

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA  
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

ALINE SCOTTINI

TERAPIA FOTODINÂMICA COM AZUL DE METILENO EM CÉLULAS DERIVADAS  
DE CARCINOMA ESPINOCELULAR: ESTUDO *IN VITRO*

PONTA GROSSA  
2021

ALINE SCOTTINI

TERAPIA FOTODINÂMICA COM AZUL DE METILENO EM CÉLULAS DERIVADAS  
DE CARCINOMA ESPINOCELULAR: ESTUDO *IN VITRO*

Dissertação apresentada para obtenção do título de mestre em Ciências da Saúde do Programa de Pós-Graduação Interdisciplinar em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Bauml Campagnoli

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Kátia Sabrina Paludo

PONTA GROSSA  
2021

S431 Scottini, Aline  
Terapia fotodinâmica com azul de metileno em células derivadas de carcinoma espinocelular: estudo in vitro / Aline Scottini. Ponta Grossa, 2021. 52 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde - Área de Concentração: Atenção Interdisciplinar em Saúde), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Bauml Campagnoli.

Coorientadora: Profa. Dra. Kátia Sabrina Paludo.

1. Fotoquimioterapia. 2. Câncer de boca. 3. Espécies reativas de oxigênio. I. Campagnoli, Eduardo Bauml. II. Paludo, Kátia Sabrina. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Atenção Interdisciplinar em Saúde. IV.T.

CDD: 616

ALINE SCOTTINI

**TERAPIA FOTODINÂMICA COM AZUL DE METILENO EM CÉLULAS  
DERIVADAS DE CARCINOMA ESPINOCELULAR: ESTUDO *IN VITRO***

Dissertação apresentada para obtenção do título de mestre em Ciências da Saúde na  
Universidade Estadual de Ponta Grossa, Área de Atenção Interdisciplinar em Saúde.

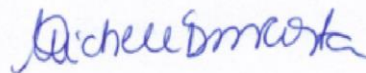
Ponta Grossa, 16 de dezembro de 2021.



Prof. Dr. Eduardo Bauml Campagnoli – Orientador  
Doutor em Estomatopatologia  
Universidade Estadual de Ponta Grossa



Prof. Dra. Melissa Rodrigues de Araujo  
Doutora em Estomatologia e Biologia Oral  
Universidade Federal do Paraná



Prof. Dra. Michele Dietrich Moura Costa  
Doutora em Biologia Celular e Molecular  
Universidade Estadual de Ponta Grossa

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Estadual de Ponta Grossa, ao programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, ao CNPQ e à CAPES pela oportunidade de realizar o mestrado.

Agradeço ao meu orientador, prof. Dr. Eduardo B. Campagnoli, por toda a paciência, amizade e dedicação durante esta jornada acadêmica, e à minha coorientadora prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Kátia S. Paludo por compartilhar seu tempo e conhecimento sobre o “mundo” do cultivo celular durante todo este projeto. Sem o apoio destes mestres jamais teria desenvolvido este projeto e por isso sou muito grata.

Agradeço também aos colegas de pesquisa Sabrina e Anderson que estiveram presentes e me auxiliaram durante a realização dos experimentos, assim como a todos os colegas de laboratório que encontrei durante a realização da pesquisa.

Agradeço a todos os professores, colaboradores e colegas do programa de pós graduação, e em especial agradeço aos colegas Marília, André e Simonei pelo apoio nos momentos mais difíceis. Vocês me ajudaram a encarar esta jornada com mais leveza.

Agradeço à minha família, especialmente aos meus pais, Inês e Luiz Carlos, por terem me dado todo o apoio e suporte durante esses dois anos.

Agradeço aos meus amigos Mariane, Camila e Willian, por me escutarem e me encorajarem nos momentos que mais precisei.

## RESUMO

Atualmente o câncer em boca é uma das neoplasias malignas mais frequentes do mundo e os principais tratamentos são a cirurgia, quimioterapia e radioterapia. No entanto, tais terapias causam muitos efeitos adversos e prejudicam a qualidade de vida do paciente. A terapia fotodinâmica (TFD) pode vir a ser uma opção no tratamento nesses casos, uma vez que gera menos efeitos colaterais. Esta terapia consiste no uso de um fotossensibilizador que é ativado por uma luz específica e na presença de oxigênio, causa a liberação de espécies reativas de oxigênio, promovendo danos e morte celular. Dentre os fotossensibilizadores existentes, o azul de metileno (AM) é um dos mais utilizados por apresentar efeito antimicrobiano comprovado, poucos efeitos colaterais e baixo custo. No entanto, ainda há poucos estudos sobre a TFD com AM em carcinoma espinocelular que se origina na mucosa bucal. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da TFD com AM em linhagem celular derivada de Carcinoma Espinocelular de língua (SCC-4), bem como comparar com uma linhagem não neoplásica (fibroblastos 3T3). Para tanto, as células SCC-4 e 3T3 foram incorporadas com soluções de AM em concentrações que variaram de 25  $\mu\text{M}$  a 3200  $\mu\text{M}$  nas linhagens SCC-4 e 3T3 por 30 min. Após a definição das concentrações menos citotóxicas, a TFD foi realizada nas células SCC-4 com aparelho laser com comprimento de onda 660 nm, potência de 50 mW, energia de 6 J por ponto, 120 segundos e densidade de energia de 150 J/cm<sup>2</sup>. A viabilidade celular foi avaliada em dois momentos diferentes (24 h e imediatamente após o tratamento com TFD) através do teste de MTT. Na linhagem SCC-4 o fotossensibilizador (AM) alterou a viabilidade celular a partir da concentração de 200  $\mu\text{M}$  e foi citotóxico para a linhagem 3T3 a partir da concentração de 100  $\mu\text{M}$ . A TFD com AM foi realizada nas células SCC-4 nas concentrações de 25  $\mu\text{M}$  e 50  $\mu\text{M}$  de AM. Nos dois tempos de pós tratamento (0 e 24 h) a TFD com AM afetou a viabilidade celular da linhagem SCC-4 nas duas concentrações, no entanto apenas na avaliação pós-24 h o tratamento com TFD foi considerado citotóxico (viabilidade celular < 70%). Com base nos dados obtidos, conclui-se que a TFD com AM afeta negativamente a viabilidade celular de células SCC-4 após 30 minutos de exposição ao fotossensibilizador nas concentrações de 25 e 50  $\mu\text{M}$  e 02 minutos de irradiação com laser (660 nm, 50 mW, área de 0,04 cm<sup>2</sup>, ou seja, 150 J/cm<sup>2</sup>).

**Palavras-chave:** Fotoquimioterapia. Câncer de boca. Espécies reativas de oxigênio.

## ABSTRACT

Nowadays, oral cancer is one of the most frequent cancer in the world and the gold standard treatments are surgery, chemotherapy and radiotherapy. However, such therapies cause many side effects and damages the patient's quality of life. Photodynamic therapy (PDT) usually induces fewer side effects and may be an option in these cases. This therapy consists in the use of a photosensitizer that is activated by a specific light and in the presence of oxygen releases reactive oxygen species, promoting cell damage and death. Among the existing photosensitizers, methylene blue (MB) is one of the most used because of its proven antimicrobial effect, few side effects and low cost. Nonetheless, there are still few studies on PDT with MB in oral squamous cell carcinoma (OSCC). The aim of this study was to evaluate the effect of PDT with MB in a cell line derived from squamous cell carcinoma of tongue (SCC-4), as well as to compare it with a non-neoplastic cell line (3T3 fibroblasts). For this purpose, the SCC-4 and 3T3 cells were incubated with MB solutions at concentrations ranging from 25  $\mu\text{M}$  to 3200  $\mu\text{M}$  for 30 min. After defining the least cytotoxic concentrations, PDT was performed on SCC-4 cells with a laser device with a wavelength of 660 nm, 50 mW, 6 J, 120 seconds of irradiation and energy density of 150  $\text{J}/\text{cm}^2$ . Cell viability was evaluated at two different times (immediately after treatment with PDT and after 24 h) using the MTT test. In the SCC-4 line, the photosensitizer (MB) reduced cell viability from a concentration of 200  $\mu\text{M}$  and was cytotoxic to the 3T3 line from a concentration of 100  $\mu\text{M}$ . MB PDT was performed on SCC-4 cells at concentrations of 25  $\mu\text{M}$  and 50  $\mu\text{M}$ . In the two post-treatment times (0 and 24 h) the PDT with MB affected the cell viability of the SCC-4 line at both concentrations, however only in the evaluation post-24 h treatment with PDT was considered cytotoxic (cell viability < 70%). Based on the data obtained, it is concluded that PDT with MB negatively affects the cell viability of SCC-4 cells after 30 minutes of exposure to photosensitizer at concentrations of 25 and 50  $\mu\text{M}$  and 02 minutes of laser irradiation (660 nm, 50 mW, area of 0.04  $\text{cm}^2$ , that is, 150  $\text{J}/\text{cm}^2$ ).

**Keywords:** Photochemotherapy. Mouth Neoplasms. Reactive Oxygen Species.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Incidência estimada dos principais tipos de câncer no Brasil para o ano de 2020 .....	13
Quadro 1	Fatores que podem interferir na eficácia da Terapia Fotodinâmica (TFD) .....	17
Quadro 2	Principais fontes emissoras de luz utilizadas na terapia fotodinâmica (TFD) .....	17
Figura 2	Propagação da luz nos tecidos biológicos.....	18
Figura 3	Espectro eletromagnético .....	18
Figura 4	Ação antitumoral da TFD e morte celular.....	21
Figura 5	Estrutura molecular do azul de metileno.....	23
Quadro 3	Estudos in vitro sobre TFD com azul de metileno tratamento de neoplasias malignas .....	25
Figura 6	Incubação do Azul de Metileno em diferentes concentrações em linhagem SCC-4 .....	31
Figura 7	Aparelho emissor de luz .....	32
Gráfico 1	Avaliação da viabilidade celular da linhagem SCC-4 após 30 minutos de incubação com AM (concentrações de 25 $\mu$ M até 3.200 $\mu$ M) .....	34
Figura 8	Incorporação do Azul de Metileno pelas células SCC-4 (aspecto macroscópico) .....	35
Figura 9	Incorporação do Azul de Metileno pelas células SCC-4 (aspecto microscópico) .....	36
Gráfico 2	Avaliação da viabilidade celular da linhagem 3T3 após 30 minutos de incubação com AM (concentrações de 25 $\mu$ M até 3.200 $\mu$ M) .....	37
Gráfico 3	Diferenças na viabilidade celular da linhagem 3T3 e SCC-4 após exposição ao AM por 30 minutos (concentrações de 25 $\mu$ M até 3.200 $\mu$ M) .....	38
Gráfico 4	Diferenças no grau de incorporação do AM pela linhagem 3T3 e SCC-4 após exposição 30 minutos (concentrações de 25 $\mu$ M até 3.200 $\mu$ M) .....	38
Gráfico 5	Viabilidade celular da linhagem SCC-4 após tratamento com laser, TFD e AM nas concentrações de 25 e 50 $\mu$ M em 2 grupos diferentes	39
Gráfico 6	Diferenças na viabilidade celular entre os subgrupos correspondentes de cada grupo (1 ou 2) .....	40



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Concentrações das soluções de tratamento e volumes correspondentes da solução-estoque .....	30
Tabela 2	Média e desvio padrão da incorporação de diferentes concentrações de AM pelas células SCC-4.....	34
Tabela 3	Média e desvio padrão da incorporação de diferentes concentrações de AM pelas células 3T3.....	37
Tabela 4	Viabilidade celular das células SCC-4 após tratamento com TFD ou AM utilizando a mesma concentração de AM nos grupos 1 e 2.....	39
Tabela 5	Viabilidade celular das células SCC-4 após tratamento com TFD ou AM utilizando diferentes concentrações de AM nos grupos 1 e 2.....	40

## LISTA DE SÍMBOLOS

µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromolar
%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	Oxigênio singleto
3T3	Linhagem celular derivada de fibroblasto murino
5-ALA	Ácido 5-aminolevulínico
A375	Linhagem celular derivada de melanoma humano
AM	Azul de Metileno
AP-1	Ativador de proteína-1
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
B16F10	Linhagem celular derivada de melanoma murino
BCRJ	Banco de Células do Rio de Janeiro
BEAS-2B	Linhagem celular derivada de epitélio normal de brônquio humano
C-33A	Linhagem celular derivada de carcinoma cervical humano
CEC	Carcinoma espinocelular
cm <sup>2</sup>	Centímetros quadrados
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
COX-2	Ciclo-oxigenase-2
Detroit 562	Linhagem celular derivada de melanoma murino
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMEM/F12	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FS	Fotossensibilizador
H441	Linhagem celular derivada de adenocarcinoma de pulmão humano
HaCaT	Linhagem celular derivada de queratinócitos humanos
HDF	<i>Human dermal fibroblast</i>
HeLa	Linhagem celular derivada de adenocarcinoma cervical humano
HPPH	<i>3-(1'-hexyloxyethyl) pyropheophorbide a</i>
HPV	<i>Human papillomavirus</i>
h	Horas
HSV	<i>Herpes Simplex Virus</i>
IFN-α	Interferon alfa
IFN-β	Interferon beta
IL-1α	Interleucina 1 alfa
IL-1β	Interleucina 1 beta
IL-2	Interleucina 2
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IP-10	Proteína 10 induzida por interferon gama
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
J	Joule
LDL	Lipoproteínas de baixa densidade

M	Mol
MCF7	Linhagem celular derivada de adenocarcinoma mamário humano
MCF 10A	Linhagem celular derivada de glândula mamária humana
MDA-MB-231	Linhagem celular derivada de adenocarcinoma mamário humano
mg	Miligramas
mL	Mililitros
min.	Minutos
MIP - 1 $\alpha$	Proteína inflamatória do Macrófago-1 alfa
MIP - $\beta$	Proteína inflamatória do Macrófago beta
MIP - 2	Proteína inflamatória do Macrófago 2
mM	Milimolar
mm <sup>2</sup>	Milímetros quadrados
MTT	Brometo de 3(4,5 dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil-tetrazólio
mW	Miliwatts
NF- $\kappa$ B	<i>Factor Nuclear Kappa B</i>
nm	Nanômetro
Pam 212	Linhagem celular derivada de queratinócito murino
pH	Potencial hidrogeniônico
p53	Proteína de tumor
RPMI	Meio de cultura <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SCC-4	Linhagem celular derivada de carcinoma em língua humano
SCC-25	Linhagem celular derivada de carcinoma em língua humano
SiHa	Linhagem celular derivada de carcinoma cervical humano
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TFD	Terapia Fotodinâmica
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
UI	Unidade Internacional

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> -----	<b>11</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> -----	<b>13</b>
2.1	CÂNCER EM BOCA-----	13
2.2	A TERAPIA FOTODINÂMICA (TFD)-----	15
2.2.1	Fonte emissora de luz -----	17
2.2.2	Fotossensibilizador -----	18
2.3	TFD ANTINEOPLÁSICA: MECANISMO DE AÇÃO-----	19
2.3.1	Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) -----	20
2.3.2	Ação antitumoral da TFD -----	20
2.4	A TFD COM AZUL DE METILENO (AM) -----	22
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> -----	<b>28</b>
3.1	OBJETIVO GERAL-----	28
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS-----	28
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> -----	<b>29</b>
4.1	LINHAGENS CELULARES-----	29
4.1.1	SCC-4 (Linhagem derivada de Carcinoma Espinocelular) -----	29
4.1.2	3T3 (Fibroblastos – natureza não neoplásica) -----	29
4.1.3	Plaqueamento celular -----	29
4.2	SOLUÇÕES DE AM-----	29
4.3	ENSAIO DE CITOTOXICIDADE-----	30
4.3.1	Ensaio de viabilidade celular (MTT) -----	31
4.4	ENSAIO DE INCORPORAÇÃO DO AM-----	31
4.5	AVALIAÇÃO DA TFD COM AM EM CÉLULAS SCC-4 -----	32
4.5.1	Aparelho emissor de luz -----	32
4.5.2	Ensaio de Citotoxicidade na TFD com AM -----	32
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA-----	33
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> -----	<b>34</b>
5.1	ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE E INCORPORAÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE AM NA LINHAGEM CELULAR SCC-4 -----	34
5.2	ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE E INCORPORAÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE AM NA LINHAGEM CELULAR 3T3 -----	37
5.3	COMPARAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E INCORPORAÇÃO DO AM ENTRE AS LINHAGENS SCC-4 E 3T3-----	38
5.4	EFEITO DA TFD NA LINHAGEM CELULAR SCC-4-----	39
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> -----	<b>41</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO</b> -----	<b>46</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> -----	<b>47</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Atualmente o câncer em boca é uma das neoplasias malignas mais frequentes do mundo, com prevalência de 6,4/100 mil em homens e 2,9/100 mil em mulheres (PRIHANTONO, 2018; SHAH; GIL, 2009). Dentre os fatores de risco mais associados a este tumor estão o consumo de tabaco, principalmente quando associado ao álcool, e a exposição à radiação ultravioleta (radiação solar) (LIU *et al.*, 2018). Muitas vezes o tumor é de crescimento lento e pode ser antecedido por uma desordem com potencial de malignização. Infelizmente muitos casos são diagnosticados tardiamente, uma vez que apresentam sintomas apenas quando estão em estágios mais avançados e assim levando ao prognóstico desfavorável (LIU *et al.*, 2018).

Os principais tratamentos para carcinoma espinocelular (CEC) em boca são a cirurgia, quimioterapia e radioterapia, associadas ou não, de acordo com o estadiamento e protocolo escolhido pela equipe médica (LONGO; LOZZI; AZEVEDO, 2011; SHAH; GIL, 2009). Tais terapias causam muitos efeitos adversos e prejudicam a qualidade de vida do paciente (RIGUAL *et al.*, 2009), sendo assim de grande importância o desenvolvimento de novas terapias que ao mesmo tempo que são efetivas contra o tumor e preservam a qualidade de vida do paciente, causando o mínimo possível de efeitos colaterais (GANGLOFF *et al.*, 2012; SAINI *et al.*, 2016).

Neste contexto, a terapia fotodinâmica antineoplásica (TFD), tratamento que consiste na liberação de radicais livres e espécies reativas de oxigênio que irão causar dano e morte celular através da ativação de um fotossensibilizador por uma fonte luminosa, tem se mostrado uma alternativa promissora ao passo que apresentou bons resultados no tratamento contra diferentes doenças, incluindo câncer de mama, de pulmão, de cérebro e esôfago (HOSSEINZADEH; KHORSANDI; JOHANSHIRI, 2017). Contudo especificamente sobre o efeito da TFD no câncer de boca ainda há poucos estudos, especialmente com o uso do fotossensibilizador azul de metileno (HARTMANS *et al.*, 2017).

Além da diminuição dos efeitos colaterais observados no pós-tratamento em comparação com as outras modalidades terapêuticas (HIRSCHBERG; BERG; PENG, 2018), a TFD apresenta como vantagens o custo operacional inferior quando comparado aos demais tratamentos, a possibilidade de repetição na mesma área sem acúmulo de toxicidade e o fato de poder ser associada a outras terapias concomitantemente. Ainda, é uma opção na eliminação de células residuais diminuindo o risco de recorrências tumorais regionais (TARDIVO *et al.*, 2005).

O azul de metileno (AM) é um corante fenotiazínico que foi sintetizado em 1876 por Heinrich Caro para ser utilizado na indústria têxtil (YANG *et al.*, 2017). No entanto, desde a década de 1930 tem apresentado diversas aplicações na área da saúde como antídoto para metemoglobinemia, envenenamento por cianeto e tratamento de encefalopatia induzida por ifosfamida e vasoplegia associada à choque séptico (PETRELLIS *et al.*, 2019).

Este fotossensibilizador apresenta vantagens em relação a outros fotossensibilizadores pelo seu baixo custo e por não apresentar muitos efeitos colaterais, já que é pouco ativado pela luz ambiente e rapidamente eliminado do organismo (ANDREADIS *et al.*, 2016). Uma das características mais interessantes do AM como fotossensibilizador, no entanto, é sua eficácia na geração de oxigênio singleto (RODRIGUEZ-CÓRDOVA *et al.*, 2019).

Dentre as terapias antineoplásicas, a TFD com AM já foi explorada em estudos relacionados a câncer de mama, de pulmão, melanoma, de esôfago

inoperável, carcinoma cervical, sarcoma de Kaposi e carcinoma de células basais (TARDIVO *et al.*, 2005; YANG *et al.*, 2017).

Considerando este contexto e a escassez de estudos na literatura, esta pesquisa teve como objetivo avaliar o efeito da TFD em linhagem celular derivada de carcinoma espinocelular (SCC4) utilizando diferentes concentrações de AM, bem como comparar com uma linhagem não neoplásica (fibroblastos).

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 CÂNCER EM BOCA

O câncer é um conjunto de doenças caracterizadas por proliferação descontrolada e invasão aos tecidos próximos e/ou à distância (metástase). Apresenta características complexas além da hiperproliferação e metástase (migração), como insensibilidade a fatores de supressão de crescimento, resistência à apoptose, instabilidade genômica, capacidade angiogênica, promotor de inflamação e mecanismos de escape do sistema imunológico, as quais acabam por dificultar o sucesso das terapias antineoplásicas (SÁ JUNIOR *et al.*, 2017).

O câncer em boca é uma das neoplasias malignas mais frequentes do mundo, especialmente em países do sul da Ásia, como a Índia, com prevalência de 6,4/100 mil em homens e 2,9/100 mil em mulheres (PRIHANTONO, 2018; SHAH; GIL, 2009). No Brasil, de acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), é atualmente o 5º tipo de câncer com maior incidência nos homens e 13º nas mulheres, conforme evidenciado na Figura 1 (INCA,2019).

Figura 1 – Incidência estimada dos principais tipos de câncer no Brasil para o ano de 2020

**Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020 por sexo, exceto pele não melanoma\***

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	65.840	29,2%	Homens	Mulheres	Mama feminina	66.280	29,7%
Colón e reto	20.520	9,1%			Colón e reto	20.470	9,2%
Traqueia, brônquio e pulmão	17.760	7,9%			Colo do útero	16.590	7,4%
Estômago	13.360	5,9%			Traqueia, brônquio e pulmão	12.440	5,6%
Cavidade oral	11.180	5,0%			Glândula tireoide	11.950	5,4%
Esôfago	8.690	3,9%			Estômago	7.870	3,5%
Bexiga	7.590	3,4%			Ovário	6.650	3,0%
Linfoma não Hodgkin	6.580	2,9%			Corpo do útero	6.540	2,9%
Laringe	6.470	2,9%			Linfoma não Hodgkin	5.450	2,4%
Leucemias	5.920	2,6%			Sistema nervoso central	5.220	2,3%

\*Números arredondados para múltiplos de 10.

Fonte: Adaptada de INCA, 2020

Infelizmente além de ser um dos países com maiores índices de incidência, o Brasil também apresenta alta mortalidade associada com câncer de cabeça e pescoço. Como muitos outros países em desenvolvimento, os principais fatores envolvidos no aumento desses índices são desigualdade social, disparidades no acesso aos serviços de saúde nas diferentes regiões do país, baixo nível educacional, falta de infraestrutura para dispor de tratamento oncológico fora dos grandes centros urbanos e dificuldade de acesso a novas tecnologias (CHAVES *et al.*, 2017).

Os principais fatores de risco para o desenvolvimento de câncer bucal são o consumo de tabaco, principalmente quando associado ao consumo de álcool, e exposição frequente ao sol (em casos de tumores malignos nos lábios). Estilo de vida, má higiene bucal, dieta e características genéticas são outros fatores que podem influenciar no desenvolvimento das neoplasias em boca (LIU *et al.*, 2018). Além disso, a infecção por alguns subtipos de HPV (papilomavírus humano 16 e 18) também tem sido associada como fator de risco para o desenvolvimento de tumores malignos em boca (SHAH; GIL, 2009).

Este tumor pode acometer diversas estruturas da boca, como: lábio, gengiva, palato duro, palato mole, língua (sobretudo a região posterior de borda) e assoalho bucal. Aproximadamente 90% destas lesões são histologicamente condizentes com carcinoma espinocelular (CEC), ou seja, neoplasias decorrentes da proliferação descontrolada de células epiteliais estratificadas da mucosa bucal de origem epitelial (SHARWANI *et al.*, 2006).

Muitas vezes, a lesão cancerosa é de crescimento lento com aspecto ulcerado e pode ser antecedida por uma desordem oral potencialmente maligna como leucoplasias, eritroplasias, queilite (ceratose) actínica e doenças autoimunes (líquen plano ou lúpus eritematoso sistêmico). Quando esta lesão com potencial de malignização é diagnosticada a chance de cura é alta, o tratamento é mais conservador e a qualidade de vida do paciente é preservada (RIAZ *et al.*, 2013).

O diagnóstico tardio pode ocorrer porque sintomas como dor e dificuldade para engolir, muitas vezes são clinicamente detectáveis apenas em estágios mais avançados da doença, pela falta de consultas odontológicas de rotina ou mesmo um olhar desatento do profissional sob lesões suspeitas durante a consulta odontológica (SAINI *et al.*, 2016). Outro fator que prejudica o diagnóstico precoce é a dificuldade de acesso ao tratamento. Além disso, quanto mais avançado o estágio do tumor maior é o risco de metástase em linfonodos e à distância, condições que também afetarão a escolha de tratamento (SAINI *et al.*, 2016). Consequentemente o tratamento do câncer torna-se mais complexo, diminuindo a taxa de sobrevivência a longo prazo e alto risco de mortalidade (PINHEIRO; CARNEIRO; CREMA, 2020; SAINI *et al.*, 2016). A escolha da terapia ideal torna-se mais desafiadora conforme a gravidade do caso clínico do paciente, pois à medida que aumenta o risco de vida também aumenta o risco de sequelas que irão interferir permanentemente na qualidade de vida do paciente (RIGUAL *et al.*, 2013).

Atualmente, o padrão-ouro de tratamento para o CEC em boca consiste primariamente em cirurgia, associada ou não a radioterapia e/ou quimioterapia (RIGUAL *et al.*, 2013). Quando a cirurgia não é recomendada, por exemplo em casos muito avançados, opta-se por radioterapia, associada ou não a quimioterapia (PRIHANTONO, 2018). Observa-se que quando utilizada apenas quimioterapia a taxa de recorrência é alta em comparação com outros tumores de cabeça e pescoço. No entanto, mesmo após cirurgia e radioterapia esta taxa ainda pode atingir valores entre 37% e 40% (SAINI *et al.*, 2016).

A escolha do protocolo de tratamento é afetada por fatores como localização primária, tamanho (tumores pequenos são mais acessíveis para ressecção cirúrgica que tumores maiores), proximidade com o osso (mandíbula ou maxila), envolvimento dos linfonodos cervicais, tratamento prévio e achados histopatológicos. O CEC em lábio se comporta de maneira similar ao câncer de pele com um excelente potencial de cura a longo prazo e prognóstico favorável. Já o CEC no palato duro e gengiva superior tem um comportamento relativamente indolente com baixo risco de metástase nos linfonodos regionais. Nos casos de câncer na língua, assoalho bucal e gengiva inferior há um alto risco de metástase nos linfonodos regionais com um impacto desfavorável no prognóstico. Por fim, condições referentes ao paciente também devem ser levadas em consideração no momento da decisão de tratamento: idade, condição de saúde geral, tolerância ao tratamento, profissão, aceitação, estilo de vida e considerações socioeconômicas podem dificultar ou facilitar a escolha do protocolo (SHAH; GIL, 2009).

Os efeitos colaterais causados por estas terapias afetam profundamente a qualidade de vida do indivíduo nos âmbitos físico, social e emocional (LONGO, 2008).



Dentre os efeitos colaterais associados a radioterapia e quimioterapia destacam-se a mucosite oral, xerostomia (hipossalivação), alteração do paladar, trismo, queimadura na pele do local da irradiação e osteorradionecrose (SAINI *et al.*, 2016).

A cirurgia deve envolver uma ampla margem de segurança ao redor da lesão e ocasiona uma mutilação permanente que afeta o paciente de forma física e emocional, além de elevar o custo de tratamento devido a necessidade de reabilitação com prótese. Em suma, mesmo que o paciente seja curado sua qualidade de vida será afetada negativamente de maneira permanente (HOSNI *et al.*, 2021).

Tendo em conta os desafios envolvidos no tratamento do câncer bucal é fundamental a descoberta e o desenvolvimento de novas tecnologias e modalidades terapêuticas que sejam eficientes em causar dano/morte celular às células neoplásicas malignas sem afetar as células saudáveis (não neoplásicas), diminuindo os efeitos colaterais e sequelas decorrentes dos principais tratamentos (GANGLOFF *et al.*, 2012). Neste universo de possibilidades, a TFD já apresentou bons resultados no tratamento com diferentes doenças, incluindo na área da oncologia (HOSSEIZADEH; KHORSANDI; JOHANSHIRI, 2017).

A diminuição dos efeitos colaterais observados no pós-tratamento é a grande vantagem na utilização desta terapia em comparação com as outras modalidades terapêuticas (HIRSCHBERG; BERG; PENG, 2018). Além do menor risco de efeito adverso, a TFD tem o custo operacional inferior quando comparado aos demais tratamentos, pois pode ser realizada em ambiente ambulatorial dispensando em alguns casos as internações hospitalares (JERJES; HAMDOON; HOPPER, 2017). Também pode ser repetida diversas vezes na mesma área sem acúmulo de toxicidade, além de pode ser associada com outros tratamentos. A TFD não está associada ao desenvolvimento de clones resistentes e nem causa danos no DNA que possam levar ao desenvolvimento de outro tumor. Em boca, a TFD tem como vantagem a visualização do campo operatório e pode ser aplicada topicamente sem envolvimento sistêmico. Por fim, é uma opção na eliminação de células residuais diminuindo o risco de recorrências tumorais regionais (TARDIVO *et al.*, 2005).

De acordo com Saini *et al.* (2016) a eficácia da TFD em câncer na região de cabeça e pescoço já foi demonstrada em alguns estudos científicos, mas a literatura de TFD em câncer bucal ainda é escassa. Para uso clínico como terapia antineoplásica a TFD já está aprovada em países como EUA, Canadá, Rússia, Japão e alguns países da União Europeia (PETRELLIS *et al.*, 2019). No Brasil, está aprovada apenas para pesquisa clínica (LONGO, 2008; PRIHANTONO, 2018). Embora existam diversos estudos sobre a TFD, a falta de conhecimento de alguns de seus mecanismos moleculares pode justificar sua utilização restrita (BACELLAR *et al.*, 2015).

## 2.2 A TERAPIA FOTODINÂMICA (TFD)

O termo “fotodinâmico” foi cunhado por Jodlbaner e Von Tappeiner em 1904 para descrever reações químicas dependentes de oxigênio como um resultado de fotossensibilização (ANDREADIS *et al.*, 2016). A TFD consiste na associação de 03 elementos: luz, fotossensibilizador e oxigênio. Quando o fotossensibilizador é ativado por uma luz com um comprimento de onda específico na presença de oxigênio causa a liberação de espécies reativas de oxigênio (em especial, oxigênio singleto ( $^1O_2$ )) que promovem danos celulares e morte celular (TARDIVO *et al.*, 2005). É um tratamento relativamente seguro e bem tolerado, apresentando poucos efeitos adversos, os quais

são mais comuns nas aplicações sistêmicas do fotossensibilizador (TARDIVO *et al.*, 2005).

A TFD já se mostrou eficaz no tratamento de diversas enfermidades como degeneração macular relacionada à idade, aterosclerose, psoríase, ceratose actínica e algumas doenças infecciosas como onicomicose (RODRIGUEZ-CÓRDOVA *et al.*, 2019). Uma das maiores vantagens da TFD é o fato de causar menos efeitos colaterais que outras terapias (ANDREADIS *et al.*, 2016)

Especificamente na odontologia a TFD possui eficácia comprovada no tratamento de doenças periodontais e lesões endodônticas como terapia antimicrobiana, além de auxiliar no diagnóstico e tratamento de lesões com potencial de malignização em boca (JERJES; HAMDOON; HOPPER, 2012; PRAŠMO *et al.*, 2016). Maloth *et al.* (2016) obtiveram bons resultados do 5-ALA (ácido 5-aminolevulínico) na regressão de lesões bucais com potencial de malignização, como leucoplasia e líquen plano.

Como tratamento antineoplásico a TFD já foi associada em estudos com câncer na região de cólon, pulmão (estágio inicial e avançado), estômago, esôfago, bexiga e também câncer cervical. Há relatos na literatura do uso da TFD no tratamento paliativo de câncer de cabeça e pescoço e de carcinoma de células basais e câncer de pele não melanoma (JERJES; HAMDOON; HOPPER, 2017; TARDIVO *et al.*, 2005). Um estudo em Nova York (EUA) acompanhou pacientes entre os anos de 2006 a 2011 após terapia adjuvante a cirurgia com TFD intraoperatória com HPPH (3- (1' - hexyloxyethyl) pyropheophorbide) em tumores localizados na cabeça e/ou pescoço, primários ou recorrente, e concluiu que a TFD com HPPH nesta situação é segura e relativamente bem tolerada, além de apresentar maior eficácia na cura da doença (RIGUAL *et al.*, 2013).

A eficácia da TFD pode ser afetada por diversos fatores (Quadro 1). A profundidade da lesão pode ser uma das maiores limitações da TFD aplicada de forma tópica, uma vez que há dificuldade na penetração da luz nos tecidos por conta das barreiras biológicas (PETRELLIS *et al.*, 2019). Essa fato faz, com que se diminua a eficácia da TFD em casos avançados (ANDREADIS *et al.*, 2016). Neste âmbito, o estudo de Figueira e Veltrini (2017) demonstrou que lesões mais superficiais e com camadas mais finas de queratina apresentam maiores evidências de morte celular que lesões mais profundas. Outro fator que interfere na eficácia é o tempo de incubação do fármaco, ou seja, exposição da célula ao fotossensibilizador sem exposição à luz, pois afeta a biodisponibilidade do fotossensibilizador (GOMES; NEVES; CAVALEIRO, 2018).

Outro fator que pode interferir na eficácia fotodinâmica é o meio onde o fotossensibilizador é solubilizado. A solubilização do AM em meio aquoso pode favorecer as reações de oxidação-redução devido a própria molécula H<sub>2</sub>O, a qual pode participar ativamente da formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) (NUNEZ, 2007) e o meio solvente também afeta o nível de agregação do corante (BACELLAR *et al.*, 2014).

A resistência a TFD pode ocorrer devido a produção de substâncias antioxidantes solúveis em água (como por exemplo: Glutathione e Vitamina C) ou lipossolúveis (Vitamina E) pelas células tumorais, assim como a produção de substâncias inibidoras de EROs como a superóxido dismutase: esta enzima quando ligada a manganês está associada a perda da sensibilidade das células a TFD. Além disso, tumores malignos com alta produção de óxido nítrico, um excelente vasodilatador, também são resistentes a TFD (NUNEZ; RIBEIRO; GARCEZ, 2013). A

disseminação da doença no organismo, com metástase em outros órgãos, também pode ser um fator limitante na eficácia da TFD diminuindo as taxas de sucesso.

Quadro 1 - Fatores que podem interferir na eficácia da Terapia Fotodinâmica (TFD)

<b>NEOPLASIA</b>	<b>FOTOSSENSIBILIZADOR</b>	<b>FONTE DE LUZ</b>	<b>PROTOCOLO</b>	<b>OPERADOR</b>
Características histológicas do tumor	Características químicas	Tipo de emissor	Tempo de incubação do fotossensibilizador	Uniformidade durante a aplicação
Dimensões	Espectro de absorvância	Comprimento de onda	Dose de energia	Ângulo de aplicação
Localização	Concentração	Potência	Tempo de irradiação da luz	Distância entre o ponto focal e o tecido alvo
Estadiamento	Solvente	Área da ponteira	Número de sessões	
Nível de oxigenação do tecido		Densidade de energia		

Fonte: Adaptado de Nunez; Ribeiro e Garcez, 2013

### 2.2.1 Fonte emissora de luz

Diversas fontes emissoras de luz podem ser utilizadas na TFD sendo as mais comuns as do tipo LED (*Light Emitter Diode*) e LASER (*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*) (Quadro 2).

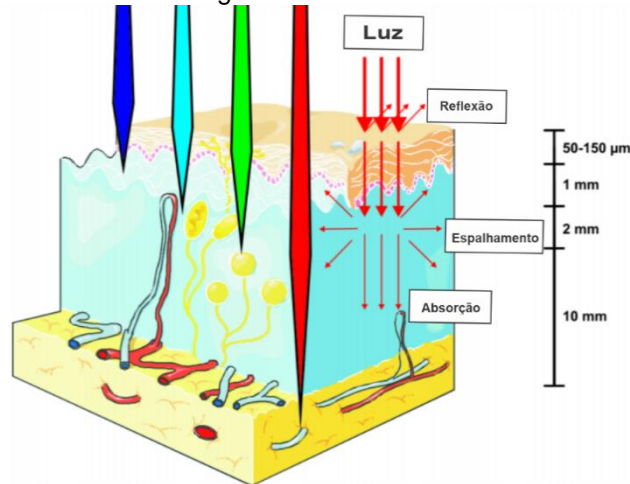
Quadro 2 - Principais fontes emissoras de luz utilizadas na terapia fotodinâmica (TFD)

<b>FONTE DE LUZ</b>	<b>VANTAGEM</b>	<b>DESvantagem</b>
Lâmpada convencional (branca – em geral, emissão do azul ao infravermelho próximo)	Alta densidade de potência	Uso de filtros Aumento de temperatura Acoplamento de fibras Cálculo de densidade de energia (mais difícil)
Fotopolimerizador (emissão azul)	Alta densidade de potência	Aumento de temperatura Acoplamento de fibras Cálculo da densidade de energia
LED (emissão vermelha e emissão azul)	Monocromático. Baixo componente térmico	Acoplamento em fibras
Laser (emissão vermelha e infravermelho próximo)	Acoplamento em fibras Cálculo da densidade de energia (mais fácil) Monocromático Atérmico	

Fonte: Adaptado de Nunez; Ribeiro e Garcez, 2013

Em contato com o tecido, a radiação luminosa pode ser absorvida, transmitida ou espalhada (Figura 2). Em geral, a luz que não é refletida penetra no tecido biológico, e por conta da ação do fotossensibilizador a maior parte desta luz é absorvida.

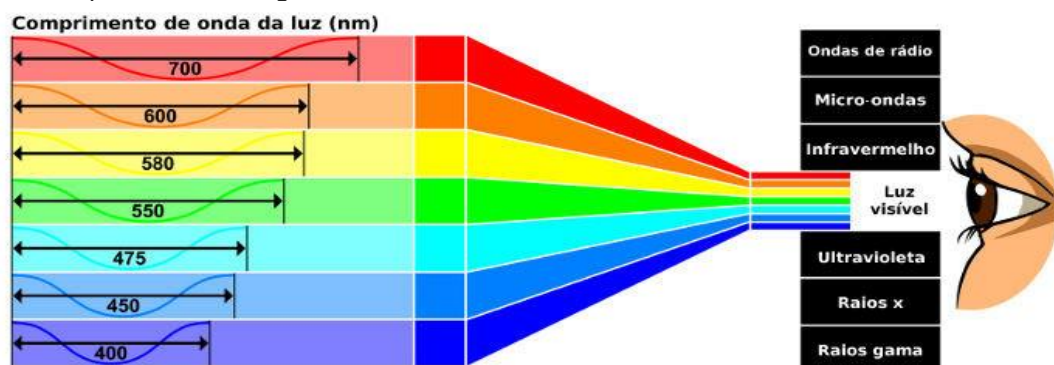
Figura 2 – Propagação da luz nos tecidos biológicos



Fonte: Adaptada de Agostinis *et al.*, 2011

O comprimento de onda da luz corresponde a distância em que um ciclo se repete e é medido em nanômetros (nm) (Figura 3). Embora possam ser utilizados fontes de luz com comprimento de onda na faixa de 400 e 500 nm, o intervalo mais utilizado na TFD corresponde aos comprimentos de onda próximos do vermelho e infravermelho por apresentar maior profundidade de penetração nos tecidos biológicos e também porque a maior parte dos fotossensibilizadores são absorvidos nessa faixa (NUNEZ; RIBEIRO; GARCEZ, 2013).

Figura 3 – Espectro eletromagnético



Fonte: Adaptado de Helerbrock, 2021

### 2.2.2 Fotossensibilizador

O fotossensibilizador (FS) é um fármaco que ao ser ativado por uma fonte de luz reage com as biomoléculas gerando espécies reativas de oxigênio que causarão danos ou morte celular. Para ser considerado um bom FS, o fármaco deve apresentar algumas características como: ser um composto único e puro obtido em poucos

passos de uma metodologia sintética bem estabelecida, ser estável e com características anfífilas (composto químico que possui parte hidrofílica e outra hidrofóbica), bom gerador de oxigênio singleto, ter absorvância na janela terapêutica e pouca ou nenhuma toxicidade *dark* (quando aplicado sem o uso da luz) (NUNEZ; RIBEIRO; GARCEZ, 2013).

Existem diversas classes de fotossensibilizadores como corantes, clorinas, porfirinas, entre outros (ANDREADIS *et al.*, 2016). O primeiro FS aprovado clinicamente é o Photofrin®, derivado da hematoporfirina, que pode apresentar como efeito colateral a fotossensibilidade. O Foscan® (temoporfina) é outro FS utilizado na União Europeia desde 2001 para tumores de cabeça e pescoço, cérebro e pulmão. Este tem como vantagem utilizar doses menores que Photofrin® (GOMES; NEVES; CAVALEIRO, 2018). Em carcinoma basocelular um estudo retrospectivo em pacientes tratados com 5-ALA (lesões superficiais) e Foscan® (lesões profundas) observou uma resposta completa de sobrevida de 3 a 5 anos em mais de 90% dos casos (JERJES; HAMDOON; HOOPER, 2017).

O FS Foscan® também apresentou resultados positivos no estudo de Gangloff *et al.* (2012) em pacientes com tumores avançados na região de cabeça e pescoço. Andreadis *et al.* (2016) observaram menor toxicidade e morbidade na TFD com este FS que a terapia convencional em tratamento de tumores malignos de cabeça e pescoço. Em câncer de língua recorrente ou avançado a temoporfina apresentou boa resposta em aproximadamente dois terços dos casos no estudo de Jerjes *et al.* (2011).

Segundo Kwiatkowski e colaboradores (1998) os fotossensibilizadores se acumulam em concentrações mais altas em células tumorais que em células normais. Isso pode estar relacionado a alta atividade mitótica das células tumorais que, na grande demanda por colesterol para construir suas membranas, mostram uma maior captação de lipoproteínas de baixa densidade, como a LDL. Na sua biodistribuição os fotossensibilizadores tendem a se acumular nessas lipoproteínas, tornando essas estruturas verdadeiros transportadores de fotossensibilizadores.

O FS pode ser administrado topicamente ou sistemicamente por meio de injeção intravenosa. Em seguida, aguarda-se um período pré-determinado para distribuição do FS e sua acumulação no tumor que pode variar de minutos a 72 horas. Após irradiação com a fonte de luz específica, o FS reage com o oxigênio molecular dando origem a espécies reativas de oxigênio (EROs), como o  $^1\text{O}_2$  (oxigênio singleto). Os danos às macromoléculas celulares causados por estas EROs levam a morte celular por apoptose, necrose ou autofagia, acompanhado da indução de uma resposta inflamatória que participa da remoção de células mortas, restauração da homeostase do tecido normal (NUNEZ; RIBEIRO; GARCEZ, 2013).

### 2.3 TFD ANTINEOPLÁSICA: MECANISMO DE AÇÃO

Os danos causados pela TFD nos tecidos afetados são diversos: oxidação proteica com conseqüente fragmentação, reações de transferência de elétrons (ligações cruzadas, carbonilação, agregação, formação de adutos e mudanças conformacionais proteicas), reações bioquímicas que provocam ativação de proteínas individuais ou em cascata que culminam com a morte celular. No caso das neoplasias malignas também causa danos no sistema vascular do tumor e alterações dos padrões de imunidade tumoral (NUNEZ; RIBEIRO; GARCEZ, 2013).

Ocorrem dois mecanismos principais na ação da TFD:

- Tipo I: Após transferência de elétrons entre moléculas ocorre a formação de radicais livres como superóxido, radicais hidroxila e peróxido de hidrogênio. Estas espécies reativas de oxigênio (EROs) causam danos as biomoléculas alvo como: membranas, proteínas e DNA (ANDREADIS *et al.*, 2016).
- Tipo II: Mediada por oxigênio singleto ( $^1O_2$ ), molécula extremamente reativa que pode reagir com diversas moléculas biológicas induzindo apoptose via mitocondrial e necrose nos lisossomos e membranas celulares (SEVERINO *et al.*, 2003).

Ambos os mecanismos podem ocorrer ao mesmo tempo durante a aplicação da luz sobre o fotossensibilizador. O caminho terapêutico da TFD é alterado dependendo de qual reação ocorre em maior quantidade, por exemplo, quando ocorre principalmente a reação tipo II, relacionada a oxigênio singleto, a apoptose é o evento de morte celular mais presente. Já a relação tipo I está mais relacionada a necrose (SEVERINO *et al.*, 2003). Um mesmo protocolo de TFD pode induzir necrose, apoptose e autofagia ao mesmo tempo, mas um mecanismo pode ser favorecido em detrimento de outro.

### 2.3.1 Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)

As EROs possuem um papel ambíguo no câncer: ao mesmo tempo que são as principais responsáveis por causar os danos e morte de células tumorais malignas na TFD, podem favorecer o desenvolvimento da neoplasia maligna ao passo que o microambiente tumoral, mantido em ambiente ácido, de hipóxia e associado ao estresse oxidativo, é alimentado por uma alta produção de EROs mitocondrial que podem favorecer a heterogenicidade do câncer aumentando a resistência do tumor (resposta adaptativa ao stress) (SÁ JUNIOR *et al.*, 2017).

O oxigênio singleto é extremamente reativo e pode danificar sistemas biológicos pela oxidação de macromoléculas, como lipídeos, ácido nucleico e proteínas. Produtos da oxidação por oxigênio singleto ou radicais podem apresentar diferenças, as quais podem identificar quais reações estão ocorrendo: o oxigênio singleto tem a tendência de induzir a apoptose (NUNEZ; RIBEIRO; GARCEZ, 2013).

A atividade antitumoral da TFD acontece em três maneiras principais: citotoxicidade direta nas células tumorais, danos a vascularização do tumor e indução de uma resposta imune contra as células tumorais (PETRELLIS *et al.*, 2019).

### 2.3.2 Ação antitumoral da TFD

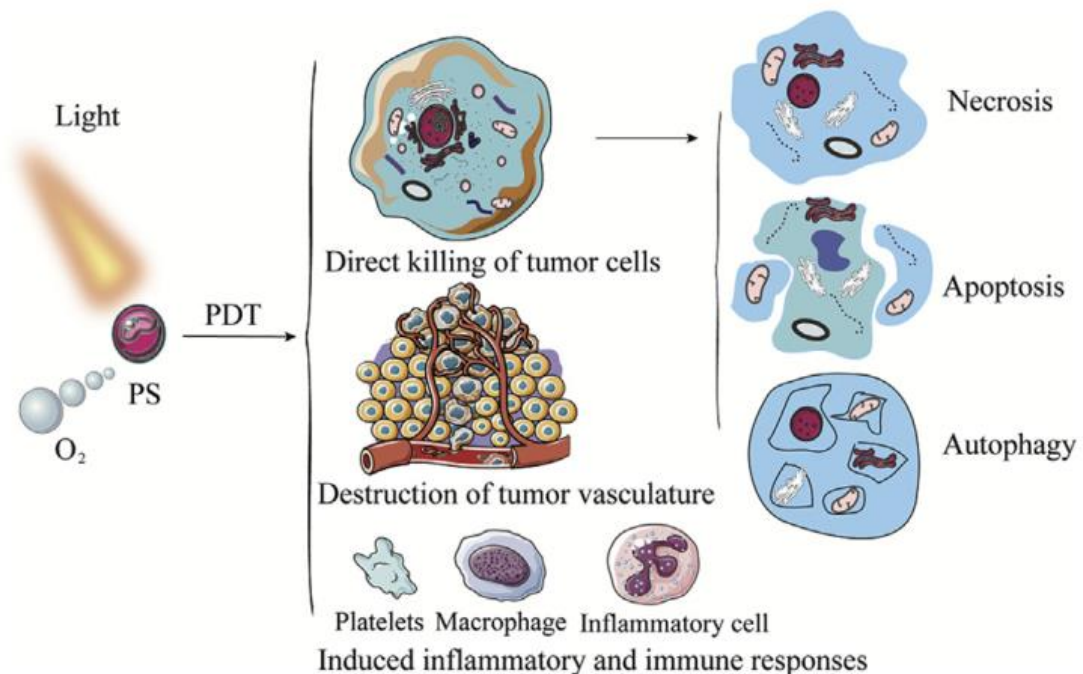
A ação antitumoral da TFD envolve três maneiras principais:

- a) Danos diretos nas células tumorais: Induzido pela geração de  $^1O_2$  (oxigênio singleto) e espécies reativas de oxigênio (EROs), levando a morte celular por necrose ou apoptose. O stress oxidativo modifica a permeabilidade mitocondrial, podendo levar à ruptura da membrana e liberação de fatores pró-apoptóticos (FREITAS *et al.*, 2017). A localização intracelular do fotossensibilizador leva a formação de agregados que podem induzir a geração de diferentes espécies citotóxicas e, portanto, diferentes mecanismos de morte celular (SEVERINO *et al.*, 2003).

- b) Danos à vascularização do tumor: A TFD pode causar vasoconstrição, alteração na permeabilidade vascular, adesão leucocitária, trombose e hemorragia prejudicando a homeostase. No entanto pode também levar a hipóxia (a qual possui um papel paradoxal no desenvolvimento do tumor e é prejudicial à terapia com TFD) (PETRELLIS *et al.*, 2019).
- c) Efeitos no sistema imunológico: O stress oxidativo ativa a liberação de diversos marcadores inflamatórios como fatores de transcrição (NF- $\kappa$ B e AP-1), interleucinas (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-8, IL-10), TNF- $\alpha$ , quimiocinas (proteína inflamatória IP-10, quimiocinas derivadas de queratinócitos, proteínas inflamatórias de macrófagos MIP-1 $\alpha$  e MIP- $\beta$ , MIP-2), interferons (IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$ ), COX 2, leucotrienos, tromboxano e prostaglandinas), os quais são responsáveis pela ativação do sistema complemento, maturação de células dendríticas, recrutamento de macrófagos e células *Natural Killer*, e infiltração neutrofílica no local do tumor. Todos estes eventos contribuem no desenvolvimento da resposta imune antitumoral pois estimulam o sistema imune para reconhecer células tumorais malignas em locais isolados possibilitando que haja uma resposta imune adaptativa para controle da progressão do tumor a longo prazo (PETRELLIS *et al.*, 2019).

Podem ocorrer basicamente 3 formas de morte celular: por apoptose, por autofagia ou por necrose. Cada tipo de morte celular apresenta características diferentes que influenciam inclusive nas resposta tecidual à agressão, conforme demonstrado na Figura 4:

Figura 4 – Ação antitumoral da TFD e morte celular



Fonte: Adaptado de Sun *et al.*, 2020

Quando o fármaco se localiza na mitocôndria a tendência é que as células morram por apoptose: a mitocôndria contém uma variedade de proteínas como citocromo C e fatores indutores de apoptose que quando liberados no citosol ativam a apoptose. Os fotossensibilizadores podem ser seletivos para a mitocôndria quando

apresentam cargas positivas e lipofilicidade suficiente para atravessar membranas e são atraídos pelo ambiente negativo eletroquímico da matriz mitocondrial (BACELLAR *et al.*, 2015; GABRIELLI *et al.*, 2004). No entanto, a apoptose pode ser dificultada por alguns fármacos que interferem na abertura dos poros de transição ou permeabilidade da mitocôndria ou quando a célula expressa em excesso proteínas anti-apoptóticas.

A necrose, por outro lado, geralmente é induzida quando o fotossensibilizador encontra-se ligado na membrana plasmática (GABRIELLI *et al.*, 2004; NUNEZ; RIBEIRO; GARCEZ, 2013). A morte celular por necrose estimularia mais a resposta imune do que a morte por apoptose. O estímulo imunológico poderia gerar eventos inflamatórios clinicamente desfavoráveis aos pacientes, porém estimularia o desenvolvimento de respostas imunes específicas contra os tumores tratados e promoveria a regulação do volume tumoral pela pressão imunológica contra os tumores (LONGO, 2008).

Por muito tempo considerou-se a apoptose o melhor mecanismo de morte programada em TFD devido a sua falta de efeitos colaterais em comparação a necrose, pois esta pode ser indesejável pelo fato de os danos fotocelulares causarem a liberação de biomoléculas de células mortas não programadas no espaço extracelular e iniciarem uma resposta inflamatória no tecido ao redor. No entanto células tumorais malignas podem ser resistentes a apoptose (BACELLAR *et al.*, 2015).

Outro fator importante no sucesso da TFD é a disponibilidade de oxigênio para as reações químicas que devem ocorrer dentro das células através dos radicais livres. No entanto tumores sólidos, principalmente em estágio mais avançado, possuem muitas áreas com hipóxia (a alta taxa de replicação consome muito oxigênio) prejudicando a eficácia da TFD. Além disso, o próprio consumo de oxigênio molecular pela TFD aumenta a hipóxia tumoral e pode levar a falha do tratamento e resistência (SUN *et al.*, 2020).

## 2.4 A TFD COM AM

Apesar de seu início na indústria têxtil, desde a década de 1930 o AM tem sido utilizado como antídoto de 1ª escolha para metemoglobinemia e envenenamento por cianeto, e desde 1990 auxilia no tratamento de encefalopatia induzida por ifosfamida e vasoplegia associada à choque séptico (PETRELLIS *et al.*, 2019).

É um corante fenotiazínico, lipofílico, com absorção de luz a partir de 630 nm, tem baixo custo em relação a outros fotossensibilizadores e sem efeitos colaterais, pois é pouco ativado pela luz ambiente e rapidamente eliminado do organismo (ANDREADIS *et al.*, 2016). Considerado um excelente fotossensibilizador com eficácia de geração de oxigênio singleto em torno de 50% (RODRIGUEZ-CÓRDOVA *et al.*, 2019), este fotossensibilizador apresenta cor azulada em um ambiente oxidativo que se torna mais clara conforme ocorre sua redução. Pode ser utilizado topicamente, reduzindo o efeito colateral de fotoqueimadura e permitindo uma distribuição mais eficiente do agente fotossensibilizador ao tumor (OBSTOY *et al.*, 2016).

Na odontologia o AM é muito utilizado na TFD antimicrobiana contra doenças periodontais, lesões endodônticas (tratamento de canal) e no tratamento de infecções como candidose bucal ou causadas pelo vírus do herpes simples - HSV (NUNEZ; RIBEIRO; GARCEZ, 2013).

Suas propriedades também são exploradas na terapia antineoplásica por meio de estudos relacionados a câncer de mama, de pulmão, melanoma, câncer de esôfago inoperável, câncer cervical, sarcoma de Kaposi e carcinoma de células basais

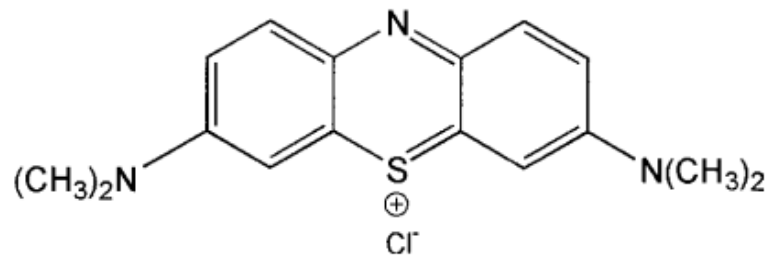


(TARDIVO *et al.*, 2005; YANG *et al.*, 2017). Há estudos que exploram suas propriedades no rastreamento de linfonodo sentinela (RAMAMURTHY *et al.*, 2014) e na detecção de tumores gástricos, próstata e de bexiga (RIAZ *et al.*, 2013).

A literatura é escassa sobre estudos de TFD com AM especificamente em câncer de cabeça e pescoço (KOFLEER *et al.*, 2018). No estudo de Obstoy *et al.* (2016) a TFD com AM foi testada *in vivo* por meio do desenvolvimento de tumores “cólicos” em ratos e hamsters e foi capaz de reduzir significativamente o volume das lesões cancerizáveis, apresentando características de morte celular por necrose.

Sobre a localização na célula não há consenso na literatura. Alguns estudos apontam que a molécula do AM apresenta carga positiva (Figura 4) e é atraída pelo potencial negativo das mitocôndrias (NUNEZ; RIBEIRO; GARCEZ, 2013). Segundo Petrellis *et al.* (2019), a principal localização intracelular é nessas organelas, pois sua natureza lipofílica demonstra alta afinidade por membranas celulares facilitando sua ancoragem e podendo induzir a apoptose. No entanto outros autores afirmam que o AM se acumula preferencialmente nos lisossomos (GABRIELLI *et al.*, 2004).

Figura 5 – Estrutura molecular do Azul de Metileno



Fonte: Adaptado de Severino *et al.*, 2003

O AM tem uma propriedade redutora única que existe em equilíbrio entre o estado oxidado na condição “*dark*” e estado reduzido mais claro (leucometileno), sendo pró oxidante e antioxidante sob diferentes condições. Yang *et al.* (2017) afirmam que o AM é um carregador de elétron pela ação de acelerar a redução do citocromo C na mitocôndria isolada. O potencial redox do AM é dependente de pH: sua redução é favorecida em pH baixo e a sua habilidade como agente oxidante é aumentada quando ativado pela luz (RUCK *et al.*, 1997).

O AM pode induzir tanto a formação de EROs (mecanismo tipo I) ou oxigênio singleto (mecanismo tipo II), e assim sua aplicação pode ser estendida para tumores que tem áreas de tecido hipóxicas onde os mecanismos tipo II são prejudicados (RUCK *et al.*, 1997).

Embora diversos autores tenham avaliado o potencial do AM na TFD contra células tumorais malignas, não há um consenso sobre o melhor protocolo a ser utilizado no que diz respeito à concentração do fotossensibilizador (pode variar de 0.2 a 160  $\mu\text{M}$ ) e fonte de luz (a densidade de energia varia de 2.4 a 95  $\text{J}/\text{cm}^2$ ), incluindo o tempo de incubação do FS e tempo de irradiação, conforme observado no Quadro 3.

Especificamente sobre o uso de TFD com AM no tratamento antineoplásico de carcinoma espinocelular em boca há pouquíssimos relatos na literatura, *in vitro* e *in vivo*. Kofler *et al.* (2018) investigaram TFD com AM em duas linhagens diferentes: SCC-25, caracterizada por não sintetizar p53 (comum em CEC) e Detroit 562, caracterizada por induzir metástase em ratos. Em seus resultados observou que a concentração de 120  $\mu\text{M}$  com incubação de 4 min. e exposição do laser de 660 nm (350 mW, 95  $\text{J}/\text{cm}^2$ ) em 8 min. obtinha o resultado com maior morte celular. Observou

também que o tratamento com TFD+AM diminui a capacidade reprodutiva das células tumorais através de estudos clonogênicos. No entanto, não há relatos na literatura de estudos de TFD com AM em outras linhagens celulares derivadas de CEC em boca.

Considerando a escassez da literatura e o potencial do uso do AM como fotossensibilizador na terapia antineoplásica TFD no tratamento de carcinoma espinocelular em boca, esta pesquisa buscou avaliar os efeitos da TFD com AM em diferentes concentrações na viabilidade celular de linhagem celular derivada de carcinoma espinocelular em boca.

Quadro 3 - Estudos in vitro sobre TFD com AM no tratamento de neoplasias malignas

(Continua)

Autor	Célula	Azul de Metileno		Fonte emissora de luz	
		Concentração	Tempo de Incubação	Modelo	Comprimento de Onda
Blazquez Castro <i>et al.</i> (2009)	Pam 212 (Queratinócitos de ratos)	10 <sup>-5</sup> M	60 min.	LED	636 nm
	HeLa (Câncer de colo de útero)	10 <sup>-6</sup> M 10 <sup>-7</sup> M			
Freitas <i>et al.</i> (2017)	SiHa (Carcinoma cervical com HPV 16)	19,5 µM	20 min.	LED	630 nm 660 nm
	C-33 A (Carcinoma cervical sem HPV) HaCat (Queratinócitos)				
Guan <i>et al.</i> (2013)	UMR106 (Osteossarcoma de ratos)	Solução estoque 3 M (com PBS) 0-100 µM	60 min.	LED	630 nm
Hosseizadeh; Khorsandi e Jahanshiri (2017)	MDA – MB- 231 (Adenocarcinoma mamário)	0 µg/mL 10 µg/mL 25 µg/mL 50 µg/mL 75 µg/mL	24 horas	LED	630 nm
Khorsandi; Hosseinzadeh e Chamani (2020)	A375 (Melanoma) HDF (Fibroblasto)	0 µg/mL 1 µg/mL 5 µg/mL 10 µg/mL 15 µg/mL 25 µg/mL	60 min.	LED	660 nm

Quadro 3 - Estudos in vitro sobre TFD com AM no tratamento de neoplasias malignas

(Continuação)

Autor	Célula	Azul de Metileno		Fonte emissora de luz	
		Concentração	Tempo de Incubação	Modelo	Comprimento de Onda
Kofler <i>et al.</i> (2018)	SCC-25 (Carcinoma de língua)	0 (glicose 5%)	0 min.	Laser Diodo	660 nm
	Detroit 562 (Carcinoma de faringe)	40 µM 80 µM 120 µM 160 µM	2 min. 4 min. 8 min. 10 min.		
Lim <i>et al.</i> (2013)	A549 (Adenocarcinoma de pulmão)	2 µg/mL	60 min.	Laser Diodo	650 nm
Rodriguez-Córdova <i>et al.</i> (2019)	BEAS-2B(Células epiteliais normais de pulmão)	0 µM	180 min.	Laser	660 nm
	H-441(Adenocarcinoma de pulmão)	31 µM 63 µM 94 µM 125 µM 156 µM			

Quadro 3 - Estudos in vitro sobre TFD com AM no tratamento de neoplasias malignas

(Conclusão)

Autor	Célula	Azul de Metileno		Fonte emissora de luz	
		Concentração	Tempo de Incubação	Modelo	Comprimento de Onda
Santos, <i>et al.</i> (2017)	MCF – 10A (Linhagem mamária não cancerígena)	0.2 µM	120 min.	LED	640 nm
	MCF – 7 (Adenocarcinoma mamário)	2 µM			
	MDA – MB- 231 (Adenocarcinoma mamário)	20 µM			
Santos, <i>et al.</i> (2018)	B16F10 (Melanoma)	12.5 µg/mL	30 min.	Laser Diodo	660 nm

Fonte: A autora

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar o efeito da TFD em linhagem celular derivada de CEC (SCC-4) utilizando diferentes concentrações de AM.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1 Avaliar a citotoxicidade e incorporação de diferentes concentrações do AM em linhagem SCC-4.
- 2 Comparar o efeito de citotoxicidade e incorporação do AM entre uma linhagem neoplásica (SCC-4) e uma linhagem celular não neoplásica (3T3).
- 3 Avaliar o efeito da TFD com fotossensibilizador AM nas concentrações não citotóxicas em linhagem celular SCC-4.

## 4 MATERIAIS E MÉTODO

### 4.1 LINHAGENS CELULARES

Foram utilizadas duas linhagens celulares neste estudo: SCC-4 (derivada de carcinoma espinocelular) e 3T3 (derivada de fibroblastos).

#### 4.1.1 SCC-4 (Linhagem derivada de CEC)

A linhagem celular SCC-4 (ATCC: CRL-1624), derivada de CEC de língua de um paciente de 55 anos, foi adquirida do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ – Rio de Janeiro, RJ, Brasil – código 0195).

Conforme as orientações do fornecedor, as células foram mantidas em garrafas plásticas próprias para cultivo celular (25 e 75 cm<sup>2</sup>) em meio de cultura DMEM/F12 (Hyclone, GE Healthcare ou Vitrocell) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 400 ng/mL de hidrocortisona, 100 UI/mL de penicilina e 100 mg/mL de estreptomicina (Hyclone, GE Healthcare). Os frascos foram armazenados em incubadora a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de umidade.

#### 4.1.2 3T3 (Fibroblastos)

A linhagem 3T3, derivada de fibroblastos murinos, foi adquirida do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ – Rio de Janeiro, RJ, Brasil-código 0017) e foi mantida em garrafas plásticas próprias para cultivo celular (25 e 75 cm<sup>2</sup>) em meio de cultura completo, RPMI (Vitrocell, São Paulo, Brasil) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100 UI/mL de penicilina e 100 mg/mL de estreptomicina (Hyclone, GE Healthcare). As garrafas foram armazenadas em incubadora a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de umidade.

#### 4.1.3 Plaqueamento celular

Com o objetivo de determinar a melhor confluência celular para a linhagem SCC-4 as seguintes densidades foram distribuídas em uma placa de cultivo de 96 poços (cada densidade foi avaliada em quadruplicata):

- a) 03 x 10<sup>3</sup> células
- b) 05 x10<sup>3</sup> células
- c) 10 x 10<sup>3</sup> células
- d) 15 x 10<sup>3</sup> células

Após 24 h deste plaqueamento, através de visualização em microscópio óptico invertido, determinou-se que a densidade 10x10<sup>3</sup> células por poço (placa de 96 poços) apresentou a melhor confluência celular para se realizar as demais etapas do experimento.

### 4.2 SOLUÇÕES DE AM

O AM ( $C_{16}H_{18}N_3SCl \cdot 3H_2O$ , Nuclear), com peso molecular de 373,92, foi avaliado em concentrações que variaram de 25  $\mu M$  a 3.200  $\mu M$ .

Para cada experimento foi preparada uma solução-estoque na concentração de 27 mM, em que 10 mg de AM foi diluído proporcionalmente em 01 mL de meio DMEM/F12 sem adição de soro fetal bovino, hidrocortisona ou antibiótico. A homogeneização do tubo era realizada em aparelho vórtex por 30 segundos e em seguida realizava-se o preparo das soluções de tratamento.

Para o grupo de 24 h, o azul de metileno da solução estoque foi diluído proporcionalmente em 01 mL de água bidestilada. Em seguida, a solução foi filtrada com auxílio de filtro de seringa com poro de 0,22  $\mu m$  para garantir a esterilidade do experimento e armazenada em congelador.

Após obter a solução estoque, as soluções de tratamento foram preparadas individualmente em tubos transparentes de 15 mL. Em cada frasco foi acrescentado 01 mL de meio de cultivo DMEM/F12 (independente do experimento) e o volume da solução-estoque correspondente a concentração que estava sendo preparada (alguns valores foram aproximados para a realização do preparo). O volume da solução-estoque correspondente a cada concentração a ser preparada foi acrescentada e a quantidade suficiente de DMEM/F12 (sem soro fetal bovino, hidrocortisona e antibiótico) para completar o volume de 1 mL como demonstrado na tabela 1.

Tabela 1 - Concentrações das soluções de tratamento e volumes correspondentes da solução-estoque

<b>Solução de tratamento (<math>\mu M</math>)</b>	<b>Volume da solução estoque (<math>\mu L</math>)</b>	<b>DMEM/F12 q.s.p</b>
25	0,93	1 mL
50	1,87	1 mL
100	3,75	1 mL
200	7,5	1 mL
400	15	1 mL
800	30	1 mL
1600	60	1 mL
3200	120	1 mL

Fonte: A autora

A solução de tratamento utilizada para o controle foi o meio de cultura DMEM/F12 sem soro fetal bovino, hidrocortisona e antibiótico.

Os ensaios de citotoxicidade e TFD foram realizados em quadruplicata, enquanto os ensaios de incorporação foram realizados em triplicata e repetidos pelo menos em 3 ocasiões diferentes.

#### 4.3 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE

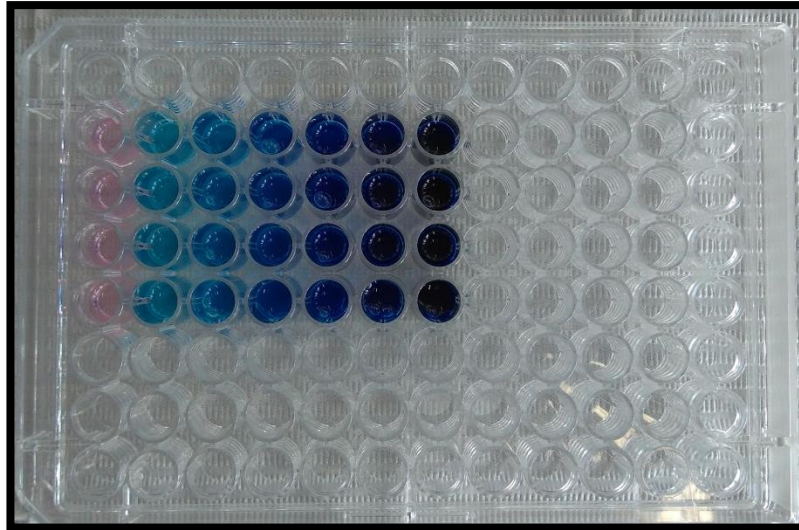
A primeira etapa da pesquisa observou o efeito de citotoxicidade de AM nas células SCC-4 e 3T3 nas seguintes concentrações: 0  $\mu M$  (controle), 25  $\mu M$ , 50  $\mu M$ , 100  $\mu M$ , 200  $\mu M$ , 400  $\mu M$ , 800  $\mu M$ , 1600  $\mu M$ , 3200  $\mu M$ .

Após 24 h do plaqueamento das células SCC-4 em placas de 96 poços, removeu-se o sobrenadante, acrescentou-se 100  $\mu L$  da solução de tratamento correspondente e em seguida a placa foi armazenada em incubadora a 37°C em atmosfera contendo 5% de  $CO_2$  e 95% de umidade por 30 minutos (tempo de incubação definido após experimentos prévios) (Figura 6). Ao final do tempo de



incubação a placa foi lavada com meio DMEM/F12 por 3 vezes para ser realizado o ensaio com MTT (brometo de 3(4,5 dimetiltiazol-2il) -2,5-difenil-tetrazólio).

Figura 6 – Incubação do Azul de Metileno em diferentes concentrações em linhagem SCC-4



Fonte: A autora

#### 4.3.1 Ensaio de viabilidade celular (MTT)

Para avaliação da viabilidade celular foi utilizado o ensaio de MTT (brometo de 3(4,5 dimetiltiazol-2il) -2,5-difenil-tetrazólio). Este ensaio de viabilidade celular consiste na redução do sal MTT pelas mitocôndrias das células viáveis em um composto insolúvel denominado formazan. As células mortas ou com seu metabolismo afetado por eventos citotoxicidade tem comprometimento dessas organelas e não conseguem realizar a redução do sal da mesma forma que células viáveis. O reagente MTT apresenta coloração amarela e quando é reduzido forma um composto insolúvel de coloração púrpura cuja absorção é mensurada em espectrofotômetro (FREITAS, 2015).

Para realizar o ensaio foi acrescentado 100  $\mu$ L da solução de MTT (0,5  $\mu$ g/mL diluído em DMEM ou RPMI) em cada poço e a placa armazenada em estufa (a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de umidade) por 60 minutos pelo menos, até que a metabolização do MTT pudesse ser observada. Em seguida, removeu-se o sobrenadante e foi acrescentado 100  $\mu$ L de solução de DMSO (dimetil sulfóxido) ou álcool isopropílico ácido (0,1M HCl) para eluição dos cristais de formazan. Após leve homogeneização dos poços, realizou-se a leitura da placa em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 570 nm.

#### 4.4 ENSAIO DE INCORPORAÇÃO DO AM

Com o objetivo de quantificar o azul de metileno incorporado pelas linhagens celulares testadas foi realizado um ensaio de incorporação do AM (SANTOS, 2016).

Após plaqueamento das células SCC4 conforme descrito no item 4.3.1 e a incubação com AM conforme item 4.2 em diferentes concentrações e lavagem como descrito no ensaio de citotoxicidade, foram adicionados 100  $\mu$ L de uma solução

contendo SDS (50 mM) para promover a lise da membrana celular e a liberação do azul de metileno incorporado pelas células. A absorvância do azul de metileno incorporado foi medida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 660 nm.

#### 4.5 AVALIAÇÃO DA TFD COM AM EM CÉLULAS SCC-4

##### 4.5.1 Aparelho emissor de luz

Com base nas características ópticas do azul de metileno e a acessibilidade por equipes da área da saúde em geral, optou-se pelo seguinte aparelho emissor de luz: o **Laser Duo MMOptics Twin Flex Evolution** (Figura 7), cujo comprimento de onda é de 660 nm (vermelho), área da ponteira era de 0,04 cm<sup>2</sup>, laser condutor GaAlAs, e cujo protocolo definido para esta pesquisa após experimentos preliminares foi de 50 mW de potência, 6 J de energia por ponto, 120 segundos de tempo de irradiação e densidade de energia de 150 J/cm<sup>2</sup>.

Figura 7 - Aparelho de laser



Fonte: A autora

##### 4.5.2 Ensaio de Citotoxicidade – Grupos TFD com AM

A terapia fotodinâmica com azul de metileno foi avaliada na linhagem SCC-4 em dois grupos diferentes: no grupo 1 (0 h) o ensaio de viabilidade celular foi realizado imediatamente após o término da TFD, enquanto no grupo 2 (24 h) este ensaio foi realizado 24 h após a realização da TFD. Em ambos os grupos foram avaliados os seguintes subgrupos:

- a. Controle (sem uso de fotossensibilizador e sem aplicação do laser).
- b. Laser (sem uso do fotossensibilizador).
- c. AM (concentrações de 25 µM e 50 µM; sem aplicação do laser).
- d. TFD (Laser e AM nas concentrações 25 µM e 50 µM).

Para diminuir a interferência da luz entre os poços a distribuição destes foi intercalada nas linhas e colunas, e nos poços vazios foi utilizada uma solução de bloqueio da luz (azul de metileno diluído em água na concentração de 27 M). Após 24 h do plaqueamento das células em placas de 96 poços, realizou-se a remoção do sobrenadante e acrescentou-se 100  $\mu$ L da solução de tratamento correspondente por 30 minutos, tanto para o grupo 1 como para o grupo 2.

Ao final do tempo de incubação, cada subgrupo do grupo 1 recebeu o seguinte tratamento:

- a. Laser: os poços foram irradiados por 02 min com a densidade de energia de 150 J/cm<sup>2</sup> e, em seguida, o sobrenadante foi removido, os poços foram lavados por 03 vezes com meio DMEM e acrescentou-se 100  $\mu$ L da solução de MTT.
- b. AM: o sobrenadante foi removido, os poços foram lavados por 03 vezes com meio DMEM e acrescentou-se 100  $\mu$ L da solução de MTT.
- c. TFD: os poços foram irradiados por 02 min com a densidade de energia 150 J/cm<sup>2</sup> e, em seguida, o sobrenadante foi removido, os poços foram lavados por 03 vezes com meio DMEM e acrescentou-se 100  $\mu$ L da solução de MTT.

A placa foi armazenada por 60 min ou até a metabolização do MTT em estufa e o protocolo de citotoxicidade foi realizado segundo o 4.3.1.

O grupo 2 recebeu tratamento semelhante em fluxo laminar, no entanto, ao término do tratamento de cada subgrupo a solução de tratamento foi substituída por 100  $\mu$ L de meio de cultivo completo e a placa armazenada em incubadora (37°C em atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de umidade) por 24 h. No dia seguinte, realizou-se a lavagem de todos os poços por 03 vezes com meio DMEM e foi acrescentado 100  $\mu$ L da solução de MTT em cada poço por pelo menos 60 min. Após o tempo determinado para o ensaio de MTT, realizou-se a eluição dos cristais de formazan e leitura da placa em espectrofotômetro conforme item 4.3.1.

#### 4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

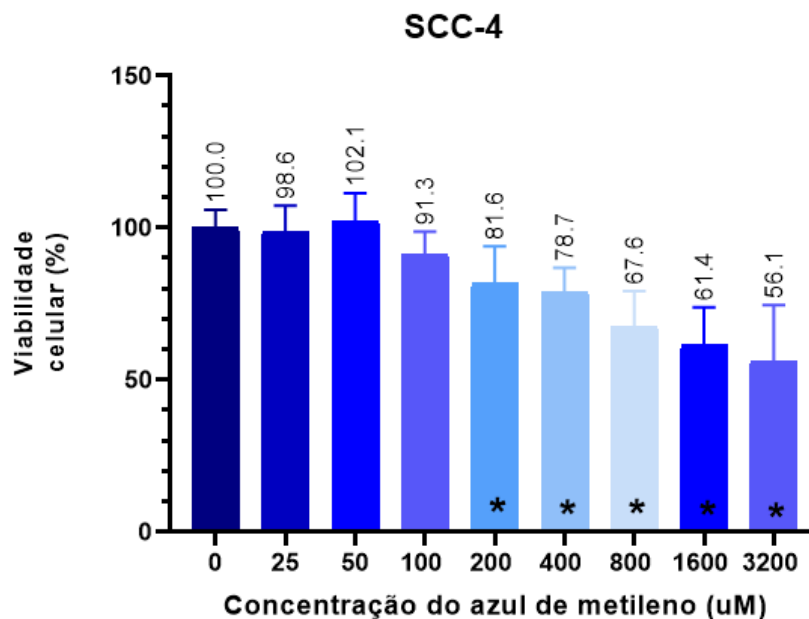
Os resultados obtidos foram tabulados no programa Microsoft Excel Versão 2008 e submetidos à análise estatística no programa *GraphPad Prisma 8.4.2*. Após a realização do teste de normalidade, os experimentos foram submetidos a análise de variância (ANOVA de uma via e de duas vias) com o pós teste de Tukey. Adotou-se o nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE E INCORPORAÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE AM NA LINHAGEM CELULAR SCC-4

O AM afetou a viabilidade celular das células SCC-4 a partir da concentração de 200  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,05$ ), mas apresentou potencial citotóxico (segundo normativa ISO) apenas em concentrações próximas a 800  $\mu\text{M}$ . As concentrações de 25  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$  foram as que menos afetaram a viabilidade celular (Gráfico 1).

Gráfico 1 – Avaliação da viabilidade celular da linhagem SCC-4 após 30 minutos de incubação com AM (concentrações de 25  $\mu\text{M}$  até 3.200  $\mu\text{M}$ )



Nota: Cada barra representa a média e desvio padrão de pelo menos 03 experimentos distintos.  
\*  $p < 0,05$  em relação ao controle (Teste Anova de uma via e pós teste de Tukey).  
Fonte: A autora

A média e o desvio padrão de incorporação da concentração do AM foi de 0,6  $\mu\text{M}$  para a concentração de 25  $\mu\text{M}$ . Para a concentração de 50  $\mu\text{M}$ , a média foi de 2,1 e o desvio padrão de 1,7  $\mu\text{M}$  (Tabela 2).

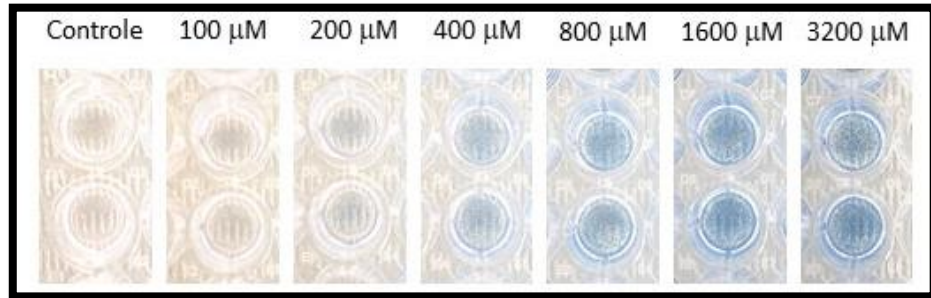
Tabela 2: Média e desvio padrão da incorporação de azul de metileno em diferentes concentrações pelas células SCC-4

Concentração ( $\mu\text{M}$ )	Média de incorporação da concentração (Desvio padrão)
25	0,6 (0,6)
50	2,1 (1,7)
100	11,4 (9,4)
200	19,5 (12)
400	19,4 (20,8)
800	40,9 (25,6)
1600	48,3 (28,2)
3200	52,7 (29,1)

Fonte: A autora

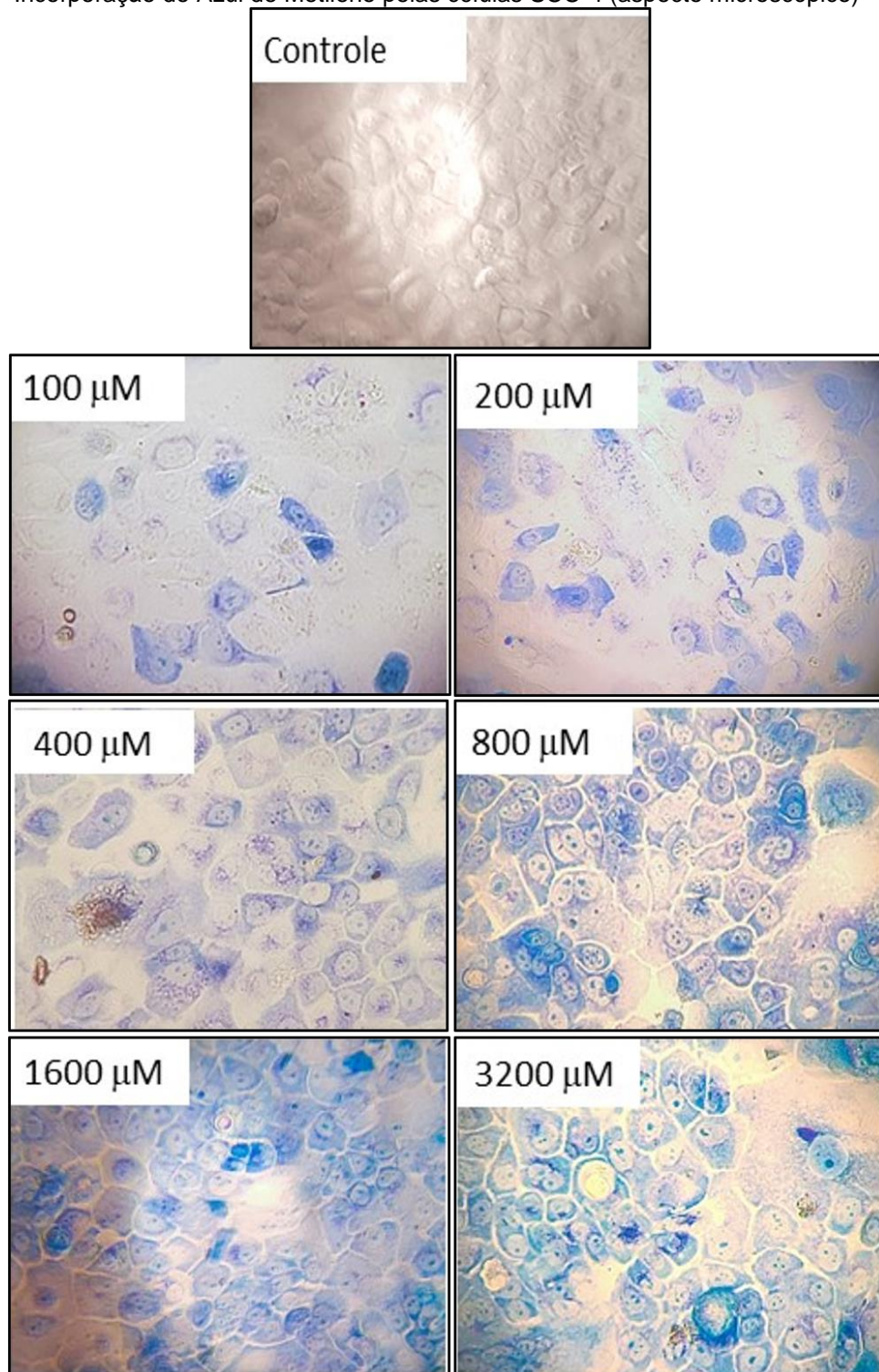
O grau de incorporação do AM pelas células SCC-4 também foi observado diretamente através de visualização em microscópio invertido a partir da concentração de 100  $\mu\text{M}$  (fotomontagem e na fotomicrografia da placa após a incubação com AM e lavagem com meio DMEM) (Figuras 8 e 9). A coloração azulada do AM é difícil de ser observada macroscopicamente e microscopicamente em concentrações abaixo de 100  $\mu\text{M}$ .

Figura 8 – Incorporação do Azul de Metileno pelas células SCC-4 (aspecto macroscópico)



Nota: Fotomacrografia dos poços de cultivo celular após experimento de incorporação com AM.  
Fonte: A autora

Figura 9 – Incorporação do Azul de Metileno pelas células SCC-4 (aspecto microscópico)



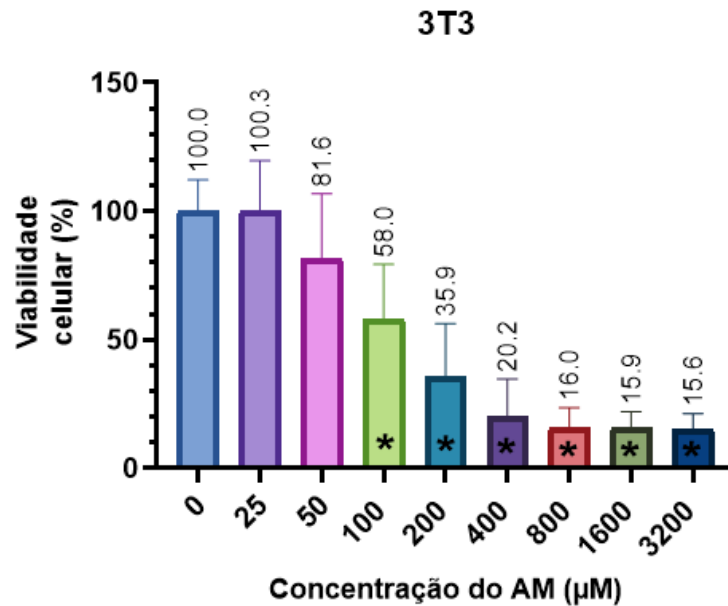
Nota: Fotomicrografia realizada em microscópio invertido no aumento de 400x após experimento de incorporação com AM.

Fonte: A autora

## 5.2 ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE E INCORPORAÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE AM NA LINHAGEM CELULAR 3T3

O AM afetou a viabilidade celular das células 3T a partir da concentração de 100  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,05$ ). Também a partir desta concentração apresentou potencial citotóxico (58%). Apenas as concentrações de 25  $\mu\text{M}$  e 50  $\mu\text{M}$  não afetaram significativamente a viabilidade celular (Gráfico 2).

Gráfico 2 – Avaliação da viabilidade celular da linhagem 3T3 após 30 minutos de incubação com AM (concentrações de 25  $\mu\text{M}$  até 3.200  $\mu\text{M}$ )



Nota: Cada barra representa a média e o desvio padrão de pelo menos 03 experimentos distintos.  
\*  $p < 0,05$  em relação ao controle (Teste Anova de uma via e pós teste de Tukey).  
Fonte: A autora

As células da linhagem 3T3 demonstraram menor capacidade de incorporar o AM em comparação com as células da linhagem SCC-4 nas concentrações de 25 e 50  $\mu\text{M}$  (não citotóxicas para esta linhagem). A incorporação do AM nas concentrações maiores que 100  $\mu\text{M}$  também foram menores, mas são difíceis de avaliar devido a intensa citotoxicidade induzida pelo AM, a qual pode explicar a intensa variação representada pelo grande desvio padrão (Tabela 3).

Tabela 3: Média e desvio padrão da incorporação de azul de metileno em diferentes concentrações pelas células 3T3

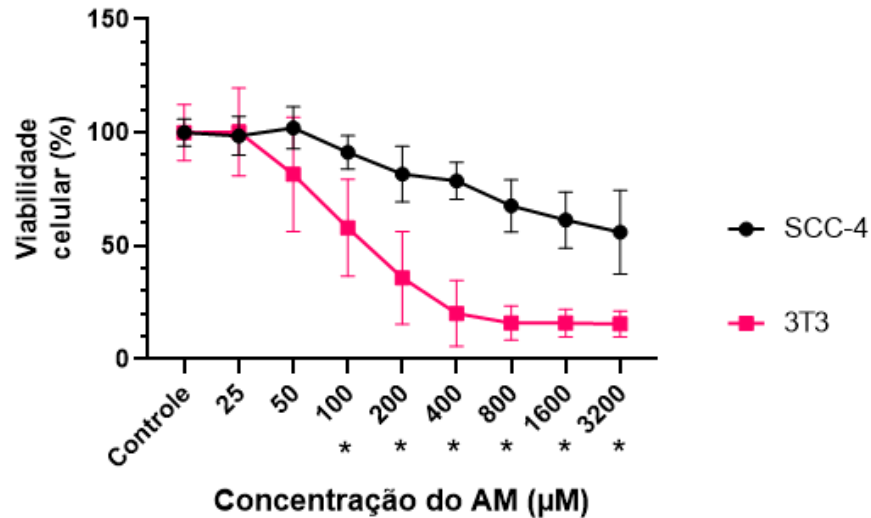
Concentração ( $\mu\text{M}$ )	Média de incorporação da concentração (Desvio padrão)
25	0 (0)
50	0 (0)
100	6,4 (11)
200	5,5 (9,6)
400	5,7 (9,9)
800	8,7 (15)
1600	9 (15,5)
3200	12,8 (22,1)

Fonte: A autora

### 5.3 COMPARAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E INCORPORAÇÃO DO AM ENTRE AS LINHAGENS SCC-4 E 3T3

A citotoxicidade foi semelhante para as duas linhagens até a concentração de 50  $\mu\text{M}$ . A partir de 100  $\mu\text{M}$  a linhagem 3T3 (58%) apresentou maior sensibilidade à ação do azul de metileno que a linhagem SCC-4 ( $p < 0,0001$ ) (Gráfico 3).

Gráfico 3 – Diferenças na viabilidade celular da linhagem 3T3 e SCC-4 após exposição ao AM por 30 minutos (concentrações de 25  $\mu\text{M}$  até 3.200  $\mu\text{M}$ )

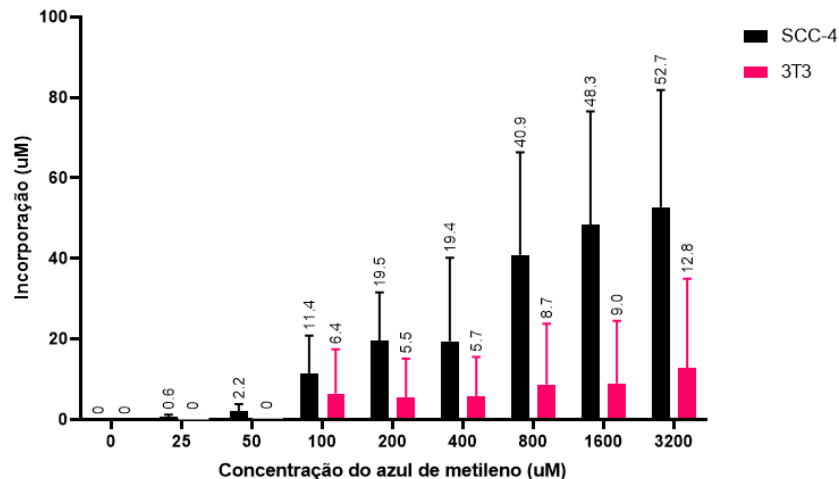


Nota: Média e desvio padrão de pelo menos 03 experimentos distintos. \* $p < 0,0001$  (Teste de Anova de duas vias)

Fonte: A autora

Na avaliação do grau de incorporação do AM, foi observada maior quantidade de corante incorporado pela linhagem neoplásica do que pela linhagem não neoplásica. Nas concentrações de 25 e 50  $\mu\text{M}$  o valor de AM incorporado pelos fibroblastos ficou próximo a zero (Gráfico 4).

Gráfico 4 – Diferenças no grau de incorporação do AM pela linhagem 3T3 e SCC-4 após exposição 30 minutos (concentrações de 25  $\mu\text{M}$  até 3.200  $\mu\text{M}$ )



Nota: Média e desvio padrão de pelo menos 02 experimentos distintos.

Fonte: A autora

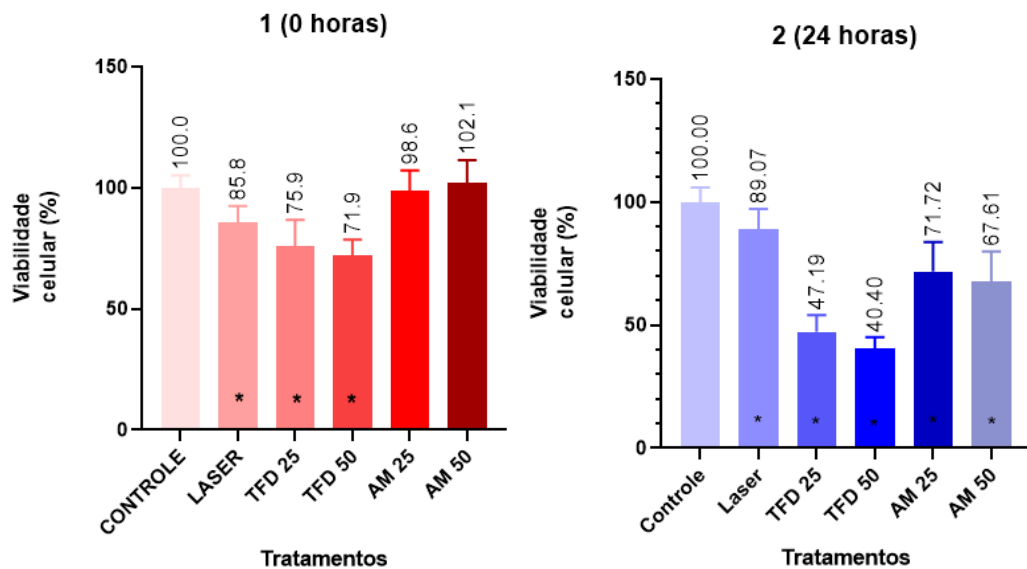


#### 5.4 EFEITO DA TFD NA LINHAGEM CELULAR SCC-4

O efeito da TFD na linhagem SCC-4 foi avaliado nas concentrações de 25 e 50  $\mu\text{M}$  em dois momentos distintos: no grupo 1, a viabilidade celular foi avaliada logo ao término do tratamento e no grupo 2, 24 h após a finalização do tratamento.

No grupo 1 os subgrupos laser, TFD 25 e TFD 50 alteraram a viabilidade significativamente em relação ao controle, no entanto, sem apresentar citotoxicidade (viabilidade abaixo de 70%). Após 24 h, no entanto, todos os subgrupos apresentaram diferença estatística em relação ao controle ( $p < 0,05$ ). Neste grupo (2) os tratamentos de AM 50, TFD 25 e TFD 50 foram considerados citotóxicos (Gráfico 5).

Gráfico 5 - Viabilidade celular da linhagem SCC-4 após tratamento com laser, TFD e AM nas concentrações de 25 e 50  $\mu\text{M}$  em 2 grupos diferentes



Nota: Cada barra representa a média e desvio padrão de pelo menos 03 experimentos independentes.  
\*  $p < 0,05$  em relação ao controle (Teste Anova de uma via e pós teste de Tukey).

Fonte: A autora

Em todos os subgrupos não houve diferença estatística no que se refere à diferença na concentração (25 ou 50  $\mu\text{M}$ ), mas foi observada diferença estatística ( $p < 0,0001$ ) entre os tratamentos (TFD e AM) dentro do mesmo grupo (1 ou 2), inclusive na mesma concentração (ex. AM 25 x TFD 25) (Tabela 4).

Tabela 4: Viabilidade celular das células SCC-4 após tratamento com TFD ou AM utilizando a mesma concentração de AM nos grupos 1 e 2

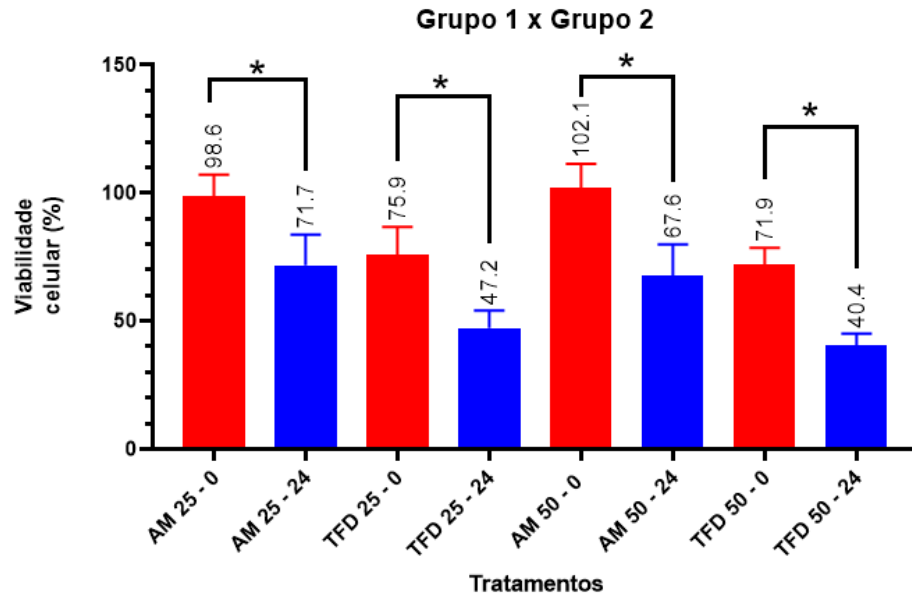
	Grupo 1		Grupo 2	
	Média (desvio padrão)	Valor de p	Média (desvio padrão)	Valor de p
AM 25 $\mu\text{M}$	95,91 (13,01)	<0,0001	71,72 (11,96)	<0,0001
TFD 25 $\mu\text{M}$	75,91 (6,629)		47,19 (6,978)	
AM 50 $\mu\text{M}$	102,3 (5,278)	<0,0001	67,61 (12,25)	<0,0001
TFD 50 $\mu\text{M}$	95,91 (13,01)		40,40 (4,690)	

Fonte: A autora

Foi observada diferença estatística entre os subgrupos de TFD e AM do grupo 1 e seus correspondentes no grupo 2, em que na avaliação pós 24 horas todos os

subgrupos apresentaram queda na viabilidade celular (Gráfico 6). O percentual de redução na viabilidade celular após 24 horas e valor de p para os 4 subgrupos podem ser observados na tabela 5.

Gráfico 6 – Diferenças na viabilidade celular entre os subgrupos correspondentes de cada grupo 1 (0 h) e grupo 2 (24 h)



Nota: Cada barra representa a média e desvio padrão de pelo menos 03 experimentos distintos.  
\*  $p < 0,05$  em relação ao controle (Teste Anova de uma via e pós teste de Tukey).

Fonte: A autora

Tabela 5: Viabilidade celular das células SCC-4 após tratamento com TFD ou AM utilizando diferentes concentrações de AM nos grupos 1 e 2

Subgrupo	Grupo 1	Grupo 2	Redução na viabilidade celular após 24 horas	Valor de p
AM 25	98,6%	71,7%	27,3%	<0,0001
AM 50	102,1%	67,6%	33,8%	<0,0001
TFD 25	75,9%	47,2%	37,9%	<0,0001
TFD 50	71,9%	40,4%	43,8%	<0,0001

Fonte: A autora

## 6 DISCUSSÃO

A TFD causa danos celulares por meio da interação entre fotossensibilizador, luz e oxigênio através da produção de EROs como radicais hidroxila ( $\text{OH}^\cdot$ ) e o oxigênio singleto (NUNEZ, 2007). A toxicidade da TFD com AM é fortemente associada com a produção de oxigênio singleto (WAINWRIGHT; CROSSLEY, 2002), mas o tipo de reação que ocorre pode variar em função da quantidade de oxigênio e outras moléculas disponíveis no meio.

Na literatura foram encontrados resultados positivos do uso da TFD com AM no tratamento de diversos tipos de tumores como sarcoma de Kaposi, carcinoma esofágico e câncer superficial de bexiga (GUAN *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2018), câncer de mama (HOSSEIZADEH; KHORSANDI; JAHANSHIRI, 2017; SANTOS *et al.*, 2017), câncer cervical (BLAZQUEZ-CASTRO *et al.*, 2009; FREITAS *et al.*, 2017), osteossarcoma (GUAN *et al.*, 2013), melanoma (KHORSANDI; HOSSEIZADEH; CHOMANI, 2020), câncer de pulmão (LIM *et al.*, 2013; RODRIGUEZ-CÓRDOVA *et al.*, 2013), e câncer de boca e de faringe (KOFLENER *et al.*, 2018). Além disso, há relatos de estudos em que células resistentes a alguns quimioterápicos foram suscetíveis a mistura de drogas padrão como doxorrubicina com corantes como azul de metileno (WAINWRIGHT, 2005). Na maior parte dos relatos a TFD com AM é utilizada em tumores localizados e de fácil acesso, ainda que sejam inoperáveis (WAINWRIGHT *et al.*, 1997; RICE; WAINWRIGHT; PHOENIX, 2000).

Este fotossensibilizador também apresenta sob certas condições a *dark* toxicidade: efeitos citotóxicos como produção de EROs (por exemplo  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e inibição de enzimas (como óxido nítrico sintase, guanilato ciclase solúvel e monoaminoxidase) que ocorrem mesmo na ausência de luz (TACAL *et al.*, 2021). Este fenômeno pode ocorrer devido ao processo de oxidação espontânea por moléculas como citocromo c da forma leucometileno, que por sua vez foi reduzida através agentes redutores biológicos como NAD(P)H (WONDRAK, 2007; IONG *et al.*, 2017).

Em nosso estudo o efeito da *dark* toxicidade em células SCC-4 foi observado em concentrações a partir de 800  $\mu\text{M}$  em que a viabilidade celular ficou abaixo de 70% (ISO, 2009). Kofler *et al.* (2018), cujo estudo avaliou os efeitos do AM e da TFD com AM em células derivadas de carcinoma espinocelular de língua (SCC-25), observaram efeitos de *dark* toxicidade do AM na concentração de 160  $\mu\text{M}$  após incubação de 08 minutos (viabilidade celular máxima de 34%). Para a mesma faixa de concentração (100 e 200  $\mu\text{M}$ ) e com maior tempo de incubação (30 minutos) em nosso estudo o AM pouco afetou a viabilidade celular, a qual permaneceu entre 90 e 80%. O momento de avaliação da viabilidade celular pode justificar esta diferença, pois as reações de oxidação-redução e seus consequentes danos celulares possivelmente continuam ocorrendo dentro das células mesmo após a remoção do fotossensibilizador. Enquanto Kofler *et al.* (2018) avaliaram a viabilidade celular 96 h após o experimento, nosso estudo realizou o teste de MTT imediatamente após o período de incubação do AM. No experimento em que o teste de MTT foi realizado 24 h após os tratamentos foi observada uma diferença de 30,55% (média) no decaimento da viabilidade celular nos grupos expostos apenas ao corante em relação ao grupo de 0 h. O estudo de Santos *et al.* (2017) apresentou *dark* toxicidade com AM em linhagens mamárias (malignas e não-maligna) até 08 h após a exposição por 02 h na concentração de 20  $\mu\text{M}$ . É certo que os efeitos da *dark* toxicidade do AM podem variar em função da concentração do fotossensibilizador, solvente, tipo de célula, tempo de exposição e tempo de avaliação da viabilidade celular (NUNEZ, 2007).

Na maior parte dos tecidos não há relatos de toxicidade local relacionada ao AM (WAINWRIGHT; CROSSLEY, 2002) e o AM é um fotossensibilizador considerado bastante seguro e com poucos efeitos colaterais, especialmente quando aplicado topicamente (LINK *et al.*, 1998; RINDADE *et al.*, 2000). Nesta pesquisa, entretanto, foi observada uma tendência de queda na viabilidade celular muito mais acentuada para a linhagem 3T3 (fibroblastos) do que a linhagem SCC-4 (derivada de CEC), especialmente em concentrações acima de 50  $\mu\text{M}$ . Resultados semelhantes foram encontrados no estudo de Rindade *et al.* (2000), o qual demonstrou que células neoplásicas (euritroleucêmicas) foram mais resistentes ao efeito citotóxico do AM do que células derivadas de tecido saudável de rim para concentração de 2,7 M. Por outro lado, o grupo observou que a citotoxicidade do AM foi maior para células neoplásicas derivadas do sangue do que células normais para concentrações abaixo de 1.350  $\mu\text{M}$ , mas acima desta concentração não houve diferença estatística (KIRSZBERG; RUMJANEK; CAPELLA, 2005).

A citotoxicidade do AM em células saudáveis é dose-dependente: estudos que não encontraram efeitos citotóxicos do AM em fibroblastos utilizaram concentrações menores que 20  $\mu\text{M}$  (YANG *et al.*, 2017), enquanto em nosso experimento a menor concentração utilizada foi 25  $\mu\text{M}$ . De fato, embora a linhagem de fibroblasto tenha sido muito mais suscetível aos danos causados pelo AM no geral, nas menores concentrações (25 e 50  $\mu\text{M}$ ) a viabilidade das células 3T3 não foi afetada de forma significativa. Nos experimentos *in vitro* de Lamarque *et al.* (2020) também não foi observada citotoxicidade em fibroblastos derivados de ratos expostos à baixas concentrações de AM em até 06 horas após o tratamento. No entanto, foi observado que o aumento da citotoxicidade estava diretamente associado ao aumento da concentração. Outras pesquisas demonstram que células derivadas de melanoma (G361) foram mais afetadas pelo uso de AM em baixas concentrações quando comparadas às células não-neoplásicas de pele (Hs27) e fibroblastos (WONDRAK, 2007).

Os efeitos citotóxicos do AM estão bastante associados com a concentração utilizada: altas concentrações tendem a gerar um estresse oxidativo maior nas células e causam mais danos celulares, e apesar de este efeito ser desejável no tratamento antineoplásico, não é adequado para os tecidos saudáveis pelo risco de efeitos colaterais. O desafio é encontrar uma dose de concentração que tenha o maior potencial em TFD contra o tumor ao mesmo tempo que não afete o tecido saudável ao redor do tumor. Neste contexto, em nosso experimento as duas concentrações mais seguras para o uso em SCC-4 e 3T3 foram as de 25 e 50  $\mu\text{M}$ .

Outro fato a ser considerado é que a aparente resistência das células SCC-4 neste experimento pode ser devido a características genéticas específicas da linhagem celular que as conferem maior resistência a diversos mecanismos que induzem a morte celular, razão pela qual muitas terapias acabam falhando na eliminação destas células. A linhagem SCC-4 foi isolada em 1981 nos EUA de um homem de 55 anos de idade que realizou tratamento com radioterapia e metotrexato por 16 meses para um câncer de língua por 16 meses antes de se obter a amostra para cultivo celular (RHEINWALD; BECKETT, 1981), o que caracteriza um tumor resistente a terapias antineoplásicas empregadas (radioterapia e metotrexato).

Em solução o AM apresenta características hidrofílicas, e a partir do momento que entra em contato com a célula pode ser reduzido à forma leucometileno que possui carga neutra, é mais lipofílica e por isso consegue atravessar a membrana celular com maior facilidade (NUNEZ, 2007; BLAZQUEZ-CASTRO *et al.*, 2008). O leucometileno absorve luz apenas em comprimentos de onda da faixa ultravioleta e,

portanto, não é útil na TFD em que a maior parte das fontes de luz encontra-se na janela terapêutica fora desta região (WAINWRIGHT *et al.*, 1997). Ainda assim em condições fisiológicas esta forma reduzida do AM pode sofrer auto oxidação espontânea e gerar EROs que causam danos celulares (WONDRAK, 2007). Embora não seja útil para a TFD proposta neste experimento, o AM incorporado como leucometileno pode ter afetado a viabilidade celular dos grupos onde utilizou-se somente o AM em diferentes concentrações. Embora não seja interessante para a TFD a presença do leucometileno, se esta for a forma mais prevalente em tecidos saudáveis do que em tecidos tumorais o risco de toxicidade será menor (WAINWRIGHT *et al.*, 1997).

É importante ressaltar que não foi possível identificar a quantidade de AM presente na forma leucometileno (incolor), pois o ensaio de incorporação utilizado nesta pesquisa busca quantificar o AM incorporado pela célula na forma oxidada que é absorvida nos comprimentos de onda acima de 620 nm (o qual foi utilizado no espectrofotômetro), e mais estudos são necessários para investigar os efeitos do leucometileno sobre a viabilidade celular.

Apesar da dificuldade de visualizar a incorporação do AM pelas linhagens SCC-4 e 3T3 na metodologia utilizada neste estudo, foi possível observar que mesmo em baixas concentrações as células neoplásicas foram muito mais suscetíveis a incorporação do AM do que as células saudáveis.

Nas concentrações acima de 100  $\mu\text{M}$  esta diferença observada no comportamento das células, pode estar relacionada a resistência das células neoplásicas a toxicidade do AM; uma vez que, a linhagem 3T3 apresentou menor viabilidade celular do que SCC-4. Isso pode ser devido ao fato do maior número de células mortas na linhagem de fibroblasto em comparação a SCC-4, o que poderia impactar na incorporação do fotossensibilizador.

Entretanto, mesmo nas menores concentrações (25 e 50  $\mu\text{M}$ ) a incorporação do corante pelas células neoplásicas foi maior do que na linhagem não-neoplásica. Este resultado vai de encontro a literatura que afirma que o corante fenotiazínico tem uma tendência a se ligar melhor a tecidos tumorais do que tecidos saudáveis (PENG *et al.*, 1993). Por sua afinidade com tecidos tumorais o AM também é utilizado como marcador visual tumoral para diagnóstico, cirurgia e rastreamento de linfonodo sentinela (KIRSZBERG; RUMJANEK; CAPELLA, 2005). Kwiatkowski *et al.*, 2018 sugerem que a presença de LDL nas células tumorais malignas pode ser um fator de afinidade para moléculas fotossensibilizadoras, especialmente como o AM, as quais tem comportamento lipofílico no meio celular. Da mesma maneira, o potencial elétrico das células pode afetar essa ligação, onde o potencial de membrana citoplasmática levemente negativo até a membrana mitocondrial interna altamente negativa apresentam uma afinidade melhor para fotossensibilizadores carregados positivamente, como o AM (SER *et al.*, 2020).

Após identificar as concentrações de AM que menos afetaram a viabilidade celular de uma linhagem não-neoplásica, e, portanto, apresentariam maior segurança para experimentos futuros *in vivo*, os experimentos com TFD foram realizados com as concentrações de 25 e 50  $\mu\text{M}$  na linhagem SCC-4.

Na avaliação imediatamente após o uso do laser ou da TFD foi possível observar diferença significativa nos grupos tratados com laser, TFD 25 e TFD 50, quando comparado aos grupos tratados apenas com o fotossensibilizador. Estes resultados demonstram que a associação do laser com o fotossensibilizador já interfere na viabilidade celular em comparação ao controle e ao uso do AM sozinho. Kofler *et al.* (2018) não encontraram diferença estatística nas células tratadas apenas

com o laser mesmo após a exposição por 15 minutos, ao contrário de nossos experimentos, cuja viabilidade celular foi afetada, mesmo com um tempo menor de exposição (02 minutos). Outra diferença em relação ao estudo de Kofler *et al.* (2018) a densidade de energia utilizada foi de 95 J/cm<sup>2</sup>, nosso grupo utilizou 150 J/cm<sup>2</sup>.

O uso do laser de baixa potência pode ter efeitos distintos sobre as células. A energia da luz quando aplicada sobre a matéria interage com os elétrons e produz diferentes efeitos biológicos. Em estudo com células hepáticas de ratos, o laser de baixa potência induziu um aumento no estresse oxidativo que estimulou resposta inflamatória e reparo tecidual (MUMIC *et al.*, 2016). Mas em altas doses de energia o laser pode gerar efeitos inibitórios que diminuem a proliferação celular ou levam a morte celular. Células de adenocarcinoma de cólon de útero (HeLa) irradiadas com densidade de energia até 15 J/cm<sup>2</sup> apresentaram proliferação celular, enquanto a densidade de energia de 50 J/cm<sup>2</sup> diminuiu a viabilidade celular (SILVA *et al.*, 2019). Assim, os efeitos da fotobiomodulação com laser de baixa potência podem estimular ou inibir o crescimento celular dependendo da linhagem celular, comprimento de onda, densidade de energia, tempo de aplicação no tecido e tempo de avaliação.

Além do grupo de laser, todos os outros grupos apresentaram diferença estatística em relação ao controle nos experimentos avaliados 24 horas após tratamento, incluindo os que foram tratados apenas com AM, mas somente foram considerados citotóxicos os grupos de TFD 25, TFD 50 e AM 50 (ISO, 2009). Portanto, a ação do laser potencializa o efeito citotóxico do AM. Por outro lado, não foi encontrada diferença significativa entre as concentrações de AM (25 e 50 µM) em relação os diferentes tempos em que foi verificada a viabilidade celular.

Concentrações maiores do que 10<sup>-5</sup> M tendem a agregar e formar dímeros, moléculas cuja absorção da luz ocorre em uma faixa um pouco menor daquela utilizada neste estudo (em torno de 610-633 nm) e que podem também servir como um escudo óptico para as monômeros, prejudicando a eficácia da TFD (BLAZQUEZ-CASTRO *et al.*, 2018). Neste sentido, concentrações menores são mais desejáveis por sua maior eficiência na TFD (NUNEZ, 2007).

Para experimentos futuros é interessante optar por utilizar a concentração de 25 µM, posto que os resultados obtidos por esta concentração foram semelhantes aos obtidos com 50 µM e quanto menor a concentração possivelmente menor será o efeito nas linhagens não neoplásicas, como demonstrado nos experimentos em que se utilizou fibroblastos murinos (3T3). No estudo de Santos *et al.* (2017) foi observado que concentrações menores de AM pouco afetaram as células da linhagem normal na TFD e ainda causaram morte celular expressiva nas linhagens malignas. Como em nosso estudo não foi avaliado o efeito da TFD sobre a linhagem 3T3 não é possível afirmar qual seria o efeito da TFD com AM nestas condições. Assim, sugere-se novos estudos de TFD com AM em células derivadas de fibroblastos nas concentrações de 25 e 50 µM.

Outro fator a ser considerado em estudos futuros é o tempo de avaliação pós tratamento, pois quanto mais formas oxidadas e instáveis (devido a transferência de energia da luz, por exemplo, como na TFD) presentes, maior será a quantidade de EROs formadas e maior será o estresse oxidativo que a célula irá sofrer. A avaliação em tempos maiores após o tratamento pode demonstrar uma melhor compreensão da influência do tempo sobre os efeitos da TFD na viabilidade celular de células SCC-4.

Dentre as limitações de nosso estudo, não foi possível identificar qual a principal organela de afinidade do AM na linhagem SCC-4, bem como o principal processo de morte celular envolvido. Não há um consenso na literatura sobre a localização intracelular do AM, seja em mitocôndria ou lisossomos, assim como não

há consenso sobre a principal via de morte celular induzida pela TFD com AM, seja apoptose ou necrose. Em diversas linhagens celulares foi observada morte celular por apoptose (WONDRAK, 2007; LIM *et al.*, 2013), sendo este o tipo de morte celular mais desejado no processo da TFD. Em contrapartida, o grupo de Santos *et al.* (2017) identificou uma maior presença de sinalizadores de necrose na morte celular induzida por TFD com AM em linhagens celulares derivadas de câncer de mama. Identificar a localização intracelular do AM bem como entender os mecanismos que levam à morte celular pode favorecer no desenvolvimento de novos protocolos ou mesmo novas abordagens como o uso de moléculas e nanopartículas conjugadas com o AM para potencializar a TFD (SER *et al.*, 2020). Neste sentido, a literatura descreve também o comportamento de derivados de azul de metileno. A eficácia da TFD com AM pode ser melhorada com a adição de um grupo metil na molécula de AM, diminuindo a taxa da forma reduzida da molécula dentro da célula (ICE *et al.*, 1998). Wainwright (2005) também descreveu que derivados de azul de metileno exibem efeitos citotóxicos em cultura muito melhores devido a combinação de lipofilicidade e diminuição da forma reduzida.

É interessante ressaltar que a maior parte das EROs são liberadas na mitocôndria por causa dos processos de metabolismo celular. A mitocôndria de células tumorais malignas, no entanto, está alterada e mutações no DNA podem levar a uma superprodução de EROs, que por sua vez podem também estimular oncogenes e favorecer o processo neoplásico. Neste sentido, terapias que modulem a produção de EROs e sistemas antioxidantes são interessantes no tratamento antineoplásico (YANG *et al.*, 2016). O AM é considerado um excelente gerador de EROs, especialmente oxigênio singleto, e embora seja difícil detectar a produção de EROs em sistemas biológicos devido as quantidades dessas espécies serem muito baixas e as reações ocorrerem de forma muito rápida, alguns métodos indiretos podem ser utilizados para estimar essa produção como os espectrofotométricos e cromatométricos que medem a atividade enzimática (SOD, catalase, GSH-Px e GSH-Rd) e/ou a concentração de tripeptídeos (GSH, GSSG) e aldeídos (MDA) (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Para estudos futuros, a quantificação dessas EROs, especialmente do oxigênio singleto, será importante para melhor entendimento da ação da TFD com AM em células SCC-4.

Dos estudos *in vitro* encontrados até o momento apenas o estudo de Kofler *et al.* (2018) foi realizado em linhagem derivada de carcinoma espinocelular de boca (SCC-25), o qual apresentou resultados promissores especialmente sobre a capacidade desta terapia de impedir a reprodução das células tumorais malignas.

Nosso estudo demonstrou que a TFD com AM pode ser uma alternativa eficaz no tratamento antineoplásico de carcinoma espinocelular derivado de língua, assim como o estudo de Kofler *et al.* (2018). Porém, considerando a complexidade do microambiente tumoral e características genéticas da linhagem SCC-4, estudos sobre a localização do AM, evidências de morte celular e quantificação de oxigênio singleto ou EROs são necessários para a definição de melhores protocolos para estudos *in vitro* e *in vivo*. A melhor compreensão do efeito da TFD em células de natureza neoplásica, podem contribuir para o desenvolvimento de novas tecnologias que auxiliem o fotossensibilizador na ligação com as organelas celulares e na produção de EROs, atingindo de forma mais eficiente a morte celular das células tumorais.

## 7 CONCLUSÃO

O AM alterou a viabilidade celular de células SCC-4 a partir da concentração de 200  $\mu\text{M}$ , mas foi considerado citotóxico (viabilidade menor que 70%) apenas a partir de 800  $\mu\text{M}$ .

Na comparação entre as linhagens, o AM apresentou maior citotoxicidade para a linhagem 3T3 (a partir de 100  $\mu\text{M}$ ). No entanto, a incorporação do fotossensibilizador foi maior para a linhagem neoplásica, sendo praticamente nula para a linhagem de fibroblasto nas concentrações de 25 e 50  $\mu\text{M}$ .

Entre os grupos tratados com laser, somente fotossensibilizador e TFD, o grupo de TFD foi o que causou maior queda na viabilidade celular nas células SCC-4 nas concentrações de 25 e 50  $\mu\text{M}$  quando irradiadas com laser de 660 nm por 02 minutos e dose de 150  $\text{J}/\text{cm}^2$  (potência de 50mW e área de irradiação de 0,04 $\text{cm}^2$ ).

Diante dos dados apresentados é possível concluir que que a TFD com AM nas concentrações de 25 e 50  $\mu\text{M}$  afetam negativamente a viabilidade celular de células derivadas de carcinoma espinocelular de língua (SCC-4).



## REFERÊNCIAS

- AGOSTINIS, P. *et al.* Photodynamic therapy of cancer: an update. **Ca: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 61, n. 4, p. 250-281, Jul. 2011.
- ANDREADIS, D. *et al.* Utility of photodynamic therapy for the management of oral potentially malignant disorders and oral cancer. **Translational Research in Oral Oncology**, v. 1, p. 1-19, 2016.
- BACELLAR, I.O.L. *et al.* Membrane Damage Efficiency of Phenothiazinium Photosensitizers. **Photochemistry and Photobiology**, p. 1-13, 2014
- BACELLAR, I. *et al.* Photodynamic Efficiency: from molecular photochemistry to cell death. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 9, p. 20523-20559, ago. 2015.
- BLÁZQUEZ-CASTRO, A. *et al.* Differential photodynamic response of cultured cells to methylene blue and toluidine blue: role of dark redox processes. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 8, n. 3, p. 371-376, jan. 2009.
- CHAVES, A. L. F. *et al.* Head and neck cancer treatment in a developing country: a survey-based study in brazil. **Journal of Cancer Policy**, v. 13, p. 18-23, jun. 2017.
- FERREIRA, A.L.A., MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Ass. Med. Brasil**, v. 43, n.1, p. 61-8, 1997
- FIGUEIRA, J.A.; VELTRINI, V.C. Photodynamic therapy in oral potentially malignant disorders—Critical literature review of existing protocols. **Photodiagnosis And Photodynamic Therapy**, v. 20, p. 125-129, set. 2017.
- FREITAS, L. M. *et al.* Photodynamic therapy combined to cisplatin potentiates cell death responses of cervical cancer cells. **BMC Cancer**, v. 17, n. 1, p. 1-12, 2017.
- GABRIELLI, D. *et al.* Binding, Aggregation and Photochemical Properties of Methylene Blue in Mitochondrial Suspensions. **Photochemistry and Photobiology**, v. 3, n. 79, p. 227-232, 2004.
- GANGLOFF, P. *et al.* Photodynamic therapy as salvage treatment for recurrent head and neck cancer. **Médecine Buccale Chirurgie Buccale**, v. 18, n. 4, p. 325-331, 2012.
- GARG, A.D. *et al.* In Vitro Studies on Erythrosine-Based Photodynamic Therapy of Malignant and Pre-Malignant Oral Epithelial Cells. **PLoS ONE**, v.7, n.4, p.344-75. 2012.
- GOMES, A.T.P.C., NEVES, M.G.P.M., CAVALEIRO, J.A. Cancer, Photodynamic Therapy and Porphyrin-Type Derivatives. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, n. 12, p. 993-1026, 2018.

GUAN, J.L. *et al.* Photodynamic action of methylene blue in osteosarcoma cells in vitro. **Photodiagnosis And Photodynamic Therapy**, v. 11, n. 1, p. 13-19, 2014.

HARTMANS, E. *et al.* Tyrosine kinase inhibitor induced growth factor receptor upregulation enhances the efficacy of near-infrared targeted photodynamic therapy in esophageal adenocarcinoma cell lines. **Oncotarget**, New York, v. 8, n. 18, p. 29846-29856, 2017.

HELERBROCK, R. "Espectro eletromagnético"; **Brasil Escola**. Disponível em: <https://brasilecola.uol.com.br/fisica/espectroeletromagnetico.htm>. Acesso em 14 de março de 2021.

HIRSCHBERG, H.; BERG, K.; PENG, Q. Photodynamic therapy mediated immune therapy of brain tumors. **Neuroimmunology And Neuroinflammation**, v. 5, n. 7, p. 27-43, 2018.

HOSNI, A. *et al.* Non-operative management for oral cavity carcinoma: definitive radiation therapy as a potential alternative treatment approach. **Radiotherapy and Oncology**, v. 154, p. 70-75, 2021.

HOSSEINZADEH, R.; KHORSANDI, K.; JAHANSHIRI, M. Combination photodynamic therapy of human breast cancer using salicylic acid and methylene blue. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 184, p. 198-203, 2017.

ICE, L. *et al.* Effect of increasing methylation on the ability of methylene blue to cause diaphorase-catalysed oxidation of NADH. **Biochemical Society Transactions**, v. 26, n. 4, p. 319-319, 1998.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Estimativa 2020: incidência de câncer no brasil. Rio de Janeiro: **Ministério da Saúde**, 2019.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 10993-5: Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity**. 3 ed. **ISO**, 42 p., 2009.

IONG, Z.M. *et al.* Anti-Aging Potentials of Methylene Blue for Human Skin Longevity. **Scientific Reports**. v. 7, n. 1, p. 1-12, 2017.

JERJES, W. *et al.* Photodynamic therapy and end-stage tongue base cancer: short communication. **Head & Neck Oncology**, v. 3, n. 1, p. 49-51, 2011.

JERJES, W.; HAMDOON, Z.; HOPPER, C. Photodynamic therapy in the management of potentially malignant and malignant oral disorders. **Head & Neck Oncology**, v. 4, n. 1, p. 01-07, 2012.

JERJES, W.; HAMDOON, Z.; HOPPER, C. Photodynamic therapy in the management of basal cell carcinoma: retrospective evaluation of outcome. **Photodiagnosis And Photodynamic Therapy**, v. 19, p. 22-27, 2017.

JHA, N. *et al.* Generation and Role of Reactive Oxygen and Nitrogen Species Induced by Plasma, Lasers, Chemical Agents, and other Systems in Dentistry. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v.1, n.1, p. 1-13. 2017

KHORSANDI, K.; HOSSEINZADEH, R.; CHAMANI, E. Molecular interaction and cellular studies on combination photodynamic therapy with rutoside for melanoma A375 cancer cells: an in vitro study. **Cancer Cell International**, v. 20, n. 1, p. 1-15, 2020.

KIRSZBERG, C., RUMJANEK, V.M., CAPELLA M.A.M. Methylene blue is more toxic to erythroleukemic cells than to normal peripheral blood mononuclear cells: a possible use in chemotherapy. **Cancer Chemotherapy And Pharmacology**, v. 56, n. 6, p. 659-665, 2005.

KOFLER, B. *et al.* Photodynamic Effect of Methylene Blue and Low-Level Laser Radiation in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Cell Lines. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 4, p. 01-17, 2018.

KWIATKOWSKI, S. *et al.* Photodynamic therapy – mechanisms, photosensitizers and combinations. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 106, p. 1098-1107, 2018.

LAMARQUE, G.C.C *et al.* Cytotoxic effect and apoptosis pathways activated by methylene blue-mediated photodynamic therapy in fibroblasts. **Photodiagnosis And Photodynamic Therapy**, v. 29, p. 01-06, jan.2020.

LIM, E.J. *et al.* Methylene blue-mediated photodynamic therapy enhances apoptosis in lung cancer. **Oncology Reports**. v. 30, p. 856-862, 2013.

LINK, E.M. *et al.* Early detection of melanoma metastases with radioiodinated methylene blue. **European Journal of Nuclear Medicine**, v. 25, n. 9, p1-8, 1998.

LIU, Y *et al.* Inhibitory effect of aloe emodin mediated photodynamic therapy on human oral mucosa carcinoma in vitro and in vivo. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 97, p.697-707, 2018.

LONGO, J. P. F. **Avaliação da aplicação da Terapia Fotodinâmica mediada pela Alumínio-Cloro-Ftalocianina em formulação lipossomal sobre o Câncer Bucal em modelos experimentais in vivo e in vitro.** 2008. 93 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Molecular), Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

LONGO, J. P. F.; LOZZI, S. P.; AZEVEDO, R. B. Câncer bucal e a terapia fotodinâmica como modalidade terapêutica. **Rev. Gaúcha Odontol.**, Porto Alegre, v. 59, p. 51-57, 2011.

MALOTH, K. N. *et al.* Photodynamic Therapy – A Non-invasive Treatment Modality for Precancerous Lesions. **Journal of Lasers In Medical Sciences**, v. 7, n. 1, p. 30-36, 2016.

- MUMIC, F. T. *et al.* Effect of irradiation with different laser wavelengths on oxidative stress of non-hepatectomized rats. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 31, n. 1, p. 40-44, 2016
- NUNEZ, S.C. **Estudo da dinâmica de fotodegradação e agregação das fenotiazinas azul de metileno e azul orto-toluidina com relação à eficiência fotodinâmica.** 2007. 146 f. Tese (Doutorado em Tecnologia Nuclear - Materiais) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2007
- NUNEZ, S.C., RIBEIRO, M.S., GARCEZ, A.S. PDT: Terapia fotodinâmica Antimicrobiana em Odontologia. Rio de Janeiro: Elsevier, 312 p. 2013
- OBSTOY, B. *et al.* Photodynamic therapy using methylene blue in lung adenocarcinoma xenograft and hamster cheek pouch induced squamous cell carcinoma. **Photodiagnosis And Photodynamic Therapy**, v. 15, p. 109-114, 2016.
- PENG, Q. *et al.* Biodistribution of a methylene blue derivative in tumor and normal tissues of rats. **Journal Of Photochemistry And Photobiology B: Biology**. v. 20, n. 1, p. 63-71, 1993.
- PETRELLIS, M.C. *et al.* Proinflammatory effects of photoactivated methylene blue on rat model of walker 256 carcinosarcoma. **Experimental Oncology**, v. 2, n. 41, p. 112-122, 2019.
- PINHEIRO, N.M., CARNEIRO, A.C.D.M., CREMA, V.O. Rho GTPases are Involved on Regulation of Cytodifferentiation of SCC-4 Oral Squamous Cell Carcinoma Cell Line: a preliminary study. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 21, n. 1, p. 3-6, 2020.
- PRAŠMO, E. *et al.* Photodynamic Therapy as a Promising Method Used in the Treatment of Oral Diseases. **Advances in Clinical and Experimental Medicine**, v. 25, n. 4, p. 799-807, 2016.
- PRIHANTONO, P. Adjuvants therapy in oral cancer. **International Journal of Surgery and Medicine**, p. 183-187, 2018.
- RAMAMURTHY, R. *et al.* A Prospective Study on Sentinel Lymph Node Biopsy in Early Oral Cancers Using Methylene Blue Dye Alone. **Indian Journal of Surgical Oncology**, v. 5, n. 3, p. 178-183, 2014.
- RHEINWALD, J.G., BECKETT, M.A. Tumorigenic Keratinocyte Lines Requiring Anchorage and Fibroblast Support Cultured from Human Squamous Cell Carcinoma. **Cancer Research**. v. 41, p. 1657-1663, 1981.
- RIAZ, A. *et al.* Methylene blue as an early diagnostic marker for oral precancer and cancer. **Springerplus**, v. 2, n. 1, p. 01-07, 2013.

- RICE, L. *et al.* Effect of increasing methylation on the ability of methylene blue to cause diaphorase-catalysed oxidation of NADH. **Biochemical Society Transactions**. n. 26. p. 1. 1998
- RICE, L., WAINWRIGHT, M., PHOENIX, D.A. Phenothiazine Photosensitizers. III. Activity of Methylene Blue Derivatives against Pigmented Melanoma Cell Lines. **Journal of Chemotherapy**, 12:1, 94-104. 2000.
- RIGUAL, N.R. *et al.* Photodynamic Therapy for Head and Neck Dysplasia and Cancer. **Arch Otolaryngol Head Neck Surgery**, v. 135, n. 8, p. 784-788, 2009.
- RIGUAL, N.R. *et al.* Adjuvant Intraoperative Photodynamic Therapy in Head and Neck Cancer. **Jama Otolaryngology–Head & Neck Surgery**, v. 139, n. 7, p. 706-711, 2013.
- RIGUAL, N.R. *et al.* Photodynamic Therapy with 3-(1'-Hexyloxyethyl) Pyropheophorbide a for Cancer of the Oral Cavity. **Clinical Cancer Research**, v. 19, n. 23, p. 6605-6613, 2013.
- RINDADE, G.S. *et al.* Methylene blue reverts multidrug resistance: sensitivity of multidrug resistant cells to this dye and its photodynamic action. **Cancer Letters**, v. 151, n. 2, p. 161-167, 2000.
- RODRÍGUEZ-CÓRDOVA, R.J. *et al.* Differential Response of BEAS-2B and H-441 Cells to Methylene Blue Photoactivation. **Anticancer Research**, v. 39, n. 7, p. 3739-3744, 2019.
- RUCK, A. *et al.* Nonlinear Dynamics of Intracellular Methylene Blue During Light Activation of Cell Cultures. **Photochemistry and Photobiology**, Hoboken, v. 6, n. 66, p. 837-841, 1997.
- SÁ JUNIOR, P.L. *et al.* The Roles of ROS in Cancer Heterogeneity and Therapy. **Oxidative Medicine And Cellular Longevity**, v. 2017, p. 1-12, 2017.
- SAINI, R. *et al.* Prospects in the Application of Photodynamic Therapy in Oral Cancer and Premalignant Lesions. **Cancers**, v. 8, n. 9, p. 83-97, 2016.
- SANTOS, A.F. *et al.* Methylene blue photodynamic therapy induces selective and massive cell death in human breast cancer cells. **BMC Cancer**, v. 17, n. 1, p. 1-15, 2017.
- SANTOS, G.M.P. *et al.* ROS-induced autophagy reduces B16F10 melanoma cell proliferative activity. **Lasers in Medical Science**, v. 33, n. 6, p. 1335-1340, 2018.
- SER, J. *et al.* Enhanced Efficacy of Photodynamic Therapy by Coupling a Cell-Penetrating Peptide with Methylene Blue. **International Journal Of Nanomedicine**, v. 15, p. 5803-5811, 2020.

SEVERINO, D. *et al.* Influence of Negatively Charged Interfaces on the Ground and Excited State Properties of Methylene Blue. **Photochemistry and Photobiology**, v. 5, n. 77, p. 459-468, 2003.

SHAH, J.P., GIL, Z. Current concepts in management of oral cancer – Surgery. **Oral Oncology**, v. 45, n. 4-5, p. 394-401, 2009.

SHARWANI, A. *et al.* Photodynamic therapy down-regulates the invasion promoting factors in human oral cancer. **Archives of Oral Biology**, v. 51, n. 12, p. 1104-1111, 2006.

SILVA, A.P. *et al.* Effects of methylene blue-mediated photodynamic therapy on a mouse model of squamous cell carcinoma and normal skin. **Photodiagnosis And Photodynamic Therapy**, v. 23, p. 154-164, 2018.

SILVA, J.L. *et al.* Effects of low level laser therapy in cancer cells—a systematic review of the literature. **Lasers in Medical Science**, v. 35, n. 3, p. 523-529, 2019

SUN, Y. *et al.* Recent progress of hypoxia-modulated multifunctional nanomedicines to enhance photodynamic therapy: opportunities, challenges, and future development. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 10, n. 8, p. 1382-1396, 2020.

TACAL, O. *et al.* Resistance of Human Butyrylcholinesterase to Methylene Blue-Catalyzed Photoinactivation; Mass Spectrometry Analysis of Oxidation Products. **Photochemistry and Photobiology**, v. 89, n. 2, p. 336-348, 2012.

TARDIVO, J.P. *et al.* Methylene blue in photodynamic therapy: from basic mechanisms to clinical applications. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 2, n. 3, p. 175-191, 2005.

WAINWRIGHT, M. *et al.* Increased cytotoxicity and phototoxicity in the methylene blue series via chromophore methylation. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 40, p. 233-239. 1997.

WAINWRIGHT, M., CROSSLEY, K.B. Methylene Blue – a Therapeutic Dye for All Seasons? **Journal of Chemotherapy**, v.14, n.5, p. 431-443. 2002.

WAINWRIGHT, M. The development of Phenothiazinium photosensitisers. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 2, n. 4, p. 263-272, 2005.

WONDRAK, G.T. NQO1-activated phenothiazinium redox cyclers for the targeted bioreductive induction of cancer cell apoptosis. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 43, n. 2, p. 178-190, 2007.

YANG, Y. *et al.* Mitochondria and Mitochondrial ROS in Cancer: Novel Targets for Anticancer Therapy. **Journal of Cellular Physiology**, v.9999, p.1-12, 2016

YANG, S. *et al.* Alternative mitochondrial electron transfer for the treatment of neurodegenerative diseases and cancers: methylene blue connects the dots. **Progress in Neurobiology**, v. 157, p. 273-291, 2017.