fs. Além disso, as células resistentes exibiram melhor desempenho no ensaio de migração celular ("scratch assay") e maior expressão da proteína anti-apoptótica p-survivina quando comparadas a população parental. As células resistentes também apresentaram uma morfologia mais fibroblástica e maior proporção de micronúcleos e macronúcleos. Os autores concluíram que essas características distintivas das células resistentes podem fornecer informações para melhorar a eficácia do tratamento (Milla et al., 2011).

Tabela 2.1 – Principais modelos *in vitro* de resistência a PDT descritos na literatura. Adaptado de Zamarrón et al. (2015)

Linhagem Celular	Fs e Concentração empregada	Tempo de Incubação do Fs	Dose de Luz (J/cm²)	Número de ciclos	Tipo de Seleção	Aumento na resistência	Referência
RIF-1 (fibrossarcoma murino)	Porfirina (25µg/ml)	1h 16h	0,2-0,84	10	Clonogênica	1,2-1,5 2,5-3	Luna et al. (1991)
HT29 (adenocarcinoma de cólon humano)	Photofrin (1-100ug/ml)	18-4hs	2,7	14	População total	1,5	Singh et al. (2001)
	Azul do Nilo A (1-3µg/ml)	1h-30min	8,1	8		2,62	
	AIPcS4 (25-50µg/ml)	18-4h	5,4	11		5,4	
LM3 (Adenocarcinoma maário murinho)	ALA (0,6mM)	3h	0,36-5,4	13	Clonogênica	Clone 4 6,7 Clone 8 4,2	Casas et al. (2006)
SCC13 (Carcinoma epidermóide cutâneo)	Me-ALA	4h	7,31-25	10	População total	8,5-9,5	Milla et al. (2011)
Células KB (câncer oral)	Hematoporfirina (1-5 µM)	24h	40,55	6	População Total	Sem informação	Kim et al. (2013)
Fadu (Carcinoma de faringe)	Hematoporfirina (1 ou 2µM)	24h	4,5	15	População total	7,75-12,25	Kim et al. (2014)

Células de fibrossarcoma de rato resistentes a PDT (protocolo PII, como descrito abaixo) também exibiram células com núcleos maiores do que sua contraparte parental. Nesse trabalho clones resistentes a PDT mediada pela porfirina (Photofrin) foram desenvolvidos a partir de dois períodos de incubação do Fs diferentes (mantendo-se a concentração do Fs fixa): um período curto (1h - PI) e um período longo (16h - PII). A localização intracelular do Fs era também diferente nos dois períodos. As células foram submetidas a dez ciclos de tratamento, no qual houve variação na dose de luz (0,2-0,84J/cm²). Dois clones de cada protocolo foram isolados e avaliou-se o grau de resistência dessas células *in vitro* e *in vivo*. Os clones isolados da incubação de 1h com Fs apresentaram aumento na resistência entre 1,2-1,5 vezes; já os clones isolados da incubação de 16h apresentaram aumento entre 2,5-3 vezes. As variantes resistentes do protocolo PII foram então injetadas em camundongo singênicos C3H. O número de células necessárias para induzir tumor em 50% dos camundongos foi maior para os clones resistentes do que para a linhagem parental, indicando que a habilidade das células resistentes a PDT de induzir tumor é menor do que sua contraparte parental (Luna; Gomer, 1991).

Há indícios de existirem variações de resistência para um mesmo Fs de acordo com a linhagem celular empregada. Alguns estudos têm relatado que, com o 5-ALA-PDT, é possível gerar populações resistentes a partir de cultura de células de adenocarcinoma de mama murinho (Casas et al., 2006) e de carcinoma epidermóide cutâneo humano (Milla et al., 2011). Contudo não foi possível estabelecer uma população de glioma humano resistente à PDT mediada por esse Fs (Madsen et al., 2003; Hirschberg et al., 2006). Vale dizer que não há relatos na literatura do desenvolvimento de clones celulares de CEC bucal resistentes à 5-ALA-PDT. Somente um estudo (Kim et al., 2013) foi encontrado no qual foi induzida população resistente utilizando uma linhagem originalmente de câncer bucal (células ATCC-KB) tratadas com hematoporfirina. Contudo, relatos atuais sobre as condições dessa linhagem indicam alta contaminação por células HeLa¹, sendo necessária uma caracterização completa das células para confirmar seu fenótipo.

¹ Uma descrição da contaminação por células HeLa encontra-se no site da ATCC. Acesso em 8 de agosto de 2015. Disponível em <http://www.atcc.org/products/all/CCL-17.aspx>

Após a fotoativação do Fs, um dos primeiros mecanismos que podem contribuir para a sobrevivência celular é a inativação de EROs via enzimas antioxidantes. As EROs são agentes oxidantes que podem reagir diretamente com muitas moléculas biológicas, como resíduos de aminoácidos, lipídios insaturados e DNA, modificando-as por reações oxidativas, o que pode induzir danos irreversíveis induzindo a morte da célula tumoral (Castano et al., 2004). Portanto, os efeitos induzidos pela PDT podem ser antagonizados por mecanismos de defesas anti-oxidantes, como o sistema glutathiona e as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase ou desidrogenase lipoamida, contribuindo para a resistência a essa terapia. A expressão de proteínas de choque térmico ("heat shock proteins", HSP) pode também ajudar na recuperação dos danos provocados pela PDT, prevenindo a agregação protéica e ajudando a estabilizar proteínas (Casas et al., 2011). Autores (Kim et al., 2013) induziram a formação de uma população de câncer bucal (células ATCC-KB) resistente a PDT após tratamentos sucessivos, mantendo fixa a dose de luz e aumentando a concentração do Fs (hematoporfirina, 1 a 10 μ M). A expressão de HSP27 aumentou no primeiro e segundo ciclo de tratamento e diminuiu após o quarto ciclo. O silenciamento dessa proteína atenuou a apoptose induzida pela PDT no primeiro ciclo de tratamento e aumentou a expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2; diminuiu também a expressão das caspases 3, 8 e 9, de Bax e de PARP clivado. Os autores concluíram que a regulação negativa de HSP27 pode induzir a resistência a apoptose induzida pela PDT (Kim et al., 2013).

A expressão de PARP, mais especificamente PARP-1, foi avaliada também em células de CEC de faringe (Fadu) resistentes a PDT. Células resistentes foram desenvolvidas através da exposição a 15 ciclos com PDT mediada por hematoporfirina. Nas células submetidas a um ciclo de PDT, observou-se que essa terapia induziu a apoptose através da ativação das caspases 3 e 8, da clivagem de PARP-1 e da diminuição de Bcl-2. A inibição de PARP-1 conferiu resistência a apoptose induzida pela PDT e aumentou a expressão de LC3II, relacionada a autofagia. Nas células resistentes, os autores observaram que a expressão de PARP-1 aumentou, mas que a clivagem dessa proteína não foi observada nessas células. Os autores relataram também que a função de PARP-1, sem sua clivagem, em células com o DNA danificado seria reparar regiões danificadas, ativando ou recrutando

enzimas de reparo. Os autores concluíram que a resistência a PDT está relacionada com a autofagia pela regulação de PARP-1 (Kim et al., 2014).

A hipótese mais aceita para explicar a sobrevivência celular após a PDT seria o acionamento de vias de reparo de proteínas, membranas e DNA, bem como a ativação de genes de resposta ao estresse celular incluindo NF κ B, EGFR, FOS, MYC e ERK (Casas et al., 2011). Foi comentado nos itens anteriores desta revisão de literatura que a via PI3K/Akt é importante para a sobrevivência celular. Alguns trabalhos sobre resistência à PDT também apontam a importância dessa via de sinalização nesse processo. Por exemplo, um trabalho demonstrou que células de adenocarcinoma mamário que sobreviveram à PDT mediada pelo Photofrin exibiram expressão de fatores anti-apoptóticos induzidos pela quinase Akt. Nas células de adenocarcinoma mamário submetidas a dose sub-letal de PDT mediada pelo Photofrin (irradiação de 120mJ/cm² ou 240mJ/cm²) foi observada alta expressão da proteína anti-apoptótica Mcl-1 na primeira meia hora. Contudo a expressão de outras proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2 e Bcl-xl diminuiu, indicando que o Mcl-1 provavelmente desempenha um importante papel protegendo as células da apoptose induzida pela PDT em comparação com Bcl-2 e Bcl-xl. Células superexpressando Mcl-1 exibiram uma viabilidade celular maior e translocação mitocondrial de Bax atrasada. Contudo, a inibição de Akt por siRNA diminuiu os níveis de Mcl-1, o que coincidiu com a diminuição na fosforilação de Akt. A inibição de Akt também aumentou a apoptose em 6%, o que sugere que Akt desempenha um papel importante na regulação da expressão de Mcl-1 e na inibição da apoptose. A exposição das células a PDT com dose subletal também aumentou a expressão de NF κ B, contudo quando o Akt foi silenciado observou-se uma diminuição na expressão dessa proteína, indicando que a expressão desse fator de transcrição é parcialmente regulada por Akt. A exposição das células a um inibidor de NF κ B antes do tratamento com PDT também diminuiu os níveis de expressão de Mcl-1, indicando que a ativação desse fator de transcrição contribui para o aumento na expressão de Mcl-1 em resposta a PDT subletal. Além disso o tratamento das células com celecoxibe diminuiu a expressão de Mcl-1 e aumentou a apoptose induzida pela PDT, o que, segundo os autores, esteve intimamente relacionado com o efeito inibitório dessa droga na via do Akt. Os autores concluíram que Mcl-1 desempenha um importante papel protegendo as células da

apoptose e que a regulação negativa de Mcl-1 pela inibição do Akt restaura a morte celular por apoptose induzida pela PDT (Song et al., 2013).

A expressão de NF κ B em células de adenocarcinoma de cólon tratadas com PDT mediada por pyropheophorbide-a metylester (PPME) foi relacionada a sobrevivência celular. Nesse estudo, os autores observaram que, quando esse fator de transcrição era inibido por intermédio da superexpressão de I κ B, havia um aumento na sensibilização das células a apoptose induzida pela PDT. Os autores concluíram que NF κ B nessas células desempenha um papel de proteção contra a apoptose induzida pela PDT (Matroule et al., 2001). Outro estudo utilizou células do mesmo tumor, as quais foram tratadas com PDT mediada por hipericina com dose subletal (1J/cm²) seguida de dose letal (11J/cm²), após intervalo de 1h ou 6h no escuro. Os autores observaram que o longo intervalo de 6h no escuro, mas não o de 1h, conferiu resistência às células contra a segunda dose letal. O aumento na resistência foi associado à diminuição da externalização de fosfatidilserina e da produção de EROs, bem como ao aumento na expressão de NF κ B e da proteína anti-apoptótica Mcl-1. Os autores interpretaram o aumento na expressão dos fatores de sobrevivência NF κ B e Mcl-1 como mecanismos de resistência a terapia (Kuliková et al., 2010).

O efeito da PDT na ativação de NF κ B parece ser dose-dependente. Um estudo avaliou a expressão desse fator de transcrição em linhagem celular de melanoma tratadas com alta dose (letalidade de cerca de 50%) e baixa dose (letalidade de cerca de 20%) de PDT mediada pelo Fs pheophorbide (Pb α). O tratamento das células com baixa dose (120nM do Fs, 14J/cm²) induziu uma rápida inibição do crescimento, contudo após um tempo as células voltaram a proliferar novamente. Baixas doses de PDT também estimularam a migração celular, levando ao melhor desempenho no ensaio de fechamento de feridas, induziram a produção de baixos níveis de NO e inibiram a apoptose por intermédio da ativação de NF κ B e da expressão do fator anti-apoptótico Snail. Por outro lado, o tratamento das células com altas doses (250nM do Fs, 14J/cm²) de PDT estimulou a produção de altos níveis de NO: a expressão dessa molécula foi duas vezes maior do que a observada no tratamento com baixa dose e inibiu a expressão de NF κ B e Snail. Em conjunto esses resultados sugerem que altas doses de PDT possuem um efeito inibitório no crescimento tumoral, enquanto baixas doses induzem um efeito contrário, promovendo a sobrevivência celular pós-PDT por

meio da ativação de NF κ B e de Snail e da produção de baixos níveis de NO (Rapozzi et al., 2011). A participação do NO na indução da resistência a PDT será descrita posteriormente nesse capítulo.

Com relação ao mTOR, não há relatos na literatura acerca da expressão dessa proteína em populações celulares resistentes à PDT. O mTOR é abordado em estudos envolvendo a PDT sem indução de resistência, com o objetivo de verificar o papel dessa proteína no contexto de apoptose e autofagia induzidas pelo tratamento. Por exemplo, a análise da expressão dessa proteína nas células de HeLa (adenocarcinoma de cérvix) submetidas a PDT mediada pela hipericina revelou rápida diminuição da atividade dessa proteína e de Akt após 1h da PDT. A inibição dessas proteínas esteve relacionada com a autofagia. Quando a autofagia foi atenuada, através da inibição da proteína ATG5, houve um aumento na sensibilização das células a apoptose, indicando que nesse modelo a autofagia desempenha um papel de proteção contra os danos induzidos pela PDT (Dewaele et al., 2011).

Dois outros estudos demonstram haver diminuição da expressão de mTOR após o tratamento com PDT. No primeiro estudo, foi avaliada a expressão dessa proteína em células de adenocarcinoma de cólon submetidas a PDT mediada pelo AIPcS2a. Foi observada inibição da expressão de mTOR, tanto a forma total quanto a fosforilada, cinco minutos após o tratamento com uma dose que induziu letalidade de 35% (DL35). Os níveis de mTOR (total e fosforilada) voltaram aos níveis do controle 24h após ao tratamento. Não foi observada alteração na expressão de Akt nas células tratadas com PDT (Weyergang, et al., 2009). O segundo trabalho mostrou também que há diminuição da expressão de mTOR em células de carcinoma de faringe (Fadu) avaliadas em diferentes períodos após o tratamento com PDT mediada pela hematoporfirina. O tratamento com PDT induziu diminuição dessa proteína mesmo após 1h da PDT. Vinte e quatro horas depois do tratamento as células ainda apresentavam níveis de expressão de mTOR menor do que o controle (Kim et al., 2014).

Como já foi dito, o papel da autofagia na PDT é bastante controverso, podendo desempenhar um papel pró-sobrevivência ou pró-morte, dependendo da localização subcelular do Fs e do tipo de célula utilizada. Seu papel pró-morte está relacionado com a capacidade de a PDT induzir a morte celular autofágica; já seu papel pró-

sobrevivência está relacionado com a reciclagem de organelas ou alvos subcelulares danificados pela PDT (Garg et al., 2015). Há também variações no papel da resposta autofágica para um mesmo Fs. Na 5-ALA-PDT já foram descritos tanto o papel pró-sobrevivência em células de glioblastoma (Coupienne et al., 2011b), quanto o pró-morte em células de adenocarcinoma de pulmão (Ji et al., 2010). Além da natureza do Fs, a dose utilizada parece ser essencial no papel da autofagia induzida pela PDT. Um trabalho avaliou os efeitos de baixa dose (DL5 - 35 mJ/cm²) e alta dose (DL90 - 120mJ/cm²) na indução da resposta autofágica pós-PDT com dois Fs diferentes: um com localização no retículo endoplasmático (um tipo de Fs da família dos porfíricos) e outro na mitocôndria (um tipo de clorina) em uma linhagem de leucemia murina. Na dose baixa, com ambos Fs, a autofagia desempenhou um papel protetor, pois seu silenciamento aumentou a sensibilização das células ao fotodano induzido pela PDT. Já em doses elevadas (DL90), tanto a apoptose como a autofagia contribuíram para a morte celular induzida pela PDT. Portanto a autofagia oferece proteção contra os fotodanos induzidos pela PDT em baixa dose, mas pode servir como modo alternativo de morte celular quando a dose de PDT é aumentada (Kessel; Reiners Jr, 2007).

Com relação ao NO, já foi comentado anteriormente que baixos níveis dessa molécula estão associados a sobrevivência após a PDT (Rapozzi et al., 2011). O estudo descrito a seguir confirma esse resultado. O tratamento das células de tumor de mama com 1mM de ALA por 45 minutos, seguido de irradiação a dose de 1J/cm² ou 2J/cm² induziu entre 20-25% e 45-50% de morte celular por apoptose 24h após a PDT, fato que pode ser confirmado pelo aumento na ordem de quatro vezes na expressão das caspases 3 e 7. Observou-se um aumento de 3,2 vezes na expressão de iNOS 20h após a PDT nas células submetidas a 5-ALA/PDT na dose de 2J/cm². Não foram observadas alterações na expressão de NOS neuronal e endotelial. Quando a atividade de iNOS foi inibida, o índice de apoptose aumentou para 50 e 70% nas doses de 1J/cm² e 2J/cm². A inibição de iNOS também induziu um aumento adicional de 5 vezes na atividade das caspases 3 e 7. Os resultados sugerem que o aumento na resistência celular ao tratamento com PDT é devido à regulação positiva de iNOS (Bhowmick; Girotti, 2010). Nas células tratadas com PDT observou-se também a ativação e translocação de NFκB para o núcleo, bem como aumento de Akt. Ambas as proteínas foram associadas à indução de iNOS. Observou-se também um aumento na expressão de survivina nessas células tratadas com 5-ALA/PDT, e

que a inibição de iNOS aboliu esse aumento. A inibição de iNOS também induziu a expressão de proteínas relacionadas a indução da apoptose como p38 MAPK, JNK e do supressor tumoral p53. Esses resultados sugerem que iNOS desempenha papel de proteção contra os danos induzidos pela PDT por intermédio da ativação das vias Akt/NF κ B e da regulação positiva da proteína anti-apoptótica survivina (Bhowmick; Girotti, 2013). Resultados semelhantes foram também encontrados pelo mesmo grupo de autores utilizando 5-ALA-PDT em células de carcinoma de próstata (Bhowmick; Girotti, 2014). Nessa linhagem, o iNOS desempenhou um papel de proteção contra os danos induzidos pela PDT, bem como foi associado a um fenótipo mais agressivo das células. O iNOS ainda foi associado ao aumento da expressão da metaloproteinase 9 (MMP-9) e das integrinas α 6 e β 1 em células do mesmo tipo de tumor submetidas a PDT. Essas proteínas participariam então dos processos de invasão/migração induzidos pela PDT (Fahey; Girotti, 2015).

Não há relatos na literatura da expressão de iNOS em células de CEC bucal tratadas com PDT.

2.5 Hipótese

Considerando que o CEC bucal é uma neoplasia frequentemente caracterizada pela resistência a quimio e radioterapia e que há uma taxa considerável de recidivas após o tratamento com PDT, elaboramos a hipótese de que as células humanas de CEC de língua irão desenvolver resistência a PDT mediada pelo 5-ALA. Na Figura 2.9 está ilustrado um esquema hipotético da ativação de vias de sobrevivência com base nos trabalhos citados acima que podem contribuir para o desenvolvimento de resistência a PDT.

Figura 2.9 – Esquema hipotético que poderá explicar os fenômenos de resistência tumoral no CEC bucal

Nota: A indução de EROS pela PDT poderá acarretar ativação de PI3K, levando ao aumento da expressão de Akt. O aumento de Akt poderá levar ao aumento de mTOR, o que acarretaria inibição da autofagia. O aumento de Akt ainda pode levar indiretamente ao aumento de NFκB, por intermédio da fosforilação de IKK, fato que levará à liberação de NFκB do complexo inibitório e sua translocação para o núcleo. O aumento de Akt e de NFκB pode induzir a expressão Bcl-2, contribuindo para a inibição da apoptose. A 5-ALA-PDT pode ainda provocar o aumento de iNOS, o que poderia também contribuir para o aumento de NFκB e aumentar ainda mais a probabilidade de evasão da apoptose. Além disso, Akt e NFκB estão associados à progressão do ciclo celular. A progressão do ciclo celular, juntamente com a inibição da autofagia e da apoptose poderão explicar parcialmente a eventual resistência do CEC bucal à PDT mediada pelo 5-ALA.

3 PROPOSIÇÃO

3.1 Objetivo Geral

Verificar se células de CEC bucal desenvolvem resistência à 5-ALA-PDT e se há alterações na expressão de proteínas relacionadas à sobrevivência celular.

3.2 Objetivos Específicos

- a) Desenvolver modelo de resistência a PDT utilizando cultura de células de CEC bucal.
- b) Avaliar a viabilidade de células de CEC bucal após esses ciclos, para verificar se houve aquisição de resistência (menor índice de letalidade).
- c) Avaliar a morfologia nuclear, o potencial de migração e a concentração de protoporfirina IX nas células submetidas ao modelo de resistência.
- d) Avaliar a expressão de NF κ B, Bcl-2 iNOS, pAkt e pmTOR em células que sobrevivem a um ou mais ciclos de PDT.
- e) Desenvolver modelo de indução de CEC bucal em ratos utilizando 4-nitroquinolina-N-óxido (4NQO), bem como de protocolo de tratamento com 5-ALA-PDT.
- f) Verificar a expressão imuno-histoquímica das proteínas pAkt, pmTOR, iNOS, NF κ B e Bcl-2 nesses animais tratados ou não com 5-ALA-PDT.

4 MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia descrita a seguir foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa (Seres Humanos) da FOUSP (Parecer n. 736.016), Anexo A) e pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da FOUSP (Parecer CEUA-FOUSP 007/2013, Anexo B).

O presente estudo contém ensaios *in vitro*, envolvendo cultura de células de CEC bucal humano, e ensaio *in vivo* em ratos (Wistar), nos quais foram induzidas lesões de CEC bucal utilizando 4-Nitroquinoline 1-oxide (4-NQO).

4.1 Ensaios *in vitro*

4.1.1 Cultivo celular

Para os estudos *in vitro* foi utilizada a linhagem de carcinoma epidermóide humano de língua SCC9 (ATCC® CRL-1629). Células acondicionadas em criotubos no nitrogênio líquido foram descongeladas em banho-maria a 37°C e transferidas para frascos de cultivo contendo meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) / Nutriente Mixture HAM F12 (Gibco - Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) na proporção de 1:1, suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco - Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e 1% de antibiótico/ antimicótico (Gibco - Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Os frascos de cultivo foram mantidos a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. A manipulação das células ocorreu em fluxo laminar e seu crescimento foi analisado diariamente em microscópio invertido com contraste de fase (Axio Vert®, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha). O meio de cultivo foi trocado de acordo com o metabolismo celular, em média a cada dois dias.

Essas células foram submetidas a ciclos de 5-ALA-PDT com variações de protocolo até atingirem resistência à primeira dose empregada. Essa metodologia está

descrita no item 4.1.3. Para fins comparativos dessas populações celulares, foram então estabelecidos os seguintes grupos experimentais:

a) Grupo Controle (população parental) – células SCC9 sem nenhum tratamento, mantidas sob as condições experimentais descritas anteriormente.

b) Grupo PDT – células SCC9 tratadas com um a cinco ciclos de 5-ALA-PDT, com variações no protocolo, conforme descrito no item 4.1.3. A cada ciclo de PDT foi originada uma geração de células, denominadas segundo a sequência dos tratamentos (Geração 1 – primeiro ciclo de PDT; Geração 2 – segundo ciclo de PDT; Geração 3 – terceiro ciclo de PDT; Geração 4 – quarto ciclo de PDT; Geração 5 – quinto ciclo de PDT).

c) Grupo ALA – células da linhagem SCC9 submetidas somente à incubação com 5-ALA (mesmo protocolo de incubação utilizado para o Grupo PDT).

d) Grupo LED - células da linhagem SCC9 submetidas somente à irradiação com LED (mesmo protocolo de irradiação utilizado no Grupo PDT Geração 1).

4.1.2 PDT mediada pelo 5-ALA

As células foram cultivadas com 5-ALA (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) diluído em meio sem soro fetal bovino a uma concentração de 1mM (Yamamoto et al., 2013; Chen et al., 2011) por 4 horas em estufa a 37°C no escuro. Foram realizados ensaios variando a concentração e o tempo de incubação desse Fs, conforme descrito no Apêndice A. A maior eficácia do tratamento foi obtida com esse protocolo (1mM e 4h de incubação).

Após a incubação do Fs, o meio foi substituído por um novo meio sem soro e as células foram irradiadas com LED 630±5nm (3N's Lasers, São Paulo, Brasil), com área do spot de 3,84 cm². Com base nos modelos de resistência a PDT descritos na literatura, a primeira dose de PDT deve gerar 90% de letalidade (DL90) (Milla et al., 2011; Zamarrón et al., 2011). Para se chegar a esse valor, foram realizados ensaios variando o tempo de irradiação, utilizando 5-ALA a 1mM e 4h de incubação. Esses ensaios estão descritos no Apêndice A. Chegou-se então à dose de 5,86J/cm²

(equivalente a 150s de irradiação) como a do primeiro ciclo de PDT, a qual foi então variando a cada ciclo (vide Tabela 4.1).

Para se realizar a irradiação, o LED foi posicionado perpendicularmente e abaixo das placas de cultivo, com o tempo de irradiação programado diretamente no aparelho. Após esse procedimento, o meio foi trocado por outro contendo 10% de soro fetal bovino, e as células foram mantidas em estufa a 37°C.

4.1.3 Modelo de resistência à PDT

Populações ou clones celulares resistentes a PDT podem ser obtidos variando-se ou a concentração/tempo de incubação do Fs, ou a dose de irradiação (Casas et al., 2011). Neste trabalho foi adotado o modelo em que se varia a dose de irradiação. Foram realizados ciclos sucessivos de doses de irradiação crescentes e subletais (a taxa de letalidade foi mantida a 90% (DL90), aumentando-se 30 segundos a cada ciclo) (Milla et al., 2011). A concentração e o tempo de incubação do 5-ALA foram mantidos em todos os ciclos a 1mM e 4 horas, respectivamente. As doses variaram de 5,86 a 9,38J/cm², obtendo-se nesse processo 4 gerações resistentes (vide item 5.1.4 em Resultados). Para se entender que uma geração era resistente, essa população de células deveria exibir viabilidade celular 1,5 vezes maior do que a geração 1 diante da dose de 5,86J/cm² (Singh et al., 2001; Zamarrón et al., 2015). As gerações 4 e 5 foram submetidas a dose de 9,38J/cm², mas a viabilidade obtida após essa irradiação não atingiu o critério de resistência adotado.

A indução de resistência foi realizada conforme descrito a seguir. As células SCC9 (1,5x10⁵) foram cultivadas em placas de 12 poços por 24 horas (Figura 4.1). Com o intuito de que todas as células fossem irradiadas e evitar que o mesmo ponto fosse irradiado mais de uma vez, no fundo das placas foram aplicados adesivos contendo furos com diâmetro igual a área de spot do LED. No total 7 pontos foram irradiados, o que correspondeu a área total do poço (Sperandio, 2012). Após esse período, foram submetidas à 5-ALA-PDT com dose de 5,86J/cm². Vinte e quatro horas após a irradiação, as células sobreviventes foram tripsinizadas, coletadas e novamente cultivadas até que exibissem 80% de confluência em garrafas de 25cm²

(em média após 3 semanas). Após esse crescimento, as células eram então novamente submetidas a nova sessão de PDT, com aumento da dose mantido o critério de 90% de letalidade. Esse procedimento foi repetido cinco vezes, até a dose de $9,38\text{J}/\text{cm}^2$, obtendo-se 4 gerações resistentes. As células foram utilizadas até a 10ª passagem. A Figura 4.2 ilustra o esquema de indução de resistência à PDT adotado.

Figura 4.1 – Placa de 12 poços contendo os adesivos aplicados ao fundo

Figura 4.2 – Esquema de indução de resistência a PDT mediada por 5-ALA

A Tabela 4.1 exibe a dosimetria máxima empregada para cada geração de células. Nota-se que as gerações 3, 4 e 5 receberam doses iguais, mas, pelo ensaio de viabilidade celular, a resistência foi aumentando a cada geração (vide tabela 5.3 em Resultados).

Tabela 4.1 - Dose máxima de irradiação utilizada no protocolo de 5-ALA-PDT empregada para cada geração de células

Geração de células	Dose máxima
Geração 1	5,86J/cm ² , 22,5J, 150mW, 150s
Geração 2	7,03 J/cm ² , 27J, 150mW, 180s
Geração 3	8,20 J/cm ² , 31,5J, 150mW, 210s
Geração 4	8,20 J/cm ² , 31,5J, 150mW, 210s
	9,38 J/cm ² , 36J, 150mW, 240s
Geração 5	8,20 J/cm ² , 31,5J, 150mW, 210s
	9,38 J/cm ² , 36J, 150mW, 240s

Foi realizado controle da temperatura durante as irradiações, por intermédio de termômetro estéril inserido no meio de cultura. A temperatura média foi de 24,3±0,67 em todos os ensaios.

Para responder às questões de sobrevivência à PDT após 24h do tratamento, foram desenvolvidos ensaios de viabilidade e imunofluorescência para as proteínas anti-apoptótica Bcl-2, NFκB, iNOS, Akt e mTOR. Para responder às questões de resistência à PDT após obtenção de 5 gerações celulares, foram desenvolvidos ensaios de viabilidade, proporção de PpIX, imunofluorescência e western-blotting para as proteínas citadas, bem como migração e morfologia celular. A Figura 4.3 ilustra os tipos de ensaios para cada grupo.

Figura 4.3 – Esquema dos ensaios realizados para cada grupo de tratamento após o primeiro ciclo de tratamento (24 horas) e depois do desenvolvimento da população resistente

4.1.4 Viabilidade celular

Utilizou-se o ensaio MTS (sal tetrazolium) para se verificar o número de células viáveis. Células SCC9 foram cultivadas em placas de 96 poços de cor preta e fundo transparente (3500 células por poço) com 200µl de meio de cultura suplementado com 10% de soro fetal bovino por 24h. A Figura 4.4 ilustra a placa de 96 poços utilizada nesse ensaio. Após esse período, as células foram submetidas a tratamento com 5-ALA-PDT conforme descrito no item 4.1.2. O teste de viabilidade celular foi realizado com o MTS kit Cell Titer 96 (Promega, Madison, Wisconsin, EUA) após previa substituição do meio de cultivo (180µL). Foram adicionados 20µL da solução Cell Titer

96, seguida por incubação por 180min em estufa CO₂ a 37°C. Após esse período, foi quantificada a formação do sal formazan em um espectrofotômetro (ELX 800 Biotek Instruments Inc., Winooski, VT, EUA) com filtro de 490 nm. A reação baseia-se no princípio de que a quantidade de células viáveis é diretamente proporcional à absorbância obtida. Todos os experimentos de MTS foram realizados em sextuplicata.

Para verificar se as células sobreviventes da Geração 1 do grupo PDT eram viáveis em um período de 5 dias, o MTS foi realizado em 24, 48, 72 e 120h após a PDT. Nas demais gerações (segunda a quinta), o MTS foi realizado sempre 24h após a tratamento com PDT, para se verificar a existência ou não de resistência ao tratamento.

Figura 4.4 – Placa de 96 poços na cor preta com fundo transparente utilizada para os ensaios de viabilidade celular

4.1.5 Ensaio TUNEL

Para confirmar a morte celular encontrada nos ensaios de MTS, foi realizado ensaio TUNEL (TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling), o qual detecta fragmentação de DNA compatível com apoptose. Esse ensaio foi realizado em triplicata 24h após os tratamentos com ALA, LED e PDT geração 1; o grupo Controle foi mantido em estufa nesse período. Inicialmente células SCC9 ($1,5 \times 10^5$) foram cultivadas por 24h em lamínulas colocadas em placas de 12 poços contendo adesivos aplicados no fundo da placa (Figura 4.1) a fim de que todas as células fossem irradiadas (7 pontos de irradiação). Após esse período, as células foram submetidas aos diferentes

tratamentos e, 24h depois, foram fixadas com paraformaldeído a 4% por 20min em temperatura ambiente. Depois de fixadas, as células foram lavadas 3 vezes com PBS e, em seguida, foi feita permeabilização com uma solução de Triton X 100 a 0,2% diluído em PBS por 5 min. Em seguida, as lamínulas foram incubadas com os reagentes pertencentes ao kit Dead End Fluorometric TUNEL System (Promega, Inc, Madison, Wisconsin, EUA), de acordo com as instruções de fabricante. As células positivas foram quantificadas em microscópio de fluorescência (Axiolmager A1, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha), obtendo-se a porcentagem de positividade em um total de 500 células.

4.1.6 Dupla marcação com TUNEL e imunofluorescência

Foi realizada a dupla marcação com TUNEL e imunofluorescência para os anticorpos anti-NF κ B e anti-Bcl-2, anti-iNOS, anti-pmTOR e anti-pAkt no período de 24h após os diferentes tratamentos nos grupos Controle, ALA, LED e PDT Geração 1. A finalidade desse ensaio foi verificar a expressão desses marcadores nas células sobreviventes (TUNEL negativas) após os tratamentos. O protocolo de TUNEL foi realizado conforme descrito no item 4.1.5. Finalizado o TUNEL, as lamínulas foram imediatamente incubadas com BSA 1% diluído em PBS durante 30 min. Em seguida, foram incubadas com os anticorpos citados (vide as características da reação na Tabela 4.2) durante uma hora e meia em temperatura ambiente. As lamínulas foram então lavadas três vezes com PBS (5 min cada lavagem) e incubadas no escuro durante 1 hora e meia em temperatura ambiente com anticorpo secundário anti-IgG de camundongo ou anti-IgG de coelho conjugado a Texas Red (Vector Laboratories, CA, EUA). Após essa incubação, as células foram lavadas novamente três vezes com PBS e montadas com meio de montagem contendo DAPI (Vectashield®, Vector Laboratories, CA, USA). As lâminas foram analisadas em microscópio de fluorescência (Axiolmager A1, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha), quando então 500 células foram digitalizadas, selecionando-se campos com maior intensidade de fluorescência para ambas as reações. As células positivas para os marcadores citados

e negativas para TUNEL foram quantificadas utilizando-se ferramenta de contagem manual existente no programa Image J².

Tabela 4.2 – Características dos anticorpos utilizados nas reações de dupla marcação para TUNEL e imunofluorescência

Anticorpo primário	Procedência	Espécie	Diluição
Anti-NFκB p65	Zymed (policlonal)	Coelho	1:50
Anti-Bcl-2	Dako (clone 124)	Camundongo	1:25
Anti-iNOS	Abcam (policlonal)	Coelho	1:50
Anti-pmTOR (Ser 2448)	Cell signaling (clone 49F9)	Coelho	1:50
Anti-pAkt (Ser 473)	Cell signaling (clone D9E)	Coelho	1:50

4.1.7 Ensaio de migração celular

O ensaio de migração celular foi realizado com base nos resultados da literatura que demonstraram haver maior capacidade migratória das células resistentes à PDT (Milla et al., 2011). Para a realização desse ensaio, foram utilizadas membranas ("transwell") com poros de 8,0 µm de diâmetro para placas de 24 poços (Corning Incorporated Life Science, Tewksbury, MA, USA). Nesse ensaio, células são inseridas na parte superior do inserto com meio sem soro fetal bovino, e as membranas são colocadas sobre os poços contendo meio com 10% de soro fetal bovino. As células com capacidade de migração se movem em direção ao soro fetal bovino, passando pelo poro e ficando aderidas ao compartimento inferior do inserto. Células SCC9, pertencentes aos grupos Controle, ALA, LED e PDT Geração 1 e 5, foram tripsinizadas, contadas e resuspendidas em meio sem soro fetal bovino a uma concentração de 1×10^6 células/ml. Em seguida, 100µl dessa suspensão celular foram

² Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA. Disponível em <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2014.

adicionados à parte superior do inserto. Estes foram então acomodados nos poços contendo 500µl de meio com 10% de soro fetal bovino e foram mantidos em estufa por 24h. Após esse período, o meio de cultivo dos insertos foi descartado e estes foram lavados duas vezes em PBS. Em seguida foram fixados em paraformaldeído 4% por 2 minutos e em álcool metílico por 20 min. Foram então lavados novamente com PBS e corados por 30 min com azul de toluidina 1% (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) diluído em PBS contendo 1% de tetraborato de sódio (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA). As células do compartimento superior do inserto, ou seja, aquelas que não migraram, foram removidas com o auxílio de um cotonete. Os insertos foram então acomodados em PBS para serem observados ao microscópio, procedendo-se então a contagem das células que migraram. Para tanto, foram digitalizados 5 campos de maior densidade celular no aumento final de 200x, utilizando câmara digital acoplada a microscópio invertido de contraste de fase (Zeiss®Axiovert – Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha).

4.1.8 Análise da morfologia celular

As células dos grupos Controle e PDT Gerações 1 e 5, depois de exibirem 80% de confluência, foram cultivadas por 24h em lamínulas (1×10^5 por lamínula) em placas de 12 poços. Após esse período, as células foram fixadas em paraformaldeído 4% (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) diluído em PBS e coradas por 1h com azul de toluidina 1% (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) diluído em PBS contendo 1% de tetraborato de sódio (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Depois de coradas, as lamínulas foram lavadas três vezes com PBS e montadas com meio de montagem Ervmount (Easypath®, Erviegas, São Paulo, Brasil). Para análise da morfologia celular, campos foram digitalizados em regiões de maior densidade celular (aumento final de 400x), até se obterem 500 células. Área, perímetro e fator de forma dos núcleos foram calculados a partir do contorno dos mesmos utilizando ferramenta de desenho disponível no programa Image J. Vale dizer que o fator de forma (FF) é a relação entre a área (A) e o perímetro (p) de figuras geométricas e é obtido a partir da fórmula abaixo:

$$FF = \pi \times A / p^2$$

Ao ser aplicado para os núcleos celulares, esse cálculo fornece o índice de circularidade dessas estruturas: quanto mais próximo de 1, mais o objeto se aproxima de um círculo perfeito. Essa análise foi realizada partindo-se da hipótese de que as células resistentes exibiriam morfologia alterada em relação ao controle, adquirindo formato mais irregular (menos circular), bem como exibindo variações nas suas dimensões (Milla et al., 2011).

4.1.9 Quantificação da protoporfirina IX

Para os grupos Controle, ALA e PDT Geração 1 e 5, foi realizada quantificação da PpIX por citometria de fluxo. Esse ensaio foi realizado com base nos resultados da literatura que demonstraram haver menor quantidade de PpIX em células resistentes à PDT (Milla et al., 2011; Casas et al., 2006). As células desses grupos foram mantidas em frascos de cultivo de 25cm² até atingirem 80% de confluência. Em seguida, para os grupos ALA e PDT, as células foram incubadas (4h em estufa a 37°C no escuro) com 1mM de 5-ALA diluído em meio sem soro fetal bovino. Para o grupo Controle, as células foram mantidas sobre as mesmas condições, mas não foram submetidas a nenhum tratamento. Após o tratamento com 5-ALA, as células foram tripsinizadas e centrifugadas a 1500rpm por 5min, ressuspensas em PBS e centrifugadas novamente. Em seguida, foram fixadas com paraformaldeído a 4% por 20min a temperatura ambiente. Depois de fixadas, as células foram centrifugadas novamente, ressuspensas em 500µl de PBS e mantidas em gelo até a leitura no citômetro. A emissão de PpIX foi detectada usando o citômetro FACS callibur $\lambda_{exc}=488nm$ e $\lambda_{em}=670nm$ (BD Bioscience, San Jose, CA, USA). A intensidade de fluorescência foi determinada em 10.000 eventos.

4.1.10 Imunofluorescência após indução de resistência à PDT

Células dos grupos Controle, ALA, LED e PDT Geração 1 e 5 foram cultivadas por 24h em lamínulas circulares de 18mm (1×10^5 célula/poço) em placas de 12 poços. As células foram então fixadas com paraformaldeído 4% contendo 0,05% de TritonX por 20min em temperatura ambiente, lavadas três vezes com PBS e mantidas em geladeira até a realização das reações de imunofluorescência. Primeiramente, as lamínulas foram incubadas com BSA 1% diluído em PBS durante 30min. Em seguida, o excesso de BSA foi removido com o auxílio de um papel filtro e as células foram incubadas com os anticorpos primários anti-pNF κ B e anti-Bcl-2, anti-iNOS, anti-pAkt e anti-pmTOR durante uma hora e meia em temperatura ambiente. As características dos anticorpos utilizados são apresentadas na Tabela 4.3. Em seguida, as lamínulas foram lavadas com PBS (três lavagens de 5min cada) e incubadas com anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado ao FITC (Vector Laboratories, CA, USA) durante 1h em temperatura ambiente. As lamínulas foram então lavadas três vezes com PBS (5min cada) e montadas com meio de montagem contendo DAPI (Vectashield®, Vector Laboratories, CA, USA). As lâminas foram analisadas em microscópio confocal Zeis LSM 510 META (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha).

Tabela 4.3 – Características dos anticorpos utilizados nas reações de imunofluorescência após indução de resistência à PDT

Anticorpo Primário	Procedência	Espécie	Diluição
Anti-pNF κ B p65	Abcam (policlonal)	Coelho	1:50
Anti-Bcl-2	Abcam (policlonal)	Coelho	1:50
Anti-iNOS	Abcam (policlonal)	Coelho	1:50
Anti-pmTOR (Ser 2448)	Cell signaling (clone 49F9)	Coelho	1:50
Anti-pAkt (Ser 473)	Cell signaling (clone 193H12)	Coelho	1:50

4.1.11 Quantificação de proteínas por Western blotting

Foi realizada quantificação das proteínas NF κ B, Bcl-2, iNOS, Akt e pmTOR para os grupos Controle, ALA, LED e PDT Gerações 1 e 5, após indução de resistência à PDT. Células desses grupos foram cultivadas em placas de 60mm de diâmetro até atingirem 80% de confluência. O meio de cultura foi então descartado e as células foram lavadas com PBS no gelo. Para extração de proteínas, as células foram raspadas com o auxílio de "cell scraper" imersas em tampão RIPA (50mM Tris-HCl, 150mM cloreto de sódio, 1% TritonX, 1% desoxicolato de sódio, 0,1% de SDS, 1mM EDTA) acrescido de inibidor de protease (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). Essa solução foi então coletada e centrifugada a 11000rpm por 20min a 4°C. Depois da centrifugação, o sobrenadante foi coletado e as proteínas foram quantificadas pelo método do ácido biocinconínico (BCA) (Protein Assay Reagent Kit, ThermoScientific, EUA). As amostras foram então alíquotadas em microtubos a uma concentração 30 μ g de proteína e congeladas em -80°C até a realização dos ensaios de Western blotting.

As alíquotas foram diluídas em tampão da amostra (3% de dodecil sulfato de sódio, 150mM Tris pH6,8, 15% de β -mercaptoetanol, 30% de glicerol e 0,01% de azul de bromofenol) e, em seguida, mantidas em banho-maria a 95°C. Após a desnaturação das proteínas, as amostras foram submetidas a eletroforese SDS-PAGE com gel de corrida a base de acrilamida a 100V em temperatura ambiente. A concentração de acrilamida foi definida de acordo com o peso molecular das proteínas estudadas, variando de 7,5 a 10%. Foi utilizada cuba para eletroforese vertical (BioRad, Hercules, CA, USA) acoplada a fonte de elétrons (LPS 300V, Loccus do Brasil LTDA, São Paulo, Brasil). Para o controle da eletroforese e posteriormente do blot, utilizou-se padrão de peso molecular Precision Plus Kaleidoscope Protein Standard (Bio Rad, Hercules, CA, USA). Após a eletroforese, procedeu-se a transferência das proteínas do gel de acrilamida para membrana de nitrocelulose (Amersham-GE Healthcare Life Science, Little Chalfont, Reino Unido) sob voltagem de 60V por 1h e 30 minutos a 4°C. Somente para o pmTOR a transferência foi realizada sob voltagem de 25V a 4°C por 16h, devido ao alto peso molecular dessa proteína. Depois da transferência, as membranas foram incubadas com BSA 5% por

1h, para bloqueio de sítios inespecíficos. Em seguida, foram incubadas "overnight" a 4°C com os anticorpos primários anti-pNFκB, anti-Bcl-2, anti-iNOS, anti-pAKT, anti-pmTOR e anti-β-actina. Na Tabela 4.4 encontram-se as características dos anticorpos utilizados nesse procedimento. Após a incubação com o anticorpo primário, as membranas foram lavadas em TBST (150mM cloreto de sódio, 20mM Tris base pH7,6, 0,1% Tween 20) sob agitação em temperatura ambiente (3 lavagens de 5min cada) e, em seguida, foi realizada a incubação com anticorpo secundário anti-mouse IgG e anti-rabbit IgG conjugado a HRP (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, MA, USA), por 1h30min em temperatura ambiente. Em seguida, as membranas foram lavadas com TBST (3 lavagens de 5min cada) e imersas em solução contendo luminol (ECL Prime, Amersham-GE Healthcare Life Science, Little Chalfont, Reino Unido) para análise por quimioluminescência. As membranas foram então digitalizadas em escaner para blot (C-Digit®, Li-Cor Biosciences, Lincoln, Reino Unido). A quantificação das bandas foi feita pela análise de densidade utilizando o programa Image J. Os ensaios de Western blotting foram feitos em triplicata experimental para todos os grupos.

Tabela 4.4 – Características dos anticorpos utilizados nas reações de Western blotting após indução de resistência à PDT

Anticorpo Primário	Procedência	Espécie	Diluição
Anti-pNFκB p65 (S536)	Abcam (policlonal)	Coelho	1:500
Anti-Bcl-2	Abcam (policlonal)	Coelho	1:1000
Anti-INOS	Abcam (policlonal)	Coelho	1:1000
Anti-pmTOR (Ser 2448)	Cell signaling (clone 49F9)	Coelho	1:1500
Anti-pAkt (Ser 473)	Cell signaling (clone 193H12)	Coelho	1:2000
Anti-βactina (clone AC-15)	Sigma	Camundongo	1:5000

4.2 Ensaio *in vivo*

Foi realizado ensaio *in vivo* com o objetivo de verificar, em um tumor tratado com 5-ALA-PDT, a expressão das mesmas proteínas analisadas *in vitro*. Esse ensaio incluiu a indução de CEC de língua em ratos a partir da administração de 4NQO na água de beber. Vinte animais (*Rattus norvegicus*, Wistar) machos, com cerca de 200g, foram aleatoriamente divididos em dois grupos:

- a) *Grupo controle* – 10 animais com indução de CEC de língua, mantidos até o final do experimento sem nenhum tratamento.
- b) *Grupo PDT* – 10 animais com indução de CEC de língua, tratados com PDT mediada pelo 5-ALA.

4.2.1 Indução do CEC em língua utilizando 4NQO

Os animais foram mantidos em gaiolas individuais, com temperatura e umidade controladas e ciclo claro-escuro. Água e ração comercial (Labina, Purina, Brasil) foram oferecidos *ad libitum*.

Foi adotado modelo de carcinogênese bucal a partir da administração de 4-nitroquinolina-1-óxido (4-NQO) na água de beber. Nesse modelo, lesões de CEC se desenvolvem na cavidade bucal a partir de 28 semanas de contato com o carcinógeno (Yamamoto et al., 2006). O 4NQO (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foi diluído em água a uma concentração de 20ppm; 400ml/semana dessa solução foram então disponibilizados aos animais durante 24 semanas. Depois desse período, os animais receberam uma dose de manutenção de 5ppm por 4 semanas. Vinte e oito semanas após o início da indução das neoplasias, os animais do grupo PDT cuja lesão sugestiva de CEC estava com um diâmetro de pelo menos 5mm foram submetidos ao tratamento com 5-ALA-PDT, conforme descrito no item 4.2.2. Os animais do grupo Controle que também exibiam lesões similares foram submetidos às mesmas condições, porém não receberam nenhum tratamento. Dois animais do grupo PDT e um animal do grupo Controle foram excluídos do experimento pois não apresentavam lesões compatíveis com CEC depois das 28 semanas de indução.

4.2.2 Terapia fotodinâmica mediada pelo 5-ALA

As lesões de CEC foram tratadas com sessão única de 5-ALA-PDT, utilizando protocolo semelhante ao adotado para a cultura de células, porém com variações na dose de ALA e na fluência, as quais foram adaptadas para o modelo *in vivo* com base no protocolo descrito em Ma et al. (1999). Os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de quetamina e xilazina (50mg/kg e 0,8mg/kg, respectivamente). Em seguida, 5-ALA (500mg/kg de peso) foi injetado por via intraperitoneal e, após 2h, foi feita irradiação utilizando LED (630nm, 120s, 150mW, área do spot 384mm²). Considerando que as lesões de CEC exibem infiltração e diante da variabilidade de padrões de crescimento e de localização dos tumores entre os animais, a irradiação visou atingir a mucosa do dorso e do ventre lingual integralmente. Dessa forma, quatro pontos foram irradiados: um na região central do dorso, um na região central do ventre, um na borda lateral direita da língua e outro na borda lateral esquerda. Os animais do grupo Controle foram também anestesiados, mas não sofreram nenhum tratamento.

Durante a indução do CEC com 4NQO, houve alto índice de mortalidade (50% do grupo PDT e 60% do grupo Controle), e os animais viáveis exibiram grande perda de massa corpórea. Um mês após o início da indução, os animais apresentaram média de perda de massa de corpórea (massa inicial - massa final) de 25,0±17,1g no grupo Controle e 25,2±12,7g no grupo PDT. Os animais apresentaram média de massa corpórea de 138,6±27,9g no grupo controle e 140,0±25,1g no grupo PDT nesse período. Um mês antes do sacrifício, ou seja, 24 semanas após o início da indução, os animais exibiram recuperação de peso, apresentando média de massa de corpórea de 199,3±39,1g e 227,2±31,1. Contudo, ao final da indução (após 28 semanas), os animais apresentaram novamente perda de massa corpórea de 30±23,2g no grupo Controle e 32,2±44,3g no grupo PDT em relação ao período de 24 semanas. Diante disso, optou-se por realizar somente um ciclo de PDT, em função da administração sistêmica do ALA e da necessidade de anestesia geral para a irradiação. Esse ensaio então limitou-se a simular a situação do grupo PDT Geração 1 do ensaio *in vitro*.

4.2.3 Eutanásia, processamento e análise histológica

Os animais sofreram eutanásia 24h após a PDT com dose letal de anestésico. A língua então foi retirada e seccionada longitudinalmente; uma das metades foi fixada em paraformaldeído 4% tamponado por 24h e a outra metade, congelada a -80°C . Depois de fixadas, as línguas foram lavadas com PBS e processadas para inclusão em parafina, sendo inicialmente imersas em solução de álcool etílico em concentrações crescentes (do álcool 80% ao absoluto). Em seguida foram diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. Foi realizada microtomia (Cut4060, Olympus, Shinjuku, Tokyo, Japão) para obtenção de cortes histológicos de $3\mu\text{m}$ de espessura, os quais foram então corados com hematoxilina e eosina e analisados em microscopia de luz convencional, para confirmação do diagnóstico de CEC e da descrição do efeito da PDT sobre o tumor.

4.2.4 Análise imuno-histoquímica

Foram obtidos cortes de $3\mu\text{m}$ de espessura dos fragmentos de língua incluídos em parafina. Os cortes foram dispostos em lâminas tratadas com 3-aminopropil-trietoxissilano (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) e desparafinizados em dois banhos sucessivos de xilol em temperatura ambiente. Em seguida, foram reidratados em concentrações decrescentes de álcool etílico (do álcool absoluto à solução de etanol a 85%), com posterior remoção de pigmento formólico em solução de etanol 95% com 10% de amônia. A recuperação antigênica foi realizada em banho-maria a 95°C com diferentes soluções, conforme descrito na Tabela 4.5. Em seguida, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena com duas imersões de 15min cada em solução de metanol e peróxido de hidrogênio a 3%. Após o bloqueio da peroxidase endógena, os cortes foram lavados em dois banhos de 1min cada em água destilada e em dois banhos em TBST (150mM de NaCl, 20mM de Tris base pH7,6, 0,1% de Tween 20). Em seguida, foi realizado o bloqueio de sítio inespecífico conforme descrito na Tabela 4.5. Depois do bloqueio de sítio inespecífico, as lâminas foram incubadas com os anticorpos primários anti-NF κ B, anti-Bcl-2, anti-iNOS, anti-pAkt e

anti-pmTOR. As características de cada anticorpo e da incubação encontram-se descritas na Tabela 4.5. Após a incubação com o anticorpo primário, as lâminas foram lavadas com TBST (três banhos de 5min cada) e, em seguida, realizou-se incubação com anticorpo de ligação biotinilado (30 min) e com complexo terciário (30 minutos) (LSAB kit peroxidase, Dako Corporation, Carpinteria, CA, EUA); cada incubação foi intercalada com três imersões em solução de TBST (5 min cada). A revelação foi realizada com diaminobenzidina (DAB) (Dako Liquid DAB Plus, Dako Corporation, Carpinteria, CA, EUA) e a contracoloração, com hematoxilina de Mayer. Os cortes foram então desidratados em banhos sucessivos de 1min em cadeia crescente de etanóis (de 70% até absoluto) e diafanizados com xilol (dois banhos de 5min). Para a montagem das lâminas, foi realizada montagem automatizada (Tissue-Tek® SCA, Sakura, EUA) com fita de polietileno (Coverslipping Film Finetek, Sakura, EUA). As reações foram analisadas em microscópio de luz comum, observando-se o padrão e a intensidade de marcação para cada proteína em cada grupo.

Tabela 4.5 – Características dos anticorpos, da recuperação antigênica, do bloqueio de sítios inespecíficos e tempo de incubação e diluição dos anticorpos nos ensaios de imunohistoquímica

Anticorpo Primário	Procedência	Espécie	Recuperação Antigênica	Bloqueio	Incubação
Anti-NF κ B p65	Zymed (policlonal)	Coelho	Ácido cítrico 30 min	Soro Suíno 10% 30 min	1:100 Overnight
Anti-Bcl-2	Dako (clone 124)	Camundongo	EDTA 45 min	Soro Suíno 10% 30 min	1:25 Overnight
Anti-INOS	Abcam (policlonal)	Coelho	Ácido cítrico 45 min	BSA 1% 30 min	1:50 Overnight
Anti-pAkt (Ser 473)	Cell Signaling (193H12)	Coelho	EDTA 45 min	BSA 1% 30 min	1:50 Overnight
Anti-pmTOR (Ser 2448)	Cell signaling (clone 49F9)	Coelho	Ácido cítrico 45 min	BSA 1% 30 min	1:50 Overnight

4.2.5 Quantificação da área de marcação imuno-histoquímica

Para análise da área de marcação imuno-histoquímica, procedeu-se a digitalização de cinco campos em regiões de marcação mais intensa no aumento final de 400x. A digitalização foi realizada com câmera Leica DFC 295 acoplada ao microscópio Leica DM 250 (Leica Biosystems, Wetzlar, Alemanha) e programa de aquisição e processamento de imagens LAS® (Leica Biosystems, Wetzlar, Alemanha). A intensidade de luz foi padronizada em todas as digitalizações. As imagens digitalizadas foram mantidas com formato RGB, resolução de 2048X1536 pixels e extensão jpg. Em seguida, foram submetidas ao processo de deconvolução da cor utilizando *plugin (Colour deconvolution)* no programa ImageJ. O método foi criado para cortes histológicos e para imuno-histoquímica por Ruifrok e Johnston (2008) e disponibilizado sob a forma de *plugin* para o ImageJ por Landini (2010). Consiste na separação matemática de cores do espectro RGB (*red, green, blue*) em imagens com combinações de até 3 cores diferentes. As lâminas digitalizadas estavam coradas pela DAB, na qual a marcação exibe coloração amarronzada. Foi utilizado então o *plugin HE-DAB*, o qual permite a separação dos tons de azul (referentes à hematoxilina) do marrom (referente ao DAB e, portanto, à marcação). O intervalo de tons de marrom representativos da marcação foi então selecionado no histograma de tons da imagem (Figura 4.5), sendo mantido esse intervalo de seleção para todos os campos. Foi realizada a padronização dessa seleção individualmente para cada proteína. Em seguida essa área selecionada foi quantificada, obtendo-se a porcentagem de marcação relativa à área total do campo (Figura 4.5).

Figura 4.5 – Exemplo de quantificação da área de marcação do DAB utilizando a técnica de deconvolução da imagem e o programa Image J. A: Imagem original evidenciando a marcação imuno-histoquímica pelo DAB. B e C: Após a deconvolução, a imagem original é convertida em duas imagens, uma contendo a cor azul - hematoxilina (B) e a outra com o marrom - DAB (C). D: Seleção do tom marrom da imagem C por intermédio do histograma de tons e quantificação da porcentagem de marcação

4.3 Análise estatística

Os dados numéricos paramétricos foram apresentados em média e desvio-padrão, e os dados não paramétricos, em mediana e valores mínimo e máximo. Para comparação entre os grupos nos testes de viabilidade, migração e morfologia celular, bem como para o teste de Western blot, foi realizada análise de variância ANOVA um critério, seguido do teste de Tukey. A comparação entre as proporções de células no teste de dupla marcação entre TUNEL e imunofluorescência, bem como a proporção de macro e micronúcleos, foi realizada pelo teste Binomial de duas proporções. A comparação entre os grupos quanto à área de marcação imuno-histoquímica foi realizada pelo teste de Mann-Whitney. O nível de significância adotado foi de 5%.

5 RESULTADOS

5.1 Ensaaios *in vitro*

5.1.1 Viabilidade celular após o primeiro ciclo de PDT

A Figura 5.1 ilustra a média de absorbância no teste de MTS encontrada para a PDT com dose de irradiação inicial de $5,86\text{J/cm}^2$ (1mM de ALA, tempo de incubação de 4h) (PDT geração 1) em comparação aos demais grupos. Foi analisada a viabilidade celular durante um período de cinco dias depois da PDT, com o intuito de verificar se as células sobreviventes à terapia ficavam viáveis. No primeiro dia após o tratamento, o grupo PDT exibiu a menor viabilidade celular em relação aos demais períodos analisados (4,8%). Esta se manteve significativamente abaixo em todos os períodos analisados quando comparada aos demais grupos. No terceiro dia o grupo LED apresentou viabilidade celular maior do que os grupos Controle e ALA, mas no quinto dia a viabilidade celular entre esses grupos foi similar. Não houve diferença estatística entre controle e ALA em nenhum dos períodos experimentais analisados, mostrando que o ALA sozinho não é capaz de induzir citotoxicidade. O experimento sugere que, apesar de ser mantida em menor taxa, as células no grupo PDT se mantêm viáveis em um período de cinco dias, fato que contribuiu para a idealização da metodologia de resistência tumoral. Há também indício de que, em algum momento, o LED sozinho estimulou o crescimento das células tumorais.

Análise de variância ANOVA seguida de teste de Tukey. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

Figura 5.1 - Média ($\pm$ desvio-padrão) de absorbância (nm) obtido no teste de viabilidade celular (MTS) para cada grupo, durante um período de crescimento celular de 5 dias

5.1.2 Ensaio de TUNEL após o primeiro ciclo de PDT

A Tabela 5.1 mostra a porcentagem de células TUNEL positivas, quantificadas após 24h do primeiro ciclo de PDT. O ensaio confirma a baixa viabilidade celular no grupo PDT, com média de 94% das células desse grupo exibindo fragmentação do DNA indicativa de apoptose.

Tabela 5.1 - Média ($\pm$ desvio-padrão) de células positivas no teste de TUNEL

	Células positivas (%)
Controle	0.0 $\pm$ 0.0
ALA	0.73 $\pm$ 0.2
LED	0.44 $\pm$ 0.2
PDT geração 1	94.0 $\pm$ 0.7

5.1.3 Dupla marcação com TUNEL e imunofluorescência

Para se verificar a frequência de células vivas positivas para NF κ B, Bcl-2, iNOS, pmTOR e pAkt, foi realizada dupla marcação para TUNEL e imunofluorescência de cada marcador 24h após o primeiro tratamento com PDT (PDT geração 1). A Tabela 5.2 mostra a frequência de células TUNEL negativas e positivas para cada marcador. Nenhuma célula viva do grupo PDT expressou NF κ B, Bcl-2 e pAkt nesse período. O grupo PDT foi o que exibiu a maior frequência de células vivas mTOR positivas (78%), diferindo estatisticamente dos demais grupos. O grupo LED exibiu a maior frequência de células vivas positivas para NF κ B (53,7%), diferindo estatisticamente do grupo Controle e PDT. O grupo ALA exibiu a maior frequência de células vivas positivas para Bcl-2, diferindo estatisticamente em relação aos demais grupos, os quais em geral exibiram pouca ou nenhuma marcação para essa proteína. Por fim, o grupo Controle exibiu a maior frequência de células vivas positivas para iNOS, diferindo estatisticamente em relação aos demais grupos. Não houve expressão de pAKT em nenhum dos grupos analisados nesse período.

Tabela 5.2 - Frequência (%) de células vivas (TUNEL negativas) positivas para cada marcador após o primeiro ciclo de PDT

Marcador	Controle	ALA	LED	PDT (geração 1)
NF κ B	40,2	52,0 ^{a,b}	53,7 ^{a,b}	0,0 ^a
Bcl-2	7,8	21,6 ^{a,b,c}	9,1 ^b	0,0 ^a
iNOS	70,0	47,5 ^{a,b,c}	63,7 ^{a,b}	14,2 ^a
pmTOR	9,2	8,0 ^{b,c}	19,2 ^{a,b}	78,4 ^a
pAkt	0,0	0,0	0,0	0,0

Teste Binomial de duas proporções realizado para cada marcador individualmente. Significante quando $p < 0.05$.

a = estatisticamente significativo em relação ao grupo Controle.

b = estatisticamente significativo em relação ao grupo PDT.

c = estatisticamente significativo em relação ao grupo LED.

A expressão de pmTOR foi ora citoplasmática ora citoplasmática e nuclear nos grupos Controle, ALA, LED. No Grupo PDT, a expressão desse marcador nas células

vivas, diferentemente do observado para os outros grupos, foi predominantemente nuclear. A expressão de iNOS foi geralmente nuclear ou nuclear e citoplasmática em todos os grupos analisados. Já o NF κ B foi localizado tanto somente citoplasma, somente no núcleo ou em ambos, sem uma regra definida, nos grupos que o expressaram. Já a expressão de Bcl-2 foi nuclear nos grupos Controle, ALA e LED. A Figura 5.2 ilustra as marcações encontradas para cada anticorpo analisado.

Figura 5.2 – Exemplos de padrões de marcação no ensaio de dupla marcação com TUNEL e imunofluorescência. Tanto nos grupos LED e ALA foram raras as células TUNEL positivas, ao contrário do observado para o grupo PDT. No exemplo, nota-se que o NF κ B exibiu expressão predominantemente nuclear no grupo LED, porém esse padrão não constituiu uma regra nos demais grupos; o Bcl-2 exibiu uma marcação mais tênue em comparação ao NF κ B, sendo nuclear nos grupos que a expressaram (ex. grupo ALA); o iNOS em geral exibiu expressão no núcleo (ex. PDT geração 1); por fim a expressão do mTOR foi intensa e predominantemente nuclear no grupo PDT (geração 1)

5.1.4 Viabilidade celular no ensaio de resistência tumoral

A viabilidade celular foi mensurada para cada geração de células tratadas com PDT, aumentando-se a dose de irradiação à medida que se observava maior sobrevivência ao tratamento. A dose a ser instituída em cada ciclo foi aquela que induziu viabilidade celular de por volta de 10% (DL90). Para mensurar a resistência das células foi avaliada a viabilidade celular nas cinco gerações de tratamento a partir da dose inicial de 5,86J/cm² aplicada na geração 1. A Figura 5.3 ilustra a média da porcentagem de viabilidade celular (absorbância do teste / absorbância do controle X 100) para cada geração tratada com a dose de 5,86J/cm² de PDT. Quatro gerações (2 a 5) das cinco obtidas exibiram alguma resistência (maior viabilidade celular). A Geração 1 apresentou uma viabilidade celular de 4,8%, enquanto na geração 5 a viabilidade celular na mesma dose de irradiação utilizada na geração 1 foi de cerca de 20,14%.

Análise de variância ANOVA seguida pelo teste de Tukey. ** $p < 0.01$ em relação a geração 1.

Figura 5.3 - Média ($\pm$ desvio-padrão) da porcentagem de viabilidade celular para cada geração de células resistentes à dose de 5,86J/cm² de PDT

A Tabela 5.3 mostra a razão da resistência em cada uma das gerações e a evolução das doses de irradiação. O aumento na razão de resistência foi calculado da seguinte maneira: razão de resistência = viabilidade (em 5,86J/cm²) da geração resistente / viabilidade da geração 1. Houve um aumento na razão de resistência de 4,6±1,9 vezes comparando a Geração 5 com a 1 na dose inicial de 5,86J/cm². Vale dizer que um aumento na razão de resistência de 1,5 vezes já qualifica uma população como resistente (Singh et al., 2001; Zamarrón et al., 2015). A partir da geração 2 a dose de PDT foi aumentada de acordo com a viabilidade celular encontrada, selecionando sempre DL90 como a dose inicial. Assim, partiu-se de 5,86J/cm² e chegou-se a 8,20J/cm² nas gerações 3, 4 e 5. Vale lembrar que, conforme mencionado na seção Material e Métodos (item 4.1.3), no desenvolvimento de uma nova geração, as células eram sempre tratadas com a dose inicial utilizada na Geração 1, com a dose utilizada na geração anterior e com uma dose de irradiação maior que a da geração anterior (aumento de 30s na irradiação). A dose que induzisse viabilidade celular de 10% era então selecionada.

Tabela 5.3 - Dose de irradiação e razão de crescimento (*viabilidade celular da população resistente/viabilidade da geração 1*) para cada geração de células resistentes ao tratamento

Geração de células resistentes	Dose	Razão de crescimento
Geração 2	7,03J/cm ²	3,6±1,7
Geração 3	8,20J/cm ²	3,4±1,3
Geração 4	8,20J/cm ²	4,2±1,7
Geração 5	8,20J/cm ²	4,6±1,9

5.1.5 Ensaio de migração celular após obtenção de células resistentes a PDT

Foi realizado ensaio de migração celular para o grupo PDT mais resistente ao tratamento (geração 5), o qual foi comparado com os demais grupos. A Figura 5.4 mostra a média da frequência de células que migraram. Observou-se que houve um número maior de células aderidas ao compartimento inferior do inserto, ou seja, um maior número de células que migraram no grupo Geração 5 quando comparado aos

demais grupos ($p < 0.01$). O grupo PDT Geração 1 também exibiu maior frequência de células que migraram em relação aos grupos Controle e ALA ($p < 0.01$), mas não diferiu do grupo LED. Este também exibiu frequência de migração maior que o Controle e o ALA ($p < 0.01$).

Análise de variância ANOVA seguido do teste de Tukey.

a = $p < 0.01$ em relação ao controle.

b = $p < 0.01$ em relação ao ALA.

c = $p < 0.01$ em relação ao LED.

d = $p < 0.01$ em relação a PDT geração 1.

Figura 5.4 - Média ($\pm$ desvio-padrão) do número de células que migraram em cada grupo analisado

5.1.6 Análise morfológica das células resistentes a PDT

Foi realizado cálculo da área, do perímetro e do fator de forma das células do grupo Controle, PDT geração 1 e PDT geração 5. A Tabela 5.4 mostra a média dessas variáveis em cada grupo, bem como a frequência de macro ($>350\mu\text{m}^2$) e micronúcleos ($<330\mu\text{m}^2$). O valor de área para classificar como macronúcleo foi determinado com base na média de área celular obtida para o grupo controle ($=349.2\mu\text{m}^2$, Tabela 5.4). O valor de área para classificar como micronúcleo foi com base no resultado do primeiro quartil de valores de núcleo para o grupo Controle ($329.8\mu\text{m}^2$). O Grupo

Geração 1 apresentou significativamente menor área e menor perímetro do que os grupos Controle e Geração 5 e maior circularidade em relação à Geração 5. O grupo PDT Geração 1 também apresentou significativamente maior frequência de micronúcleos do que os demais grupos. Não houve diferença na área e perímetro entre os grupos Controle e Geração 5. Contudo, a Geração 5 apresentou significativamente maior porcentagem de macronúcleos do que os demais grupos.

Tabela 5.4 - Média ($\pm$ desvio-padrão) de área, perímetro e fator de forma das células SCC9 e frequência de macronúcleos ($>350\mu\text{m}^2$) e micronúcleos ($<330\mu\text{m}^2$) nos grupos sem tratamento com PDT (controle) e após um (geração 1) e cinco (geração 5) tratamentos

Morfologia celular	Grupos		
	Controle	PDT geração 1	PDT geração 5
Área (μm^2)	349.2 $\pm$ 25.0	280.1 $\pm$ 22.7 ^a	373.0 $\pm$ 56.8
Perímetro (μm)	70.6 $\pm$ 2.1	62.7 $\pm$ 2.6 ^a	73.5 $\pm$ 5.9
Fator de forma	0.439 $\pm$ 0.009	0.446 $\pm$ 0.005 ^b	0.431 $\pm$ 0.010
% Macronúcleos ($>350\mu\text{m}^2$)	40.4 ^b	19.0 ^a	46.8
% Micronúcleos ($<330\mu\text{m}^2$)	57.6	79.6 ^a	51.5

Análise de variância ANOVA seguida pelo teste de Tukey para área, perímetro e fator de forma. Teste Binomial para duas proporções para % Macrocélulas e %Microcélulas. Significante quando $p<0.05$.

a= estatisticamente significativa em relação ao controle e a PDT geração 5 ($p<0.01$ para o Teste de Tukey e $p<0.001$ para o Teste Binomial).

b = estatisticamente significativa em relação a PDT geração 5 ($p<0.01$ para o teste de Tukey e $p=0.043$ para o teste Binomial).

5.1.7 Quantificação de protoporfirina (PpIX) após obtenção de células resistentes a PDT

A proporção de PpIX foi determinada pelo método de citometria de fluxo para os grupos Controle, ALA, LED, PDT geração 1 e PDT geração 5. A Figura 5.5 evidencia as diferenças entre os grupos. Inicialmente foi analisada a intensidade de fluorescência do Grupo Controle, para determinar a autofluorescência nas células SCC9. Foi então mensurada a intensidade de fluorescência (R1) nesse grupo, a qual foi usada como parâmetro de autofluorescência para os demais grupos. Como se observa na Figura 5.5, no grupo Controle, 99,3% da intensidade de fluorescência foi considerado como autofluorescência. O Grupo ALA apresentou maior intensidade de

fluorescência de PpIX (44,7%), seguido do LED (35,1%) quando comparado aos demais grupos. Os grupos PDT geração 1 e 5 apresentaram menor intensidade de fluorescência do que os demais grupos, com a geração 5 exibindo a menor porcentagem (31% e 17,6%, respectivamente). Com relação ao “Dot Plot” do tamanho (FSC) pela complexidade interna (SSC), podemos observar que as células no grupo Controle apresentavam-se dispersas, com tamanho de pequeno a médio e pouca complexidade interna. Os grupos ALA e LED apresentaram tamanhos semelhantes ao grupo Controle, mas com complexidade interna menor que esse grupo. Os grupos tratados com PDT apresentaram diferenças nítidas com relação a esses parâmetros quando comparados aos demais grupos. Nota-se que as células tratadas com PDT se encontravam mais dispersas, principalmente as células da Geração 1, que apresentaram maior complexidade interna.

Figura 5.5 – Citometria de fluxo para PpIX. Nota: Na coluna da esquerda encontram-se os “Dot Plots” com tamanho (FSC) e complexidade externa (SSC) e, na coluna da direita, encontram-se as intensidades de fluorescência da PpIX detectadas para cada grupo estudado. No primeiro histograma observa-se a região R1, utilizada como parâmetro de autofluorescência para os demais grupos. As regiões R2,

R4, R5 e R6 referem-se às intensidades de fluorescência de PpIX encontradas nos grupos ALA, LED, Geração 1 e Geração 5, respectivamente

5.1.8 Quantificação por Western blotting e análise por imunofluorescência das proteínas pNF κ B, Bcl-2, iNOS, pmTOR e pAkt após obtenção de células resistentes a PDT

As proteínas de interesse foram quantificadas por meio de ensaio em triplicata experimental utilizando a técnica de Western blotting. Foi realizada também imunofluorescência dessas proteínas, para verificar sua localização celular. A Figura 5.6 exibe a densidade relativa (% em relação ao controle) da expressão do pNF κ B. Nota-se maior quantidade de pNF κ B nos grupos ALA, PDT Geração 1 e 5 do que nos grupos Controle e LED, havendo diferenças estatísticas entre esses grupos. Na imunofluorescência nota-se que todos os grupos apresentaram expressão basicamente citoplasmática; no grupo ALA e LED praticamente não foi observada marcação dessa proteína. Observou-se uma marcação mais intensa de NF κ B nos grupos ALA, Geração 1 e Geração 5.

Desvio-padrão referente a densidade da banda normalizada pela actina obtida em triplicata amostral. Análise de variância ANOVA seguida pelo teste de Tukey. ** $p < 0.01$ em relação ao controle e ao LED.

Figura 5.6 - Média ($\pm$ desvio-padrão) da densidade relativa (% em relação ao controle) da expressão de pNFκB. Imunofluorescência de pNFκB, evidenciando, em todos os grupos, expressão difusa no citoplasma

A expressão relativa da proteína Bcl-2 é visualizada na Figura 5.7. Observa-se maior expressão dessa proteína no grupo LED, a qual foi estatisticamente significativa em relação aos grupos Controle e PDT Gerações 1 e 5. Entre esses dois últimos grupos não houve diferenças significativas. Nota-se na imunofluorescência que a expressão de Bcl-2 foi ora citoplasmática, ora nuclear, dependendo do grupo analisado. No grupo Controle e ALA, observa-se marcação granular citoplasmática,

com grande intensidade no grupo ALA. O Grupo LED apresentou uma marcação somente nuclear. Os grupos tratados com PDT (Geração 1 e 5) apresentaram tanto marcação citoplasmática quanto nuclear; contudo a emissão de fluorescência encontrada nesses grupos, apesar de ser intensa, foi menor que o grupo LED e ALA.

Desvio-padrão referente a densidade da banda normalizada pela actina obtida em triplicata amostral. Análise de variância ANOVA seguida pelo teste de Tukey. * $p < 0.05$ em relação ao controle. ** $p < 0.01$ em relação ao LED.

Figura 5.7 - Média ($\pm$ desvio-padrão) da densidade relativa (% em relação ao controle) da expressão de Bcl-2. Imunofluorescência de Bcl-2, a qual foi intensamente expressa tanto no núcleo quanto no citoplasma no grupo PDT; já no grupo LED a expressão foi exclusivamente no núcleo e, no grupo ALA, exclusivamente no citoplasma, em região adjacente ao núcleo

A Figura 5.8 mostra a expressão relativa de iNOS. Nota-se maior expressão dessa proteína no grupo LED quando comparado aos demais grupos analisados. O grupo da PDT (gerações 1 e 5) exibiu expressão significativamente maior somente em relação ao Controle. Na imunofluorescência nota-se que nos grupos Controle, ALA e LED a expressão desse marcador foi predominantemente nuclear. As células do grupo LED apresentaram maior intensidade de fluorescência em comparação aos demais grupos. Os grupos tratados com PDT apresentaram menor frequência de células positivas para esse marcador em relação ao LED.

Desvio-padrão referente a densidade da banda normalizada pela actina obtida em triplicata amostral. Análise de variância ANOVA seguida pelo teste de Tukey. * $p < 0.05$ em relação ao controle. ** $p < 0.01$ em relação ao LED. # $p < 0.01$ em relação ao controle.

Figura 5.8 - Média ($\pm$ desvio-padrão) da densidade relativa (% em relação ao controle) da expressão de iNOS. Imunofluorescência de iNOS, evidenciando predomínio de expressão no núcleo em todos os grupos; nota-se certa expressão no citoplasma das células, porém esta é de pouca intensidade

O gráfico da Figura 5.9 mostra a média da expressão relativa de pmTOR para todos os grupos. Não houve expressão de pmTOR no grupo Controle. O grupo PDT Geração 5 apresentou a maior expressão de pmTOR, a qual foi estatisticamente significativa em relação aos demais grupos analisados. Nos grupos ALA, LED e PDT

Geração 1 a expressão desse marcador foi maior do que o grupo Controle. Na imunofluorescência nota-se que o grupo ALA apresentou marcação citoplasmática, enquanto nos grupos LED e PDT (Geração 1 e 5) a marcação foi predominantemente nuclear com maior intensidade nesse último.

Desvio-padrão referente a densidade da banda normalizada pela actina obtida em triplicata amostral. Análise de variância ANOVA seguida pelo teste de Tukey. ** $p < 0.01$ em relação ao controle. # $p < 0.01$ em relação a PDT geração 5.

Figura 5.9 - Média ($\pm$ desvio-padrão) da densidade relativa (% em relação ao controle) da expressão de pmTOR. Imunofluorescência por pmTOR, evidenciando intensa expressão no citoplasma das células do grupo ALA; nos grupos LED e PDT a marcação foi nuclear, com mais intensidade no grupo PDT

A média de densidade da expressão de pAkt está ilustrada na Figura 5.10. Para esse marcador o grupo PDT geração 5 exibiu a maior expressão, sendo esta significativa em relação aos demais grupos. A menor expressão foi observada o grupo LED, a qual diferiu em relação ao Controle e a PDT geração 1, mas não em relação ao ALA. Na imunofluorescência nota-se que a expressão no grupo Controle e ALA foi citoplasmática com maior intensidade no grupo ALA. A marcação nas células tratadas com PDT era mais intensa do que a nos demais grupos. A expressão dessa proteína na geração 1 foi citoplasmática, enquanto na geração 5 a marcação foi tanto citoplasmática quanto nuclear.

Desvio-padrão referente a densidade da banda normalizada pela actina obtida em triplicata amostral. Análise de variância ANOVA seguida pelo teste de Tukey. * $p < 0.05$ em relação ao LED. ** $p < 0.01$ em relação ao LED. ◇ $p < 0.05$ em relação a PDT geração 5. # $p < 0.01$ em relação a PDT geração 5.

Figura 5.10 - Média ($\pm$ desvio-padrão) da densidade relativa (% em relação ao controle) da expressão de pAkt. Imunofluorescência de pAkt, evidenciando intensa expressão no citoplasma do grupo Controle. No grupo ALA a marcação também citoplasmática e mais difusa, enquanto no grupo LED poucas células expressam esse marcador. Já nos grupos PDT, a marcação é mais evidente; na geração 1 nota-se que a marcação é citoplasmática, porém na geração 5 há também certa expressão de pAkt no núcleo

5.2 Ensaio *in vivo*

5.2.1 Análise histológica dos tumores de CEC induzidos

Dentre os animais nos quais foi iniciada indução de CEC bucal utilizando 4NQO na água de beber, somente cinco animais do grupo PDT e quatro do Controle sobreviveram após as semanas de indução e o tratamento com 5-ALA-PDT. Apesar do número reduzido de animais, os tumores exibiram padrão clínico (tamanho e localização) e histológico semelhante, o que permitiu a inclusão, no presente trabalho, de todos esses indivíduos e dos resultados descritos a seguir.

No grupo Controle, após o ciclo de indução com 4-NQO, os animais em geral exibiram aumento de volume localizado em borda lateral de língua, de coloração avermelhada e, por vezes, superfície ulcerada (Figura 5.11 A). Histologicamente observou-se neoplasia maligna de origem epitelial, caracterizada pela presença de ninhos ou cordões de células epiteliais, exibindo pleomorfismo, hipercromatismo nuclear e mitoses atípicas. O estroma era composto de tecido conjuntivo denso bem vascularizado e celularizado. Em todos os casos grande quantidade de pérolas córneas se fez presente, originando um padrão tumoral mais bem diferenciado (Figura 5.11 B). Também na totalidade dos casos, foi possível delimitar as margens tumorais. Nestas, o epitélio de superfície exibia atipia moderada, caracterizada por hipercromatismo nuclear e hiperplasia da camada basal, projeção em gota e perda da coesão entre as células (Figura 5.11 C). Em função das características clínicas e histopatológicas, a lesão induzida foi classificada como carcinoma epidermóide bucal bem diferenciado.

Após 24h da execução da PDT, a região do tumor exibia clinicamente necrose, ulceração, edema intersticial e hiperemia, gerando um quadro inflamatório agudo bem exacerbado (Figura 5.11 D). Histologicamente, essa necrose superficial ficou restrita à profundidade de no máximo 500µm; esse limite foi interpretado como a região de máximo efeito letal da PDT; o restante do tumor exibia células tumorais viáveis (Figura 5.11 E); no estroma era evidente hiperemia e infiltrado inflamatório mono e polimorfonuclear difuso de intensidade moderada. Na área adjacente ao tumor, foi

possível detectar necrose restrita às camadas epiteliais, bem como edema por entre as fibras musculares esqueléticas e infiltrado inflamatório difuso (Figura 5.11 F).

Figura 5.11 – Indução de carcinoma epidermóide oral utilizando 4-NQO. **A:** Aspecto clínico da lesão, caracterizada por aumento de volume em borda lateral de língua, de coloração vermelho-escuro (seta). **B:** Aspecto histológico da lesão, na qual se evidencia neoplasia maligna epitelial invadindo a lâmina própria até a submucosa, com grande quantidade de pérolas córneas. O aspecto histológico condiz com carcinoma epidérmoide oral (CEC) (HE, aumento original 100X). **C:** Região dos limites do CEC, em que se nota hiperqueratose, displasia epitelial moderada e intensa celularidade na lâmina própria (HE, aumento original 100X). **D:** Aspecto clínico 24h após a PDT. Nota-se extensa área de necrose e ulceração (setas), bem como edema em toda a língua. **E:** Corte histológico do CEC após a PDT; esta provocou necrose (n) na superfície do tumor, porém a arquitetura tumoral, com células viáveis, se manteve mais na profundidade. Infiltrado inflamatório é evidente no estroma tumoral (HE, aumento original 100X). **F:** Região da borda do CEC, em que se nota necrose epitelial (n), intenso edema por entre as fibras musculares e infiltrado inflamatório (HE, aumento original 100X)

5.2.2 Expressão imuno-histoquímica das proteínas NF κ B, Bcl-2, iNOS, mTOR e Akt *in vivo* após um ciclo de PDT

A expressão imuno-histoquímica das proteínas analisadas *in vitro* foi verificada em ensaio *in vivo* utilizando ratos com indução de CEC em língua tratados com um ciclo de PDT. O padrão da marcação imuno-histoquímica pode ser visualizado nas Figura 5.12 a 5.16.

A marcação do NF κ B (Figura 5.12) exibiu intensidade variada e foi predominantemente citoplasmática no grupo Controle, com poucos núcleos positivos nos cordões epiteliais. Nota-se que houve intensa marcação desse fator de transcrição no estroma do tumor com expressão predominantemente nuclear. O Grupo PDT exibiu intensa marcação de NF κ B nas células dos cordões epiteliais com expressão predominantemente citoplasmática.

Figura 5.12 – Cortes histológicos representativos da expressão imuno-histoquímica de NF κ B (estreptoavidina-biotina, aumento original de 100X, 200X e 400X). **A:** Grupo

controle em menor aumento exibindo positividade para NF κ B, tanto nos cordões epiteliais do tumor, quanto no estroma. **B:** Detalhe da imagem anterior, em que se nota expressão predominantemente citoplasmática nas células tumorais próximas às perólas córneas, e nuclear nas células estromais. **C:** Grupo PDT exibindo intensa marcação para NF κ B, em toda a extensão do tumor. **D:** Em detalhe nota-se marcação intensa no citoplasma das células epiteliais tumorais, por vezes exibindo maior concentração em região próxima à membrana citoplasmática

A proteína anti-apoptótica Bcl-2 (Figura 5.13) apresentou uma marcação com padrão granular no citoplasma das células tumorais, com intensidade discreta nas células dos cordões epiteliais e na parede dos vasos presentes no estroma do tumor nos animais do grupo Controle. No grupo PDT essa intensidade foi mais acentuada principalmente nas áreas dos cordões epiteliais com pouca expressão no estroma do tumor.

Figura 5.13 - Cortes histológicos representativos da expressão imuno-histoquímica de Bcl-2 (estreptoavidina-biotina, aumento original de 100X e 400X). **A:** Grupo controle exibindo positividade para Bcl-2, porém em intensidade muito discreta. **B:** Em detalhe nota-se marcação bastante tênue no citoplasma das células epiteliais tumorais e em células da parede dos vasos localizados no estroma. **C:** Grupo PDT exibindo expressão mais intensa do que o Grupo Controle, principalmente nas células localizadas mais na profundidade do tumor (setas). Nota-se área de necrose (n) superficial derivada do tratamento com PDT. **D:** Em maior

aumento, a expressão de Bcl-2 foi concentrada em áreas restritas do citoplasma das células epiteliais tumorais, com raras células exibindo um padrão difuso no citoplasma. Poucas células do estroma exibiam positividade

A expressão imuno-histoquímica de iNOS (Figura 5.14) foi citoplasmática nas células tumorais e do estroma. No grupo Controle nota-se que a expressão de iNOS nas células do estroma com poucas células nos cordões epiteliais marcadas. Já o grupo PDT apresentou maior expressão de iNOS do que o grupo Controle, com intensa marcação tanto nos cordões epiteliais como no estroma tumoral.

Figura 5.14 - Cortes histológicos representativos da expressão imuno-histoquímica de iNOS (estreptoavidina-biotina, aumento original de 100X e 400X). **A:** Marcação bem evidente no grupo Controle, principalmente no estroma tumoral. **B:** Em maior aumento, nota-se expressão citoplasmática de iNOS nas células mesenquimais do CEC, com raras células epiteliais positivas (seta). **C:** Grupo PDT com grande intensidade de marcação, tanto nas células epiteliais quanto nas células mesenquimais do tumor. **D:** Detalhe da marcação de iNOS no grupo PDT, em que as células epiteliais exibem marcação heterogênea (ora moderada ora intensa), por vezes bizarras (extremamente intensas) (seta), em algumas ilhotas epiteliais

A marcação de pmTOR (Figura 5.15) foi geralmente citoplasmática com intensidade discreta nos animais do grupo Controle tanto nos cordões epiteliais como no estroma tumoral. Já nos animais do grupo PDT observa-se marcação citoplasmática, mas também nota-se maior positividade nuclear com maior intensidade de marcação. A marcação de pmTOR restringiu-se às ilhas ou cordões de células epiteliais tumorais, sendo negativa no estroma, com intensa marcação nas áreas tumorais adjacentes à área de necrose induzida pela PDT.

Figura 5.15 - Cortes histológicos representativos da expressão imuno-histoquímica de mTOR (estreptoavidina-biotina, aumento original de 100X e 400X). **A:** Grupo Controle em que não se nota marcação de mTOR em menor aumento. **B:** Detalhe da figura anterior, em que é possível verificar positividade em algumas células isoladas, tanto epiteliais quanto mesenquimais, de intensidade discreta e padrão difuso no citoplasma. **C:** Intensa marcação nas células tumorais adjacentes à área de necrose (n) gerada pela PDT. **D:** Em detalhe, nota-se marcação intensa nos núcleos e moderada a discreta no citoplasma das células tumorais epiteliais

A expressão imuno-histoquímica de pAkt (Figura 5.16) foi citoplasmática e por vezes nuclear nas células localizadas nos cordões epiteliais do tumor. Observou-se que a expressão de Akt no grupo Controle foi discreta. Já no epitélio de superfície

adjacente ao tumor a expressão foi mais intensa. No grupo PDT observou-se intensa expressão desse marcador principalmente em regiões adjacentes à necrose induzida pela PDT. A expressão de pAkt foi predominantemente citoplasmática nesse grupo; somente um animal apresentou positividade nuclear em raras células.

Figura 5.16 - Cortes histológicos representativos da expressão imuno-histoquímica de pAkt (estreptoavidina-biotina, aumento original de 100X e 400X). **A:** Menor aumento no grupo Controle em que se nota marcação discreta de pAkt no CEC, porém a intensidade é maior no epitélio adjacente ao tumor (seta). **B:** Detalhe da positividade de pAkt, em que algumas células tumorais epiteliais exibem marcação discreta e difusa no citoplasma. Raras células exibem marcação nuclear (seta). **C:** Menor aumento no Grupo PDT, em que se observa intensa marcação de pAkt em células próximas à área de necrose provocada pela PDT (n); em região mais profunda da neoplasia, a marcação é mais discreta ou inexistente. **D:** Detalhe da região de necrose (n), evidenciando intensa positividade para pAkt no citoplasma das células epiteliais do tumor

Foi realizada quantificação da área do DAB em cortes histológicos obtidos 24h após o término da irradiação com LED. A Tabela 5.5 mostra a média da área do DAB para cada proteína no grupo Controle (somente CEC) e PDT (24h após o tratamento

do CEC com PDT). Diferentemente da análise do cultivo de células em 24h, o grupo PDT exibiu maior expressão imuno-histoquímica de todas as proteínas, sendo estatisticamente significativa em relação ao grupo Controle (somente indução tumoral sem PDT). Nas células SCC9 submetidas ao tratamento com PDT e avaliadas 24h depois, observou-se a expressão somente das proteínas pmTOR e iNOS no grupo PDT (item 5.1.3).

Tabela 5.5 - Média ($\pm$ desvio-padrão) e mediana (valores mínimo e máximo) da porcentagem da área de DAB para cada proteína nos grupos Controle (somente CEC bucal) e PDT (24h após o tratamento do CEC com PDT)

	Controle (%)		PDT (%)		Valor de p
	Média ($\pm$ DP)	Mediana (mín-máx)	Média ($\pm$ DP)	Mediana (mín-máx)	
NF κ B	17,2 $\pm$ 6,0	18,0 (5,7-25,3)	28,7 $\pm$ 10,8	31,1 (14,9-50,4)	0.008
Bcl-2	7,1 $\pm$ 5,9	3,6 (1,0-15,8)	23,7 $\pm$ 12,1	17,1 (12,6-46,0)	0.000
iNOS	9,8 $\pm$ 4,2	10,7 (3,7-15,4)	25,4 $\pm$ 6,3	24,5 (15,8-36,1)	<0.0001
pmTOR	6,1 $\pm$ 4,0	5,0 (1,3-15,1)	27,0 $\pm$ 9,9	26,1 (15,1-42,9)	<0.0001
pAkt	3,0 $\pm$ 2,2	2,3 (0,9-6,9)	17,1 $\pm$ 9,1	14,5 (6,5-34,4)	<0.0001

Teste estatístico de Mann-Whitney. Significante quando $p < 0.05$.

6 DISCUSSÃO

A proposta deste trabalho foi investigar se células de CEC bucal desenvolviam resistência a tratamentos repetidos de PDT, bem como avaliar a expressão nessas células de marcadores relacionados a sobrevivência celular (NF κ B, Bcl-2, iNOS, pmTOR e pAkt). Verificamos que as células testadas desenvolveram resistência após 5 ciclos de tratamentos com 5-ALA-PDT (Geração 5), exibindo viabilidade celular 4,6 vezes maior do que a primeira geração na dose inicial utilizada (dose 5,86J/cm²). Constatamos também que durante esse processo houve ativação de NF κ B e da via de sinalização PI3K/Akt/mTOR, bem como superexpressão da enzima iNOS.

Inicialmente, foi realizada análise da expressão das proteínas citadas acima nas células que sobreviveram a um ciclo de tratamento com PDT. O intuito foi verificar se, após a dose inicial (5,86J/cm², DL90), as células mantinham sua capacidade de crescimento. Verificamos que as células sobreviventes exibiram certa taxa de proliferação em cinco dias, porém bem menor em comparação a do Controle. Além disso, detectamos que, dentre as proteínas analisadas, somente o mTOR estava intensamente expresso nessas células, sugerindo que provavelmente a via modulada por essa proteína ainda estava ativa.

Nos estudos relacionados à PDT, a inativação da via do mTOR tem sido constantemente mencionada como uma das causas da morte celular após a PDT. Tem-se observado que essas células exibem um fenótipo compatível com autofagia, com presença de vacúolos intracitoplasmáticos semelhantes a autofagossomos (Dewaele et al., 2011). A presença da autofagia após a PDT tem sido interpretada de duas maneiras. A primeira seria uma resposta pró-sobrevivência, na qual haveria reciclagem das organelas danificadas pela terapia, sem haver morte das células; esse mecanismo estaria presente em doses mais baixas de PDT (DL5 - 35 mJ/cm²). A segunda maneira seria uma resposta pró-morte, quando então haveria autofagia levando a morte celular nas situações de dano extenso provocado pelo estresse oxidativo, principalmente em doses mais altas de PDT (DL90 – 120mJ/cm²) (Garg et al., 2015; Kessel; Reiners Jr, 2007). Em nosso estudo, interpretamos que o aumento

da expressão de mTOR nas células sobreviventes à PDT pode estar relacionado à completa inibição da autofagia, sugerindo viabilidade das células em termos nutricionais e de síntese de proteínas. Um estudo descreveu resultado compatível com o nosso trabalho, ao demonstrar que, após 24h da PDT mediada pelo AIPcS2a, as células sobreviventes (adenocarcinoma de cólon) exibiram níveis de mTOR compatíveis com o baseline (Weyergang et al., 2009). Já outro trabalho demonstrou que o mTOR não retornou aos níveis normais após 24h da PDT mediada por hematoporfirina em células de câncer de faringe (Kim et al., 2014). Esses resultados discrepantes podem estar relacionados ao tipo de Fs, à dose de PDT utilizada e ao tipo de células tumorais. Nosso trabalho foi o primeiro a avaliar a expressão de mTOR em células de CEC bucal submetidas a PDT. Assim, a alta expressão desse marcador no nosso modelo sugere o acionamento de um mecanismo de proteção e de sobrevivência aos danos gerados pela PDT.

Nesse ensaio de sobrevivência celular, algumas células também expressaram iNOS, porém com frequência bem reduzida em relação à expressão de mTOR. O iNOS é uma enzima que, quando expressa em baixas doses, pode induzir proliferação celular (Fetz et al., 2009; Pervin et al., 2007). Como não quantificamos o iNOS nesse ensaio, não é possível depreender o papel dessa expressão após 24h da PDT. Vale dizer que essa enzima será mais amplamente discutida quando abordarmos o ensaio de resistência à PDT.

Outro fato desse ensaio de sobrevivência foi a inexistência de células viáveis expressando NF κ B, Bcl-2 e pAkt após 24h. Esses achados corroboram outros estudos que também observaram inibição dessas proteínas após a PDT (Rapozzi et al., 2011; Dewaele et al., 2011; Grebenová et al., 2003; Kim et al., 1999).

Depois da caracterização das células que sobreviveram a um ciclo de tratamento com PDT, as células de CEC bucal foram submetidas a tratamentos repetidos de PDT mediada pelo 5-ALA, para verificar se era possível desenvolver linhagens celulares resistentes a esse tratamento. Nos artigos sobre resistência a PDT, a população celular que exibe viabilidade 1,5 vezes maior do que a população parental (população original) pode ser considerada como resistente, diante de dose que induza 90% de letalidade (DL90) (Milla et al., 2011; Zamarrón et al., 2015; Singh et al., 2001). Em nosso trabalho, foi possível desenvolver quatro linhagens resistentes,

considerando o aumento de 1,5 vezes na viabilidade. A Geração 5 foi considerada a mais resistente, com viabilidade celular 4,6 vezes maior que a Geração 1. Um estudo envolvendo linhagem de CEC de pele e modelo de resistência à PDT mediada pelo Me-ALA também demonstrou resistência após cinco gerações, porém nesse estudo a quinta geração exibiu aumento de 8,5 vezes na viabilidade quando comparada a primeira geração de tratamento (Milla et al., 2011). As diferenças encontradas no aumento na resistência entre esse trabalho e o nosso pode estar relacionada com a origem do tumor utilizado para o desenvolvimento de resistência.

Além de demonstrarem maior viabilidade, as populações resistentes exibiram morfologia distinta da observada na população parental. A morfologia celular da população mais resistente (Geração 5) apresentava maior frequência de núcleos gigantes (macronúcleos) quando comparada ao grupo parental e à Geração 1. A maior proporção de macronúcleos já foi relatada anteriormente em população de CEC de pele resistente a PDT mediada pelo Me-ALA, em que os autores relacionaram esse fato à poliploidia e a maior malignidade dessas células (Milla et al., 2011). O cariótipo poliplóide das células resistentes a PDT já foi relatado anteriormente em células de fibrossarcoma induzido por radiação (Sharkey et al., 1993). A poliploidia tem sido relacionada com a transformação maligna e progressão tumoral, pois permite que as células tumorais acumulem uma alta incidência de mutações, atenuando as consequências de perdas cromossômicas, deleções de genes e mutações de inativação, conferindo uma vantagem adaptativa a célula tumoral (Davoli; Lange, 2011). Células com tamanho e núcleos maiores do que sua contraparte parental também foram descritas em outro trabalho envolvendo fibrossarcoma de rato induzido por radiação ionizante, resistentes à PDT mediada pelo Photofrin (Luna; Gomer, 1991). Aumento de tamanho celular também foi descrito em estudo com células de adenocarcinoma mamário resistentes à 5-ALA-PDT; nesse estudo foi detectado aumento de duas vezes no volume celular e morfologia mais fibroblástica das células tumorais (Casas et al., 2006).

Enquanto as células da Geração 5 exibiram maior frequência de macronúcleos, as células da Geração 1 exibiram maior porcentagem de micronúcleos e núcleos mais circulares em relação à população parental e à Geração 5. No mesmo trabalho que evidenciou a presença de macronúcleos em células de carcinoma de pele resistentes a PDT mediada pelo Me-ALA, foram também detectados micronúcleos nas

populações mais resistentes, o que o segundo os autores indica desorganização do material genético nas células tumorais que reduziram a morte celular após a PDT (Milla et al., 2011). A formação de micronúcleos tem sido usada para detectar danos ao DNA após a quimioterapia ou radioterapia em células tumorais com mecanismos de apoptose reduzido. Nessas células a diminuição dos mecanismos de apoptose pode ser compensada pelo processo de catástrofe mitótica, levando a formação de múltiplos micronúcleos (Driessens et al., 2003). Interpretamos nossos achados como indicativos de maior pleomorfismo, tanto na Geração 1 quanto na Geração 5, fato que, aliado à maior capacidade de migração dessas células, confirmado pelo ensaio de migração discutido mais adiante, pode ser associado a um fenótipo de maior malignização.

Alterações na quantidade intracelular do Fs também têm sido descritas como importantes no mecanismo de resistência a PDT, limitando a fotossensibilização. No nosso trabalho, avaliamos a quantidade intracelular de PpIX por citometria de fluxo, e verificamos que a população de células mais resistente (Geração 5) apresentava menor quantidade de PpIX do que os demais grupos analisados, inclusive em relação à Geração 1. A diminuição na quantidade de PpIX também foi observada em populações resistentes de CEC de pele submetidas a cinco e dez ciclos de PDT mediada pelo Me-ALA (Milla et al., 2011), e em adenocarcinoma mamário murino resistente à 5-ALA-PDT (Casas et al., 2006). Nesse último trabalho, a redução da PpIX nas células resistentes esteve condicionada a alterações no mecanismo de síntese do grupo heme; por exemplo, houve aumento significativo de uroporfirina e redução de PpIX, fato que demonstrou modificações nessa via. Vale dizer que, além de haver diminuição da quantidade de FS, este pode estar localizado em sítio não propício à fotossensibilização. O trabalho anteriormente citado envolvendo células resistentes ao Me-ALA (Milla et al., 2011) demonstrou que a PpIX estava localizada em vacúolos intracelulares, que poderiam agir como sítios de sequestro, diminuindo assim a fotossensibilização das células.

Verificamos também, por ensaio de "transwell", que a população mais resistente de células apresentava maior capacidade de migração do que a população parental e a primeira geração. Existem trabalhos na literatura que, ora relatam haver maior capacidade de migração pelas células resistentes (Milla et al., 2011), ora descrevem diminuição dessa capacidade (Casas et al., 2008; Madsen et al., 2003;

Hirschberg et al., 2006; Tsai et al., 2009), a qual pode chegar a ser quatro vezes menor do que a da população parental (Casas et al., 2008). Uma diferença importante entre o nosso trabalho e este último no qual houve diminuição da migração é que este isolou clones celulares de adenocarcinoma mamário resistentes à 5-ALA-PDT e os submeteu ao ensaio de migração, enquanto nós realizamos esse ensaio com uma população inteira resistente. A redução de migração encontrada nos clones resistentes pode estar relacionada à ausência de sinalização de uma população heterogênea. Além disso, outros fatores podem ter contribuído para as diferenças obtidas, tais como o tipo de linhagem celular e o protocolo de PDT utilizado (Casas et al., 2011).

Acredita-se que, a partir de um grupo heterogêneo de células, a PDT pode selecionar positivamente as células que possuem mecanismos de resistência, enquanto as células que não possuem esses mecanismos morrem após o tratamento (Milla et al., 2011). A resistência pode aparecer devido a seleção de uma subpopulação que já tinha características de resistência na população original (resistência intrínseca) e/ou uma população celular que desenvolveu resistência após o tratamento (Zamarrón et al., 2015). A linhagem SCC9 tem sido utilizada em alguns trabalhos sobre resistência tumoral, os quais demonstram alta capacidade dessa linhagem em desenvolver populações quimiorresistentes (Song et al., 2014) e radorresistentes (Czembirek et al., 2009). Assim, acreditamos que certa resistência intrínseca já estivesse presente na população parental de SCC9 utilizada em nosso estudo, a qual foi exacerbada pelo estímulo da PDT e caracterizada pela expressão de proteínas relacionadas à sobrevivência celular, conforme será discutido a seguir.

O sucesso da PDT no controle do crescimento tumoral se relaciona com o fato de essa terapia gerar grande quantidade de EROs, que tornam as células inviáveis, induzindo a morte celular. Um dos efeitos da PDT é neutralizar a proteína anti-apoptótica Bcl-2, que possui um papel importante na proteção contra a apoptose (Grebenová et al., 2003, Kim et al., 1999). A Bcl-2 é sensível a fotodano, podendo ser inativada diante desse estímulo. Se o Fs se localizar na mitocôndria, como no caso da PpIX, esse processo pode se intensificar; já proteínas pró-apoptóticas, como Bax e Bad, são mais resistentes às EROs, desencadeando a apoptose (Kessel, 2015). Portanto, é de se esperar que, no processo de indução de resistência à PDT, haja

aumento na expressão de Bcl-2 e, consequentemente, inibição da apoptose. Em nosso estudo, não observamos diferenças na expressão dessa proteína comparando-se as gerações resistentes (Gerações 1 e 5) e a população parental. Somente no grupo ALA houve intensa expressão de Bcl-2. Não encontramos nenhum estudo que demonstrasse aumento da proteína Bcl-2 após tratamento com 5-ALA. Esse aumento pode estar associado à intensa produção de PpIX induzido pelo 5-ALA, a qual fica acumulada na mitocôndria e pode gerar alterações nessa organela, sem provocar nem necrose nem apoptose (Laafi et al., 2014). Provavelmente a produção de Bcl-2 deve estar associada a complexa rede de ativações de proteínas mitocondriais seguintes a perda da homeostase nessa organela, sendo necessários estudos específicos para entender melhor essa expressão. É interessante notar que esse grupo exibiu níveis aumentados de NF κ B em relação ao controle, fato que condiz com a superexpressão de Bcl-2, já que esse fator de transcrição regula essa e outras proteínas anti-apoptóticas (Piette, 2015).

Um trabalho que analisou a expressão de Bcl-2 em populações celulares de adenocarcinoma de cólon resistentes à PDT demonstrou aumento dessa expressão nessas células (Shen et al., 2005). A superexpressão de Bcl-2 nesse contexto foi interpretada como sendo um mecanismo de resistência à terapia. A relevância do envolvimento de Bcl-2 na resistência a PDT pode ser apoiada pelo fato de que células transfectadas com Bcl-2 são duas vezes mais resistentes ao tratamento com PDT mediada pelo Fs fitalocianina (Pc4) (He et al., 1996). A diferença encontrada entre nosso trabalho e o trabalho citado acima talvez possa ser explicada pelas diferentes linhagens celulares empregadas e pelas condições de tratamentos utilizadas no desenvolvimento de resistência, uma vez que optamos em desenvolver populações resistentes aumentando a dose de irradiação e, no trabalho com adenocarcinoma de cólon, as linhagens resistentes foram induzidas variando-se as concentrações do Fs.

É importante mencionar que a evasão da apoptose observada em modelos de resistência à PDT tem sido associada também a outras vias, por exemplo, à alta expressão de fosfo-survivina em células de CEC cutâneo tratadas com Me-ALA-PDT (Milla et al., 2011), à superexpressão de Hsp27 em células de adenocarcinoma de cólon tratadas com PDT mediada pelo Photofrin (Wang et al., 2002), à ausência de clivagem da PARP-1 em células de carcinoma de orofaringe tratadas com PDT mediada por hematoporfirina (Kim et al., 2014), e à superexpressão de Mcl-1, mas

não de Bcl-2, em células de adenocarcinoma mamário submetidas a dose subletal de PDT mediada Photofrin (Song et al., 2013). No presente estudo, portanto, a ausência de apoptose nas células resistentes não foi explicada pela superexpressão de Bcl-2. Provavelmente outras vias relacionadas a essa inibição, tais como as descritas anteriormente, sejam responsáveis pelo efeito anti-apoptótico observado.

Apesar de não haver alteração da expressão de Bcl-2, verificamos no presente trabalho que houve um aumento na expressão de NF κ B nas células tratadas com PDT, tanto na primeira quanto na quinta geração. O aumento da expressão de NF κ B em células sobreviventes tratadas com PDT já foi descrito em outros estudos com outras linhagens celulares e protocolos diversos de tratamento (Matroule et al., 2001; Kuliková et al., 2010). Em geral os autores concluem que o NF κ B desempenha um papel de proteção contra a apoptose induzida pela PDT, sendo responsável por vários mecanismos de resistência a essa terapia. Um estudo em particular com PDT mediada pelo Photofrin e células de adenocarcinoma mamário demonstrou que o aumento de NF κ B em células tratadas com PDT está condicionado à expressão de Akt. Nesse trabalho quando o Akt foi silenciado, houve queda da expressão de NF κ B nas células tratadas com dose subletal de PDT, as quais, antes do silenciamento, exibiam alta expressão desse fator de transcrição (Song et al., 2013). O Akt permite a translocação de NF κ B para o núcleo, local onde esse fator de transcrição aciona genes que induzem inibição da apoptose e proliferação celular (Manning; Cantley, 2007). Foi intrigante o fato de, no presente trabalho, não termos observado expressão de pNF κ B no núcleo das células nos ensaios de imunofluorescência; este foi visível somente no citoplasma, tanto no grupo ALA quanto nas gerações resistentes à PDT. Apesar de estar fosforilado, o NF κ B não translocou para o núcleo, o que gera dúvidas quanto ao seu real papel no processo de inibição da apoptose e de acionamento de vias de resistência tumoral no contexto da presente pesquisa.

Além de aumento de NF κ B, observamos também superexpressão de Akt, com diferença significativa no grupo de maior resistência à PDT (Geração 5). Nesse grupo, o pAkt exibiu translocação para o núcleo, fato não observado nos demais grupos nos quais também foi expresso de forma significativa (grupo Controle e PDT Geração 1). O aumento de Akt também já foi associado a mecanismos de resistência à PDT, promovendo evasão da apoptose (Song et al., 2013) e crescimento tumoral (Wan et

al., 2015) quando utilizadas doses subletais de PDT. Vale lembrar que a via PI3K/Akt/mTOR frequentemente é desregulada no CEC de boca e sua expressão nesse tumor tem sido associada a um pior prognóstico (Lim, 2005). No CEC bucal, desempenha um papel crítico no desenvolvimento de resistência a quimioterapia e a radioterapia (Simpson et al., 2015; Bussink et al., 2008). A superativação de PI3K/Akt parece ser uma das principais razões de radiorresistência no CEC bucal (Ettl et al., 2015) e de resistência ao 5-FU (Nakagawa et al., 2014).

Um dos alvos a jusante do Akt é o mTOR. O Akt promove a fosforilação e ativação dessa proteína, a qual também induz sobrevivência celular por meio da regulação da síntese protéica, da progressão do ciclo celular e da inibição da autofagia (Liu et al., 2009). No presente trabalho, a expressão de mTOR aumentou na população resistente (Geração 5) em comparação aos demais grupos, indicando que essa proteína pode estar relacionada ao desenvolvimento de resistência à PDT. Nosso estudo é o primeiro a detectar aumento da expressão de mTOR em células tumorais resistentes à PDT. Não encontramos trabalhos que avaliassem a expressão desse marcador no contexto de resistência à PDT. Contudo, alguns estudos (Dewaele et al., 2011; Weyergang et al., 2009; Kim et al., 2014) demonstraram que a expressão dessa proteína diminuiu após a PDT, e que a inibição dessa via parece estar relacionada ao aumento de fatores associados a autofagia. Tem sido considerado então o fato de que a PDT promove, além de apoptose, também autofagia, e esse último mecanismo de morte estaria condicionado à inibição da via Akt/mTOR (Dewaele et al., 2011).

Além de aumento da expressão de NF κ B, Akt e mTOR, verificamos superexpressão de iNOS nas células resistentes à PDT, tanto na Geração 1 como na 5, em comparação com a população parental. Essa enzima é responsável pela produção de óxido nítrico, radical livre altamente reativo que pode desempenhar tanto um papel pró como anticarcinogênico, dependendo da sua concentração. Em baixas concentrações, essa molécula estimula a sobrevivência e proliferação; já em alta concentração induz a morte celular por apoptose (Thomas et al., 2004; Fetz et al., 2009; Girotti, 2015). A expressão dessa enzima no CEC bucal também está associada a progressão tumoral e ao pior prognóstico (Connely et al., 2005; Varghese et al., 2010). A expressão de iNOS e de óxido nítrico tem sido associada à sobrevivência celular à PDT (Bhowmick; Girotti, 2010), principalmente por intermédio da ativação de

Akt e NF κ B (Bhowmick; Girotti, 2013). A inibição de iNOS promove aumento na taxa de apoptose após a PDT, demonstrando que essa enzima exerce efeito protetor contra os danos derivados da PDT (Bhowmick; Girotti, 2013). Por outro lado, a superexpressão de iNOS parece induzir um fenótipo mais invasivo do tumor após a PDT, principalmente pela indução da secreção de metaloproteinases e de integrinas pelas células tumorais (Fahey; Girotti, 2015). Em resumo, no presente trabalho observamos aumento na expressão de iNOS, bem como de Akt e NF κ B nas células resistentes à PDT, sugerindo que o aumento na expressão iNOS pode induzir a regulação positiva de Akt e NF κ B e que possivelmente esse mecanismo contribuiu para a resistência à PDT.

Comentários devem ser feitos para o grupo LED, já que as células desse grupo expressaram intensivamente alguns marcadores de sobrevivência celular e exibiram incremento na taxa de crescimento nos ensaios de viabilidade celular. As células desse grupo proliferaram mais que o Controle em um período de 5 dias após o tratamento. Observamos também que células tratadas com LED exibiram intensa expressão de Bcl-2 e iNOS, o que corrobora com a tendência de proteção contra a apoptose e estímulo a proliferação celular após esse tratamento. Provavelmente a indução de óxido nítrico nesse grupo deve ter sido reduzida, induzindo à proliferação das células tumorais em detrimento de sua inibição. Esse resultado de certa maneira sinaliza para a possibilidade de, durante o tratamento com PDT, as células tumorais que não forem sensibilizadas pelo Fs, ao serem irradiadas, receberem fotomodulação de baixa intensidade, o que, ao invés de inibir o crescimento, pode estimular a proliferação celular. Portanto, no tratamento com PDT é importante considerar a possibilidade de fotoestimulação ao invés de fotoinibição, minimizando esse risco por meio da avaliação da gradação do tumor, para verificar se há indicação de PDT, bem como da seleção e execução de protocolos adequados de Fs e irradiação.

O ensaio *in vivo* conduzido no presente estudo demonstrou essa limitação técnica da PDT em CECs induzidos na cavidade bucal. Nesse ensaio avaliamos a expressão dos mesmos marcadores analisados nos ensaios *in vitro* (Akt, mTOR, iNOS, Bcl-2 e NF κ B), nos tumores induzidos com 4NQO, tratados com um ciclo de 5-ALA-PDT. Foi possível visualizar células viáveis adjacentes à área de necrose provocada pela PDT, a qual foi executada com uma dose que é considerada letal (Ma

et al., 1999). Observamos também que a área de expressão de todos os marcadores avaliados foi maior nos animais tratados com PDT em relação aos animais do grupo Controle não submetidos a nenhum tratamento. Na comparação com o ensaio *in vitro* envolvendo somente um ciclo de PDT e análise das proteínas 24h após o tratamento, esse ensaio *in vivo* não confirmou os achados *in vitro*, já que neste as células sobreviventes expressaram somente mTOR em grande quantidade. Mas, na comparação com os ensaios de resistência tumoral, o modelo *in vivo* confirmou a tendência de as células sobreviventes ao tratamento expressarem intensivamente essas proteínas, o que confirma o potencial de indução de resistência já nos primeiros ciclos da terapia. Além disso, o modelo *in vivo* demonstrou a limitação da técnica da PDT para tumores mais invasivos e mais hiperqueratinizados, variáveis que prejudicam a fotoativação, bem como demonstrou a existência de outros fatores induzidos pela PDT que podem favorecer o crescimento tumoral, tais como a inflamação pós-PDT (St Denis et al., 2011).

Ressalvas quanto ao tipo de CEC induzido devem ser feitas, já que por esse modelo são gerados tumores bem diferenciados, os quais não tendem a metastatizar. Os tumores induzidos simularam, em parte, um grupo restrito de CECs humanos, cujo prognóstico em geral é muito bom quando tratados com cirurgia e radioterapia (por exemplo, CECs bucais em T1N0M0, ou seja, de tamanho reduzido e sem invasão em linfonodos regionais ou metástases). Portanto, os resultados da presente pesquisa limitam-se a demonstrar o potencial de desenvolvimento de resistência tumoral à 5-ALA-PDT de tumores bem diferenciados e pouco invasivos, quimicamente induzidos, não sendo possível a extrapolação para a ampla gama de situações de CECs bucais no homem. Também não foi possível realizar vários ciclos de tratamentos de PDT em função da alta mortalidade dos animais, a qual foi atribuída aos efeitos de sensibilização sistêmica provocados pelo ALA, inviabilizando mais de uma sessão envolvendo anestesia geral. Assim, a questão da presença ou não de remissão do tumor após vários ciclos de PDT não foi respondida no presente modelo.

Outra ressalva deve ser feita ao método de análise da expressão das proteínas. Foi realizada quantificação da área de marcação imuno-histoquímica, sendo esta maior para todas as proteínas analisadas no grupo PDT. Contudo, esse resultado não significa haver maior quantidade dessas proteínas, fato que deve ser confirmado por outros métodos. Vale dizer, contudo, que a análise imuno-histoquímica revelou a

presença de marcações de Akt e de mTOR no núcleo das células tumorais tratadas com PDT, as quais não foram vistas no grupo Controle. Além disso, houve maior intensidade de expressão de Bcl-2 no grupo PDT, resultado que não tinha sido detectado no ensaio *in vitro*. Assim, apesar de suas limitações quantitativas, a imunohistoquímica contribuiu para demonstrar aspectos da resistência tumoral à PDT que não tinham sido observados pelos outros métodos.

Em suma, o presente trabalho demonstrou tendência de as células de CEC bucal exibirem fenótipo de resistência após tratamentos repetidos de 5-ALA-PDT, no qual a dose de irradiação variou de 5,86 a 8,20J/cm². Esse fato deve ser considerado no momento da adoção dessa terapia para o CEC bucal. A expressão dos marcadores analisados muito se assemelha àquela observada para a resistência a quimioterapia e radioterapia nesse tumor. Mais estudos são necessários para verificar se outros protocolos de PDT utilizados para o tratamento de CEC bucal (por exemplo, PDT mediada pelo mTHCP) também desenvolvem esse perfil de resistência.

7 CONCLUSÕES

1. Células de CEC bucal tratadas com 5-ALA-PDT a uma dose de 90% de letalidade desenvolveram resistência crescente ao tratamento após ciclos repetidos da terapia.
2. A população celular resistente à PDT exibiu morfologia diferente (maior frequência de macronúcleos), maior capacidade de migração e menor sensibilização ao 5-ALA, gerando menor quantidade de PpIX.
3. A população celular resistente exibiu maior intensidade de expressão de pNF κ B, iNOS, pmTOR e pAkt, proteínas relacionadas com menor taxa de apoptose e autofagia e maior tendência a proliferação celular.
4. CECs bucais induzidos experimentalmente com 4NQO em ratos, tratados com um ciclo de 5-ALA-PDT, demonstraram a existência de células viáveis 24h após o tratamento e tendência a expressar intensivamente proteínas relacionadas à sobrevivência celular: Bcl-2, pNF κ B, iNOS, pmTOR e pAkt.
5. A ausência da taxa de letalidade esperada, aliada à superexpressão de proteínas relacionadas à sobrevivência celular nas células de CEC bucal humano e em CECs bucais induzidos experimentalmente confirmam o potencial de desenvolvimento de resistência à 5-ALA-PDT nesse tipo de tumor. Esse fato deve ser cuidadosamente considerado no momento da instituição dessa terapia para os CECs bucais.

REFERÊNCIAS³

Agostinis P, Berg K, Cengel KA, Foster TH, Girotti AW, Gollnick SO, et al. Photodynamic therapy of cancer an update. *CA Cancer J Clin*. 2011 Jul;61(4):250-81. doi:10.3322/caac.20114.

Almeida LO, Abrahao AC, Rosselli-Murai LK, Giudice FS, Zagni C, Leopoldino AM, et al. NFκB mediates cisplatin resistance trough histone modifications in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). *FEBS Open Bio*. 2014 Dec;4:96-104. doi:10.1016/j.fob.2013.12.003.

Babilas P, Landthaler M, Szeimies RM. Photodynamic therapy in dermatology. *Eur J Dermatol*. 2006 Jul;16(4):340-8.

Bader MJ, Stepp H, Beyer W, Pongratz T, Sroka R, Kriegmair M, et al. Photodynamic therapy of bladder cancer – a phase I study using hexaminolevulinate (HAL). *Urol Oncol*. 2013 Oct;31(7):1178-83. doi:10.1016/j.urolonc.2012.02.007.

Baldwin AS. Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by transcription factor NF-κB. *J Clin Invest*. 2001 Feb;107(3):241-6. doi:[10.1172/JCI11991](https://doi.org/10.1172/JCI11991).

Belcher R, Hayes K, Fedewa S, Chen AY. Current treatment of head and neck squamous cell cancer. *J Surg Oncol*. 2014 Oct;110(5):551-74. doi:10.1007/s11864-011-0176-y.

Bhowmick R, Girotti AW. Cytoprotective Induction of Nitric Oxide Synthase in a Cellular Model of 5-Aminolevulinic Acid-Based Photodynamic Therapy. *Free Radic Biol Med*. 2010 May;48(10):1296–301. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2010.01.040.

³ De acordo com o estilo Vancouver.

Bhowmick R, Girotti AW. Cytoprotective signaling associated with nitric oxide upregulation in tumor cells subjected to photodynamic therapy-like oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 2013 Apr;57:39-48. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.12.005.

Bhowmick R, Girotti AW. Pro-survival and pro-growth effects of stress-induced nitric oxide in a prostate cancer photodynamic therapy model. *Cancer Lett*. 2014 Feb; 343(1):115-22. doi:10.1016/j.canlet.2013.09.025.

Biel M. Advances in photodynamic therapy for the treatment of head and neck cancers. *Lasers Surg Med*. 2006 Jun;38(5):349-55.doi:10.1002/lsm.20368.

Biel M. Photodynamic Therapy treatment of early oral and laryngeal cancers. *Photochem Photobiol*. 2007 Sep;83(5):1063-8. doi:10.1111/j.1751-1097.2007.00153.x

Biel MA. Photodynamic Therapy in head and neck cancer. *Methods Mol Biol*. 2010 Feb;635:281-93. doi:10.1007/978-1-60761-697-9_18.

Brown KK, Toker A. The phosphoinositide 3-kinase pathway and therapy resistance in cancer. *F1000Prime Rep*. 2015 Feb;7:13. doi:10.12703/P7-13.

Burris HA. Overcoming acquired resistance to anticancer therapy: focus on the PI3K/Akt/mTOR pathway. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2013 Apr;71(4):829-42. doi:10.1007/s00280-012-2043-3.

Bussink J, van der Kogel AJ, Kaanders JH. Activation of the PI3K/AKT pathway and implications for the radioresistance mechanisms in head and neck cancer. *Lancet Oncol*. 2008 Mar;9(3):288-96. doi:10.1016/S1470-2045(08)70073-1.

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. doi:10.1016/j.bbcan.2007.07.001.

Casas A, Di Venosa G, Hasan T, Al Batlle. Mechanisms of resistance to photodynamic therapy. *Curr Med Chem*. 2011 Sep;18(16):2486-515.

Casas A, Perotti C, Ortel B, Di Venosa G, Saccoliti M, Batlle A, et al. Tumor cell lines resistant to ALA-mediated photodynamic therapy and possible tools to target surviving cells. *Int J Oncol*. 2006 Aug;29(2):397–405. doi:10.3892/ijo.29.2.397.

Casas A, Di Venosa G, Vanzulli S, Perotti C, Mamome L, Rodriguez L, et al. Decreased metastatic phenotype in cells resistant to aminolevulinic acid-photodynamic therapy. *Cancer Lett*. 2008 Nov;271(2):342-51. doi:10.1016/j.canlet.2008.06.023.

Castano AP, Demidova TN, Hamblin MR. Mechanisms in photodynamic therapy: part one – photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagn Photodyn Ther*. 2004 Dec;1(4):279-93. doi:10.1016/S1572-1000(05)00030-X.

Castano AP, Mroz P, Hamblin MR. Photodynamic therapy and anti-tumor immunity. *Nat Rev Cancer*. 2006 Jul;6(7):535-45. doi:10.1038/nrc1894.

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. doi:10.1002/lsm.20214.

Chen HM, Yu CH, Lin HP, Yang H, Kuo RC, Kuo YS, et al. Successful treatment of an early invasive oral squamous cell carcinoma with topical 5-aminolevulinic acid-

mediated photodynamic therapy. *J Dent Sci.* 2010 Mar;5(1):36-40. doi:10.1016/S1991-7902(10)60006-2.

Chen H-M, Liu C-M, Yang H, Chou H-Y, Chiang C-P, 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. doi:10.1111/j.1600-0714.2010.00973.x.

Choi SK. Autophagy and cancer. *Exp Mol Med.* 2012 Feb;44(2):109-20. doi:10.3858/emm.2012.44.2.033.

Connely ST, Macebeo-Ong M, Dekker N, Jordan RCK, Schmidt BL. Increased nitric oxide levels and iNOS over-expression in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2005 Mar;41(3):261-7. doi:10.1016/j.oraloncology.2004.09.007.

Correia C, Lee SH, Meng XW, Vincelette ND, Knorr KLB, Ding H, et al. Emerging understanding of Bcl-2 biology: implications for neoplastic progression and treatment. *Biochim Biophys Acta.* 2015 Jul;1853(7):1658-71. doi:10.1016/j.bbamcr.2015.03.012.

Coupienne I, Fettweis G, Piette J. RIP3 expression induces a death profile change in U2OS osteosarcoma cells after 5-ALA-PDT. *Lasers Surg Med.* 2011a Sep;43(7):557-64. doi:10.1002/lsm.21088.

Coupienne I, Bontems S, Dewaele M, Rubio N, Habraken Y, Fulda S, et al. NF- κ B inhibition improves the sensitivity of human glioblastoma cell to 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy. *Biochem Pharmacol.* 2011b Mar;81(5):606-16. doi:10.1016/j.bcp.2010.12.015.

Czembirek C, Eder-Czembirek C, Erovic BM, Turhani D, Spittler A, Pötter R, et al. The cyclooxygenase-2 inhibitor nimesulide, a nonsteroidal analgesic, decreases the effect of radiation therapy in head-and-neck cancer cells. *Strahlenther Onkol.* 2009 May;185(5):310-7. doi:10.1007/s00066-009-1929-4.

da Silva SB, Ferlito A, Takes RP, Brakenhoff RH, Valentin MV, Woolgar JA, et al. Advances and applications of oral cancer basic research. *Oral Oncol.* 2011 Sep;47(9):783-91. doi:10.1016/j.oraloncology.2011.07.004.

Davoli T, Lange T. The Causes and consequences of polyploidy in normal development and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2011 Jul;27:585-610. doi:10.1146/annurev-cellbio-092910-154234.

de Visscher SA, Melchers LJ, Dijkstra PU, Karakullukcu B, Tan IB, Hopper C, et al. mTHPC-mediated photodynamic therapy of early stage oral squamous cell carcinoma: a comparison to surgical treatment. *Ann Surg Oncol.* 2013 Sep;20(9):3076-82. doi:10.1245/s10434-013-3006-6.

Dewaele M, Martinet W, Rubio N, Verfaillie T, de Witte PA, Piette J, et al. Autophagy pathways activated in response to PDT contribute to cell resistance against ROS damage. *J Cell Mol Med.* 2011 Jun;15(6):1402-14. doi:10.1111/j.1582-4934.2010.01118.x.

Dolcet X, Llobet D, Pallares J, Matias-Guiu X. NF- κ B in development and progression of human cancer. *Virchows Arch.* 2005 May;446(5):475-82. doi:10.1007/s00428-005-1264-9.

Driessens G, Harsan L, Robaye B, Waroquier D, Browaeys P, Ginnakopoulos, et al. Micronuclei to detect in vivo chemotherapy damage in p53 mutated solid tumor. *Br J Cancer.* 2003 Aug;89(4):727-9. doi:10.1038/sj.bjc.6601163.

Durbec M, Cosmidis A, Fuchsmann C, Ramade A, Céruse P. Efficacy and safety of photodynamic therapy with temoporfin in curative treatment of recurrent carcinoma of the oral cavity and oropharynx. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2013 Mar;270(4):1433-9. doi:10.1007/s00405-012-2083-7.

Eid A, Li S, Garza R, Wong ME. Chemotherapy for oral and maxillofacial tumors: an update. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am*. 2014 May;26(2):163-9. doi:10.1016/j.coms.2014.01.004.

Erstad DJ, Cusack JC, Jr. Targeting the NF- κ B Pathway in Cancer Therapy. *Surg Oncol Clin N Am*. 2013 Oct;22(4):705-46. doi:10.1016/j.soc.2013.06.011.

Ettl T, Viale-Bouroncle S, Hautmann MG, Gosau M, Kölbl O, Reichert TE, et al. AKT and MET signalling mediates antiapoptotic resistance in head and neck cancer cell lines. *Oral Oncol*. 2015 Feb;51(2):158-63. doi:10.1016/j.oraloncology.2014.11.005.

Fahey JM, Girotti AW. Accelerated migration and invasion of prostate cancer cells after a photodynamic therapy-like challenge: role of nitric oxide. *Nitric Oxide*. 2015 Sep;49:47-55. doi:10.1016/j.niox.2015.05.006.

Fan KF, Hopper C, Speight PM, Buonaccorsi G, MacRobert AJ, Bown SG. Photodynamic therapy using 5-aminolevulinic acid for premalignant and malignant lesions of the oral cavity. *Cancer*. 1996 Oct;78(7):1374-83. doi:10.1002/(SICI)1097-0142(19961001)78:7.

Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, et al. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; [cited 2015 apr 15] 2013. Available from: <http://globocan.iarc.fr>.

Fetz V, Bier C, Habtemichael N, Schoun R, Schweitzer A, Kunkel M, et al. Inducible NO synthase confers chemoresistance in head and neck cancer by modulating survivin. *Int J Cancer*. 2009 May;124(9):2033-41. doi:10.1002/ijc.24182.

Fruman DA, Rommel C. PI3K and cancer: lessons, challenges and opportunities. *Nat Rev Drug Discov*. 2014 Feb;13(2):140-56. doi:10.1038/nrd4204.

Fukumura D, Kashiwagi S, Jain RK. The role of nitric oxide in tumor progression. *Nat Rev Cancer*. 2006 Jul;6(7):521 – 34. doi:10.1038/nrc1910.

Galluzzi L, Pietrocola F, Bravo-San Pedro JM, Amaravadi RK, Baehrecke EH, Cecconi F, et al. Autophagy in malignant transformation and cancer progression. *EMBO J*. 2015 Apr;34(7):856-80. doi:10.15252/embj.201490784.

Garg AD, Maes H, Romano E, Agostinis P. Autophagy, a major adaptation pathway shapping cancer cell death and anticancer immunity responses following photodynamic therapy. *Photochem Photobiol Sci*. 2015 Aug;14(8):1410-24. doi:10.1039/c4pp00466c.

Grebenová D, Kuzelová K, Smentana S, Pluskalová M, Cajthamlová H, Marinov I, et al. Mitochondrial and endoplasmatic reticulum stress-induced apoptotic pathways are activated by 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy in HL60 leukemia cells. *J Photochem Photobiol B*. 2003 Feb;69(2):71-85. doi:10.1016/S1011-1344(02)00410-4.

Greenberg JS, El-Naggar AK, Mo V, Roberts D, Myers JN. Disparity in pathologic and clinical lymph node staging in oral tongue carcinoma. Implication for therapeutic decision making. *Cancer*. 2003 Aug;98(3):508–15. doi:10.1002/cncr.11526.

Girotti AW. Tumor-generated nitric oxide as an antagonist of photodynamic therapy. *Photochem Photobiol Sci*. 2015 Aug;14(8):1425-32. doi:10.1039/c4pp00470a.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*. 2011 Mar;144(5):646-74. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013.

Hazlehurst LA, Landowski TH, Dalton W. Role of tumor microenvironment in mediating de novo resistance to drugs and physiological mediators of cell death. *Oncogene*. 2003 Oct;22(47):7396-402. doi:10.1038/sj.onc.1206943.

He J, Agarwal ML, Larkin HE, Friedman LR, Xue LY, Oleinick NL. The induction of partial resistance to photodynamic therapy by the protooncogene BCL-2. *Photochem Photobiol*. 1996 Nov;64(5):845–52. doi:10.1111/j.1751-1097.1996.tb01845.x.

Hein AL, Ouellete MM, Yan Y. Radiation-induced signaling pathways that promote cancer cell survival (review). *Int J Oncol*. 2014 Nov;45(5):1813-9. doi:10.3892/ijo.2014.2614.

Hirschberg H, Sørensen DR, Angell-Petersen E, Peng Q, Tromberg B, Sun CH, et al. Repetitive photodynamic therapy of malignant brain tumors. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*. 2006;25(1-2):261-79. doi:10.1615/JEnvironPatholToxicolOncol.v25.i1-2.170.

Ikeda H, Tobita T, Ohba S, Uehara M, Asahina I. Treatment outcome of Photofrin-based photodynamic therapy for T1 and T2 oral squamous cell carcinoma and dysplasia. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2013 Sep;10(3):229-35. doi:10.1016/j.pdpdt.2013.01.006.

Janakiram NB, Rao CV. iNOS-selective inhibitors for cancer prevention: promise and progress. *Future Med Chem*. 2012 Nov;4(17):2193–204. doi:10.4155/fmc.12.168.

Jedlinski A, Ansell A, Johansson A-C, Roberg K. EGFR status and EGFR ligand expression influence the treatment response of head and neck cancer cell lines. *J Oral Pathol Med*. 2013 Jan;42(1):26-36. doi:10.1111/j.1600-0714.2012.01177.x.

Jerjes W, Upile T, Hamdoon Z, Mosse CA, Akram S, Hopper C. Photodynamic therapy outcome for oral dysplasia. *Lasers Surg Med*. 2011a Mar;43(3):192–9. doi:10.1002/lsm.21036.

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.* 2011b Aug;43(6):463-9. doi:10.1002/lsm.21071.

Jerjes W, Hamdoon Z, Hopper C. Photodynamic therapy in the management of potentially malignant and malignant oral disorders. *Head Neck Oncol.* 2012 Apr;4:16. doi:10.1186/1758-3284-4-16.

Ji HT, Chien LT, Chien GF, Chen CT. 5-ALA mediated photodynamic therapy induces autophagic cell death via AMP- activated protein kinase. *Mol Cancer.* 2010 Apr;9:91. doi:10.1186/1476-4598-9-91.

Jing H, Lee S. NF- κ B in cellular senescence and cancer treatment. *Mol Cell.* 2014 Mar;37(3):189-95. doi:10.14348/molcells.2014.2353.

Khan KH, Blanco-Codeido M, Molife R. Cancer Therapeutics: targeting the apoptotic pathway. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2014 Jun;90(3):200-19. doi:10.1016/j.critrevonc.2013.12.012.

Khan Z, Bisen OS. Oncoapoptotic signaling and deregulated target genes in cancer: special reference to oral cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2013 Aug;1836(1):123-45. doi:10.1016/j.bbcan.2013.04.002.

Kessel D. Apoptosis and associated phenomena as a determinants of the efficacy of photodynamic therapy. *Photochem Photobiol Sci.* 2015 Aug;14(8):1397-402. doi:10.1039/c4pp00413b.

kessel D, Reiners JJ Jr. Apoptosis and autophagy after mitochondrial or endoplasmic reticulum photodamage. *Photochem Photobiol.* 2007 Sep-Oct;83(5):1024-8. doi: 10.1111/j.1751-1097.2007.00088.x.

Kim HRC, Luo Y, Li G, Kessel D. Enhanced apoptotic response to photodynamic therapy after bcl-2 transfection. *Cancer Res.* 1999 Jul;59(14):3429-32.

Kim J, Jung H, Lim W, Kim S, KoY, Karna S, et al. Down-regulation of heat-shock protein 27-induced resistance to photodynamic therapy in oral cancer cells. *J Oral Pathol Med.* 2013 Jan;42(1):9–16. doi:10.1111/j.1600-0714.2012.01155.x.

Kim J, Lim W, Kim S, Jeon S, Hui Z, Ni K, et al. Photodynamic therapy (PDT) resistance by PARP1 regulation on PDT-induced apoptosis with autophagy in head and neck cancer cells. *J Oral Pathol Med.* 2014 Oct;43(9):675-84. doi:10.1111/jop.12195.

Konopka K, Goslinski T. Photodynamic therapy in dentistry. *J Dent Res.* 2007 Aug;86(8):694–707.

Kormeili T, Yamauchi OS, Lowe NJ. Topical photodynamic therapy in clinical dermatology. *Br J Dermatol.* 2004 Jun;150(6):1061-9. doi: 10.1111/j.1365-2133.2004.05940.x.

Krammer B, Plaetzer K. ALA and its impact, from bench to bedside. *Photochem Photobiol Sci.* 2007 Mar;7(3):283-9. doi:10.1039/b712847a.

Kuliková L, Mikeš J, Hýždálová M, Palumbo G, Fedoročko P. NF-κB is not directly responsible for photoresistance induced by fractionated light delivery in HT-29 colon adenocarcinoma cells. *Photochem Photobiol.* 2010 Nov-Dec;86(6):1285-93. doi: 10.1111/j.1751-1097.2010.00788.x.

Laafi J, Homedan C, Jacques C, Gueguen N, Schmitt C, Puy H, et al. Pro-oxidant effect of ALA is implicated in mitochondrial dysfunction of HepG2 cells. *Biochimie.* 2014 Nov;106:157-66. doi:10.1016/j.biochi.2014.08.014.

Landini G. Color deconvolution. [cited 2015 Aug 17] 2010. Available from: <http://www.mecourse.com/landinig/software/cdeconv/cdeconv.html>.

Lambert R, Suaveget C, de Camargo Cancela M, Sankaranarayanan R. Epidemiology of cancer from the oral cavity and oropharynx. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2011 Aug;23(8):633-41. doi:10.1097/MEG.0b013e3283484795.

Laplanche M, Sabatini DM. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell*. 2012 Apr;149(2):274-93. doi:10.1016/j.cell.2012.03.017.

Lechner M, Lirk P, Rieder J. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) in tumor biology: the two sides of the same coin. *Semin Cancer Biol*. 2005 Aug;15(4):277-89. doi:10.1016/j.semcancer.2005.04.004.

Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*. 2008 Jan;132(1):27-42. doi:10.1016/j.cell.2007.12.018.

Lim J, Kim JH, Paeng JY, Kim MJ, Hong SD, Lee JI, et al. Prognostic value of activated Akt expression in oral squamous cell carcinoma. *J Clin Pathol*. 2005 Nov;58(11):1199-205. doi: 10.1136/jcp.2004.024786.

Liu P, Cheng H, Roberts TM, Zhao JJ. Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. *Nat Rev Drug Discov*. 2009 Aug;8(8):627-44. doi:10.1038/nrd2926.

Liu VW, Hedberg ML, Li H, Vangara BS, Penleton K, Zeng Y. Frequent mutation of the pi3K pathway in head and neck cancer defines predictive biomarkers. *Cancer Discov*. 2013 Jul;3(7):761-9. doi:10.1158/2159-8290.CD-13-0103.

Lowenstein CJ, Padalko E. iNOS (NOS2) at glance. *J Cell Sci.* 2004 Jun;117(14):2865-7.

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;169(1):33-9. doi:10.1016/S0304-3835(01)00559-6.

Luna MC, Gomer CJ. Isolation and Initial Characterization of mouse tumor cells resistant to porphyrin-mediated photodynamic therapy. *Cancer Res.* 1991 Aug;51:4243-9.

Lugmani YA. Mechanisms of drug resistance in cancer chemotherapy. *Med Princ Pract.* 2005 Jul;14:35-48. doi:10.1159/000086183.

Ma G, Ikeda H, Inokuchi T, Sano K. Effect of photodynamic therapy using 5-aminolevulinic acid on 4-nitroquinoline-1-oxide-induced premalignant and malignant lesions of mouse tongue. *Oral Oncol.* 1999 Jan;35(1):120-4.

Madsen SJ, Sun CH, Tromberg BJ, Hirschberg H. Repetitive 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy on human glioma spheroids. *J Neurooncol.* 2003 May;62(3):243-50. doi:10.1023/A:1023362011705.

Manning BD, Cantley LC. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell.* 2007 Jun;129(7):1261-74. doi:10.1016/j.cell.2007.06.009.

Matroule JY, Carthy CM, Granville DJ, Jolois O, Hunt DWC, Piette J. Mechanism of colon cancer cell apoptosis mediated by pyropheophorbide-a methylester photosensitization. *Oncogene.* 2001 Jul;20(3):4070-84.

Milla LN, Cogno IS, Rodríguez ME, Sanz-Rodríguez F, Zamarrón A, Gilaberte Y, et al. Isolation and characterization of squamous carcinoma cells resistant to photodynamic therapy. *J Cell Biochem*. 2011 Sep;112(9):2266-78. doi:10.1002/jcb.23145.

Molinolo AA, Amornphimoltham P, Squarize CH, Castilho RM, Patel V, Gutkind S. Dysregulated molecular networks in head and neck carcinogenesis. *Oral Oncol*. 2009 Apr-May;45(4-5):324-34. doi:10.1016/j.oraloncology.2008.07.011.

Monteiro LS, Delgado ML, Ricardo S, Garcez F, Amaral B, Warnakulasuriya S, et al. Phosphorylated mammalian target of rapamycin is associated with and adverse outcome in oral squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2013 May;115(5):638-45. doi:10.1016/j.oooo.2013.01.022.

Moore CM, Nathan TR, Less WR, Mosse CA, Freeman A, Emberton M, et al. Photodynamic therapy using meso tetra hydroxy phenyl chlorin (mTHPC) in early prostate cancer. *Lasers Surg Med*. 2006 Jun;38(5):356-63. doi:10.1002/lsm.20275.

Nakagawa Y, Nakayama H, Nagata M, Yoshida R, Kawahara K, Hirosue A, et al. Overexpression of fibronectin confers cell adhesion-mediated drug resistance (CAM-DR) against 5-FU in oral squamous cell carcinoma cells. *Int J Oncol*. 2014 Apr;44(4):1376-84. doi:10.3892/ijo.2014.2265.

Naruse T, Yanamoto S, Yamada S, Rokutanda S, Kawakita A, Kawasaki G, et al. Anti-tumor effect of the mammalian target of rapamycin inhibitor everolimus in oral squamous cell carcinoma. *Pathol Oncol Res*. 2015 Jul;21(3):765-73. doi:10.1007/s12253-014-9888-1.

Nathan TR, Whitelaw DE, Chang SC, LeesWR, Ripley PM Payne H, et al. Photodynamic therapy for prostate cancer recurrence after radiotherapy: a phase I study. *J Urol*. 2002 Oct;168(4):1427-32.

Nicholson KM, Anderson NG. The protein kinase B/Akt pathway in human malignancy. *Cell Signal*. 2002 May;14(5):381 – 95. doi:10.1016/S0898-6568(01)00271-6.

Pervin S, Singh R, Hernandez E, Wu G, Chaudhuri G. Nitric Oxide in Physiologic concentrations targets the translational machinery to increase the proliferation of human breast cancer cells: involvement of mammalian target of rapamycin/eIF4E pathway. *Cancer Res*. 2007 Jan;67(1):289-99. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-4623.

Peterson PE. Oral cancer prevention and control – the approach of the world health organization. *Oral Oncol*. 2009 Apr-May;45(4-5):454-60. doi:10.1016/j.oraloncology.2008.05.023.

Piette J. Signalling pathway activation by photodynamic therapy: NF- κ B at the crossroad between oncology and immunology. *Photochem Photobiol Sci*. 2015 Aug;14(8):1510-7. doi:10.1039/c4pp00465e.

Poillet-Perez L, Despouy G, Delage-Mourroux R, Boyer-Guittaut M. Interplay between ROS and autophagy in cancer cells, from tumor initiation to cancer therapy. *Redox Biol*. 2015 Apr;4:184-92. doi:10.1016/j.redox.2014.12.003.

Pontes HAR, Pontes FSC, de Jesus AS, Soares MCP, Gonçalves FLN, de Lucena Botelho T, et al. p-Akt and its relationship with clinicopathological features and survival in oral squamous cell carcinoma: an immunohistochemical study. *J Oral Pathol Med*. 2015 Aug;44(7):532-7. doi:10.1111/jop.12268.

Porta C, Paglino C, Mosca A. Targeting PI3K/Akt/mTOR signaling in cancer. *Front Oncol*. 2014 Apr;4:64. doi:10.3389/fonc.2014.00064.

Qumseya BJ, David W, Wolfsen HC. Photodynamic therapy for barrett's esophagus and esophageal carcinoma. *Clin Endosc.* 2013 Jan;46(1):30-7. doi:10.5946/ce.2013.46.1.30.

Radogna F, Dicato M, Diederich M. Cancer-type-specific crosstalk between autophagy, necroptosis and apoptosis as pharmacological target. *Biochem Pharmacol.* 2015 Mar;94(1):1-11. doi:10.1016/j.bcp.2014.12.018.

Rapozzi V, Umezawa K, Xodo LE. Role of NF- κ B/Snail/RKIP loop in the response of tumor cells to photodynamic therapy. *Lasers Surg Med.* 2011 Sep;43(7):575-85. doi:10.1002/lsm.21095.

Reiners JJ Jr, Agostinis P, Berg K, Oleinick NL, Kessel D. Assessing autophagy in the context of photodynamic therapy. *Autophagy.* 2010 Jan;6(1):7-18. doi:10.4161/auto.6.1.10220.

Ruifrok AC, Johnston DA. Quantification of histochemical staining by color deconvolution. *Anal Quant Cytol Histol.* 2008 Aug;23(4):291–9. doi:10.1016/j.jtbi.2015.03.004.

Sabatini DM. mTOR and cancer: insights into a complex relationship. *Nat Rev Cancer.* 2006 Sep;6(9):729 – 34. doi:10.1038/nrc1974.

Sappayatosok K, Maneerat Y, Swadison S, Viriyavejakul P, Dhanuthai K, Zwang J, et al. Expression of pro-inflammatory protein, iNOS, VEGF and COX-2 in oral squamous cell carcinoma (OSCC), relationship with angiogenesis and their clinical pathological correlation. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2009 Jul;14(7):E319-24.

Sawhney M, Rohatgi N, Kaur J, Shishodia S, Sethi G, Gupta SD, et al. Expression of NF κ B parallels COX-2 expression in oral precancer and cancer: association with smokeless tobacco. *Int J Cancer.* 2007 Jan;120(12):2545-56. doi:10.1002/ijc.22657.

Sharkey SM, Wilson BC, Moorhead R, Singh G. Mitochondria! Alterations in photodynamic therapy-resistance cells. *Cancer Res.* 1993 Oct;53(20):4994-9. doi:10.1117/12.822916.

Shen XY, Zaca N, Singh G, Rainbow AJ. Alterations in mitochondria and apoptosis-regulating gene expression in photodynamic therapy-resistant variants of HT29 Colon Carcinoma Cells. *Photochem Photobiol.* 2005 Mar-Apr;81(2):306-13. doi:10.1111/j.1751-1097.2005.tb00188.

Simone CB, Friedberg JS, Glatstein E, Stevenson JP, Sterman DH, Hahn SM, et al. Photodynamic therapy for the treatment of non-small cell lung cancer. *J Thorac Dis.* 2012 Feb;4(1):63-75. doi:10.3978/j.issn.2072-1439.2011.11.05.

Simpson DR, Mell LK, Cohen EEW. Targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oral Oncol.* 2015 Apr;51(4):291-8. doi:10.1016/j.oraloncology.2014.11.012.

Singh S, Gupta AK. Nitric oxide: role in tumor biology and iNOS/NO based anticancer therapy. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2011 Jun;67(6):1211-24. doi:10.1007/s00280-011-1654-4.

Singh G, Espiritu M, Shen XY, Hanlon JG, Rainbow AJ. In Vitro Induction of PDT Resistance in HT29, HT1376 and SK-N-MC Cells by Various Photosensitizers. *Photochem Photobiol.* 2001 Jun;73(6):651-6. doi:10.1562/0031-8655(2001)0730651IVIOPR2.0.CO2.

Solyanik GI. Multifactorial nature of tumor drug resistance. *Exp Oncol.* 2010 Sep;32(3):181-5. doi:10.1016/j.ejpb.2012.02.005.

Song J, Chen Q, Xing D. Enhanced apoptotic effects by downregulating Mcl-1: evidence for the improvement of photodynamic therapy with Celecoxib. *Exp Cell Res.* 2013; Jun;319(10):1491-504. doi:10.1016/j.yexcr.2013.03.012.

Song K, Song Y, Zhao XP, Shen H, Wang M, Yan TL, et al. Oral cancer/endothelial cell fusion experiences nuclear fusion and acquisition of enhanced survival potential. *Exp Cell Res.* 2014 Oct;328(1):156-63. doi:10.1016/j.yexcr.2014.07.006.

Sperandio FF. Análise da expressão e mecanismos de ação das proteínas Akt, Hsp90, mTOR e ciclina D1 em cultura de células de carcinoma epidermóide humano e células displásicas após irradiação com laser em baixa intensidade [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2012.

St Denis TG, Aziz K, Waheed AA, Huang Y-Y, Sharma SK, Mroz P. Combination approaches to potentiate immune response after photodynamic therapy of cancer. *Photochem Photobiol Sci.* 2011 May;10(5):792-801. doi:10.1039/c0pp00326c.

Tang JY, Hsi E, Huang YC, Hsu NC, Chen YK, Chu PY, et al. ATG overexpression is associated with disease recurrence and poor survival in patients with oral squamous cell carcinoma. *Virchows Arch.* 2013 Dec;463(6):737-42. doi:10.1371/journal.pone.0083869.

Tang JY, Hsi E, Huang YC, Hsu NC, Yang WC, Chang HW, et al. Overexpression of autophagy-related 16-like 1 in patients with oral squamous cell carcinoma. *Pathol Oncol Res.* 2014 Apr;21(2):301-5. doi:10.1007/s12253-014-9821-7.

Thomas DD, Espsey MG, Ridnour LA, Hofseth LJ, Mancardi D, Harris CC. Hypoxic inducible factor 1alpha, extracellular signal-regulated kinase, and p53 are regulated by distinct threshold concentrations of nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004 Jun;101(24):8894-9. doi: 10.1111/j.1742-4658.2008.06725.x.

Toker A, Marmiroli. Signaling specificity in the Akt pathway in biology and disease. *Adv Biol Regul.* 2014 May;55:28-38. doi:10.1016/j.jbior.2014.04.001.

Torezan L, Niwa ABM, Festa Neto C. Photodynamic therapy in dermatology: basic principles. *An Bras Dermatol.* 2009 Sep-Oct;85(5):445-59.

Toulany M, Rodemann HP. Potential of Akt mediated DNA repair in radioresistance of solid tumors overexpressing erbB-PI3K-Akt pathway. *Transl Cancer Res.* 2013 Jun;2(3):190-202. doi:10.3978/j.issn.2218-676X.2013.04.09.

Tsai JC, Chiang CP, Chen HM, Huang SB, Wang CW, Lee MI, et al. Photodynamic Therapy of oral dysplasia with topical 5-aminolevulinic acid and light-emitting diode array. *Lasers Surg Med.* 2004 Jan;34(1):18-24. doi:10.1002/lsm.10250.

Tsai T, Ji HT, Chiang PC, Chou RH, Chang WSW, Chen CT. ALA-PDT results in phenotypic changes and decreased cellular invasion in surviving cancer cells. *Lasers Surg Med.* 2009 Apr;41(4):305-15. doi:10.1002/lsm.20761.

Varghese SS, Sunil PM, Madhavan RN. Expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) in oral precancer and oral squamous cell carcinoma: an immunohistochemical study. *Cancer Biomark.* 2010 Oct;8(3):155-60. doi:10.3233/CBM-2011-0207.

Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-kinase-akt pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer.* 2002 Jul;2(7):489-501. doi:10.1038/nrc839.

Wachowska M, Muchowicz A, Firczuk M, Gabrysiak M, Winiarska M, Wańczyk M, et al. Aminolevulinic acid (ALA) as a prodrug in photodynamic therapy of cancer. *Molecules.* 2011;16:4140-64. doi:10.3390/molecules16054140.

Wang HP, Hanlon JG, Rainbow AJ, Espiritu M, Singh G. Up-regulation of Hsp27 plays a role in the resistance of human colon carcinoma HT29 cells to photooxidative stress. *Photochem Photobiol.* 2002 Jul;76(1):98-104. doi:10.1562/0031-8655(2002)0760098UROHPA2.0.CO2.

Wan J, Wu W, Che Y, Kang N, Zhang R. Low dose photodynamic-therapy induce immune escape of tumor cells in a HIF-1 α dependent manner through PI3K/Akt pathway. *Int Immunopharmacol.* 2015 Sep;28(1):44-51. doi:10.1016/j.intimp.2015.05.025.

Warnakulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncol.* 2009 Apr-May;45(4-5):309-16. doi:10.1016/j.oraloncology.2008.06.002.

Weng J, Wang C, Wang Y, Tang H, Liang J, Liu X, et al. Beclin1 inhibits proliferation, migration and invasion in tongue squamous cell carcinoma lines. *Oral Oncol.* 2014 Oct;50(10):983-90. doi:10.1016/j.oraloncology.2014.06.020.

Weyergang A, Berg K, Kaalhus O, Peng Q, Selbo PK. Photodynamic therapy targets the mTOR signaling network in vitro and in vivo. *Mol Pharm.* 2009 Jan-Feb;6(1):255-64. doi:10.1021/mp800156e.

Xu K, Liu P, Wei W. mTOR signaling in tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta.* 2014 Dec;1846(2):638-54. doi:10.1016/j.bbcan.2014.10.007.

Yamamoto K, Kitayama W, Denda A, Sasahira T, Kuniyasu H, Kirita T. Expression of receptor for advanced glycation end products during rat tongue carcinogenesis by 4-Nitroquinoline 1-oxide and effect of a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, etodolac. *Pathobiology* 2006; 73: 317-24. doi:10.1159/000099127.

Yamamoto M, Fujita H, Katase N, Inoue K, Nagatsuka H, Utsumi K, et al. Improvement of the efficacy of 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic

treatment in human oral squamous cell carcinoma HSC-4. *Acta Med Okayama*. 2013 Jun;67(3):153-64.

Yuan TL, Cantley LC. PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. *Oncogene*. 2008 Sep;27(41):5497-510. doi:10.1038/onc.2008.245.

Zamarrón A, Lucena SR, Salazar N, Sanz-Rodríguez F, Jaén P, Golaberte Y, et al. Isolation and characterization of PDT-resistant cancer cells. *Photochem Photobiol Sci*. 2015 Aug;14(8):1378-89. doi:10.1039/c4pp00448e.

Zerp SF, Stoter R, Hoebbers FJP, van den Brekel MWM, Dubbelman R, Kuipers GK. Targeting anti-apoptotic Bcl-2 by AT-101 to increase radiation efficacy: data from in vitro and clinical pharmacokinetic studies in head and neck cancer. *Radiat Oncol*. 2015 Jul;10:158. doi:10.1186/s13014-015-0474-9.

Zhang B, Liu M, Tang HK, Ma HB, Wang C, Chen X, et al. The expression and significance of MRP1, LRP, TOPOIIb, and BCL2 in tongue squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 2012 Feb;41(2):141-8. doi:10.1111/j.1600-0714.2011.01066.x.

Zhi X, Zhong Q. Autophagy in cancer. *F100oPrime Rep*. 2015 Feb;7:18. doi:10.12703/P7-18.

Zhou H, Huang S. Role of mTOR signaling in tumor cell motility, invasion and metastasis. *Curr Protein Pept Sci*. 2011 Feb;12(1):30-42. doi:10.2174/138920311795659407.

APÊNDICE A – Padronização da concentração e do tempo de incubação do ALA, e do tempo de irradiação com led

Inicialmente padronizamos a dose de 5-ALA. A dose inicial de 1mM foi baseada nos artigos de Yamamoto et al. (2013) e Chen et al. (2011), que utilizaram essa dose no tratamento de células de câncer bucal. Contudo, a dose de 5-ALA varia muito na literatura. Como há relatos de experimentos com doses menores de 1mM, resolvemos avaliar a viabilidade celular com as doses de 0,25; 0,5; 0,75 e 1mM. As células foram tratadas com essas diferentes concentrações de 5-ALA por 4h e, em seguida, irradiadas com a energia de $3,52\text{J}/\text{cm}^2$ (150mW, 90s). A Figura A.1 mostra a média de viabilidade celular para cada dose de ALA utilizada. Observamos maior eficiência da PDT, ou seja, menor viabilidade celular nas células tratadas com 5-ALA a 1mM.

a) Concentração e tempo de incubação do ALA

Letras diferentes indicam significância estatística ($p < 0.05$).
Teste de ANOVA seguida de teste de Tukey.

Figura A.1 - Média de viabilidade celular (%) segundo diferentes concentrações de ALA

O tempo de incubação com ALA também varia muito na literatura. Nos artigos citados anteriormente, a incubação de 5-ALA teve duração de 3h, mas também há relatos de tempo de incubação maiores (geralmente 4h) e menores. Avaliamos, assim,

os seguintes tempos de incubação de ALA: 30min, 1h, 2h, 3h e 4h. As células foram incubadas com 1mM de ALA nos tempos citados acima e, em seguida, foram irradiadas com a energia de $3,52\text{J}/\text{cm}^2$ (150mW, 90s). A Figura A.2 mostra a média de porcentagem de viabilidade celular nos diferentes tempos de incubação. Verificamos que o tempo de incubação de 4h induziu menor viabilidade celular do que os demais tempos avaliados.

Letras diferentes indicam significância estatística ($p < 0.05$).
Teste de ANOVA seguida de teste de Tukey.

Figura A.2 - Média de viabilidade celular (%) segundo diferentes tempos de incubação do ALA

O tempo de incubação de 4h e a concentração de 1mM de ALA foram adotados para o experimento, já que esse protocolo acarretou a menor média de viabilidade celular ($29.1 \pm 17.6\%$).

b) Tempo de irradiação

Após o estabelecimento da dose e do tempo de incubação do 5-ALA, iniciamos a padronização da dose de irradiação. A dose de irradiação foi selecionada de acordo com os ensaios de viabilidade celular, sendo escolhida a que induziu viabilidade celular de 1-10% (DL90). As células foram tratadas com 1mM de 5-ALA por 4h e, em

seguida, irradiadas com os seguintes tempos de irradiação: 30s, 90s, 120s e 150s. A Figura A.3 mostra a média da porcentagem de viabilidade celular de acordo com os diferentes tempos de irradiação. Verificamos viabilidade celular de 4,1% no tempo de irradiação de 150s, portanto esse tempo de irradiação foi selecionado, pois induziu uma viabilidade celular abaixo de 10%.

Letras diferentes indicam significância estatística ($p < 0.05$).

Teste de ANOVA seguida de teste de Tukey.

Figura A.3 - Média de viabilidade celular (%) segundo diferentes tempos de irradiação LED

O tempo de 150s (equivalente a $5,86 \text{ J/cm}^2$) foi adotado como a dose inicial do experimento, já que acarretou a menor média de viabilidade celular ($4.1 \pm 0.9\%$).

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa (Seres Humanos)

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Mecanismos de resistência à PDT desenvolvidos por células de carcinoma epidermóide bucal

Pesquisador: Luciana Corrêa

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 32879214.3.0000.0075

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 736.016

Data da Relatoria: 01/08/2014

Apresentação do Projeto:

O carcinoma epidermóide bucal (CEC) constitui uma neoplasia maligna de alta morbidade, com alto índice de recidiva e de resistência aos tratamentos convencionais. A terapia fotodinâmica (PDT) tem sido utilizada em casos iniciais de CEC, com índices promissores de remissão completa do tumor. Não se sabe, contudo, se as células de CEC podem desenvolver resistência à PDT, principalmente nas situações em que essa terapia é utilizada durante vários ciclos, com administração de doses subletais.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Analisar o mecanismo de sobrevivência/resistência de células de câncer bucal humano quando submetidas a ciclos repetidos de PDT mediada pelo 5-ALA.

Objetivo Secundário:

- Verificar se as células de CEC bucal humano desenvolvem resistência à PDT mediada pelo 5-ALA por intermédio de testes de viabilidade celular e índice de apoptose.
- Analisar a quantidade e a distribuição da protoporfirina IX nos clones celulares submetidos a diferentes doses de PDT. Analisar a morfologia das células, a capacidade de migração celular e a formação de colônias nos diferentes grupos experimentais.

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-900

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)3091-7960

Fax: (11)3091-7814

E-mail: cepfo@usp.br

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

Continuação do Parecer: 736.016

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não há riscos, não há participantes envolvidos, somente os pesquisadores que segundo relataram seguirão o protocolo laboratorial específico para trabalhar com cultura de células cancerosas.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Como o experimento vai ser feito em células de CEC de cultura vendidas comercialmente, a pesquisa é interessante, pois os resultados darão um melhor entendimento sobre a terapia que já é usada clinicamente.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Não é necessário, cultura de células.

Recomendações:

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP-FOUSP relatórios parciais semestrais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final ao término do trabalho. Qualquer modificação do projeto original deve ser apresentada a este CEP, de forma objetiva e com justificativas, para nova apreciação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

SAO PAULO, 01 de Agosto de 2014

Assinado por:
Maria Gabriela Haye Biazevic
(Coordenador)

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-900

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-7960

Fax: (11)3091-7814

E-mail: cepfo@usp.br

ANEXO B – Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

Certificado

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **007/2013** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a). **Luciana Corrêa** Coordenador(a) da Linha de Pesquisa "**Avaliação da eficácia da terapia fotodinâmica mediada por ácido 5-aminolevulínico na remissão do carcinoma epidermóide bucal induzido por 4-nitroquinolina 1-óxido**" do qual participam o(s) pesquisador(es) **Flávia Cristina Perillo Rosin**, 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 **29/04/2013**, com validade de **03 (três)** anos.

São Paulo, 29 de abril de 2013

Prof. Dr. João Gualberto de Cerqueira Luz
Coordenador do CEUA-FOUSP

Av. Prof. Lineu Prestes, 2227 - Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira",
São Paulo - SP - CEP 05508-000 - FAX (0XX11) 3091-7879 -
Tels. Chefia (0XX11) 3091-7863 - Secretaria do Depto. (0XX11) 3091-7887.