

Universidade do Vale do Paraíba
Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento

Bruno Henrique Godoi

**ESTUDO DA TERAPIA FOTODINÂMICA UTILIZANDO ALUMÍNIO
FTALOCIANINA TETRASULFONADA: UMA ANÁLISE QUÍMICA, FÍSICA E
BIOLÓGICA DOS MECANISMOS TERAPÊUTICOS**

São José dos Campos – SP

2020

Bruno Henrique Godoi

**ESTUDO DA TERAPIA FOTODINÂMICA UTILIZANDO ALUMÍNIO
FTALOCIANINA TETRASULFONADA: UMA ANÁLISE QUÍMICA, FÍSICA E
BIOLÓGICA DOS COMPONENTES TERAPÊUTICOS**

Dissertação de Mestrado Apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia biomédica da Universidade do Vale do Paraíba, como complementação dos créditos necessários para obtenção do título de Mestre em Engenharia Biomédica.

Orientadora: Prof^a Dr^a Cristina Pacheco Soares

Coorientador: Prof^a. Dr^a Juliana Ferreira Sixtrino

São José dos Campos – SP

2020

TERMO DE AUTORIZAÇÃO DE DIVULGAÇÃO DA OBRA

Ficha catalográfica

Godoi, Bruno Henrique
ESTUDO DA TERAPIA FOTODINÂMICA UTILIZANDO ALUMÍNIO
FTALOCIANINA TETRASULFONADA: UMA ANÁLISE QUÍMICA, FÍSICA E
BIOLÓGICA DOS MECANISMOS TERAPÊUTICOS / Bruno Henrique Godoi;
orientador, Cristina Pacheco-Soares Pacheco-Soares; co-orientador
Juliana Ferreira Sixtrino. - São José dos Campos, SP, 2020.
66 p.

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade do Vale do
Paraíba, São José dos Campos. Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Biomédica.

Inclui referências


1. Engenharia Biomédica. 2. Terapia Fotodinamica. 3. Alumínio
Ftalocianina Tetra Sulfonada. 4. Cancer. 5. Resistencia a
Terapia. I. Pacheco-Soares, Cristina Pacheco-Soares, orient. II.
Sixtrino, Juliana Ferreira, co-orient. III. Universidade do Vale
do Paraíba. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica.
IV. Título.

Eu, Bruno Henrique Godoi, autor(a) da obra acima referenciada:

Autorizo a divulgação total ou parcial da obra impressa, digital ou fixada em
outro tipo de mídia, bem como, a sua reprodução total ou parcial, devendo o
usuário da reprodução atribuir os créditos ao autor da obra, citando a fonte.

Declaro, para todos os fins e efeitos de direito, que o Trabalho foi elaborado
respeitando os princípios da moral e da ética e não violou qualquer direito de
propriedade intelectual sob pena de responder civil, criminal, ética e
profissionalmente por meus atos.

São José dos Campos, 28 de Fevereiro de 2020.



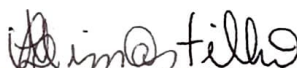
Autor(a) da Obra

BRUNO HENRIQUE GODOI

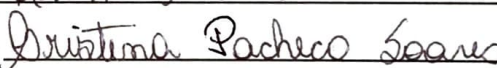
**“ESTUDO DA TERAPIA FOTODINÂMICA UTILIZANDO ALUMÍNIO FTALOCIANINA
TETRASULFONADA: UMA ANÁLISE QUÍMICA, FÍSICA E BIOLÓGICA DOS
MECANISMOS TERAPÊUTICOS.”**

Dissertação aprovada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre, do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba - Univap, pela seguinte banca examinadora:

PROF.^ª DR.^ª MAIARA LIMA CASTILHO



PROF.^ª DR.^ª CRISTINA PACHECO SOARES



PROF.^ª DR.^ª JULIANA FERREIRA STRIXINO



PROF.^ª DR.^ª LUANA MAROTTA REIS DE VASCONCELLOS – Unesp



Prof. Dr. Leandro José Raniero

Diretor do IP&D – Univap

São José dos Campos, 05 de fevereiro de 2020.

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a meus pais, pois nunca desistiram de me incentivar, a minha segunda mãe Regina que mesmo longe continua a zelar e me dar forças, a Lilica minha companhia de 19 anos que sempre esteve ao meu lado para me alegrar, a minha companheira Amanda que me confortou em todos os meus momentos da minha caminhada até aqui.

Aos meus irmãos, Diogo e Eduardo que sempre estiveram presentes em minha vida, a novo membro da família Mika por sua insistência em participar de todo o processo de escrita.

Aos meus amigos Lucas Mancio e Lucas Taveira, por serem sempre os detentores dos melhores conselhos, as minhas meninas, Viviane, Laleska, Beatriz, Gilmara, Letícia, Amanda, Mariela e meu guaxinim Vanessa, por me aguentarem como Co orientador e me ensinarem como manejar diferentes personalidades em prol de uma causa.

Aos meus mentores, Cristina, Juliana, Newton e Isabel, sem vocês várias oportunidades não seriam aproveitadas e esse trabalho nem existiria.

A todos os colegas e amigos, pois sem vocês inúmeras parcerias não seriam reais e muitas experiências não existiriam.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que acreditaram no meu potencial.

“Tudo o que temos de decidir é o que fazer com o tempo que nos é dado”

Gandalf o Branco

RESUMO

A terapia fotodinâmica (TFD) é uma técnica descoberta no início do século XX, que utiliza a luz como catalisador de uma reação de oxidação no órgão, tecido ou célula alvo. Para que ocorra a reação fotodinâmica é necessário oxigênio ao nível molecular, fotossensibilizante e uma fonte de luz. A técnica é utilizada em inúmeros tratamentos estéticos e dermatológicos sendo atualmente empregue como tratamento antimicrobiano e antifúngico, em infecções virais causadas pelos vírus *Herpes* e *Papilloma*, além de patologias como periodontite, tratamento de leishmaniose cutânea e alguns casos de câncer. Contudo, um dos obstáculos no emprego da técnica como tratamento contínuo ou de longa duração para doenças de alta complexidade, é o possível mecanismo de resistência às drogas, que as células podem apresentar quando são expostas ao fármaco fotossensibilizante por sucessivas vezes ou longos períodos, há ainda a divergência dos métodos aplicados em estudos e procedimentos clínicos, resultando assim em respostas variadas e fragilidade nos resultados divulgados, acarretando inúmeros questionamentos sobre a sua aplicabilidade nos procedimentos clínicos. O presente estudo tem por finalidade avaliar a capacidade de sobrevivência de células da linhagem HEP-2 após a TFD e evidenciar critérios para elaboração de um guia de boas práticas para aplicação da TFD utilizando o fotossensibilizante de segunda geração ALPcS₄. Assim utilizando análises espectroscópicas e testes colorimétricos foi possível delinear a concentração de trabalho do fotossensibilizante de 5 µM em conjunto da densidade mínima de energia necessária para ativa-lo de 5 J/cm². Após determinar os parâmetros para os testes, utilizou-se os ensaios colorimétricos e imunológicos em conjunto com a quantificação gênica das HSP's e da enzima SOD2, e para avaliara a resposta biológica pós a TFD. Os resultados dos ensaios colorimétrico, coloração de cristal violeta, coloração de vermelho neutro e conversão do sal de MTT, demonstram uma redução na viabilidade celular após a TFD consolidando a escolha dos parâmetros de concentração do fotossensibilizante e dose de energia. Já a avaliação imunológica das citocinas IL-6 e TNF – α não permitiu uma conclusão clara sobre o ambiente tumoral pós a TFD devido ao baixo poder de correlação entre os resultados obtidos. Por fim a expressão genica demonstrou redução significativa dos genes das HSP's, glicoproteínas e enzima SOD2, evidenciando um potencial destrutivo da TFD, sugerindo que o tratamento uma vez padronizado não pode gerar clones resistentes a terapia, assegurando assim sua eficácia utilizando a linhagem celular HEP-2 como objeto de estudo. Acredita-se que este estudo fornece critérios para implantação de práticas mais eficientes utilizando a terapia fotodinâmica.

Palavras-chave: Terapia Fotodinâmica, Câncer, Fotossensibilizante, Padronização, HEP-2

ABSTRACT

Photodynamic therapy (PDT) is a discovery technique in the early 20th century that uses light as a catalyst for an oxidation reaction in the target organ, tissue or cell. For a photodynamic reaction to occur, oxygen at the molecular level, photosensitizer and a light source are required. The technique is used in numerous aesthetic and dermatological treatments, being used as an antimicrobial and antifungal treatment, in viral infections caused by the Herpes and Papillomaviruses, in addition to pathologies such as periodontitis, treatment of cutaneous leishmaniasis and some cases of cancer. However, one of the obstacles in the use of techniques such as continuous or long-term treatment for highly complex diseases is the drug resistance mechanism, which cells can exhibit when they are exposed to the photosensitized drug successively or long ago. time, there is still a divergence in the methods used in clinical studies and procedures, thus resulting in varied responses and fragility in the published results, recording numbers of questions about their application in clinical procedures. The present study aims to evaluate the capacity of HEp-2 cells after PDT and to evidence the use of a good practice guide for the application of PDT using the second generation photosensitivity AlPcS₄. Thus, the use of spectrometers and colorimetric tests made it possible to design a 5 µM photosensitivity working concentration in the set of the minimum energy density required for activation of 5 J /cm². After determining the settings for the tests, use colorimetric and immunological tests in conjunction with the genetic quantification of HSP and the SOD2 enzyme, and to assess the post-PDT clinical response. The results of colorimetric tests, violet crystal staining, neutral red staining, and MTT salt conversion, demonstrate a reduction in cell viability after a TFD consolidating the choice of the photosensitivity concentration and energy dose variations. The immunology of the cytokines IL-6 and TNF have already been assessed - a clear conclusion on the post-TFD tumor environment is not allowed due to the low correlation power between the results obtained. Finally, gene expression shows a significant reduction in the genes of HSP, glycoproteins and SOD2 enzymes, showing a destructive potential of PDT, suggesting that the treatment once standardized cannot generate clones resistant to therapy, thus guaranteeing its use during HEp- 2 cell use as the object of study. It is believed that this study used to implement more efficient practices using photodynamic therapy.

Keywords: Photodynamic Therapy, Cancer, Photosensitizers, Standardization, HEp-2

LISTA DE ABREVIATURA

5-ALA - Ácido Aminolevulínico
AlPcS₄ - Alumínio Ftalocianina Tetrasulfonada
 λ - Comprimento de Onda
CI - Conversão
CIS - Cruzamento Intersistêmico
LED - Diodo Emissor de Luz
SDS - Dodecil Sulfato de Sódio
DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium
ELISA - Ensaio de Imunoabsorção enzimática
S1 - Estado Excitado Singleto
S_n - Estado Excitado Singleto Superior
S0 - Estado Fundamental
TNF- α - Fator de Necrose Tumoral
F - Fluorescência
FDA - Food and Drug Administration
HSP - Heat Shock Protein (Proteína de Choque Térmico)
IL1 β - Interleucina 1 Beta
IL10 - Interleucina 10
IL6 - Interleucina 6
IL8 - Interleucina 8
Oxigênio Molecular - O₂
Oxigênio Singleto - ¹O₂
HSP's - Proteínas de Choque Térmico
qPCR - Reação de Polimerase em Cadeia Quantitativa em Tempo Real
RT-qPCR - Reação de Transcriptase reversa seguida da Reação de Polimerase em Cadeia Quantitativa em Tempo Real
 ϕ - Rendimento quântico de Fluorescência
PBS - Tampão Fosfato Salino
TFD - Terapia Fotodinâmica
T1 - Tripleto
ZnPc - Zinco Ftalocianina

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 - Processo da Terapia Fotodinâmica dividida em 5 passos..... | 18 |
| Figura 2 - Diagrama de Jablonski adaptado para Terapia Fotodinâmica. | 21 |
| Figura 3 - Diagrama das Etapas do Experimento. | 26 |
| Figura 4 - Ilustração das Etapas de Coloração e Revelação do Ensaio de Coloração com Cristal Violeta..... | 31 |
| Figura 5 - Ilustração das Etapas de Metabolização e Revelação do Ensaio de MTT..... | 32 |
| Figura 6 - Ilustração da Coloração e Revelação do ensaio Vermelho Neutro..... | 32 |
| Figura 7 - Diluição da Alumino Ftalocianina Tetrasulfonada (AlPcS4). | 36 |
| Figura 8 - Calibração Expressa Gráficamente Através da Equação da Reta..... | 37 |
| Figura 9 - Espectros de Absorção e Emissão da Alumínio Ftalocianina Tetrasulfonada. | 38 |
| Figura 10 - Espectros de Absorção e Emissão da Zinco Ftalocianina. | 39 |
| Figura 11 - Ensaio Clonogênico com Dosagem Seriada de Energia..... | 41 |
| Figura 12 - Ensaio Clonogênico com Variação do Tempo de Incubação do Fotossensibilizante. | 43 |
| Figura 13 - Avaliação da Capacidade Clonogênica após Terapia Fotodinâmica..... | 45 |
| Figura 14 - Avaliação da Atividade Mitocondrial após a Terapia Fotodinâmica. | 46 |
| Figura 15 - Avaliação da Atividade Lisossomal após a Terapia Fotodinâmica..... | 47 |
| Figura 16 - Quantificação da Citocina IL-6..... | 49 |
| Figura 17 - Quantificação de TNF α | 50 |
| Figura 18 - Expressão Gênica das HSP's após Terapia Fotodinâmica..... | 52 |
| Figura 19 - Expressão Gênica das Glicoproteínas e da enzima Superóxido Desmutase 2 após Terapia Fotodinâmica. | 55 |

LISTA DE EQUAÇÕES

| | |
|---|----|
| Equação 1 - Cálculo do Rendimento Quântico de Fluorescência. | 23 |
| Equação 2 - Densidade de Energia. | 28 |
| Equação 3 - Fluência | 28 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 - Genes Avaliados e seus Primers..... | 34 |
| Tabela 2 - Referência dos intervalos de valores estatísticos representados nos Gráficos. | 35 |
| Tabela 3 - HSP's divididas por Família, Função e Localização Celular. | 51 |

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 15 |
| 2 OBJETIVOS..... | 17 |
| 2.1 Objetivo Específico | 17 |
| 3 REVISÃO | 18 |
| 3.1 Terapia Fotodinâmica | 18 |
| 3.2 Mecanismos Resistência a Terapia Fotodinâmica | 23 |
| 3.3 Resposta Imunológica Pós Terapia Fotodinâmica..... | 24 |
| 4 METODOLOGIA | 26 |
| 4.1 Diluição e Caracterização das Propriedades Fotofísica da Alumínio Ftalocianina Tetrasulfonada (AIPcS4) | 26 |
| 4.1.1 <i>Análise do Espectro de Absorção e Emissão do Fotossensibilizante</i> | 27 |
| 4.1.2 <i>Escolha da concentração</i> | 27 |
| 4.2 Padronização da Técnica..... | 28 |
| 4.2.1 <i>Linhagem Celular</i> | 28 |
| 4.2.2 <i>Irradiação</i> | 28 |
| 4.2.3 <i>Curva de Resposta a Dose de Energia</i> | 29 |
| 4.2.4 <i>Variação de Tempo de Incubação para Resposta da terapia</i> | 29 |
| 4.3 Caracterização dos Efeitos da Terapia <i>in vitro</i> | 30 |
| 4.3.1 <i>Capacidade Clonogênica - Cristal Violeta</i> | 30 |
| 4.3.2 <i>Atividade Mitocondrial - MTT</i> | 31 |
| 4.3.3 <i>Atividade Lisossomal – Vermelho Neutro</i> | 32 |
| 4.3.4 <i>Quantificação de Citocinas - Ensaio Imunoenzimático ELISA</i> | 33 |
| 4.3.5 <i>Extração de RNA Total</i> | 33 |
| 4.4 Análises Estatísticas..... | 35 |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 36 |
| 5.1 Curva de calibração da AIPcS4 e análise do espectro de absorção Uv/Visível | 36 |
| 5.2 Análise do Espectro de Absorção e Emissão do Fotossensibilizante e Cálculo do Rendimento Quântico de Fluorescência..... | 38 |
| 5.3 Padronização da Técnica..... | 40 |
| 5.3.1 <i>Curva de Resposta a Densidade de Energia Empregue na Irradiação</i> | 40 |
| 5.3.2 <i>Variação de tempo de incubação para resposta da terapia</i> | 42 |
| 5.4 Caracterização dos efeitos da terapia <i>In Vitro</i> | 43 |
| 5.4.1 <i>Capacidade Clonogênica - Cristal Violeta</i> | 44 |
| 5.4.2 <i>Avaliação da Atividade Mitocôndria – MTT</i> | 45 |
| 5.4.3 <i>Atividade Lisossomal – Vermelho Neutro</i> | 46 |
| 5.4.4 <i>Quantificação de Citocinas - Ensaio Imunoenzimático ELISA</i> | 48 |
| 5.4.5 <i>RT-qPCR para Expressão Gênica dos Mecanismos de Resistência a TFD</i> | 50 |
| 6 CONCLUSÃO | 56 |
| REFERÊNCIAS..... | 57 |

1 INTRODUÇÃO

A terapia fotodinâmica (TFD) é uma técnica descoberta no início do século XX, contudo sua utilização clínica vem sendo empregada com maior amplitude nos últimos 20 anos como um dos métodos terapêuticos da nova geração ^{1,2}. Seu princípio parte da fotobiologia, utiliza a luz como catalisador de uma reação oxidativa em órgão, tecido ou célula alvo. Para que ocorra a reação fotodinâmica é imprescindível a presença de três componentes; oxigênio molecular, fotossensibilizante e uma fonte de luz ³.

Como se trata de uma reação de oxidação, a presença do oxigênio ou de elementos capazes de ionizar com facilidade no local é de suma importância para a eficiência da terapia. Assim compostos das famílias do nitrogênio e calcogênios, que possuem ligações duplas ou triplas em suas composições, reagem com os elétrons altamente energéticos doados por reação de estabilização do fármaco fotossensibilizante, formando moléculas altamente instáveis denominadas de espécies reativas ^{4,5}.

Os fármacos fotossensíveis sofrem um processo de excitação eletrônica quando são expostos a comprimentos de ondas específicos, assim seus elétrons energizam-se saltando para estágios mais excitados e ao retornarem em sua reação de estabilização o composto tende a transferir sua energia ao sistema mais próximo, tal rota biofísica foi descrita por Jablonski em seu trabalho de 1933 e até hoje é utilizado com referência na área de biofotônica ^{6,7}.

As técnicas utilizadas na TFD são empregadas nos EUA desde sua aprovação pelo FDA em 1996 com a utilização das porfirinas, assim o aumento da adesão da técnica para inúmeros tratamentos estéticos e dermatológicos ocorreu nos anos que se sucederam, sendo atualmente usadas no tratamento antimicrobianos e antifúngicos, infecções virais causadas pelos vírus *Herpes* e *Papilloma*, em patologias como periodontite, tratamento de leishmaniose cutânea e alguns casos de câncer ^{1,8,9}.

Um dos obstáculos no emprego da TFD como tratamento contínuo ou de longa duração para doenças de alta complexidade, é o possível mecanismo de resistência aos fármacos em que as células podem desenvolver quando expostas ao agente fotossensibilizante por sucessivas vezes ou longos períodos. Casas *et al.* (2015), descrevem a resistência a TFD ancorada em pontos específicos como: (1) expressão de glicoproteínas e transportadores ABCG2, (2) indução precoce de sinalização gênica e transduções de vias metabólicas, (3) interrupção do processo de apoptose e autofagia, (4) expressão de HSPs e (5) mudanças na formação do citoesqueleto e expressão das proteínas de adesão ¹⁰⁻¹³.

Somado aos mecanismos descritos ainda existe a divergências dos métodos aplicados como uso de fontes de luz ineficientes ou tentativas de fotoativação do fármaco em comprimentos de ondas inadequados, superdosagem do fotossensibilizante ou insolubilidade causando assim aglomeração e inativação do composto ¹⁴.

Em virtude das respostas variadas e fragilidade nos resultados divulgados, acarretando questionamentos sobre a sua aplicabilidade nos procedimentos de alta complexidade. Ainda se faz necessário, estudos que explorem os mecanismos descritos sobre geração de clones resistentes e desenvolvimento de protocolos ou guia de boas práticas em TFD que possibilite a padronização de critérios adotados para escolha do fotossensibilizante, comprimento de onda, densidade de energia e meio de veiculação do fármaco, possibilitando assim uma diminuição a disparidade de resultados e possibilitando maior emprego da técnica de forma clínica.

O presente estudo tem por finalidade avaliar a capacidade de sobrevivência de células da linhagem de câncer de Laringe Humano (HEp-2) após a TFD e evidenciar critérios para elaboração de um guia de boas práticas para aplicação da TFD utilizando o fotossensibilizante de segunda geração Alumínio Ftalocianina Tetrasulfonada.

Desta forma será adotado parâmetros de concentração do fotossensibilizante, tempo de absorção do fotossensibilizante no tecido e a menor densidade de energia para uso terapêutico na tentativa de elaborar um protocolo para analisar os mecanismos biológicos da resposta a TFD em linhagem de câncer de Laringe Humano.

2 OBJETIVOS

O presente estudo tem por finalidade avaliar a capacidade de sobrevivência de células da linhagem de câncer de Laringe Humano (HEp-2) após a TFD e evidenciar critérios para elaboração de um guia de boas práticas para aplicação da TFD utilizando o fotossensibilizante de segunda geração Alumínio Ftalocianina Tetrasulfonada. (AlPcS₄).

2.1 Objetivo Específico

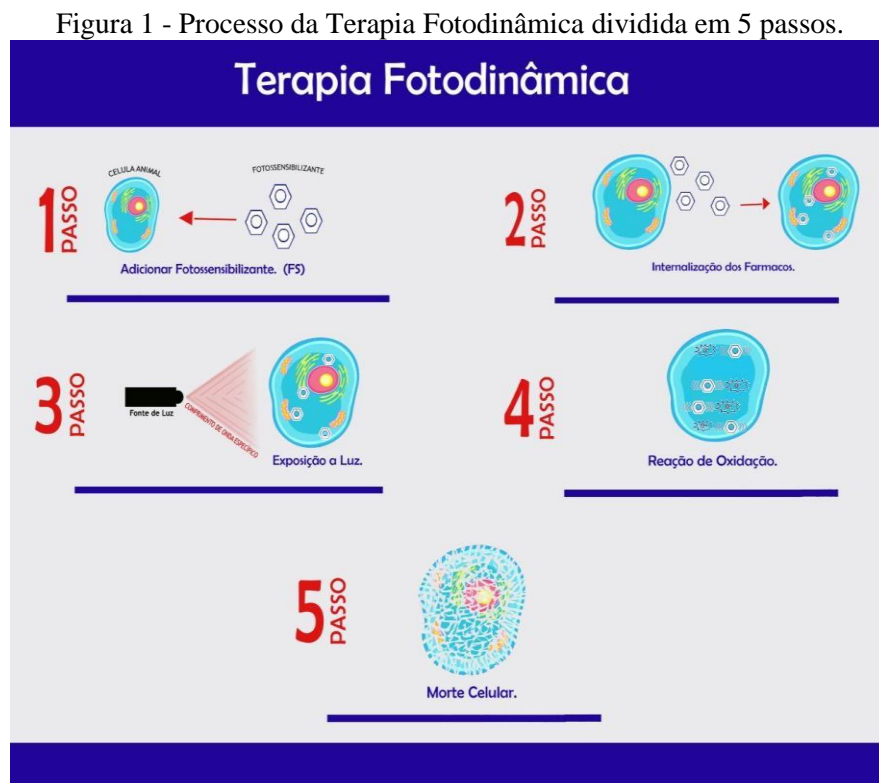
- Calcular o rendimento quântico de fluorescência da AlPcS₄, justificando assim a escolha como fotossensibilizante de estudo.
- Elaborar critérios de escolha para concentração ideal de AlPcS₄ baseada em seu espectro Uv/Visível, para aplicação de TFD em células de câncer de laringe humano.
- Avaliar o metabolismo celular pós-TFD utilizando testes colorimétricos.
- Avaliar a expressão gênica das proteínas de choque térmico envolvidas no processo de resistência a TFD em linhagem HEp-2.
- Avaliar a secreção das citocinas TNF α e IL-6 e das células Hep-2 após a TFD.

3 REVISÃO

3.1 Terapia Fotodinâmica

A terapia fotodinâmica teve sua origem por volta dos anos de 1900, em um estudo que investigava a ação do corante acridina em paramécios realizado por Oscar Raab e seu professor Hermann Von Tappeiner, em Munique. Sua ação fotodinâmica foi comprovada após observado que apenas o composto ou a luz, não eram letais às células de forma isolada. Em 1901, o termo “terapia fotodinâmica” foi criado após Von Tappeiner, descobrir que o oxigênio era necessário para o desenvolvimento dessa reação ^{9,15}.

O princípio explorado pela técnica utiliza fonte de Luz, um fotossensibilizante e oxigênio molecular, como demonstra a Figura 1, que ilustram as etapas da TFD de maneira simples.



Fonte: Autor.

O processo pode ser classificado com 3 principais fases; Sensibilização, Ativação e Dano. Entende-se como fase de Sensibilização a etapa de administração do fármaco

fotossensibilizante, sua internalização pela célula, tecido ou órgão alvo, ilustradas como passo 1 e 2 da Figura 1. Para que o fotossensibilizante chegue ao destino desejado, barreiras como membranas devem ser vencidas, assim uma das características almejadas para o sucesso do fotossensibilizante é sua formulação química com aspectos anfifílicos^{2,16,17}.

Uma vez que o fotossensibilizante se encontra dentro da célula alvo se inicia a etapa de ativação, ilustrada pelo passo 3 na Figura 1, processo o qual o fotossensibilizante é exposto a um comprimento de luz específico que desencadear uma reação fotoquímica que gera oxidação ao tecido tratado. Tais reações podem ser ilustradas pelo passo 4 da Figura 1, que por sua vez, irão induzir a morte celular por diferentes mecanismos e conseqüentemente ocasionar na destruição dos tecidos como ilustrado no passo 5¹⁸⁻²⁰.

É importante se lembrar que as gerações de fotossensibilizantes que se sucederam tiveram como principal evolução a modificação para melhora da absorção e biodisponibilidade dos fotossensibilizantes nos tecidos alvos. Tais modificações deram características a gerações de fotossensibilizantes que podem ser classificadas em três gerações até o momento²¹.

A primeira geração de fotossensibilizantes teve sua maior exploração, em meados dos anos 60 e 70, que intensificou-se o interesse pela técnica com a descoberta dos efeitos de derivados da hematoporfirina, assim iniciando o processo de desenvolvimento de fármacos fotossensibilizantes de uso comercial como o ácido 5- delta aminolevulínico (5-ALA) e o Porfimer sódico (Photofrin®), tornando a técnica viável para comunidade científica e médica^{9,22}. O desenvolvimento do fotossensibilizante Photofrin® foi essencial para a ampliação da área de pesquisa, contudo devido a sua fotossensibilidade cutânea foi sendo substituída por fotossensibilizantes de segunda geração, utilizando a fórmula estrutural da molécula da porfirina para modelar novos fotossensibilizantes como Clorinas, Ftalocianinas e Texafirinas^{23,24}.

Com a evolução dos fotossensibilizantes, algumas características foram sendo selecionadas visando a busca por um fotossensibilizante ideal, motivo do salto de gerações das tecnologias envolvidas em sua produção. Desta forma para que a TFD seja explorada de forma eficiente o fotossensibilizante, necessita ser não reativo quando em ausência de luz e atóxico, anfifílico para que não possua problemas de solubilidade, eficiente na geração de espécies reativas e ser ativado dentro da janela óptica entre o infravermelho e o vermelho para melhor penetração nos tecidos durante os tratamentos^{17,24}.

A segunda geração possui em sua própria estrutura química características lipofílicas ou até mesmo anfipática (característica hidro e lipo solúvel), fator importante para seu sucesso na biodisponibilidade e bioacumulação, uma vez que a hidrofilicidade garante seu transporte através dos líquidos corporais sem ocorrer agregação, e a lipofilicidade garante a entrada de forma fluida dentro das células alvos através de fusão com suas membranas ou incorporação através de transportadores passivos.¹⁷

Dentre os fotossensibilizantes da segunda geração destacam-se as Ftalocianinas por absorver em comprimento de onda entre 650-680 nm, vermelho-visível, que segundo Sharman, (1999), ressalta que a faixa espectral de penetração nos tecidos eficiente devido a ausência de interferentes como cromóforos endógenos capazes de absorver em tais comprimentos de onda^{25,26}. Além disso a complexação das ftalocianinas com íons metálicos como Zn^{2+} e Al^{3+} , são responsáveis por atribuírem as características aos compostos formados como aumento do rendimento quântico, melhorando o tempo de vida dos estados excitados singlete e tripleto²⁷⁻²⁹. Atualmente um exemplo comercial de ftalocianina de uso clínico é o Photosens®, um fotossensibilizante derivado alumínio ftalocianina sulfonada, utilizando na Rússia em tratamentos de cânceres de cabeça e pescoço, lesões cutâneas e endobronquiais entre outros males^{30,31}.

A terceira geração foi desenvolvida utilizando o conceito de otimização da biodisponibilidade, com carreadores como acessórios que aumentavam a permeabilização e do fotossensibilizante nas células alvo de forma mais eficiente e específica utilizando nanoestruturas sinalizadas com proteínas, açúcares ou material genético^{24,32}.

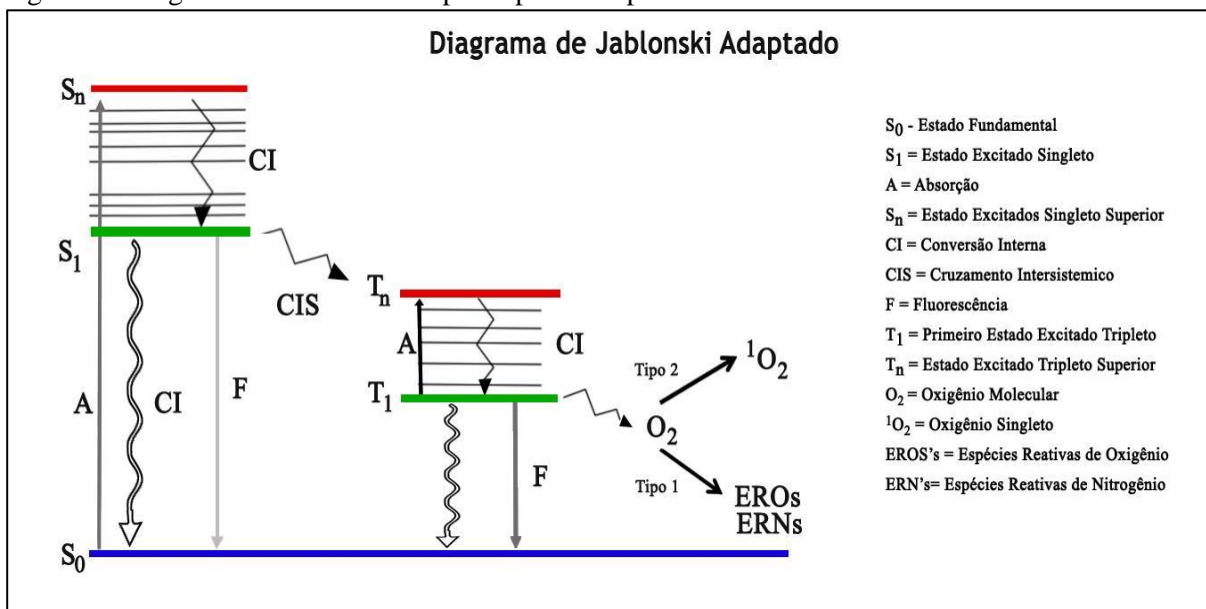
A escolha do fotossensibilizante dependerá do tipo de tratamento a ser empregue, por exemplo; tratamentos de doenças dermatológicas, lesões ou infecções superficiais, demanda o uso de formulações de aplicação tópica ou intradérmica, já tumores, nódulos e infecções internas podem, por sua vez, estarem localizados em regiões de difícil acesso necessitando de uma formulação farmacológica que facilite o transporte do fotossensibilizante ao sítio de ação, normalmente por meio da administração de forma endovenosa ou intramuscular, maneiras que diminuem as barreiras a serem vencidas pelos fotossensibilizantes melhor biodisponibilidade.

O processo de irradiação para ativação do fotossensibilizante depende de uma fonte de luz compatível com seu espectro de absorção, contudo para melhor eficiência do processo é ideal que o fotossensibilizante tenha sua banda de ressonância localizada na “janela

terapêutica” de comprimento de onda situada entre 600 e 800 nm, região de máxima penetração da luz nos tecidos biológicos^{3,33}.

A reação de ativação do fotossensibilizante já foi adaptada inúmeras vezes na literatura utilizando o diagrama do físico Aleksander Jabłoński, a Figura 2 ilustra a reação que ocorre durante a TFD. A molécula de fotossensibilizante é excitada por uma fonte de luz e as moléculas saem de seu estado fundamental (S_0) e partem para um estado excitado denominado de Singleto (S_n), por ser um estado muito energético e extremamente entrópico as moléculas sofrem uma pequena perda de energia retornando para um estado de menor energia denominado de Singleto 1 (S_1), através de um processo físico chamado de conversão interna (CI)⁶.

Figura 2 - Diagrama de Jablonski adaptado para Terapia Fotodinâmica.



Fonte: Adaptado de Luiz (2019)³⁴.

Durante o estado S_1 os elétrons buscam a estabilidade energética do estado fundamental S_0 , para isso é necessário perder a energia, tal processo pode ocorrer por conversão interna, liberação em forma de calor ou pelo mecanismo de fluorescência (F).

Contudo durante o processo de estabilização energética pode ocorrer o evento denominado de cruzamento intersistemas (CIS) onde os elétrons não conseguem chegar ao estado Fundamental pôr a sua energia continuar alta e se torna uma molécula no estado excitado Triplete (T_1).

O estado T_1 é um estágio de transição energética, inferior ao S_1 , onde a molécula pode retornar ao estado fundamental através dos mesmos mecanismos do S_1 , fosforescência ou conversão interna³⁵. Contudo durante o estado T_1 do fotossensibilizante, é possível que ele reaja com algumas moléculas do ambiente, trocando cargas e rompendo ligações. O principal alvo dessas reações tende a ser o oxigênio molecular resultando assim, nas reações de tipo 1 e 2 de produção de espécies reativas.

A reação do tipo 1 ocorre com o fotossensibilizante no estado Triplete que transfere energia para moléculas de oxigênio e nitrogênio, rompendo ligações e formando espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, já a reação do tipo 2, transfere energia para o oxigênio molecular (O_2), o excitando a um estado denominado de Oxigênio Singleto (1O_2) tal estado do oxigênio é capaz de produzir reações oxidativas quando em contato a outras moléculas, assim ocorre o processo fotodinâmico.

Além dos fatores como dose de energia utilizada durante a irradiação, biodisponibilidade do fotossensibilizante, a eficiência da terapia depende do rendimento quântico da produção de espécies reativas do fotossensibilizante. A relação do fotossensibilizante e seu rendimento quântico de produção de espécies reativas é o que atribui sua eficiência a tratamento, uma vez que rendimento quântico é um resultado obtido através da razão entre os fótons emitidos e os fótons absorvidos³⁵.

Dentro da física o rendimento quântico pode ser relacionado de inúmeras formas como rendimento quântico de espécie reativas produzidas por um reagente, rendimento quântico de oxigênio singleto produzido em uma reação e rendimento quântico de fluorescência de um determinado composto. Entre todos, o rendimento quântico de fluorescência é a forma mais simples e acessível de se calcular a eficiência do fotossensibilizante estudado, uma vez que substâncias altamente fluorescentes normalmente são agente fotodinâmicos pouco eficientes pois possuem uma baixa produção de moléculas excitadas no estado T_1 resultando em baixa transferência de energias para moléculas como o oxigênio molecular²⁹.

O cálculo do rendimento quântico de fluorescência é dado pela comparação entre um fotossensibilizante de estudo e um fotossensibilizante padrão que emita no mesmo comprimento de onda, utilizando a Equação 1 descrita através dos estudos de Crosby e Demas, (1971)³⁶;

Equação 1 - Cálculo do Rendimento Quântico de Fluorescência.

$$\phi f_{amostra} = \frac{(\text{Área amostra})}{(\text{Área padrão})} \times \frac{(\text{Absorbância padrão})}{(\text{Absorbância amostra})} \times \frac{(n \text{ padrão})}{(n \text{ amostra})} \times \phi f_p \quad (1)$$

Fonte: Crosby e Demas (1971)³⁵.

Na equação, ϕf é o rendimento quântico de fluorescência, a área é a integral das bandas de emissão compatíveis com o comprimento de onda excitatório e n é o índice de refração do solvente utilizado. O resultado obtido pela equação encontra-se no intervalo de $0 > \phi f > 1$, quando o resultado de um fotossensibilizante de estudo é próximo a 0 entende-se que possui uma alta eficiência no uso terapêutico, quando o resultado é próximo a 1 o fotossensibilizante não possui uma boa eficiência fotodinâmica para uso²⁹.

3.2 Mecanismos Resistência a Terapia Fotodinâmica

Uma das limitações da utilização da TFD como tratamento contínuo ou de longa duração é o possível mecanismo de resistência a drogas que as células podem desenvolver quando são expostas ao agente fotossensibilizante por sucessivas vezes ou longos períodos de tempo segundo Casas *et al.* (2015)¹¹.

Desta forma Casas descreve a resistência à TFD ancorada em pontos específicos como:

- (1) Expressão de glicoproteínas e transportadores ABCG2;
- (2) Indução precoce de sinalização gênica e transduções de vias metabólicas;
- (3) Interrupção do processo de apoptose e autofagia;
- (4) Expressão das proteínas de choque térmico (HSP's);
- (5) Mudanças na formação do citoesqueleto e expressão das proteínas de adesão.

Entende-se que a expressão das proteínas HSP's desempenham um papel importante na sobrevivência celular, pois são ativadas como mecanismo de resposta a estímulos externos que ameacem a sobrevivência celular, como aumento da temperatura, mudança de pH ou interação com substâncias ou organismos exógenos^{11,37,38}.

As HSP's podem ser divididas em seis principais famílias:

- *small* HSP's – Proteínas menores que 40 Kda
- HSP40 – proteínas maiores que 40 Kda e menores que 60 Kda
- HSP60 – Proteínas maiores que 60 e menores que 70 Kda

- HSP70 – Proteínas maiores que 70 Kda e menores que 100 Kda
- HSP100 - Proteínas maiores que 100 Kda

Essas proteínas auxiliam no dobramento de novas proteínas formadas em ambientes estressores ou interagem com outras proteínas já danificadas as induzindo a degradação ou reparo ³⁹. Outra característica desempenhada por algumas HSP's é a capacidade de inibição ou ativação de vias sinalizadoras como a via do apoptose que sofre grande influência de proteínas como a HSP 27 ⁴⁰.

A proteína GRP78 (HSPA5) é controlada pela glicose encontrando-se no lúmen do retículo endoplasmático, tendo como principal função o deslocamento proteico. No câncer, a GRP78 é frequentemente translocada para a membrana plasmática, sendo responsável pela ativação da via de sinalização AKT, tal via é responsável pela inibição de um dos sinais desencadeados da via intrínseca da apoptose, por meio da interação com fosfatidilinositol 3-quinases (PI3K) ⁴¹.

Já a HSP70 (HSPA9) é encontrada no interior mitocondrial, possuindo como funções a regulação da diferenciação celular e na tumorigênese, por associação com a proteína p53 ⁴². A proteína HSP 90 atua como chaperona no enovelamento e estabilização de várias proteínas, incluindo receptores, quinases, fatores transcricionais e telomerasas, podendo atuar na célula tumoral estabilizando grande número de proteínas. Esta atividade ocorre em particular nas oncoproteínas como; B-RAF, C-KIT, ErbB2, K-RAS e a P53, responsáveis por sinalização de sobrevivência ou proliferação de células carcinogênicas ⁴³.

3.3 Resposta Imunológica Pós Terapia Fotodinâmica

Alguns estudos demonstraram que quando administrada em tecidos normais e tumorais a TFD promove processo inflamatório estimulando a produção de citocinas inflamatórias de forma que essas substâncias irão induzir a migração de neutrófilos e macrófagos para a região das células tumorais promovendo atividade tumoricida ^{44,45}.

Algumas dessas citocinas demonstram comportamento similar executando atividade pró-inflamatórias. Segundo Yom *et al.* (2003) foram detectados em pacientes após cirurgia e TFD, níveis elevados de IL1 β , IL6, IL8 e IL 10 em mesotelioma (tumor do tecido que reveste os pulmões). Situação semelhante foi observada nos estudos de KICK *et al.* (1995) e GOLLNICK *et al.* (1997) uma vez que após a aplicação de TFD os níveis de IL6 se elevaram em comparação a outros mediadores, Wang *et al.* (2013) também relata em seus

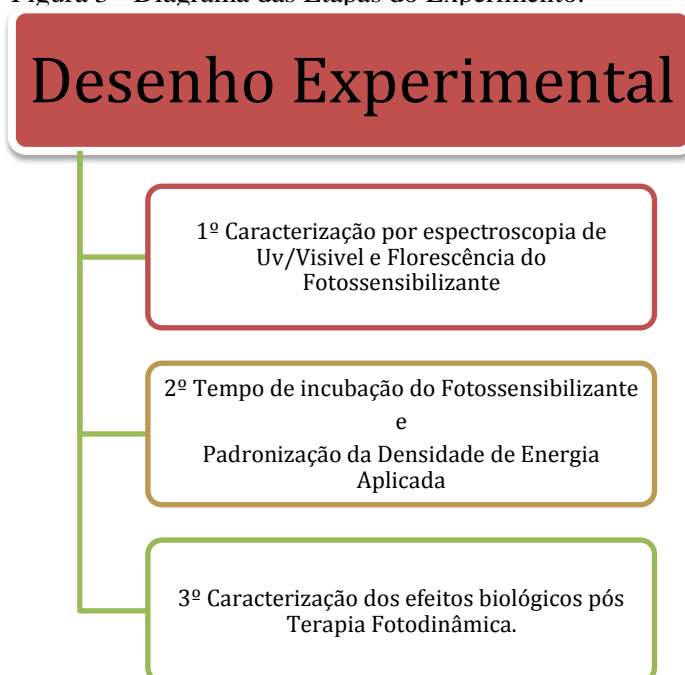
experimentos, aumento da expressão de TNF- α após semanas do tratamento de camundongos expostos a UVB ⁴⁶⁻⁵⁰.

Assim é importante destacar a atuação das citocinas IL-6 e TNF- α como citocinas envolvidas principalmente na imunidade inata, desempenhando papéis na atividade pró-inflamatória e na apoptose de organismos exógenos ou células cancerígenas ^{51,52}. A IL-6 é uma classe de proteínas solúveis atuantes na proliferação celular, diferenciação e apoptose. Já a TNF- α é uma citocina pró-inflamatória e atuante na apoptose, que estimula o recrutamento de macrófagos principalmente em células tratadas com TFD ^{47,53-55}.

4 METODOLOGIA

O presente estudo foi desenvolvido em etapas como descritas na Figura 3, onde a 1ª etapa foi a caracterização do Fotossensibilizante, a 2ª etapa foi a padronização dos parâmetros de concentração e dose de energia para a terapia e a 3ª etapa foi a avaliação dos efeitos biológicos utilizando os parâmetros de concentração do fotossensibilizante e dose de energia estabelecidas na 2ª Etapa.

Figura 3 - Diagrama das Etapas do Experimento.



Fonte: Autor.

4.1 Diluição e Caracterização das Propriedades Fotofísica da Alumínio Ftalocianina Tetrasulfonada (AlPcS₄)

O Fotossensibilizante utilizado nesse estudo é a Alumínio Ftalocianina Tetrasulfonada (AlPcS₄) (Porphyrin Frontier Scientific, Logan, UT, USA) diluída em Tampão Fosfato 1X (PBS) armazenada ao abrigo da luz sobre a temperatura de 4°C ⁵⁶

Para encontrar a melhor concentração de trabalho efetuou-se uma diluição seriada do fotossensibilizante AlPcS₄ em PBS. Partindo da amostra concentrada de 1 mM para diluições de 1 µM; 2 µM; 3 µM; 4 µM e 5 µM.

Com o intuito de padronizar e garantir linearidade nas diluições, realizou-se curva de calibração das alíquotas da solução de AlPcS₄, com o objetivo de se obter uma relação proporcional como previsto pela Lei de Lambert e Beer, simulando assim um ambiente passível de estipulação da concentração da amostra utilizando a equação da reta gerada a partir da calibração⁵⁷.

A análise de absorção foi realizada no equipamento Espectrofotômetro Cary-50 (Varian, Inc), localizado no laboratório multiusuário do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento (IP&D) na Universidade do Vale do Paraíba – UNIVAP.

4.1.1 Análise do Espectro de Absorção e Emissão do Fotossensibilizante

A análise de absorção e fluorimetria foram realizadas nos equipamentos Fluorímetro Varian Cary Eclipse (Varian, Inc) e Spectrofluorometer FS5 (Edinburgh Instruments), instalados no Laboratório Multiusuário do Departamento de Biofísica da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP e Laboratório de Nanomateriais e Nanotoxicologia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP).

Foram analisadas as amostras de Alumínio Ftalocianina Tetrasulfonada (AlPcS₄) diluídas em PBS, na concentração de 0,6 µM e comparadas ao Zinco ftalocianina diluída em DMSO, na concentração de 2 µM para a realização do cálculo do Rendimento Quântico, Equação 1, do Fotossensibilizante.

4.1.2 Escolha da concentração

Após a análise dos espectros de absorção e a cálculo do rendimento quântico de fluorescência utilizamos a maior concentração encontrada no espectro UV/Visível não ultrapassando a medida de 100% do equipamento, para fornecer o maior número possível de moléculas disponíveis com um baixo o risco de aglomeração do fotossensibilizantes, dentro dos parâmetros estabelecidos anteriormente.

4.2 Padronização da Técnica

4.2.1 Linhagem Celular

A linhagem celular utilizada foi a Hep-2, proveniente de carcinoma de laringe humano. A cultura foi adquirida no Banco de Células do Rio de Janeiro e mantidas em garrafas de 25cm², utilizando meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM), suplementado com 10% (vol/vol) de soro fetal de bovino, 1% Antibiótico-antimicótico (penicilina e estreptomicina) a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂.

4.2.2 Irradiação

A irradiação foi feita no Equipamento de LED - Biopdi/IRRAD-LED 660 nm (Biopdi, São Carlos, São Paulo, Brasil), dispositivo composto por 54 LEDs em seu interior, responsáveis pela irradiação da placa ou garrafa depositada no equipamento, cada LED possui 70 mW de potência, totalizando uma intensidade de 25 mW/cm², emitindo em 660 ± 5 nm e cobrindo uma área de 150 cm².

A densidade de Energia (I) foi calculada utilizando a Equação 2;

Equação 2 - Densidade de Energia.

$$I = \frac{(54 \times 70 \text{ mW})}{152 \text{ cm}^2} \quad (2)$$

Fonte: Fontana *et al.* (2017)⁵⁸.

A fluência (F) também pode ser calculada de acordo como o protocolo descrito por Fontana *et al.* (2017) com a Equação 3⁵⁸;

Equação 3 - Fluência

$$F = 25 \frac{\text{mW}}{\text{cm}^2} \times t(\text{s}) \quad (3)$$

Fonte: Fontana *et al.* (2017)⁵⁸.

4.2.3 Curva de Resposta a Dose de Energia

As células foram plaqueadas na densidade de 1×10^4 células/poço em microplacas pretas de fundo chato e transparente com tampa de 96 poços e 24 h após o meio de cultura foi retirado e as células foram lavadas duas vezes com tampão fosfato salino 1x (PBS). Em seguida, adicionou-se AlPcS₄, para verificar a eficácia da terapia fotodinâmica após a variação da densidade de energia assim, baseado em protocolos do grupo de pesquisa a concentração escolhida foi de 5 µM/mL, aplicou-se 200 µL da solução de AlPcS₄ e se incubou por 1 h em estufa a uma temperatura de 37 °C e 5 % CO₂^{20,56}. Ao término deste período, a solução de AlPcS₄ foi retirada, as células foram lavadas novamente duas vezes e finalmente irradiadas em PBS.

Assim foram divididos 6 grupos sendo eles: 0 J/cm², células sem o fotossensibilizante e não irradiadas; TFD com 5 J/cm²; 10 J/cm²; 15 J/cm²; 20 J/cm² e 25 J/cm² de fluência.

Após a irradiação, descartou-se o PBS e se adicionou meio de cultura DMEM, retornando as células a estufa para serem incubadas a 37 °C em atmosfera de 5 % CO₂ durante 24 horas para posterior avaliação da capacidade clonogênica.

Adotou-se como dose padrão para os testes posteriores a menor dose de energia a atingir uma redução populacional de 50% no ensaio colorimétrico com Cristal Violeta.

4.2.4 Variação de Tempo de Incubação para Resposta da terapia

As células foram plaqueadas na densidade de 1×10^4 células/poço em microplacas pretas de fundo chato e transparente com tampa de 96 poços, 24 h após o meio de cultura foi retirado e as células foram lavadas duas vezes com tampão fosfato salino 1x (PBS).

Em seguida variou-se o tempo de incubação em 1 e 24 Horas, utilizando placas diferentes, assim adicionou-se 200 µL da solução de AlPcS₄ diluída em meio DMEM sem indicador Fenol na concentração resultante da avaliação dos espectros. Ao término deste período, a solução de AlPcS₄ foi retirada, as células foram lavadas duas vezes com PBS e irradiadas utilizando a densidade de energia obtida no ensaio da curva de dose resposta de energia. Para avaliação do experimento utilizou-se do teste de capacidade clonogênica, Cristal Violeta.

Utilizou-se como critério de seleção para o tempo de incubação, o grupo demonstra maior viabilidade de aplicação clínica comparado a redução populacional demonstrado no ensaio de capacidade clonogênica.

4.3 Caracterização dos Efeitos da Terapia *in vitro*

Para o estudo as células foram divididas em 5 Grupos;

- Grupo Controle, células Hep-2 ausente de tratamento;
- Grupo AIPcS₄, células incubadas com 5 µM do fotossensibilizante AIPcS₄ e incubadas na ausência de luz;
- Grupo Luz, células expostas à irradiação de 5 J/cm² do dispositivo de LED - Biopdi/IRRAD-LED 660 nm;
- Grupo TFD, células incubadas com 5 µM do fotossensibilizante AIPcS₄ e expostas à irradiação de 5 J/cm² do dispositivo de LED - Biopdi/IRRAD-LED 660 nm;

Ao fim de cada experimento, o sobrenadante foi coletado e armazenado sob refrigeração (-20°C) com para posterior quantificação de citocinas pró-inflamatórias (TNF-α e IL-6), pelo teste imunoenzimático (ELISA).

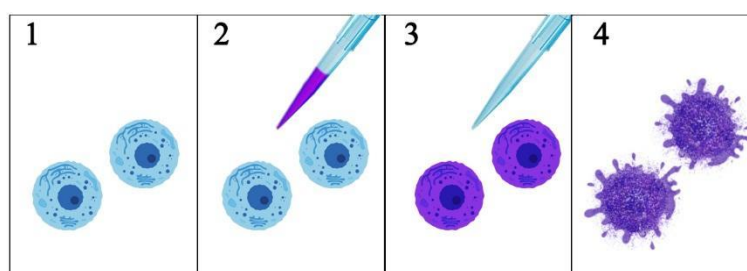
4.3.1 Capacidade Clonogênica - Cristal Violeta

Após os períodos de 24 e 48 horas de avaliação do tratamento As células foram lavadas com salina tamponada com fosfato (PBS - Gibco) a 37 °C, para a remoção das células não aderidas, e incubadas com 100 µL da solução de Cristal violeta (2,5g Cristal Violeta; 0,85g NaCl; 15,5 mL Etanol 95%; 28 mL H₂O destilada; 16,5 mL Paraformaldeído) por três minutos em temperatura ambiente. Após o período de incubação as placas foram lavadas com água corrente para retirada do excesso do corante e as células foram incubadas com 200 µL da solução de eluição de Dodecil sulfato de sódio (SDS) durante 1h. Ao término do período de incubação efetuou-se a leitura no espectrofotômetro (SpectraCount Packard) com o comprimento de onda de 570 nm.

A coloração por violeta de metila reflete a perda da monocamada celular por meio da quantidade total de ácido nucléico, utilizando assim a Figura 4 é possível ilustrar as etapas de coloração e revelação do ensaio. Na Figura 4, quadro número 1 e 2 as células são expostas a solução corante de Cristal Violeta, no quadro 3 as mesmas passaram pelo tempo de exposição

e foram lavadas com uma solução tampão, assim restando apenas as células aderidas na placa e assim é adicionado um solvente orgânico para romper as células e solubilizar o cristal violeta, por fim no quadro 4 as células foram lisadas e o corante agora está disponível em todo o poço da placa de cultura para ser analisado dentro do espectrofotômetro. Assim são quantificadas mudanças quando se compara os tratamentos ao grupo controle resultando na alteração no número de células aderidas ^{59,60}.

Figura 4 - Ilustração das Etapas de Coloração e Revelação do Ensaio de Coloração com Cristal Violeta.



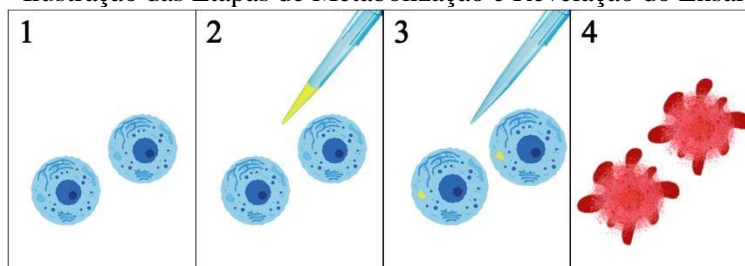
Fonte: Autor.

4.3.2 Atividade Mitocondrial - MTT

Após os períodos de 24 e 48 horas de avaliação do tratamento as células foram lavadas com PBS a 37 °C, para a retirada daquelas não aderidas, em seguida foram incubadas com 100 µL da solução de MTT {brometo de [3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5 difeniltetrazólio]} (Sigma®) por duas horas em temperatura ambiente. Após esse período a solução foi descartada e adicionou-se 200 µL de dimetilsulfóxido (DMSO), em seguida foi agitada em Incubadora Refrigerada de Bancada - Cientec a 100 rpm por 30 minutos, sendo todo o processo realizado ao abrigo da luz, pois as substâncias geradas são sensíveis a luz. Com o término do período de incubação, realizou-se a leitura no espectrofotômetro SpectraCount a $\lambda=570$ nm.

Esse método é constituído na avaliação da atividade mitocondrial, Ilustrado pela Figura 5, ele consiste na absorção do sal MTT {brometo de [3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5 difeniltetrazólio]} pelas células representado na Figura 5, nos quadros 1 e 2, sendo convertido no interior da mitocôndria a um produto chamado formazan, representado no quadro 3, quando acumulada no citoplasma ela será extraída ao adicionar um solvente apropriado como ilustrado no quadro 4 ⁶¹.

Figura 5 - Ilustração das Etapas de Metabolização e Revelação do Ensaio de MTT.



Fonte: Autor.

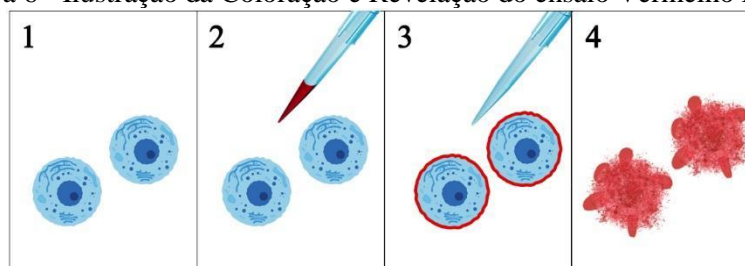
4.3.3 Atividade Lisossomal – Vermelho Neutro

Após os períodos de 24 e 48 horas de avaliação do tratamento, os grupos foram incubados com 200 μ L corante vermelho neutro por um período de 2 horas a 37 ° C em atmosfera de 5% de CO₂. Em seguida, foi retirado o excesso de corante e incubadas com 200 μ l da solução de eluição e efetuada a leitura no espectrofotômetro (SpectraCount TM BS10001- Packard) com o comprimento de onda de 490 nm.

A Figura 6 ilustra as etapas de coloração e revelação do corante vermelho neutro, sendo os quadros 1 e 2 a exposição ao corante, quadro 3 a incorporação da células após a remoção do excesso dele através da lavagem com solução tampão e exposição ao solvente orgânico para lise da célula e solubilização do corante, por fim o 4 quadro que ilustra a exposição do corante que antes estava nas membranas e lisossomos para leitura no espectrofotômetro.

O vermelho neutro é um corante vital, solúvel em água e que passa através da membrana celular, concentrando-se nos lisossomos. As células vivas incorporam o vermelho neutro nos seus lisossomos e membranas, assim a perda de absorção em relação ao controle corresponde à perda de viabilidade celular⁶².

Figura 6 - Ilustração da Coloração e Revelação do ensaio Vermelho Neutro.



Fonte: Autor.

4.3.4 Quantificação de Citocinas - Ensaio Imunoenzimático ELISA

Placas de microtitulação de 96 poços (Nunc) foram sensibilizadas com anticorpos de captura anti-TNF- α e anti-IL-6 de humanos (Kits R&D Systems, NE) mantidas *overnight* em temperatura ambiente. No dia seguinte, as placas foram lavadas com PBS contendo Tween 20 (PBS-T) e bloqueadas com soro albumina bovina (BSA, 0,1%) por 1 hora. Após as placas foram lavadas com PBS-T, seguido pela adição dos sobrenadantes da cultura de células (100 μ L por poço) e os padrões das citocinas com concentrações conhecidas (curva-padrão). Os testes foram realizados em duplicata. Após duas horas de contato com os sobrenadantes, as placas foram lavadas (PBS-T), após foram acrescentados os anticorpos de detecção anti-TNF- α e anti-IL-6 marcados com biotina. Após 2 horas de incubação a reação foi revelada com solução contendo substrato cromogênico e peróxido de hidrogênio. A reação colorimétrica foi bloqueada, após 20 minutos, com ácido sulfúrico 2N. As densidades ópticas (DO) foram obtidas no leitor de microplacas (Biotek ELx 808) com comprimento de onda de 450 nm e analisados estatisticamente através do programa GraphPad Prism 5.0.

4.3.5 Extração de RNA Total

A extração de RNA total foi realizada utilizando o reagente TRIzol (Thermo Fisher Scientific, Gibco, Waltham, MA, EUA), assim o meio foi retirado da placa de 6 poços e se acrescentado 500 μ l do reagente por poço adaptando o protocolo publicado por Chomczynski e Sacchi (1987)⁶³. A concentração de RNA foi determinada por espectrofotometria utilizando o NanoDrop Thermo TRIzol (Thermo Fisher Scientific, Gibco, Waltham, MA, EUA) e a integridade das amostras extraídas foi analisada por meio de eletroforese em gel de agarose sob condições desnaturantes. As amostras foram utilizadas para a síntese de cDNA.

4.3.5.1 Síntese de cDNA

Três amostras de RNA adquiridas em três experimentos distintos foram primeiramente tratadas com DNase I (Promega, Madison, Wisconsin, EUA) utilizando 1 μ l de RNA e 1 μ l de DNase. A síntese da primeira fita de cDNA foi realizada utilizando os RNAs tratados com DNase empregando o kit GoScript™ Reverse Transcriptase reverse (Promega, Madison, Wisconsin, EUA), de acordo com as instruções do fabricante.

A concentração do cDNA foi estimada utilizando o protocolo estabelecido no laboratório avaliando a quantidade de entrada de RNA na reação e estimando a quantidade de cDNA que formada ao término dela, estes serão diluídos para 12 ng/ μ L para utilização nos experimentos de RT-qPCR (reação da transcriptase reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase em tempo real).

4.3.5.2 RT-qPCR para Avaliação da Expressão Gênica

A análise da expressão dos genes estudados neste trabalho foi realizada por meio da técnica de RT-qPCR e da metodologia Syber Green, utilizando o equipamento StepOnePlus Real Time System (Applied Biosystems). Três amostras de RNA provenientes de experimentos independentes foram utilizadas para cada um dos pontos analisados e as reações realizadas em duplicata. Oligonucleotídeos iniciadores específicos desenhados, representados na Tabela 1, tiveram sua especificidade confirmada por meio de buscas no genoma de Humano utilizando a ferramenta Blast e por meio da análise da curva de dissociação de cada um dos oligonucleotídeos utilizados.

Os experimentos de RT-qPCR foram realizados utilizando o kit GoTaq® qPCR Master Mix (Promega, Madison, Wisconsin, EUA), usando 5 ng de cDNA e 2 μ L de cada oligonucleotídeos iniciador, em reações de 12,5 μ L. O ciclo da PCR consistiu em 95 °C por 10 min, seguido de 40 ciclos de 95 °C por 15 s e 60 °C por 1 min. A curva de dissociação foi gerada ao final de cada corrida para verificação da especificidade dos oligonucleotídeos utilizados. Todos os procedimentos e metodologias adotadas para a realização de RT-qPCR foram baseados em estudos prévios^{64,65}.

Tabela 1 - Genes Avaliados e seus Primers (continua...)

| Genes | Primers |
|-------|--------------------------------------|
| HSP27 | F 5' - GAT GTC AAC CAC TTC GCC CC-3' |
| | R 5' - AGA TGT AGC CAT GCT CCT-3' |
| HSP70 | F 5' - TTG TGC AGT TGC CTA CAG GA-3' |
| | R 5' - GCA GTC ACT TGC TCA GTG GT-3' |

Tabela 1 - Genes Avaliados e seus Primers (conclusão)

| | |
|-------|--------------------------------------|
| GRP78 | F 5' - CAA GCA ACC AAA GAC GCT GG-3' |
| | R 5' - CTG CCG TAG GCT CGT TGA T-3' |
| HSP90 | F 5' - GAT GAG CAG TAC GCT TGG GA-3' |
| | R 5' - TCC ACG ACC CAT AGG TTC AC-3' |
| BGN | F 5' - ATCCCCAAAGACCTCCCTGA-3' |
| | R 5' - CCAGTTCGATGGCCTGGATT-3' |
| DCN | F 5' - TCAAGTGACTTCTGCCACC-3' |
| | R 5' - GAGCGCACGTAGACACATCT-3' |
| SOD2 | F 5' - CTGCTTGTCCAAATCAGG-3' |
| | R 5' - GTGCTCCCACACATCAAT-3' |

Fonte: Autor.

4.4 Análises Estatísticas

Para a realização das análises estatísticas dos testes foram realizados em triplicatas com o menor número de amostral sendo 3, assim a média das repetições foram utilizadas para as comparações estatísticas.

A significância estatística dos demais testes foi determinada utilizando os testes de ANOVA one way e two way, confirmados pelo teste de Tukey com a significância admitida de $P < 0,05$.

Para a realização das análises estatísticas e plotagem dos gráficos foi utilizado o software GraphPad Prism 6® (GraphPad Inc., La Jolla, CA). As representações gráficas dos resultados possuem em destaque os grupos que resultam em significância estatística quando comparados ao grupo Controle, Tabela 3 ilustra as legendas presentes nas representações gráficas.

Tabela 2 - Referência dos intervalos de valores estatísticos representados nos Gráficos.

| P Valor | Relevância Estatística | Representação |
|----------------|------------------------|---------------|
| < 0,0001 | Extrema Significância | **** |
| 0.0001 a 0.001 | Extrema Significância | *** |
| 0.001 a 0.01 | Grande Significância | ** |
| 0.01 a 0.05 | Significância | * |

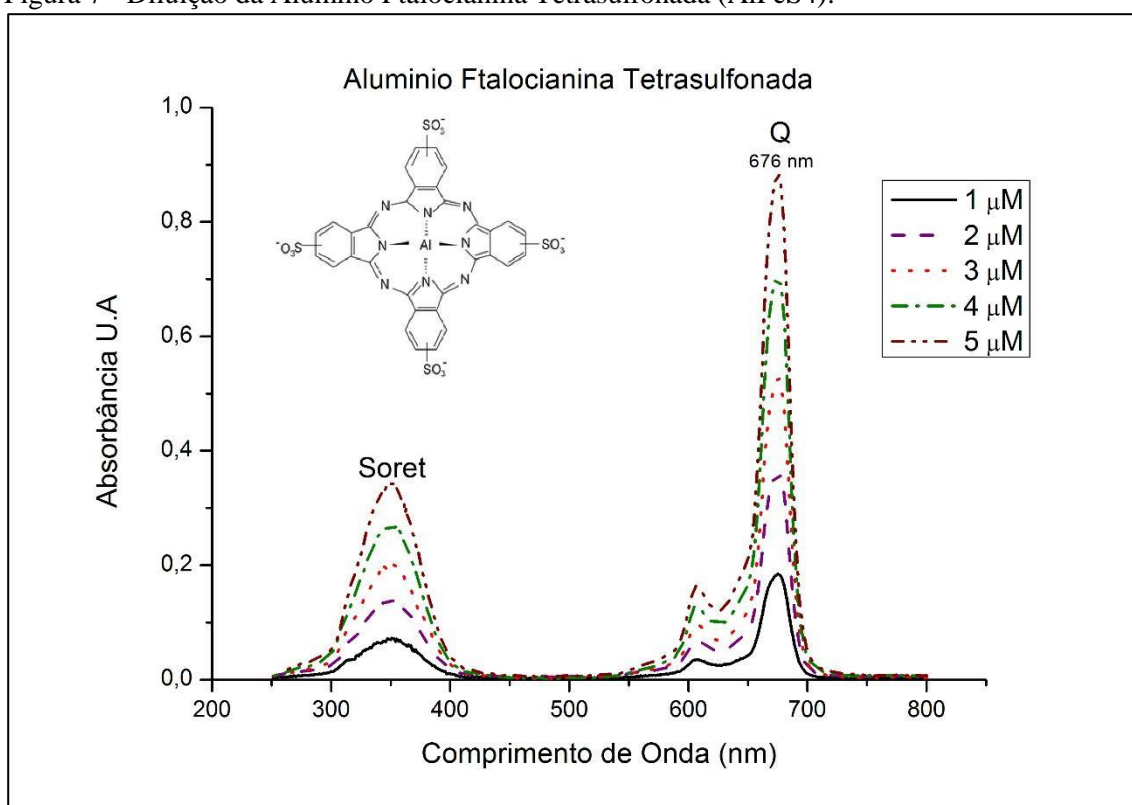
Fonte: Adaptado do Graphpad ⁶⁶.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Curva de calibração da AlPcS4 e análise do espectro de absorção Uv/Visível

A curva de calibração da Alumínio Ftalocianina Tetrasulfonada (AlPcS₄) está representada pelo espectro de absorbância das amostras fracionadas na Figura 7, onde é possível notar a formação da banda de Soret na região de 350 nm e a banda Q com o pico mais intenso em 676 nm, banda que atribui característica as Ftalocianinas (673 ±5 nm). Comparando as concentrações entre si de forma qualitativa é possível notar graficamente uma proporcionalidade gerada pelo aumento da concentração do fotossensibilizante, também é importante notar que a AlPcS₄ possui em seu espectro uma característica favorável de absorção dentro da janela óptica de 600 a 800 nm favorecendo maior penetração da luz e facilidade de ativação do fármaco em terapias³³.

Figura 7 - Diluição da Alumino Ftalocianina Tetrasulfonada (AlPcS₄).

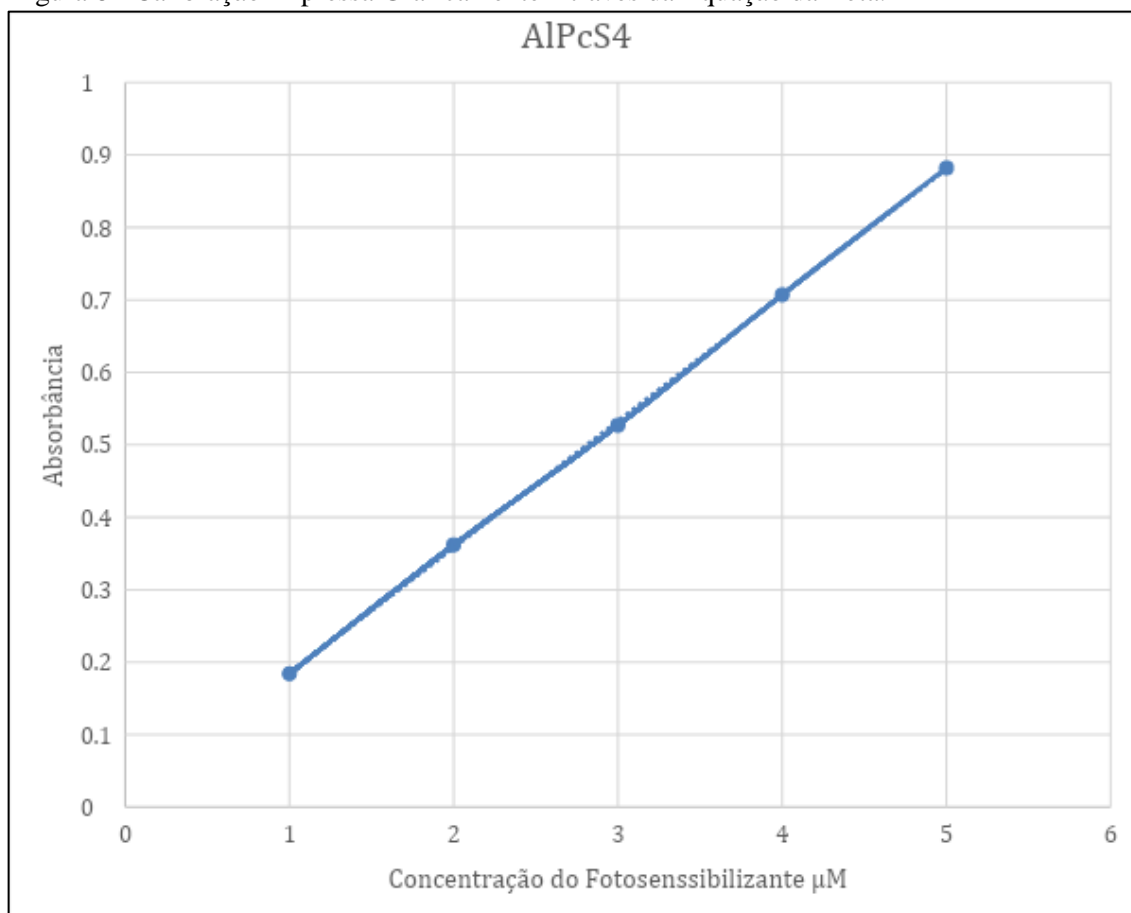


Fonte: Autor.

Como forma de controle da diluição efetuou-se o cálculo de calibração utilizando a absorção obtida através da análise do pico de 676 nm em conjunto com a concentração do

composto expressa no mesmo, resultando assim em uma equação da reta expressa na Figura 8, com um coeficiente de determinação de 99,98% de confiabilidade.

Figura 8 - Calibração Expressa Gráficamente Através da Equação da Reta.



Fonte: Autor.

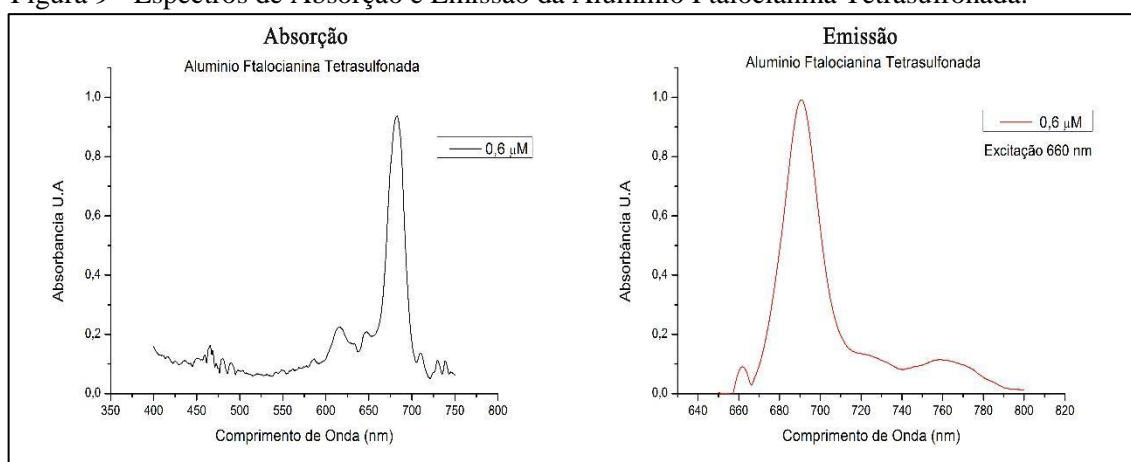
Ao analisarmos as Figuras 7 e 8 é possível notar que a diluição do fotossensibilizante AlPcS₄, atinge sua concentração máxima de leitura no equipamento próximo a 5 μM tal concentração já era adotada em estudos anteriores como de Moraes *et al.* (2019), apresentando eficácia na destruição da linhagem celular HEP-2, causando danos em seu material genético impossibilitando sua sobrevivência²⁰.

Assim ao escolher um fotossensibilizante é de interesse saber seu coeficiente de diluição nos meios de trabalhos, possibilitando assim um provável aumento de disponibilidade do fotossensibilizante nas células. Uma vez que aglomerados de moléculas levam a perda da propriedade fotodinâmica por modificarem as bandas de absorção do fotossensibilizante^{57,67}.

5.2 Análise do Espectro de Absorção e Emissão do Fotossensibilizante e Cálculo do Rendimento Quântico de Fluorescência

A Figura 9 apresenta de forma gráfica os espectros de absorção e emissão do fotossensibilizante AlPcS₄ diluído em PBS. No espectro de absorção a banda Q sofre com uma variação alterando seu pico mais intenso para 680 nm. O espectro de Emissão foi adquirido utilizando o comprimento de onda de 660 nm para simular o mesmo comprimento do equipamento usado para irradiação e ativação do fotossensibilizante, emitindo com maior intensidade em 685 nm.

Figura 9 - Espectros de Absorção e Emissão da Alumínio Ftalocianina Tetrasulfonada.



Fonte: Autor.

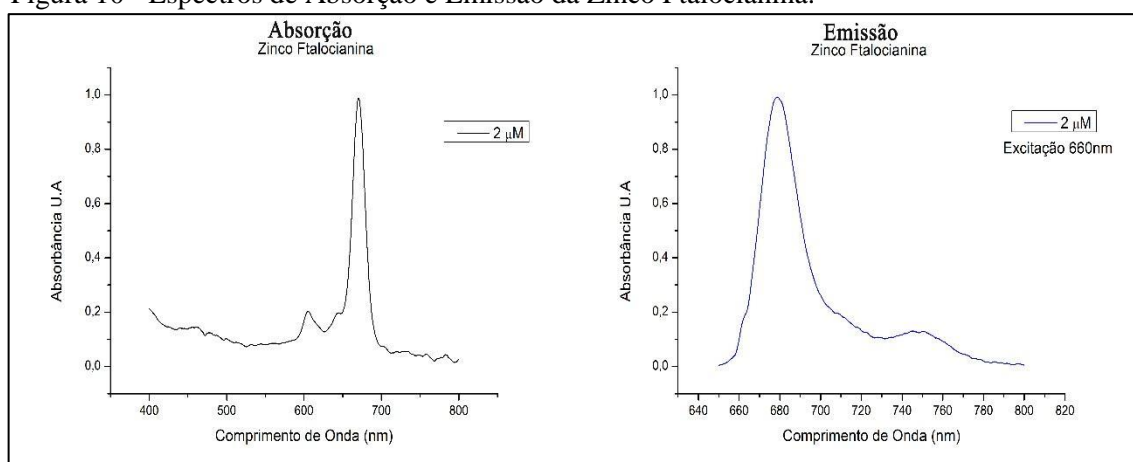
Para efetuar o cálculo de rendimento quântico de fluorescência foi necessário adquirir os espectros de absorção e emissão do fotossensibilizante Zinco Ftalocianina (ZnPc) diluído em Dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração de $2 \mu\text{M L}^{-1}$, Figura 10. Assim o espectro de absorção da ZnPc demonstra sua banda Q de maior intensidade em 670 nm e quando excitado no comprimento de onda de 660 nm, sua emissão ocorre com um pico de maior intensidade em 679 nm.

De forma prévia ao cálculo de rendimento quântico de fluorescência, dividiu-se a fluorescência do pico de maior intensidade dos espectros de emissão dos fotossensibilizante pelo número de moléculas do fotossensibilizante, obtendo assim um número aproximado de fluorescência por molécula de fotossensibilizante, sendo de $8,26 \times 10^{-22}$ Unidades Arbitrárias/Moléculas de AlPcS₄ e $2,76 \times 10^{-21}$ Unidades Arbitrárias/Moléculas de ZnPc. Tais valores dimensionam a diferença de fluorescência de cada tipo de ftalocianina, assim quando

comparamos a fluorescência da molécula de AlPcS₄ e com molécula de referência ZnPc, fica evidente que a molécula de AlPcS₄ excitada no comprimento de onda de 660 nm possui sua fluorescência menor em 30% que a molécula de ZnPc.

A fluorescência é uma das formas de perda da energia adquirida pelo fotossensibilizante durante sua fase de excitação, assim moléculas muito fluorescentes tendem a serem ineficientes na terapia fotodinâmica devido à baixa probabilidade de gerar espécies reativas decorrentes das reações de transferência de energia, uma das formas de mensurar a eficiência de uma molécula como fotossensibilizante é o cálculo de rendimento quântico de fluorescência.

Figura 10 - Espectros de Absorção e Emissão da Zinco Ftalocianina.



Fonte: Autor.

Assim o rendimento quântico é uma medida acessível e de execução simples que possibilita prever a eficiência do fotossensibilizante, uma vez que um alto rendimento quântico de fluorescência indica um composto ideal para utilização como marcador fluorescente e um composto com baixo rendimento quântico de fluorescência permite inferir a possibilidade de uma alta taxa de formação de espécies reativas, favorecendo o uso do composto como fotossensibilizante.

Para o cálculo do rendimento quântico de fluorescência, adotou-se a Equação (1), descrita por Crosby e Demas, (1971), assim utilizando a zinco ftalocianina como fotossensibilizante padrão para comparação admitiu-se seu rendimento quântico de fluorescência, quando dissolvida em DMSO, como $\phi_f ZnPc = 0,20$ descrito por Ogunsipe *et al.* (2004) e Gümrukçü *et al.* (2014)^{36,68,69}.

Assim ao final do cálculo o rendimento quântico de fluorescência obteve-se o valor de $\Phi_f \text{AlPcS}_4 = 0,28$, rendimento compatível com os trabalhos que utilizam derivados de ftalocianinas, tal resultado descreve uma faixa de produção de fluorescência baixo resultando em si um possivelmente elevado de rendimento na produção de oxigênio singlete^{29,35}.

É importante ressaltar que o solvente afeta significativamente o processo de excitação e emissão dos fótons da amostra, pois devido à polaridade e a relação das cargas elétricas entre soluto e solvente pode ocorrer agregação e perda do espectro característico, diminuindo assim o rendimento quântico de fluorescência e de produção de espécies reativas do fotossensibilizador.

5.3 Padronização da Técnica

5.3.1 Curva de Resposta a Densidade de Energia Empregue na Irradiação

Com base nos testes anteriores e nos estudos de nosso grupo de pesquisa citados na metodologia, definiu-se a dose de $5 \mu\text{M L}^{-1}$, visando possibilitar a melhor biodisponibilidade utilizando o fotossensibilizante AlPcS₄. Desta forma seguindo os protocolos estabelecidos no artigo de Moraes *et al* (2019) para o tempo de incubação do fotossensibilizante, otimizou-se a densidade de energia ativadora do fotossensibilizante para melhor aplicação da terapia, utilizando como critério de avaliação a menor dose de energia capaz de diminuir a densidade populacional abaixo de 50% através do ensaio de coloração por cristal violeta^{20,70-72}.

Assim a curva de resposta a densidade de energia variada, Figura 11, demonstra diferença significativa em todas as dosagens aplicadas quando comparado ao grupo controle, $P < 0,001$, obtendo um percentual mínimo de morte de 50% em todos os grupos irradiados. Quando comparamos as densidades de energias entre si, não é possível obter significância nos testes estatísticos desmontando assim indiferença na variação de energia utilizando a concentração de $5 \mu\text{M L}^{-1}$ de AlPcS₄.

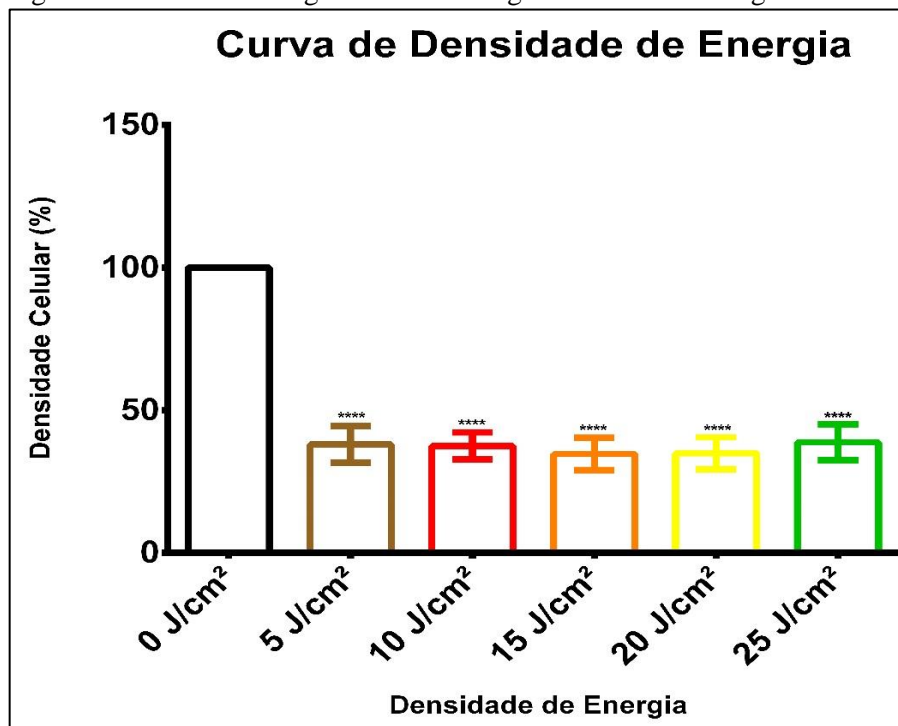
Tal resposta sugere que a partir da dosagem de 5 J/cm^2 , o aumento da densidade de energia não aumenta a eficiência da técnica causando o mesmo potencial de morte celular, ainda se pode inferir que o aumento da densidade energia total entregue a placa apenas variando o tempo de exposição, pode levar a um princípio de aquecimento dos componentes da placa de cultura, contudo devido a densidade de energia e o comprimento de onda

utilizando, acredita-se que não existiu interferência do fator aquecimento devido a taxa de morte manter-se constante.

É importante ressaltar que estudos diversos utilizando a ftalocianinas de forma geral, não houve preocupação em avaliar se a fonte de energia era eficaz para a ativação do fotossensibilizante ou a dose mínima de energia ativadora a ser utilizada ou exibir a curva teste de densidade de energia ativadora, ponto que corrobora para a ineficácia de alguns tratamentos e possivelmente a geração de clones resistentes a terapia fotodinâmica como nos estudos de Singh *et al.* (2001), onde compara a eficácia dos fotossensibilizantes Azul de Metileno, Porfirin e ALPcS₄, sugerindo a formação de clones resistentes após aproximadamente 8 ciclos de aplicação da terapia nas células ¹⁴. Contudo utilizando de luz branca com filtro vermelho de 525 – 700 nm e com a energia máxima de ativação de 0,81 J/cm² aproximadamente 6 vezes menor que a menor densidade de energia escolhida para este trabalho. Desta forma é evidente que o estudo da variação da densidade de energia é importante para um tratamento eficaz utilizando a TFD.

Então adotou-se a densidade de energia de 5 J/cm² para realização dos demais testes sugeridos, uma vez que se demonstrou a menor densidade capaz de ativar a atividade fotodinâmica de forma eficiente para utilização em protocolos de estudo.

Figura 11 - Ensaio Clonogênico com Dosagem Seriada de Energia.



Fonte: Autor.

5.3.2 Variação de tempo de incubação para resposta da terapia

Com a densidade de energia de 5 J/cm² definida, executou-se o ensaio para avaliar a resposta ao tempo de incubação do fotossensibilizante utilizando apenas dois tempos, 1 hora de exposição ao fotossensibilizante e 24 horas de exposição ao mesmo, para isso se utilizou com solução para diluição do fotossensibilizante o meio de cultura DMEM sem indicador fenol e não suplementado com soro fetal bovino, evitando assim a possibilidade da interação da albumina com o fotossensibilizante a possível inativação deste.

Para avaliação da comparação utilizou-se o ensaio de coloração de cristal violeta para estimar a densidade populacional após a TFD em ambos os tempos de incubação. Assim após a análise dos dados demonstrados na Figura 12, ambos os períodos de incubação, 1 e 24 Horas, demonstraram diferença estatística quando comparados ao grupo controle, $P < 0,0001$.

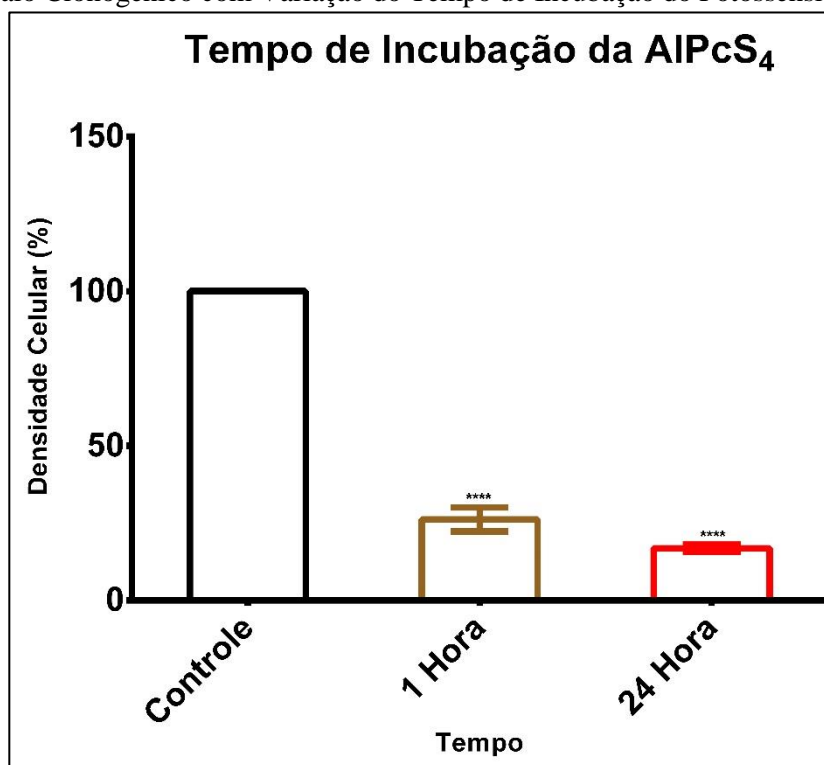
Quando comparados entre si também apresentam significância estatística, $P < 0,0001$, demonstrando que em 24 Horas existe um acúmulo de AlPcS₄ que resulta em uma diminuição populacional de 34% superior ao período de 1 Hora.

O tempo de incubação dos fotossensibilizantes demonstra a eficiência de bioacumulação destes e a capacidade da célula de metaboliza-los. Durante o processo descrito pela Figura 1, nos passos 1 e 2, a internalização do fotossensibilizante pela célula ocorre de forma cíclica e contínua uma vez que exista presença de fotossensibilizante em meio extracelular e o tempo de degradação deste através da metabolização ou expulsão para o meio extracelular varia de célula a célula. Desta forma longos períodos de incubação com o fotossensibilizantes pode ser benéficas ao tratamento aumentando sua eficiência a terapia, contudo tal afirmação só se torna real uma vez que exista fotossensibilizante o suficiente em meio extracelular para que ocorra continuamente sua entrada no interior da célula, levando ao platô e a constante de uma curva de saturação^{73,74}.

Wieder *et al.* (2006), em seus estudos avaliou a eficiência da terapia após uma variação do tempo utilizando nanossondas com fotossensibilizante e concluiu que em seu maior tempo de incubação, de 6 Horas, ocorreu maior redução na densidade populacional celular⁷³. Já Castilho (2017), efetuou ensaios semelhantes, contudo com o intuito de observar a incorporação de nanossondas conjugadas com um fotossensibilizante em uma variação de tempo crescente, assim notou que mesmo variando as concentrações quando maior o tempo mais nanopartículas conjugadas estavam no interior da célula⁷⁴.

Para a escolha do tempo de incubação ideal para aplicação nos experimentos considerou-se uma rotina de aplicação clínica, assim a adoção do tempo de incubação de 24 horas só seria viável se a diferença entre o tempo de 1 hora fosse maior que 61% diminuindo a população para abaixo de 10% de células viáveis. Assim adotou-se o período de incubação de 1 hora devido a sua praticidade na execução da metodologia e a resposta TFD tão eficiente quanto ao período de incubação de 24 horas.

Figura 12 - Ensaio Clonogênico com Variação do Tempo de Incubação do Fotossensibilizante.



Fonte: Autor.

5.4 Caracterização dos efeitos da terapia *In Vitro*

Após definir a concentração de fotossensibilizante, o tempo de incubação do fotossensibilizante e a densidade de energia a ser utilizada, se deu início aos testes biológicos afim de caracterizar a ação da TFD quando comparada aos seus Grupos controles internos.

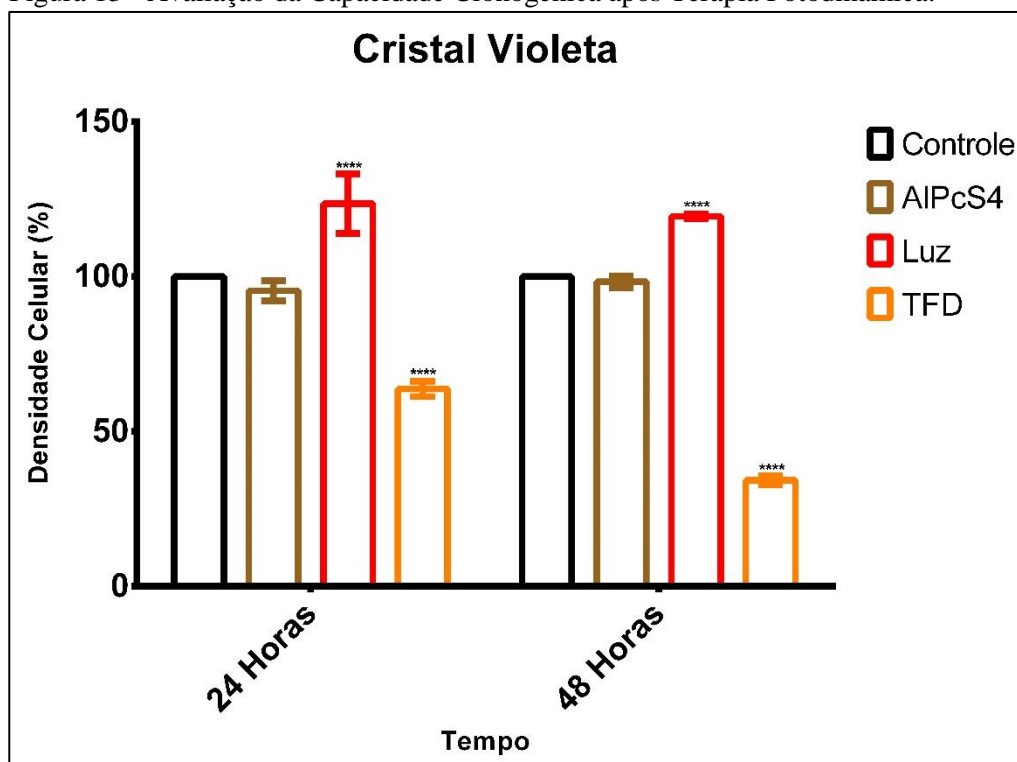
5.4.1 Capacidade Clonogênica - Cristal Violeta

Ao avaliar os dados obtidos com o ensaio de coloração com Cristal Violeta evidenciados graficamente na Figura 13, fica evidente que o grupo TFD destaca-se dos demais grupos obtendo uma significância nos testes estatísticos quando comparado ao grupo controle e aos demais grupos com $P < 0,001$, em ambos os períodos de avaliação de 24 e 48 Horas após TFD.

Costa (2008), ao avaliar o potencial metastático de células HEp-2 após terapia fotodinâmica verificou o mesmo comportamento uma vez que o grupo TFD, utilizando $AlPcS_4$, causou redução da viabilidade celular em 50% dentro de 24 horas após o tratamento⁷¹. Moraes *et al.* (2019) também verificou o mesmo comportamento de redução da população viável das células HEp-2 após a TFD, seguido pela fragmentação do material genético sugerindo um dano que inviabilizaria as demais gerações de células que se sucederam, comportamento similar a densidade populacional de células em 48 horas que é inferior ao período de 24 horas²⁰.

Nos estudos de Casas *et al* (2015), que remetem a resistência a TFD, é sugerido que são necessárias várias sessões de aplicação da terapia em células cancerígenas para que ocorra o desenvolvimento de clones resistentes¹¹. Contudo com os dados obtidos somados a estudos como os de Costa (2008) e Moraes *et al.* (2019), sugere-se que a curva de viabilidade celular tende a decrescer com o tempo, levando a inviabilidade total do grupo TFD após alguns ciclos celulares^{20,71,20}.

Figura 13 - Avaliação da Capacidade Clonogênica após Terapia Fotodinâmica.



Fonte: Autor.

5.4.2 Avaliação da Atividade Mitocôndria – MTT

Um dos marcadores de viabilidade celular é a atividade mitocondrial, vide os protocolos descritos por Mosmam (1983), tal ensaio é um indicador do metabolismo celular, uma vez que seu princípio ocorre com a conversão do sal de MTT em cristais de formazan no interior da mitocôndria⁶¹. Organela que sofre com o mecanismo fotodinâmico uma vez que a presença de espécies reativas é maior nas membranas mitocôndrias devido a sua estrutura promotora de reações bioquímicas oxidativas.

Segundo Tedesco *et al.* (2004) em seus estudos utilizando marcadores mitocondriais é possível notar uma hiperpolarização da membrana mitocondrial após 24 horas da ação da TFD utilizando AIPcS₄ e 48 horas uma despolarização completa seguida de fragmentação das membranas, o que pode ser caracterizado como dano mitocondrial causada pela ação das espécies reativas de forma local⁷⁰.

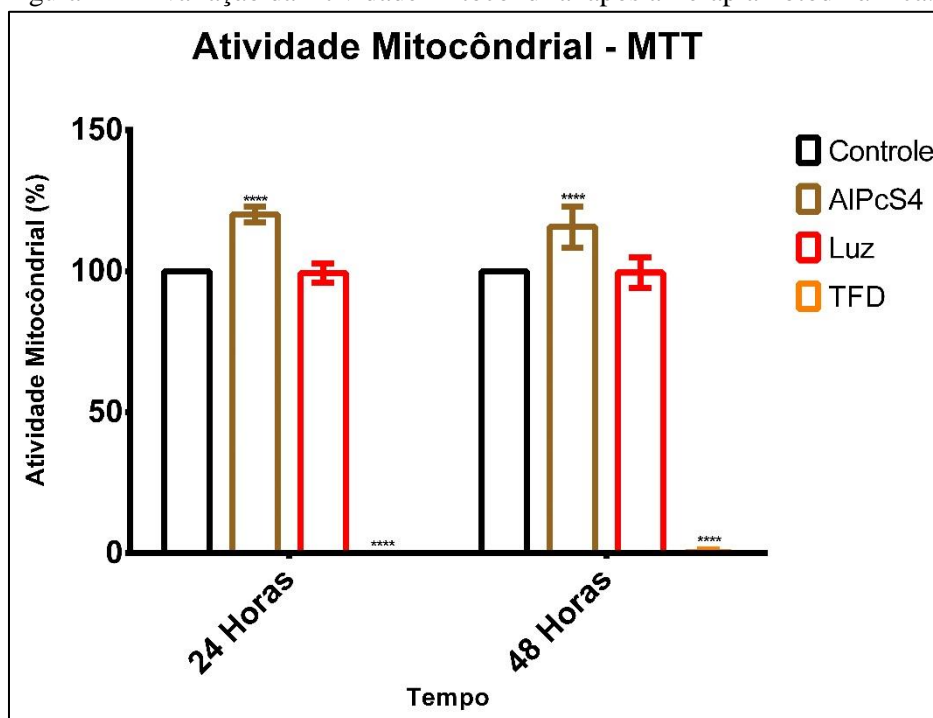
Desta forma ao analisarmos os resultados demonstrados graficamente na Figura 14, é possível notar a diminuição da atividade mitocondrial no grupo TFD em ambos os períodos

pós tratamento. Tal diminuição possui significância estatística, $P < 0,0001$, quando comparada aos demais grupos de controle da Terapia, Controle; Luz; AIPcS₄.

Ao compararmos com os resultados do ensaio de Coloração com Cristal Violeta é possível notar semelhanças, uma vez que o Grupo TFD em ambos os testes sofreu uma redução significativa comparado aos demais, evidenciando assim uma baixa populacional comprovada por uma baixa na atividade mitocondrial/ metabólica demonstrada no ensaio de MTT.

Em estudos prévios publicados por Moraes *et al.* (2019), após a TFD em células HEp-2 os ensaios de MTT demonstram a queda de mais de 80% da atividade mitocondrial quando comparados ao grupo controle nos mesmos períodos de avaliação de 24 e 48 horas após a aplicação da terapia ²⁰. Corroborando assim para hipótese de inviabilidade da criação de clones resistentes a terapia uma vez que os danos às células quantificadas por ambos os métodos tendem a se estender por alguns ciclos celulares.

Figura 14 - Avaliação da Atividade Mitocondrial após a Terapia Fotodinâmica.



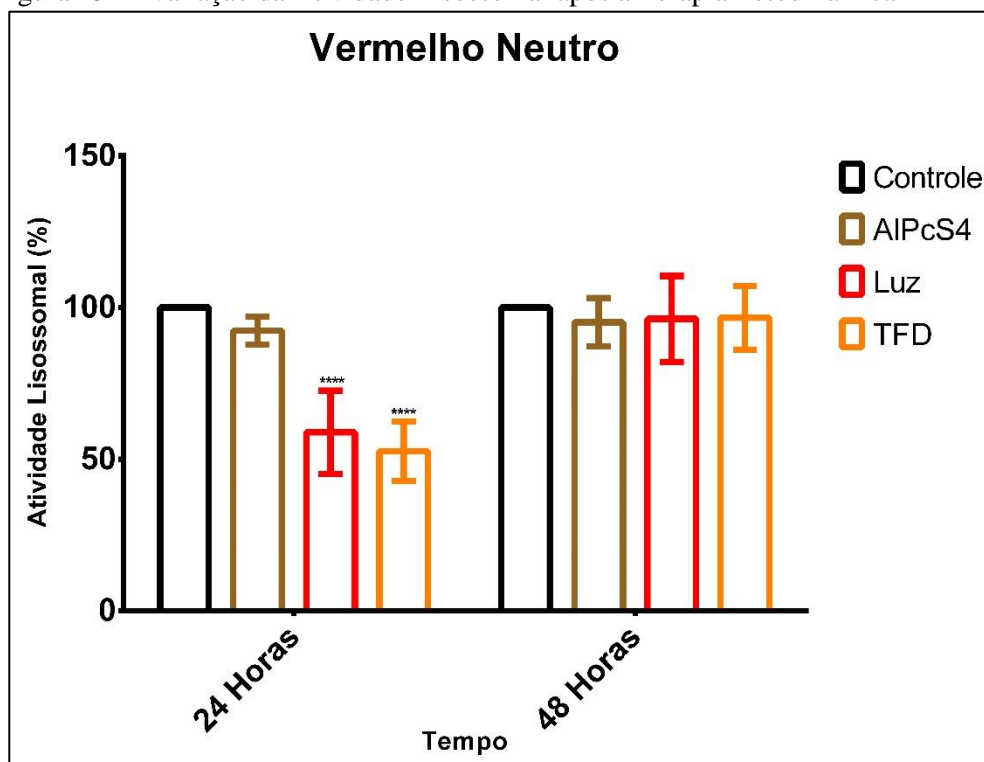
Fonte: Autor.

5.4.3 Atividade Lisossomal – Vermelho Neutro

O ensaio de coloração com Vermelho Neutro quantifica o acúmulo do corante em membranas ácidas, principalmente em organelas como lisossomos, tal teste pode ser

considerado como um ensaio de viabilidade celular indireta ⁷⁵. Assim ao analisarmos os dados ilustrados graficamente pela Figura 15, é possível notar que o Grupo TFD se destaca dos demais apenas no período de 24 horas de avaliação após a terapia, demonstrando uma significância estatística quando comparado ao grupo controle com $P < 0,0001$. No período de 48 horas existe um aumento em sua quantificação e todos os grupos equiparam-se ao grupo controle não ocorrendo significância estatística no período de 48 horas quando comparamos os grupos entre si e com o controle.

Figura 15 - Avaliação da Atividade Lisossomal após a Terapia Fotodinâmica



Fonte: Autor.

Tal variação entre os períodos pode ser relacionada ao processo de morte celular envolvido no período avaliado, segundo Moraes *et al.* (2019), 48 Horas após a TFD o ensaio de morte celular indica que existe um aumento no número de células em apoptose quando comparado ao período de 24 Horas de avaliação, o processo de apoptose envolve a criação de vesículas ácidas para digestão das organelas e material genético, o aumento destas vesículas resultado da fusão de lisossomos e endossomos com membranas e organelas pode ter levado o aumento da quantificação em 48 horas ^{20,76}. Já o período de 24 horas ainda é marcado por células em necrose remanescentes do momento inicial da TFD que são perdidas durante os processos de lavagens incluídos no protocolo assim diminuindo a quantificação.

Desta forma a compararmos os testes colorimétricos é possível notar a degradação celular ocorrendo após a aplicação da TFD, sugerindo danos a célula cancerígena de caráter irreversível, possivelmente inviabilizando seus ciclos celulares seguintes a exposição ao tratamento como sugerido com a redução da densidade populacional, diminuição da atividade mitocondrial e variação da atividade lisossomal. Contudo é importante realçar que tais resultados só sugerem isso devido a adoção dos critérios anteriores para escolha de concentração do fotossensibilizante, tempo de incubação e densidade de energia, parâmetros que não são abordados como possíveis variáveis responsáveis pelo surgimento de células resistentes a terapia nos trabalhos de Casas *et al* (2015), Kim *et al* (2013) e Olsen *et al* (2017) entre outros ^{11,77,78}.

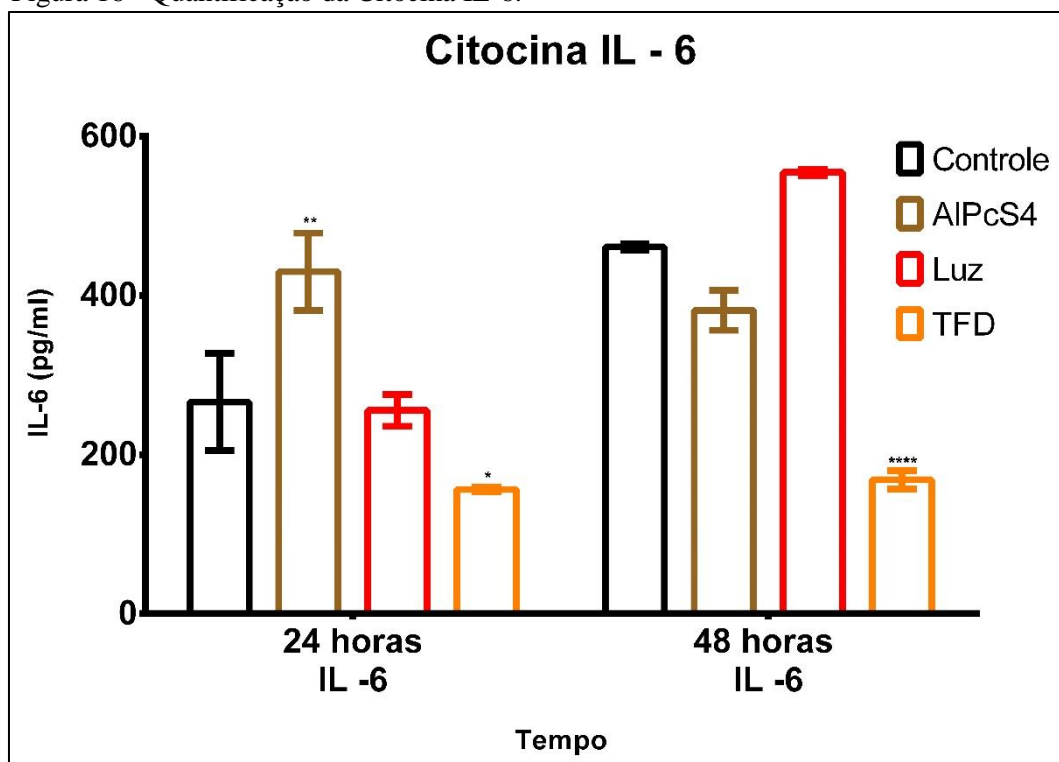
5.4.4 Quantificação de Citocinas - Ensaio Imunoenzimático ELISA

O ensaio imunoenzimático foi executado para verificar o ambiente tumoral criado pela linhagem HEP-2, e como se altera após a TFD sendo monitorado pelos períodos de 24 e 48 horas, desta forma avaliou-se a Interleucina 6 (IL-6) e o Fator de Necrose Tumoral, devido a alterações que foram apresentadas por estas citocinas na literatura ⁴⁶⁻⁵⁰.

A Interleucina- 6 é uma citocina pro-inflamatória, envolvida na resposta imunológica, atuante na proliferação celular, diferenciação e apoptose ^{51,52}. Sua secreção é importante para ativação dos linfócitos e aumento da produção de anticorpos contra determinado antígeno quando em contato com macrófagos ⁷⁹. Assim ao analisar os níveis de IL-6 utilizando a Figura 16, o Grupo TFD após ambos os períodos de avaliação pós terapia, demonstrou significância estatística quando comparado aos demais grupos com seu valor variando entre $P < 0,054$ a $P < 0,0001$ nas comparações.

Segundo estudos de Gollnick *et al.* (2003), existe uma diminuição na expressão de IL-6 em células tumorais de mama EMT6, hipótese que indica perda de função na produção de proteínas pós TFD. Wong *et al.* (2003) também relata que existe perda da função de receptores de várias células tratadas com TFD, por exemplo; carcinoma hipofaríngea, adenocarcinoma cervical, carcinoma hepatocelular, culturas primárias de fibroblastos de pulmão humano e células epiteliais, demonstrando indiferença no tipo celular para a resposta ^{80,81}.

Figura 16 - Quantificação da Citocina IL-6.



Fonte: Autor.

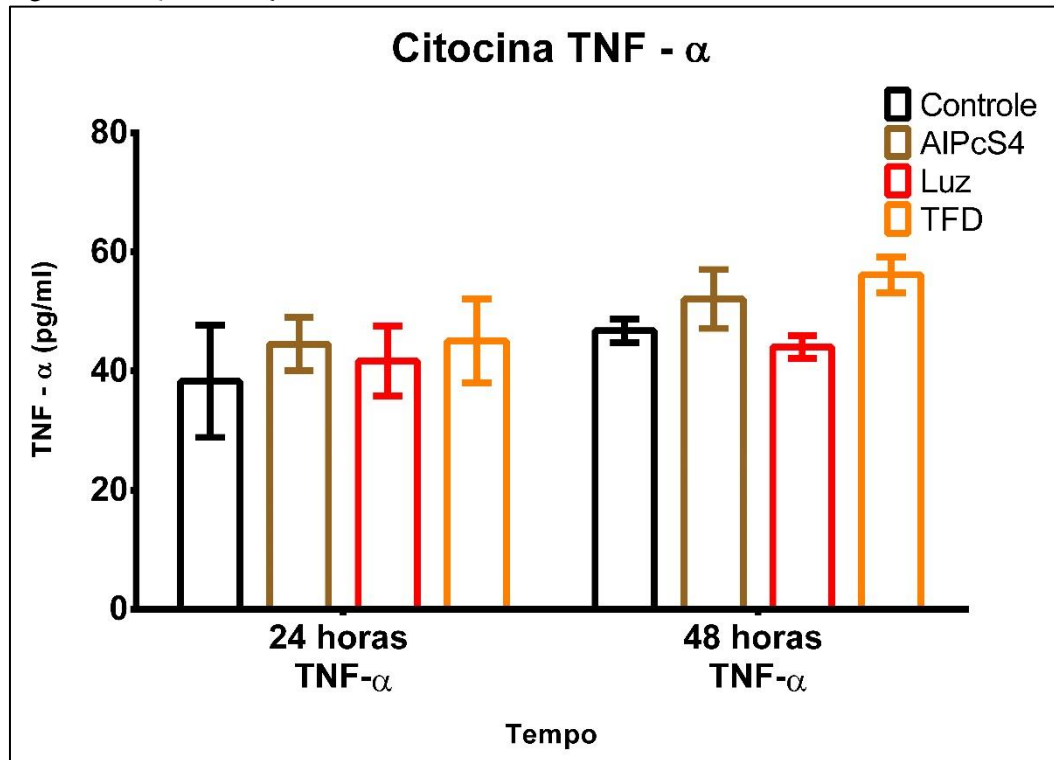
Também foi dosado o Fator de Necrose Tumoral alfa(TNF- α), uma citocina pró-inflamatória que tem como função o envolvimento em diversas condições inflamatórias, infecciosas, autoimunes e malignas, expresso principalmente em macrófagos e linfócitos ativados a fim de conferir imunidade ao hospedeiro^{82,83}. Quando secretado por macrófagos desempenham a função de ativar o endotélio vascular e aumentar a permeabilidade dos vasos, aumentar a produção de imunoglobulinas entre outros efeitos locais e sistêmicos⁸⁴.

Após a avaliação estatística da dosagem do TNF- α liberado pela célula HEp-2 ilustrado na Figura 17, em ambos os períodos de avaliação pós-tratamento, não foi possível notar diferenças estatísticas quando comparamos o Grupo TFD aos demais grupos. Segundo Silva (2014), após a avaliação de camundongos submetidos a TFD utilizando o fotossensibilizante Azul de Metileno, os níveis de quantificação de TNF- α eram reduzidos comparado aos demais grupos, contudo Wang *et al.* (2013), relata em seus estudos aumento da produção de TNF- α após o tratamento de camundongos com carcinoma espinocelular cutâneo induzidos por UvB utilizando TFD^{46,47}.

Assim sugere se que para que ocorra alteração na secreção de TNF- α , é necessário componentes mais complexos existentes apenas em testes *in vivo* ou simulações através de co

culturas, aprimorando assim o ambiente tumoral, acarretando uma resposta próximo à realidade fisiológica.

Figura 17 - Quantificação de TNF α



Fonte: Autor.

A avaliação do ambiente tumoral utilizando apenas as citocinas TNF- α , não foi o suficiente para identificar alterações chave responsáveis pelo controle das células tumorais pós TFD, uma vez que a quantificação de TNF- α é inconclusiva utilizando a metodologia adotada e a diminuição da secreção de Il-6 não pode ser atribuída a um fator específico resultante da TFD e sim a possíveis vários fatores, como dano genético que pode levar a degradação dos receptores de citocinas ou aos RNAs mensageiros que codificam a produção de tais citocinas, tornando necessários mais testes acerca do assunto para melhores conclusões futuras.

5.4.5 RT-qPCR para Expressão Gênica dos Mecanismos de Resistência a TFD

A fim de validar as afirmações sobre os mecanismos de resistências a TFD descritos por Casas *et al.* (2015) como; alteração na expressão das glicoproteínas, alteração na sinalização gênica e interpretação de vias metabólicas, interrupção dos processos de apoptose

e autofagia, aumento da expressão de proteínas de choque térmico (HSP's) e mudança na formação do citoesqueleto e expressão das proteínas de adesão ¹¹. Efetuou-se a quantificação gênica através da técnica de RT-qPCR o qual possibilita quantificar a expressão do RNA formador das proteínas de estudo, viabilizando identificar a ação da TFD sobre tais proteínas após 24 horas do tratamento.

Assim se avaliou as proteínas de choque térmico que mediam vias de sinalização e autofagia/apoptose, sendo elas conhecidas como HSP27, HSP 70, GRP78 e HSP90, todas estão representadas na Tabela 3, classificadas com suas famílias, nomes, função e localização celular segundo a literatura ^{39,42,85-91}.

Tabela 3 - HSP's divididas por Família, Função e Localização Celular.

| Famílias | Principais proteínas | Função | Localização nas células |
|-------------------|----------------------|--|---------------------------------------|
| <i>Smalls</i> HSP | HSP27/ HSPB1 | HSP 27 - participa da inibição da via apoptótica nas células | Membrana Plasmática e Citoplasma |
| HSP70 | HSP70/ HSPA4 | HSPA4 -Inibição de ativação da via do apoptose | Nucleoplasma, Vesículas e Citoplasmas |
| HSP70 | HSP90/ HSP90AA1 | HSP90AA1- Proteína mediadora da autofagia e parte da via de sinalização para fagocitose. | Citoplasma |
| HSP70 | GRP78/ HSPA5 | HSPA5 - Proteína mediadora de respostas a moléculas exógenas a célula. | Citoplasma |

Fonte: Autor.

Desta forma ao analisarmos os dados obtidos utilizando a RT-qPCR, ilustrado graficamente pela Figura 18, é possível notar que a expressão gênica do Grupo TFD em todos os genes avaliados teve significância estatística quando comparado aos demais grupos com um valor médio de $P < 0,012$.

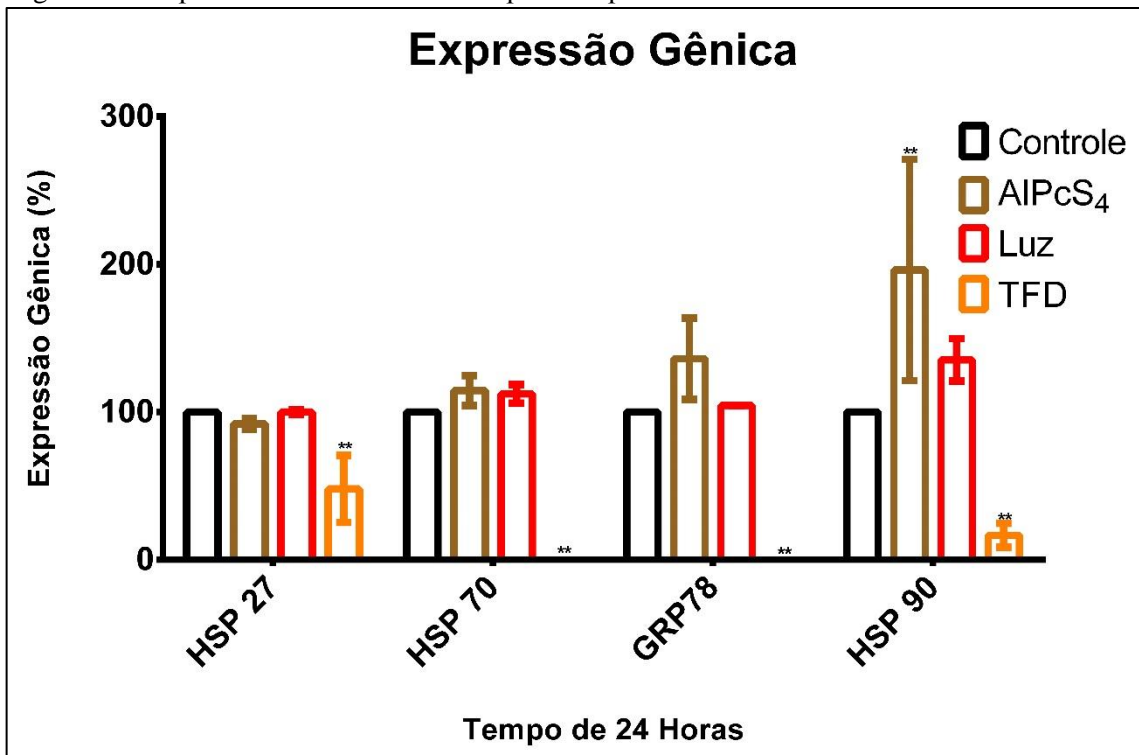
Kim *et al.* (2013), sugeriu que baixa expressão de HSP27 está ligada a resistência das células a TFD, uma vez que silenciado o gene da HSP27, ocorreu uma regulação na expressão dos genes Bax e Bcl-2, conferindo uma maior sobrevivência a célula ⁷³. Rodríguez *et al.* (2016),

relata que a presença da HSP27 em diversos estudos induz a resistência a apoptose através da ativação de vias de autofagia ⁷⁷.

Tal resultado contrapõe o princípio de aumento da expressão gênica pós TFD, defendido por Casas *et al.* (2015), uma vez que em todos os genes avaliados o Grupo TFD obteve uma expressão abaixo do controle e dos demais grupo, mesmo a expressão do gene HSP27 sendo superior aos outros Grupos TFD's, não sugere uma resistência a terapia devido sua ação na inibição da via da apoptose ⁹².

Fato que é comprovado avaliando o comportamento das células nos testes colorimétricos, uma vez que em 48 horas não existe aumento populacional e nem na atividade mitocondrial como ilustrados pelas Figuras 13 e 14, além disso existe o aumento da atividade lisossomal possivelmente devido a eventos apoptóticos no período de 48 horas como sugere o ensaio de coloração de vermelho neutro, Figura 15, e o ensaio de apoptose de Moraes *et al.* (2019) ^{20,76}.

Figura 18 - Expressão Gênica das HSP's após Terapia Fotodinâmica.



Fonte: Autor.

Já estudos de Xue *et al.* (1995), quando utilizando a TFD com o fotossensibilizante AIPc em células de ovário de hamster (V9), ocorreu a redução da expressão do gene HSP70, em contrapartida notou um aumento na expressão do gene GRP78 atribuindo a produção

dessa proteína a regulação da homeostase de cálcio no interior da célula após a TFD ⁹³. Já Gomer *et al.* (1996), descreve em seus estudos utilizando Clorinas, que após a TFD existe um aumento da produção de HSP70 ⁹⁴.

Quanto a produção de HSP 90, Ferrario e Gommer (2010) descrevem que sua presença em células tratada com TFD, mediam sua recuperação sendo uma possível barreira a TFD quando super expressa como resultado da TFD, contudo em nossos estudo notamos que no grupo TFD no gene HSP90 ocorre uma queda significativa na expressão possivelmente inviabilizando a resposta a positiva para a sobrevivência tumoral ⁹⁵.

Tais resultados observados na literatura podem ser justificados possivelmente devido a linhagem celular utilizada diferir dos estudos citados, não exista um padrão de regulação genica baseado no aumento da expressão de HSP's que se conecte diretamente ao mecanismo de resistência uma vez que cada estudo da literatura sugere um comportamento diferente a cada linhagem celular, utilizando parâmetros de densidade de energia e fotossensibilizantes diversos.

Casas *et al.* (2015) descreve a alteração na expressão das glicoproteínas e mudança na formação do citoesqueleto e expressão das proteínas de adesão como fatores que possibilitam a resistência a TFD, devido sua intenção com a internalização do fotossensibilizante, assim após sucessivas aplicações da TFD a alteração no padrão de expressão dessas glicoproteínas e sua apresentação no citoplasma, retículo e membrana tornasse um dos obstáculos para o acúmulo do fotossensibilizante no interior da célula.

Desta forma a avaliação da expressão das glicoproteínas Biglycan e Decorin pode sugerir ações que ocorrem após a TFD relacionados a adesão celular, internalização dos fotossensibilizante e alterações no citoesqueleto das células HEp-2. Uma vez que ambos estão relacionados a constituintes importantes da matriz extracelular (MEC) e desempenham um papel importante no desenvolvimento tumoral, pois modificações estruturais na composição do MEC favorecem o deslocamento e migração das células tumorais.

O Decorin é uma glicoproteína rica em leucina, envolvida em inúmeros processos metabólicos referentes a adesão celular, sua principal função descrita na literatura está na regulação da fibrilogênese dos colágenos tipo I, II e VI, já a glicoproteína Biglycan faz parte do sistema imunológico inato segundo Schaefer *et al.* (2005) e participa ativamente como regulador da osteogênese e integridade muscular segundo Berendsen *et al.* (2011) e Moreth *et al* (2012), entre outros autores, ainda segundo Amenta *et al* (2012) a molécula de Biglycan desempenha papel na estabilidade sináptica ⁹⁶⁻¹⁰².

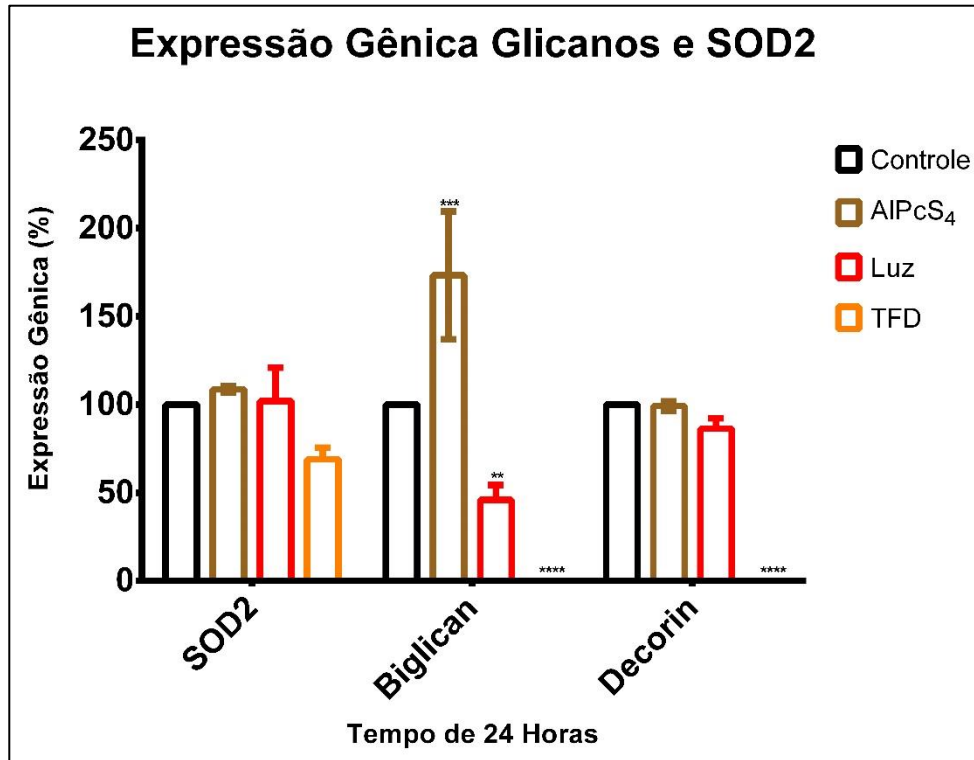
Assim ao analisarmos o Gráfico da Figura 19, em ambos os genes Biglycan e Decorin o grupo TFD apresenta expressão quase nula, demonstrando significância estatística quando comparado aos demais grupos com $P < 0,0001$.

Há também a expressão do gene Superóxido Desmutase 2 (SOD2), gene que codifica a enzima Superóxido Desmutase 2, responsável por atuar principalmente na mitocôndria controlando a produção de espécies reativas. O grupo TFD quando quantificado não demonstrou significância estatística, após o tratamento, fato ocorrido devido ao aumento da expressão após a TFD compensando assim a diminuição da densidade populacional quantificada pelo ensaio de coloração por cristal violeta.

Segundo Kimáková *et al.* (2017), o aumento da expressão de SOD2 ocorre em células de câncer de mama (MCF7) após a TFD, como resposta ao tratamento incrementando assim um mecanismo de sobrevivência as células¹⁰³. Contudo se comparar o presente estudo ao de Kimáková *et al.* (2017), sugere-se que o aumento da expressão de SOD2 no grupo TFD é um esforço da células remanescentes para neutralizar a produção de espécies reativas decorrente dos danos gerados pela TFD, associando a estudo anteriores de Moraes *et al.* (2019), as células após a TFD possuem organelas e estruturas importantes comprometidas devido a aleatoriedade do dano causado pelas espécies reativas dentro dela^{20,103}.

Entende-se também que os mecanismos de resistência defendido por Casas *et al.* (2015) e outros autores, ocorre devido a aplicação da TFD sem otimizar os parâmetros da terapia tornando assim os danos celulares pequenos quando comparados ao presente estudo. Ainda sim compreende-se que a variação entre linhagens celulares de estudo pode acarretar uma diferença nos resultados sendo necessário fotossensibilizantes mais modernos ou doses de energia ativadoras maiores decorrente da biodisponibilidade na célula de estudo.

Figura 19 - Expressão Gênica das Glicoproteínas e da enzima Superóxido Desmutase 2 após Terapia Fotodinâmica.



Fonte: Autor.

6 CONCLUSÃO

Após a conclusão das três etapas do experimento, entende-se que para justificar a utilização de um fotossensibilizante é necessário conhecer seus espectros de absorção e emissão uma vez que eles possibilitam delinear o tipo de equipamento e o comprimento de onda para ativação do fotossensibilizante. Além dos espectros de absorção e emissão do fotossensibilizante é necessário saber sobre sua eficiência na produção de espécies reativas assim o cálculo do rendimento quântico de fluorescência possibilita julgar a possível eficiência do fotossensibilizante. Assim após a primeira etapa do experimento caracterização foi possível concluir a eficiência da AlPcS₄ como fotossensibilizante e características como diluição adequada para o experimento.

Desta forma após definir critérios para seleção da concentração do fotossensibilizante, avaliou-se os critérios de seleção do tempo de incubação para terapia e densidade de energia para o tratamento, utilizando ensaios colorimétricos que quantificavam a densidade populacional pós terapia, sendo possível estabelecer os critérios utilizando uma metodologia simples finalizando assim as etapas de caracterização e análise dos critérios utilizados para avaliação da atividade biológica da TFD utilizando AlPcS₄.

Utilizando os critérios de concentração do fotossensibilizante, densidade de energia aplicada e tempo de incubação do fármaco, as análises dos resultados biológicos demonstram-se favoráveis a não resistência ao tratamento fotodinâmico, uma vez que os testes executados sugeriram respostas complementares entre si. Assim baseado neste trabalho é possível sugerir critérios para escolha e utilização de um fotossensibilizante, fontes para irradiação e ensaios de avaliação da TFD.

REFERÊNCIAS

1. KHARKWAL, G. B. *et al.* Photodynamic therapy for infections: Clinical applications. *Lasers Surg Med.* v. 43, n. 7, p. 755–67, 2011.
2. ALLISON, R. R. Photodynamic therapy: oncologic horizons. *Futur Oncol.*, v. 10, n.1, p. 123–4, 2014.
3. AGOSTINIS, P. *et al.* Photodynamic therapy of cancer: An update. *CA Cancer J Clin.*, v. 61, n. 4, p. 250–81, 2011.
4. LI, R.; JIA, Z.; TRUSH, M. Defining ROS in Biology and Medicine. *React Oxyg Species.*, v. 1, n. 1, p. 139–48, 2016.
5. CRISTIANA, F. Introductory Chapter: The Biology of Reactive Species. *In: CRISTIANA, F. Reactive Oxygen Species (ROS) in Living Cells.* [s.l.] : InTech, 2018. p. 13.
6. JABLONSKI, A. Efficiency of Anti-Stokes Fluorescence in Dyes. *Nature*, v. 131, n. 3319, p. 839–40, 1933.
7. CASTANO, A. P.; DEMIDOVA, T. N. Hamblin M. Mechanisms in photodynamic therapy: part one. *Photodiagnosis Photodyn Ther.*, v. 1, n. 4, p. 279–93, 2004.
8. GURSOY, H. *et al.* Photodynamic therapy in dentistry: A literature review. *Clin Oral Investig.*, v. 17, v. 4, p. 1113–25, 2013.
9. SELLERA, F.P.; GARGANO, R. G.; POGLIANI, F. C. Terapia fotodinâmica : revisão de literatura. *Rev Educ Contin em Med veterinária e Zootec do CRMV-SP*, v. 12, p. 6–13, 2014.
10. SHARKEY, S. M. *et al.* Mitochondrial Alterations in Photodynamic Therapy-resistant Cells. *Cancer Res.*, v. 53, n. 20, p. 4994–9, 1993.
11. CASAS, A. *et al.* Mechanisms of Resistance to Photodynamic Therapy: An Update. *In: RAPOZZI, V.; JORI, G. editors. Resistance to Photodynamic Therapy in Cancer.* Cham: Springer International Publishing, 2015. p. 29–63.
12. CASAS, A. *et al.* Mechanisms of resistance to photodynamic therapy. *Curr Med Chem.*, v. 18, n. 16, p. 2486–515, 2011.
13. GABRYSIK, M. *et al.* Low dose of GRP78-targeting subtilase cytotoxin improves the efficacy of photodynamic therapy in vivo. *Oncol Rep.*, v. 35, n. 6, p. 3151–8, 2016.
14. SINGH, G. *et al.* In Vitro Induction of PDT Resistance in HT29, HT1376 and SK-N-MC Cells by Various Photosensitizers. *Photochem Photobiol.*, v. 73, n. 6, p. 651-656, 2001.
15. KRASNOVSKY JUNIOR, A. A. Singlet oxygen and primary mechanisms of photodynamic therapy and photodynamic diseases. *In: UZDENSHY, A. B. editor. Photodynamic Therapy at the Cellular Level.* [s.l.]: Research Signpost, 2007. p. 17–62.

16. SIBATA, C. H. *et al.* Photodynamic therapy : a new concept in medical treatment. *Brazilian J Med Biol Res.*, v. 33, n. 8, p. 869–80, 2000.
17. CASTANO, A. P.; DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: Part two - Cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v. 2, n. 1, p. 1–23, 2005.
18. DOUGHERTY, T. J. *et al.* Photodynamic therapy. *J Natl Cancer Inst.*, v. 90, n. 12, 1998.
19. CASTANO, A. P.; DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: Part three - Photosensitizer pharmacokinetics, biodistribution, tumor localization and modes of tumor destruction. *Photodiagnosis Photodyn Ther.*, v. 2, n. 2, p. 91–106, 2005.
20. MORAES, C. D. G. de O. *et al.* Genotoxic effects of photodynamic therapy in laryngeal cancer cells – An in vitro study. *Exp Biol Med.*, v. 244, n. 3, p. 262–71, 2019.
21. LUCKY, S. S.; SOO, K. C.; ZHANG Y. Nanoparticles in Photodynamic Therapy. *Chem Rev.*, v. 115, n. 4, p. 1990–2042, 2015.
22. ALLISON, R. R.; MOGHISSI, K. Photodynamic therapy (PDT): PDT mechanisms. *Clin Endosc.*, v. 46, n. 1, p. 24–9, 2013.
23. DOUGHERTY, T. J. *et al.* Photodynamic Therapy. *JNCI J Natl Cancer Inst.*, v. 90, n. 12, p. 889–905, 1998.
24. NANN, T. Nanoparticles in Photodynamic Therapy. *Nano Biomed Eng.*, v. 3, n. 2, p. 137–43, 2011.
25. TOMAZINI, M.V. *et al.* Topical photodynamic therapy with zinc phthalocyanine: Evaluation of fluorescence intensity, skin absorption, skin histological and immunohistochemical changes in animal model. *An Bras Dermatol.*, v. 82, n. 6, p. 535–41, 2007.
26. SHARMAN, W.M.; ALLEN, C.M.; VAN LIER, J. E. Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications. *Drug Discov Today*, v. 4, n. 11, p. 507–17, 1999.
27. IDOWU, M.; NYOKONG, T. Photophysical and photochemical properties of zinc and aluminum phthalocyanines in the presence of magnetic fluid. *J Photochem Photobiol A Chem.*, v. 188, n. 2–3, p. 200–6, 2007.
28. NUNES, S. M. T.; SGUILLA, F. S.; TEDESCO, A. C. Photophysical studies of zinc phthalocyanine and chloroaluminum phthalocyanine incorporated into liposomes in the presence of additives. *Brazilian J Med Biol Res.*, v. 37, n. 2, p. 273–84, 2004.
29. BARBUGLI, P. A. **Estudo dos efeitos da terapia fotodinâmica na progressão tumoral e em modelos celulares tridimensionais.** 2010. 107f. Tese (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade de São Paulo, Ribeirao, 2010.

30. SILVA, E. R.; SANTOS, E. P.; RICCI-JÚNIOR, E. Terapia fotodinâmica no tratamento do câncer de pele: conceitos, utilizações e limitações. *211 Rev Bras Farm.*, v. 90, n. 3, p. 211–7, 2009.
31. SILVA, A. C. de S. **Caracterização de células resistentes a terapia fotodinâmica.** 2014. 57f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, 2014.
32. PASZKO, E. *et al.* Nanodrug applications in photodynamic therapy. *Photodiagnosis Photodyn Ther.*, v. 8, n. 1, p. 14–29, 2011.
33. FISHER, A. M. R.; MURPHREE, A. L.; GOMER, C. J. Clinical and preclinical photodynamic therapy. *Lasers Surg Med.*, v. 17, n. 1, p. 2–31, 1995.
34. LUIZ, F. C. L. **Estudos de fluorescência estacionária e resolvida no tempo de anestésicos locais e de antibióticos da classe das fluoroquinolonas.** 2009. 154f. Tese (Doutorado em Física) - Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.
35. CARNEIRO, Z. A. **Fotocitotoxicidade proveniente do sinergismo de oxigênio singlete e óxido nítrico gerado pelo complexo [Ru (NO)(ONO)(ftalocianina)].** 2011. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.
36. CROSBY, G. A.; DEMAS, J. N. Measurement of photoluminescence quantum yields. Review. *J Phys Chem.*, v. 75, n. 8, p. 991–1024, 1971.
37. LIANOS, G. D. *et al.* The role of heat shock proteins in cancer. *Cancer Lett.*, v. 360, n. 2, p. 114–8, 2015.
38. SRIVASTAVA, P. K.; UDONO, H. Heat shock protein-peptide complexes in cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol.*, v. 6, n. 5, p. 728–32, 1994.
39. DRUMMOND, L. R. *et al.* Expressão das proteínas de choque térmico (hsps) no músculo cardíaco em resposta ao treinamento físico: uma revisão sistemática. *Rev da Educ Fis.*, v. 24, n. 4, p. 637–47, 2013.
40. CONCANNON, C. G.; GORMAN, A. M.; SAMALI, A. On the role of Hsp27 in regulating apoptosis. *Apoptosis.*, v. 8, n. 1, p. 61–70, 2003.
41. SCHMITT, E. *et al.* Intracellular and extracellular functions of heat shock proteins: repercussions in cancer therapy. *J Leukoc Biol.*, v. 81, n. 1, p. 15–27, 2007.
42. SILVA M do DA da; GABRIEL, J. E. Alinhamentos múltiplos entre aminoácidos da proteína de choque térmico HSP70 em distintos animais por análises de bioinformática. *Estud Biol.*, v. 32, n. 76/81, p. 87–91, 2011.
43. EL FATIMY, R. *et al.* Heat shock factor 2 is a stress-responsive mediator of neuronal migration defects in models of fetal alcohol syndrome. *EMBO Mol Med.*, v. 6, n. 8, p. 1043–61, 2014.

44. NOWIS, D. *et al.* Direct tumor damage mechanisms of photodynamic therapy. *Acta Biochim Pol.*, v. 52, n. 2, p. 339–52, 2005.
45. FIRSZUK, M.; NOWIS, D.; GOŁB, J. PDT-induced inflammatory and host responses. *Photochemical and Photobiological Sciences*, v.10, n. 5, p. 653–63, 2011.
46. WANG, H. *et al.* Therapeutic and immune effects of 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy on UVB-induced squamous cell carcinomas in hairless mice. *Exp Dermatol.*, v. 22, n. 5, p. 362–3, 2013.
47. SILVA, A. P. **Avaliação histopatológica do tratamento do carcinoma espinocelular cutâneo em camundongos usando terapia fotodinâmica mediada por azul de metileno.** 2014. Tese (Doutorado em Ciências Biomédicas) - Universidade De São Paulo, São Paulo, 2014.
48. YOM, S. S. *et al.* Elevated Serum Cytokine Levels in Mesothelioma Patients Who Have Undergone Pleurectomy or Extrapleural Pneumonectomy and Adjuvant Intraoperative Photodynamic Therapy. *Photochem Photobiol.*, v. 78, n. 1, p. 75-81, 2003.
49. KICK, G. *et al.* Photodynamic Therapy Induces Expression of Interleukin 6 by Activation of AP-1 but not NF-kB DNA Binding. *Cancer Res.*, v. 55, n. 11, p. 2373–9, 1995.
50. GOLLNICK, S. O. *et al.* Altered Expression of Interleukin 6 and Interleukin 10 As a Result of Photodynamic Therapy in Vivo. *Cancer Res.*, v. 57, n. 18, p. 3904–9, 1997.
51. TANAKA, T.; NARAZAKI, M.; KISHIMOTO, T. Il-6 in inflammation, Immunity, And disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* v. 6, n. 10, 2014.
52. POP, V. V. *et al.* IL-6 roles – Molecular pathway and clinical implication in pancreatic cancer – A systemic review. *Immunol Lett.*, v. 181, n. 400177, p. 45–50, 2017.
53. KORBELIK, M.; KROSL, G. Enhanced Macrophage Cytotoxicity Against Tumor Cells Treated With Photodynamic Therapy. *Photochem Photobiol.*, v. 60, n. 5, p. 497–502, 1994.
54. EVANS, S. *et al.* Effect of photodynamic therapy on tumor necrosis factor production by murine macrophages. *J Natl Cancer Inst.*, v. 82, n. 1, p. 34–9, 1990.
55. BUYTAERT, E.; DEWAELE, M.; AGOSTINIS, P. Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer.*, v. 1776, n. 1, p. 86–107, 2007.
56. MACHADO, A. H. A. *et al.* Cellular and molecular studies of the initial process of the photodynamic therapy in HEp-2 cells using LED light source and two different photosensitizers. *Cell Biol Int.*, v. 33, n. 7, p. 785–95, 2009.
57. SKOOG, D. A. *et al.* **Fundamentos de Química Analítica.** São Paulo: Thomson, 2006.
58. FONTANA, L. C. *et al.* Photodithazine photodynamic effect on viability of 9L/lacZ gliosarcoma cell line. *Lasers Med Sci.*, v. 32, n. 6, p. 1245–52, 2017.

59. GILLIES, R. J.; DIDIER, N.; DENTON, M. Determination of cell number in monolayer cultures. *Anal Biochem.*, v. 159, n. 1, p. 109–13, 1986.
60. MICKUVIENE, I.; KIRVELIENE, V.; JUODKA, B. Experimental survey of non-clonogenic viability assays for adherent cells in vitro. *Toxicol Vitr.*, v. 18, n. 5, p. 639–48, 2004.
61. MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.*, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.
62. ROGERO, S. O. *et al.* Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. *Mater Res.*, v. 6, n. 3, p. 317–20, 2003.
63. CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.*, v. 162, n. 1, p. 156–9, 1987.
64. CRACK, J. A. *et al.* Functional analysis of a small heat shock/ α -crystallin protein from *Artemia franciscana*. *Eur J Biochem.*, v. 269, n. 3, p. 933–42, 2002.
65. MATHIESON, W.; THOMAS, G. A. Simultaneously extracting DNA, RNA, and protein using kits: Is sample quantity or quality prejudiced? *Anal Biochem.*, v. 433, n. 1, p. 10–8, 2013.
66. GRAPHPAD Prism 6 Statistics Guide - Extremely significant? Disponível em: https://www.graphpad.com/guides/prism/7/statistics/extremely_significant_results.htm. Acesso em: 20 out. 2019.
67. VOGEL, A. *et al.* **Química Analítica Qualitativa**. 6. ed. São Paulo: LTC., 2002. p. 462.
68. OGUNSIPE A, CHEN JY, NYOKONG T. Photophysical and photochemical studies of zinc(II) phthalocyanine derivatives - Effects of substituents and solvents. *New J Chem.*, v. 28, n. 7, p. 822–7, 2004.
69. GÜMRÜKÇÜ, G. *et al.* Photophysical, photochemical, and BQ quenching properties of zinc phthalocyanines with fused or interrupted extended conjugation. *J Chem.*, v. 2014, p. 1–11, 2014.
70. TEDESCO, A. C. *et al.* Analysis of mitochondria, endoplasmic reticulum and actin filaments after PDT with AlPcS 4. *Lasers Med Sci.*, v. 18, n. 4, p. 207–12, 2004.
71. MAFTOUM-COSTA M. *et al.* Mitochondria, endoplasmic reticulum and actin filament behavior after PDT with chloroaluminum phthalocyanine liposomal in HeLa cells. *Cell Biol Int.*, v. 32, n. 8, p. 1024–8, 2008.
72. PACHECO-SOARES, C. *et al.* Evaluation of photodynamic therapy in adhesion protein expression. *Oncol Lett.*, v. 8, n. 2, p. 714–8, 2014.

73. WIEDER, M. E. *et al.* Intracellular photodynamic therapy with photosensitizer-nanoparticle conjugates: Cancer therapy using a “Trojan horse.” *Photochem Photobiol Sci.*, v. 5, n. 8, p. 727–34, 2006.
74. CASTILHO, M. L. **Nanossondas bifuncionais fotossensibilizadoras para o tratamento do câncer de mama.** 2017. 107f. Tese (Doutorado em Engenharia Biomédica) - Universidade do Vale do Paraiba, São José dos Campos, 2017.
75. BEDNARCZUK, V. O. *et al.* Testes in vitro e in vivo utilizados na triagem toxicológica de produtos naturais. *Visão Acadêmica*, v. 11, n. 2, p. 1518–5192, 2010.
76. MOOR, A. C. E. Signaling pathways in cell death and survival after photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B Biol.*, v. 57, n. 1, p. 1–13, 2000.
77. KIM, J. *et al.* Down-regulation of heat-shock protein 27-induced resistance to photodynamic therapy in oral cancer cells. *J Oral Pathol Med.*, v. 42, n. 1, p. 9–16, 2013.
78. OLSEN, C. E. *et al.* Development of resistance to photodynamic therapy (PDT) in human breast cancer cells is photosensitizer-dependent: Possible mechanisms and approaches for overcoming PDT-resistance. *Biochem Pharmacol.*, v. 144, p. 63–77, 2017.
79. WEINBERG, R. A. **The Biology of Cancer.** 2nd. ed. [s.l.]: Garland Science, 2014.
80. WONG, T. W. *et al.* Photodynamic therapy mediates immediate loss of cellular responsiveness to cytokines and growth factors. *Cancer Res.*, v. 63, n. 13, p. 3812–8, 2003.
81. GOLLNICK, S. O. *et al.* Role of cytokines in photodynamic therapy-induced local and systemic inflammation. *Br J Cancer.*, v. 88, n. 11, p. 1772–9, 2003.
82. APOSTOLAKI, M. *et al.* Cellular mechanisms of TNF function in models of inflammation and autoimmunity. *Curr Dir Autoimmun.*, v. 11, p. 1–26, 2010.
83. HORIUCHI, T. *et al.* Transmembrane TNF- α : Structure, function and interaction with anti-TNF agents. *Rheumatology*, v. 49, n. 7, p. 1215–28, 2010.
84. MURPHY, K.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. **Imunobiologia de Janeway.** 7. ed. Porto Alegre: Artmed; 2013.
85. XU, F. *et al.* An investigation of heat shock protein 27 and P-glycoprotein mediated multi-drug resistance in breast cancer using liquid chromatography-tandem mass spectrometry-based targeted proteomics. *J Proteomics.*, v. 108, p. 188–97, 2014.
86. ACUNZO, J.; KATSOGIANNOU, M.; ROCCHI, P. Small heat shock proteins HSP27 (HspB1), α -crystallin (HspB5) and HSP22 (HspB8) as regulators of cell death. *Int J Biochem Cell Biol.*, v. 44, n. 10, p. 1622–31, 2012.
87. ZHENG, G. *et al.* HSP27-Mediated Extracellular and Intracellular Signaling Pathways Synergistically Confer Chemoresistance in Squamous Cell Carcinoma of Tongue. *Clin Cancer Res.*, v. 24, n. 5, p. 1163–75, 2018.

88. BUKAU, B.; HORWICH, A. L. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell.*, v. 92, n. 3, p. 351–66, 1998.
89. MODI, S. *et al.* HSP90 Inhibition Is Effective in Breast Cancer: A Phase II Trial of Tanespimycin (17-AAG) Plus Trastuzumab in Patients with HER2-Positive Metastatic Breast Cancer Progressing on Trastuzumab. *Clin Cancer Res.*, v. 17, n. 15, p. 5132–9, 2011.
90. CHEN, G. *et al.* Hsp90 stress potentiates rapid cellular adaptation through induction of aneuploidy. *Nature*, v. 482, n. 7384, p. 246–50, 2012.
91. TAIPALE, M.; JAROSZ, D. F.; LINDQUIST, S. HSP90 at the hub of protein homeostasis: emerging mechanistic insights. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, v. 11, n. 7, p. 515–28, 2010.
92. RODRÍGUEZ, M. E. *et al.* Heat shock proteins in the context of photodynamic therapy: autophagy, apoptosis and immunogenic cell death. *Photochem Photobiol Sci.*, v. 15, n. 9, p. 1090–102, 2016.
93. XUE, L.; AGARWAL, M. L.; VARNES, M. E. Elevation of Grp-78 and Loss of Hsp-70 Following Photodynamic Treatment of V79 Cells: Sensitization By Nigericin. *Photochem Photobiol.*, v. 62, n. 1, p. 135–43, 1995.
94. GOMER, C. J. *et al.* Photodynamic therapy-mediated oxidative stress can induce expression of heat shock proteins. *Cancer Res.*, v. 56, n. 10, p. 2355–60, 1996.
95. FERRARIO, A.; GOMER, C. J. Targeting the 90 kDa heat shock protein improves photodynamic therapy. *Cancer Lett.*, v. 289, n. 2, p. 188–94, 2010.
96. SCHAEFER, L. *et al.* The matrix component biglycan is proinflammatory and signals through Toll-like receptors 4 and 2 in macrophages. *J Clin Invest.*, v. 115, n. 8, p. 2223–33, 2005.
97. BERENDSEN, A. D. *et al.* Modulation of canonical Wnt signaling by the extracellular matrix component biglycan. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, v. 108, n. 41, p. 17022–7, 2011.
98. MORETH, K.; IOZZO, R. V.; SCHAEFER, L. Small leucine-rich proteoglycans orchestrate receptor crosstalk during inflammation. *Cell Cycle*, v. 11, n. 11, p. 2084–91, 2012.
99. AMENTA, A. R. *et al.* Biglycan is an extracellular MuSK binding protein important for synapse stability. *J Neurosci.*, v. 32, n. 7, p. 2324–34, 2012.
100. AMENTA, A. R. *et al.* Biglycan recruits utrophin to the sarcolemma and counters dystrophic pathology in mdx mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, v. 108, n. 2, p. 762–7, 2011.
101. MERCADO, M. L. *et al.* Biglycan regulates the expression and sarcolemmal localization of dystrobrevin, syntrophin, and nNOS. *FASEB J.*, v. 20, n. 10, 2006.
102. RAFII, M. S. *et al.* Biglycan binds to α - and γ -sarcoglycan and regulates their expression

during development. *J Cell Physiol.*, v. 209, n. 2, p. 439–47, 2006.

103. KIMÁKOVÁ, P. *et al.* Photoactivated hypericin increases the expression of SOD-2 and makes MCF-7 cells resistant to photodynamic therapy. *Biomed Pharmacother.*, v. 85, p. 749–55, 2017.