

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

SABRINA MIRANDA VIEIRA

AVALIAÇÃO DO EFEITO DA TERAPIA FOTODINÂMICA COM USO DE GEL DE
AZUL DE METILENO SOBRE LINHAGENS DE CÉLULAS DERIVADAS DE
CARCINOMA ESPINOCELULAR EM BOCA - ESTUDO *IN VITRO*.

PONTA GROSSA
2023

SABRINA MIRANDA VIEIRA

AVALIAÇÃO DO EFEITO DA TERAPIA FOTODINÂMICA COM USO DE GEL DE AZUL DE METILENO SOBRE LINHAGENS DE CÉLULAS DERIVADAS DE CARCINOMA ESPINOCELULAR EM BOCA - 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^ª. Dra. Kátia Sabrina Paludo.

PONTA GROSSA
2023

V658 Vieira, Sabrina Miranda
Avaliação do efeito da terapia fotodinâmica com uso de gel de azul de metileno sobre linhagens de células derivadas de carcinoma espinocelular em boca: estudo *in vitro* / Sabrina Miranda Vieira. Ponta Grossa, 2023.
71 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. Neoplasias bucais. 2. Azul de metileno. 3. Fotoquimioterapia. 4. Carcinoma espinocelular - boca. 5. Scq-4. I. Campagnoli, Eduardo Bauml. II. Paludo, Kátia Sabrina. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Atenção Interdisciplinar em Saúde. IV.T.

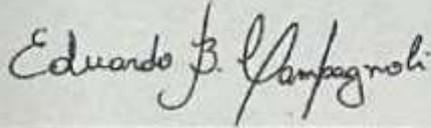
CDD: 616

SABRINA MIRANDA VIEIRA

AVALIAÇÃO DO EFEITO DA TERAPIA FOTODINÂMICA COM USO DE GEL DE AZUL DE METILENO SOBRE LINHAGENS DE CÉLULAS DERIVADAS DE CARCINOMA ESPINOCELULAR EM BOCA - 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 março de 2023.



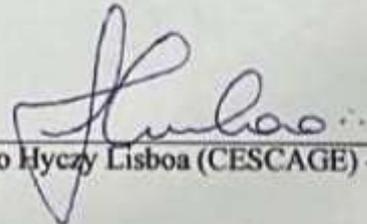
Prof. Dr. Eduardo Bauml Campagnoli (UEPG) - Presidente

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



Prof. Dra. Dionizia Xavier Scomparin (UEPG) - Titular

Prof. Dra. Dionizia Xavier Scomparin
Doutora em Ciências Biológicas
Universidade Estadual de Ponta Grossa



Prof. Dr. Alessandro Hyczy Lisboa (CESCAGE) - Titular

Alessandro Hyczy Lisboa
Doutor em odontologia
Universidade Estadual de Ponta Grossa



**A minha Cunhada Sabrina e
A minha “Filha” Ana Catarina.**

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 (não foi pouca) e dedicação durante esta jornada acadêmica, e à minha coorientadora profa. Dra. Kátia S. Paludo por compartilhar seu tempo e conhecimentos. Sem o apoio destes mestres jamais teria desenvolvido este projeto e por isso sou muito grata.

Agradeço também aos colegas de pesquisa Aline, Gabriel e Anderson que me auxiliaram durante a realização dos experimentos.

Agradeço à minha família, especialmente aos meus pais, Luciana e Jorge Damião, por terem me dado todo o apoio e suporte durante a realização da minha pesquisa.

À meus amigos, de forma especial, a minha amiga Caroline Domingues, que me ajudou, apoiou e deu todo o suporte que eu precisava para realizar minha pesquisa sem surtar; a meus amigos que fiz durante o intercâmbio: Robert por me dar todo suporte e apoio antes da qualificação; A minha amiga e de alguma forma mentora, Patrícia Vogtt, que todos os dias pegava no meu pé e me mandava estudar; A minha mãe da Inglaterra, Patrícia Bernardo, que me ajudou a não desistir de tudo quando quebrei o pé no meio do intercâmbio e sempre me lembrou que a vida é melhor quando olhamos tudo pelo lado positivo (mesmo que seja difícil encontrar esse lado); I also would like to thank all my friends from “Food For All” and “YHA” that supported me while I was volunteering and freaking out because of my research. I really appreciate all the concern about my masters degree.

Ao Juliano, meu namorado lindo pela paciência gigantesca, pelo apoio, compreensão (e bota compreensão nisso), mesmo nos momentos de surto quando as células contaminaram e eu achei que não finalizaria minha pesquisa. Faltam palavras para agradecer tudo que fez por mim durante a graduação e mestrado! Te Amo!

Um agradecimento especial à estrela mais brilhante lá no céu, minha cunhada Sabrina Arruda, que sempre acreditou em mim, até mesmo quando eu não acreditava. Sem ela essa pesquisa não seria possível.

RESUMO

A Terapia Fotodinâmica (PDT) pode ser uma alternativa para o tratamento das desordens orais potencialmente malignas ou nos casos de carcinoma espinocelular em estágios iniciais. Os fotossensibilizadores com menor custo poderiam ser desenvolvidos e testados; dentre eles, o Azul de Metileno. O objetivo da pesquisa foi avaliar in vitro a ação da Terapia Fotodinâmica utilizando o Azul de Metileno na forma de gel, em linhagem de célula derivada de carcinoma espinocelular de boca (SCC-4). O gel de Azul de Metileno foi desenvolvido em concentração preestabelecida e com pH 6. Após o preparo do gel base foram realizados testes de incorporação e citotoxicidade do gel com Azul de Metileno em concentrações que variam de 25µm a 400µm. A viabilidade celular foi determinada através de experimentos com dimetiltiazoldifeniltetrazolium (MTT), buscando verificar a eficácia do gel. Com base nos dados obtidos, conclui-se que a PDT com gel de AM induz uma diminuição na viabilidade celular de células SCC-4 passados 30 minutos de exposição, porém sem apresentar citotoxicidade.

Palavras-chave: Neoplasias bucais. Azul de metileno. Fotoquimioterapia. Carcinoma espinocelular de boca. SCC-4. 3T3.

ABSTRACT

Photodynamic Therapy (PDT) could be an alternative for the treatment of potentially malignant oral disease or for early-stage squamous cell carcinoma. Less costly photosensitizers could be developed and tested, including methylene blue. The aim of this research was to investigate in vitro the effect of photodynamic therapy using methylene blue as a gel in a cell line derived from oral squamous cell carcinoma (SCC-4). The methylene blue gel was developed at a predetermined concentration and pH of 6. After preparation of the base gel, incorporation and cytotoxicity tests of the gel were performed with methylene blue at concentrations ranging from 25 μ m to 400 μ m. Cell viability was determined by experiments with dimethylthiazoldiphenyltetrazolium (MTT) to verify the efficacy of the gel. Based on the data obtained, we conclude that PDT with AM gel causes a decrease in cell viability of SCC-4 cells after 30 minutes of exposure, but without cytotoxicity.

Keywords: Oral Cancer. Squamous Cell Carcinoma. Methylene Blue. Photochemotherapy. antineoplastic agent.

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

μg	Micrograma
μL	Microlitro
μM	Micromolar
%	Porcentagem
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
$^1\text{O}_2$	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^2	Centímetros quadrados
CO_2	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>
HPMC	Hidroxipropilmetilcelulose
HPV	<i>Human papilomavírus</i>
H	Horas
HSV	Herpes Simplex Virus
IFN- α	Interferon alfa
IFN- β	Interferon beta
IL-1 α	Interleucina 1 alfa
IL-1 β	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
ISSO	<i>International Organization for Standardization</i>
J	Joule
LDL	Lipoproteínas de baixa densidade
LED	Diodo Emissor de Luz
LIP	Luz intensa pulsada
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 α	Proteína inflamatória do Macrófago-1 alfa
MIP - β	Proteína inflamatória do Macrófago beta
MIP - 2	Proteína inflamatória do Macrófago 2
mM	Milimolar

mm ²	Milímetros quadrados
MTT	Brometo de 3(4,5 dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil-tetrazólio
mW	Miliwatts
NF-κB	<i>Factor Nuclear Kappa B</i>
Nm	Nanômetro
Pam 212	Linhagem celular derivada de queratinócito murino
PDT	Photodynamic Therapy
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
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
UI	Unidade Internacional

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DE LITERATURA	14
3 OBJETIVOS	30
3.1 OBJETIVO GERAL	30
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
4 METODOLOGIA	31
4.1 ETAPA A – PREPARO DAS FORMULAÇÕES	31
4.2 ETAPA B - CARACTERIZAÇÃO DOS GÉIS	34
4.3 ETAPA C – EXPERIMENTOS <i>IN VITRO</i>	36
4.3.1 Linhagens celulares	36
4.3.1.1 SCC-4 (Linhagem derivada de CEC)	37
4.3.1.2 3T3 (Fibroblastos)	37
4.3.2 Gel de azul de metileno	37
4.3.3 Cultura de células	38
4.3.4 Plaqueamento celular	39
4.4 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE	39
4.5 ENSAIO DE INCORPORAÇÃO DO AM	41
4.6 AVALIAÇÃO DA TFD COM AZUL DE METILENO EM CÉLULAS SCC-4 E 3T3	41
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	43
5 RESULTADOS	44
5.1 FORMULAÇÃO	44
5.2 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS	44
5.3 ENSAIOS DE INCORPORAÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE AM NAS LINHAGENS CELULARES DE SCC-4 E 3T3	45
5.4 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE AM NAS LINHAGENS CELULARES SCC-4 E 3T3	49
5.5 EFEITO DA PDT NAS LINHAGENS CELULARES SCC-4 E 3T3	52
6 DISCUSSÃO	56
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	59
REFERÊNCIAS	60

1 INTRODUÇÃO

O Instituto Nacional de Câncer (INCA) estima que para cada ano do triênio 2020/2022 sejam diagnosticados, no Brasil, 15.190 novos casos de câncer em boca e orofaringe, sendo 11.180 casos em homens e 4.010 em mulheres. A idade média da maioria dos diagnosticadas com câncer em boca e orofaringe é de 63 anos, podendo ocorrer em pessoas mais jovens. Aproximadamente um quarto dos casos ocorre em pessoas com menos de 55 anos (INCA, 2021).

O histórico de tabagismo e etilismo estão presentes na maioria dos pacientes diagnosticados, tornando-os importantes fatores associados ao desenvolvimento do carcinoma espinocelular em boca e orofaringe (HARRIS *et al.*, 2010).

Geralmente, o tratamento do câncer em boca e orofaringe envolve cirurgia oncológica, radioterapia e quimioterapia, sozinhos ou em associação. A maioria dos doentes são identificados em estágios tardios, o que leva ao comprometimento na sobrevida e aumento do sofrimento, pois a ressecção cirúrgica extensa pode levar à desfiguração física e função oral limitada, causando o insucesso do tratamento em muitos casos (HONORATO *et al.* 2009; ONYANGO *et al.*, 2006). Sendo assim, é de grande relevância buscar tratamentos mais conservadores que possibilitem controle da doença ou melhora da qualidade de vida dos indivíduos (SAJISEVI *et al.*, 2015).

Durante os últimos anos, a Terapia Fotodinâmica (PDT – *Photodynamic Therapy*) tem sido muito estudada como uma modalidade de tratamento para casos de lesões potencialmente malignas de câncer em boca (SILVA *et al.*, 2009).

A PDT é um tratamento minimamente invasivo, que envolve a ativação de um fármaco fotossensibilizador (FS) - capaz de focar a luz com precisão no local da lesão - e uma fonte de luz em comprimento de onda específico, os quais geram espécies reativas de oxigênio e radicais livres, que causam a destruição seletiva do tecido alvo (HAMDOON *at al.*, 2011). Parte importante deste processo é o controle local ativo de processos malignos ou infecciosos sem danos extensos às estruturas normais circundantes e também a possibilidade de ser usada em combinação com outras terapias (FERREIRA e CORREA 2006). Além disso, não devem ocorrer perturbações

nas migrações celulares, sem formação de ulceração ou fibrose (DILKES *et al.*, 1996; PRAȘMO *et al.*, 2017).

A PDT tem apresentado grandes vantagens por causar menos efeitos colaterais que outras terapias no pós-tratamento (HOPPER; NIZIOL; SHIDHU, 2004). E além de ser reprodutível e não resistente a medicamentos, diminui o risco de recorrências tumorais regionais por eliminar células residuais (TARDIVO *et al.*, 2005). Já a desvantagem da PDT é que ela só pode tratar áreas onde a luz pode alcançar. Ou seja, só pode ser usada para tratar câncer na pele ou logo abaixo da pele ou no revestimento de alguns órgãos (MedlinePlus, 2022).

A PDT utiliza fármacos fotossensibilizantes que são classificados de acordo com o período cronológico de desenvolvimento ou características químicas como porfirinas (ex.: ALA – Ácido Aminolevulínico), clorinas (ex.: temoprofina), ftalocianina (alumínio-sulfonada-ftalocianina). Em casos de carcinoma espinocelular em boca destacam-se ALA, Foscan® (m-Tetra(hydroxyphenyl)chlorin) e Photoprin® (LONGO; LOZZI; AZEVEDO, 2011).

O azul de metileno (AM) é um FS cujas propriedades fotodinâmicas são atingidas em um comprimento de onda de 630 nm e seu uso já foi investigado em outras neoplasias malignas, como câncer de mama e de pulmão (OBSTOY *et al.*, 2016). Além disso, o AM tem baixo custo em relação aos outros fotossensibilizantes, não possui efeitos colaterais, é pouco ativado pela luz ambiente e rapidamente eliminado do organismo (ANDREADIS *et al.*, 2016). Já sua eficácia como fotossensibilizante está ligada à rápida geração do oxigênio singleto (RODRIGUEZ-CÓRDOVA *et al.*, 2019).

Dentre as terapias antineoplásicas, a PDT com AM já foi usada em estudos ligados ao câncer de mama, pulmão, melanoma, de esôfago inoperável, carcinoma cervical, sarcoma de Kaposi e carcinoma de células basais (SCOTTINI, 2021). No Brasil o uso da terapia fotodinâmica é liberado apenas para pesquisas clínicas. Um fator limitante de seu uso clínico é a falta de estudos que comprovem sua eficácia (EDUARDO *et al.*, 2015).

Diante do que foi exposto, constata-se que há poucos estudos na literatura que levam à uma padronização de formulação tópica de AM. Esta pesquisa tem como objetivo desenvolver uma formulação de gel contendo azul de metileno e avaliar o efeito da PDT em linhagem celular derivada de carcinoma espinocelular (SCC4),

comparando os efeitos da solução e gel de AM em diferentes concentrações, bem como comparar com uma linhagem não neoplásica (fibroblastos).

2 REVISÃO DE LITERATURA

O câncer é um termo que abrange mais de 100 diferentes tipos de neoplasias malignas, tendo como características a alta velocidade de multiplicação das células, capacidade de invadir tecidos adjacentes e órgãos vizinhos, geração de metástase, insensibilidade a fatores de supressão de crescimento, resistência à apoptose, instabilidade genômica, capacidade angiogênica, promoção de inflamação e mecanismos de escape do sistema imunológico (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2019; SÁ JUNIOR *et al.*, 2017).

Para o Brasil, a estimativa para cada ano do triênio 2020-2022 aponta que ocorrerão 625 mil casos novos de câncer. Sendo 15.190 novos casos de câncer de boca e orofaringe (INCA, 2019). O cálculo global corrigido para o sub-registro aponta a ocorrência de 685 mil casos novos (MATHERS *et al.*, 2003).

O câncer é considerado um problema de saúde pública, tanto nos países desenvolvidos quanto nos países em desenvolvimento. Está entre as quatro principais causas de morte antes dos 70 anos de idade, sendo a segunda principal causa de morte no mundo, responsável por 9,6 milhões de mortes em 2018 (WHO, 2002; WHO, 2008; WHO, 2018).

O desenvolvimento de câncer bucal possui como fatores de risco o uso de tabaco e o consumo de álcool; e a exposição frequente ao sol (tumores malignos nos lábios). Além disso, a infecção por alguns subtipos de HPV (papilomavírus humano 16 e 18) também tem sido associada ao desenvolvimento de tumores malignos em boca, principalmente na orofaringe (AMENÁBAR *et al.*, 2019).

O carcinoma de células escamosas (CEC) é a neoplasia maligna mais comum da cavidade oral, correspondendo de 90% a 96% dos cânceres orais (DIB *et al.*, 1994), podendo acometer todas as regiões topográficas da boca, sendo o lábio inferior e a língua os locais de maior incidência, seguidos pelo assoalho bucal e osso alveolar inferior, suas formas mais comuns de apresentação clínica são as exofíticas e as infiltrativas (BERTÃO, 2003).

Várias razões contribuem para o diagnóstico tardio do carcinoma espinocelular, como: desconhecimento e falta de percepção dos sinais e sintomas pelo paciente (lesões iniciais oligossintomáticas); ignorância sobre os fatores de risco; ausência de exame clínico rotineiro da boca; e deficiência no acesso e qualidade da assistência médica e odontológica (SOARES *et al.*, 2014).

A escolha do tratamento está diretamente relacionada à complexidade do câncer e ao fato de que quanto mais tardio o diagnóstico e início do tratamento, maior a morbimortalidade do paciente, devido ao maior risco de metástase em linfonodos e à distância (SAINI *et al.*, 2016). Portanto, o diagnóstico precoce é o meio mais eficaz para melhorar o prognóstico do câncer e a sobrevida (INCA, 2019). Vale ressaltar também que quando o diagnóstico deste tipo de câncer é tardio, a escolha da terapêutica ideal torna-se desafiadora, pois à medida que aumenta o risco de vida, aumenta também o risco de sequelas, que podem interferir permanentemente na qualidade de vida do paciente (RIGUAL *et al.*, 2013).

O tratamento do carcinoma espinocelular em boca é estabelecido de acordo com a localização, o grau de malignidade, estadiamento clínico do tumor, tamanho (tumores pequenos são mais acessíveis para ressecção cirúrgica), proximidade com o osso (mandíbula ou maxila), envolvimento dos linfonodos cervicais, tratamento prévio, achados histopatológicos e condição de saúde bucal e geral do paciente. O tratamento pode envolver cirurgia, radioterapia e quimioterapia (DA SILVA *et al.*, 2011). Observa-se que em lesões neoplásicas iniciais ou intermediárias, geralmente, cirurgias com margens de segurança e/ou RT em neoplasias proporcionam um prognóstico favorável (CURI; DIB; KOWALSKI, 2000).

Em casos de lesões mais avançadas, o mais indicado é a associação de terapias. No câncer de boca, a cirurgia para remoção do tumor é o tratamento de escolha, associada ou não à radioterapia. A radioterapia pode ser também indicada no pré ou pós-operatório, pretendendo diminuir o volume do tumor ou amenizar os sintomas do paciente (ORD; KOLOKYTHAS; REYNOLDS, 2006). Particularidades do paciente também devem ser consideradas durante a decisão do tratamento: idade, aceitação, tolerância ao tratamento, condição de saúde geral, profissão, considerações socioeconômicas e estilo de vida (SHAH; GIL, 2009). 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).

Em casos de uso de próteses no pós-cirúrgico o paciente é afetado de forma física e emocional devido a ocorrência de algum grau de desfiguração facial, promovendo defeitos estéticos e funcionais. Mesmo que a cirurgia seja feita com ampla margem de segurança e o paciente seja curado, sua qualidade de vida será afetada negativamente de maneira permanente (HOSNI *et al.*, 2021).

A radioterapia tem como reações adversas: mucosite, candidose, hipossalivação, cárie de radiação, dificuldade de deglutir, perda do paladar, trismo muscular, alterações vasculares e osteorradionecrose, e outras complicações mais graves (SANNOMIYA; FURUKAWA, 2000). Algumas dessas manifestações podem levar à necessidade de um ajuste ou até interrupção da radioterapia ou quimioterapia, demonstrando que as complicações bucais devem ser prevenidas ou reduzidas ao mínimo (FERRAZ *et al.*, 2004).

Os tratamentos disponíveis são eficazes a longo prazo devido à alta taxa de retorno do tumor. Terapias para Carcinoma Espinocelular em boca (CEC) são invasivas e com alto custo, portanto, é fundamental o desenvolvimento de novas tecnologias que possibilitem uma terapia eficiente em causar dano/morte celular às células neoplásicas sem afetar as células não neoplásicas, diminuindo os efeitos colaterais e sequelas decorrentes dos tratamentos (GANGLOFF *et al.*, 2012). Alternativas vêm sendo estudadas visando um tratamento mais eficaz e acessível. A Terapia Fotodinâmica (PDT – do termo em inglês – *Photodynamic Therapy*) está ganhando destaque como uma dessas alternativas por ser minimamente invasiva, preservar a integridade funcional e anatômica, possuir poucos efeitos colaterais e seletividade para as células tumorais e ter baixa toxicidade, favorecendo a utilização de múltiplos ciclos de tratamento (FRANCO *et al.*, 2008; DOLMANS *et al.*, 2003; RODINI *et al.*, 2017).

A PDT consiste na administração sistêmica ou tópica de agentes fotossensibilizantes (FS) que após se localizarem nos tecidos neoplásicos são ativados pela luz (em comprimento de onda entre 400nm e 800nm) (FERNANDES, 2017), e na presença de oxigênio molecular levam à produção de oxigênio singleto (1O_2) e radicais livres (espécies reativas de oxigênio O_2 e $^{\bullet}OH$, denominadas EROS)

que são tóxicos, promovendo dano/morte celular (MARANHO, 2008). O fármaco fotossensibilizante ou a luz, isolados, não apresentam toxicidade para o organismo (MIRONOV *et al.*, 2003).

A PDT tem vantagem por apresentar poucos efeitos colaterais no pós-tratamento (LONGO, 2007). Também pode ser repetida diversas vezes na mesma área, podendo ser aplicada topicamente sem envolvimento sistêmico e sem acúmulo de toxicidade, além de poder ser associada com outros tratamentos sem o risco de desenvolvimento de clones resistentes e nem causar danos no DNA que possam levar ao desenvolvimento de outro tumor. Além disso, diminui o risco de recorrências tumorais regionais pois elimina células residuais (TARDIVO *et al.*, 2005).

Para uso clínico como terapia antineoplásica em pacientes com câncer de mama, pulmão, melanoma, de esôfago inoperável, carcinoma cervical, sarcoma de Kaposi e carcinoma de células basais a PDT 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). Dessa forma, pesquisas a respeito deste tema desenvolvidas no Brasil tornam de extrema importância para o avanço de técnicas utilizadas para o tratamento deste tipo de câncer.

As primeiras aplicações da PDT no tratamento de tumores em humanos foram realizadas por Tappenier e Jesionek, em 1903, empregando a eosina como fotossensibilizador no tratamento de câncer de pele. Embora os resultados tenham sido positivos, esse trabalho não teve continuidade (ROLIM *et al.*, 2012).

A PDT tem demonstrado eficácia em diversos tratamentos, em áreas oncológicas e não-oncológicas (degeneração macular relacionada à idade, aterosclerose, psoríase, ceratose actínica e algumas doenças infecciosas como onicomiose) (RODRIGUEZ-CÓRDOVA *et al.*, 2019; GONÇALVES, 2021).

A PDT com aplicação local de AM foi testada com sucesso em um estudo piloto em três pacientes com câncer de esôfago. O azul de metileno foi injetado diretamente em carcinomas inoperáveis e recorrentes sob orientação endoscópica, e a irradiação a laser foi realizada 1 hora depois. 72 horas após o procedimento foi comprovada necrose tumoral de 4mm a 5mm. Após dois tratamentos no período de 2 semanas não

houveram efeitos adversos e nenhuma evidência macroscópica de tumor. Dentro de 6 meses após a realização de PDT não houve crescimento do tumor (ORTH *et al.*, 1995).

A aplicação da PDT induz dano irreversível às macromoléculas celulares, morte das células tumorais por mecanismos de apoptose, necrose ou autofagia e, induz uma resposta inflamatória local aguda que participa da remoção de células mortas e restaura as células do tecido normal (STAJÉR *et al.*, 2018; FAN *et al.*, 2020; AGOSTINIS *et al.*, 2011).

A aplicabilidade da PDT pode ser afetada por alguns fatores, o principal deles é a profundidade da lesão, pois a luz dificilmente penetra no tecido devido às barreiras biológicas (PETRELLIS *et al.*, 2019).

Estudos demonstraram que a PDT direcionada contra tumores murinos resultou na geração de memória imune (KORBELIK; DOUGHERTY, 1999). Também foi demonstrado que a PDT antitumoral aumenta a imunidade antitumoral. A PDT em angiossarcoma multifocal da cabeça e pescoço resultou em aumento da infiltração de células imunes em tumores distantes não tratados, acompanhados por regressão do tumor (THONG *et al.*, 2007). No carcinoma basocelular (CBC) a PDT aumentou a reatividade das células imunes contra um antígeno associado (KABINGU *et al.*, 2009).

Há relatos na literatura de PDT em combinação com outras terapias (cirurgia, radioterapia, quimioterapia) para tratamento de carcinomas de cabeça e pescoço e basocelulares e cânceres de pele não melanoma. A PDT também tem sido associada a estudos de câncer de cólon, pulmão, bexiga, gástrico, esofágico e cervical (JERJES; HAMDOON; HOPPER, 2017; TARDIVO *et al.*, 2005).

Um estudo em Nova York (EUA) acompanhou pacientes entre os anos de 2006 e 2011 após terapia adjuvante a cirurgia com PDT intraoperatória com HPPH (2-[1-hexiloxietil]-2 devinil pirofeoforbida-a) em tumores localizados na cabeça e/ou pescoço, primário ou recorrente, e concluiu que a PDT com HPPH nesta situação é segura e relativamente bem tolerada, além de um tratamento mais eficaz da doença (RIGUAL *et al.*, 2013).

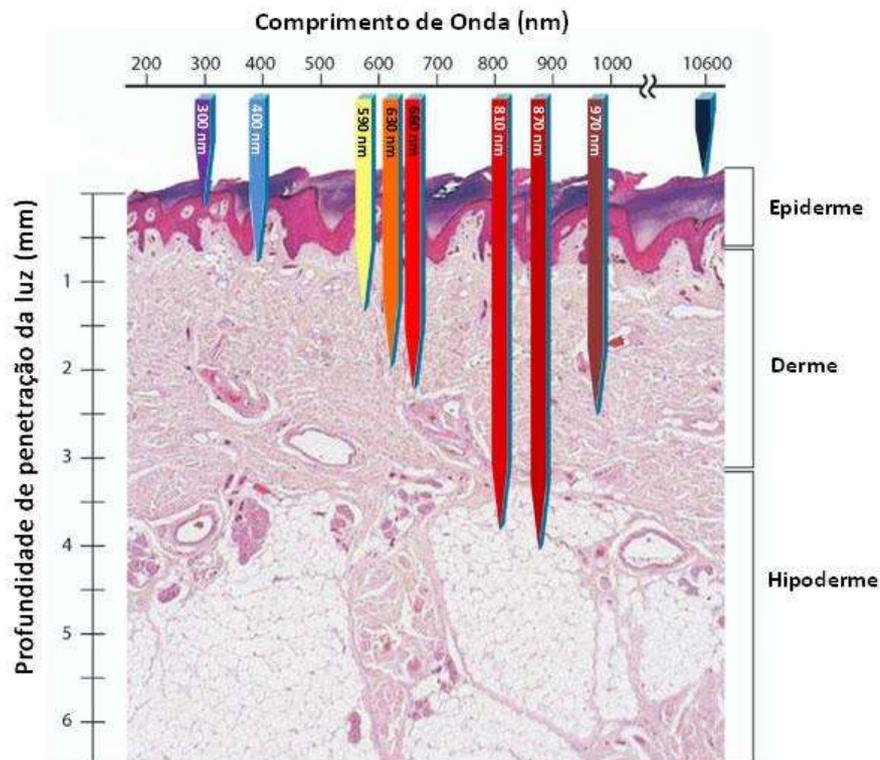
Diversas fontes de luz podem ser usadas na PDT tópica. A literatura descreve três classes principais de fontes de luz utilizadas: as lâmpadas de amplo espectro, as

lâmpadas de diodo e os lasers. As fontes de luz não coerentes descritas em estudos clínicos em PDT incluem as lâmpadas halógenas projetoras de diapositivos, as lâmpadas de diodo (LED) e a luz intensa pulsada (LIP).

O laser apresenta um comprimento de onda específico, correspondente ao pico de absorção do fotossensibilizante. Sua capacidade de emissão de luz monocromática de alta fluência, associada à precisão do foco, permite tratar pequenas lesões com mínimo dano ao tecido ao redor e em curto intervalo de tempo. Entretanto, para o tratamento de condições dermatológicas com PDT e sensibilizantes à base de protoporfirinas, os lasers não apresentam vantagem sobre os equipamentos mais baratos e práticos, como as fontes de luz não coerentes. Embora, tanto os lasers quanto os LEDs produzam luz monocromática, em termos de comprimento de onda, os LEDs e as lâmpadas halógenas não possuem a mesma especificidade dos lasers e podem ser utilizados com diferentes fotossensibilizantes e apresentam o mesmo potencial de inativação, além da vantagem de emitir grande campo de irradiação, possibilitando tratar maior área da superfície cutânea (WILSON; PATTERSON, 2008; CALZAVARA; VENTURINI, 2017; QIANG; ZHANG; HUANG, 2006).

A luz irradiada pode ser absorvida, transmitida ou espalhada, mas em geral, a luz não refletida penetra no tecido biológico e a maior parte da luz é absorvida devido aos fotossensibilizadores (Figura 1) (MANOTTI; ARANHA; EDUARDO, 2008).

Figura 1 - Profundidade de penetração da luz na pele humana em função do comprimento de onda.



Fonte: Barolet, 2008.

Os LEDs são uma alternativa econômica e com maior alcance de iluminação em relação aos lasers, além disso, a propagação da luz do LED é não colimada, incoerente e monocromática, conseguindo emitir um grande campo de irradiação e possibilitar o tratamento de uma área maior de superfície cutânea (RODINI, 2017).

Para que a PDT seja efetiva é imprescindível que a fonte de luz interaja com o FS. Assim, a escolha da fonte de luz depende do FS que será utilizado e vice-versa. Existem muitos agentes FS descritos na literatura para este fim, o mais estudado deles é o azul de metileno e a luz mais utilizada para interagir com este FS é a luz vermelha visível, que pode ser emitida pelo laser de baixa potência vermelho ou por LEDs vermelhos (EDUARDO *et al.*, 2015).

Fotossensibilizadores são moléculas capazes de interagir com a luz de modo a gerar espécies altamente reativas de oxigênio como o oxigênio singlete. Esta propriedade pode ser utilizada para o tratamento de câncer, remoção de contaminantes ambientais, inativação de agentes patogênicos no sangue e

hemoderivados, bem como na esterilização de alimentos (NARVAEZ; CORCUERA, 2016; SILVA, 2007).

Algumas propriedades dos FS são desejáveis para sua utilização clínica, como a sua pureza química, estabilidade biológica, síntese fácil, reprodutibilidade, baixo custo e estrutura bem definida. Além disso, deve possuir: capacidade de localização específica nos tecidos (maior absorção em células tumorais); pequeno intervalo entre a administração da droga e o acúmulo máximo no tecido; eficiência fotoquímica; meia-vida curta; eliminação rápida do tecido normal; elevada absorção na região da janela terapêutica (entre 600-800nm); mínimo efeito tóxico causado às células normais circunvizinhas; capacidade de produzir grande quantidade de produtos citotóxicos (FANG, 2018; ISSA; AZUALY, 2010).

Torezan (2002) esclarece que, até o momento, não são bem esclarecidos os mecanismos pelos quais ocorre retenção seletiva dos fotossensibilizantes nos tecidos malignos. Hipóteses incluem a permeabilidade alterada da membrana celular, o aumento da quantidade de vasos sanguíneos e de sua permeabilidade, o pH baixo no fluido intersticial, além da diminuição da drenagem linfática.

Obstoy *et al.* (2016) realizaram um estudo com aplicação de PDT em xenoinxertos de células cancerígenas brônquicas em camundongos e em carcinomas induzidos nas bolsas jugais (presentes nas bochechas) de hamsters. Nesse estudo utilizou injeção de azul de metileno 1% (v/p), laser 200J e difusor de 600mW por um período de 750 segundos nos camundongos, e nos hamsters utilizou difusor de 400mW por 500 segundos. Como resultado obteve uma diminuição do volume tumoral de 52% nos camundongos e de 85,8% nos hamsters.

Outro experimento utilizando PDT foi realizado em camundongos com xenoinxertos de células tumorais. O AM, nas concentrações de 1%, 0,1% e 0,01%, foi injetado diretamente nos tumores que em seguida foram irradiados com lasers de 100J ou 200J, de modo contínuo ou fracionado, ocorrendo dois esquemas de fracionamento (longo e curto), no fracionamento longo o tratamento teve um tempo total de 8,3 minutos (sendo interrompido duas vezes em intervalos de 2 minutos), já o fracionamento curto intercalou fases com e sem irradiação, com duração de 15 segundos. O AM na concentração de 1% e sem irradiação causou estagnação no volume do tumor após 3 semanas da aplicação; na concentração de 0,1% gerou

atraso no crescimento do tumor, que foi significativo depois da segunda aplicação na segunda semana de tratamento; por fim, a aplicação de AM na concentração de 0,01% inibiu apenas o crescimento das margens do tumor (ORTH *et al.*, 2000).

Em geral, nos estudos, o AM é injetado por via intravenosa e concentra-se nas células tumorais, gerando efeitos colaterais sistêmicos como metahemoglobinemia e variação na cor da urina, esses efeitos podem ser evitados se o FS for aplicado intralesionalmente ou localmente (ORTH *et al.*, 2000).

O mecanismo de ação da PDT deve-se à interação do FS com moléculas na sua vizinhança por transferência de elétrons ou hidrogênio, levando à produção de radicais livres (reação do tipo I) ou por transferência de energia ao oxigênio (reação do tipo II), levando à produção de oxigênio singleto. Estes fenômenos são provocados visando a morte celular e a destruição do tecido doente (PERUSSI, 2007).

Devido a presença de lipídeos insaturados na membrana celular, esta fica propensa a sofrer danos causados pelo oxigênio singleto. Os constituintes celulares formados por compostos orgânicos insaturados (grande maioria das estruturas), ficam sujeitos às injúrias causadas pelo oxigênio singleto (PERUSSI, 2007).

No estado tripleto excitado, o agente fotossensibilizante é passível de reagir com moléculas biológicas através de dois principais mecanismos que são dependentes de oxigênio, denominados de reação tipo I e reação tipo II (SEVERINO *et al.*, 2003).

A excitação do FS em células tumorais resulta na produção de EROS que é responsável por gerar danos irreparáveis às macromoléculas celulares, induzindo a morte de células tumorais por um mecanismo apoptótico, necrótico ou autofágico. O tipo de dano é dependente de qual reação ocorre em maior quantidade, por exemplo, quando ocorre principalmente a reação tipo II, relacionada a oxigênio singleto, a apoptose é mais presente, já a reação tipo I está mais relacionada à necrose. Um mesmo protocolo de PDT pode induzir necrose, apoptose e autofagia ao mesmo tempo, mas um mecanismo pode ser favorecido em detrimento de outro (SEVERINO *et al.*, 2003).

As espécies de reação em cascata geradas após a aplicação da PDT são fatores fundamentais na citotoxicidade induzida por esta terapia devido à sua alta capacidade de interagir com diferentes biomoléculas (lipídios, proteínas e ácidos

nucléicos), podendo induzir dano oxidativo na membrana celular e na parede celular, além de gerar oxidação dos constituintes celulares tais como o DNA, mitocôndrias, lisossomos e núcleos das células alvo (DOUGHERTY *et al.*, 1998).

O AM pode induzir a formação de EROs (mecanismo tipo I) ou oxigênio singlete (mecanismo tipo II), de modo que sua aplicação pode ser estendida a tumores com áreas de tecido hipóxico prejudicadas pelo mecanismo tipo II (RUCK *et al.*, 1997).

Hayes *et al.* (2020) sublinham que as espécies reativas a oxigênio influenciam a evolução do câncer de maneiras aparentemente contraditórias, iniciando e estimulando a tumorigênese e apoiando a transformação e a proliferação de células cancerígenas ou causando a morte celular. As EROs são as principais responsáveis por causar danos e morte de células tumorais malignas na PDT, 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 heterogeneidade do câncer aumentando a resistência do tumor (resposta adaptativa ao stress) (SÁ JUNIOR *et al.*, 2017). As EROs são reguladoras de diversas vias de transdução de sinais, podendo participar de diversas etapas da transformação e progressão tumoral, como a autossuficiência em sinais de crescimento, insensibilidade a sinais antiproliferativos, evasão da apoptose, potencial replicativo ilimitado, angiogênese sustentada, invasão e metástase, metabolismo e inflamação (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Entre os processos patológicos em que já foi descrita a participação do estresse oxidativo estão as doenças cardiovasculares, neurológicas, o diabetes e o câncer. Diversos tumores humanos, incluindo melanoma, leucemias, carcinomas gástrico, prostático, mamário e de cólon, apresentam níveis elevados de EROs (REUTER. *et al.*, 2010). Células tumorais estão comumente expostas a condições de estresse, como hipóxia, perda de adesão célula-célula e célula-matriz extracelular, desbalanço no metabolismo oxidativo e diversos fatores ambientais (DHILLON *et al.*, 2007).

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

Três mecanismos são responsáveis pela eficácia da ação antitumoral da PDT devido a sua geração das EROs: a) destruição direta da massa tumoral pela ação das espécies reativas de oxigênio; b) alteração da vascularização tumoral, gerando áreas de hipóxia e c) ativação do sistema imunológico pela necrose e/ou apoptose que atuaria em uma fase secundária na redução da massa tumoral (DOLMANS *et al.*, 2003; PAZOS; NADER, 2007).

a) Danos diretos nas células tumorais:

Induzido pela geração de $^1\text{O}_2$ (oxigênio singleto) e EROs, levando à morte celular por necrose ou apoptose. A permeabilidade mitocondrial é afetada pelo stress oxidativo, podendo levar à ruptura da membrana e liberação de fatores pró-apoptóticos (FREITAS *et al.*, 2017). A localização intracelular do FS leva à formação de agregados que podem induzir a produção de diferentes substâncias citotóxicas, ocasionando diferentes mecanismos de morte celular (SEVERINO *et al.*, 2003).

b) Danos à vascularização do tumor:

A PDT pode causar vasoconstrição, alteração na permeabilidade vascular, adesão leucocitária, trombose e hemorragia prejudicando a homeostase (PETRELLIS *et al.*, 2019). Restrição do suprimento de oxigênio e nutrientes (hipóxia), induzindo as reações inflamatórias locais agudas que participam da remoção de células mortas (STAJÉR *et al.*, 2020; FAN, 2020; AGOSTINIS, 2011).

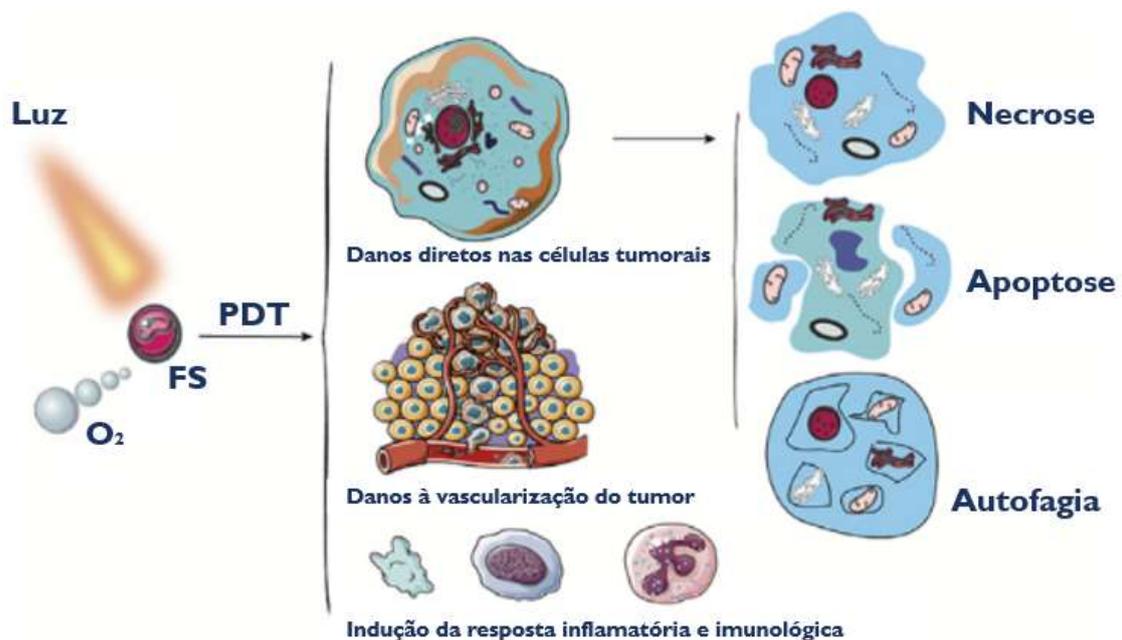
c) Efeitos no sistema imunológico:

O stress oxidativo ativa a liberação de vários marcadores inflamatórios como fatores de transcrição (NF- κ B e AP-1), interleucinas (IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, IL-10), TNF- α , quimiocinas (proteína inflamatória IP-10, quimiocinas derivadas de queratinócitos, proteínas inflamatórias de macrófagos MIP-1 α e MIP- β , MIP-2), interferons (IFN- α e IFN- β), COX 2, leucotrienos, tromboxano e prostaglandinas, que 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. Este stress oxidativo contribui no desenvolvimento da resposta imune antitumoral pois estimula o sistema imune a 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).

Apoptose, por autofagia ou por necrose, é a forma de morte celular que pode ser gerada pela PDT. A resposta tecidual é afetada pelo tipo de morte celular, que por serem diferentes entre si, influenciam nas respostas teciduais, conforme demonstrado na Figura 2:

Figura 2 – PDT e morte celular



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

O azul de metileno é um corante que pertence à classe dos corantes fenotiazínicos, suas propriedades fotodinâmicas são atingidas em um comprimento de onda de 630 nm e seu uso já foi investigado em outras neoplasias malignas, como câncer de mama e de pulmão (OBSTOY *et al.*, 2016). Este corante tem se destacado como um efetivo fotossensibilizante de grande potencial para a aplicação médica como agente terapêutico na PDT devido às suas características fotodinâmicas e fototóxicas e por demonstrar alta afinidade com a membrana mitocondrial celular, causando importantes alterações funcionais e levando ao quadro de falência mitocondrial que promove morte celular por apoptose (CHEN *et*

al., 2008; NOODT *et al.*, 1998; ORTH *et al.*, 2000). Além disso, o AM tem baixo custo em relação aos outros fotossensibilizantes, não possui efeitos colaterais, é pouco ativado pela luz ambiente e rapidamente eliminado do organismo (ANDREADIS *et al.*, 2016). Também reduz o efeito colateral de fotoqueimadura e permite uma distribuição mais eficiente do agente fotossensibilizante no tumor, permitindo que o procedimento possa ser repetido quantas vezes forem necessárias, já que não há efeitos tóxicos cumulativos (PERUSSI, 2007).

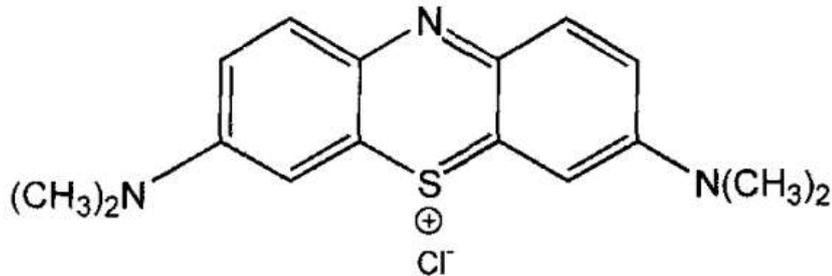
Já sua eficácia como fotossensibilizante é provada por apresentar excelentes propriedades fotoquímicas em função de possuir alto rendimento na geração de $^1\text{O}_2$ e EROs na presença de agentes redutores (CHEN *et al.*, 2008; GABRIELLI *et al.*, 2002; PELOI *et al.*, 2008; TARDIVO *et al.*, 2005).

Na odontologia, o AM já foi utilizado como tratamento de lesões pré-malignas de mucosa, como adjuvante na terapêutica periodontal e endodôntica, bem como na PDT 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; MAISCH, 2007).

Obstoy *et al.* (2016) utilizaram a PDT com AM em experimentos *in vivo* por meio do desenvolvimento de tumores cólicos em ratos e hamsters, como resultado obteve uma redução significativa do volume das lesões cancerígenas, apresentando morte celular por necrose. Embora existam estudos com PDT e AM são escassas as pesquisas que tratam especificamente de câncer de cabeça e pescoço (KOFLEER *et al.*, 2018).

Sobre a localização do AM na célula não há consenso na literatura. A dificuldade em estabelecer os padrões de acúmulo se deve às propriedades fotofísicas do AM que sofreriam interferências de diferentes microambientes dentro da célula. Alguns estudos como o de Nunez, Ribeiro e Garcez (2013) apontam que a molécula do AM (Figura 3) apresenta carga positiva e é atraída pelo potencial negativo das mitocôndrias. Já para Petrellis *et al.* (2019), a principal localização intracelular é nos lisossomos, pois sua natureza lipofílica demonstra alta afinidade por membranas celulares facilitando sua ancoragem e podendo induzir a apoptose.

Figura 3. Estrutura molecular do Azul de Metileno.



Fonte: Gabrielli et al., 2002.

Outro fator que afeta a eficiência fotodinâmica é o meio em que o fotossensibilizador é dissolvido. A dissolução de AM em meio aquoso favorece reações redox porque as próprias moléculas de H₂O podem participar ativamente na formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), e o meio solvente também pode afetar os níveis de agregação de corantes (NUNEZ, 2007; BACELLAR *et al.*, 2015).

As formulações géis são categorizadas de acordo com a origem do solvente utilizado, podendo ser oleogéis (géis lipofílicos) ou hidrogéis (géis hidrofílicos) (SALGADO, 2008). Em formulações odontológicas, os polímeros (géis hidrofílicos) são utilizados como adjuvantes farmacotécnicos, normalmente com funções de contribuir na manipulação do produto, aumentar a retenção do fármaco na boca e, por consequência, aumentar seu tempo de ação. Além disso, podem ser usados numa formulação para proporcionar estabilidade físico-química e microbiológica, assim como assegurar maior conforto e aceitação do produto pelo paciente (VILLANOVA *et al.*, 2010). Mucoadesividade e bioadesividade são características comuns aos polímeros utilizados na odontologia, os quais em formulações semi-sólidas proporcionam maior dispersão, umedecimento e retenção na cavidade bucal (COOK; KHUTORYANAKIY, 2015). Acredita-se que isto ocorre pela transferência de moléculas de água da saliva para o polímero, assim como pela interação deste com as glicoproteínas salivares (FINI; BERGAMANTE; CESCHEL, 2011; BAGAN *et al.*, 2012).

A Hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) apresenta rápida interação com a mucosa bucal pois é um polímero sintético e hidrofílico que interage com a mucina (proteína

salivar) por ligações de hidrogênio, além disso, é considerado um polímero gelificante e celulósico, que garante viscosidade ao produto final (FINI *et al.*, 2011). Em formulações de uso odontológico é preparada pela dispersão do polímero em meio aquoso, o qual servirá de base para a consistência e aparência de gel. Ademais, o HPMC é um polímero com capacidade de controlar a liberação de fármacos de uma formulação (VILLANOVA *et al.*, 2010; ALLEN; POPOVICH; ANSEL, 2005).

Assim como o HPMC, o propilenoglicol é um polímero hidrofílico sintético não-iônico, amplamente utilizado em formulações odontológicas semi-sólidas e sólidas. Ele é empregado como solubilizante e fornece estabilidade ao produto (VILLANOVA *et al.*, 2010). O propilenoglicol possui higroscopicidade, que proporciona retenção e absorção de umidade, tornando-o um excipiente lubrificante e hidratante, principalmente em preparações semi-sólidas como géis, cremes e pomadas (SEVERINO *et al.*, 2011). Já o polietilenoglicol é um líquido viscoso miscível em água e álcool, é um solvente que tem várias aplicações e frequentemente substitui a glicerina nas modernas fórmulas farmacêuticas (SOUZA, 2016).

Os géis aquosos têm vantagens como: rápida interação com a mucosa bucal, alta retenção do fármaco na boca, prolongado tempo de ação, controle da liberação de fármacos de uma formulação e facilidade de eliminação na lavagem. No entanto, apresentam tendência a desidratar, perdendo sua textura original. Para evitar que isso ocorra é adicionada à formulação alguma substância higroscópica como a glicerina ou o propilenoglicol (SALGADO, 2008).

Segundo Chorilli *et al.* (2007), existem vários fatores que interferem na penetração transdérmica, como concentração do fármaco, área de aplicação, afinidade do fármaco com a pele, hidratação da pele, local de aplicação, persistência do fármaco na pele, tempo e intensidade da massagem. Portanto, em condições normais, a penetração de substâncias na pele e mucosas é muito difícil, o que depende não apenas das propriedades físico-químicas do fármaco, mas também de seu comportamento quando colocado em um carreador farmacêuticamente aceitável.

São várias as causas que afetam a estabilidade da formulação, incluindo condições externas às quais o produto está exposto, como: tempo, temperatura, luz, oxigênio, umidade, embalagem, microrganismos e vibração; interações com as propriedades da formulação e seus ingredientes relacionados com funções

intrínsecas. Eles criam principalmente incompatibilidades físicas e químicas, que podem levar a alterações nas propriedades organolépticas das formulações, separação de fases e redução do teor de princípios ativos (DE-PAOLA, 2001).

Costa *et al.* (2017) desenvolveram uma formulação simples na forma gel de carbopol 940®, para aumentar o tempo de contato do FS com o ponto de aplicação, buscando aumentar a eficácia da terapia fotodinâmica tópica. Como resultado obtiveram géis que se apresentaram estáveis com a presença do ativo, sugerindo que a formulação propicia um ambiente físico-químico adequado para a amplificação do efeito fotodinâmico. Os testes de detecção de EROs sugerem certo grau de interação entre o AM e a malha polimérica, diminuindo a sua dimerização (processos responsáveis por reduzir a eficiência do AM) que gera um aumento da produção de EROs (NUÑEZ *et al.*, 2015). A redução da eficiência de produção de EROs nas formulações foi observada mais extensivamente nas amostras incorporadas de ureia, o que sugere alguma interferência desta espécie no mecanismo de formação das espécies reativas.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito *in vitro* da Terapia Fotodinâmica com o uso do fotossensibilizador Azul de Metileno na forma de gel em linhagem de células derivadas de carcinoma espinocelular de boca (SCC-4).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Desenvolver formulação base de gel de hidroximetilpropilcelulose (HPMC) para uso tópico de azul de metileno nas concentrações de 25 $\mu\text{M}/\text{mL}$; 50 $\mu\text{M}/\text{mL}$, 100 $\mu\text{M}/\text{mL}$, 200 $\mu\text{M}/\text{mL}$ e 400 $\mu\text{M}/\text{mL}$;
2. Avaliar o pH, as características reológicas da formulação em diferentes períodos (0, 10 e 20 dias);
3. Analisar o grau de incorporação do Azul de Metileno pelas células neoplásicas (SCC-4), quando utilizado na forma de gel;
4. Comparar as ações citotóxicas (morte celular) e da Terapia Fotodinâmica com Azul de Metileno em diferentes formulações de gel, sobre as linhagens de células derivadas de carcinoma espinocelular de boca (SCC-4).

4 METODOLOGIA

Este estudo é de natureza experimental e foi realizado entre 2020-2022, no Laboratório de Laboratório de Biologia Celular e Protozoologia - DEBIOGEN e nos Laboratórios de Cosmetologia, Farmacotécnica e Controle de Qualidade Farmacêutica da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG). O estudo foi realizado em etapas, como segue o fluxograma (Figura 4).

Figura 4. Fluxograma com o delineamento da parte laboratorial da pesquisa.



Fonte: Própria autora, 2022.

4.1 ETAPA A – PREPARO DAS FORMULAÇÕES

O preparo das formulações ocorreu no Laboratório de Cosmetologia da UEPG, onde foram manipuladas as formulações dos géis desenvolvidos com base a metodologia descrita por Melo, Domingues e Lima (2018). Realizou-se, primeiramente, um estudo de pré-formulação dos géis, baseando-se nas

incompatibilidades do azul de metileno e viscosidade do gel (baixa viscosidade necessária para ensaios em placa de 96 poços).

O gel foi formulado com os seguintes componentes, buscando suas respectivas funções: HPMC (viscosidade), PEG 4000 (mucoadesividade, hidratação e estabilidade), propilenoglicol (solubilização), e água purificada (solvente). Como indicadas no Quadro 2.

Quadro 2: componentes do gel base de hidroxietilcelulose.

<u>Componente</u>	<u>%</u>	<u>Finalidade</u>
HPMC	1	Espessante
PEG 4000	1	Mucoadesividade, hidratação e estabilidade
Propilenoglicol	3	Solubilização
Água destilada	Qsp 100 mL	Solvente

b Obs.: qsp: quantidade suficiente para.

Este gel apresenta característica transparente, incolor, com pH entre 5 e 6 (MELO; DOMINGUES; LIMA. 2018).

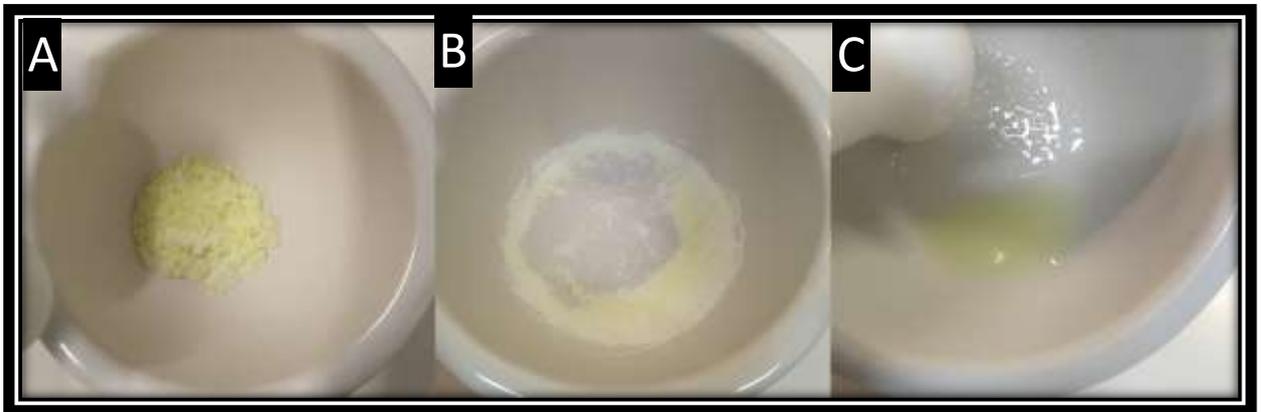
As formulações foram manipuladas de acordo com as práticas corretas de fabricação e controle preconizadas pela Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) 67/2007 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA (ANVISA, 2016). Para o preparo das formulações, primeiramente foram separados os componentes utilizados e foram calculadas e pesadas as quantidades necessárias de cada componente em uma balança semi-analítica.

Na manipulação, em um béquer aqueceu-se a água purificada numa temperatura de 70°C e nela foi solubilizado o HPMC. O béquer com a solução foi agitado lentamente até a sua consistência ficar igual a um gel fluido. Este béquer foi reservado e iniciou-se a etapa da trituração dos sólidos. Em um gral de porcelana foi inserido o PEG 4000, que foi triturado com um pistilo, sendo pré dissolvidos em propilenoglicol. Após este processo, a solução foi repassada ao béquer (com a solução de água e HPMC) e foi misturada.

Durante a preparação e análise foi evitado a exposição das amostras à luz ambiente para todas as formulações contendo fotossensibilizadores. Todas as amostras foram preparadas e testadas no 1°, 10° e 20° dias.

A incorporação do azul de metileno no gel foi realizada somente nos dias dos ensaios para obter o fotossensibilizante nas concentrações de 25 $\mu\text{M}/\text{ml}$; 50 $\mu\text{M}/\text{ml}$; 100 $\mu\text{M}/\text{ml}$; 200 $\mu\text{M}/\text{ml}$; 400 $\mu\text{M}/\text{ml}$, com pH final de 6,0.

Figura 5- A) Sólidos presentes no gel (PEG 4000), ainda não triturados. B) Manipulação e trituração dos sólidos da formulação em gral e pistilo. C) Pré-dissolução dos componentes sólidos triturados com propilenoglicol em um gral.



Fonte: Própria autora.

O AM ($\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{SCl}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$, Nuclear), com peso molecular de 373,92, foi avaliado em concentrações que variaram de 25 μM a 400 μM .

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 água destilada. A homogeneização do tubo era realizada em aparelho vórtex por 30 segundos e em seguida realizava-se a incorporação da solução mãe de azul de metileno no gel de tratamento através de diluição seriada.

Figura 6: Gel incorporado com diferentes concentrações de azul de metileno.



Fonte: Própria autora.

4.2 ETAPA B - CARACTERIZAÇÃO DOS GÉIS

Com as formulações finalizadas, realizou-se a caracterização dos géis. Foram analisados como parâmetros físico-químicos os valores de pH, densidade dos géis e estabilidade da incorporação de azul de metileno no gel.

No Laboratório de Controle de qualidade da UEPG foram realizados os testes para determinar os valores de pH. Foram realizados dois métodos diferentes para determinar o pH (Figura 7). O primeiro método consistiu na medição dos valores de pH através de um pHmetro digital de bancada PHS-3E calibrado. Para calibração do aparelho, utilizou-se as soluções padrão de pH 6,86 e pH 4,00, conferindo sensibilidade ao equipamento. Após calibração, foram inseridos os eletrodos dos aparelhos lentamente na solução (evitando bolhas de ar) até o valor indicado se estabilizar. Para limpar o eletrodo utilizou-se água destilada e papel absorvente. E o segundo método utilizaram-se fitas indicadoras de pH Macherey-Nagel. Cada fita foi submergida por um minuto na solução e depois compararam-se as cores das fitas de pH com uma escala de cores (presente na embalagem das fitas) e seus valores correspondentes. Os dois métodos foram aplicados com as soluções em temperatura de $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. As medições de pH foram realizadas em três tempos diferentes: no dia em que os géis foram preparados, logo após os preparos, 10^o dia, 20^o dia.

Nos dias de experimentação em células o pH do gel foi conferido apenas através da utilização das fitas indicadoras de pH.

Figura 7: Métodos de medição de pH utilizados no gel de azul de metileno.



Nota- A) Tira indicadora de pH (Macherey-Nagel); B) peagômetro digital de bancada (PHS- 3E).

Fonte: Própria autora.

No Laboratório de Controle de Qualidade Farmacêutica da UEPG a densidade relativa dos produtos foi determinada para caracterização dos produtos, pelo método da Picnometria (Figura X). O teste foi realizado no 1º, 10º e 20º dias após a preparação das formulações. Para determinar a massa do picnômetro utilizou-se uma balança analítica X. O picnômetro vazio foi pesado e depois colocou-se água destilada no seu interior até seu total preenchimento. Pesou-se o picnômetro novamente para determinar a massa da água destilada. Para pesar os géis, inseriu-se o Gel base com uma pipeta Pasteur até completar o picnômetro e o pesou, após limpeza do picnômetro, identificando a massa do gel base (sem incorporação de azul de metileno). Para cada produto utilizado (água destilada e Gel base) foi obtido a massa pela equação:

$$\text{Massa do produto (g)} = \text{Massa do picnômetro com o produto (g)} - \text{Massa do picnômetro vazio (g)}$$

A água destilada e os dois géis estavam na temperatura de 25°C e todos os valores foram anotados para o cálculo final das densidades, a qual utiliza a seguinte equação:

$$\text{Densidade do gel (g/mL)} = \text{Massa do gel (g)} / \text{Massa da água destilada (mL)}$$

Figura 8 – Picnometria dos géis.



Fonte: Própria autora.

Nota - A) Pesagem realizada numa balança analítica referente ao picnômetro vazio. B) Pesagem realizada numa balança analítica referente ao picnômetro contendo água destilada em seu interior. C) Pesagem realizada numa balança analítica referente ao picnômetro contendo o gel 2 em seu interior.

4.3 ETAPA C – EXPERIMENTOS *IN VITRO*

4.3.1 Linhagens celulares

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

A linhagem celular 3T3 (ATCC: CRL- 1658), derivada de fibroblastos murinos, foi adquirida do Banco de Células do Rio de Janeiro BCRJ – Rio de Janeiro, RJ, Brasil- código 0017).

4.3.1.1 SCC-4 (Linhagem derivada de CEC)

Conforme as orientações do fornecedor, as células foram mantidas em garrafas plásticas próprias para cultivo celular (25 e 75 cm²) em meio de cultura DMEM/F12 (Hyclone, GE Healthcare ou Vitrocell) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 400 mg/mL de hidrocortisona, 100 UI/mL de penicilina e 100 mg/mL de estreptomicina (Hyclone, GE Healthcare). As garrafas foram armazenadas em incubadora de CO₂ para cultivo celular e mantidas a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO₂ e 95% de umidade.

4.3.1.2 3T3 (Fibroblastos)

A linhagem 3T3 foi mantida intacta em frascos plásticos (25 e 75 cm²) adequados para meio de cultura celular, 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 também foram armazenadas em incubadora de CO₂ para cultivo celular e mantidas a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO₂ e 95% de umidade.

4.3.2 Gel de azul de metileno

O Azul de Metileno (C₁₆H₁₈N₃SCI*3H₂O, Nuclear), com peso molecular de 373,92, foi utilizado em concentrações que variaram de 25 µM a 400 µM.

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 água destilada. A homogeneização do tubo era realizada em aparelho vórtex por 30 segundos e em seguida realizava-se o preparo das soluções de tratamento com diferentes concentrações.

Após obter a solução estoque, foi realizado a incorporação do azul de metileno no gel de tratamento, individualmente em tubos transparentes de 15 mL. Em cada frasco foi acrescentado 01 mL de gel de tratamento base (independente do

experimento) e o volume da solução-estoque correspondente a concentração que estava sendo preparada. O volume da solução-estoque correspondente a cada concentração a ser preparada foi acrescentada e a quantidade suficiente de gel para completar o volume de 1 mL como demonstrado na tabela 1.

Quadro 1 - Concentrações dos géis de tratamento e volumes correspondentes da solução-estoque.

Solução de tratamento (μM)	Volume da solução estoque (μL)	GEL q.s.p
25	0,93	1 mL
50	1,87	1 mL
100	3,75	1 mL
200	7,5	1 mL
400	15	1 mL

Fonte: A autora

As soluções de tratamento utilizada para o controle foram o meio de cultura DMEM//F12 e o gel.

Os ensaios de citotoxicidade, de incorporação e PDT foram realizados em triplicata e repetidos pelo menos em 3 ocasiões diferentes.

4.3.3 Cultura de células

Para iniciar os experimentos, foram utilizadas garrafas com cultura celular apresentando confluência de aproximadamente 70%. Para tanto, o meio de cultura foi removido, as células lavadas com 10ml de solução salina tamponada com fosfato pH 7,4 (PBS) e então incubadas a 37°C com 0,5 ml ou 2 ml de tripsina a 2% para frascos de 25 cm² ou 75 cm², respectivamente. Após um período de 15 minutos, as células perdem a adesão ao frasco e ficam suspensas no meio de cultura (). A ação da tripsina é interrompida pela adição de 5ml (garrafas de 25 cm²) ou 10ml (garrafas de 75 cm²) de meio de cultura DMEM com 10% de SFB. Em seguida, a suspensão de células foi

transferida para Tubo Falcon de 15 ml estéreis e centrifugadas a 3000 rpm por 3 minutos. O sobrenadante era removido e descartado, já o “pellet” de células era ressuspendido em 5 ml de meio de cultura DMEM/F-12 com 10% de SFB. Então, as células foram contadas em câmara hemocitométrica de Neubauer e na sequencia foram divididas em duas frações: primeira fração foi utilizada para o plaqueamento (densidade 10×10^3 células por poço na placa de 96 poços); segunda fração foi incubada em novos frascos de 25 cm² ou 75 cm² (1×10^3 células em 5 ml de meio para frascos de 25 cm² e 1×10^5 células em 10 ml de meio para frascos de 75 cm²). O meio de cultura foi trocado a cada 48 horas.

4.3.4 Plaqueamento celular

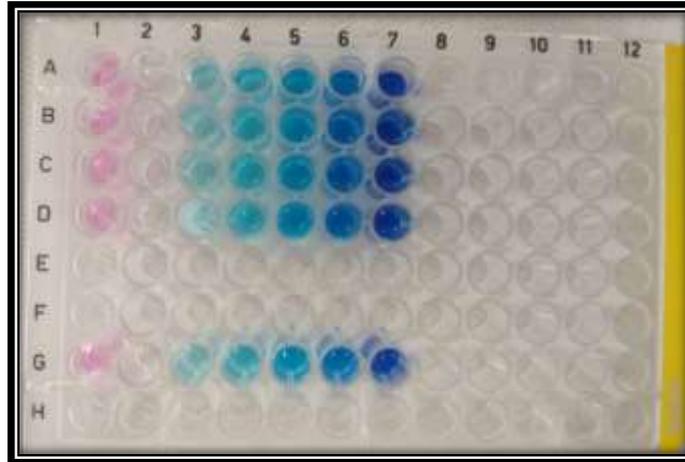
Através de visualização em microscópio óptico invertido, determinou-se que a densidade 10×10^3 células por poço (placa de 96 poços) apresentou a melhor confluência celular para se realizar as demais etapas do experimento.

4.4 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE

A primeira etapa da pesquisa observou o efeito de citotoxicidade do gel incorporado com AM nas células SCC-4 e 3T3 nas seguintes concentrações: 0 µM, (controle - Gel), 0 µM (controle – Meio), 25 µM, 50 µM, 100 µM, 200 µM, 400 µM (Figura 9).

Após 24 h do plaqueamento das células (SCC-4 ou 3T3) em placas de 96 poços, removeu-se o sobrenadante, acrescentou-se 100 µL do gel de tratamento correspondente e em seguida a placa foi armazenada em incubadora a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO₂ e 95% de umidade por 30 minutos. O tempo de incubação foi definido após pesquisa com solução de azul de metileno (SCOTTINI, 2021). 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 dimetiliazol-2il)-2,5-difenil-tetrazólio).

Figura 9 – Incubação do Azul de Metileno em diferentes concentrações em linhagem SCC-4



Fonte: A autora

A redução do MTT baseia-se na capacidade que a enzima succinato desidrogenase (presentes nas mitocôndrias de células viáveis) têm de converter o sal de tetrazolium (dimetiliazol difenil tetrazolium, ou MTT), que é hidrossolúvel e de cor amarelada, em cristais de formazan, que são de cor púrpura. Esta capacidade que somente células vivas possuem, indica atividade mitocondrial e consequente viabilidade celular. 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, 2017).

Para realizar o ensaio foi acrescentado 100 μ L da solução de MTT (0,5 μ g/mL diluído em DMEM quando se utilizava SCC-4 ou RPMI quando se usava a linhagem 3T3) em cada poço e a placa armazenada em estufa (a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO₂ e 95% de umidade) por 60 minutos. Em seguida, removeu-se o sobrenadante e foi acrescentado 100 μ L de solução de 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 com o objetivo de quantificar o formazan formado a partir do cálculo a seguir:

$$\text{Viabilidade celular} = (\text{Absorbância} \times 100) / \text{Média das absorbâncias do controle.}$$

4.5 ENSAIO DE INCORPORAÇÃO DO AM

Conforme descrito por Santos (2017) foi realizado o ensaio de incorporação de Azul de metileno com o objetivo de quantificar o azul de metileno incorporado pelas linhagens celulares testadas.

Após plaqueamento de células SCC-4 e incubação com várias concentrações de AM por 30 min e lavagem conforme descrito no ensaio de citotoxicidade, 100 µL de uma solução contendo SDS (50 mM) foram adicionados para promover a lise da membrana celular e liberação de azul, que foi absorvida pelas linhagens celulares testadas. Logo em seguida foi realizada a leitura da placa em espectrofotômetro em comprimento de onda de 660 nm.

Os cálculos são feitos após plotar o gráfico com a linha de tendência e equação da reta.

Equação de uma reta:

$$Y = mX + b$$

*Y - incorporação
m - inclinação da reta
b - interseção em y
X - absorbância*

4.6 AVALIAÇÃO DA TFD COM AZUL DE METILENO EM CÉLULAS SCC-4 E 3T3

As células foram plaqueadas (concentração de 1×10^3 em 1 ml de DMEM/F-12 com 10% de SFB em cada poço de placas de cultura de 96 poços. Então o meio de cultura foi removido e os poços distribuídos em quatro grandes grupos experimentais:

- **Grupo 1 (Controle - sem tratamento com laser e fotossensibilizador):** 3 poços de cultura, contendo, cada poço, 100 µL da suspensão de células a ser testada e 100 µL de meio DMEM/F12. Nesse grupo não foi aplicado qualquer tratamento, sendo manipulado e avaliado no mesmo momento dos outros grupos

experimentais.

- **Grupo 2 (Controle – com gel base e laser):** 3 poços de cultura, contendo, cada poço, 100 μ L da suspensão de células a serem testadas e 100 μ L do gel base de tratamento, irradiados com laser na dosimetria de 50 mW por 120 segundos (6J), em aplicação única.
- **Grupo 3 (gel de azul de metileno):** 3 poços de cultura contendo, cada poço, 100 μ L da suspensão de células a serem testadas, 100 μ L de gel de tratamento com diferentes concentrações testadas (25, 50, 100, 200, 400 μ M) e incubado por 30 minutos.
- **Grupo 4 (gel de azul de metileno e laser):** 3 poços de cultura contendo, cada poço, 100 μ L da suspensão de células a ser testada, 100 μ L de gel de tratamento de Azul de Metileno nas concentrações testadas, incubado por 30 minutos. Em seguida foi realizada irradiação com laser na dosimetria 50 mW por 120 segundos (6J), em aplicação única. Após a irradiação do laser o gel foi descartado e procedeu-se a lavagem das células em 150 μ L de meio.

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 cm², 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/cm² (SCOTTINI, 2021). 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). Todos os experimentos foram realizados em três momentos diferentes, com a finalidade de obter-se no final 9 leituras de cada grupo e concentração testada.

Após o tratamento realizado, nos diferentes grupos, o gel foi removido e os poços foram lavados por 03 vezes com meio DMEM. Na sequência para avaliação do efeito da terapia fotodinâmica foi acrescentado 100 μ L da solução de MTT. A placa foi armazenada por 60 min em estufa para cultivo celular até que a metabolização do MTT pudesse ser observada. Em seguida, removeu-se o sobrenadante e foi acrescentado 100 μ L de solução de DMSO (dimetil sulfoxido) para eluição dos cristais de formazan.

Figura 10 - Aparelho de laser



Fonte: A autora

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram tabulados no programa Microsoft Excel Versão 2016 e submetidos à análise estatística no programa Jamovi. 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% ($p < 0,05$). Para testes com nível de significância $p < 0,001$ em relação ao controle foram aplicados os testes não paramétricos de Teste Kruskal-Wallis e DSCF Pairwise comparisons, utilizado na comparação de três ou mais amostras independentes.

5 RESULTADOS

5.1 FORMULAÇÃO

Com os estudos de pré-formulação foi desenvolvido um gel com viscosidade baixa, adequado para o uso em placa de 96 poços. A incorporação do princípio ativo era realizado apenas nos momentos de experimentação sem interferir na estabilidade do gel base, com o objetivo de manter a integridade do Azul de Metileno.

Para proporcionar a viscosidade e aspecto de gel, utilizou-se o HPMC. Ele também fará a liberação controlada dos fármacos. Assim como o HPMC, foram utilizados mais dois polímeros: o PEG 4000 e o propilenoglicol. O PEG 4000 foi incluso para proporcionar mucoadesividade, bem como estabilizar o produto. O propilenoglicol foi utilizado para facilitar a solubilização do Azul de Metileno (AM) junto ao gel. Como veículo e solvente foi utilizada a água purificada.

5.2 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS

Para a caracterização físico-química do gel fluido, o pH foi analisado usando dois métodos diferentes: medidor de pH digital de bancada e fitas indicadoras de pH. Foi obtido o pH 6 pelos dois métodos, não apresentando variação significativa entre os períodos estabelecidos (inicial, 10^o dia e 20^o dia).

Quadro 02: Resultados da análise pH inicial, 10^o dia e 20^o dia.

<u>Aferição do pH</u>	<u>pHmetro de bancada</u>	<u>Fita indicadora de pH</u>
<u>Inicial</u>	6	6
<u>10 dias depois</u>	6	6
<u>20 dias depois</u>	6	6

Fonte: A autora A densidade dos géis foi determinada por Picnometria. No primeiro dia utilizou-se um picnômetro vazio de massa 16,831g, no qual apresentou massa correspondente a 42,250g quando cheio de água destilada, obtendo a massa da água

destilada de 25,419g. Com o uso das equações, verificou-se que o Gel pesava 25,888g (picnômetro com Gel = 42,718g). Desta forma, a densidade do gel é de 1,018g/mL. Foi possível observar uma queda na densidade após 20 dias, conforme demonstrado na Tabela 02.

Quadro 02: Resultados da análise de viscosidade por Picnometria do gel base de HPMC.

Dia	Massa do picnômetro (g)	Massa da água (g)	Massa do gel (g)	Densidade (g/mL)
Início	16,83	25,419	25,888	1,018
10°	16,700	25,517	25,828	1,012
20°	16,731	25,295	25,541	1,009

Fonte: A autora, 2022.

5.3 ENSAIOS DE INCORPORAÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE AM NAS LINHAGENS CELULARES DE SCC-4 E 3T3

Na linhagem SCC-4 a média de incorporação da concentração do AM foi de 6,16 μM (24,64%) para a concentração de 25 μM . Para a concentração de 50 μM , a média foi de 10,60 μM representando 21,20% do corante incorporado pelas células (Gráfico 1). A linhagem 3T3 incorporou mais de 100% do corante na concentração de 25 μM e aproximadamente 60% do corante foi absorvido na concentração de 50 μM . Em todas as concentrações a linhagem não neoplásica apresentou maior capacidade de incorporação comparado a linhagem neoplásica. Para as concentrações de 25 μM , 50 μM e 100 μM a linhagem não neoplásica apresentou mais do que o dobro da capacidade de incorporação que a linhagem neoplásica.

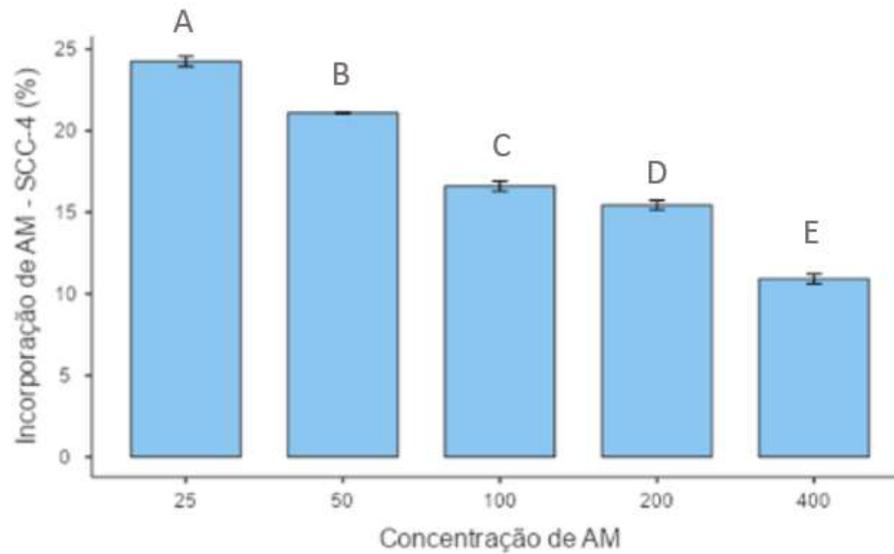
Quadro 3: Média da incorporação de azul de metileno em diferentes concentrações pelas células SCC-4

Concentração (µM)	SCC -4		3T3	
	Concentração incorporada	Porcentagem de incorporação	Concentração incorporada	Porcentagem de incorporação
25	6,16	24,64	26,10	104,4
50	10,60	21,20	29,5	59,00
100	17,10	17,10	44,50	44,50
200	31,90	15,95	45,00	22,50
400	46,20	11,55	83,00	20,75

Fonte: A autora

Para todas as concentrações a capacidade de incorporação do azul de metileno pelas células foi inferior a 30%, para concentração de 400 µM a incorporação foi inferior a 12%. As concentrações superiores a 100 µM apresentaram potencial de incorporação inferior a 20%. Houve diferença estatística entre todas as concentrações em estudo.

Gráfico 1: Porcentagem de incorporação de azul de metileno em diferentes concentrações pelas células SCC-4.

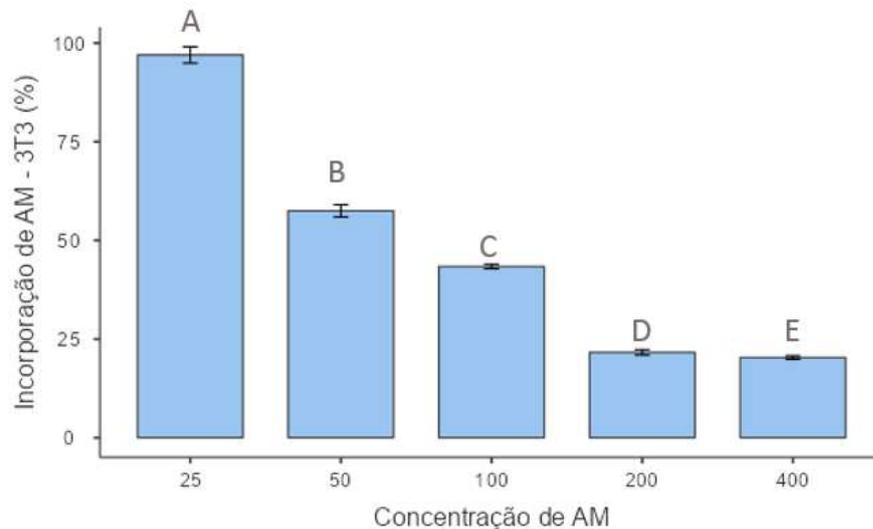


Nota: Os dados foram analisados pela análise de variância de uma via (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey quando p foi significativo. Dados expressos em média da porcentagem de incorporação celular (n=4). Diferentes letras representam diferença estatística entre todas as concentrações $p < 0,05$ (Teste Kruskal-Wallis e DSCF Pairwise comparisons $p < 0.001$).

Fonte: A autora, 2022.

As células da linhagem 3T3 demonstraram maior capacidade de incorporar o AM em comparação com as células da linhagem SCC-4 em todas as concentrações. As células não neoplásicas apresentaram alta capacidade de incorporação do AM, na concentração de 25 μM (104%), não apresentando capacidade de incorporação inferior a 20% em nenhuma das concentrações. Houve diferença estatística entre todas as concentrações em estudo (Tabela 2).

Gráfico 2: Porcentagem de incorporação de azul de metileno em diferentes concentrações pelas células 3T3.



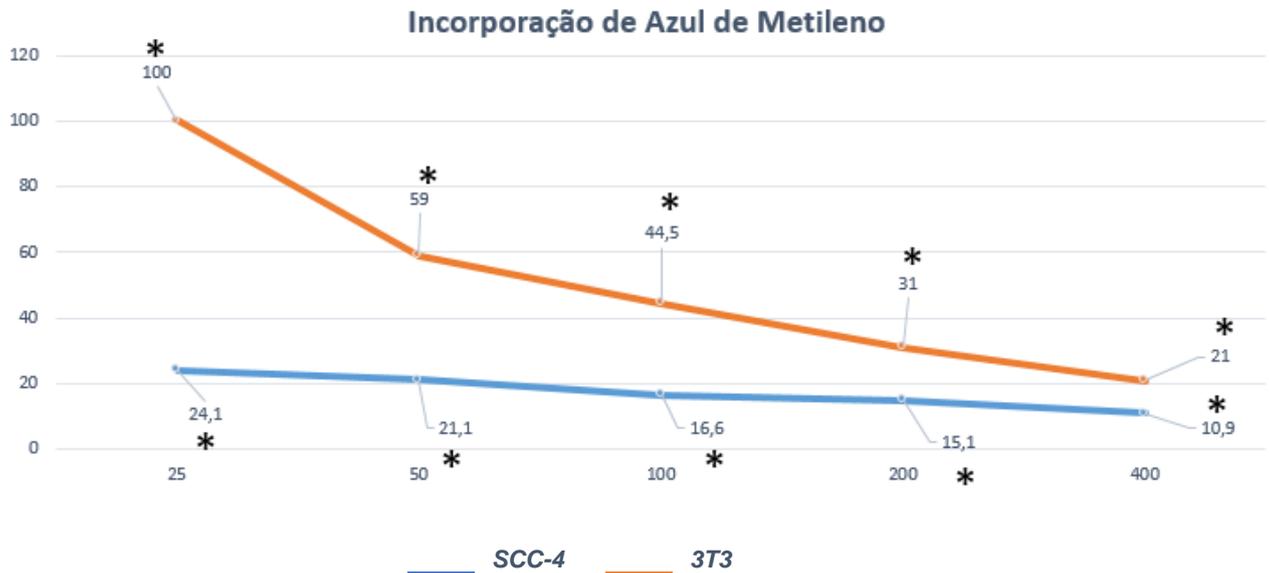
Nota: Os dados foram analisados pela análise de variância de uma via (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey quando p foi significativo. Dados expressos em média da porcentagem de incorporação celular (n=4). Diferentes letras representam diferença estatística entre todas as concentrações $p < 0,05$ (Teste Kruskal-Wallis e DSCF Pairwise comparisons $p < 0.001$).

Fonte: A autora, 2022.

Na avaliação do grau de incorporação do AM, foi observada maior quantidade de corante incorporado pela linhagem não neoplásica do que pela linhagem neoplásica, nas diferentes concentrações testadas foi possível observar que a linhagem neoplásica possui menos da metade da capacidade de incorporação que a linhagem não neoplásica. Na concentração de 25 μM o valor de AM incorporado pela linhagem SCC-4 foi menor que 10% e 3T3 incorporou 100% na mesma concentração.

As células não neoplásicas apresentaram alta capacidade de incorporação do AM, na concentração de 25 μM (104%), enquanto a linhagem SCC-4 teve 24,64% do corante foi incorporado e na mesma concentração. Na linhagem não neoplásica as concentrações superiores a 100 μM apresentaram potencial de incorporação inferior a 20%, já na linhagem não neoplásica nenhuma concentração apresentou incorporação inferior a 20% (Gráfico 3).

Gráfico 3 – Diferenças no grau de incorporação do AM pela linhagem 3T3 e SCC-4 após exposição 30 minutos (concentrações de 25 µM até 400 µM)



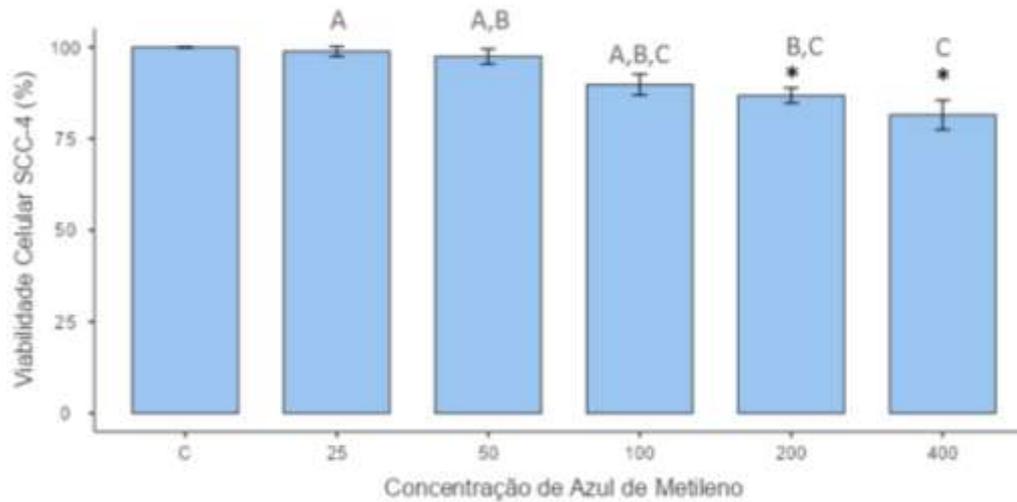
Nota: Dados expressos em média da porcentagem de viabilidade celular (n=4). *representando diferença estatística entre todas as concentrações $p < 0,05$ (Teste Kruskal-Wallis e DSCF Pairwise comparisons $p < 0,001$).

Fonte: A autora, 2022.

5.4 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE AM NAS LINHAGENS CELULARES SCC-4 E 3T3

O AM afetou a viabilidade celular das células SCC-4 a partir da concentração de 50 µM ($p < 0,05$). Ocorreu diferença estatística nas concentrações de 25 e 50 em relação a concentração de 400 µM. Na concentração de 400 apresentou elevada diminuição da viabilidade celular, ou seja, citotoxicidade que segundo a normativa ISO é a redução da viabilidade celular abaixo de 70%. Apenas as concentrações de 200 µM e 400 µM apresentaram diferença estatística em relação ao controle. As concentrações de 25 µM, 50 µM e 100 µM foram as que menos afetaram a viabilidade celular (Gráfico 4).

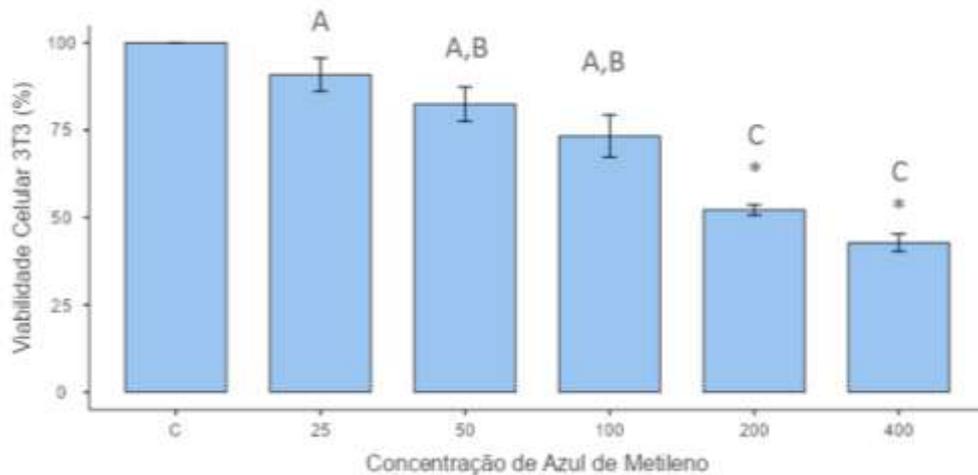
Gráfico 4 – Avaliação da viabilidade celular da linhagem SCC-4 após 30 minutos de incubação com AM (concentrações de 25 μ M até 400 μ M)



Nota: Os dados foram analisados pela análise de variância de uma via (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey quando F foi significativo. Dados expressos em média da porcentagem de viabilidade celular (n=4). *quando $p < 0,05$ em comparação ao grupo controle (Teste Kruskal-Wallis e DSCF Pairwise comparisons). a. representa os grupos que não tiveram diferença estatística e os grupos que tiveram diferença estatística entre si estão representados por b e c.

O AM afetou a viabilidade celular das células 3T3 a partir da concentração de 25 μ M ($p < 0,05$), sem apresentar diferença estatística apenas entre as concentrações de 25 e 50 μ M, apresentando redução drástica da viabilidade celular a partir da concentração de 100 μ M (59,20%). Apenas as concentrações de 25 μ M e 50 μ M não afetou significativamente a viabilidade celular (Gráfico 5).

Gráfico 5 – Avaliação da viabilidade celular da linhagem 3T3 após 30 minutos de incubação com AM (concentrações de 25 μ M até 400 μ M)

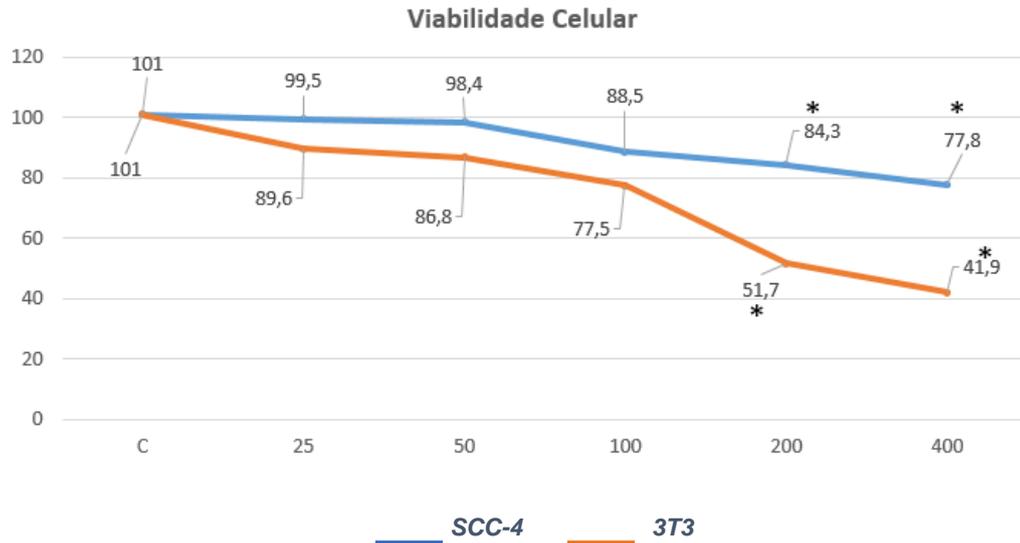


Nota: Os dados foram analisados pela análise de variância de uma via (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey quando F foi significativo. Dados expressos em média da porcentagem de viabilidade celular (n=4). *quando $p < 0,05$ em comparação ao grupo controle (Teste Kruskal-Wallis e DSCF Pairwise comparisons). a. representa as concentrações sem diferença estatística e as letras b e c representam grupos que apresentam diferença estatística entre si.

Fonte: A autora, 2022.

A diminuição da viabilidade celular foi semelhante nas concentrações de 25 e 50 μ M das duas linhagens. A partir de 100 μ M a linhagem 3T3 (77,50%) apresentou maior sensibilidade à ação do azul de metileno que a linhagem SCC-4 ($p < 0,05$). Nas concentrações a partir de 200 μ M foi observado acentuada diminuição na viabilidade celular nas células não neoplásicas, já para as células neoplásicas o AM diminuiu significativamente a viabilidade somente na concentração de 200 μ M. O AM começou a interferir na viabilidade de 3T3 na concentração de 25 μ M, para a linhagem neoplásica a diminuição da viabilidade passa a ser visível apenas na concentração de 100 μ M. Foi observado diferença estatística entre os grupos nas concentrações de 200 μ M (SCC-4 84% - 3T3 52%) e 400 μ M (SCC-4 78% - 3T3 42%). Não foi observado viabilidade a baixo de 70% para as células neoplásicas, já a linhagem não neoplásica apresentou viabilidade abaixo de 50% (Gráfico 6).

Gráfico 6 – Diferenças na viabilidade celular da linhagem 3T3 e SCC-4 após exposição ao AM por 30 minutos (concentrações de 25 μ M até 400 μ M)



Nota: Os dados foram analisados pela análise de variância de uma via (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey quando F foi significativo. Dados expressos em média da porcentagem de viabilidade celular (n=4). *quando $p < 0,05$ diferença estatística entre os grupos (Teste Kruskal-Wallis e DSCF Pairwise comparisons).

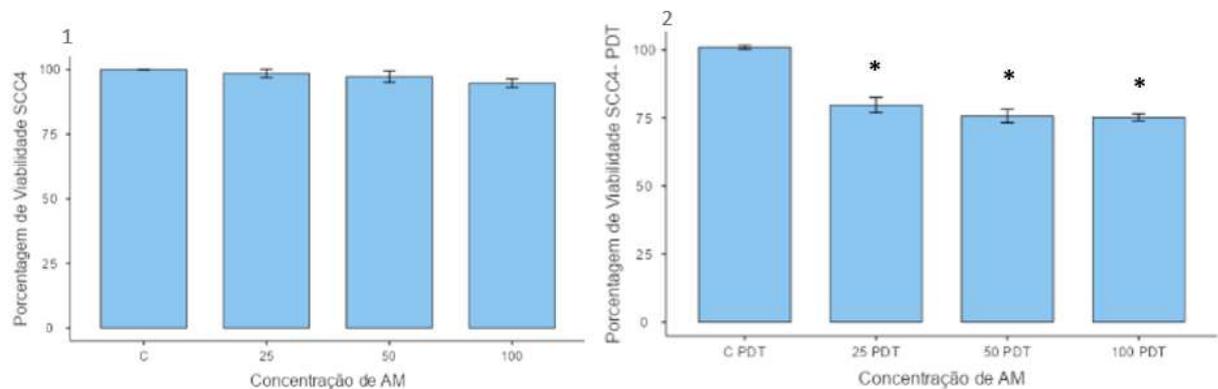
Fonte: A autora, 2022.

5.5 EFEITO DA PDT NAS LINHAGENS CELULARES SCC-4 E 3T3

O efeito da PDT na linhagem SCC-4 foi avaliado nos grupos controles e nas concentrações de 25 μ M, 50 μ M e 100 μ M em dois grupos distintos: no grupo 1, a viabilidade celular foi avaliada sem a utilização da PDT, após 30 minutos de incubação com AM e no grupo 2, após a incubação de AM por 30 minutos a PDT foi aplicada sobre as células.

No grupo sem aplicação da Terapia Fotodinâmica (grupo 1) não foi observado diferença significativa na viabilidade celular entre as concentrações em estudo, não apresentando viabilidade abaixo de 95% em nenhuma das concentrações. A viabilidade celular foi alterada no grupo de Terapia Fotodinâmica (grupo 2), nas concentrações de 50 μ M (75,8%) e 100 μ M (75,3%) apresentou viabilidade abaixo de 80%, sem apresentar citotoxicidade (viabilidade abaixo de 70%). Observou-se diferença estatística entre o controle e todas as concentrações em estudo (gráfico 7).

Gráfico 7 – Avaliação da viabilidade celular da linhagem SCC-4 após 30 minutos de incubação com AM sem e com a aplicação da PDT (concentrações de 25 μ M até 100 μ M).



1- Avaliação da viabilidade celular da linhagem SCC-4 após 30 minutos de incubação com AM.

2- Avaliação da viabilidade celular da linhagem SCC-4 após 30 minutos de incubação com AM e aplicação da Terapia Fotodinâmica.

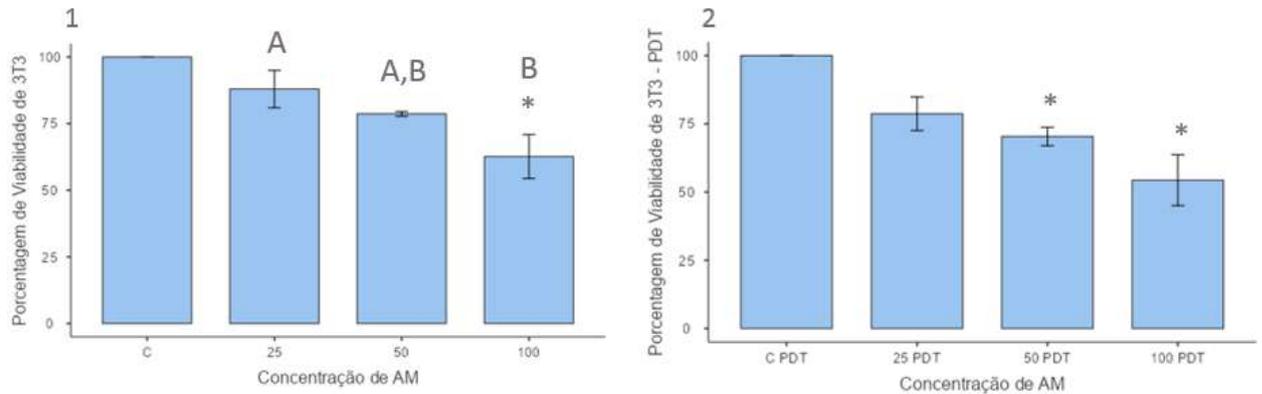
Nota: Os dados foram analisados pela análise de variância de uma via (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey quando p foi significativo. Dados expressos em média da porcentagem de viabilidade celular (n=4). *quando $p < 0,05$ em comparação ao grupo controle (Teste Kruskal-Wallis e DSCF Pairwise comparisons).

Fonte: A autora, 2022.

A viabilidade celular da linhagem 3T3 foi avaliada nos grupos controles, nas concentrações de 25 μ M, 50 μ M e 100 μ M em dois grupos distintos: no grupo 1, a viabilidade celular foi avaliada sem a utilização da PDT, após 30 minutos de incubação com AM e no grupo 2, após a incubação de AM por 30 minutos a PDT foi aplicada sobre as células.

No grupo 1, todas as concentrações alteraram a viabilidade celular, no entanto, apenas a concentração de 100 μ M apresentou citotoxicidade e diferença estatística em relação ao controle e em relação a concentração de 25 μ M. Com a PDT, no entanto, as concentrações de 50 μ M e 100 μ M apresentaram diferença estatística em relação ao controle ($p < 0,05$). Neste grupo (2) os tratamentos de PDT 50 μ M e PDT 100 μ M apresentaram diminuição considerável da viabilidade celular (Gráfico 8).

Gráfico 8 – Avaliação da viabilidade celular da linhagem 3T3 após 30 minutos de incubação com AM sem e com a aplicação da PDT (concentrações de 25 μ M até 100 μ M).



- 1- Avaliação da viabilidade celular da linhagem 3T3 após 30 minutos de incubação com AM.
- 2- Avaliação da viabilidade celular da linhagem 3T3 após 30 minutos de incubação com AM e aplicação da Terapia Fotodinâmica.

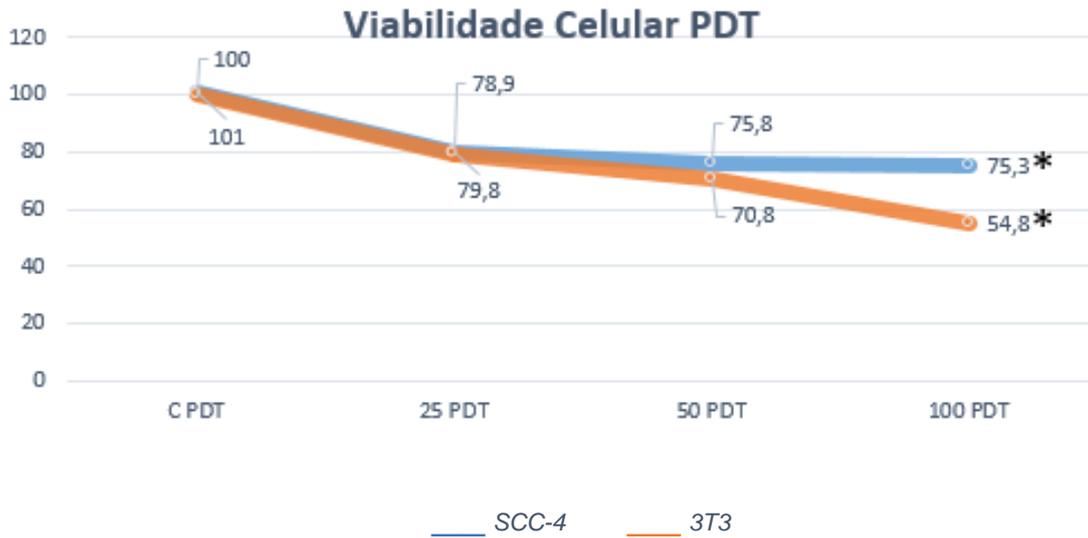
Nota: Os dados foram analisados pela análise de variância de uma via (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey quando F foi significativo. Dados expressos em média da porcentagem de viabilidade celular (n=4). *quando $p < 0,05$ em comparação ao grupo controle (Teste Kruskal-Wallis e DSCF Pairwise comparisons).

Fonte: A autora, 2022.

O efeito da PDT nas linhagens de SCC-4 e 3T3 foram avaliados nas concentrações de 25 μ M, 50 μ M e 100 μ M após 30 minutos de incubação com AM.

Nas três concentrações testadas para SCC-4 houve alteração significativa na viabilidade em relação ao controle, no entanto, sem apresentar citotoxicidade (viabilidade abaixo de 70%). Para 3T3 as concentrações de 50 e 100 μ M apresentaram diferença estatística em relação ao controle e citotoxicidade. Após a concentração de 50 μ M foi observado a diferença estatística entre os grupos, culminando em uma evidente queda de viabilidade na linhagem não neoplásica (gráfico 9).

Gráfico 9 – Avaliação da viabilidade celular da linhagem SCC-4 após 30 minutos de incubação com AM e aplicação da PDT nas linhagens celulares SCC-4 e 3T3 (concentrações de 25 µM até 100 µM).



Nota: Os dados foram analisados pela análise de variância de uma via (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey quando F foi significativo. Dados expressos em média da porcentagem de viabilidade celular (n=4). *quando $p < 0,05$ em comparação ao grupo controle (Teste Kruskal-Wallis e DSCF Pairwise comparisons).

Fonte: A autora, 2022.

6 DISCUSSÃO

Recentemente, muitas tentativas de melhorar os efeitos terapêuticos da PDT foram relatadas. LIM *et al* (2013) obtiveram como resultado de sua pesquisa um aumento da apoptose induzida por PDT em associação com a regulação negativa de proteínas antiapoptóticas e uso de solução de AM.

No tratamento das lesões cutâneas, quanto mais superficial a lesão, melhores os resultados obtidos, devido administração tópica da solução de fotossensibilizador ser facilitada pela proximidade/acessibilidade do local de ação (WAINWRIGHT *et al.* 1997; RICE; WAINWRIGHT; PHOENIX, 2000; CERIZE, 2012). De maneira análoga, o presente estudo trata do desenvolvimento de um gel de AM, o qual torna-se candidato a ser utilizado no tratamento de lesões de fácil acesso, ou seja, sua aplicação não requer métodos invasivos.

Estudos mostraram que o AM é um fotossensibilizador seguro e que apresenta poucos efeitos colaterais, principalmente em seu uso tópico (LINK *et al.* 1998; RINDADE *et al.* 2000), e não mostram relatos de toxicidade local na maioria dos tecidos (WAINWRIGHT e CROSSLEY 2002). No presente estudo foi possível observar que na presença de gel de AM houve uma maior alteração na viabilidade celular das células da linhagem não neoplásicas em relação às células neoplásicas. Nos experimentos com AM e PDT a concentração de 100 μ M apresentou citotoxicidade para a linhagem celular não neoplásica, indicando que não há segurança para aplicação tópica do gel em tecidos saudáveis.

Nas formulações odontológicas, os géis hidrofílicos geralmente contribuem na manipulação do produto, aumentando a retenção do fármaco na boca e seu tempo de ação. Também proporcionam estabilidade físico-química e microbiológica às formulações, o que garante maior adesão do produto pelo paciente (VILLANOVA *et al.*, 2010). Para o presente estudo a utilização de gel com características tradicionais para uso oral (maior densidade) mostrou-se inviável pois em conjunto com os materiais usados apresentava dificuldades de manuseio. A necessidade de manipulação no momento da experimentação carecia da entrada do mesmo nos pequenos orifícios da placa de 96 poços. Para tal, o polímero de HPMC em baixa concentração (1%) foi disperso em meio aquoso para obter uma formulação com consistência e aparência de gel fluído, com densidade maior que a da água (1,000

g/mL), porém menor que a densidade de um gel de uso oral (densidade superior a 1,100 g/mL)(PEDRAZZI *et al.*, 2009).

Santos (2018) desenvolveu um gel fluido de HPMC 2% e obteve a densidade de 1,038 g/mL, pouco superior a densidade de 1,018 g/mL obtida pelo presente estudo. Os géis presentes no mercado apresentam densidade entre 1,100 g/mL – 1,300 g/mL (Pedrazzi *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2019).

Costa *et al.* (2017) fizeram uma formulação simples de gel de carbopol 940® com intuito de aumentar o período de contato do FS e eficácia da PDT. Obtiveram géis estáveis com a presença do ativo, sugerindo que a formulação gera um ambiente físico-químico adequado para o aumento do efeito fotodinâmico. Os testes de detecção de EROs mostram interação entre o AM e a malha polimérica, onde amostras incorporadas com ureia geraram redução da eficiência de produção de EROs, indicando que os excipientes da formulação podem interferir no resultado da PDT. Na atual pesquisa optou-se por uma formulação com poucas matérias primas visando mitigar a interferência dos componentes na ação, incorporação e eficácia da formulação gel de AM.

A citotoxicidade do AM nas células depende da dose utilizada. Nas concentrações a partir de 200 µM observou-se acentuada diminuição na viabilidade celular em ambas as linhagens. Nos testes *in vitro* de Lamarque *et al.* (2020) notou-se que o aumento da citotoxicidade do AM está ligado ao aumento da concentração, corroborando os resultados. O desafio é descobrir uma concentração que tenha alto potencial citotóxico, gerando maior estresse oxidativo e danos celulares seletivamente contra as células neoplásicas sem afetar a viabilidade dos tecidos saudáveis.

Assim como no presente estudo, Scottini (2021) observou que a porcentagem de incorporação do AM pelas células decrescia junto com o aumento da concentração da solução de AM. Como resultado observou que mesmo em baixas concentrações as células neoplásicas foram muito mais suscetíveis a incorporação do AM do que as células saudáveis e ambas as linhagens incorporaram mais de 50% da solução de AM em algumas concentrações. Contudo, no presente estudo nota-se um potencial menor de incorporação de AM na formulação de gel pelas células de linhagem SCC-4, não apresentando absorção superior a 25% em nenhuma das concentrações testadas.

Comparando os resultados da pesquisa com os resultados de Scottini (2021) nota-se algumas semelhanças. Scottini (2021) observou viabilidade celular de 98,6%

em células que foram expostas a solução com concentração de 25µM de AM, e viabilidade celular de 71,9% em células expostas a solução com concentração de 50µM. No presente trabalho, foi observada viabilidade celular de 98,5% em células expostas ao gel com concentração de 25µM de AM, e viabilidade celular de 75,8% em células expostas ao gel em concentração de 50µM.

Kofler *et al.* (2018) não encontraram diferença estatística nas células tratadas apenas com o laser mesmo após a exposição por 15 minutos com densidade de energia de 95 J/cm². Em nosso estudo após a avaliação da PDT, foram observadas diferenças significativas entre os grupos tratados com laser PDT 25, PDT 50 e PDT 100 em relação ao grupo tratado apenas com gel de AM. Esses resultados indicam que a combinação de luz laser e gel AM interferiu na viabilidade celular em comparação aos controles.

Entre as limitações deste estudo, estão a impossibilidade de identificar as organelas de afinidade com o AM na linhagem SCC-4 e os principais processos de morte celular envolvidos. Quanto à localização do AM nas células, seja mitocôndria ou lisossomo, não há consenso na literatura, assim como não há consenso se a principal via de morte celular induzida por PDT e AM é apoptose ou necrose. Em várias linhagens celulares foi observada morte celular por apoptose (WONDRAK, 2007; LIM *et al.*, 2013), que é o tipo de morte celular desejável durante a PDT. Em contraste, o grupo de Santos *et al.* (2017) encontrou mais marcadores necróticos na morte celular induzida por PDT usando AM em linhas celulares derivadas de câncer de mama. Determinar a localização do AM nas células e entender os mecanismos que levam à morte celular podem facilitar o desenvolvimento de novos protocolos e novas abordagens, como o uso de moléculas e nanopartículas de ligação AM para melhorar o PDT (SER *et al.*, 2020). Wainwright (2005) também descreveu que os derivados do azul de metileno exibem maior citotoxicidade em cultura devido a uma combinação de lipofilicidade e redução da forma reduzida.

Dos estudos *in vitro* encontrados até agora, o estudo de Kofler *et al.* (2018) foi realizado em linhagem derivada de carcinoma espinocelular de boca (SCC-25) apresentou resultados promissores especialmente sobre a capacidade desta terapia de impedir a reprodução das células tumorais malignas. Assim como no presente estudo, Scottini (2021) demonstrou que a PDT com solução de AM pode ser uma

alternativa eficaz no tratamento antineoplásico de carcinoma espinocelular derivado de língua.

Com base nos fatos mencionados, estudar a localização do AM, pesquisar os mecanismos de morte celular e quantificar o oxigênio singleto ou ERO, são outras variáveis a serem exploradas para definir melhores protocolos de pesquisa *in vitro* e *in vivo*. Uma melhor compreensão dos efeitos da PDT nas células tumorais leva ao desenvolvimento de novas tecnologias. Essas inovações podem permitir que os fotossensibilizadores se liguem às organelas e gerem EROs para uma morte celular mais eficiente das células tumorais.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O gel base de HPMC 1% apresentou estabilidade de pH (6,0) e pouca alteração na densidade, nos períodos de 0, 10 e 20 dias. As células da linhagem SCC-4 demonstraram baixa capacidade de incorporação do AM por parte das células neoplásicas, além disso, o uso do Gel de AM isolado não afetou a viabilidade celular das células neoplásicas, exceto quando se utilizou uma concentração igual ou maior que 400 μM .

Notou-se diferença estatística entre a viabilidade celular do grupo controle e células que foram submetidas à PDT, indicando que a PDT proporcionou diminuição na viabilidade celular das linhagens testadas.

REFERÊNCIAS

1. AGOSTINIS, P. *et al.* Photodynamic therapy of cancer: an update. **CA Cancer J Clin.** 2011.
2. ALLEN, L.V., POPOVICH, N.G., ANSEL, H.C. Ansel's pharmaceutical dosage forms. 8th ed. **Lippincot Williams & Wilkins**, Baltimore. 2005.
3. AMENÁBAR, J.M.; TORRES-PEREIRA, C.C.; TANG, K.D.; PUNYADEERA, C. Two enemies, one fight: An update of oral cancer in patients with Fanconi anemia. **Cancer.** 2019.
4. 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.
5. BACELLAR, I. *et al.* Photodynamic Efficiency: from molecular photochemistry to cell death. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 9, p. 20523-20559, 2015.
6. BAGAN J.; PADERNI, C.; TERMINE, N.; CAMPISI, G.; LO RUSSO, L.; COMPILATO, D.; DI FEDE, O. Mucoadhesive polymers for oral transmucosal drug delivery: a review. **Curr Pharm Des.** 2012.
7. BAROLET, D. Light-Emitting Diodes (LEDs) in Dermatology. **Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery.** Canada. 2008.
8. BERTÃO, J.M. **Análise clínica e histoquímica comparativa computadorizada pelo método da Agnor de carcinoma espinocelular de diferentes regiões da boca de humano.** 2003.
9. Biel, M.A. Antimicrobial Photodynamic Therapy for Treatment of Biofilm-Based Infections. In: Donelli, G. (eds) Biofilm-based Healthcare-associated Infections. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 831. Springer, Cham. 2015.
10. CALZAVARA-PINTON, P.G.; VENTURINI, M. SALA R. Photodynamic therapy: update 2006. Part 1: Photochemistry and photobiology. **J Eur Acad Dermatol Venereol.** 2007;
11. CARVALHO, A.L.; SINGH, B.; SPIRO, R.H.; KOWALSKI, L.P.; SHAH, J.P. Cancer of the oral cavity: a comparis between institutions in a developing and a developed nation. **Head Neck.** 2004.
12. CASTANO, A.P.; MROZ, P.; HAMBLIN, M.R. Photodynamic therapy and anti-

- tumour immunity. **Nat Rev Cancer**. 2006.
13. CERIZE, N.N.P. **Sistemas nanocarreadores com aplicação na terapia fotodinâmica do câncer: nanoremédios**. São Paulo, 2012.
 14. CHEN, X.; LU, Y.; JIAO, R.; ZHONG, J.; JI, J.; Shen, P. Methylene blue-mediated photodynamic therapy induces mitochondria-dependent apoptosis in HeLa Cell. **J. Cell. Biochem**. 2008.
 15. CHORILLI, Marlus *et al.* **Free radicals and antioxidant agents: concepts to application in pharmaceutical and cosmetic formulations**. 2007.
 16. COOK, M. T.; KHUTORYANAKIY, V. V. Mucohesion and mucosa-mimetic materials. **International Journal of Pharmaceutics**. 2015.
 17. COSTA L.A.G. *et al.* **Géis poliméricos contendo azul de metileno como novas formulações para terapia fotodinâmica**. 2017.
 18. CURI, M.M.; DIB, L.L.; KOWALSKI, L.P. Management of refractory osteoradionecrosis of the jaws with surgery and adjunctive hyperbaric oxygen therapy. **Int J Oral Maxillofac Surg Rev**, 2000.
 19. DA SILVA, S.D. *et al.* Advances and applications of oral cancer basic research. **Oral Oncol**. 2011
 20. DE PAOLA, Maria Valéria Robles Velasco. Avaliação da disponibilidade de formas farmacêuticas sólidas comercializadas no mercado brasileiro empregando o teste de dissolução. **J. Health Sci. Inst**. 2001.
 21. DHILLON, A.S. *et al.* **MAP kinase signalling pathways in cancer**. *Oncogene*, vol. 26, nº 22. 2007.
 22. DIB, L.L.; SABBA, L.M.B.; MARQUES, L.A.; ARAÚJO, N.S. Fatores prognósticos em carcinoma de bordas de língua: análise clínica e histopatológica. **Acta Oncol Bras**. 1994.
 23. DILKES, M.G.; DEJODE, M.L.; ROWNTREE-TAYLOR, A. *et al.* m-THPC photodynamic therapy for head and neck cancer. **Laser Med Sci** 11, 23–29. 1996.
 24. DOLMANS, D.E.; FUKUMURA, D.; JAIN, R.K. Photodynamic therapy for cancer. **Nat Rev Cancer**. 2003.
 25. DOUGHERTY, T.J.; GOMER, C.J.; HENDERSON, B.W.; JORI, G.; KESSEL, D.; KORBELIK, M.; MOAN, J.; PENG Q. Photodynamic therapy. **J Natl Cancer Inst**. 1998.

26. EDUARDO, A.P. *et al.* Photodynamic therapy as a complementary benefit in the dental clinic. **Revista da Associação Paulista de Cirurgiões Dentistas**. 2015.
27. FAN, H.Y. *et al.* Light stimulus responsive nanomedicine in the treatment of oral squamous cell carcinoma. **Eur J Med Chem**. 2020.
28. FANG, C.Y. *et al.* miR-145 mediates the anti-cancer stemness effect of photodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid (ALA) in oral cancer cells. **J Formos Med Assoc**. 2018.
29. FERNANDES, K.P.S.; FERRARI, R.A.M.; FRANÇA, C.M. **Biofotônica-Princípios e Aplicações**. São Paulo, 2017.
30. FERRAZ, F.C.; SIMÕES, W.; RAPAPORT, A.; BOZZO, R.O. O uso de localizador apical endodôntico em pacientes irradiados. **Rev Gaúcha Odontol**. 2004.
31. FERREIRA, J.; CORRÊA, T. P. Terapêutica no carcinoma de células escamosas cutâneo em gatos. **Ciência Rural**. 2006.
32. FINI, A.; BERGAMANTE, V.; CESCHEL, G. C. Mucoadhesive gels designed for the controlled release of chlorhexidine in the oral cavity. **Pharmaceutics**, 3, 665-679. 2011.
33. FRANCO, R.; SCHONEVELD, O.; GEORGAKILAS, A.G.; PANAYIOTIDIS, M.I. Oxidative stress, DNA methylation and carcinogenesis. **Cancer Lett**. 2008.
34. 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.
35. GABRIELLI, D.; BELISLE, E.; SEVERINO, D.; KOWALTOWSKI, A.J.; BAPTISTA, M.S. Binding, aggregation and photochemical properties of methylene blue in mitochondrial suspensions. **Photochemistry and Photobiology**, 79: 227-232. 2002.
36. GAD, A.; KIYOSAWA, K.; UMEMURA, T.; ICHIJO, T.; MATSUMOTO, A.; YOSHIZAWA, K.; TANAKA, E. Hepatocellular carcinoma: Recent trends in Japan. **Gastroenterology**. v. 127, Issue 5, Supplement 1. 2004.
37. GANGLOFF, P.; PHULPIN, B.; CORTESE, S.; GALLET, P.; BRAVETTI, P.; MASTRONICOLA, R.; GUILLEMIN, F.; DOLIVET, G. Photodynamic therapy as salvage treatment for recurrent head and neck cancer. **Médecine Buccale Chirurgie Buccale**. 2012.
38. GONÇALVES, P.J. *et al.* **Inativação Fotodinâmica**: aspectos fotofísicos e aplicações no combate a microrganismos. 2021.

39. HAMDOON, Z. **Optical coherence tomography-guided photodynamic therapy for skin cancer**: case study, 2011.
40. HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, vol. 144, nº 5. 2011.
41. HARRIS, SL.; KIMPLE, RJ.; HAYES, DN.; COUCH, ME.; ROSENMAN, JG. Never-smokers, never-drinkers: unique clinical subgroup of young patients with head and neck squamous cell cancers. **Head Neck**. 2010.
42. HAYES, John D.; DINKOVA-KOSTOVA, Albena T.; TEW, Kenneth D. Oxidative Stress in Cancer. **Cancer Cell**. v. 38, Issue 2. 2020.
43. HONORATO, J.; CAMISASCA, D.R.; SILVA, L.E.; DIAS, F.L.; FARIA, P.A.S.; LOURENÇO, S.Q.C. Análise de sobrevida global em pacientes diagnosticados com carcinoma de células escamosas de boca no INCA no ano de 1999. **Rev Bras Epidemiol**. 2009;12(1):69-81.
44. HOPPER, C.; NIZIOL, C.; SHIDHU M. The cost-effectiveness of foscan mediated photodynamic therapy (foscan-pdt) compared with extensive palliative surgery and palliative chemotherapy for patients with advanced head and neck cancer in the UK. **Oral Oncol**. 2004.
45. 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.
46. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Estimativa 2020**: incidência de câncer no brasil. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, 2019.
47. ISSA, Maria Cláudia Almeida.; AZULAY, Mônica Manela. **Terapia fotodinâmica**: revisão da literatura e documentação iconográfica. 2010.
48. 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.
49. 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.
50. JULIANA, P.M.L. The antimicrobial activity of photodynamic therapy against *Streptococcus mutans* using different photosensitizers. **Journal of**

Photochemistry and Photobiology B: Biology.

51. KABINGU, E.; OSEROFF, A. R.; WILDING, G. E.; GOLLNICK, S. O. Enhanced systemic immune reactivity to a Basal cell carcinoma associated antigen following photodynamic therapy. **Clin Cancer Res.** 2009.
52. KARAKULLUKCU, M.B. Photodynamic Therapy of Malignancies of the Nasopharynx, the Nasal Cavity, and the Paranasal Sinuses. In: Wong, BF., Ilgner, J. (eds) **Biomedical Optics in Otorhinolaryngology**. Springer, New York, NY. 2016.
53. KOFLER, B.; ROMANI, A.; PRITZ, C.; STEINBICHLER, T.B.; SCHARTINGER, V.H.; RIECHELMANN, H.; DUDAS, J. Photodynamic Effect of Methylene Blue and Low Level Laser Radiation in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Cell Lines. **Int. J. Mol. Sci.** 2018.
54. KORBELIK, M.; DOUGHERTY, G.J. Photodynamic therapy-mediated immune response against subcutaneous mouse tumors. **Cancer Res.** 1999.
55. 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. 101654, 2020.
56. LIM, E.J. *et al.* Methylene blue-mediated photodynamic therapy enhances apoptosis in lung cancer. **Oncology Reports.** 30: p. 856-862, 2013.
57. 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.
58. LONGO, J.P.F.; LOZZI, S.P.; AZEVEDO, R.B. **Oral cancer and photodynamic therapy as a treatment.** 2011.
59. MACHADO, A.E.H. Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. **Química Nova.** 2000; 23(2): 237-43.
60. MAFRA, D.; FERNANDES, A.G. **Zinco e câncer: uma revisão.** 2005.
61. MAISCH, T. Anti-microbial photodynamic therapy: useful in the future? **Lasers Med Sci.** 22, 83–91 2007.
62. MANOTTI, J.; ARANHA, A.C.C.; EDUARDO, C.P. Tratamento do herpes labial pela terapia fotodinâmica. **Assoc. Paul. Cir. Dent.** 2008.
63. MARANHO, D. S. **Estudo da associação de complexos nitrosilos de rutênio liberadores de NO com o agente fotossensibilizador Zinco**

- ftalocianina ZnPC em sistemas de liberação utilizados na Terapia Fotodinâmica.** 2008.
64. MARX, R.E. Osteoradionecrosis: a new concept of its pathophysiology. **J Oral Maxillofac Surg.** 1983.
65. MATHERS, C.D. *et al.* Global burden of disease in 2002: data sources, methods and results. **World Health Organization**, 2003.
66. MEDLINEPLUS. **National Library of Medicine (US)**. Acesso em: 21/06/2022 Disponível em: <<https://medlineplus.gov/ency/patientinstructions/000906.htm>>
67. MELO, C.A.S.; DOMINGUES, R.J.S.; LIMA, A.B. **Elaboração de géis e análise de estabilidade de medicamentos.** Universidade do Estado do Pará, 2018.
68. MILLER, C.S.; JOHNSTONE, B.M. Human papillomavirus as a risk factor for oral squamous cell carcinoma: A metaanalysis, 1982-1997. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** 2001.
69. MIRONOV, A.F. *et al.* New photosensitizers of bacteriochlorin series for photodynamic cancer therapy. **Russian Journal of Bioorganic Chemistry**, 2003.
70. MOLON, A.C. **Análise da expressão de ligantes de células Natural Killer em linhagens celulares derivadas de carcinoma epidermóide oral submetidas à terapia fotodinâmica.** 2021.
71. NARVAEZ, A.C.; CORCUERA, M.M. Terapia fotodinámica para el tratamiento de lesiones orales potencialmente malignas. **Rev Colomb Cancerol.** 2016.
72. NGUYEN, S.; HIORTH, M. Advanced drug delivery systems for local treatment of the oral cavity. **Therapeutic Delivery**, v. 6, nº 5. 2015.
73. NOODT, B.B.; RODAL, G.H.; WAINWRIGHT, M.; PENG, Q.; HOROBIN, R.; NESLAND, J.M.; BERG, K. Apoptosis induction by different pathways with methylene blue derivative and light from mitochondrial sites in V79 cells. **Int. J. Cancer**, 75: 941-948. 1998.
74. NUNEZ, S.C. Estudo da dinâmica de fotodegradação e agregação das fenotiazinas azul de metileno e azul orto-toluidina com relação à eficiência fotodinâmica. **Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares**, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2007
75. NÚÑEZ, S.C.; RIBEIRO, M.S.; GARCEZ, A.S.; AZAMBUJAJR., N.; FREGNANI, E.R.; RODRIGUEZ, H.M.H.; HAMBLIN, M.R.; SUZUKI, H. Effects of Photodynamic

- Therapy on Gram-Positive and Gram-Negative Bacterial Biofilms by Bioluminescence Imaging and Scanning Electron Microscopic Analysis. **Photomedicine and Laser Surgery**. 2013.
76. 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.
77. ONYANGO, J.F.; MACHARIA, I.M. Delays in diagnosis, referral and management of head and neck cancer presenting at Kenyatta National Hospital, Nairobi. **East Afr Med J**. 2006.
78. ONYANGO, P.; IRIZARRY, R.; LADD-ACOSTA, C.; WEN, B. *et al.* The human colon cancer methylome shows similar hypo- and hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores. **Nat Genet**. v. 41, 178–186. 2009.
79. ORD, R.A.; BLANCHAERT, R.H. Current management of oral cancer. **J Am Dent Assoc**. 2001.
80. ORD, R.A.; KOLOKYTHAS, A.; REYNOLDS, M.A. Surgical salvage for local and regional recurrence in oral cancer. **J Oral Maxillofac Surg**. 2006.
81. ORTH, K.; BECK, G.; GENZE, F.; RÜCK, A. Methylene blue mediated photodynamic therapy in experimental colorectal tumors in mice. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. Volume 57. 2000.
82. ORTH, K.; RÜCK, A.; BECK, G.; STANESCU, A.; BEGER, H.G. Photodynamic therapy of small adenocarcinomas with methylene blue. **Der Chirurg; Zeitschrift für Alle Gebiete der Operativen Medizin**, 1995.
83. PASCHOAL, M.A.; LIN, M.; SANTOS-PINTO, L.; DUARTE, S. Photodynamic antimicrobial chemotherapy on *Streptococcus mutans* using curcumin and toluidine blue activated by a novel LED device. **Lasers in Medical Science**. 2015.
84. PAZOS, Md. C.; NADER, H.B. **Effect of photodynamic therapy on the extracellular matrix and associated components**. 2007
85. PEDRAZZI V, *et al.* Métodos mecânicos para o controle do biofilme dentário supragengival. **Rev. Periodontia**, 2009;
86. PELOI, L.S.; SOARES, R.R.S.; BIONDO, C.E.G. *et al.* Photodynamic effect of light-emitting diode light on cell growth inhibition induced by methylene blue. **J Biosci** **33**, 231–237. 2008.

87. PERUSSI, J.R. Inativação fotodinâmica de microrganismos. **Rev Quim Nova**. 2007.
88. 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.
89. PIFFARETTI, D. *et al.* Protoporphyrin IX tracer fluorescence modulation for improved brain tumor cell lines visualization. **J Photochem Photobiol B**. 2019
90. PRAŠMO, E.J.; GODLEWSKA, R.A.; MIELCZAREK, A.B. Effectiveness of repeated photodynamic therapy in the elimination of intracanal *Enterococcus faecalis* biofilm: an in vitro study. **Lasers In Medical Science**, v. 32, n. 3, p.655-661, 2017.
91. PRIHANTONO, P. Adjuvants therapy in oral cancer. **International Journal of Surgery and Medicine**, p. 183-187, 2018.
92. QIANG, Y.G.; ZHANG, X.P.; LI, J.; HUANG, Z. Photodynamic therapy for malignant and non-malignant diseases: clinical investigation and application. **Chin Med J (Engl)**. 2006.
93. QUEIROZ, B.M. **Desenvolvimento e estudo da estabilidade de gel com extrato de *matricaria recutita* (L.) e avaliação da atividade anti-inflamatória tópica comparada com gel de diclofenaco sódico**. 2008.
94. REUTER, S. *et al.* Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked?. **Free Radic Biol Med**, v. 49, nº 11. 2010.
95. 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.
96. RIBEIRO, M.S.; SILVA, D.F.T.; NÚÑEZ, S.C.; ZECELL, D.M. **Treaty of aesthetic medicine**, 2 ed. São Paulo, Brasil, 2011.
97. 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.
98. 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.
99. 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.

100. 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.
101. 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.
102. RISI JÚNIOR, J. P.; NOGUEIRA, R. P. As condições de saúde no Brasil. In: FINKELMAN, J. (Org.) **Caminhos da saúde pública**. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz, 2002. p. 115-234.
103. RODINI, C.O.; LOPES, N.M.; LARA, V.S.; MACKENZIE, I.C. Oral cancer stem cells - properties and consequences. **J Appl Oral Sci**. 2017.
104. 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.
105. ROLIM, Juliana P.M.L.; DE-MELO, Mary A.S.; GUEDES, Sarah F.; ALBUQUERQUE-FILHO, Fernando B.; DE SOUZA; Jackson R.; NOGUEIRA, Nádia A.P.; ZANIN, Iriana C.J.; RODRIGUES, Lidiany K.A. The antimicrobial activity of photodynamic therapy against *Streptococcus mutans* using different photosensitizers. **Journal of Photochemistry and Photobiology**. Biology. v. 106. 2012.
106. 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.
107. SÁ JUNIOR, P.L. *et al.* The Roles of ROS in Cancer Heterogeneity and Therapy. **Oxidative Medicine And Celular Longevity**, v. 2017, p. 1-12, 2017.
108. 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.
109. SAJISEVI, M.; RIGUAL, N.R.; BELLNIER, D.A.; SESHADRI, M. Image-guided Interstitial Photodynamic Therapy for Squamous Cell Carcinomas: Preclinical investigation. **Journal of Oral Maxillofacial Surgery Medicine Pathology**, v. 27, n.2, p. 159-165, 2015.
110. SALGADO, C.G.B. **Desenvolvimento galênico de um gel para o tratamento de dermatites no couro cabeludo**. 2008.

111. SANNOMIYA, E.K.; FURUKAWA, S. Diferentes métodos de tratamento radioterápico em tumores da cavidade bucal e suas complicações. **Rev Bras Odontol.** 2000.
112. 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.
113. SCHERER, K.M.; BISBY, R.H.; BOTCHWAY, S.W.; PARKER, A.W. New approaches to photodynamic therapy from types I, II and III to type IV using one or more photons. **Anticancer Agents Med Chem.** 2017.
114. SCOTTINI, A. **Terapia fotodinâmica com azul de metileno em células derivadas de carcinoma espinocelular: estudo in vitro.** Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde). Universidade Estadual de Ponta Grossa. Ponta Grossa. 2021.
115. 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.
116. 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.
117. SHAH, J.P.; GIL, Z. Current concepts in management of oral cancer – Surgery. **Oral Oncology**, v. 45, n. 4-5, p. 394-401, 2009.
118. SILVA, C.R. Avaliação do efeito fotodinâmico de fotossensibilizadores com aplicação em terapia fotodinâmica. **Instituto Químico de São Carlos.** SP, 2007.
119. SILVA, J.L. *et al.* Effects of low level laser therapy in cancer cells-a systematic review of the literature. **Lasers In Medical Science**, 2019
120. SILVA, M.D. **Estudo da associação de complexos nitrosilos de rutênio liberadores de NO com o agente fotossensibilizador Zinco ftalocianina ZnPC em sistemas de liberação utilizados na Terapia Fotodinâmica**, 2008.
121. SOARES, J.M.A. *et al.* **Por que tratamos câncer de boca em estádios avançados?** 2014.
122. SOUZA, H.C. **Apostila Teórica de Farmacotécnica II.** 2016
123. STÁJER, A. *et al.* Utility of Photodynamic Therapy in Dentistry: Current Concepts. **Dent J (Basel).** 2020.

124. STÁJER, A.; KAJÁRI, S.; GAJDÁCS, M.; MUSAH-EROJE, A.; BARÁTH, Z. Utility of Photodynamic Therapy in Dentistry: Current Concepts. **Dent J** (Basel). 2020.
125. 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.
126. 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, 2004.
127. TARDIVO, JP.; DEL GIGLIO, A.; DE OLIVEIRA, CS.; GABRIELLI, DS.; JUNQUEIRA, HC.; TADA, DB.; SEVERINO, D.; DE FÁTIMA, TURCHIELLO, R.; BAPTISTA MS. Methylene blue in photodynamic therapy: From basic mechanisms to clinical applications. **Photodiagnosis Photodyn Ther**. 2005
128. The World Health Report 2000. Health systems: improving performance. Geneva, **World Health Organization**, 2000.
129. THONG, P.S. *et al.* Photodynamic-therapy-activated immune response against distant untreated tumours in recurrent angiosarcoma. **Lancet Oncol**. 2007.
130. THUN, Michael J.; DELANCEY, John Oliver; CENTER, Melissa M.; JEMAL, Ahmedin; WARD, Elizabeth M. The global burden of cancer: priorities for prevention, **Carcinogenesis**, v. 31, Issue 1, January 2010,
131. TOREZAN, L.A.R. **Terapia Fotodinâmica em Dermatologia**. editors. Laser em Dermatologia. São Paulo: Editora Roca; 2002.
132. VILLANOVA, Janaina C. O.; ORÉFICE, Rodrigo L. e Cunha; ARMANDO, S. Aplicações farmacêuticas de polímeros. **Polímeros**. 2010,
133. WAINWRIGHT, M. The development of phenothiazinium photosensitisers. **Photodiagnosis And Photodynamic Therapy**, v. 2, n. 4, p. 263-272, 2005.
134. WAINWRIGHT, M., CROSSLEY, K.B. Methylene Blue – a Therapeutic Dye for All Seasons?. **Journal of Chemotherapy**. 14:5, 431-443. 2002.
135. WARNAKULASURIYA, S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. **Oral Oncol.**, 45 (4–5). 2009.
136. WILSON, Brian C.; PATTERSON, Michael S. The physics, biophysics and technology of photodynamic therapy. **Physics in Medicine and Biology**. v. 53.

n° 9. 2008.

137. YANG, L.; SUN, R.; TAN, X.; WANG, X.; ROBERTSON, ES.; LAN, K. Epigenetic Landscape of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Genome in Classic Kaposi's Sarcoma Tissues. **PLoS Pathog.** 2017.