

UNIVERSIDADE DO VALE DO PARAÍBA
INSTITUTO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA

LETÍCIA CORRÊA FONTANA

**COMPARAÇÃO DOS EFEITOS DO PHOTODITHAZINE, FOTOENTICINE E
PROTOPORFIRINA IX APLICADO À TERAPIA FOTODINÂMICA EM
GLOSSARCOMA**

São José dos Campos, SP
2020

LETÍCIA CORRÊA FONTANA

**COMPARAÇÃO DOS EFEITOS DO PHOTODITHAZINE, FOTOENTICINE E
PROTOPORFIRINA IX APLICADO À TERAPIA FOTODINÂMICA EM
GLOSSARCOMA**

Tese de Doutorado 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 Doutor em Engenharia Biomédica.

Orientadora: Prof^a. Dra. Juliana Ferreira Strixino

Co-orientadora: Prof^a. Dra. Cristina Pacheco Soares

São José dos Campos, SP
2020

TERMO DE AUTORIZAÇÃO DE DIVULGAÇÃO DA OBRA

Ficha catalográfica

Fontana, Letícia Corrêa

Comparação dos efeitos do photodithazine, fotoenticine e protoporfirina IX aplicado à terapia fotodinâmica em gliossarcoma / Letícia Corrêa Fontana; orientadora, Juliana Ferreira Strixino; co-orientadora Cristina Pacheco Soares. - São José dos Campos, SP, 2020.

1 CD-ROM, 104 p.

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

Inclui referências

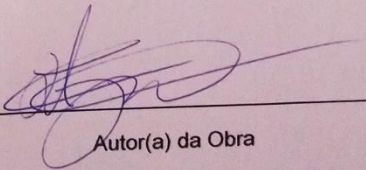
1. Engenharia Biomédica. 2. Terapia fotodinâmica. 3. Gliossarcoma. 4. Tumor cerebral. I. Strixino, Juliana Ferreira, orient. II. Soares, Cristina Pacheco, co-orient. III. Universidade do Vale do Paraíba. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica. IV. Título.

Eu, Letícia Corrêa Fontana, 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, 1 de Setembro de 2020.



Autor(a) da Obra

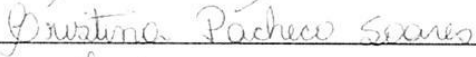
Data da defesa: ____/____/____


LETÍCIA CORRÊA FONTANA

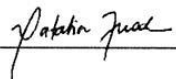
Tese aprovada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor, do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba – Univap, pela seguinte banca examinadora:

PROF.^ª DR.^ª RENATA AMADEI NICOLAU  _____

PROF.^ª DR.^ª JULIANA FERREIRA STRIXINO  _____

PROF.^ª DR.^ª CRISTINA PACHECO SOARES  _____

PROF.^ª DR.^ª DAYANE BATISTA TADA - Unifesp  _____

PROF.^ª DR.^ª NATALIA MAYUMI INADA – USP/São Carlos  _____

Prof. Dr. Leandro José Raniero

Diretor do IP&D – Univap

São José dos Campos, 02 de março de 2020.

AGRADECIMENTOS

“O medo é só um motivo para tentar ainda mais”.

À FAPESP pela bolsa ao longo do curso, que possibilitou a dedicação e auxiliou na execução desse projeto. Processo FAPESP 2016/20022-7.

Agradeço à CAPES pela bolsa taxa durante o primeiro ano, sem a qual não conseguiria iniciar esse projeto.

À Professora Dra. Juliana Ferreira Strixino, pelo apoio, pelos ensinamentos e por estar sempre disponível para auxiliar, por me ensinar o que é fazer ciência. Obrigada pelo carinho ao longo desses anos todos, pela paciência e todos os bons momentos de conversas e conselhos. Você foi fundamental para que eu chegasse até aqui.

À Professora Dra. Cristina Pacheco Soares pela contribuição fundamental ao longo de cada etapa do trabalho. Obrigada pela atenção, carinho e paciência.

A Professora Dra. Natalia Inada e à aluna Ilaiali, da USP São Carlos, pelo auxílio na discussão do projeto e doação dos fármacos.

A Professora Dra. Martha Simões e à aluna Camila e Fernanda do IPEN-USP, bem como a Professora Dra. Isabelle Ferreira pelo auxílio na discussão e execução dos experimentos em animais.

A Professora Dayanne Tada e à aluna Fabiana, da Unifesp de São José dos Campos, pelo auxílio nos experimentos e discussão sobre melhorias do projeto.

A todos os funcionários da UNIVAP, pelo comprometimento e dedicação.

A todos os amigos e colegas das instituições Centro de Educação Santos Dummont (CasdVest e Casdinho).

Aos amigos que fiz no decorrer dessa jornada, com quem sempre pude contar e aprender: Maiara, Caio, Vanessa, Bruno, Luciana, Miriam, João Antônio, Pablo, Beatriz, Lara e tantos outros que me apoiaram e ajudaram em todos os momentos.

As alunas Rainara Moreno Sanches de Almeida e Gabrielle dos Santos Vitorio, por todo auxílio ao longo dos experimentos, obrigada por toda a paciência ao longo dos anos e por me permitir ensinar e aprender com vocês. Tenho certeza, vão ter muito êxito na carreira que escolherem. Vocês são ótimos e carrego muitos momentos especiais com cada um de vocês.

Ao meu amigo e companheiro de laboratório ao longo de todos esses anos, André Henrique, obrigada pelo auxílio no projeto, pelos conselhos, brincadeiras, pela amizade e por sempre me apoiar e me entender!

A minha amiga irmã de coração, que me ajudou a tornar possível esse projeto, me ensinou a confiar em mim mesma e a buscar sempre por mais. Obrigada por sempre ir comigo no caminho mais correto, por me ajudar mesmo de longe e nunca negar apoio em nenhuma fase da minha vida, Juliana Guerra.

Aos meus pais, Valdemir e Lourdes, e meu irmão, Diego por todo suporte e toda preocupação com meu bem estar ao longo desses anos. E a toda a minha família.

Ao meu parceiro da vida Fábio Luíz, pelo apoio, carinho e compreensão, fundamentais para que eu chegasse até aqui, obrigada por ser meu alicerce e me manter sempre firme, mesmo nos mais conturbados momentos. Espero ser para você ao menos 10% do foi para mim nesses anos todos, te amo!

Agradeço a Deus pelo dom da vida e por me permitir chegar até aqui.

“Part of the journey is the end...”

COMPARAÇÃO DOS EFEITOS DO PHOTODITHAZINE, FOTOENTICINE E PROTOPORFIRINA IX APLICADO À TERAPIA FOTODINÂMICA EM GLIOSSARCOMA

RESUMO

A Terapia Fotodinâmica (TFD) é uma terapia promissora, que emprega um agente fotossensível (FS), luz e oxigênio molecular, produzindo espécies reativas de oxigênio (ERO's) com o objetivo de induzir a célula cancerígena à morte, sendo um tratamento de interesse à Tumores Cerebrais. O objetivo desse trabalho foi avaliar a ação da TFD em células de gliossarcoma, utilizando como FS as clorinas russa (Photodithazine - PDZ) e espanhola (Fotoenticine - FTC) e o precursor da protoporfirina IX, ácido aminolevulínico (ALA). Foram realizados testes *in vitro*, a fonte de luz foi um dispositivo LED (Biopdi/Irrad-Led 660) para as clorinas e um dispositivo LED (Biopdi/Irrad-Led 630) para o ALA. Foram realizados testes de viabilidade celular com células 9L (gliossarcoma) e L929 (fibroblastos), e foi demonstrado que o sucesso da terapia é dependente da concentração do FS utilizado. Para o ALA, o período de incubação mínimo para que haja resposta eficaz, foi o período de 4h. Por meio do teste de internalização das clorinas, foi constatado a presença dos FSs no interior das células após 1h de incubação. Ao se observar os tipos de morte celular induzidos pela TFD com os três FSs, foi demonstrada a prevalência de morte celular por necrose ou apoptose tardia, com ausência de apoptose inicial. Por fim, houve um aumento na produção de ERO's após a TFD para todos os FSs, porém quando visto o ALA, o tempo de incubação é fator chave para a produção dessas espécies. Entre as clorinas, o PDZ apresentou maior rendimento quântico de oxigênio singleto, sendo considerado o melhor fármaco entre os 3 testados. O PDZ foi utilizado para análise *in vivo* de acúmulo da clorina em tumores xenográficos induzidos em ratos Fischer, com células 9L. Com 1h observou-se acúmulo do FS no tumor, sendo crescente no tempo de 3h. Além disso, se apresentou um fármaco de fácil transporte via sistêmica ou local. Por fim, foi constatado presença do FS na região do crânio, porém novos estudos devem ser realizados para comprovar sua passagem pela barreira hematoencefálica.

Palavras-chave: Terapia fotodinâmica. Gliossarcoma. Tumor cerebral.

COMPARISON OF THE EFFECTS OF PHOTODITHAZINE, PHOTOENTICIN AND PROTOPORPHYRIN IX APPLIED TO PHOTODYNAMIC THERAPY IN GLIOSARCOMA

ABSTRACT

Photodynamic Therapy (PDT) is a promising therapy that employs a photosensitive agent (FS), light and molecular oxygen, producing reactive oxygen species (ROS) in order to induce a cancer cell to death, being a treatment of interest for tumors brain. The objective of this work was to evaluate an action of TFD in gliosarcoma cells, using FS as a Russian (Photodithazine - PDZ) and Spanish (Fotoenticine - FTC) and the precursor protoporphyrin IX, aminolevulinic acid (ALA). *In vitro* tests were performed, a light source was an LED device (Biopdi / Irrad-Led 660) for chlorides and an LED device (Biopdi / Irrad-Led 630) for ALA. Cell viability tests were performed with 9L (gliosarcoma) and L929 (fibroblast) cells, and it was shown that the success of the therapy depends on the concentration of FS used. For ALA, the minimum incubation period to effective response was 4 hours. Through the chlorine internalization test, the presence of FSs was found inside the cells after 1 hour of incubation. When observing the types of cell death induced by TFD with three FSs, the prevalence of cell death due to necrosis or late apoptosis was demonstrated, with the absence of initial apoptosis. Finally, there was an increase in the production of ROS after a TFD for all FSs, but when observed in ALA, the incubation time is the key factor for the production of these species. Among chlorine, PDZ had the highest singlete oxygen yield, being considered the best drug among the 3 tested. PDZ was used for in vivo analysis in xenographic tumors induced in Fischer rats, with 9L cells. With 1h there is an increase in FS in the tumor, increasing more and more in 3h. In addition, it shows a type of easy transport via systemic or local. Finally, the presence of FS was found in the skull region, however, further studies must be carried out to prove its passage through the blood-brain barrier.

Keywords: Photodynamic Therapy. Gliosarcoma. Brain tumor.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Linha do tempo: História da Terapia Fotodinâmica (1900 – 2000).....	22
Figura 2 - Diagrama de Jablonski simplificado.	24
Figura 3 - Janela óptica tecidual.....	26
Figura 4 - Estrutura molecular dos fotossensibilizadores Fotoenticine®, Photodithazine® e Protoporfirina IX	28
Figura 5 - Espectro de absorção dos fotossensibilizadores Fotoenticine®, Photodithazine®.....	29
Figura 6 - Representação esquemática da rota biosintética da Heme	30
Figura 7 - Espectro de intensidade da Biotable utilizada no projeto.	31
Figura 8 - Esquema de metodologia dos experimentos <i>in vitro</i>	37
Figura 9 - Teste de Trypan realizado após 18h da aplicação da ALA-TFD.	47
Figura 10 - Comparação da Viabilidade celular após ALA-TFD.	49
Figura 11 - Teste de Trypan realizado após 18h da aplicação da FTC-TFD.....	50
Figura 12 - Comparação da viabilidade celular com FTC e PDZ	51
Figura 13 - Avaliação da atividade mitocondrial por meio do teste de MTT, após 18h da ALA-TFD.	52
Figura 14 - Avaliação da Atividade Mitocondrial antes e pós FTC-TFD.	54
Figura 15 - Análise morfológica com Fotoenticine.....	55
Figura 16 - Análise viabilidade celular para em linhagem fibroblástica L929, com as clorinas.....	56
Figura 17 - Imagens confocal realizadas após 1h, 2h, 4h, 6h e 8h de incubação do fármaco ALA.....	58
Figura 18 - Espectro de fluorescência da formação de PpIX em diferentes tempos.	59
Figura 19 - Curva de formação da PpIX.	60
Figura 20 - Internalização do Fotoenticine em células da linhagem 9l/lacZ	61
Figura 21 - Imagens confocal realizadas após 1h de incubação do PDZ.	62
Figura 22 - Imagens confocal realizadas após 1h de incubação do FTC.	62
Figura 23 - Morte celular por citometria de imagem, imediatamente após a TFD utilizando ALA, FTC e PDZ como FSs e 18h após a TFD.....	64
Figura 24 - Produção de Espécies Reativas de Oxigênio após TFD.....	66
Figura 25 - Medida da formação de oxigênio singlete pelas clorinas.	68
Figura 26 - Medida de fluorescência do PDZ em animais.	69
Figura 27 - Captação da fluorescência do FS pelo encéfalo em animais sem tumor e com tumor.	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação de Tumores do Sistema Nervoso Central segundo Organização Mundial da Saúde (OMS), 2016.....	20
Tabela 2 - Parâmetros de irradiação dos testes <i>in vitro</i>	35
Tabela 3 - Resultados gerais obtidos pelos testes <i>in vitro</i>	89

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abs	Absorbância
ALA	Ácido aminolevulínico
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHE	Barreira Hematoencifálica
Cx. c/	Caixa com
DNA	Ácido Desoxiribonucléico
DMSO	Dimetil sulfóxido
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
ELISA	Ensaio com imuno adsorvente ligado a enzima
ERO's	Espécies Reativas de Oxigênio
EUA	Estados Unidos da América
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FS	Fotossensibilizador
FTC	Fotoentcine
G	Gravidade
GS	Gliossarcoma
GY	Gray
H	Hora
H2DCF-DA	Diacetato de 2',7'-diclorodi-hidrofluoresceína
HpD	Derivado de hematoporfirina
IDH-Selvagem	Sem mutação de Isocitrato Desidrogenase
LED	Diodo emissor de luz
Laser	<i>Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation</i>
mL	Mililitro
mM	Mili molar
MTT	(3-(4,5 dimetiazol-2il)-2,5 difeniltetrazolium brometo)
µg	micrograma
µL	micro litro
µM	micromolar
Nm	Nanometro
OMS	Organização mundias de saúde
¹ O ₂	Oxigênio Singleto

PDZ	<i>Photodithazine</i>
PBS	Tampão fosfato salino
Pp IX	Protoporfirina IX
RGF	Ressecção Guiada por Fluorescência
RPM	Rotações por minuto
S0	Singleto fundamental
S1	Singleto excitado
SFB	Soro Fetal Bovino
SNC	Sistema Nervoso Central
T1	Tripleto
TMZ	Temozolomida
TFD	Terapia Fotodinâmica
9L	Linhagem de gliossarcoma de ratos

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	Justificativa.....	15
1.2	Objetivo Geral.....	16
1.3	Objetivos específicos.....	16
1.4	Hipótese	17
2	REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1	Gliossarcoma.....	18
2.2	Terapia Fotodinâmica (TFD).....	21
2.2.1	<i>Fotossensibilizadores</i>	26
2.2.2	<i>Fonte de Luz</i>	30
2.3	Terapia Fotodinâmica e Gliomas	32
3	MATERIAL E MÉTODOS	34
A.	ANÁLISES <i>In vitro</i>	34
A.1.	Linhagem celular	34
A.2.	Fotossensibilizadores	34
A.3.	Medida pH ALA	35
A.4.	Fonte luz.....	35
A.5.	Ensaio de citotoxicidade.....	35
a.	Grupos experimentais.....	36
b.	Análise da viabilidade celular pelo método de exclusão com Azul de Trypan.....	37
c.	Teste de Atividade mitocondrial	38
d.	Análise Morfológica das células tratadas.....	38
A.6.	Análise da Produção PpIX.	39
a.	Microscopia confocal de fluorescência.....	39
b.	Análise comparativa de PpIX por fluorescência	39
A.7.	Internalização Clorinas.....	40
A.8.	Análise de Morte Celular	41
A.9.	Análise de Formação Intracelular de Espécies Reativas de Oxigênio.....	41
A.10.	Medida indireta de oxigênio singlete das clorinas	42
	ANÁLISES <i>In vivo</i>	43
B1.	Aspectos Legais de Bioética e Biossegurança.....	43
B2.	Casuística.....	43
B3.	Indução do tumor.....	44
B4.	Fotossensibilizador	44
B5.	Análise das vias de administração do fármaco	44
B6.	Acúmulo do fármaco no encéfalo.	45
4	RESULTADOS	46
4.1	Teste de Citotoxicidade	46
a.	Teste Azul de Trypan	46
b.	Ensaio MTT	51
c.	Morfológico.....	55
4.2	Viabilidade por exclusão por azul de Trypan em Fibroblastos	56
4.3	Análise de Produção PpIX.....	57
a.	Microscopia Confocal de fluorescência.....	57
b.	Curva de formação da PpIX.....	59

4.3	Internalização Clorinas	60
4.4	Morte Celular por Apoptose/Necrose	62
4.5.	Produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO's).....	65
4.6.	Eficiência da Produção de Oxigênio singlete pelas clorinas.	67
4.7.	Análise das vias de administração do fármaco <i>in vivo</i>	69
B5.	Acúmulo do fármaco no encéfalo.	71
5	DISCUSSÃO	73
6	CONCLUSÃO.....	88
	REFERENCIAS	91
	ANEXOS – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA	103

1 INTRODUÇÃO

O gliossacoma (GS) é um dos tumores mais agressivos do Sistema Nervoso Central (SNC), com alto grau de malignidade. É classificado pela Organização mundial de saúde (OMS) como tumor astrocitário, glioblastomas IDH-Selvagem, pela nova classificação de 2016, apresentando prognóstico de até 11 meses de vida ao paciente. O GS é um problema de saúde pública, por vezes negligenciado por sua raridade de ocorrência, sendo frequentemente tratado como um glioblastoma multiforme, por suas características parecidas, apesar desse segundo não possuir o conteúdo mesenquimal, ou confundido com meningiomas, devido à sua localização (DAWAR *et al.*, 2013; DAMODARAN *et al.*, 2014).

O tratamento de primeira escolha é a ressecção completa do tumor, seguida de tratamento radioterápico e, por vezes, quimioterápico. Em casos tidos como inoperáveis pela localização ou regiões acometidas pelo tumor, faz-se uso de radioterapia e quimioterapia. Entretanto um dos desafios que esses tratamentos apresentam é a capacidade de ultrapassar as barreiras que protegem o SNC, tais como a caixa craniana, meninges e a barreira hematoencefálica (BHE) (ARYAL *et al.*, 2013; ALYAUTDIN *et al.*, 2014).

A terapia fotodinâmica (TFD) é uma técnica em ascensão no tratamento de tumores cerebrais, sendo uma alternativa com potencial de melhor prognóstico de pacientes com tumores cerebrais. Apresenta-se como um tratamento pouco invasivo, com fármacos fotossensíveis capazes de ultrapassar a BHE, tais como o Ácido Aminolevulínico (ALA), precursor da protoporfirina IX (PpIX), já utilizado em cirurgias guiadas por fluorescência. Embora diversos trabalhos tenham estudado a TFD como modalidade terapêutica em diferentes tipos de gliomas, seu uso em gliossarcomas ainda é pouco explorado, tornando esse um abrangente campo epistemológico (HEFTI *et al.*, 2011; ALBERT; HEFTI; LUGINBUEHL, 2014; MATSUO *et al.*, 2017).

A TFD baseia-se na interação de uma droga fotossensível (FS), luz em comprimento de onda adequado ao espectro de absorção do FS escolhido e oxigênio molecular, gerando espécies reativas de oxigênio (ERO's) por meio de reações fotoquímicas. Essas espécies apresentam alta citotoxicidade, podendo desencadear morte celular por necrose, apoptose ou autofagia (ALLISON; SIBATA, 2010; OLSEN *et al.*, 2017).

O sucesso da TFD é dependente da escolha do FS, determinando-se concentrações ideais para o tratamento, bem como a fonte de luz escolhida e os parâmetros de irradiação. O tecido a ser tratado também é outro fator determinante na eficácia da terapia. Sabe-se que protocolos com padronização de FS e condições de irradiação, por vezes não apresentam o mesmo efeito em tecidos similares. Sendo assim, é necessário o desenvolvimento de protocolos individuais para cada tipo de tumor (TIRAPELLI *et al.*, 2011; BECHET *et al.*, 2012; AKIMOTO, 2016).

1.1 Justificativa

Os tumores cerebrais perfazem 1,4% a 1,8% dos casos de cânceres e representam o quarto câncer com maior mortalidade do mundo, atrás apenas do câncer de testículos, cervical e linfomas, cânceres com maior número de incidência. Segundo a antiga classificação da OMS, os tumores cerebrais poderiam ser classificados em Grau I (menos agressivo) à grau IV (mais agressivo), com menos de 30% de sobrevivência no primeiro ano a partir do diagnóstico. Em 2018, foram relatados cerca de 296.851 casos de câncer cerebral, com 241.037 mortes, e são esperados cerca de 435.554 novos casos até 2040 (OSTROM *et al.*, 2017; INCA, 2018; WHO, 2018).

O tratamento para os tumores do SNC, é complexo iniciando-se pela cirurgia de remoção ou biópsia, seguindo-se de radioterapia e quimioterapia. A quimioterapia isolada, raramente é indicada, pela dificuldade do fármaco em ultrapassar a BHE, sendo escolhido o fármaco Temolozomida, comercialmente conhecido como Temodal® para o tratamento. Além disso o fármaco apresenta um alto custo comercial, cerca de R\$2.347,47 (cx. c/ 5 comprimidos), sem as taxas tributárias. Em estudo clínico apresentado por Van Den Bert e colaboradores em 2019, foi possível constatar que o uso da quimioterapia para tumores cerebrais sem mutações no gene IDH, não levam ao aumento da sobrevivência ou sobrevida livre do paciente (ANVISA, 2019; VAN DEN BERT *et al.*, 2019).

Em vista do exposto, junto aos problemas socioeconômicos e a redução da expectativa de vida causadas pelo câncer cerebral, bem como a falta de trabalhos com terapia fotodinâmica em cânceres cerebrais de alta malignidade (como glioblastomas multiforme e gliossarcomas), em 2016 foi iniciado um estudo experimental, que deu origem à dissertação de mestrado intitulado “Estudo da Terapia fotodinâmica no tratamento de gliossarcoma, análise *in vitro* (L9/LacZ)”, no qual foram avaliados os

efeitos da TFD com a clorina russa Photodithazine® (PDZ), *in vitro*. Demonstrando, por meio da análise da viabilidade celular, morfologia, internalização e localização, resultados promissores à utilização da TFD com clorinas (FONTANA *et al.*, 2016).

Buscando ampliar a divulgação e os efeitos das clorinas, esse estudo avaliou os efeitos da TFD com a clorina Russa PDZ, com a clorina espanhola Fotoenticine® e o ALA, por ser o fármaco padrão para TFD para casos de tumores cerebrais, em células de gliossarcoma.

1.2 Objetivo Geral

Avaliar a ação da TFD comparando os FSs FTC, PDZ e ALA (PpIX) em linhagem de células de gliossarcomas 9L/lacZ, e a resposta de tumores de gliossarcoma xenográficos induzidos, observando a resposta à terapia.

1.3 Objetivos específicos

Avaliar a eficiência da TFD utilizando-se duas clorinas, em comparação ao Ácido aminolevulínico (ALA), precursor da Protoporfirina IX (PpIX), estabelecendo parâmetros mais adequados para tratamentos por meio de:

- 1) Análise da viabilidade celular com os FSs e pós TFD em células tumorais (9L/lacZ) por meio de Exclusão por Azul de Trypan, Atividade mitocondrial e morfologia celular.
- 2) Análise dos tipos de morte celular induzidas com as Clorinas e PpIX induzida por ALA (apoptose/necrose), em células tumorais.
- 3) Verificação da internalização dos FSs em células tumorais e não tumorais no período de 1h para as clorinas, por microscopia confocal de fluorescência.
- 4) Avaliação da formação de PpIX em células tumorais por meio de microscopia Confocal de fluorescência e medida de fluorescência de PpIX, nos tempos de 1h, 2h, 4h, 6h e 8h.
- 5) Avaliação da formação de espécies reativas de oxigênio em células tumorais, após TFD.
- 6) Análise da viabilidade celular de fibroblasto L929 submetidas a TFD com clorina, por meio de análise por exclusão de Trypan.

- 7) Mensuração indireta da formação de oxigênio singleto induzida por clorinas.
- 8) Análise das vias de administração do PDZ, por meio de imagem de fluorescência (*in vivo*).
- 9) Detecção da presença do PDZ na região encefálica do animal por meio de imagem de fluorescência (*in vivo*).

1.4 Hipótese

Considerando-se estudos prévios (ALLISON; SIBATA, 2010; BERNAL *et al.*, 2015; ABRAHAMSE; HAMBLIM, 2016), espera-se que os testes de viabilidade para ambas as clorinas sejam mais promissores do que o encontrado para os estudos com ALA, além de um menor tempo de acúmulo celular das clorinas, por esse ser um composto fotossensível e não um precursor. Além disso, espera-se que o menor tempo para o ALA produzir a PpIX suficiente seja no período de 4h de incubação, por ser o tempo mais utilizado na literatura em testes *in vitro* (PALASUBERNIAM *et al.*, 2015; COZZENS *et al.*, 2016). Pela morfologia, é esperado que as clorinas demonstrem uma maior destruição do citoplasma, sem comprometimento nuclear, além de apresentarem maior formação de ERO's

Por meio da análise de morte celular, espera-se que haja uma maior taxa de morte por apoptose para os 3 compostos, por ser o tipo de morte desejável aos tratamentos de câncer cerebral.

Pelos testes em animais, acredita-se no potencial das clorinas como agente fotossensibilizador é esperado que com pouco tempo de incubação (até 4h) haja acúmulo do FS no tumor, para a realização da TFD, bem como a presença desses fármacos na região cerebral.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Gliossarcoma

O SNC é responsável por receber, analisar e integrar as informações do organismo, interpretando os estímulos internos e externos, de modo a ordenar uma ação em resposta. Além disso, o SNC possui a capacidade de gravar informações, deixando-as armazenadas em memória que servem como parâmetros para comparações aos estímulos novos (GUYTON; HALL, 2009).

O SNC é composto por dois tipos celulares: neurônios e células gliais. Os neurônios são células especializadas permanentes, capazes de receber estímulos transduzidos, processar e enviar informações ao organismo, por meio de impulsos nervosos elétricos que são quimicamente mediados por neurotransmissores, sendo as principais células do SNC. Já as células gliais, se localizam entre os neurônios e apresentam diferentes funções de auxílio no funcionamento dos neurônios (BARBOSA; DE MEDEIROS; AUGUSTO, 2006; AZEVEDO *et al.*, 2009).

As células gliais são divididas em diferentes tipos, segundo sua função e morfologia, como as micróglia, células associadas à macrófagos responsáveis por auxiliar na resposta imune do SNC, oligodendritos, responsáveis pela síntese de mielina nos axônios neuronais, e os astrócitos, células importantes no processo de nutrição e sustentação dos neurônios, agindo na limitação do crescimento neuronal, além de auxiliar na regulação de neurotransmissores em sinapses nervosas (BEAR; CONNORS; PARADISO, 2007).

As células gliais tem capacidade de divisão mitótica, sendo, portanto, as células acometidas em ocorrências de tumores cerebrais, também conhecidos como gliomas. Em 2016 a Organização Mundial de Saúde (OMS) elaborou um novo método de classificação de tumores do SNC, visando um diagnóstico mais preciso, baseado em sua morfologia e características genéticas. A nova classificação traz uma nova nomenclatura a esses tumores, que devem consistir em nome histopatológico, baseado no tipo celular afetado, seguido de características genéticas (Tabela 1) (CLARA, 2011; LOUIS *et al.*, 2016).

Os astrocitomas são os tumores mais comuns, correspondendo cerca de 76% dos tumores cerebrais. Dentre os tipos de astrocitomas mais graves, estão os gliossarcomas, tumores astrocitários difusos, sendo uma variante histopatológica do

glioblastoma IDH-Tipo Selvagem (sem mutação no gene IDH), antigamente classificado como um tumor grau IV, ou seja, com alta taxa de malignidade (LOUIS *et al.*, 2016; FRANDSEN *et al.*, 2017).

O GS é composto por dois componentes de malignidade, uma de origem glial e outro mesenquimal (geralmente fibroblastos), essa característica torna o tumor mais invasivo e agressivo, aumentando os casos de metástase. Perfazem 2% dos tumores cerebrais astrocitários como um todo e pode apresentar sintomas que impossibilitam o acometido de seguir com sua rotina, de fortes dores de cabeça à paralisia total ou parcial dos membros, além disso, seu prognóstico é não favorável, podendo variar de 3 até 11 meses de vida (MANNAS *et al.*, 2014; WOLBERS, 2014; AZAMI *et al.*, 2017; SMITH *et al.*, 2017).

Apesar do avanço tecnológico nos centros médicos para o tratamento de tumores cerebrais, os resultados seguem desfavoráveis. A primeira opção terapêutica é a ressecção total ou parcial do tumor, visando a retirada do tecido afetado e a preservação do tecido sadio e das funções neurológicas. Entretanto, aproximadamente 35% dos acometidos não podem realizar a ressecção, devido à localização tumoral, acometimento de mais de um lobo cerebral ou idade avançada, permitindo apenas uma citorredução do tumor. (MANNAS *et al.*, 2014; SPRING *et al.*, 2015; SHIN; YOON; DIAZ, 2017).

Coadjuvante à remoção cirúrgica ou adjuvantes em caso de tumores tidos como inoperáveis por sua localização ou área de disseminação tumoral, é realizada a radioterapia em uma dose de 60 GY. A quimioterapia apresenta-se como última alternativa ou associada à remoção cirúrgica ou radioterapia (TZERKOVSKY *et al.*, 2014; WOLBERS, 2014; AZAMI *et al.*, 2017; SHIN; YOON; DIAZ, 2017).

O tratamento realizado apenas com quimioterápico, não é indicado, uma vez que há uma baixa absorção de fármacos, devido as barreiras mecânicas do SNC (como as meninges) e a barreira hematoencefálica (BHE), composta por células endoteliais e perivascularares (células de músculo liso, perícitos e microglias) (ALYAUTDIN *et al.*, 2014; SHIN, YOON; DIAZ, 2017).

Tabela 1 - Classificação de Tumores do Sistema Nervoso Central segundo Organização Mundial da Saúde (OMS), 2016.

Tumores Astrocíticos Difusos e Oligodendrogliais	ICD-O	Tumores Neurais e Mistos Neurais e Gliais	ICD-O
Astrocitoma Difuso, IDH-Mutante	9400/3	Tumor neuroepitelial disembrionário	9413/0
Astrocitoma gemistocítico, IDH mutant	9411/3	Gangliocitoma	9492/0
Astrocitoma Difuso, IDH-Selvagem	9400/3	Ganglioglioma	9505/1
Astrocitoma Difuso, NOS	9400/3	Ganglioglioma anaplásico	9505/3
		Gangliocitoma displásico cerebelar (doença de Lhermitte-Duclos)	9493/0
Astrocitoma anaplásico, IDH-Mutante	9401/3	Astrocitoma infantil desmoplásico e ganglioglioma	9412/1
Astrocitoma anaplásico, IDH-Selvagem	9401/3	Tumor glioneural papilar	9509/1
Astrocitoma anaplásico, NOS	9401/3	Tumor glioneuronal com formação de rosetas	9509/1
		<i>Tumor glioneuronal leptomeníngeo difuso</i>	
Glioblastoma, IDH-Selvagem	9440/3	Neurocitoma central	9506/1
Glioblastoma de Célula Gigante	9441/3	Neurocitoma extraventricular	9506/1
Gliosarcoma	9442/3	Liponeurocitoma cerebelar	9506/1
Glioblastoma Epitelióide	9440/3	Paranglioma	8693/1
Glioblastoma, IDH-Mutante	9445/3		
Glioblastoma, NOS	9440/3	Tumores da região pineal	
		Pineocitoma	9361/1
Glioma de linha média difusa, H3 K27M - Mutante	9385/3	Tumor parenquimatoso pineal de diferenciação intermediária	9362/3
		Pineoblastoma	9362/3
Oligodendrogloma, IDH-Mutante e 1p/19q-codeletado	9450/3	Tumor papilar da região pineal	9395/3
Oligodendrogloma, NOS	9450/3		
		Tumores Embrionários	
Oligodendrogloma anaplásico, IDH-Mutante e 1p/19q-codeletado	9451/3	Meduloblastomas, geneticamente definidos	
Oligodendrogloma anaplásico, NOS	9451/3	Meduloblastoma, WNT-ativado	9475/3
		Meduloblastoma, SHH-ativado e TP53-selvagem	9471/3
Oligoastrocitoma, NOS	9382/3	Meduloblastoma, não-WNT/não-SHH	9477/3
Oligoastrocitoma anaplásico, NOS	9382/3	Meduloblastoma, grupo 3	
		Meduloblastoma, grupo 4	
Outros Tumores Astrocitários		Meduloblastomas, histologicamente definidos	
Astrocitoma pilocítico	9421/1	Meduloblastoma, clássico	9470/3
Astrocitoma pilomixóide	9425/3	Meduloblastoma, desmoplásico/nodular	9471/3
Astrocitoma subependimário de células gigantes	9384/1	Meduloblastoma com extensa nodularidade	9471/3
Xantoastrocitoma pleomorfo	9424/3	Meduloblastoma, de célula grande/anaplásica	9474/3
Xantoastrocitoma pleomorfo anaplásico	9424/3	Meduloblastomas, NOS	9470/3
Tumores Ependimários		Tumor embrionário com rosetas multicamadas, C19MC-alterado	9478/3
Subependimoma	9383/1	Tumor embrionário com rosetas multicamadas, NOS	9478/3
Ependimoma mixopapilar	9394/1	Meduloepitelioma	9501/3
Ependimoma	9391/3	Neuroblastoma do SNC	9500/3
Ependimoma papilar	9393/3	Ganglioneuroblastoma do SNC	9490/3
Ependimoma de células claras	9391/3	Tumor embrionário do SNC, NOS	9473/3
Ependimoma tancítico	9391/3	Tumor teratoide/rabdoide atípico	9508/3
Ependimoma, RELA fusão-positiva	9396/3	Tumor embrionário do SNC com características rabdoídes	9508/3
Ependimoma anaplásico	9392/3		
Outros Gliomas		Tumores dos nervos cranianos e paraespinhais	
Glioma cordóide do terceiro ventrículo	9444/1	Schwannoma	9560/0
Glioma angiocêntrico	9431/1	Schwannoma celular	9560/0
Astroblastoma	9430/3	Schwannoma plexiforme	9560/0
Tumores do plexo coróide			
Papiloma do plexo coróide	9390/0		
Papiloma do plexo coróide atípico	9390/1		
Carcinoma do plexo coróide	9390/3		

Fonte: Elaborado pelo autor. Baseado em Louis *et al.* (2016).

A radioquimioterapia, sessões de radioterapia associadas ao quimioterápico Temozolomida (TMZ), também é uma prática já empregada no auxílio da eliminação de glioblastomas IDH-Tipo Selvagem. A TMZ é um agente citotóxico alquilante, capaz de sensibilizar as células à radiação. Entretanto, essa também atinge resultados limitados no que compete na melhoria do quadro clínico e sobrevida do acometido (AZEVEDO *et al.*, 2009; ALYAUTDIN *et al.*, 2014; WOLBERS, 2014; SHIN; YOON; DIAZ, 2017).

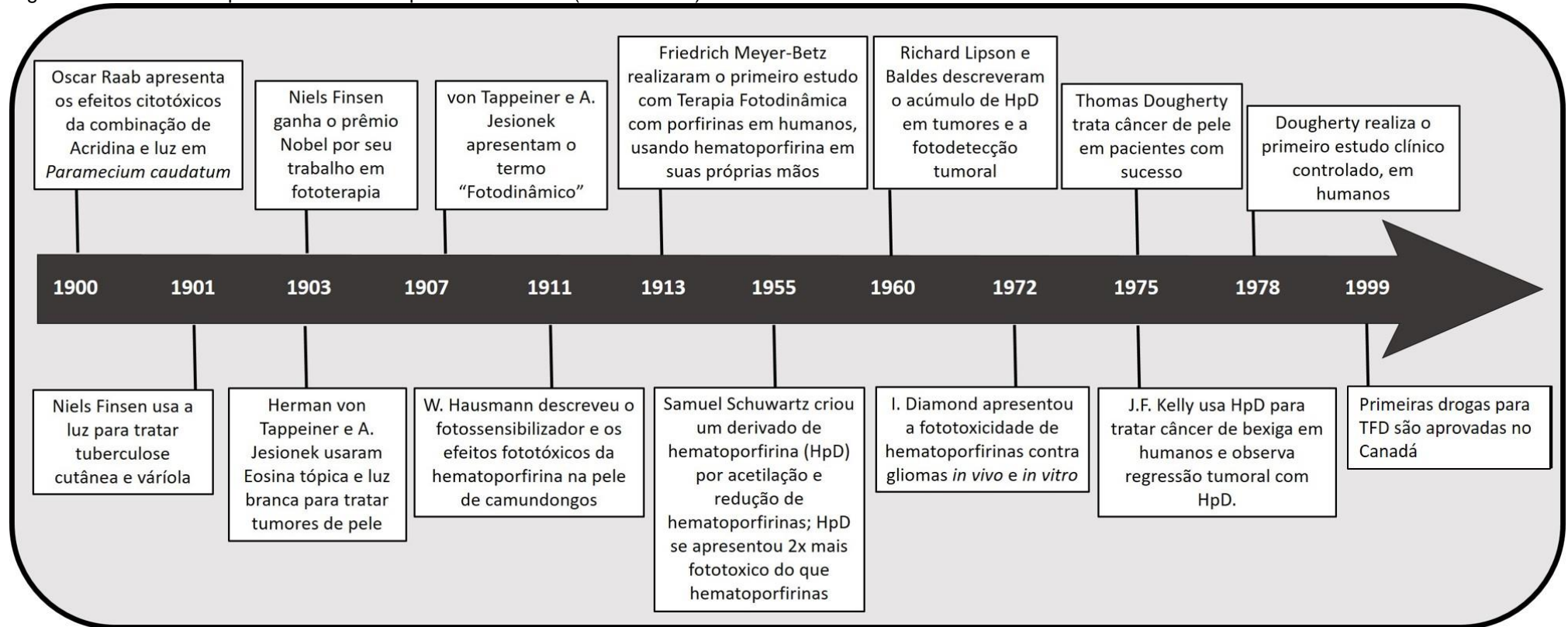
A raridade e o alto grau de agressividade desse tipo de tumor dificultam protocolos de tratamentos que sejam eficazes e capazes de melhorar o prognóstico ao paciente (AZEVEDO, 2012; ARYAL *et al.*, 2013; AZAMI *et al.*, 2017). Por esse motivo, a busca por métodos alternativos de tratamento para tumores cerebrais de alto grau de agressividade, torna-se um campo amplo de estudo (TSITLAKIDIS *et al.*, 2010; BALDAWA *et al.*, 2013).

Dentre as alternativas aos tratamentos convencionais, a Terapia Fotodinâmica surge como uma terapia eficaz e promissora, uma vez que utiliza um fármaco fotossensível (FS), luz em comprimento de onda adequada ao espectro de absorção do FS e oxigênio molecular, gerando espécies reativas de oxigênio (EROs), capazes de levar à morte celular (AGOSTINIS *et al.*, 2011; BERNAL *et al.*, 2015).

2.2 Terapia Fotodinâmica (TFD)

No início do século XX, o estudante de medicina alemão Oscar Raab, aluno de Von Tappeiner, observou pela primeira vez o efeito da TFD em protozoários do gênero *Paramecium*. Na presença do corante Acridina, Raab constatou que, na ausência de luz os parasitas continuavam viáveis, porém após exposição à luz, esses eram mortos. Após essa observação, Raab e Von Tappeiner começaram a estudar o que foi definido por eles como “efeito fotodinâmico”, no qual concluíram que a morte dos parasitas era causada não apenas pela interação do corante com a luz, mas também dependia da quantidade de oxigênio molecular do meio (Figura 1) (CAPELLA; CAPELLA, 2003; ALLISON; SIBATA, 2010; ATIF *et al.*, 2011).

Figura 1 – Linha do tempo: História da Terapia Fotodinâmica (1900 – 2000)



Fonte: Elaborado pelo autor, baseado em Dolmans; Fukumura; Jain, (2003).

A partir de suas observações, Von Tappeiner apresentou pela primeira vez o conceito de reação fotodinâmica como um processo fotoquímico que envolve a absorção de luz por um agente fotossensível e subsequentemente a formação de espécies reativas de oxigênio (CALZAVARA-PINTON; VENTURINI; SALA, 2007; ALLISSON; SIBATA, 2010).

Os conceitos dessa nova terapia, porém, foram perdidos por anos, sendo trazidos novamente à discussão na década de 1960 por meio dos estudos de Lipson e Baldes, ao demonstrarem o acúmulo de derivados de hematoporfirina (HpD) em células malignas e seus efeitos tóxicos à exposição de luz (HUANG; CHEN; WU, 2005).

Na década de 1970, o médico Thomas Dougherty avaliou as propriedades de HpD em câncer de pele, observando que esse agia como um localizador da lesão por meio de sua fluorescência emitida, bem como sua ação como fotossensibilizador, ao ser exposto em comprimento de luz específico. Dougherty levou a TFD para o tratamento clínico de lesões cutâneas, obtendo resultados promissores (DOLMANS; FUKUMURA; JAIN, 2003; BERNAL, 2011; KESSEL, 2019).

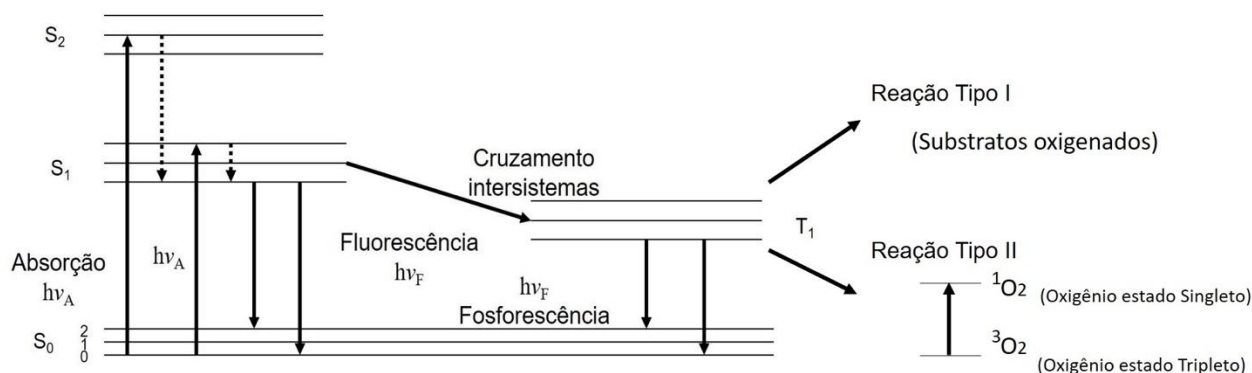
Nos últimos 20 anos, a TFD vem sendo amplamente utilizada como tratamento alternativo em diversos tipos de doenças, com destaque para a dermatologia, no tratamento de tumores de pele não-melanoma, queratoses e dermatites. Ainda, o uso da terapia para diferentes tipos de tumores vem crescendo nos últimos anos (DARLENSKI; FLUHR, 2013; ISSA; BOECHAT; FASSINI, 2016).

A TFD baseia-se na administração de um composto fotossensível (FS), aplicado localmente de modo tópico, agindo apenas localmente, ou sistemicamente, no qual o FS será distribuído pelo organismo, sendo eliminada de maneira natural pelas células saudáveis, porém por causa das diferenças metabólicas e morfológicas, as células tumorais não são capazes de eliminá-lo, ocorrendo o acúmulo do FS no interior de células tumorais (ETMINAN *et al.*, 2011; LIU *et al.*, 2011).

Esperado determinado período para acúmulo do FS nas células alvo, o tecido é irradiado por meio de uma fonte de luz com emissão em comprimento de onda adequado ao espectro de absorção do FS de escolha para o tratamento. A luz excita as moléculas do FS naturalmente em estado singleto fundamental (S₀) a um estado de maior energia (singleto excitado – S₁), essa energia pode ser perdida na forma de fluorescência ou o FS pode passar a um estado excitado de menor energia (Tripleto -

T1), por meio do cruzamento intersistemas (Figura 2) (FERREIRA, 2003; LOPEZ *et al.*, 2010; GHEEWALA; SKWOR; MUNIRATHINAM, 2017).

Figura 2 - Rota de formação das espécies reativas de Oxigênio. Diagrama de Jablonski simplificado.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Caso ocorra o cruzamento intersistemas, as moléculas do FS irão transferir sua energia às moléculas de oxigênio ou substratos oxigenados presentes no tecido, naturalmente encontrados em estado triplete. Com a transferência de energia o oxigênio é levado a um estado energético maior, o que pode gerar dois tipos de reações diferentes chamadas Tipo I e Tipo II (LOPEZ *et al.*, 2010; GHEEWALA; SKWOR; MUNIRATHINAM, 2017).

As reações tipo I geram radicais livres, superóxido e peróxido de hidrogênio, por reações de transferência de elétrons para substratos celulares. As reações tipo II, ocorrem pela transferência direta de energia ao oxigênio molecular, levando à formação do oxigênio singlete (¹O₂) (Figura 2). Ambas as reações são capazes de gerar danos celulares como peroxidação lipídica, fotoxidação guanossinica e danos à membrana celular, citoesqueleto, e eventual morte celular por apoptose, necrose, autofagia ou paraptose, dependendo do tipo celular tratado, FS empregado e parâmetros de irradiação (BORGES, 2008; ALLISON; SIBATA, 2010; HERRMANN *et al.*, 2013; HADIZADEH; FATEH, 2014; KESSEL, 2019).

Os FSs utilizados para realização da TFD, apresentam baixa citotoxicidade em ausência de luz, ou seja, não geram danos às células quando no escuro, além disso, por causa do seu acúmulo em células malignas e a migração limitada do ¹O₂, essa é uma terapia com ausência de efeitos adversos sistêmicos, presentes nos métodos convencionais. Seus efeitos normalmente são apontados como fotossensibilidade dérmica e ocular por curto período após as sessões fototerápicas. Além disso,

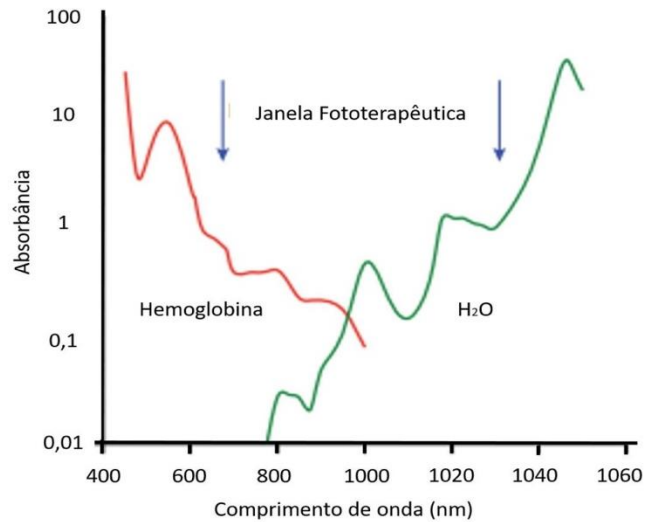
geralmente, os FSs tendem a não se acumular no núcleo celular, o que minimiza o risco de danos maiores ao DNA, que possam levar a mutações que agravem o quadro do paciente (LUKSIENE, 2003; MENEZES *et al.*, 2007; BORGES, 2008).

A luz é capaz de interagir de diferentes maneiras com o tecido humano, dependendo de suas propriedades químicas e estruturais. Desse modo, cada comprimento de onda é capaz de interagir de modo distinto com cada tecido, sendo importante levar em consideração os processos de espalhamento e absorção da luz por biomoléculas constituintes do organismo, de modo a evitar possíveis interferências na entrega da luz para o FS no tecido, diminuindo a eficácia do tratamento (CASTANO; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2004; QUIRK *et al.*, 2015; REGO, 2008).

Por esse motivo, a escolha do FS deve apresentar características ópticas favoráveis, com um espectro de absorção na chamada “Janela óptica” (Figura 3), que varia de 600 nm a aproximadamente 1200 nm (CASTANO; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2004; BENOVA, 2014).

Em comprimentos de onda menores, a energia torna-se maior, o que permite sua interação com os cromóforos naturais do organismo, como a hemoglobina com absorção próxima do 500 a 600 nm. Há ainda uma relação inversamente proporcional quanto a penetração da luz no tecido, tornando difícil o tratamento em regiões mais profundas. Em comprimentos de onda maiores, a luz interage basicamente com a água presente nos tecidos e a hidroxiapatita dos ossos, entretanto, os fótons podem não apresentar energia suficiente para desencadear as reações com o FS e o oxigênio molecular, também comprometendo o tratamento (CASTANO; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2004; AGOSTINIS *et al.*, 2011; BENOVA, 2014; QUIRK *et al.*, 2015).

Figura 3 - Janela óptica tecidual. Espectro de absorção dos principais componentes teciduais.



Fonte: Adaptado de Benov, 2014

A TFD vem se destacando como terapia alternativa ao tratamento de diferentes tipos de câncer, seja concomitante a outros tratamentos clínicos, ou como tratamento primário em estudo (BAGNATO *et al.*, 2006; HERRMANN *et al.*, 2013; BECHET, 2014).

Quanto aos cânceres cerebrais, foram realizados estudos em diferentes tipos de tumores em diferentes graus, desde pesquisas *in vitro* e *in vivo*, até aplicações clínicas. Em todos os casos, o sucesso da terapia é relativo, variando de caso a caso, segundo o protocolo utilizado. A maioria dos estudos, utilizam porfirinas (Photogem[®] e Photofrim[®]) e o ALA, como FS a ser empregado. Quanto aos parâmetros de irradiação utilizados, existem diferentes protocolos testados, com diferentes respostas cada, o que torna necessário a busca por novos FS e uma padronização de parâmetros a serem utilizados (ZHANG *et al.*, 2006; ZELENKOV *et al.*, 2007; TIRAPELLI *et al.*, 2011; SIMONE *et al.*, 2012; AKIMOTO, 2016).

2.2.1 Fotossensibilizadores

As moléculas do FS encontram-se em um estado fundamental singleto, ou seja, possuem dois elétrons com “*spins*” opostos. Essas moléculas são capazes de absorver fótons de luz com energia quântica apropriada (comprimento de onda) o que leva à excitação de um elétron à um estado de maior energia (Singleto excitado). Esse é um estado energético instável que perde rapidamente seu excesso em forma de fluorescência ou decai a um nível menos excitado (estado Tripleto). No estado Tripleto

as moléculas são capazes de interagir com o oxigênio molecular do meio orgânico, formando espécies reativas de oxigênio (BECHET, 2014; ABRAHAMSE *et al.*, 2017).

Um FS ideal deve possuir certas propriedades fotofísicas, de modo a apresentar baixa ou nenhuma citotoxicidade no escuro e alto rendimento quântico quando irradiado em comprimentos de onda equivalentes ao seu espectro de absorção. Além disso, o composto deve possuir uma farmacocinética favorável com um baixo tempo de depuração em células saudáveis, auxiliando na seletividade ao tumor. É necessário que o FS apresente, ainda, uma hidrofiliabilidade ideal, para que haja sua internalização pela membrana plasmática das células, bem como, impeça a formação de agregados moleculares, que podem prejudicar a ação da TFD (SIMPLÍCIO; MOIONCH; HIOKA, 2002; SOLBAN; RIZVI; HASAN, 2006; WANG *et al.*, 2015).

A ação do FS acontece a nível celular, vascular e imunológico, variando de acordo com sua localização no interior da célula, bem como o tipo de tecido a ser tratado e a entrega de luz na região fotossensibilizada. O FS deve apresentar uma banda de absorção na região do vermelho ou infravermelho próximo (600 a 800 nm), visando uma menor interferência dos fluoróforos naturais do organismo e a maior penetração da luz no tecido (SOLBAN; RIZVI; HASAN, 2006; VOLLET-FILHO *et al.*, 2010; ABRAHAMSE; HAMBLIN, 2016).

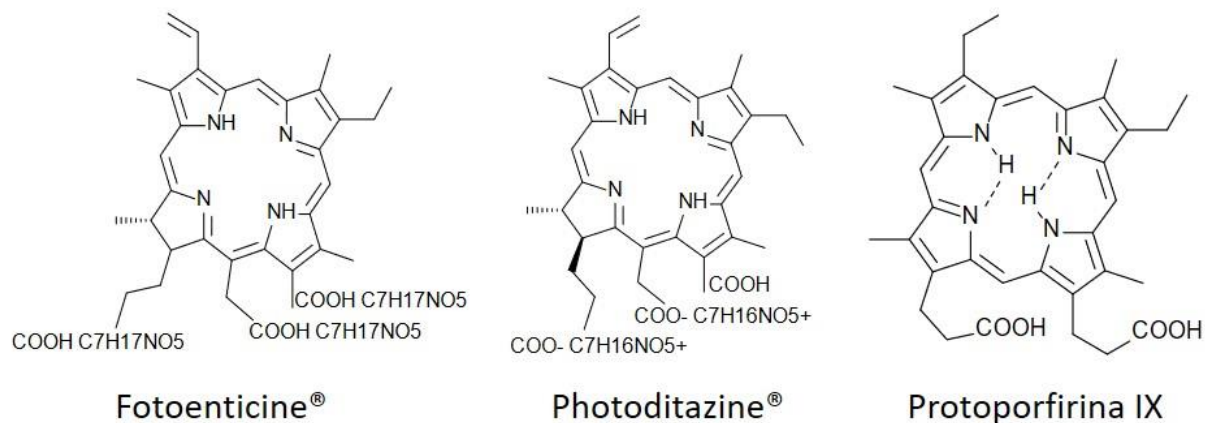
Os primeiros FSs aprovados para uso clínico eram derivados de HpD, classificados como FSs de primeira geração, sendo esses os mais utilizados para aplicação da TFD até os dias de hoje. Entretanto são identificados alguns problemas relacionados ao uso desses FSs, como fotossensibilidade dérmica e ocular prolongada, além de bandas de absorção na região de 620 a 630 nm, o que leva a uma menor penetração da luz no tecido alvo (ALLISON; SIBATA, 2010; AGOSTINIS *et al.*, 2011).

Visando minimizar os problemas apresentados pelos HpD, novos estudos permitiram o desenvolvimento dos FSs de segunda geração, com características mais favoráveis quanto à absorção de luz em comprimentos de onda mais longos (660 a 670 nm), permitindo a utilização de fonte de luz em comprimentos de onda de maior penetração no tecido, além de possuírem menor tempo de depuração pelo tecido normal. Nessa classificação são apresentadas as clorinas e bacterioclorinas, como a clorina e6 uma forma derivada da clorofila-a, com alto rendimento quântico na formação de oxigênio singleto, além de apresentar absorção em comprimentos de

onda maiores, possuindo potencial promissor para uso clínico (CARMELLO *et al.*, 2015; ABRAHAMSE *et al.*, 2017; CHANG *et al.*, 2018).

O Photodithazine® (PDZ – Veta Grand - Rússia) é um FS a base de clorina e6, de origem russa, com absorção na região de 650 a 680nm. É obtido a partir de uma cianobactéria presente em algas alcalinas, o que torna sua obtenção fácil, além de diminuir seu custo comparado a outros fotossensibilizadores. O PDZ apresenta alta penetração por meio das membranas biológicas, além de apresentar baixa toxicidade no escuro (Figura 4) (CARMELLO *et al.*, 2014; BERNAL *et al.*, 2015).

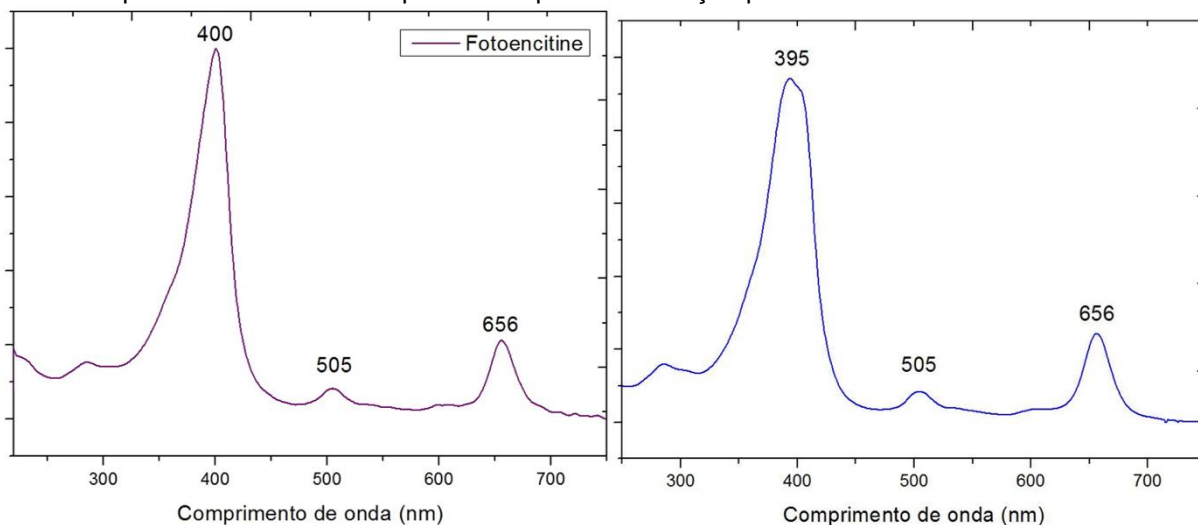
Figura 4 - Estrutura molecular dos fotossensibilizadores Fotoenticine® (A), Photodithazine® (B) e Protoporfirina IX (C)



Fonte: Elaborado pelo autor Adaptado de Mussi, (2003); Cheung, (2014); Bernal *et al.*, (2015).

Uma nova clorina experimental foi introduzida recentemente na Espanha, o Fotoenticine® (FTC), visando o tratamento de tumores malignos. Trata-se de um sal de clorina e6, trissubstituído com N-Metil-D-glucamina e surge como uma alternativa às clorinas conhecidas (CHEUNG, 2014). Tanto o PDZ quanto o Fotoenticine®, apresentam bandas de absorção em 660 nm.

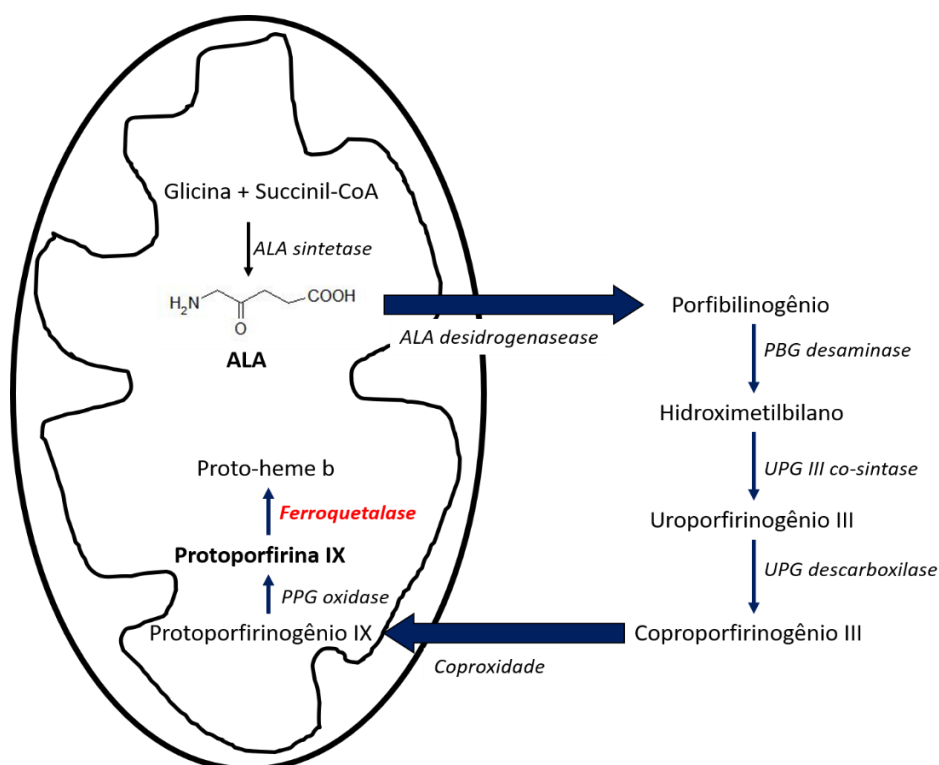
Figura 5 - Espectro de absorção dos fotossensibilizadores Fotoencitine® (A), Photodithazine® (B). Vale ressaltar que ambas as clorinas apresentam pico de absorção próximo à 660 nm.



Fonte: autor.

Além dos FSs convencionais, há ainda os precursores metabólicos como o ácido δ -aminolevulínico (ALA), que estimula a formação da protoporfirina IX (PpIX), um FS endógeno. O ALA é um subproduto/reagente da rota metabólica de formação da Heme. O excesso de ALA, induz a formação de PpIX, e acaba por limitar a taxa de conversão biossintética para heme, levando a um aumento da concentração de PpIX no tecido. O tecido maligno, naturalmente produz excesso de PpIX quando comparado ao tecido normal, exibindo ainda diminuição da atividade da ferroquelase, enzima responsável pela conversão da PpIX para Heme, e menor concentração de íons de ferro. Essas características permitem uma diferença de concentração significativa da PpIX entre tumor maligno e tecido normal (Figura 6). (ALLISON; SIBATA, 2010; CERIZE, 2012; BENITO-MIGUEL; DOLORES-BLANCO; GÓMEZ, 2015).

Figura 6 - Representação esquemática da rota biosintética da Heme



Fonte: Elaborado pelo autor. Adaptado de Dutra; Bechara (2005).

Uma das características descritas como ideal a FSs utilizados no tratamento oncológico, é a seletividade aos tecidos malignos, entretanto, essa seleção não se encontra bem elucidada. Diversos fatores são apontados para o acúmulo do fármaco em células tumorais, como a alteração na permeabilidade das membranas de células malignas e a presença de fibras colágenas imaturas no tecido acometido, o que permite a agregação de porfirinas. A agregação do FS a lipoproteínas e a mudança no pH celular, também são fatores citados como contribuintes para essa seletividade (FERREIRA, 2007; ALLISON *et al.*, 2008; FELÍCIO *et al.*, 2008).

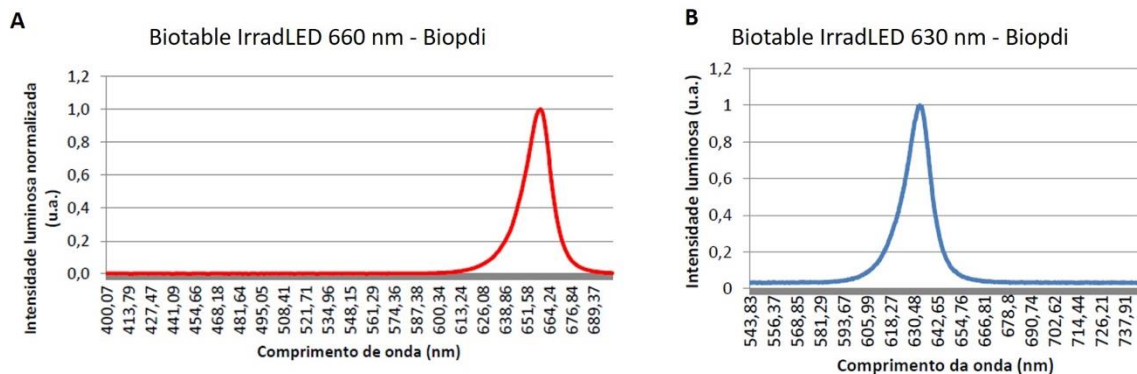
2.2.2 Fonte de Luz

Um dos fatores que influenciam no sucesso da TFD é a fonte de luz empregada, que deve considerar o comprimento de onda abrangente à absorção do FS, desde que esteja dentro da janela óptica biológica. Além disso, é importante conhecer as propriedades físicas do tecido a ser tratado (ALLISSON; SIBATA, 2010; CHAVES *et al.*, 2014).

A irradiação para TFD pode ser realizada por meio de qualquer fonte de luz, entretanto, as fontes mais utilizadas são LEDs (*Light Emitting Diode*) vermelhos e lasers (*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*) de diodo de baixa ou média potência, na região espectral do vermelho e infravermelho próximo (600 nm a 1200 nm), já que a eficácia clínica da TFD é dependente de dose de luz total, tempo de exposição à luz e modo de entrega de luz (AGOSTINIS *et al.*, 2011; ITO *et al.*, 2014).

O uso de laser ou LED, geralmente não interfere na eficácia do tratamento, entretanto ambas as fontes de luz apresentam características específicas. O laser é monocromático, ou seja, apresenta único comprimento de onda, sua irradiação é pontual (colimado) e apresenta maior potência quando comparado ao LED, sendo um equipamento de fácil manuseio e que possibilita o acoplamento de fibra óptica em caso de tratamentos de lesões internas (HERRMANN *et al.*, 2013; GRYKO *et al.*, 2016) (Figura 7).

Figura 7 - Espectro de intensidade da Biotable utilizada no projeto, ambos na região do vermelho, sendo uma em 660 nm (A) e uma em 630 nm (B).



Fonte: Manual IrradLED.

Os dispositivos a base de LED, diferente dos lasers, são a combinação de dois semicondutores diferentes, gerando uma emissão luminosa em bandas que permitem uma margem de erro acerca do comprimento de onda gerado. Os LEDs permitem maior distribuição da luz, irradiando uma região ampla. São sistemas mais compactos e com um baixo custo comparado ao Laser (ARANY, 2012; GRYKO *et al.*, 2016).

A fonte de luz escolhida para a realização da TFD deve levar em consideração o tipo e localização do tumor e o FS de escolha, bem como a dosimetria de luz, tempo de exposição e modo de aplicação (FERREIRA, 2007; HERRMANN *et al.*, 2013).

2.3 Terapia Fotodinâmica e Gliomas

A terapia fotodinâmica é um tratamento inovador que vêm sendo explorado a anos por campos de pesquisa *in vitro* e *in vivo*, buscando-se entender os mecanismos de ação dessa terapia, bem como ensaios clínicos, visando a introdução dessa terapia como método de tratamento padrão no auxílio a diferentes tipos de tumores. Nos EUA a TFD é clinicamente aprovada para câncer de esôfago e câncer de pulmão de pequenas células, iniciando-se os testes em gliomas e câncer cerebral pediátrico (AGOSTINIS *et al.*, 2011; NATH; OBAID; HASAN, 2019; MAHMOUDI *et al.*, 2019).

Segundo alguns estudos, um dos fatores que torna a TFD um tratamento em potencial para adjuvancia ou coadjuvancia para tumores cerebrais é a seletividade do FS às células tumorais, havendo um acúmulo de 3-400 vezes maior nas células neoplásicas quando comparada às células saudáveis (ELJAMEL, 2004; 2010). Dentre os diversos FSs que surgem a cada ano no mercado, o mais utilizado clinicamente é o ALA, por ser uma droga aprovada pela *Food and Drug Administration* (FDA), e por ser uma droga já utilizada na Ressecção Guiada por Fluorescência (RGF), prática essa que vêm sendo cada vez mais utilizada por permitir um melhor margeamento das células tumorais cerebrais, pelo acúmulo do FS no tumor (STEPP *et al.*, 2007; VAN STRATEN *et al.*, 2017).

Stepp e colaboradores (2007), realizaram a execução da TFD-ALA, em um estudo de fase III para a RGF, utilizando um aparato de fibras ópticas de microlentes para irradiação em doses de 100, 150 e 200 J/cm². A TFD foi realizada após RGF e se demonstrou como uma modalidade terapêutica interessante, por permitir uma aparente eliminação completa das células tumorais, além de apresentar um aumento na sobrevida livre dos pacientes (STEPP *et al.*, 2007; VAN STRATEN *et al.*, 2017).

Além do estudo de Stepp, outros estudos clínicos com a TFD para tumores cerebrais com alto grau de malignidade demonstram uma melhora no prognóstico dos pacientes, quando há a aplicação da TFD concomitante à remoção cirúrgica, com aumento médio de 12 meses de sobrevida livre (ELJAMEL, 2010; KOSTRON, 2010; YANOVSKY *et al.*, 2019).

Apesar dos aparentes avanços da TFD no campo clínico, estudos *in vitro* e *in vivo*, apontam resistência de células tumorais ao tratamento, dependendo do

protocolo utilizado (TIRAPELLI *et al.*, 2011; KESSEL; OLEINICK, 2018; GIROTTI, 2019). Os motivos apontados para essa resistência ainda não se encontram bem elucidados, mas entender o mecanismo de ação da terapia é essencial para que se possa entender os efeitos dessa no organismo e os motivos que levam ao seu sucesso ou não, tornando a pesquisa básica acerca da TFD, ainda necessária para que essa se torne uma prática clínica.

3 MATERIAL E MÉTODOS

A. ANÁLISES *In vitro*

A.1. Linhagem celular

Para análise da ação dos FS's em células de cânceres cerebrais foram utilizadas células de gliossarcoma, com morfologia fibroblástica 9L/lacZ (ATCC® - CRL-2200TM) e para análise da ação dos FS's em células não malignas, foi utilizada a linhagem de fibroblastos L929 (ATCC® CRL-2648TM), ambas mantidas em meio DMEM com 4,5 g/L de glicose e 1mM de piruvato de sódio 90%, suplementado com 10% Soro Fetal Bovino, 1% de solução de Penicilina/Estreptomicina, acondicionados em estufa de cultura a 37°C com 5% de CO₂.

A.2. Fotossensibilizadores

Foram avaliadas a ação de 3 FSs diferentes:

O pró-fármaco ácido aminolevulínico (ALA) (PDT Pharma®), muito utilizado no tratamento de gliomas, por sua facilidade em ultrapassar a barreira hematoencefálica, sendo utilizado inclusive em cirurgias guiadas por fluorescência. O ALA tem apresentação comercial em pó, e foi diluído conforme instruções do fabricante. Inicialmente foi diluído na concentração de 50 mg/mL (solução estoque). Para os experimentos, a diluição de trabalho foi realizada em meio DMEM incompleto, nas concentrações de 2000 µg/mL a 15,1 µg/mL, em diluição seriada (1:1).

Foram utilizadas duas clorinas e6, Fotoenticine® (La empresa Nuevas Tecnologías Científicas – NTC - Llanera (Asturias)) de origem espanhola e Photodithazine® da empresa Veta-Grand® de origem russa, ambas as clorinas são solubilizadas e estabilizadas com 0,5% de N-metil-D-glicosamina. Os fármacos foram cedidos pela Prof^a. Dra. Natalia Inada, do Instituto de Física de São Carlos – USP São Carlos (CEPOF 2013/07276-1). O Fotoenticine apresenta-se em solução aquosa na concentração de 7,1 mg/mL (solução estoque) e o PDZ apresenta-se em solução aquosa na concentração de 5 mg/mL (solução estoque). Foram utilizadas as concentrações de 200 µg/mL à 6,25 µg/mL, em diluição seriada 1:1, para ambas clorinas.

As concentrações foram escolhidas segundo estudos prévios do grupo. Todos os FS's foram mantidos no escuro durante toda a manipulação.

A.3. Medida pH ALA

Um dos fatores que interferem na estabilidade e produção da PpIX é o pH (CERIZE, 2012), por esse motivo, foi medido o pH da solução trabalho do ALA, por meio de Medidor de pH eletrônico (Bentchtop pHmeter - KASVI), sendo utilizado um pH de 6,3.

A.4. Fonte luz

Para a irradiação da PpIX induzida por ALA, foi utilizado um dispositivo LED, formado de 48 LEDs em 630nm (± 5 nm) (Biopdi/Irrad-Led 630), sendo essa a região de absorção das porfirinas. Foi utilizada uma intensidade de 40 mW/cm², na dose de 10 J/cm², por 4 min e 10 s.

Para ambas as clorinas foi utilizado como fonte luz um dispositivo à base de LED (Biopdi/Irrad-Led 660) com emissão de luz na região de 660 nm (± 5 nm), uma vez em que clorinas absorvem nessa região. O dispositivo é formado de 54 LEDs, e foi aplicada dose de 10 J/cm², na irradiância de 25 mW/cm², em um tempo de exposição de 6 min e 40 s.

Tabela 2 - Parâmetros de irradiação dos testes *in vitro*.

	ALA	Clorinas
Comprimento de onda (λ)	630 nm	660 nm
Irradiância	40 mW/cm ²	25 mW/cm ²
Fluência	10 J/cm ²	10 J/cm ²

Fonte: autor.

A.5. Ensaios de citotoxicidade

O teste de citotoxicidade foi realizado visando a determinação das concentrações utilizadas nos ensaios, para isso foram realizados os testes de azul de Trypan, realizado para as linhagens 9L/lacZ e L929 e ensaio de MTT para linhagem

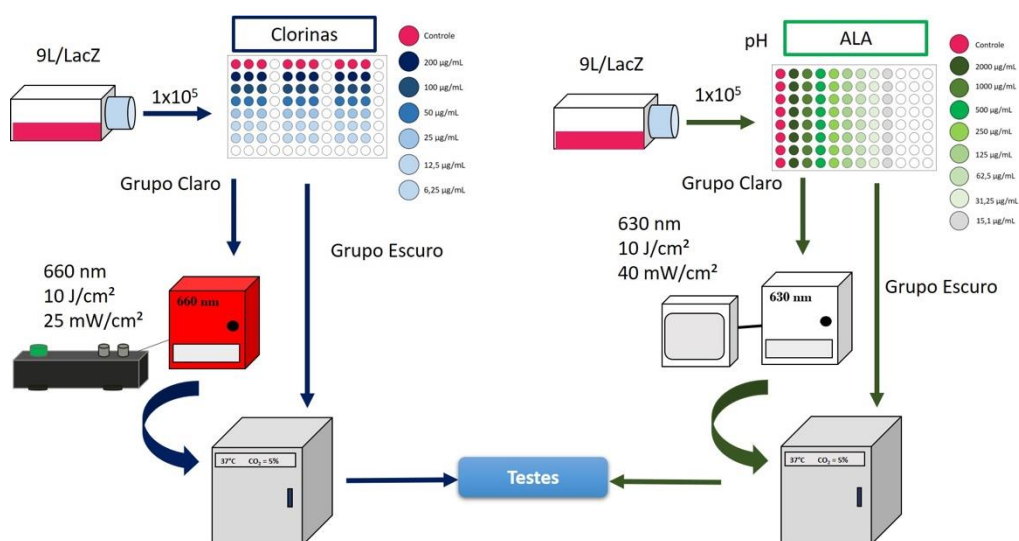
9L/lacZ. Para visualização de possíveis mudanças morfológicas das células tratadas, foi realizada também uma análise morfológica pela coloração de Giemsa.

Para o ALA foram utilizadas concentrações a partir de 2000 µg/mL em diluição seriada em PBS, com dose mínima de 15,1 µg/mL, com tempo de incubação de 1h, 2h, 4h, 6h e 8h. O Fotoenticine foi testado em concentrações a partir de 200 µg/mL em diluição seriada em PBS, com dose mínima de 6,25 µg/mL, com tempo de incubação de 1h.

Os dados referentes ao Photodithazine encontram-se presentes no artigo “Photodithazine photodynamic effect on viability of 9L/lacZ gliosarcoma cell line”, publicado em 2017. Referente aos dados obtidos na dissertação “Estudo da Terapia fotodinâmica no tratamento de gliossarcoma, análise *in vitro* (L9/lacZ)” de 2016.

a. Grupos experimentais

Primeiramente as células foram destacadas com um espalhador de células, sendo transferidas a um tubo tipo Falcon e centrifugadas a 6000 rpm (4180 g) por 10 min. As células foram então plaqueadas em placas de 96 ou 24 poços, segundo ensaios, com concentração de 1×10^6 células/poço, incubados por 24h para adesão. Os ensaios foram realizados em triplicata. Após esse período, foi realizado o ensaio de TFD utilizando as concentrações previamente citadas, incubados nos diferentes tempos estipulados, em estufa à 37°C, na ausência de luz (Figura 8).

Figura 8 - Esquema de metodologia dos experimentos *in vitro*.

Fonte: autor

Após o período de incubação, o FS foi retirado, as células lavadas 1x com PBS estéril e adicionados 200 µL de PBS em cada poço. Uma placa foi mantida no escuro, para controle, quanto à toxicidade do FS, e uma placa foi irradiada, a fim de observar o efeito da TFD. Todos os ensaios foram realizados em triplicata (n = 9).

b. Análise da viabilidade celular pelo método de exclusão com Azul de Trypan

O método de exclusão com Azul de Trypan permite diferenciar células vivas de mortas pela observação da coloração da célula. Por causa da integridade da membrana, não há acúmulo do corante no citoplasma das células viáveis.

O teste foi realizado 18h após os tratamentos, tempo determinado por estudos prévios do grupo. Para isso foram adicionados 50 µL de solução de azul de Trypan (Sigma®) a 0,2%, por 5 minutos, e 150 µL de PBS. Após homogeneizar, as células foram fotografadas por meio de câmera acoplada ao microscópio óptico invertido (Zeiss® - Axio Vert A1) em aumento de 40x, sendo selecionados 5 campos aleatórios de cada poço. Foram contadas células mortas (quando retida coloração azul) e vivas (células não coradas) de cada grupo, utilizando a ferramenta Cell counter do software ImageJ® (Plugins – Analyze – Cell Counter). A viabilidade foi dada pela Equação 1.

$$\% \text{ de viabilidade} = \frac{n^{\circ} \text{ céls. viáveis}}{n^{\circ} \text{ céls. Totais}} * 100$$

[Equação 1]

c. Teste de Atividade mitocondrial

A atividade mitocondrial após os ensaios foi avaliada por meio do teste de MTT, consistindo na degradação do sal de MTT ([3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)2,5diphenyltetrazoliumbromide]) em cristais de Formazan, por células viáveis. Após 18h da realização dos tratamentos, foram adicionados a cada poço 50 µL de solução de MTT (5 mg/mL), suavemente agitado e reincubado por 4h a 37°C em atmosfera umidificada na ausência de luz. Após esse período toda a solução de MTT foi retirada e acrescidos 100 µL de DMSO em cada poço para a solubilização dos cristais de formazan. A densidade óptica foi medida por meio de leitor óptico de placa tipo ELISA (Espectrofotômetro Biotek Sinergy HT) com filtro de 570 nm. Os valores de absorbância obtidos foram transformados em porcentagem de atividade mitocondrial em relação ao controle por meio da Equação 2.

$$\% \text{ Viabilidade} = \frac{\text{Abs células tratadas} - \text{Abs branco}}{\text{Abs controle} - \text{Abs branco}} \times 100$$

[Equação 2]

d. Análise Morfológica das células tratadas.

Para avaliação de possíveis alterações na morfologia celular, foram colocadas 1×10^6 células em placa de 24 poços com lamínulas redondas ao fundo. Os ensaios foram realizados em duas placas, uma mantida em ausência de luz e outra, com a realização da TFD nos mesmos parâmetros utilizados para os outros testes. Após 18h da realização da TFD, o meio foi retirado e os poços deixados para secar em temperatura ambiente por 24h.

Foi realizada a coloração com May-Grunwald por um minuto seguido do corante Giemsa por 20 minutos. Após secar, as lâminas foram montadas com entelan e, após secar, as lâminas foram fotografadas em microscópio ótico (Leica – DM 2500) com sistema de captura de imagens digital (Câmera Leica DFC425), as imagens foram adquiridas com software *Leixca Application Suite 4.6.1*.

A.6. Análise da Produção PpIX.

O ALA é apenas um precursor da PpIX, portanto, é importante observar a formação da PpIX em diferentes tempos. Para isso, foi utilizada a microscopia confocal de fluorescência e a quantificação por fluorescência para análise da produção de PpIX.

a. Microscopia confocal de fluorescência

Inicialmente foram plaqueadas 1×10^6 células por poço, em placas de 24 poços, com lamínulas redondas ao fundo, sendo um poço sem FS e um com a adição de ALA na concentração de 125 $\mu\text{g/mL}$ (0,7 mM), escolhida com base nos testes de viabilidade por ser a menor concentração eficaz, e incubados nos tempos de 1h, 2h, 4h, 6h e 8h.

Após esse período o ALA foi retirado, as amostras lavadas com PBS, foram adicionados 100 μL de paraformaldeído 4% diluído em PBS, para fixação celular.

O paraformaldeído foi retirado, as células lavadas com PBS, seguida da adição de 50 μL de solução contendo o DAPI, para marcação de material genético. O excesso foi retirado, as células lavadas e levadas para análise em microscópio confocal LSM 700 Zeiss (FINEP 01.13.0275/00).

Para o marcador DAPI foi utilizada excitação em 405 nm e emissão captada em 461 nm, já para a porfirina para excitação foi utilizado o laser de 488 nm e emissão captada acima de 500 nm.

b. Análise comparativa de PpIX por fluorescência

Foram plaqueadas 1×10^6 células por poço, em placas de 24 poços, sendo um poço sem FS e um com a adição de ALA na concentração de 125 $\mu\text{g/mL}$ (0,7 mM), escolhida com base nos testes de viabilidade por ser a menor concentração eficaz, e incubados nos tempos de 1h, 2h, 4h, 6h e 8h.

Após esse período o ALA foi retirado e as amostras lavadas com PBS. Foram adicionados 500 μL de SDS 1%, para romper a membrana celular e ter o conteúdo intracelular exposto.

As amostras foram levadas para leitura no espectrofluorômetro (*Spectrofluorometer FS5 – Edinburgh instruments*) localizado no Laboratório de Nanomateriais e Nanotoxicologia, da Universidade Federal de São Paulo de São José dos Campos (UNIFESP – SJC) sob responsabilidade da Prof^a Dra. Dayanne Tada. As medidas foram realizadas com excitação em 400 nm e captação em 635 nm.

A.7. Internalização Clorinas

Foi utilizada a microscopia confocal para analisar a internalização das clorinas e observar se havia sua agregação na região nuclear.

Foram plaqueadas 1×10^6 células por poço, em placas de 24 poços com lâminulas redondas ao fundo, sendo um poço sem FS, um com a adição de Fotoenticine e um com a adição de PDZ, ambos na concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$, e incubado por 1h (FONTANA *et al.*, 2017). Após esse período o FS foi retirado, as amostras foram lavadas com PBS, sendo adicionados 100 μL de paraformaldeído 4% diluído em PBS para a fixação celular.

O paraformaldeído foi retirado, as células lavadas com PBS, seguida da adição de 50 μL de solução contendo o DAPI, para marcação de material genético. O excesso foi retirado, as células lavadas e levadas para análise em microscópio confocal LSM 700 Zeiss, localizado no laboratório multiusuário da UNIVAP (FINEP 01130275/00).

Previamente as amostras foram levadas para análise em microscópio de fluorescência (Leica DMIL LED) com filtro D em 355 nm (verde), as imagens foram capturadas com auxílio de câmera acoplada (Leica DFC310 FX) e software Leica Application Suite 4.6.1 no Laboratório de Cultura Celular do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba.

Para o marcador DAPI foi utilizada excitação em 358 nm e emissão captada em 461 nm, já para a clorina foi utilizado para excitação o laser de 488 nm e emissão captada acima de 500 nm.

A.8. Análise de Morte Celular

A análise de morte celular qualitativa e quantitativa foi realizada por citometria de imagem, utilizando o kit Apoptosis Assay Kit–Annexin V Alexa Fluor® 488 e Iodeto de propídeo, para marcação das células em apoptose e em necrose. O preparo foi realizado segundo informações do fabricante (Life Technologies®). Para análise foi utilizado o citômetro por imagem (TALI®), presente no Laboratório de Biologia Celular e Tecidual na Universidade do Vale do Paraíba. O tipo de morte celular foi analisado em dois grupos distintos pós TFD. Um grupo imediatamente após a terapia e outro 18h após a terapia, visando comparar o comportamento celular nesses dois momentos.

A.9. Análise de Formação Intracelular de Espécies Reativas de Oxigênio

Como indicador para espécies reativas de oxigênio (ERO's) foi utilizado o reagente Diacetato de 2',7'-diclorodi-hidrofluoresceína (H2DCF-DA – Thermofischer®), um reagente não fluorescente que é convertido no interior da célula pela ação de ERO's e outros peróxidos em sua forma fluorescente 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) que pode ser detectada por métodos fluorescentes (RAJNEESH *et al.*, 2017).

Para isso, as células foram plaqueadas para o grupo controle e a concentração escolhida após os testes de viabilidade. Depois de 1h de incubação para as clorinas, e no tempo escolhido de 4h para os grupos com ALA, a placa foi reincubada com 100 µL do reagente H2DCF-DA em solução de 5 µM por 30 minutos. Depois desse intervalo, as células foram lavadas 1x com PBS e foram adicionados 100 µL de PBS e uma placa foi irradiada. Foi realizado um grupo com o marcador e um grupo sem o marcador e a leitura foi feita usando o Synergy HT Multi-Detection Microplate Reader (Bio-Tek, Winooski, VT, USA) com excitação a 480 nm e emissão a 530 nm, do laboratório de Bioquímica Aplicada.

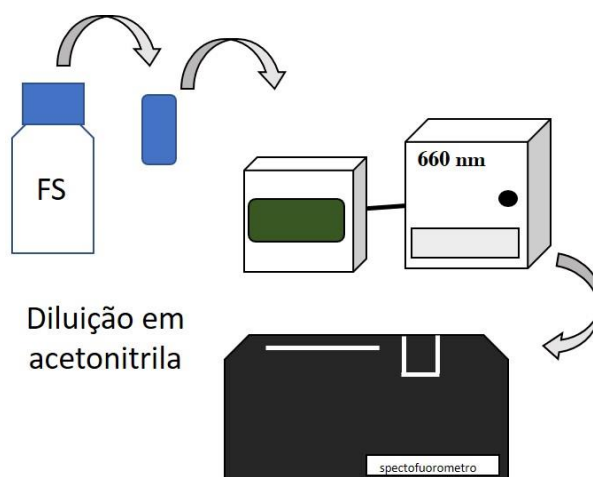
A.10. Medida indireta de oxigênio singlete das clorinas

Para medir a quantidade de oxigênio singlete produzida pelas clorinas foi realizada uma medida indireta por meio da análise de decaimento da sonda de difenilisobenzofurano, diluído em acetonitrila, com absorvância 0,6. A sonda apresenta um pico maior de absorção em 410 nm. Conforme reação com oxigênio singlete, há o decaimento dessa absorvância, havendo uma relação indireta entre a formação de oxigênio singlete e o consumo da nanosonda.

As clorinas foram diluídas em acetonitrila, a uma diluição de absorvância 0,3. As medidas de absorvância foram realizadas por espectrofluorômetro (Spectrofluorometer FS5 – Edinburgh Instruments) localizado no laboratório de nanomateriais e nanotoxicologia, da Universidade Federal de São Paulo de São José dos Campos (UNIFESP – SJC) sob responsabilidade da Prof^a Dra. Dayanne Tada.

Os FS's foram submetidos a irradiação a cada 2s em Biotable 660 nm IrradLED5-Biopdi, com intensidade de 20 mW/cm², sendo coletada a absorvância entre os intervalos de irradiação. Como solução padrão para fins de comparação, foi utilizada uma solução de azul de metileno (AM) em acetonitrila (Figura 9).

Figura 9 - Esquema experimental da medida indireta de formação de oxigênio singlete



$$S_{partícula} = \phi_{padrão} \times \frac{t_{padrão}}{t_{partícula}}$$

Fonte: autor.

Para cada FS foi construída uma curva de decaimento da absorção em 410 nm função do tempo de irradiação. As curvas obtidas foram ajustadas para decaimentos de exponencial de primeira ordem, por meio do software Origin 8.5 para obtenção do tempo de consumo da sonda.

O rendimento quântico de geração de oxigênio singlete, foi calculado por meio da equação:

$$S_{partícula} = \phi_{padrão} \times \frac{t_{padrão}}{t_{partícula}}$$

Sendo, $t_{padrão}$ = o tempo de decaimento do AM, $t_{partícula}$ = tempo de decaimento do FS e $\phi_{padrão}$ = rendimento quântico de geração de 1O_2 do AM.

ANÁLISES *In vivo*

B1. Aspectos Legais de Bioética e Biossegurança

Este projeto foi aprovado pelo comitê de ética da Universidade do Vale do Paraíba, sob o protocolo no 02/CEAU/2017 segundo as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa envolvendo animais, conforme Lei nº 11.794/2008, que regulamenta o inciso VII do § 1º do art. 225 da Constituição Federal (Documento em anexo).

B2. Casuística

Foram utilizados 6 ratos machos, da linhagem Fischer, com 40 dias de vida, provenientes do Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica, UNICAMP. Os animais foram acondicionados no biotério do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento (IP&D), UNIVAP, em caixas de policarbonato especiais para estes animais, sendo acondicionados de dois a três animais por caixa. As condições ambientais foram de temperatura ambiente, com 50% de umidade, e ciclo de 12 horas claro e escuro. Os ratos foram alimentados com ração própria e água *ad libitum* por todo experimento.

B3. Indução do tumor

Foram utilizados um total de 4 animais, inoculados com células da linhagem 9L/lacZ, de gliossarcoma com morfologia fibroblástica, segundo protocolo previamente descrito na literatura (HOU *et al.*, 2014), com a inoculação de 1×10^6 células em 50 μ l de PBS na região subcutânea no dorso do animal.

B4. Fotossensibilizador

Por meio dos testes *in vitro*, foi selecionado o FS Photodithazine® (PDZ) por causa dos resultados obtidos no estudo *in vitro*. O fármaco foi administrado na concentração de 8 mg/Kg do animal (SILVA *et al.*, 2014) em diferentes vias de administração (intravenosa, intratumoral e intraperitoneal).

B5. Análise das vias de administração do fármaco

Foram utilizados 4 animais, sendo testadas três animais para avaliação das vias de administração do fármaco, observando a entrega desse no tumor e um animal não fotossensibilizado, como controle. A análise foi realizada por meio da captação da fluorescência do FS utilizando o sistema *In Vivo Imaging System* (IVIS Spectrum - PerkinElmer) no Centro de Facilidades de Apoio à Pesquisa da Universidade de São Paulo em São Paulo. Os animais foram pesados e a dose de administração calculada com base na concentração de 8 mg/Kg do animal, sendo testadas as vias intraperitoneal, intravenosa e intratumoral.

Para a administração intraperitoneal e intratumoral, os animais foram contidos, sem a necessidade de prévia anestesia. Para administração intravenosa, o animal foi previamente anestesiado por injeção intramuscular contendo solução estéril de cloridrato de Cetamina a 10% (Cetamin® - Syntec) na dose de 0,08 mg/kg de peso corporal associado ao relaxante muscular analgésico e sedativo de cloridrato de Xilazina 2% (Xilazin® - Syntec) na dose de 0,04 mg/kg, com a injeção do FS por meio da veia caudal do animal. Para coleta dos dados, os animais foram colocados em câmara de captação e anestesiados com Isoflurano a 2,5% com CO₂ 5%.

Para todas as vias de administração foi realizada a medida da fluorescência nos tempos de 1h, 2h, 3h e 4h após administração do fármaco. Para análise foi utilizado software próprio do equipamento, Living Image *in vivo* software.

B6. Acúmulo do fármaco no encéfalo.

Para avaliação do acúmulo do FS na região do encéfalo do animal, foram utilizados 2 animais, sendo um animal com o desenvolvimento do tumor xenográfico e outro animal sem tumor. O fármaco foi administrado por via intraperitoneal, e a fluorescência na região cranial foi realizada após 1h, 2h, 3h e 4h da administração do fármaco, por meio do sistema *In Vivo Imaging System* (IVIS Spectrum - PerkinElmer).

Para coleta dos dados, os animais foram colocados em câmara de captação e anestesiados com Isoflurano a 2,5% com CO₂ 5% e para análise foi utilizado software próprio do equipamento, Living Image *in vivo* software.

4 RESULTADOS

Foram analisados *in vitro* os efeitos do Photodithazine, ALA e Fotoenticine na viabilidade celular, interação e internalização na linhagem celular 9L/LacZ. Foi realizada inicialmente a análise de produção da PpIX induzida por ALA e a internalização das clorinas.

4.1 Teste de Citotoxicidade

Para análise da viabilidade dos FSs foram utilizados os testes padrões de MTT e exclusão por azul de Trypan, além de uma análise de mudanças morfológicas após a TFD. As análises do PDZ, foram previamente realizadas e publicadas “Photodithazine photodynamic effect on viability of 9L/lacZ gliosarcoma cell line” (FONTANA *et al.*, 2017).

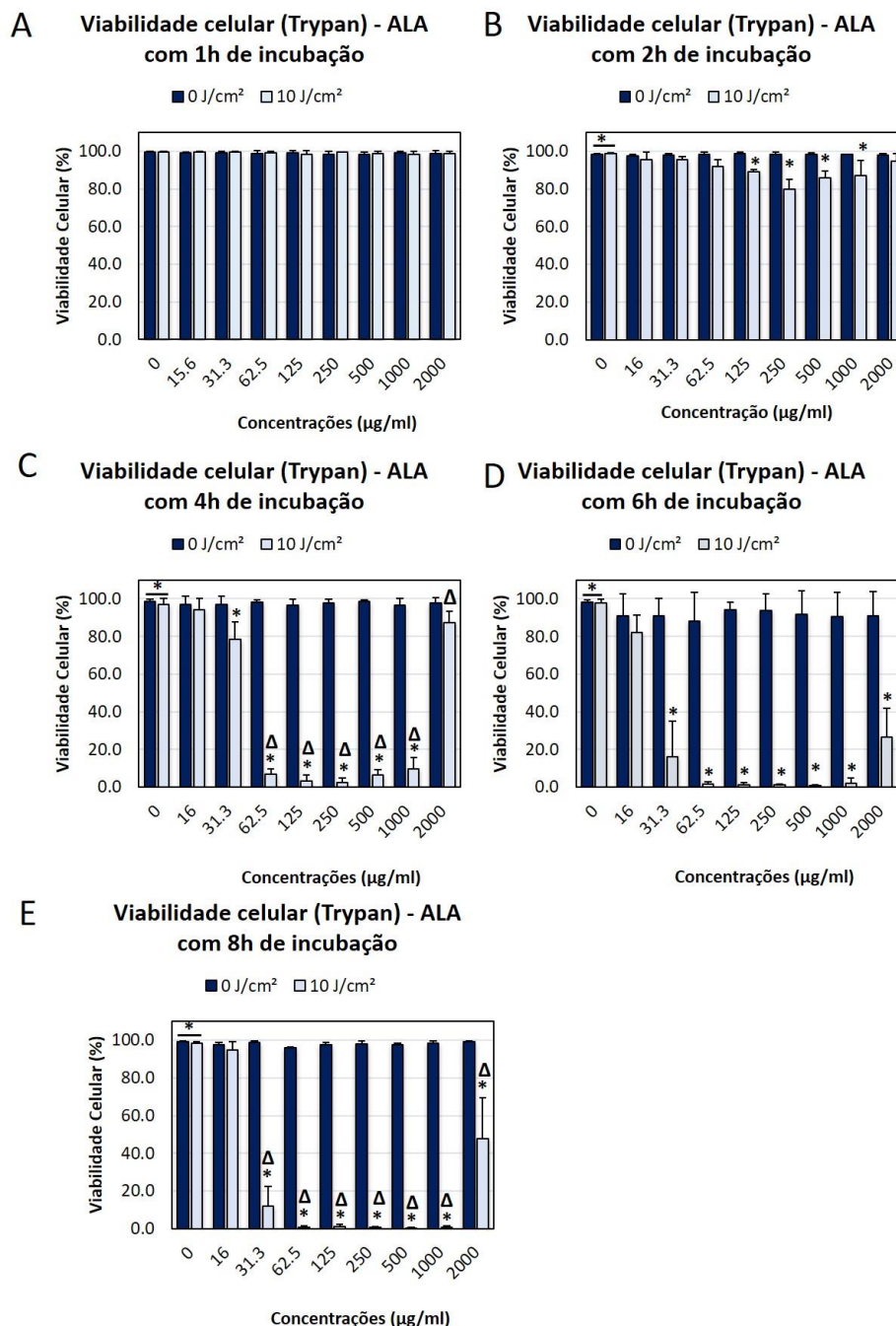
a. Teste Azul de Trypan

O azul de Trypan permite a avaliação de células vivas ou mortas, por meio da coloração de células em azul quando mortas e a sua não coloração quando vivas, uma vez em que células vivas são capazes de expulsar o corante de seu interior.

Com o tempo de incubação de 1h não foi observada morte celular quando comparados os diferentes grupos (Controle claro e escuro, grupos com ALA no claro e no escuro). Demonstrando que, para os parâmetros utilizados, esse tempo de incubação não é ideal para o tratamento (Figura 10 - A).

Já no tempo de 2h, foi possível se observar uma redução significativa de 9,1%, 18,3%, 12,4% e 11,1% nos grupos tratados com a TFD, nas concentrações de 125 µg/mL, 250 µg/mL, 500 µg/mL e 1000 µg/mL, respectivamente, quando comparados aos grupos controle claro e escuro, bem como aos grupos com adição do ALA nas diversas concentrações no escuro. As concentrações de 15,6 µg/mL, 31,3 µg/mL, 62,5 µg/mL e 2000 µg/mL após a irradiação, não apresentaram redução significativa, mostrando que essas concentrações não são eficazes nos parâmetros utilizados. As concentrações, não demonstraram diferenças quanto a sua eficácia (Figura 10 - B).

Figura 10 - Teste de Trypan realizado após 18h da aplicação da ALA-TFD, demonstrando a viabilidade celular dos grupos claros e escuros nos tempos de 1h (A), 2h (B), 4h (C), 6h (D) e 8h (E). Resultados apresentados em Média±DP. Foram considerados * $p < 0,01$, comparando-se os grupos controle e tratados no qual é possível observar um aumento da eficiência segundo o aumento da concentração e do tempo de incubação, sem diferenças significativas entre os grupos de concentrações intermediárias (62,5 $\mu\text{g/mL}$ a 1000 $\mu\text{g/mL}$) após a realização da TFD. Ao se comparar os grupos após TFD, entre si, foi considerada $\Delta p < 0,05$, nos tempos de 4h e 8h de incubação, demonstrando uma diferença na viabilidade do grupo 2000 $\mu\text{g/mL}$ com os grupos intermediárias.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Com a TFD após 4h de incubação do ALA, houve uma redução de 19,9%, 91,7%, 95,2%, 95,9%, 91,8% e 88,6%, nas concentrações de 31,3 $\mu\text{g/mL}$ à 1000

$\mu\text{g/mL}$, em diluição seriada, respectivamente. Quando comparados ao controle claro e escuro, bem como os grupos com ALA no escuro, as reduções em todos os grupos mencionados, são significativos ($p < 0,01$). Os grupos $15,6 \mu\text{g/mL}$ e $2000 \mu\text{g/mL}$ no claro, não apresentaram um resultado significativo, porém ao se comparar o grupo $31,1 \mu\text{g/mL}$ no claro com o grupo $2000 \mu\text{g/mL}$ no claro, não são observadas diferenças estatísticas, demonstrando que o grupo $31,1 \mu\text{g/mL}$ no claro não é uma concentração eficaz nos parâmetros testados (Figura 10 - C).

Ao se realizar a TFD após incubação do ALA por 6h, obteve-se uma redução de 71,6% na concentração de $2000 \mu\text{g/mL}$, concentração essa que com 4h não apresentou resultados significativos. Já para as concentrações de $31,3 \mu\text{g/mL}$ a $1000 \mu\text{g/mL}$, em diluição seriada, foi observada redução de 82%, 96,5%, 96,7%, 96,8%, 97% e 95,8%, respectivamente. Todos os resultados são significativos ao se comparar com os grupos controle claro e escuro e os grupos incubados com ALA no escuro. A concentração de $15,6 \mu\text{g/mL}$ (correspondente a $0,09 \text{ mM}$) no claro, não apresentou redução significativa, demonstrando que concentrações muito baixas, para os parâmetros utilizados, não são eficazes (Figura 10 - D).

Na realização da ALA-TFD com 8h de incubação, houve um resultado ainda melhor nas concentrações já vistas como eficazes, além de um bom resultado na maior concentração. Com uma redução maior do que 97% nas concentrações de $62,5 \mu\text{g/mL}$, $125 \mu\text{g/mL}$, $250 \mu\text{g/mL}$ e $1000 \mu\text{g/mL}$. Além de uma redução de aproximadamente 50% de viabilidade na maior concentração ($2000 \mu\text{g/mL}$). Porém, novamente, com a concentração de $15,6 \mu\text{g/mL}$, não se obteve redução significativa (Figura 10 - E).

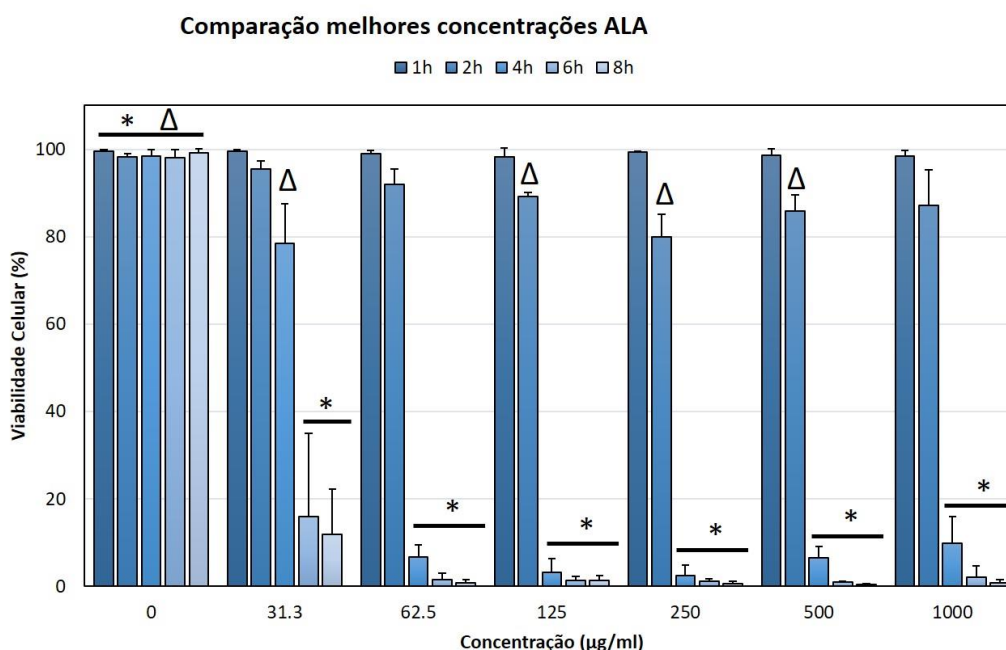
Por meio do grupo irradiado sem a presença do ALA, foi possível observar que a interação da luz com a célula, não leva à morte ou proliferação celular, assim como por meio dos grupos com a presença de ALA em ausência de luz não apresentam citotoxicidade para essa linhagem celular, em todas as concentrações testadas, nos parâmetros utilizados nesse estudo.

Analisando os resultados demonstrados, pode-se observar que as melhores concentrações para trabalho variam de $62,5 \mu\text{g/mL}$ a $1000 \mu\text{g/mL}$, em diluição seriada 1:1. Além disso foi possível confirmar a influência do tempo na formação da PpIX, demonstrando que quanto maior o tempo de incubação, maior a produção de PpIX e melhor a resposta à TFD. Os resultados se tornam mais visíveis quando comparados

os grupos controles escuros, de cada incubação, com os grupos irradiados (Figura 11).

As concentrações intermediárias de 125 µg/mL, 250 µg/mL, 500 µg/mL e 1000 µg/mL, demonstraram maior eficácia nos tempos de 2h, 4h, 6h e 8h, enquanto as concentrações de 31,3 µg/mL e 62,5 µg/mL, apresentaram citotoxicidade apenas após 4h de incubação. Além disso, não houve diferença significativa entre os resultados obtidos com 4h, 6h e 8h de incubação, mantendo uma taxa similar de morte celular independente da variação desses tempos.

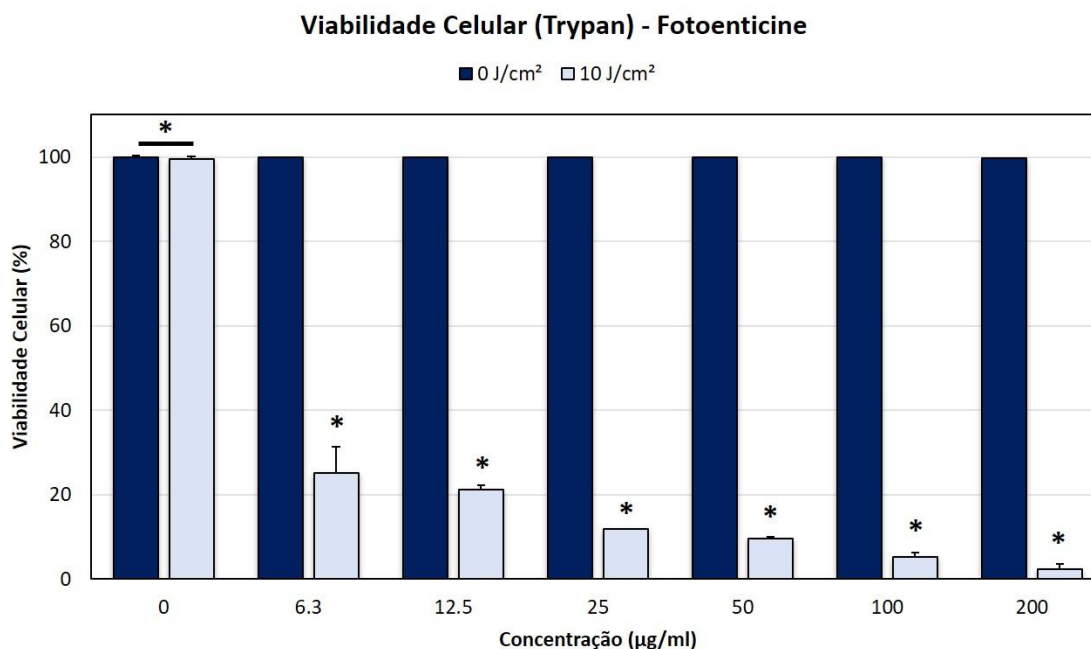
Figura 11 - Comparação da Viabilidade celular após ALA-TFD, por meio do teste de Azul de Trypan. Resultados apresentados em Média±DP. Foram considerados * p<0,01, comparando-se apenas os grupos após a TFD nas diferentes concentrações e tempos testados, demonstrando melhor eficácia das concentrações intermediárias nos tempos de 4h a 8h. Entre os grupos controle as concentrações de 31,3 µg/mL no tempo de 4h de incubação e 125 µg/mL, 250 µg/mL e 500 µg/mL, no tempo de 2h de incubação, foram consideradas Δ p<0,05.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Para o Fotoentcine foram avaliadas diferentes concentrações, 200 µg/mL à 6,25 µg/mL, em diluição seriada 1:1, com tempo de incubação de 1h. No teste de viabilidade por azul de Trypan houve diferença estatisticamente significativa (p<0,01), com redução da viabilidade celular nos grupos tratados com TFD em comparação ao grupo controle (Figura 12).

Figura 12 - Teste de Trypan realizado após 18h da aplicação da FTC-TFD, com 1h de incubação do FS, demonstrando a viabilidade celular dos grupos claros e escuros. Resultados apresentados em Média±DP. Foram considerados * $p < 0,01$, comparando-se os grupos controle e TFD nas diferentes concentrações, demonstrando uma resposta dose/dependente, no qual maiores concentrações demonstraram maior taxa de morte celular.

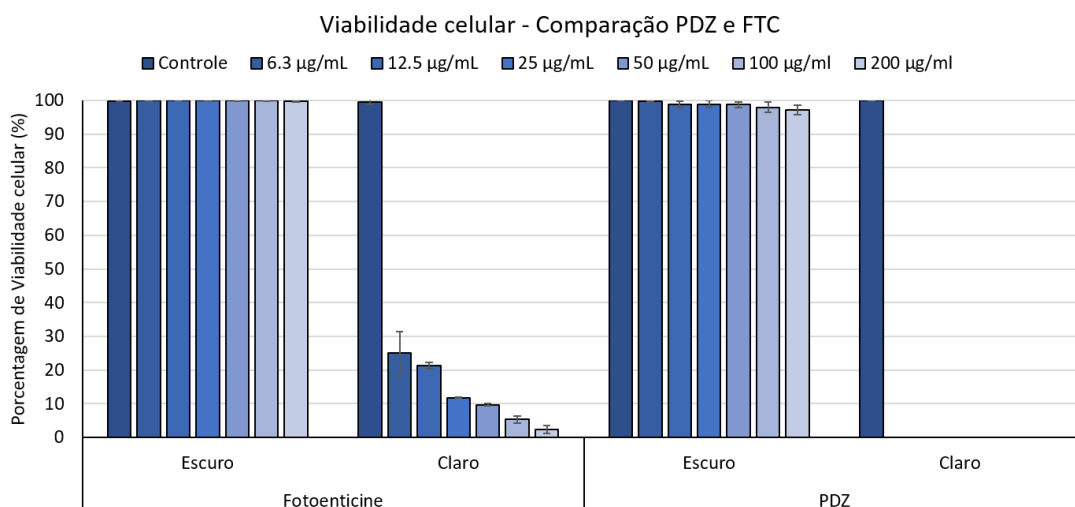


Fonte: Elaborado pelo autor.

Com redução de 74,8%, 78,6%, 88,1%, 90,2%, 94,6% e 97,5 para as respectivas concentrações de 6,3 µg/mL, 12,5 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL e 200 µg/mL. Não há diferença estatística quando comparados os grupos controle irradiado e não irradiado e os grupos com FS nas diferentes concentrações em ausência de luz. Já entre o grupo TFD 100 e TFD 200 e entre TFD 50 e TFD 200 foi observado diferença estatística ($p < 0,05$), demonstrando uma maior fotocitotoxicidade com o aumento da concentração utilizada.

Ao compararmos o Fotoenticine com a clorina PDZ, observa-se que o PDZ apresenta maior citotoxicidade após irradiado, com uma redução de 97,5% e 100% da viabilidade, respectivamente, para o Fotoenticine e PDZ, na maior concentração. Do mesmo modo, quando em ausência de luz, o PDZ apresenta uma citotoxicidade pequena (2,8%), porém maior que o Fotoenticine (0,1%) (Figura 13).

Figura 13 - Comparação da viabilidade celular por meio do teste de Trypan, com FTC e PDZ. Resultados apresentados em Média±DP. Comparando-se os grupos irradiados de ambas as clorinas, é possível observar que o PDZ apresenta maior fototoxicidade quando comparado ao FTC, independentemente da concentração utilizada.



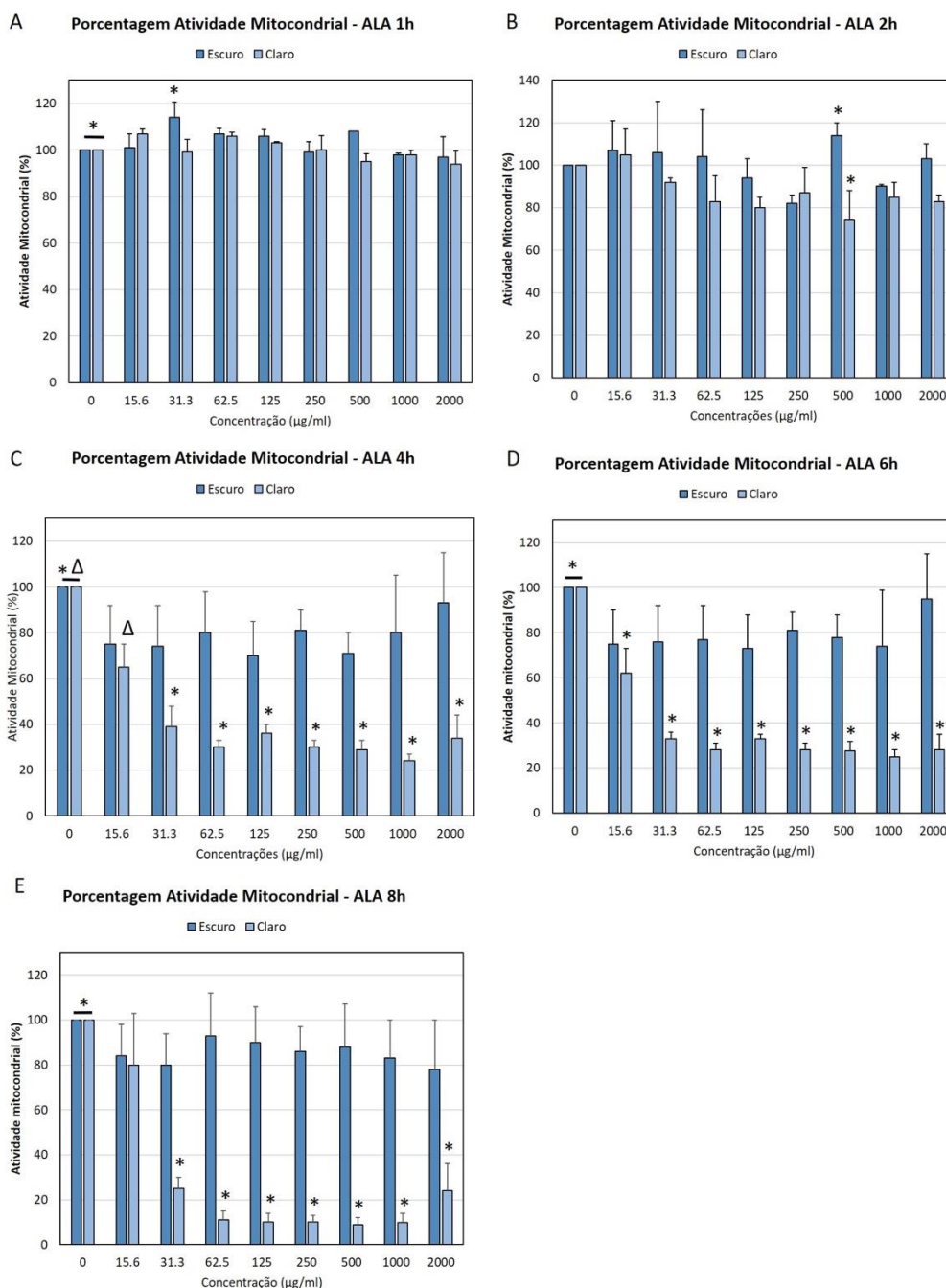
Fonte: Elaborado pelo autor.

De modo geral, ambas as clorinas apresentaram melhor resposta quando comparado ao ALA, uma vez que apresenta maior citotoxicidade após a TFD, com apenas 1h de incubação, já o ALA necessita de no mínimo 4h para uma resposta similar ao das clorinas.

b. Ensaio MTT

O teste de MTT foi realizado visando complementar o teste de viabilidade por Azul de Trypan. Assim como no teste de exclusão por azul de Trypan, no tempo de incubação de 1h não foram observadas diferenças significativas quando comparados os diferentes grupos (Controle irradiado e não irradiado, grupos com ALA irradiado e não irradiado). Há um pequeno aumento da atividade mitocondrial do grupo 31,25 µg/mL, quando no escuro (Figura 14 – A).

Figura 14 - Avaliação da atividade mitocondrial por meio do teste de MTT, após 18h da ALA-TFD em diferentes concentrações, com tempo de incubação do ALA de 1h (A), 2h (B), 4h (C), 6h (D) e 8h (E). Resultados apresentados em Média±DP. Foram considerados * $p < 0,01$, comparando-se os grupos controle e tratados no qual é possível observar um aumento da eficiência segundo o aumento da concentração e do tempo de incubação, sem diferenças significativas entre os grupos de concentrações intermediárias (31,3 $\mu\text{g/mL}$ a 1000 $\mu\text{g/mL}$) após a realização da TFD. No tempo de 4h, foi observada uma pequena resposta à menor concentração (15,1 $\mu\text{g/mL}$) considerando-se $\Delta p < 0,05$.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Apesar da pequena diminuição da viabilidade celular, demonstrada no teste de Trypan para o tempo de incubação de 2h, no teste de MTT não foi possível perceber

essa diminuição, de modo que, estatisticamente, não foram observadas diferenças entre os grupos (Controle irradiado e não irradiado, grupos com ALA irradiado e não irradiado). O grupo 500 µg/mL apresentou um aumento de sua atividade mitocondrial, diferindo de seu resultado após a TFD, entretanto esse resultado pode ser atribuído a interação do ALA com a mitocôndria, uma vez que com o teste de Trypan, não observamos morte celular (Figura 14 – B).

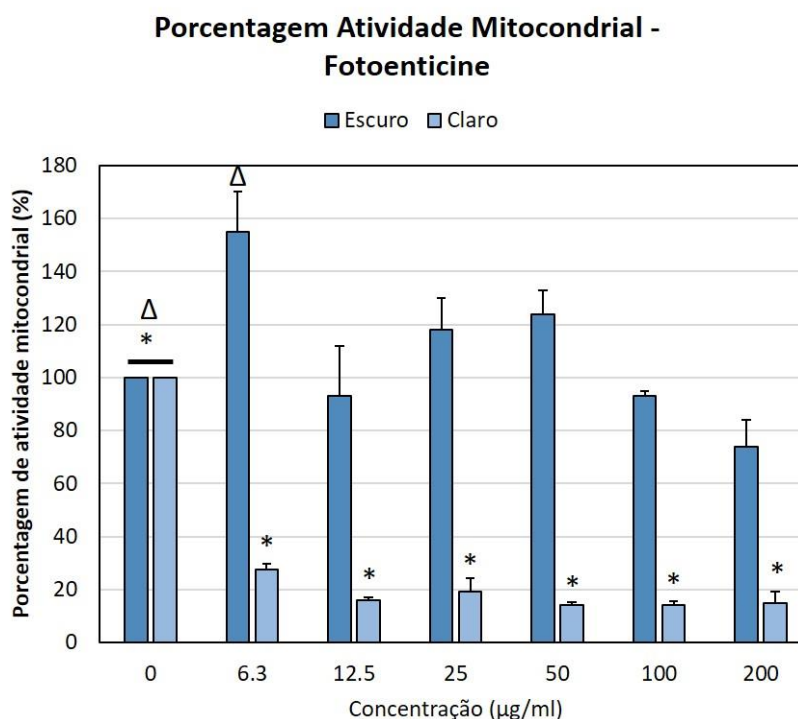
Com 4h de incubação do ALA, houve uma redução de 61%, 70%, 64%, 70%, 71%, 76% e 66% nas concentrações de 31,3 µg/mL à 2000 µg/mL, em diluição seriada, respectivamente. Quando comparados ao controle irradiado e não irradiado, bem como os grupos com ALA não irradiado, as reduções em todos os grupos mencionados, são significativas ($p < 0,01$). Diferentemente do teste de Trypan, no qual os grupos 15,1 µg/mL e 2000 µg/mL após irradiação, não apresentaram resultado satisfatório, no teste de MTT houve aproximadamente 35% e 66%, respectivamente, de diminuição da atividade mitocondrial ($p < 0,05$), essa aparente discrepância nos resultados pode ser devido a uma variação da própria resposta à TFD nessas concentrações, ou apenas indicar a variação da atividade mitocondrial frente a sua interação com o ALA (Figura 14 – C). Quando comparados os grupos controle aos grupos com ALA nas diferentes concentrações na ausência de luz, não são observadas diferenças significativas e, como nos tempos de 1h e 2h, houve uma grande variação dos resultados obtidos.

Ao se incubar o ALA por 6h, obteve-se uma redução de 72% na concentração de 2000 µg/mL irradiado, compatível com o demonstrado pelo Trypan. Para as concentrações de 31,3 µg/mL a 1000 µg/mL, em diluição seriada, após a irradiação, foi observada redução de 67%, 71,9%, 67%, 72%, 72,3% e 75%, respectivamente (Figura 14 – D). Todos os resultados são significativos ao se comparar com os grupos controle claro e escuro e os grupos incubados com ALA não irradiados. A concentração de 15,6 µg/mL, apresentou redução significativa ($p < 0,05$) de 38%, levantando as mesmas hipóteses para os resultados obtidos na incubação de 4h.

Assim como visto no teste de Trypan, incubado por 8h, o ALA apresentou uma redução maior do que 89% nas concentrações de 62,5 µg/mL, 125 µg/mL, 250 µg/mL, 500 µg/mL e 1000 µg/mL e uma redução de 75% para as concentrações de 31,3 µg/mL e 2000 µg/mL. Porém, com a concentração de 15,6 µg/mL, não se obteve redução significativa (Figura 14 - E).

A avaliação da porcentagem de atividade mitocondrial do grupo com Fotoenticine (FTC) (Figura 15) testada pelo método de MTT mostrou uma diminuição significativa ($p < 0,05$) entre os grupos: Controle e 200 $\mu\text{g/mL}$ não irradiado.

Figura 15 - Avaliação da Atividade Mitocondrial antes e pós FTC-TFD, com 1h de incubação do FS, em diferentes concentrações. Resultados apresentados em Média \pm DP. Foram considerados * $p < 0,01$, comparando-se os grupos controle e TFD nas diferentes concentrações, demonstrando uma resposta independente da dose, com redução da atividade mitocondrial para todas as concentrações após a TFD, de modo semelhante. Além disso foi observado um aumento da atividade mitocondrial ao na menor concentração, ao se comparar com o controle, considerando-se $\Delta p < 0,05$.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Quando comparados os grupos tratados com a FTC-TFD em todas as concentrações testadas com os grupos controle e apenas irradiado, foi observada diferença estatística ($p < 0,01$), sugerindo que a TFD alterou a viabilidade celular, o que pode ser comprovado pelo método de coloração com azul de Trypan. Também foi possível observar que os parâmetros de irradiação utilizados não modificaram a resposta celular, uma vez em que os grupos, controle e apenas irradiado, não apresentaram diferenças significativas.

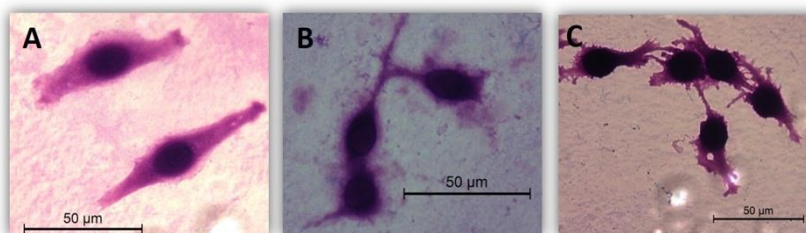
Houve um aumento significativo da atividade mitocondrial na menor concentração quando em ausência de luz, porém isso não indica aumento da viabilidade e sim maior atividade celular.

Com um percentual de 15% de atividade mitocondrial na maior concentração após irradiação e de 28% na menor concentração, o Fotoenticine apresenta-se como um FS promissor para a TFD. Já o PDZ demonstra um comportamento muito semelhante ao do Fotoenticine, apresentando um percentual de 14,6% na maior concentração e 12,2% na menor concentração, quando irradiado, também se mostrando um FS promissor (FONTANA *et al.*, 2017).

c. Morfológico

O teste morfológico permite observar se os danos sofridos pelas células afetam sua arquitetura. O morfológico com PDZ demonstrou que, antes da TFD e na maior concentração utilizada, em ausência de luz, não há mudanças na morfologia celular, entretanto, após a TFD, há a perda ou diminuição da região citoplasmática, de modo que foram observadas diversas células com núcleos nus, porém sem danos aparentes no núcleo celular (FONTANA *et al.*, 2017). Para fins de comparação, foi realizada a análise morfológica do Fotoenticine na maior concentração utilizada (200 µg/mL), nos parâmetros citados anteriormente (Figura 16).

Figura 16 - Análise morfológica com Fotoenticine. Grupo controle (A) demonstrando a morfologia íntegra da célula, tratado com 200 µg/mL em ausência de luz (B) demonstrando os prolongamentos celulares e após FTC-TFD (C), na qual se observa um desarranjo na região citoplasmática.



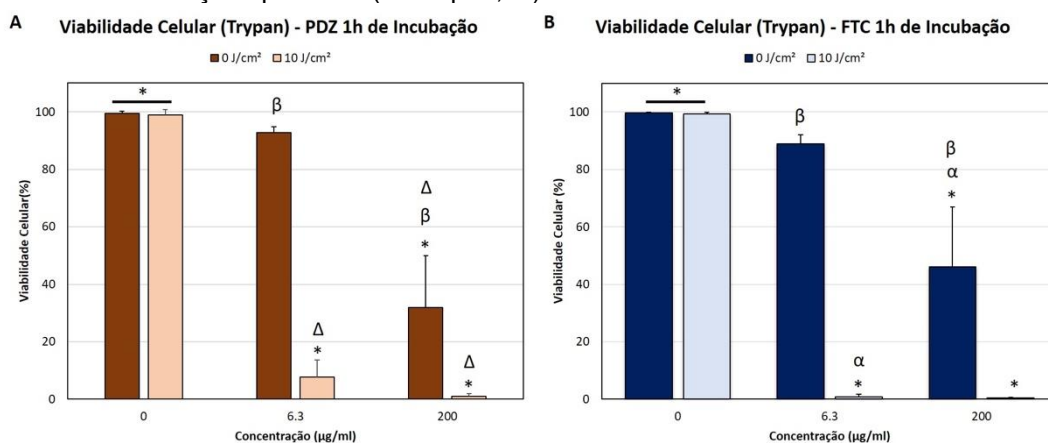
Fonte: Elaborado pelo autor.

Assim como o PDZ, no grupo controle e na maior concentração testada em ausência de luz, não há perda da arquitetura celular, com células fusiformes (Figura 15 – A e B). Entretanto, após a irradiação, é observada um desarranjo no citoplasma celular, apresentando prolongamentos e aparente estresse celular (Figura 15 – C).

4.2 Viabilidade por exclusão por azul de Trypan em Fibroblastos

Para verificar a seletividade da ação das clorinas em células de gliossarcoma, foi realizada a análise de viabilidade por exclusão de Trypan em células de fibroblastos L929, sendo utilizadas a maior e menor concentração para comparação, uma vez que todas as concentrações testadas foram obtidos bons resultados. Ao observarmos os grupos com FS em ausência de luz, é possível observar uma maior citotoxicidade de ambas as clorinas para a linhagem de fibroblasto em comparação a linhagem de gliossarcoma, com redução de 7,3% e 68% da viabilidade utilizando o PDZ e 11% e 54% para o FTC, na menor e maior concentração, respectivamente. Quando comparado a viabilidade entre as clorinas em ausência de luz, não há diferenças significativas, demonstrando igual citotoxicidade entre elas (Figura 17).

Figura 17 - Análise viabilidade celular para em linhagem fibroblástica L929, com as clorinas PDZ (A) e FTC (B). Foi observado uma redução da viabilidade quando comparados os grupos controle e TFD em ambas as concentrações (* $p < 0,01$). Além disso, há uma diminuição significativa comparando-se os grupos 200 $\mu\text{g/mL}$ e 6,3 $\mu\text{g/mL}$ no escuro, para ambas as concentrações, demonstrando citotoxicidade na maior concentração (β $p < 0,01$). Há ainda uma redução significativa entre o grupo 200 $\mu\text{g/mL}$ e ambas as concentrações pós TFD (Δ e α $p < 0,05$).



Fonte: autor.

Quando irradiado, ambas as clorinas apresentaram padrão de citotoxicidade semelhante, não havendo diferenças significativas entre elas. Para o PDZ foi observada uma taxa de redução de 92,2% e 98,9% na menor e maior concentração respectivamente, e para o FTC, a redução foi de 99,2% e 99,6% na menor e maior concentração, respectivamente. Apesar de não haver diferenças entre as clorinas, o FTC apresenta uma taxa de fotocitotoxicidade maior na linhagem L929 em

comparação com a linhagem 9L. Já o PDZ, apresentou uma taxa de redução maior na linhagem de gliossarcoma.

4.3 Análise de Produção PpIX

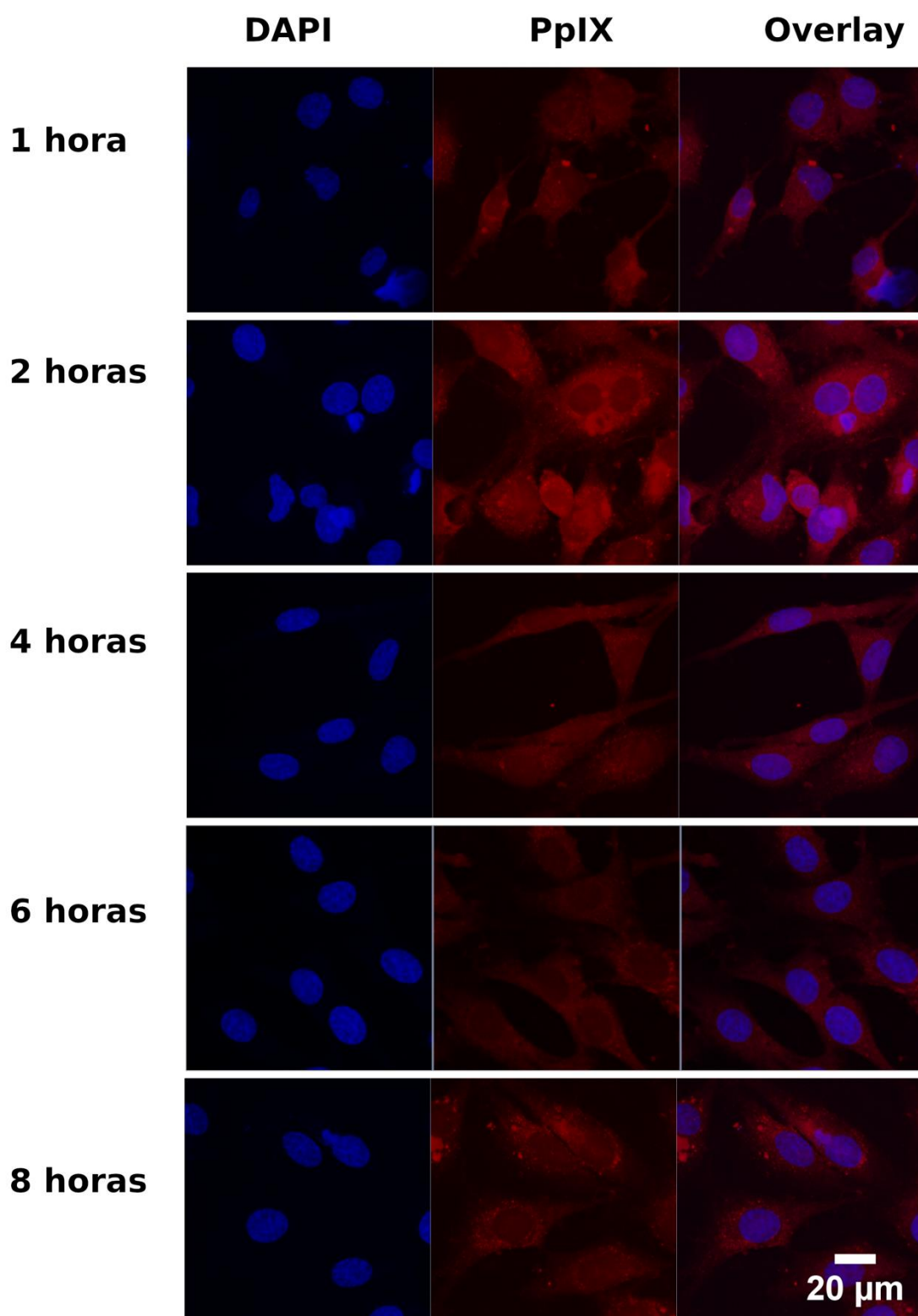
a. Microscopia Confocal de fluorescência

Para verificar o melhor tempo para a produção da PpIX, foram realizadas imagens por meio de microscopia confocal, utilizando o marcador nuclear DAPI (Figura 18).

Foram testados diferentes tempos, na concentração de 125 µg/mL (correspondendo a 0,7 mM) de ALA, que foi a menor concentração eficaz encontrada nos testes de viabilidade.

Foi possível observar que os os tempos de 4h e 6h apresentam maior acúmulo da protoporfirina IX, e menor produção nos tempos de 1h e 8h. No tempo de 2h de incubação, a quantidade de PpIX presente é menor que nos tempos de 4h e 6h, além de se apresentar mais disperso no citoplasma, quando comparados os tempos de 4h e 6h, que apresenta uma distribuição mais uniforme da PpIX.

Figura 18 - Imagens confocal realizadas após 1h, 2h, 4h, 6h e 8h de incubação do fármaco ALA. A) Marcação com DAPI; B) Fluorescência PpIX formada; C) Sobreposição das imagens A e B; D) Sobreposição das imagens junto ao campo claro.

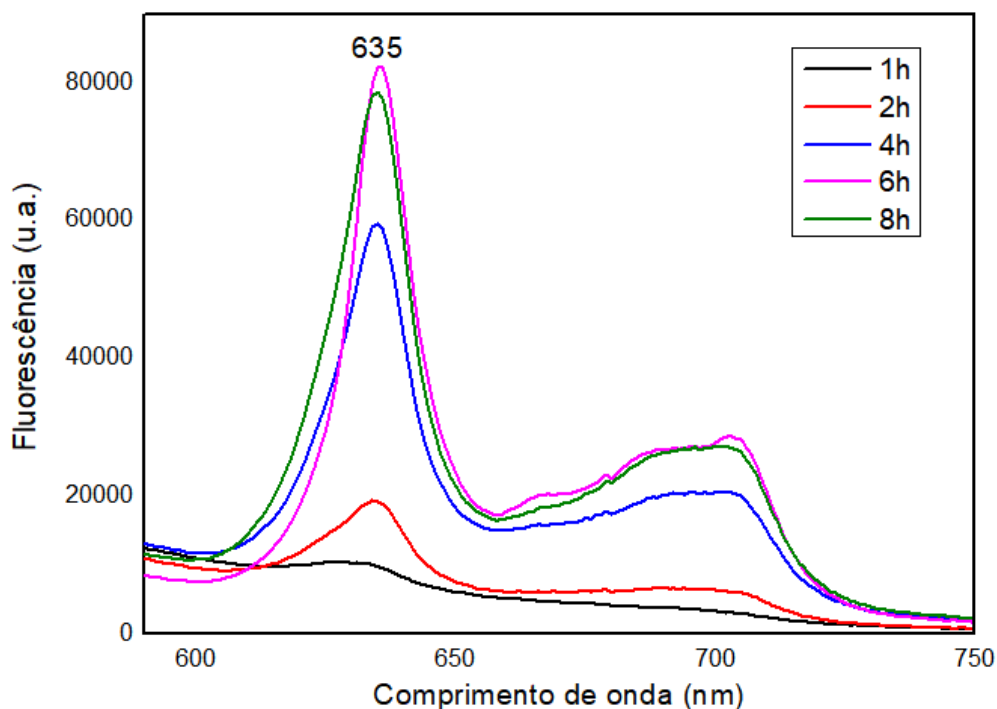


Fonte: Elaborado pelo autor.

b. Curva de formação da PpIX

Visando complementar a microscopia confocal, foi realizada a medida de fluorescência da formação da PpIX (Figura 19).

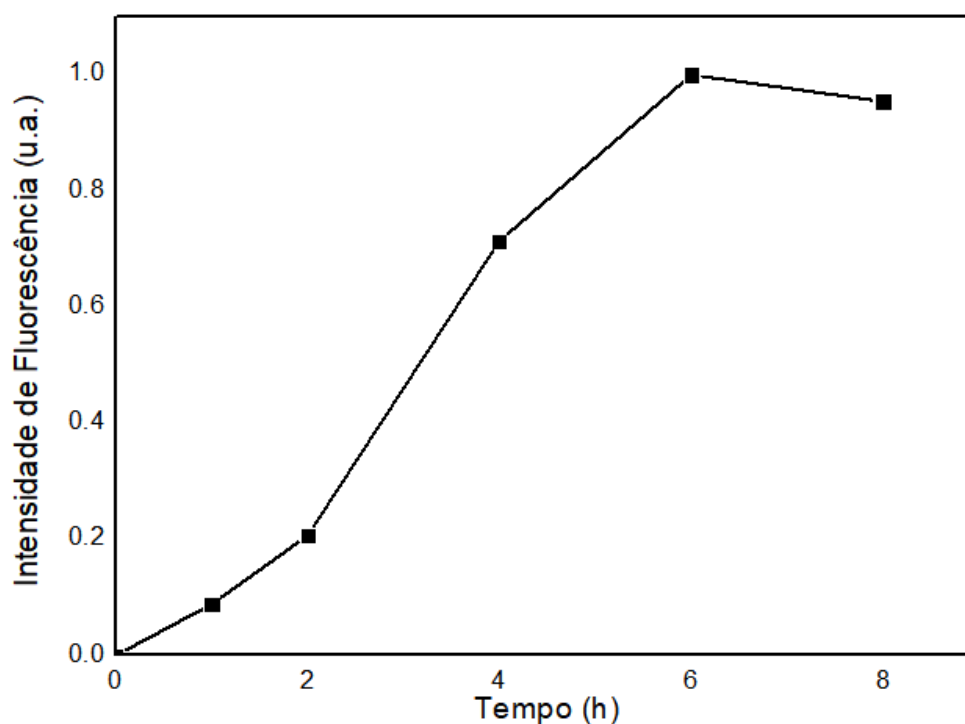
Figura 19 - Espectro de fluorescência da formação de PpIX em diferentes tempos.



Fonte: autor.

Assim como na análise por microscopia confocal, foi possível observar um aumento da produção da PpIX ao longo do tempo, com um pico máximo em 6h de incubação (linha rosa), havendo um decaimento da fluorescência com o período de incubação de 8h. Os tempos de 1h e 2h foram os tempos de menor produção e o tempo de 4h demonstrou uma quantidade intermediária da produção de porfirina endógena (Figura 20).

Figura 20 - Curva de formação da PpIX ao longo do tempo (h) de incubação, dada pela normalização do pico de 635 nm, atribuído à PpIX, demonstrando acúmulo crescente da PpIX com o tempo e pequena redução no período de 8h.



Fonte: autor

4.3 Internalização Clorinas

A análise por microscopia de fluorescência permitiu observar a localização celular do Fotoentice, a fim de se comparar com os resultados obtidos com o PDZ, já publicados. Foi utilizada a maior concentração (200 $\mu\text{g/mL}$), observando-se que após o período de 1h de incubação o FS é internalizado pelas células e localiza-se no citoplasma, mas não no núcleo celular (Figura 21).

Figura 21 - Internalização do Fotoenticine em células da linhagem 9I/lacZ após uma hora de incubação. A – Células em campo claro na concentração de 200 µg/mL; B – Células do controle com marcador DAPI; C – Células apresentando FS e marcação nuclear; D – Sobreposição. (escala 50 µm)



Fonte: Elaborado pelo autor.

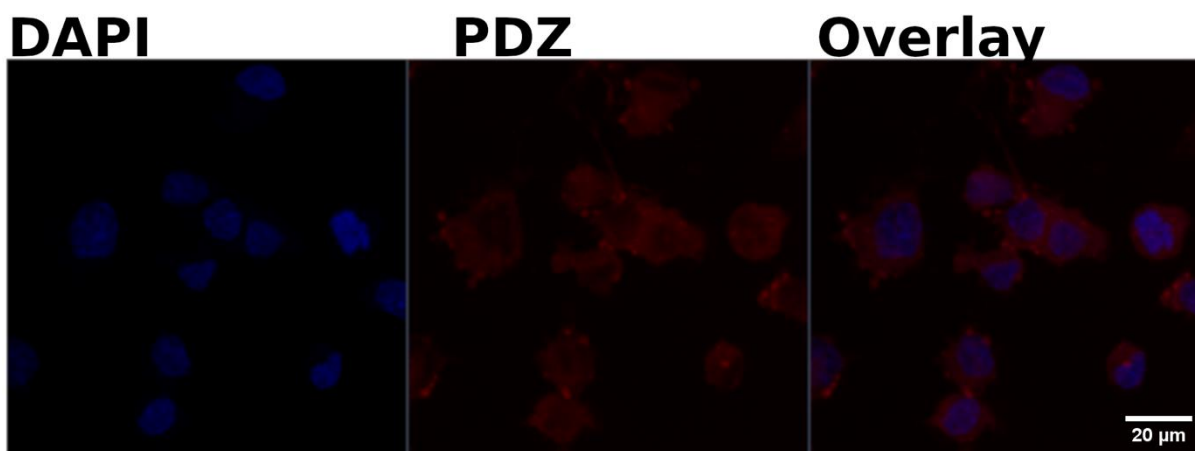
Mesmo após a internalização do FS em sua maior concentração, não foram observadas alterações morfológicas na célula (Figura 21 - A). No grupo controle, foi observada a marcação nuclear com DAPI, apenas (Figura 21 – B), já a adição do FS demonstrou a presença do FS no interior de toda a extensão celular exceto a região nuclear, no qual observa-se a ausência total de marcação ao centro da célula (Figura 21 – C), com a marcação do DAPI junto ao FS, foi possível demonstrar a separação citoplasma/núcleo, bem como evidenciar a presença do FS na região citoplasmática.

Para o PDZ também foi utilizada a maior concentração (200 ug/mL), observando-se que após o período de 1h de incubação o FS é internalizado pelas células, porém, diferente do Fotoenticine, o PDZ apresenta sua localização no citoplasma, bem como na região do núcleo celular. A marcação nuclear para o PDZ foi realizada utilizando o Sybr Green, entretanto, pelas limitações do equipamento, não foi possível afirmar se o PDZ se encontra de fato no interior do núcleo ou ao redor do mesmo (FONTANA *et al.*, 2017).

Para confirmação da localização, foi utilizada a microscopia confocal, utilizando-se 200 µg/mL de ambas as clorinas, e como marcador nuclear o DAPI.

Foi possível observar de maneira mais nítida, que o PDZ se apresenta por toda a região citoplasmática, com ausência no interior do núcleo, porém é observada maior proximidade do FS à membrana nuclear (Figura 22).

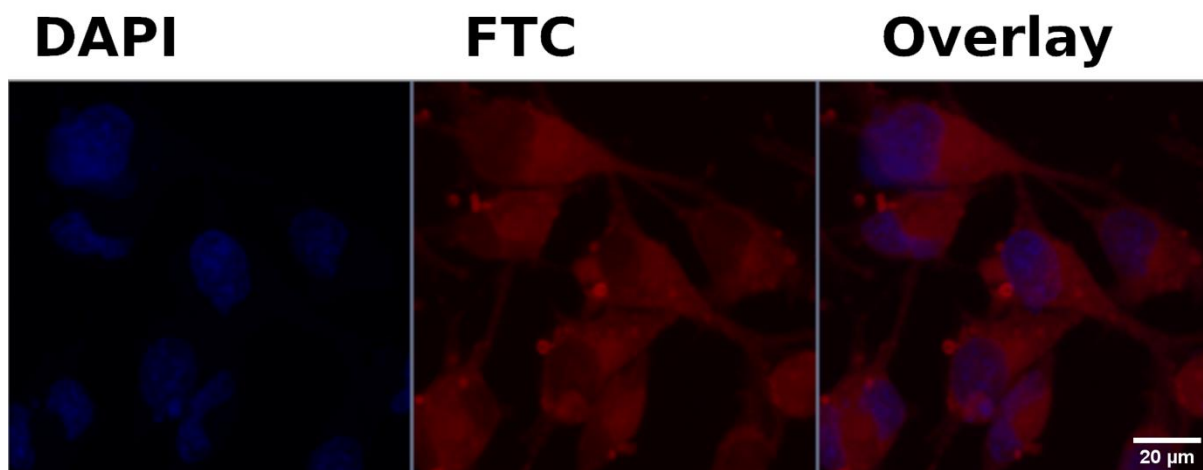
Figura 22 - Imagens confocal realizadas após 1h de incubação do PDZ a 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em células da linhagem 9l/lacZ. A) Marcação com DAPI; B) Fluorescência Clorina; C) Sobreposição das imagens A e B.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Assim como o PDZ, o FTC também se demonstrou distribuído pelo citoplasma, porém, ele encontra-se mais bem distribuído em toda extensão citoplasmática (Figura 23).

Figura 23 - Imagens confocal realizadas após 1h de incubação do FTC a 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em células da linhagem 9l/lacZ. A) Marcação com DAPI; B) Fluorescência Clorina; C) Sobreposição das imagens A e B.



Fonte: Elaborado pelo autor.

4.4 Morte Celular por Apoptose/Necrose

A citometria baseada em imagem foi realizada antes e após a TFD, utilizando-se a concentração de 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ALA e tempo de 4h de incubação. Foram

analisados dois grupos sendo um grupo imediatamente após a realização da TFD e outro após 18h do tratamento (Figura 24 - A).

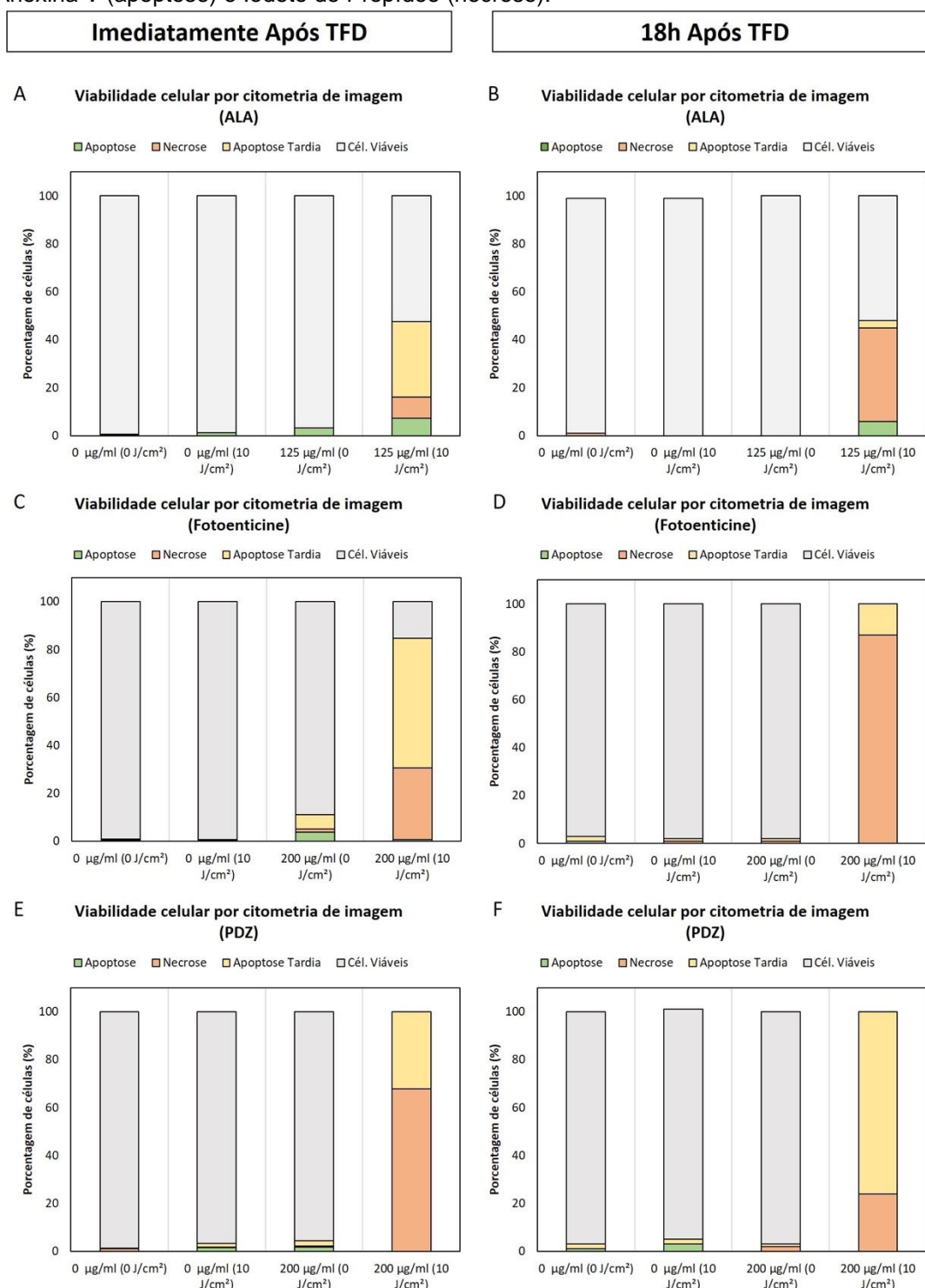
Os resultados imediatos demonstraram uma taxa de 52,4% de células não marcadas (viáveis) e 47,6% de células marcadas, com 7,3% de morte por apoptose, 8,8% por necrose e 31,5% por apoptose tardia, quando submetidos a TFD. Já nos grupos controle, foram observados 99,4% e 98,7% de células não marcadas, bem como 96,8% de células não marcadas quando adicionado ALA por 4h em ausência de luz.

Na análise realizada após 18h do tratamento, não foram observadas mudanças na quantificação da morte celular observada, com 52% de células não marcadas e 48% de células marcadas, entretanto foi observada uma mudança em relação ao tipo de morte celular presente, com um aumento do número de células em necrose e diminuição de apoptose tardia (6% de morte por apoptose, 39% de morte por necrose e 3% de morte por apoptose tardia) (Figura 24 – B).

Para as clorinas o experimento foi realizado com a concentração de 200 µg/mL, no tempo de 1h de incubação (FONTANA *et al.*, 2017). A concentração das clorinas foi escolhida para comparação com artigo previamente publicado com os dados de citotoxicidade do PDZ. Assim como o ALA, as clorinas também foram analisadas imediatamente e 18h após a TFD.

O Fotoenticine apresentou 88,9% de viabilidade no grupo em ausência de luz, apresentando uma leve citotoxicidade. Já após a irradiação, observou-se 15,4% de células viáveis e 84,6% de células não viáveis, sendo 53,9% de morte por apoptose tardia e 30,1% de necrose nos grupos irradiados, apresentando uma resposta eficiente com apenas 1h após a aplicação da TFD, resultado esse que persiste após 18h, como visto pelos testes de viabilidade (Figura 24 - C).

Figura 24 - Morte celular por citometria de imagem, imediatamente após a TFD utilizando ALA, FTC e PDZ como FSs (A, C e E) e 18h após a TFD utilizando ALA, FTC e PDZ como FSs (B, D e F), demonstrando diferenças quanto ao tipo de morte celular demonstrada. As células foram marcadas com Anexina V (apoptose) e Iodeto de Propídeo (necrose).



Fonte: Elaborado pelo autor.

O teste realizado após 18h da realização da TFD, apresentou um melhor resultado quanto à viabilidade celular, com 100% de células marcadas, e também

apresentou alteração quanto ao tipo de morte celular presente nos grupos, com 87% de morte por necrose e 13% por apoptose tardia (Figura 24 – D).

Quando utilizado PDZ como FS, na análise feita 1h pós TFD, nos grupos controle irradiado e não irradiado, bem como o grupo com PDZ em ausência de luz, apresentaram 98,7%, 96,6% e 95,6% de viabilidade celular, respectivamente, entretanto, após irradiação foi obtida uma taxa de morte celular de 100%, resultado igualmente obtido nos testes de viabilidade, com 67,8% de morte por necrose e 32,2% por apoptose tardia (Figura 24 - E).

Assim como no Fotoenticine, houve uma mudança no tipo de morte celular prevalente após 18h da terapia. Foram observadas 100% de células marcadas, porém 76% de apoptose tardia e 24% de necrose (Figura 24 – F).

Apesar de serem clorinas parecidas, o Fotoenticine apresentou diferenças quanto a prevalência ao tipo de morte celular, tanto imediatamente quanto pós 18h da TFD, demonstrando que a rota de ação de ambos os FS's, apesar de clorinas, apresentam diferenças.

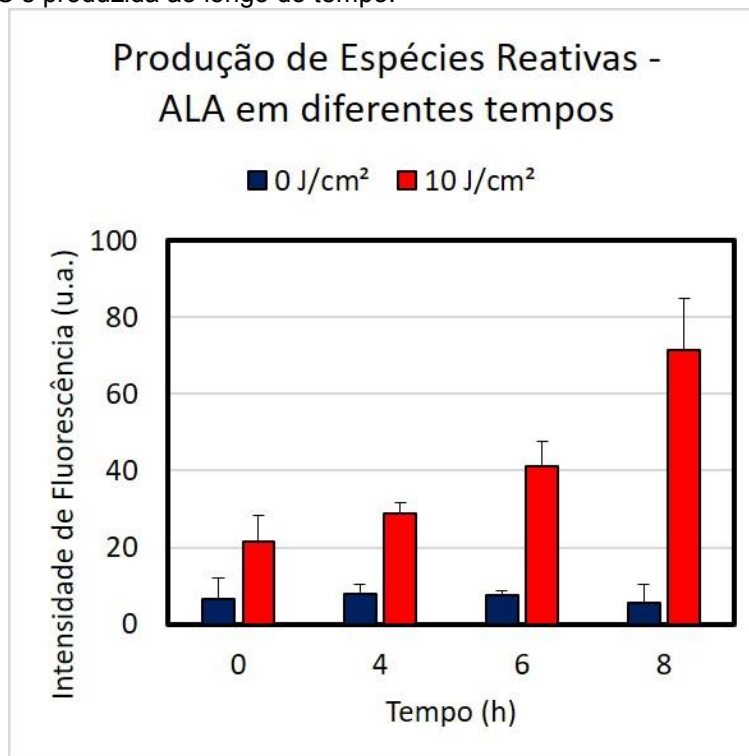
4.5. Produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO's)

Foi realizada a quantificação de espécies reativas de oxigênio após TFD, por meio do marcador H₂DCF-DA, um marcador não fluorescente que é convertido no composto fluorescente DCF, por meio da exposição às espécies reativas de oxigênio, formadas no ambiente.

Em todos os testes, o grupo controle irradiado apresentou um aumento na produção de ERO's, porém, como visto pelos testes prévios, esse aumento não afeta a viabilidade celular de modo expressivo.

Para o ALA, foi utilizada a concentração de 125 µg/mL, nos tempos de 4h, 6h e 8h de incubação, irradiado nos parâmetros previamente estabelecidos. Foi observado que, a TFD+ALA promove o aumento da produção de ERO's em todos os tempos testados, quando comparados ao controle escuro e a exposição ao ALA em ausência de luz, havendo um aumento da fluorescência emitida, com o aumento do tempo de incubação (Figura 25).

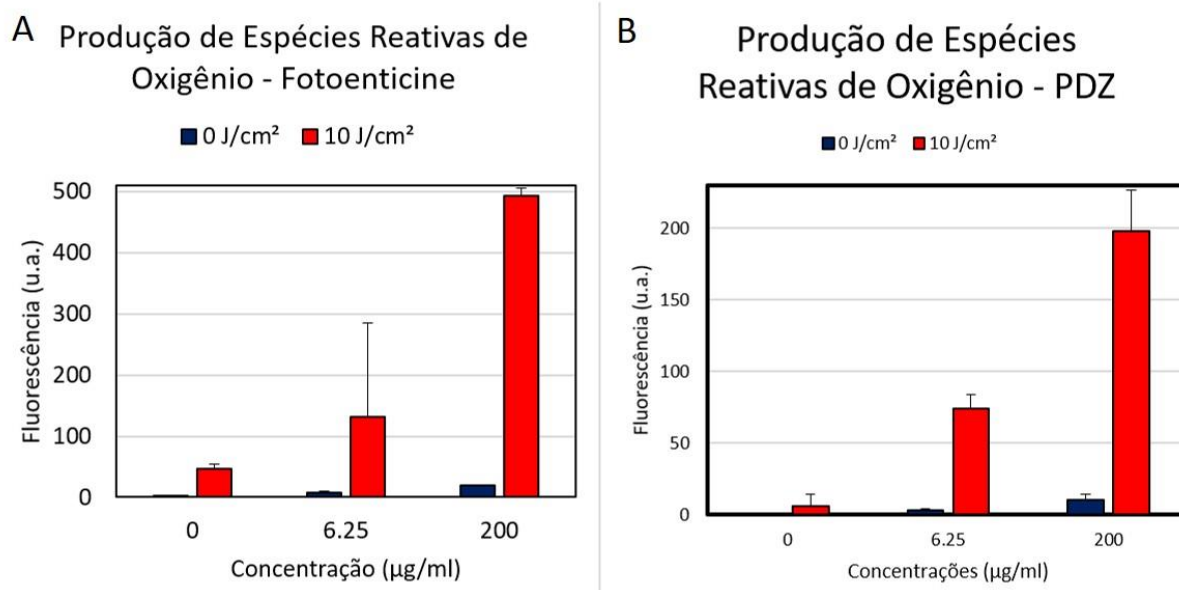
Figura 25 - Produção de Espécies Reativas de Oxigênio após TFD nos tempos de 4h, 6h e 8h de incubação com ALA. Resultado apresentado em Média±DP. Demonstrando que há um aumento da quantidade de ERO's produzida ao longo do tempo.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Para ambas as clorinas, foram testadas a maior (200 µg/mL) e a menor concentração (6,3 µg/mL). Tanto para o Fotoenticine quanto para o PDZ, foi possível observar, que a produção de ERO's é dependente da concentração utilizada, de modo que com o aumento da concentração, há também o aumento da produção de ERO's. Além disso, quando em ausência de luz, não é observado a formação de ERO's (Figura 26).

Figura 26 - Produção de Espécies Reativas de Oxigênio após TFD com FTC (A) e PDZ (B) nas concentrações de 6,25 $\mu\text{g/mL}$ e 200 $\mu\text{g/mL}$. Resultado apresentado em Média \pm DP, demonstrando que há um aumento da quantidade de ERO's produzida com o aumento da concentração utilizada.



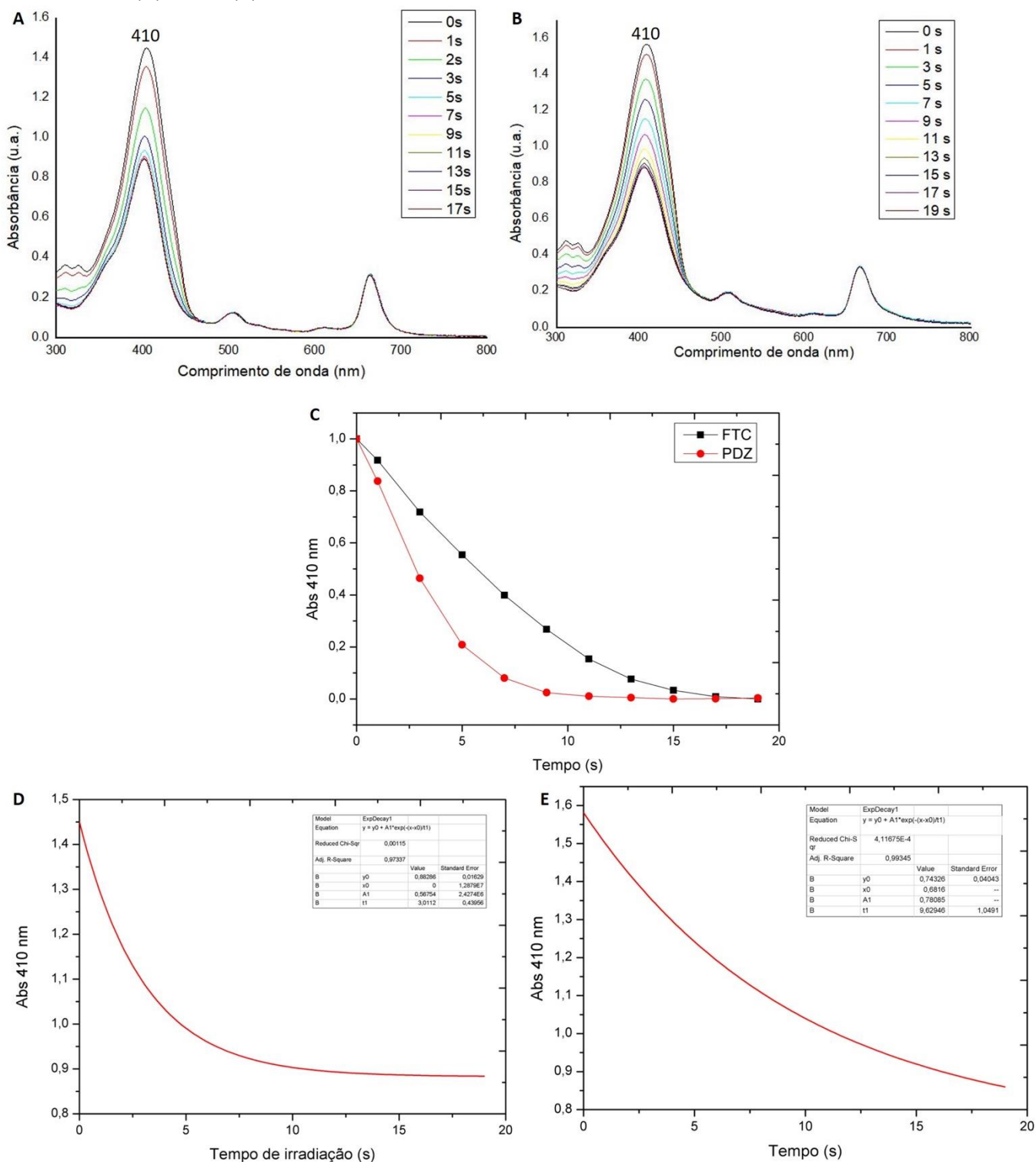
Fonte: Elaborado pelo autor.

4.6. Eficiência da Produção de Oxigênio singleto pelas clorinas.

Foi realizada a análise da eficiência de formação de oxigênio singleto pelas clorinas quando irradiada, fornecendo uma estimativa do rendimento quântico de cada clorina. O teste foi realizado por meio do decaimento da sonda de difenilisobenzofurano, adicionada junto a clorina. O caimento foi medido por meio da variação da absorbância no pico de 410 nm, referente à sonda.

Foi possível perceber decaimento mais rápido com a clorina PDZ quando comparada à clorina FTC. O decaimento da sonda é proporcional à geração de $^1\text{O}_2$, ou seja, quanto mais rápido o decaimento, maior a geração de oxigênio singleto pelo FS (Figura 27 A-C). Com os valores de absorbância em 410 nm, foi possível traçar uma curva decaimento em função do tempo, ajustada para decaimento exponencial de primeira ordem (Figura 27 – D e E).

Figura 27 - Medida da formação de oxigênio singlete pelas clorinas pelo decaimento da nanosonda de Benzoisoflurano, observada por meio do pico em 410 nm. Espectro de decaimento do PDZ (A) e FTC (B). Por meio dos valores em 410 nm, foi traçada a curva de decaimento para ambas clorinas (C), a partir da qual foram ajustadas para decaimento exponencial de primeira ordem para as curvas isoladas do PDZ (D) e FTC (E).



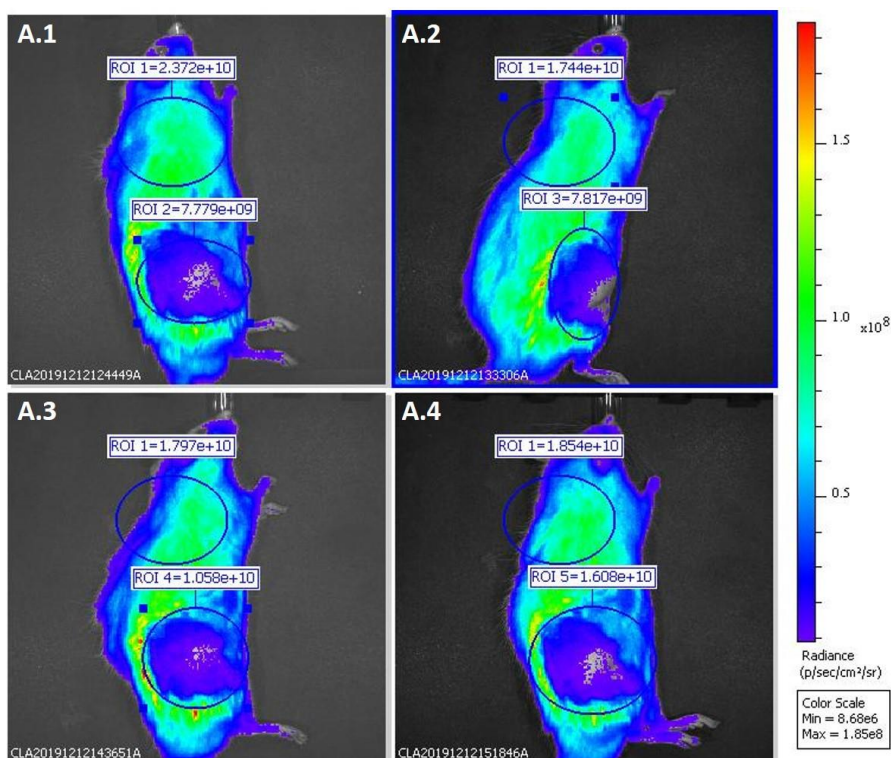
Fonte: autor

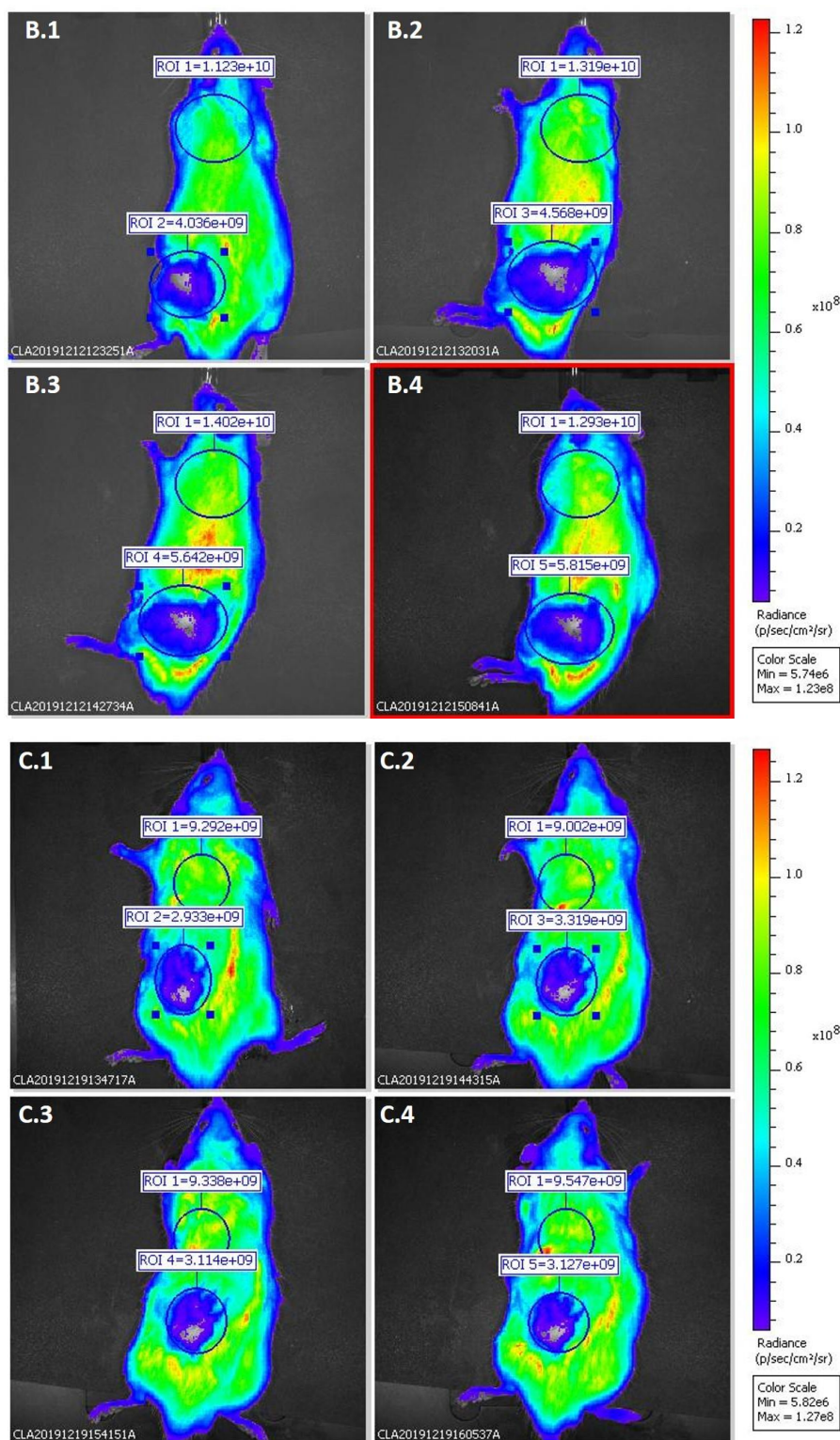
Por meio das curvas traçadas foi possível se calcular o rendimento quântico de cada FS, com valores de 0,27 para o PDZ e 0,13 para o FTC. Desse modo, o PDZ apresenta maior rendimento quântico, visto sua maior geração de $^1\text{O}_2$ no menor tempo de irradiação.

4.7 Análise das vias de administração do fármaco *in vivo*

Para observar a melhor via de administração do fármaco, foi utilizada a clorina Photodithazine®, por apresentar maior eficiência nos testes *in vitro*. Foi realizada a análise da fluorescência do animal após administração do fármaco via intraperitoneal, intravenosa e intratumoral (Figura 28).

Figura 28 - Medida de fluorescência do PDZ em animais. O fármaco foi administrado via intraperitoneal (A), intratumoral (B) e intravenoso (C), sendo captados com 1h (1), 2h (2), 3h (3) e 4h (4) de administração do fármaco. Escala em cor de fluorescência vermelho indicando maior taxa de fluorescência à violeta, menor taxa de fluorescência. ROI – Intensidade do sinal em uma região de interesse.





Fonte: autor

A medida foi realizada por meio do equipamento IVIS Spectrum, utilizando excitação em 488 nm. As medidas foram realizadas e compensadas por meio da

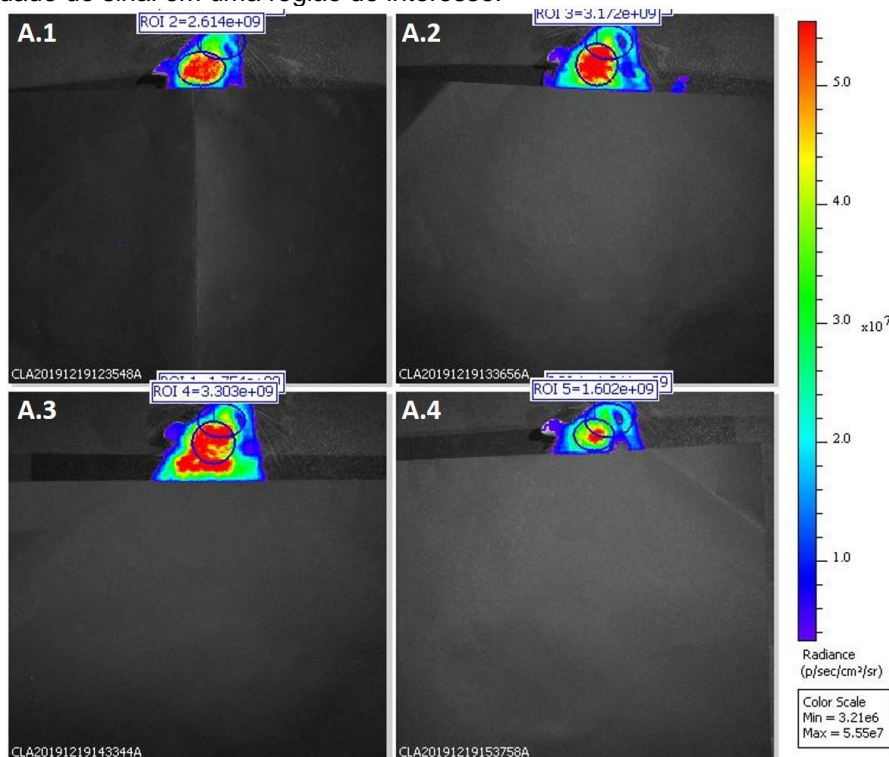
fluorescência de um animal sem FS (dado não mostrado). A captação da fluorescência foi realizada nos tempos de 1h, 2h, 3h e 4h da administração do fármaco

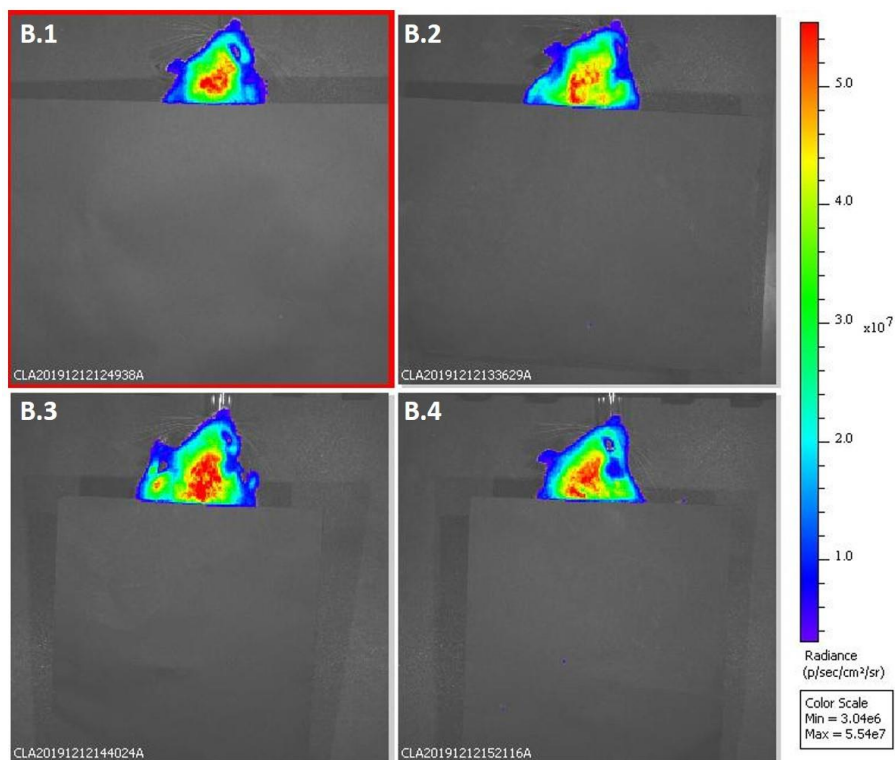
Independente da via de administração, houve acúmulo do fármaco pelo tumor após 1h de administração do fármaco, entretanto não foi possível observar um aumento significativo ao longo dos tempos de subsequentes. A comparação entre as vias de administração foi comprometida devido aos tamanhos irregulares dos tumores analisados, entretanto, é provável que em uma administração intravenosa ao paciente, o fármaco se acumularia no tumor, viabilizando uma irradiação local.

B5. Acúmulo do fármaco no encéfalo.

Para avaliação do acúmulo do FS na região do encéfalo do animal, foi utilizado um animal com o desenvolvimento do tumor xenográfico e outro animal sem tumor (Figura 29).

Figura 29 - Captação da fluorescência do FS pelo encéfalo em animais sem tumor (A) e com tumor (B). As análises foram realizadas com 1h (1), 2h (2), 3h (3) e 4h (4) de incubação. Escala em cor de fluorescência vermelho indicando maior taxa de fluorescência à violeta, menor taxa de fluorescência. ROI – Intensidade do sinal em uma região de interesse.





Fonte: autor.

Visto que a via de administração apresenta pouca influência na entrega do PDZ, pela facilidade de administração no animal, foi escolhida a via intraperitoneal. As imagens de fluorescência foram captadas com 1h, 2h, 3h e 4h de incubação com o fármaco.

Em ambos os animais, houve uma maior fluorescência na região cranial após a administração do fármaco, com um aumento da fluorescência com 3h de incubação. Entretanto, é possível observar que o animal sem tumor xenográfico (Figura 29 - A), apresenta acúmulo maior do fármaco nessa região quando comparado ao animal com tumor (Figura 29 - B).

5 DISCUSSÃO

O ALA é um pró-fármaco que estimula a formação da protoporfirina IX (PpIX), um FS endógeno, subproduto/reagente da rota metabólica de formação do Heme. O excesso de ALA, induz a formação de PpIX, e acaba por limitar a taxa de conversão biossintética para heme, levando a um aumento da concentração de PpIX no tecido. A aplicação do ALA pode ser via tópica ou sistemicamente, mas não há padronização do tempo de espera para o acúmulo de PpIX nas células tumorais, variando de 1h a 8h nos trabalhos encontrados na literatura (ROSA *et al.*, 2004; LAWRENCE *et al.*, 2014; COZZENS *et al.*, 2016).

Por meio da microscopia confocal, foi possível observar que os melhores tempos de acúmulo e retenção da PpIX *in vitro*, foram as incubações de 4h e 6h. Havendo menor produção nos tempos de 1h, acúmulo mais disperso em 2h e possivelmente a depuração do FS da célula no tempo de 8h de incubação, uma vez que a intensidade de fluorescência de PpIX presente é menor que nos tempos de 4h e 6h. Visando complementar as informações obtidas por meio da microscopia confocal, foi realizada uma curva de formação da PpIX, observada por meio da captação da fluorescência após incubação com ALA. A formação da porfirina foi detectada por meio da intensidade do pico em 635 nm, correspondente à PpIX, no qual foi observado uma quantidade pequena de formação da PpIX nos tempos de 1h e 2h. Com 4h, há um aumento da intensidade do pico em 635 nm, sendo maior com 6h e há um diminuição com 8h de incubação, demonstrando mais uma vez que o tempo mínimo para produção suficiente da PpIX em células da linhagem 9L é no período de 4h.

O ALA apresenta-se como padrão para o estudo de tumores cerebrais, por ser um fármaco conhecidamente capaz de ultrapassar a barreira hematoencefálica, tratando-se de uma propriedade importante no tratamento *in vivo* de pacientes acometidos. O ALA já é utilizado clinicamente em cirurgias guiadas por fluorescência, no qual o tempo de incubação preconizado é de 3h a 4h após aplicação oral do fármaco, sendo esse tempo o mais utilizado ao se realizar a TFD com ALA (CHUNG; ELJAMEL, 2013; PALASUBERNIAM *et al.*, 2015; COZZENS *et al.*, 2016).

Existem tratamentos, principalmente quando superficial, com o uso do ALA incubado por 1h, obtendo-se quantidade de PpIX suficiente para o sucesso do

tratamento. A menor quantidade encontrada nas imagens de confocal e na curva de produção, pode estar relacionada ao tempo da síntese. Fatores como o pH e a diluição do ALA, possuem uma grande influência quanto a formação de PpIX e sucesso da terapia (ANDRADE *et al.*, 2017).

O pH ótimo para o máximo acúmulo de PpIX, encontra-se entre 6,8 - 7,2, havendo agregação das moléculas de ALA em pH acima de 7,2, o que leva a perda de atividade do composto. A solução de ALA é mais estável quando em menor pH, porém soluções com pH abaixo de 5,0, possuem uma diminuição da formação da PpIX, comprometendo o tratamento. O pH entre 6,05 – 6,4, apresenta uma pequena diminuição dessa produção, porém sem comprometer a eficácia da terapia (BECH; BERG; MOAN, 1997; CERIZE, 2012). Antes dos ensaios, foi verificado o pH da solução de ALA de uso, sendo encontrado pH em torno de 6,3 o qual proporciona maior tempo de estabilidade do composto, bem como produção de PpIX suficiente para que o tratamento tenha resposta.

Por meio dos testes de viabilidade com o ALA, foi possível observar que em concentrações muito baixas (15,6 µg/mL, correspondente a 0,09 mM), não há redução significativa, independentemente do tempo de incubação utilizado, demonstrando que concentrações muito baixas do ALA não são eficazes. O mesmo é visto por diferentes trabalhos utilizando diferentes concentrações de ALA (BECH; BERG; MOAN, 1997; CORNELIUS *et al.*, 2014; EL-KHATIB *et al.*, 2015).

Diferente do ALA, que necessita um tempo longo de incubação para que se tenha FS suficiente viabilizando a TFD, as clorinas são FS exógenos, considerados de segunda geração, reagindo com comprimentos de onda maiores (660 - 670 nm), com alta capacidade de formação de ERO's após irradiação, levando a alta fototoxicidade, baixa citotoxicidade quando na ausência de luz, além de ser um composto em abundância na natureza, como em plantas (clorofila) e algas (*Spirulina maxima*) (GRECCO *et al.*, 2016; GAVRINA *et al.*, 2018; CHANG *et al.*, 2018). Outra característica das clorinas é seu rápido acúmulo nas células, quando comparado às porfirinas (GRECCO *et al.*, 2016).

Além do menor tempo de acúmulo nas células tumorais, apresentado pelas clorinas, os testes de viabilidade demonstraram maior eficácia desses fármacos quando comparado ao ALA. No trabalho de Liu e colaboradores (2011), foi utilizado como FS um derivado de hematoporfirina, HMME *in vitro* em linhagem de câncer de

mama (CHMm) utilizando como método de avaliação, entre outros, o teste de exclusão por Azul de Trypan. Foi observado que o FS não era citotóxico, entretanto quando irradiado causava morte celular. A concentração da droga utilizada foi de 20 µg/mL, utilizando-se um laser em 632,8 nm, com fluência de 2,8 J/cm², observando-se um máximo de 70% de morte celular após 48h da realização da TFD. De modo semelhante, na concentração de 25 µg/mL, foi obtido em apenas 18h, um total de 100% de morte celular com o uso do PDZ e 90% com o Fotoenticine, demonstrando uma eficácia maior das clorinas em comparação ao derivado de hematoporfirina. Ao comparamos a concentração de 15,6 µg/mL de ALA, independentemente do tempo de incubação utilizado, não há uma resposta satisfatória, já com 31,3 µg/mL há uma redução de aproximadamente 80% nos tempos de 6h e 8h de incubação, sem redução significativa quando incubado por 1h, 2h e 4h. Demonstrando que em baixas concentrações, as clorinas se mostram mais eficazes e precisam de menor tempo de incubação para uma resposta satisfatória.

É conhecido na literatura que existe resistência de tumores cerebrais quanto a TFD, dependendo da linhagem celular estudada, atrelando-se o sucesso da terapia ao FS empregado, parâmetros de irradiação e tipo tumoral (TIRAPELLI *et al.*, 2011; KHURSHID *et al.*, 2012; ALBERT; HEFTI; LUGINBUEHL, 2014). No estudo de Tirapelli e colaboradores (2011) foram utilizadas diferentes linhagens celulares de gliomas para análise da ação da TFD com o uso de porfirinas (Photogem® - PG) em uma concentração de 5 µg/mL, irradiadas com um equipamento LED em 630 nm, observando a eficácia da indução de morte em células de glioblastoma (GB) da linhagem U87 e U138, aproximadamente 60% e 30% de morte celular, respectivamente, avaliados por meio do teste de exclusão por azul de Trypan. Em comparação, neste trabalho, utilizando a menor concentração de ambas as clorinas (6,25 µg/mL) obteve-se 100% de morte celular com PDZ e 75% utilizando-se Fotoenticine, análise também concluída por meio da técnica de exclusão por azul de Trypan.

O PG, assim como a PpIX vista nesse estudo, são derivados de hematoporfirina muito utilizados em tratamentos com TFD, entretanto possuem uma banda de absorção na região de 620 a 630 nm, determinando menor penetração da luz no tecido alvo, já as clorinas possuem espectro de absorção na região de 660 a 670 nm,

possibilitando maior penetração tecidual da luz, bem como menor interação com os componentes bioquímicos do organismo (BUZZÁ *et al.*, 2014; BERNAL *et al.*, 2015).

O método de exclusão com Azul de Trypan permite diferenciar células vivas de mortas pela observação da coloração da célula. Por causa da integridade da membrana, não há acúmulo do corante no citoplasma das células viáveis. Para complementar e atestar os resultados obtidos por meio do teste de azul de Trypan, foi realizado o teste de MTT, que é capaz de detectar células vivas, uma vez em que essas são capazes de converter o sal de MTT em cristais de formazan, por meio de reações ocorridas principalmente em mitocôndrias em atividade. O resultado depende do grau de ativação e estimulação celular, mensurando a ativação da célula mesmo sem proliferação (MOSMANN, 1983).

Por ser o ALA um fármaco que age na mitocôndria, os resultados do MTT devem ser analisados com cuidado e por isso o uso de um teste complementar, como o teste de Trypan. Em suma, os resultados de ambos os testes, foram semelhantes, porém, principalmente para a maior concentração testada, houveram algumas discrepâncias como diminuição significativa da viabilidade apenas nos tempos de 6h e 8h analisado por meio do teste de Trypan e redução significativa da atividade mitocondrial a partir de 4h de incubação, essas diferenças podem ser explicadas pela ação do ALA na mitocôndria, uma vez que foi observada por meio da microscopia confocal que, com 1h e 2h não há formação suficiente de PpIX, mas com 4h a célula já apresenta quantidade suficiente, o que demonstra que entre esses tempos a célula encontra-se trabalhando para a formação da PpIX. Entretanto na menor concentração utilizada, independentemente do tempo de incubação utilizado, não houve resposta satisfatória.

Briel-Pump e colaboradores (2018), analisaram a produção da PpIX por ALA em diferentes linhagens de tumores cerebrais, em concentrações de 0 a 100 µg/mL, utilizando parâmetros de irradiação semelhantes (18,75 J/cm²; 30 mW/cm², 635 nm) e observaram que em baixas concentrações (12,5 µg/mL e 25 µg/mL), nos tempos de 4h e 6h de incubação, não houve uma redução significativa da viabilidade celular, resultado obtido por meio do teste de WST-1, que também é um sal de tetrazolium, como o MTT. Além disso, não houve diferença estatística entre os tempos de 4h e 6h, assim como em nosso estudo.

Pensando no uso clínico, é interessante que o FS apresente um tempo de incubação baixo para internalização e que permita uma ação eficaz da TFD, por esse motivo, foi escolhido o tempo de 4h para os testes seguintes. Além disso, após comparações com a literatura, optou-se por se utilizar a concentração de 125 µg/mL (0,7 mM), que foi a menor concentração eficaz no tempo de 4h de incubação, uma vez em que menores concentrações de ALA, suficientes para obtenção de resposta, são melhores de se utilizar visando a diminuição de efeitos adversos, como o tempo de fotossensibilidade do paciente, e também por se aproximar da concentração de 1 mM, muito utilizada em estudo *in vitro* (CASAS *et al.*, 2009; BRIEL-PUMP *et al.*, 2018).

Os testes de MTT para ambas as clorinas demonstraram uma redução da atividade mitocondrial em todos os grupos tratados com TFD, incluindo a menor concentração (6,25 µg/mL). Em contrapartida, os grupos com FS não irradiados, demonstraram alteração na atividade mitocondrial, apresentando aumento em concentrações mais baixas. Em estudo apresentado por Almeida e colaboradores (2019), foi observada a presença da clorina Fotoenticine na mitocôndria, permitindo-se inferir que há interação do FS com a mitocôndria. Entretanto não houve efeito citotóxico, como visualizado por meio dos resultados obtidos com o teste de exclusão por azul de Trypan, o que corrobora com achados do uso de clorinas, nos quais não é observada citotoxicidade em concentrações adequadas (BERNAL *et al.*, 2015).

Para melhor análise das clorinas como fármacos de escolha à TFD, foi realizada a análise de viabilidade celular em células de fibroblasto (L929), por se assemelharem as células adjacentes a tumores cerebrais. Como as clorinas se apresentaram eficazes em todas as concentrações testadas, foram escolhidas as concentrações de 200 µg/ml e 6,25 µg/ml, antes e após a irradiação. Ambas as clorinas apresentaram maior citotoxicidade na concentração de 200 µg/ml, levando a uma redução de cerca de 54% a 68% da viabilidade celular. Porém, na menor concentração, ambas as clorinas não apresentaram alta citotoxicidade. Apesar do desempenho semelhante de ambos os fármacos, o PDZ apresentou maior taxa de morte celular em sua menor concentração, na linhagem de gliossarcoma, e, após irradiação, apresentou uma taxa menor de morte na linhagem de fibroblasto, se demonstrando mais eficaz na linhagem de gliossarcoma quando comparado ao Fotoenticine.

Além da concentração do FS, outro fator que pode proporcionar maior seletividade do PDZ e do FTC, às células tumorais, conseqüentemente reduzindo a ação em células saudáveis, é o tempo de incubação do fármaco, que pode apresentar uma cinética de eliminação mais rápida em células saudáveis, ficando retido às células tumorais (AGOSTINIS *et al.*, 2010).

Um dos maiores desafios em cirurgias de ressecção tumoral é a preservação do tecido neuronal sadio, uma vez em que sequelas podem ser ocasionadas ao paciente, como a incapacidade de fala, dificuldade de locomoção, redução de movimentos das mãos e braços, entre outros problemas que acabam por limitar a vida do paciente. Por esse motivo, um fármaco que apresente maior capacidade seletiva para células tumorais e permita maior preservação do tecido sadio, torna-se um fármaco de maior interesse ao tratamento de tumores cerebrais (BARONE; LAWRIE; HART, 2014).

Além da viabilidade, para a linhagem de gliossarcoma, foi observada por meio da análise morfológica a perda da arquitetura celular após TFD com ambas as clorinas, o mesmo foi observado por Feng e colaboradores (2015) que analisaram células de câncer de mama (MDA-MB-231), após a TFD com clorina e6 incubada por 4h e irradiado a 650 nm (1,2 J/cm²). Após TFD, por meio de microscopia eletrônica de varredura, foi possível perceber que as células tratadas encolhem, diminuindo o tamanho de seu citoplasma.

Além da internalização, a microscopia confocal de fluorescência, permitiu observar que ambas as clorinas não se acumulam no núcleo, porém o PDZ se mostrou mais próximo a membrana perinuclear. Por meio da morfologia, ambas as clorinas demonstraram que não há destruição nuclear aparente, permitindo inferir que esses FS geram poucos danos nucleares que poderiam causar mutações carcinogênicas, diminuindo o risco de formação de clones resistentes.

Foi observado também que as clorinas se apresentam dispersas pelo citoplasma, o que também é visualizado por Bae e colaboradores (2004), que observaram por meio da microscopia confocal, a difusão da Radaclorina® por todo o citoplasma e membrana plasmática, e Chen e colaboradores (2000), que utilizaram a clorina mTHC. O morfológico do PDZ demonstrou redução do citoplasma, bem como células com núcleos nus aparentes, já o FTC, demonstrou redução e deformidade citoplasmática. Essa resposta pode estar associada a uma possível ação desses FSs

na membrana plasmática, permitindo inferir que as clorinas, nos parâmetros utilizados, são FSs que levam a morte celular por necrose ou apoptose tardia (BAE *et al.*, 2004; MROZ *et al.*, 2011; FONTANA *et al.*, 2017).

O tipo de morte celular é dependente do tipo de FS utilizado, bem como dos parâmetros de irradiação e da localização do FS no interior da célula. Para a determinação dos tipos de morte celular, foi utilizada a citometria de imagem, técnica equiparada com a citometria de fluxo, provendo dados multiparamétricos quantitativos sobre uma amostra. A citometria de imagem realiza a análise por meio de campos aleatórios, estimando o número de células marcadas com os fluoróforos Anexina V (Ann) e Iodeto de Propídeo (IP). A Anexina V se liga a lipoproteína Fosfatidilserina, comumente presente na membrana interna das células viáveis, essa lipoproteína é externada no início do processo apoptótico, já o Iodeto de Propídeo, não é internalizado por células viáveis, porém, em casos de perda da seletividade por destruição da membrana, o IP é capaz de internalizar na célula e se liga ao material genético, esse processo é ligado à morte por necrose. Pode ocorrer ainda uma marcação dupla, o que indica apoptose tardia (REMPLE; STONE, 2011; VALENTE, 2011; BRAUCHLE *et al.*, 2014).

Para a PpIX, foi observada uma taxa de aproximadamente 56% de células não marcadas, independente do período de análise, mantendo-se a taxa de morte pós TFD constante. Entretanto, é observado uma diferença entre a taxa de morte demonstrada pelo ensaio de Anexina/IP quando comparamos os resultados obtidos pelos testes de Trypan e MTT. Esse é um teste que avalia a morte por necrose e apoptose, levando em consideração proteínas que são expressas no processo apoptótico e a permeabilidade da membrana plasmática, considerando-se essas duas vias de morte as mais frequentes e exploradas em estudos. Entretanto, atualmente sabe-se que há ao menos dez tipos diferentes de mecanismos de morte celular (GALLUZZI *et al.*, 2018; KESSEL; REINERS JUNIOR, 2017), e por isso, acredita-se que além dos tipos de morte avaliados, algum outro mecanismo de morte, possa estar envolvido na redução da viabilidade celular após ALA-TFD.

Na análise realizada imediatamente após a TFD, foi observada uma prevalência de morte celular por apoptose tardia, identificada pela dupla marcação (Ann+/IP+). A maior proporção de morte celular por apoptose tardia (marcação dupla), quando utilizado ALA por 4h de incubação, também foi observada por outros

trabalhos, como o de Benito-Miguel; Dolores-Blanco; Gomez (2015), no qual, após TFD com 75 μM de ALA, incubado por 4h e irradiado por LED 640 nm (40mW/cm²; Fluência não informada), observou por microscopia de fluorescência, um maior número de células marcadas duplamente à células com marcações isoladas.

A apoptose tardia, também conhecida como necrose secundária, ocorre quando células em apoptose possuem uma alteração na permeabilidade da membrana plasmática. A morte por apoptose (seja precoce ou tardia) é interessante como resposta à TFD, uma vez em que esse tipo de morte leva a uma ação controlada do sistema imunológico por meio da exposição de padrões moleculares associados a células apoptóticas (ACAMPs), para mediar sua captação por fagócitos. Ao mesmo tempo, devido a alteração na membrana, células em apoptose tardia podem liberar Alarminas, que são capazes de alertar o sistema imunológico quanto à danos teciduais, estimulando o recrutamento de células leucocitárias (POON; HULETT; PARISH, 2010; SILVA, 2010).

Na análise realizada 18h após ALA-TFD, houve redução das células em apoptose tardia e um aumento da taxa de morte por necrose. É conhecido que o tempo de análise influencia no tipo de morte encontrada, o que justifica a diferença entre os dos tempos avaliados (CAO *et al.*, 2009; WEI *et al.*, 2010).

Por muito tempo, acreditou-se que a morte por necrose fosse uma morte ocorrida de maneira desordenada, porém novos estudos demonstraram, que a necrose é um tipo de morte controlada por proteínas como RIP1 (Proteína de Interação com Receptor 1) e RIP3 (Proteína de Interação com Receptor 3) (COUPIENNE *et al.*, 2011; GALLUZZI *et al.*, 2018). Coupienne e colaboradores (2011) observaram que a ALA-TFD leva a uma maior taxa de morte por necrose em células de glioblastomas, descrevendo que a taxa de oxigênio singleto produzida é o estímulo primário para a necrose e a ativação de RIP3.

Assim como para o ALA, o tipo de morte celular prevalente nas clorinas é dependente do tempo de análise, porém assim como o ALA, houve uma predominância de apoptose tardia e necrose. O Fotoenticine, em uma análise imediata, assim como o ALA, apresentou maior taxa de células em apoptose tardia e, após 18h da terapia, houve um aumento das células necróticas. Além disso, foi possível observar que o processo de morte celular acarretada pela FTC-TFD nas células tumorais é contínua, ou seja, mesmo após o tratamento, há células que sofrem

algum tipo de estresse, mesmo em ausência de luz desencadeada pela irradiação uma vez em que é observada uma taxa de aproximadamente 15% de células viáveis na análise imediata e após 18h, essa taxa se reduz próximo à 0%.

O PDZ por sua vez, em análise imediatamente após a TFD, apresentou maior taxa de necrose e após 18h, é visto maior taxa de apoptose tardia. Prevalência da ocorrência de necrose com o PDZ também foi visualizada *in vivo* por Grecco (2013) que, dentre seus estudos, analisou o perfil de morte celular induzida em fígado sadio de ratos da linhagem Wistar, utilizando-se 1 mg/Kg de PDZ incubado por 30 min, irradiado por meio de laser de diodo 660 nm (102 mW/cm²; 150 J/cm²), no qual foi observado alto dano celular, com prevalência de regiões necróticas.

A morte celular ocasionada por necrose leva a um processo inflamatório na região que é considerado importante para a estimulação do sistema imunológico e com isso uma eliminação mais rápida do tumor. Entretanto, em regiões cerebrais, o processo inflamatório exacerbado pode ocasionar edema da região, agravando o quadro clínico (ABRAHAMSE; HAMBLIM, 2016).

Apesar da predominância de necrose e apoptose tardia pelas clorinas, Ono e colaboradores (2018) apontam a presença do PDZ em mitocôndrias, geralmente associada ao processo de apoptose, além disso Silva e colaboradores (2014) observaram o aumento de genes pró apoptóticos em tumores de mama de ratas tratadas com PDZ na concentração de 8 mg/Kg, irradiado por laser de diodo 670 nm (100 mW/cm; 100 J/cm). Levando-se em consideração os resultados obtidos e a literatura, pode-se inferir que o mecanismo de morte celular é dependente do protocolo utilizado. Além disso, como visto por Galluzzi e colaboradores (2018), muitos mecanismos de morte podem ser observados, além de apoptose e a necrose, como autofagia, aumento da Permeabilidade de Membrana Mitocondrial, Necroptose, morte celular NETotica.

É descrito na literatura que o tipo de morte celular é dependente da quantidade de FS utilizado, do local afetado, da quantidade e do tipo de espécies reativas de oxigênio formadas, de modo que um mesmo FS, em condições diferentes, como por exemplo, quanto à disponibilidade de oxigênio molecular, pode levar à morte por necrose em condições normais ou apoptose em casos de hipóxia (BENOV, 2014).

Yamamoto e colaboradores (2006) realizaram um estudo com células da linhagem 9L/lacZ, utilizando o ALA na dose de 50 µmol/L, utilizando fluências (8 J/cm²,

16 J/cm² e 24 J/cm²), no qual observaram que o tipo de morte celular varia de acordo com a fluência utilizada e o momento em que é realizada a avaliação. Com uma avaliação de 3h após a TFD nas doses de 8 e 16 J/cm² há baixa ocorrência de apoptose inicial, o mesmo visualizado para a dose de 10 J/cm², em análise imediatamente após. Na dose de 24 J/cm², observou que há um aumento na quantificação de morte celular por necrose.

Em análise após 8h e 24h, Yamamoto e colaboradores (2006) observaram que há sempre diminuição da ocorrência de apoptose inicial, independente da dose utilizada, corroborando mais uma vez com o encontrado em nosso estudo. Essa diferença de resposta encontrada com a mudança de parâmetros, também foi observada com o uso das clorinas, por esse motivo são necessários estudos quanto à seletividade das clorinas ao tumor, em especial o Fotoentice, além de análise da resposta *in vivo*.

O dano celular pós TFD, depende, entre outros fatores, da capacidade de formação de ERO's a partir da combinação FS-Irradiação (BENOV, 2014; BENITO-MIGUEL; DOLORES-BLANCO; GÓMEZ, 2015). Os grupos controle dos 3 compostos demonstraram uma baixa taxa de ERO's, visualizada pela produção natural do organismo (ANAZETTI; MELLO, 2007; ONO; KURACHI, 2016), essa taxa não é citotóxica, como visualizado por meio dos testes de viabilidade.

O organismo apresenta defesas contra a produção natural de ERO's, porém quando há o aumento abrupto dessas espécies, acima da capacidade de tamponamento celular e em quantidade superior àquela suportada pelas enzimas responsáveis pelo controle dessas moléculas, leva ao estresse oxidativo citotóxico. O tempo de vida e o tipo de ERO's formados levam a danos em organelas diferentes, bem como alteração no mecanismo de morte celular que atuará nas células (ANAZETTI; MELLO, 2007; GRECCO, 2013 ABRAHAMSE; HAMBLIM, 2016). Todos os FSs testados, demonstram que, após irradiação, a quantidade de ERO's produzida é suficiente para que haja redução da viabilidade celular.

A alta taxa de produção de ERO's observada com o uso das clorinas, foi refletida nos testes citotóxicos, de modo que a taxa de morte celular pós TFD foi superior àquela encontrada com o uso da ALA-TFD.

Bernal e colaboradores (2015) estudaram diferentes FS, dentre eles o Photogem e o PDZ, demonstrando que a clorina é um composto mais lipossolúvel,

característica importante para a penetração do FS através da membrana fosfolipídica da célula. Além disso, demonstrou também que o PDZ possui uma maior eficiência de foto-oxidação comparado ao PG.

Levando-se em consideração o nível de intensidade de fluorescência obtido com o uso do ALA e de ambas as clorinas, é possível perceber que há uma maior produção de ERO's por parte das clorinas. As clorinas tendem a se degradar mais rapidamente após a irradiação, do que as porfirinas (PpIX por exemplo), o que leva a uma alta taxa de reação e, por consequência, maior formação de ERO's (GRECCO, 2013; CHANG *et al.*, 2018).

Foi possível observar ainda que a taxa de produção de ERO's na ALA-TFD é dependente do tempo de análise, visualizando maior formação dessas espécies no tempo de 8h. Porém, ao se analisar os testes de viabilidade, não há grandes diferenças na resposta de morte celular apresentada após o tratamento. Além da quantidade de EROs, o tipo de reação (tipo I ou II) e consequentemente os tipos EROs formados, influenciam na morte celular, bem como no tipo de morte celular predominante (BAPTISTA *et al.*, 2017).

Uma das características importantes para a um FS ideal é a capacidade de gerar oxigênio singleto. O PDZ já foi estudado em comparação às porfirinas, se demonstrando um FS com maior potencial à TFD (BERNAL *et al.*, 2015). Entretanto a comparação entre as duas clorinas utilizadas, analisando o rendimento quântico é importante para a melhora dos fármacos utilizados. Para isso foi calculada a eficiência das partículas em gerar 1O_2 utilizando-se como base o rendimento quântico do azul de metileno em acetoneitrila, quando exposta a um comprimento de onda 660 nm (0,50) (TADA *et al.*, 2010).

Foi realizada a análise de formação de oxigênio singleto pelas clorinas quando irradiada, fornecendo uma estimativa do rendimento quântico de cada uma. O teste foi realizado por meio da nanosonda de difenilisobenzofurano. Essa sonda é consumida quando em presença de oxigênio singleto, permitindo uma análise indireta da formação de 1O_2 . O consumo da sonda é observado pela diminuição do pico de absorção em 410 nm.

Ambas clorinas apresentam uma banda de Soret (banda de maior energia) na região de 410 nm, por esse motivo, é possível observar que a adição da sonda leva a um aumento da banda em 410 nm e que após um determinado tempo de irradiação,

tem-se uma estabilização dessa região, atribuída então à banda de solet da própria clorina (SRDANOVIC *et al.*, 2018).

Foi observado um decaimento em 410 nm mais rápido, quando utilizado o PDZ (consumo após 9 s de irradiação), já o FTC levou um tempo maior para estabilização da região 410 nm (19 s). Por meio da curva de decaimento de cada clorina, foi possível estabelecer o rendimento quântico por partícula segundo cálculo proposto por Spiller e colaboradores (1997), chegando-se aos valores de 0,27 para o PDZ e 0,13 para o FTC, demonstrando melhor rendimento quântico por parte da clorina russa (PDZ).

O maior rendimento quântico por parte do PDZ reflete em melhor desempenho nos testes de viabilidade. Por ser uma molécula altamente energética e instável, o tempo de vida do $^1\text{O}_2$ é muito curto (aproximadamente 5 μs a 65 μs , dependendo do solvente utilizado), levando a danos em regiões próximas ao seu local de formação, bem como danos imediatos (MOAN; BERG, 1991; TADA *et al.*, 2010). Essa característica foi visualizada também, por meio da análise por Anexina e Iodeto de Propídeo, que demonstrou que imediatamente após a TFD, há uma redução completa da viabilidade celular. Porém mesmo com os efeitos mais agressivos à linhagem tumoral, os testes com a linhagem de fibroblasto, demonstraram que o PDZ não leva a uma redução completa da viabilidade mesmo em sua maior concentração, demonstrando mais uma vez o potencial do fármaco como mais seletivo.

Apesar do menor rendimento quântico de $^1\text{O}_2$ pelo FTC, a medida de ERO's intracelular, é aparentemente superior (pela maior fluorescência demonstrada) do que a quantidade de ERO's produzida pelo PDZ. Isso pode ser atribuído a maior geração de espécies reativas de oxigênio como superóxido, óxido nítrico ou radicais livres oxigenados que apresentam maior tempo de vida (BENOV, 2014), o que condiz com o visualizado pelo teste com Anexina e Iodeto, que demonstra maior taxa de morte celular após 18h da TFD em comparação ao teste realizado imediatamente após o tratamento.

Apesar das características físicoquímicas e a capacidade de danos a célula tumoral, serem essenciais ao sucesso da TFD, ao se pensar na aplicação clínica da terapia, é importante que algumas características extras sejam pensadas, como a capacidade da molécula em ser carregada pelo sangue, sua capacidade de bioacumulação e o tempo de acúmulo do fármaco no tumor (CASTANO; DEMINOVA; HAMBLIN, 2004; ALISSON; SIBATA, 2010; BERNAL *et al.*, 2015).

Para o ALA, é bem estabelecido na literatura, que a administração oral ou intravenosa, são eficazes para a entrega do fármaco na região tumoral (CASAS *et al.*, 2009; AGOSTINIS *et al.*, 2011; COZZENS *et al.*, 2016). Entretanto a via de administração das clorinas, por não serem fármacos, clinicamente utilizados com frequência quando comparada aos derivados de hematoporfirina, não apresentam uma via de administração preferencial, sendo apresentada a via intraperitoneal em artigos envolvendo estudo animal (SILVA *et al.*, 2014; BHATTACHARJEE *et al.*, 2018).

Por se demonstrar a melhor clorina nos testes *in vitro* e apresentar melhor rendimento quântico, foi selecionado o PDZ para avaliação das vias de administração das clorinas, bem como do tempo de incubação, por meio da captação da fluorescência *in vivo* em ratos da linhagem Fischer, com tumores xenográficos induzidos via subcutânea por células 9L/lacZ. Foram utilizadas as vias intraperitoneal, intravenosa e intratumoral.

Segundo descrito por Allison e Sibata (2010), um FS clinicamente interessante, deve ser facilmente transportado em uma solução estável, que possa ser administrado sistemicamente, bem como localmente e que se acumule preferencialmente no tumor. Por meio do IVIS Spectrum, foi possível observar que independente da via de administração, há acúmulo do fármaco pelo tecido tumoral nos tempos estabelecidos, demonstrando que o PDZ é um fármaco de fácil distribuição pelo corpo, podendo ser utilizado sistemicamente ou localmente, sendo aplicado diretamente no tumor, não necessitando de carreadores, que tornam a molécula mais complexa e elevam os custos do fármaco (ALLISON; SIBATA, 2010; BARBUGLI, 2010)

A via intraperitoneal facilita a administração de fármacos para estudos em animais, o que nos permite inferir que estudos utilizando essa via de administração podem ser extrapolados para o uso clínico, quando se utiliza a via intravenosa, uma vez que ambas as vias foram eficazes na entrega do fármaco. A via intratumoral é importante para o tratamento local, imaginando-se uma possível aplicação pós remoção cirúrgica, na qual a TFD seria realizada no leito cirúrgico. Desse modo, o PDZ se apresenta como um fármaco de fácil distribuição e com acúmulo tumoral, mesmo sem o uso de encapsulamento com carreadores específicos.

Outra característica importante para o FS no tratamento clínico, é a rápida entrega do fármaco ao tumor, por isso foi observada a fluorescência nos tumores nos

períodos de 1h, 2h, 3h e 4h, demonstrando a presença do FS já com 1h de incubação. Ao longo dos períodos 2h, 3h e 4h, o fármaco se manteve retido no tumor, demonstrando um pequeno aumento no período de 3h de incubação. Geralmente, em estudos clínicos, o tempo médio de incubação após aplicação do fármaco é de 3h (CALZAVARA-PINTON; SALA, 2006; CASAS *et al.*, 2009; ALLISON; SIBATA, 2010), o que indica que o PDZ apresenta um tempo viável para acúmulo no tumor.

O tumor apresenta uma região necrótica no centro, o que dificulta a entrega do FS por todo o tumor, limitando-o às bordas do tumor. Isso é observado por diferentes tratamentos como a quimioterapia, que apresentam maior dificuldade em chegar até o local do tumor. O FS por sua vez, apresenta a vantagem de promover danos às células tumorais ao redor e aos vasos sanguíneos do tumor, viabilizando o tratamento (DEBEFVE, 2007; SILVA *et al.*, 2014).

Pensando no tratamento de tumores cerebrais, é importante que o fármaco tenha a capacidade de ultrapassar a barreira hematoencefálica. A BHE foi percebida pela primeira vez por Paul Ehrlich em 1885, quando ao injetar um corante por via intravenosa, percebeu que esse não chegava ao cérebro. Com o tempo, descobriu-se que há uma camada de proteção da região cerebral formada por células endoteliais, células perivasculares, células musculares, perícitos, micróglias e astrócitos. Essa barreira formada por diferentes células impede que substâncias nocivas cheguem com facilidade ao SNC (ALYAUDIN *et al.*, 2014; AZEVEDO; MOREIRA-FILHO, 2015).

Apesar de importante para proteção do SNC, a BHE pode ser um empecilho para que fármacos importantes no tratamento dessa região possam chegar até o alvo, como é o caso de alguns fármacos quimioterápicos (VAN DEN BENT, 2003; AZEVEDO; MOREIRA-FILHO, 2015). Em vista disso, é importante que o FS tenha a capacidade de ultrapassar a BHE. Por meio do IVIS Spectrum, foi visualizado nos tempos de 1h, 2h, 3h e 4h, a captação do PDZ pela região encefálica em animais com tumor xenográfico e em animal sem tumor. A via de administração foi sistêmica por via intraperitoneal, pela facilidade de aplicação e a dispensa de anestesia geral do animal.

Foi observado que, tanto no animal com tumor, quanto no animal sem tumor, a presença do FS na região do encéfalo, demonstrando que o fármaco é distribuído, naturalmente à região cranial do animal. Além disso, foi observado um aumento de fluorescência após 3h de incubação para ambos os animais, o que mostra que esse

é um período ideal para o acúmulo do FS no local de interesse. Quando comparados, o animal com tumor xenográfico apresentou menor fluorescência cranial, o que pode ser atribuído à competição do tumor pelo FS. Ou seja, o PDZ é um fármaco que naturalmente é direcionado à região tumoral e à região do encéfalo.

Infelizmente, a metodologia do IVIS não é capaz de indicar se o fármaco se encontrada no interior do SNC ou se encontra-se ao redor da BHE, trazendo a necessidade de novos estudos para que essa resposta seja dada.

O PDZ apresentou-se, de um modo geral, como um fármaco de interesse clínico para o tratamento de tumores cerebrais. Entretanto, é importante colocar que o FTC, apesar de apresentar resultados que demonstram um desempenho abaixo do PDZ, é uma clorina com características *in vitro*, interessantes para que sejam realizados testes *in vivo* e posteriormente clínicos, sendo ambas as clorinas, fármacos de interesse, que poderiam vir a substituir o padrão conhecido ao tratamento (ALA).

6 CONCLUSÃO

Foi possível analisar a eficácia da TFD utilizando-se como FSs duas clorinas e o ALA, por meio da viabilidade celular, demonstrando que a linhagem de gliossarcoma 9L/lacZ é susceptível ao tratamento, bem como o uso de clorinas se apresenta como potencial ao uso na TFD por se mostrar mais eficaz que o padrão utilizado em estudos *in vivo* (ALA).

Além disso, as clorinas apresentaram-se mais citotóxicas à linhagem de fibroblastos quando em maior concentração, porém, não apresentaram citotoxicidade em menor concentração. O PDZ se mostrou um FS mais eficaz à linhagem 9L/lacZ (gliossarcoma), com menor porcentagem de morte da linhagem L929 (fibroblastos), diferente o FTC, que apresentou uma taxa de morte superior na linhagem L929.

As clorinas se apresentaram eficazes independente da concentração utilizada, já o ALA demonstrou que concentrações muito baixas não são eficazes, bem como concentrações muito altas. Com base nisso, foi preconizado que a concentração mínima eficaz nesse estudo, foi a de 125 µg/mL. O ALA se mostrou, também, dependente de um período mínimo de 4h para demonstrar uma redução eficaz das células cancerígenas.

Por meio da microscopia confocal de fluorescência, a produção de PpIX foi mais ativa no tempo de 4h, 6h e 8h, com baixa presença nos tempos de 1h e 2h, e com aparente depuração no tempo de 8h. Padrão esse, que foi reproduzido por meio da quantificação por fluorescência.

Para as clorinas, no tempo de análise de 1h, já foi possível se observar a presença do FS, que se encontra disperso por todo o citoplasma, porém não ligado ao material genético.

Todos os compostos testados apresentaram uma predominância de morte celular por necrose ou apoptose tardia, nos parâmetros utilizados. Além disso, as clorinas demonstraram maior produção de espécies reativas de oxigênio, mostrando uma relação entre a taxa de morte e o aumento da produção de EROs, porém, como observado pelos resultados do ALA, uma análise do tipo de espécie reativa formada, também pode ter influência.

O PDZ apresentou maior rendimento quântico quando comparado ao FTC, demonstrando uma maior produção de oxigênio singlete. Condizendo com a morte

celular imediata após a TFD. Porém o FTC apresentou maior produção de ERO's, portanto, uma avaliação da formação de superóxido e radicais livres oxigenados, bem como outros tipos de Espécies Reativas, podem explicar esse comportamento, bem como o processo mais lento da redução de viabilidade após a TFD.

Tabela 3 - Resultados gerais obtidos pelos testes in vitro

	ALA	FTC	PDZ
Tempo de incubação	4h	1h	1h
Redução Viabilidade pós-TFD na maior concentração eficaz (9L/lacZ)	88,6%	97,5%	100%
Redução Viabilidade pós-TFD na menor concentração eficaz (9L/lacZ)	91,7%	74,8%	100%
Redução da atividade mitocondrial pós-TFD na maior concentração	76%	85%	85%
Redução da atividade mitocondrial pós-TFD na menor concentração	70%	72%	88%
Redução Viabilidade pós-TFD na maior concentração eficaz (L929)	-	99,6%	98,9%
Redução Viabilidade pós-TFD na menor concentração eficaz (L929)	-	99,2%	92,2%
Microscopia confocal	Produção de PplX crescente com tempo de incubação	Internalização com 1h, sem presença no núcleo	Internalização com 1h, sem presença no núcleo
Avaliação da morte celular imediata	31,5% apoptose tardia	53,9% apoptose tardia	67,8% necrose
Avaliação da morte celular 18h	39% necrose	87% necrose	76% apoptose tardia
ERO's	Proporcional ao tempo de incubação	Proporcional a concentração	Proporcional a concentração
Rendimento quântico de formação de 1O_2	-	0,13	0,27

Fonte: autor

Pelos melhores resultados com o PDZ, esse fármaco foi avaliado *in vivo*, demonstrando que é um fármaco de fácil entrega ao tumor, independente da via de

administração. Além disso, demonstrou que o PDZ é capaz de chegar até a região do encéfalo.

De modo geral, novos estudos com a localização dos fármacos no interior da célula, são necessários visando o melhoramento da TFD, bem como testes *in vivo*, para análise do comportamento desses fármacos em ambiente tecidual/sistêmico.

REFERENCIAS

- ABRAHAMSE, H.; HAMBLIN, M. R. New photosensitizers for photodynamic therapy. **Biochemical Journal**, v. 473, n. 4, p. 347-364, 2016.
- ABRAHAMSE, H. *et al.* Nanoparticles for advanced photodynamic therapy of cancer. **Photomedicine and laser surgery**, v. 35, n. 11, p. 581-588, 2017.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. **Medicamentos Anvisa**, 2019. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/medicamentos>. Acesso em: 15 jan. 2020.
- AGOSTINIS, P. *et al.* Photodynamic Therapy of cancer: an update. **CA Cancer J Clin.**, v. 61, n. 4, p. 250–281, 2011.
- AKIMOTO, J. Photodynamic Therapy for Malignant Brain Tumors. **Neurologia medico-chirurgica**, v. 56, n. 4, p. 151–157, 2016.
- ALBERT, I.; HEFTI, M.; LUGINBUEHL, V. Physiological oxygen concentration alters glioma cell malignancy and responsiveness to photodynamic therapy *in vitro*. **Neurological Research**, v. 36, n. 11, p. 1001–1010, 2014.
- ALLISON, R. R. *et al.* Bio-nanotechnology and photodynamic therapy—State of the art review. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, v. 5, n. 1, p. 19-28, 2008.
- ALLISON, R. R.; SIBATA, C. H. Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: A clinical review. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 7, n. 2, p. 61–75, 2010.
- ALMEIDA, R. *et al.* Potencial do efeito da terapia fotodinâmica com Fotoentice em células de gliossarcoma 9L/lacZ. *In: XXIII ENCONTRO LATINO AMERICANO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA*, 23., 2019. **Anais...**, São José dos Campos: Univap, 2019.
- ALYAUDDIN, R. *et al.* Nanoscale drug delivery systems and the blood-brain barrier. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, n. 1, p. 795–811, 2014.
- ANAZETTI, M. C.; MELO, P. S. Morte Celular por Apoptose: uma visão bioquímica e molecular. **Metrocamp Pesquisa**, v. 1, n. 1, p. 37-58. 2007.
- ANDRADE, L. R. *et al.* In vitro assessment of anti-tumorigenic mechanisms and efficacy of NanoALA, a nanoformulation of aminolevulinic acid designed for photodynamic therapy of cancer. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, v. 20, p. 62-70, 2017.
- ARANY, P. R. Photobiomodulation: poised from the fringes. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 30, n. 9, 2012.

ARYAL, M. *et al.* Multiple treatments with liposomal doxorubicin and ultrasound-induced disruption of blood-tumor and blood-brain barriers improve outcomes in a rat glioma model. **Journal of Controlled Release**, v. 169, n. 1–2, p. 103–111, 2013.

ATIF, M. *et al.* Cytotoxic and photocytotoxic effect of Photofrin® on human laryngeal carcinoma (Hep2c) cell line. **Laser Physics**, v. 21, n. 7, p. 1235–1242, 2011.

AZAMI, M. A. *et al.* Gliosarcome cérébral primitif: à propos de deux cas et revue de la littérature. **Pan African Medical Journal**, v. 27, p. 1–6, 2017.

AZEVEDO, F. A. C. *et al.* Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. **Journal of Comparative Neurology**, v. 513, n. 5, p. 532–541, 2009.

AZEVEDO, H. F. Z. **Sinalização mediada pela angiotensina II em um modelo de Glioblastoma Multiforme**: uso da genômica funcional na identificação do papel dos receptores AT1 e AT2. 93 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

AZEVEDO, H.; MOREIRA-FILHO, C. A. Topological robustness analysis of protein interaction networks reveals key targets for overcoming chemotherapy resistance in glioma. **Scientific reports**, v. 5, p. 16830, 2015.

BAE, S. *et al.* Photodynamic Effects of Radachlorin on Cervical Cancer Cells. **Cancer Res Treat.**, v. 36, n. 6, p. 389–394, 2004.

BAGNATO, V. S. *et al.* New photonic technologies for the treatment and diagnosis of hepatic diseases: an overview of the experimental work performed in collaboration, between Physics Institute of São Carlos and Ribeirão Preto Faculty of Medicine of the University of São Paulo. **Acta cirurgica brasileira**, v. 21, n. Suppl. 1, p. 3–11, 2006.

BALDAWA, S. *et al.* Primary intraventricular gliosarcoma. **Clinical Neuropathology**, v. 32, n. 6, p. 525–528, 2013.

BAPTISTA, Maurício S. *et al.* Type I and type II photosensitized oxidation reactions: guidelines and mechanistic pathways. **Photochemistry and photobiology**, v. 93, n. 4, p. 912–919, 2017.

BARBOSA, L. F.; DE MEDEIROS, M. H. G.; AUGUSTO, O. Danos oxidativos e neurodegeneração: O que aprendemos com animais transgênicos e nocautes? **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1352–1360, 2006.

BARBUGLI, P. A. **Estudo dos efeitos da terapia fotodinâmica na progressão tumoral e em modelos celulares tridimensionais**. 2010. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

BARONE, D. G.; LAWRIE, T. A.; HART, M. G. Image guided surgery for the resection of brain tumours. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 1, 2014.

BEAR, M. F.; CONNORS, B. W.; PARADISO, M. A. **Neurociências: desvendando o sistema nervoso**. 4. ed. São Paulo: Artmed Editora, 2007.

BECH, Ø.; BERG, K.; MOAN, J. The pH dependency of protoporphyrin IX formation in cells incubated with 5-aminolevulinic acid. **Cancer letters**, v. 113, n. 1-2, p. 25-29, 1997.

BECHET, D. *et al.* Innovations of photodynamic therapy for brain tumors: potential of multifunctional nanoparticles. **J Carcinogene Mutagene S**, n. 8, 2012.

BECHET, D. Photodynamic therapy of malignant brain tumours: A complementary approach to conventional therapies. **Cancer Treatment Reviews**, v. 40, n. 2, p. 229241, 2014.

BENITO-MIGUEL, M.; DOLORES-BLANCO, M.; GÓMEZ, C. nanoparticles and ALA-photodynamic therapy on HeLa cell line. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 12, n. 3, p. 466–475, 2015.

BENOV, L. Photodynamic therapy: Current status and future directions. **Medical Principles and Practice**, v. 24, p. 14–28, 2014.

BERNAL, C. **Hipericina, photodithazine e photogemum estudo comparativo da atividade fotodinâmica**, 2011, 157f. Tese (mestrado em Química) – Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

BERNAL, C. *et al.* Photodynamic efficiency of hypericin compared with chlorin and hematoporphyrin derivatives in HEp-2 and Vero epithelial cell lines. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 12, n. 2, p. 176–185, 2015.

BHATTACHARJEE, T. *et al.* In vivo Raman spectroscopy of breast tumors prephotodynamic and postphotodynamic therapy. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 49, n. 5, p. 786-791, 2018.

BORGES, R. A. O. **Avaliação da produção de citocinas em camundongos submetidos à terapia fotodinâmica**. 2008. 56f. Dissertação (Mestrado) - Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, 2008.

BRAUCHLE, E. *et al.* Cell death stages in single apoptotic and necrotic cells monitored by Raman microspectroscopy. **Scientific reports**, n. 4, 2014.

BRIEL-PUMP, A. *et al.* Accumulation of protoporphyrin IX in medulloblastoma cell lines and sensitivity to subsequent photodynamic treatment. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, n. 189, p. 298-305, 2018.

BUZZÁ, H. H. *et al.* Evaluation of vascular effect of Photodynamic Therapy in chorioallantoic membrane using different photosensitizers. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: biology**, n. 138, p. 1-7, 2014.

CALZAVARA-PINTON, P. G.; VENTURINI, M.; SALA, R. Photodynamic therapy: update 2006 Part 1: Photochemistry and photobiology. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 21, n. 3, p. 293-302, 2007.

CAO, X. *et al.* Surfactin induces apoptosis and G 2/M arrest in human breast cancer MCF-7 cells through cell cycle factor regulation. **Cell biochemistry and biophysics**, v. 55, n. 3, p. 163, 2009.

CAPELLA, M. A. M.; CAPELLA, L. S. A light in multidrug resistance: Photodynamic treatment of multidrug-resistant tumors. **Journal of Biomedical Science**, v. 10, n. 4, p. 361–366, 2003.

CARMELLO, J. C. *et al.* In vivo evaluation of photodynamic inactivation using Photodithazine® against *Candida albicans*. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 14, n. 7, p. 1319–1328, 2015.

CASAS, A. *et al.* Sustained and efficient porphyrin generation in vivo using dendrimer conjugates of 5-ALA for photodynamic therapy. **Journal of Controlled Release**, v. 135, n. 2, p. 136-143, 2009.

CASTANO, A. P.; DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: Part one - Photosensitizers, photochemistry and cellular localization. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 1, n. 4, p. 279–293, 2004.

CERIZE, N. N. P. **Estudo de sistemas nanocarreadores para o ácido 5-aminolevulínico com aplicação na terapia fotodinâmica**. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

CHANG, J. E. *et al.* Tumor Size-Dependent Anticancer Efficacy of Chlorin Derivatives for Photodynamic Therapy. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 6, p. 1596, 2018.

CHAVES, M. E. A. *et al.* Effects of low-power light therapy on wound healing: LASER x LED. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 89, n. 4, p. 616-623, 2014.

CHEN, J. Y. *et al.* The Binding Characteristics and Intracellular Localization of Temoporfin (mTHPC) in Myeloid Leukemia Cells: Phototoxicity and Mitochondrial Damage. **Photochem Photobiol.**, v. 72, n. 4, p. 541–547, 2000.

CHEUNG J. C. C. **El Triptófano como sonda luminiscente intrínseca: caracterización del enlace seralbumina bovina-antibiótico**. 53f. Dissertação (Mestrado) - Universidad de Oviedo, 2014.

CHUNG, I. W. H.; ELJAMEL, S. Risk factors for developing oral 5-aminolevulinic acid-induced side effects in patients undergoing fluorescence guided resection. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, v. 10, n. 4, p. 362-367, 2013.

CLARA, C. A. **Estudo das expressões imunoistoquímicas dos marcadores HIF-1 α , VEGF e PDGF-C correlacionados com a angiogênese e o prognóstico em**

glioblastomas. 2011. 147f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

CORNELIUS, J. F. *et al.* Enhancing the effect of 5-aminolevulinic acid based photodynamic therapy in human meningioma cells. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, v. 11, n. 1, p. 1-6, 2014.

COUPIENNE, I. *et al.* 5-ALA-PDT induces RIP3-dependent necrosis in glioblastoma. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 10, n. 12, p. 1868-1878, 2011.

COZZENS, J. W. *et al.* A phase 1 dose-escalation study of oral 5-aminolevulinic acid in adult patients undergoing resection of a newly diagnosed or recurrent high-grade glioma. **Neurosurgery**, v. 81, n. 1, p. 46-55, 2016.

DAMODARAN, O. *et al.* Clinical management and survival outcomes of gliosarcomas in the era of multimodality therapy. **Journal of Clinical Neuroscience**, v. 21, n. 3, p. 478–481, 2014.

DARLENSKI, R.; FLUHR J. W. Photodynamic therapy in dermatology: past, present, and future. *Journal of biomedical optics*, v. 18, n. 6, p. 061208-061208, 2013.

DAWAR, R. *et al.* Secondary gliosarcoma with extra-cranial metastases: A report and review of the literature. **Clinical Neurology and Neurosurgery**, v. 115, n. 4, p. 375–380, 2013.

DEBEFVE, E. Characterization and therapeutic exploitation of the vascular permeability induced by photodynamic therapy. **EPFL**, 2007.

DOLMANS, D. E. J. G. J.; FUKUMURA, D.; JAIN, R. K. Photodynamic therapy for cancer. **Nature reviews cancer**, v. 3, n. 5, p. 380-387, 2003.

DUTRA, F.; BECHARA, E. J. H. Bioquímica e ação citotóxica de α -aminocetonas endógenas. **Quim. Nova**, v. 28, n. 3, p. 483-491, 2005.

ELJAMEL, M. S. Brain PDD and PDT unlocking the mystery of malignant gliomas. **Photodiagnosis and Photodynamic therapy**, v. 1, n. 4, p. 303-310, 2004.

ELJAMEL, S. Photodynamic applications in brain tumors: a comprehensive review of the literature. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, v. 7, n. 2, p. 76-85, 2010.

EL-KHATIB, M. *et al.* Aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy of human meningioma: an in vitro study on primary cell lines. **International journal of molecular sciences**, v. 16, n. 5, p. 9936-9948, 2015.

ETMINAN, N. *et al.* Heat-shock protein 70-dependent dendritic cell activation by 5aminolevulinic acid-mediated photodynamic treatment of human glioblastoma spheroids in vitro. **British Journal of Cancer**, v. 105, n. 7, p. 961–969, 2011.

FELÍCIO, L. B. A. *et al.* A terapia fotodinâmica com ácido 5-aminolevulínico como modalidade de tratamento para neoplasias cutâneas não-melanoma. **An. bras. Dermatol.**, v. 83, n. 4, p. 309-316, 2008.

FENG, X. *et al.* Glycolytic inhibitors 2-deoxyglucose and 3-bromopyruvate synergize with photodynamic therapy respectively to inhibit cell migration. **Journal of bioenergetics and biomembranes**, v. 47, n. 3, p. 189-197, 2015.

FERREIRA, J. **Análise da necrose em tecidos normais fotossensibilizados pós Terapia Fotodinâmica, estudo in vivo.** 2003. 104f. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

FERREIRA, J. **Estudo e correlação de diferentes HpD's e clorinas no processo de terapia fotodinâmica.** Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

FONTANA, L. C. *et al.* Photodithazine photodynamic effect on viability of 9L/lacZ gliosarcoma cell line. **Lasers in medical science**, v. 32, n. 6, p. 1245-1252, 2017.

FRANSEN, J. *et al.* Patterns of care and outcomes in gliosarcoma: an analysis of the National Cancer Database. **AANS J Neurosurg**, p. 1–6, 2017.

GALLUZZI, L. *et al.* Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. **Cell Death & Differentiation**, v. 25, n. 3, p. 486-541, 2018.

GAVRINA, A. I. *et al.* Photodynamic therapy of mouse tumor model using chlorin e6-polyvinyl alcohol complex. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 178, p. 614-622, 2018.

GHEEWALA, T.; SKWOR, T.; MUNIRATHINAM, G. Photosensitizers in prostate cancer therapy. **Oncotarget**, v. 8, n. 18, p. 30524–30538, 2017.

GIROTTI, A. W. Nitric Oxide-Mediated Resistance to Anti-Tumor Photodynamic Therapy. **Photochemistry and photobiology**, v. 96, n. 3, p. 500-505 2019.

GRECCO, C. **Estudo comparativo da terapia fotodinâmica utilizando laser CW e de femtossegundos em diferentes intensidades e comprimentos de onda.** Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

GRECCO, C. *et al.* Comparison of two photosensitizers in photodynamic therapy using light pulses in femtosecond regime: an animal study. *In: OPTICAL METHODS FOR TUMOR TREATMENT AND DETECTION: MECHANISMS AND TECHNIQUES IN PHOTODYNAMIC THERAPY*, 25., 2016. **Proceedings...** San Francisco, 2016.

GRYKO, L. *et al.* Semiconductor lasers vs LEDs in diagnostic and therapeutic medicine. *In: XIth Symposium on Laser Technology.* **International Society for Optics and Photonics**, p. 101590I-101590I-19. 2016.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

HADIZADEH, M; FATEH, M. Synergistic Cytotoxic Effect of Gold Nanoparticles and 5Aminolevulinic Acid-Mediated Photodynamic Therapy against Skin Cancer Cells. **Iran J Med Sci.**, v. 39, n. 5, p. 452-458, 2014.

HEFTI, M. *et al.* Susceptibility to 5-Aminolevulinic acid based photodynamic therapy in WHO i meningioma cells corresponds to ferrochelatase activity. **Photochemistry and Photobiology**, v. 87, n. 1, p. 235–241, 2011.

HERRMANN, K. *et al.* Photodynamic characterization and optimization using multifunctional nanoparticles for brain cancer treatment. **SPIE BIOS**, p. 85680I-85680I-8, 2013.

HOU, H. *et al.* Skeletal muscle and glioma oxygenation by carbogen inhalation in rats: a longitudinal study by EPR oximetry using single-probe implantable oxygen sensors. **Adv Exp Med Biol.**, n. 812, p. 97-103, 2014.

HUANG, H. F.; CHEN, Y. Z.; WU, Y. ZnPcS2P2-based photodynamic therapy induces mitochondria-dependent apoptosis in K562 cells. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 37, n. 7, p. 488–494, 2005.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER – INCA. **Tumores Cerebrais**. 2018. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-do-sistema-nervoso-central>. Acesso em: 10 set. 2019.

ISSA, M. C. A.; BOECHAT, M.; FASSINI, A. C. Photodynamic therapy in Brazil: 10 years of history. **Surgical & Cosmetic Dermatology**, p. 17, 2016.

ITO, H. *et al.* Reactive oxygen species involved cancer cellular specific 5aminolevulinic acid uptake in gastric epithelial cells. **Journal of clinical biochemistry and nutrition**, v. 54, n. 2, p. 81-85, 2014.

KESSEL, D. Apoptosis, paraptosis and autophagy: death and survival pathways associated with photodynamic therapy. **Photochemistry and photobiology**, v. 95, n. 1, p. 119-125, 2019.

KESSEL, D.; OLEINICK, N. L. Cell death pathways associated with photodynamic therapy: an update. **Photochemistry and photobiology**, v. 94, n. 2, p. 213-218, 2018.

KESSEL, D.; REINERS JUNIOR, J. J. Effects of combined lysosomal and mitochondrial photodamage in a non-small-cell lung cancer cell line: the role of paraptosis. **Photochemistry and photobiology**, v. 93, n. 6, p. 1502-1508, 2017.

KHURSHID, A. *et al.* In vivo study of laser irradiation of fractionated drug administration based mechanism for effective photodynamic therapy in rat liver. **Laser Physics**, v. 22, n. 1, p. 317-321, 2012.

- KOSTRON, Herwig. Photodynamic diagnosis and therapy and the brain. In: Photodynamic Therapy. **Humana Press, Totowa**, p. 261-280, 2010.
- LAWRENCE, Johnathan E. *et al.* Quantification of protoporphyrin IX accumulation in glioblastoma cells: a new technique. **ISRN surgery**, v. 2014, 2014.
- LIU, Y. *et al.* Apoptosis induced by hematoporphyrin monomethyl ether combined with He-Ne laser irradiation in vitro on canine breast cancer cells. **Veterinary Journal**, v. 188, n. 3, p. 325–330, 2011.
- LOPEZ, T. *et al.* Study of the stabilization of zinc phthalocyanine in sol-gel TiO₂ for photodynamic therapy applications. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 6, n. 6, p. 777–785, 2010.
- LOUIS, D. N. *et al.* The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. **Acta Neuropathologica**, v. 131, n. 6, p. 803–820, 2016.
- LUKSIENE, Z. Photodynamic therapy: mechanism of action and ways to improve the efficiency of treatment. **Medicina** (Kaunas, Lithuania), v. 39, n. 12, p. 1137–1150, 2003.
- MAHMOUDI, K. *et al.* 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy for the treatment of high-grade gliomas. **Journal of neuro-oncology**, v. 141, n. 3, p. 595-607, 2019.
- MANNAS, J. P. *et al.* Long-term treatment with temozolomide in malignant glioma. **Journal of Clinical Neuroscience**, v. 21, n. 1, p. 121–123, 2014.
- MATSUO, H. *et al.* Efficient fluorescence detection of protoporphyrin IX in metastatic lymph nodes of murine colorectal cancer stained with indigo carmine. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, v. 19, p. 175-180, 2017.
- MENEZES, P. F. C. *et al.* Correlation of cytotoxicity and depth of necrosis of the photoproducts of photogem®. **Laser Physics**, v. 17, n. 4, p. 461–467, 2007.
- MOAN, J.; BERG, K. The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen. **Photochemistry and photobiology**, v. 53, n. 4, p. 549-553, 1991.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.
- MROZ, P. *et al.* Cell death pathways in photodynamic therapy of cancer. **Cancers**, v. 3, n. 2, p. 2516-2539, 2011.
- MUSSI, L. **Eficiência Fotodinâmica das protoporfirinas IX de magnésio e zinco**. 90f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual, Campinas, 2003.

NATH, S.; OBAID, G.; HASAN, T. The Course of Immune Stimulation by Photodynamic Therapy: Bridging fundamentals of photochemically-induced Immunogenic Cell Death to the Enrichment of T Cell Repertoire. **Photochemistry and photobiology**, v. 95, n. 6, p. 1288-1305, 2019.

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. **Biochemical Pharmacology**, v. 144, p. 63–77, 2017.

ONO, B. A. Subcellular localization and photodynamic activity of Photodithazine (glucosamine salt of chlorin e6) in murine melanoma B16-F10: an in vitro and in vivo study. *In: OPTICAL METHODS FOR TUMOR TREATMENT AND DETECTION: MECHANISMS AND TECHNIQUES IN PHOTODYNAMIC THERAPY*, 27., 2018. **Proceedings...**, San Francisco, 2018.

ONO, B. A.; KURACHI, C. **Avaliação da resposta fotodinâmica em células de melanoma murino utilizando Photodithazine**. 2016. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

OSTROM, Q. T. *et al.* CBTRUS statistical report: primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2010–2014. **Neuro-oncology**, v. 19, n. suppl. 5, p. v1-v88, 2017.

PALASUBERNIAM, P. *et al.* ABCG2 transporter inhibitor restores the sensitivity of triple negative breast cancer cells to aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy. **Scientific reports**, v. 5, p. 13298, 2015.

POON, I. K. H.; HULETT, M. D.; PARISH, C. R. Molecular mechanisms of late apoptotic/necrotic cell clearance. **Cell death and differentiation**, v. 17, n. 3, p. 381, 2010.

QUIRK, B. J. *et al.* Photodynamic therapy (PDT) for malignant brain tumors - Where do we stand? **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 12, n. 3, p. 530–544, 2015.

RAJNEESH *et al.* Detection of Reactive Oxygen Species (ROS) in Cyanobacteria Using the Oxidant-sensing Probe 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein Diacetate (DCFH-DA). **Bio-protocol**, v. 7, n. 17, 2017.

REGO, Raquel Ferreira. **Estudo comparativo de precursores da PpIX (ALA e MAL) utilizados topicamente em terapia fotodinâmica**. 2008. 91f. Dissertação (Mestrado em Multidisciplinar) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2008.

REMPLE, K.; STONE, L. Assessment of GFP expression and viability using the tali image-based cytometer. **JoVE (Journal of Visualized Experiments)**, n. 57, p. e3659, 2011.

ROSA, F. S. *et al.* In vitro metabolism of 5-ALA esters derivatives in hairless mice skin homogenate and in vivo PpIX accumulation studies. **Pharmaceutical research**, v. 21, n. 12, p. 2247-2252, 2004.

SHIN, J. Y.; YOON, J. K.; DIAZ, A. Z. Gliosarcoma in septuagenarians and octogenarians: What is the impact of adjuvant chemoradiation? **Journal of Clinical Neuroscience**, v. 45, p. 77–82, 2017.

SILVA, M. T. Secondary necrosis: the natural outcome of the complete apoptotic program. **FEBS letters**, v. 584, n. 22, p. 4491-4499, 2010.

SILVA, J. C. *et al.* Apoptosis-associated genes related to photodynamic therapy in breast carcinomas. **Lasers in medical science**, v. 29, n. 4, p. 1429-1436, 2014.

SIMONE, C. B. *et al.* Photodynamic therapy for the treatment of non-small cell lung cancer. **Journal of Thoracic Disease**, v. 4, n. 1, p. 63–75, 2012.

SIMPLICIO, F. I.; MAIONCHI, F.; HIOKA, N. Terapia fotodinâmica: aspectos farmacológicos, aplicações e avanços recentes no desenvolvimento de medicamentos. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 801-807, 2002.

SMITH, D. R. *et al.* Clinical and molecular characteristics of gliosarcoma and modern prognostic significance relative to conventional glioblastoma. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 0, n. 0, p. 1–9, 2017.

SOLBAN, N.; RIZVI, I.; HASAN, T. Targeted photodynamic therapy. Lasers in Surgery and Medicine: The Official **Journal of the American Society for Laser Medicine and Surgery**, v. 38, n. 5, p. 522-531, 2006.

SPILLER, W. *et al.* Singlet oxygen quantum yields of different photosensitizers in polar solvents and micellar solutions. **Journal of Porphyrins and Phthalocyanines**, v. 2, n. 2, p. 145-158, 2012.

SPRING, B. Q. *et al.* The role of photodynamic therapy in overcoming cancer drug resistance. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 14, n. 8, p. 1476-1491, 2015.

SRDANOVIĆ, S. *et al.* The photodynamic activity of 131-[2'-(2-pyridyl) ethylamine] chlorin e6 photosensitizer in human esophageal cancer. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 28, n. 10, p. 1785-1791, 2018.

STEPP, H. *et al.* ALA and malignant glioma: fluorescence-guided resection and photodynamic treatment. **Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology**, v. 26, n. 2, 2007.

TADA, D. B. *et al.* Nanoparticle platform to modulate reaction mechanism of phenothiazine photosensitizers. **Journal of nanoscience and nanotechnology**, v. 10, n. 5, p. 3100-3108, 2010.

TIRAPELLI, L. F. *et al.* Apoptosis in Glioma Cells Treated with PDT. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 29, n. 5, p. 305–309, 2011.

TSITLAKIDIS, A. *et al.* Biopsy versus resection in the management of malignant gliomas: a systematic review and meta-analysis. **Journal of Neurosurgery**, v. 112, n. 5, p. 1020–1032, 2010.

TZERKOVSKY, D. A. *et al.* Fluorescent diagnosis and photodynamic therapy for C6 glioma in combination with antiangiogenic therapy in subcutaneous and intracranial tumor models. **Experimental Oncology**, v. 36, n. 2, p. 85–89, 2014.

VALENTE, S. C. M. **Marcação da anexina V para imagem funcional da apoptose celular**. Tese (Doutorado) – Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2011.

VAN DEN BENT, M. J. The role of chemotherapy in brain metastases. **European Journal of Cancer**, v. 39, n. 15, p. 2114-2120, 2003.

VAN DEN BENT, M. J. *et al.* Second interim and first molecular analysis of the EORTC randomized phase III intergroup CATNON trial on concurrent and adjuvant temozolomide in anaplastic glioma without 1p/19q codeletion. **Journal of Clinical Oncology**, v. 37, suppl. 15, 2019.

VAN STRATEN, D. *et al.* Oncologic photodynamic therapy: basic principles, current clinical status and future directions. **Cancers**, v. 9, n. 2, p. 19, 2017.

VOLLET-FILHO, J. D. *et al.* Non-homogeneous liver distribution of photosensitizer and its consequence for photodynamic therapy outcome. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, v. 7, n. 3, p. 189-200, 2010.

WANG, X. *et al.* Analysis of the in vivo and in vitro effects of photodynamic therapy on breast cancer by using a sensitizer, sinoporphyrin sodium. **Theranostics**, v. 5, n. 7, p. 772, 2015.

WEI, H. *et al.* Apoptosis of mesenchymal stem cells induced by hydrogen peroxide concerns both endoplasmic reticulum stress and mitochondrial death pathway through regulation of caspases, p38 and JNK. **Journal of cellular biochemistry**, v. 111, n. 4, p. 967-978, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. **Cancer. Brain Cancer**. 2018
Disponível em: https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1. Acesso em 27 set. 2019.

WOLBERS, J. G. Novel strategies in glioblastoma surgery aim at safe, supra-maximum resection in conjunction with local therapies. **Chinese journal of cancer**, v. 33, n. 1, p. 8, 2014.

YAMAMOTO J. *et al.* Monitoring of singlet oxygen is useful for predicting the photodynamic effects in the treatment for experimental glioma. **Clinical cancer research**, v. 12, n. 23, p. 7132-7139, 2006.

YANOVSKY, R. L. *et al.* Photodynamic therapy for solid tumors: A review of the literature. **Photodermatology, photoimmunology & photomedicine**, v. 35, n. 5, p. 295-303, 2019.

ZELENKOV, P. *et al.* Acute morphological sequelae of photodynamic therapy with 5aminolevulinic acid in the C6 spheroid model. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 82, n. 1, p. 49–60, 2007.

ZHANG, X. *et al.* Combination of Surgical Resection and Photodynamic Therapy of 9L Gliosarcoma in the Nude Rat. **Photochemistry and Photobiology**, v. 82, n. 6, p. 1704–1711, 2006.

ANEXOS – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA



Instituto de Pesquisa
e Desenvolvimento

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA

CERTIFICADO

Certificamos que a projeto intitulado “ Comparação dos efeitos do Fotoencitine e ALA aplicado à Terapia Fotodinâmica em Gliossaroma”, registrado com o nº A02/CEUA/2017, sob responsabilidade da Profa. Dra. Juliana Ferreira e que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Vale do Paraíba, em reunião de 25 de maio de 2017.

Vigência do projeto: 10/08/2017 – 10/11/2017

Espécie/Linhagem: Ratos Fischer (F344/NTac)

Nº de animais: 45

Peso/Idade: 200g-280g/40 dias

Sexo: macho

Origem: Biotério Unicamp

A aprovação pelo CEUA/UNIVAP não dispensa autorização prévia junto ao IBAMA, SISBIO ou CRBio

Obs: O pesquisador(a) principal responsável pela proposta deverá entrar em contato com a Médica Veterinária Dra. Hanna Sibuya Kokubun (email: hanna@univap.br) para agendar o acompanhamento da anestesia e cirurgia.

São José dos Campos, 26 de maio de 2017.


Nádia de Campos Velho, Profa. Dra
Coordenadora CEUA/UNIVAP



Av. Shishima Hifumi, 2911 - 12244-000 - São José dos Campos - SP -
www.univap.br



Universidade do Vale do Paraíba

Instituto de Pesquisa
e Desenvolvimento

São José dos Campos, 13 de dezembro de 2018

A Profa. Dra. Juliana Ferreira Strixino

O Projeto intitulado ***"Comparação dos efeitos do Fotoencina e ALA aplicado à Terapia Fotodinâmica em Gliossarcoma"*** da pesquisadora responsável Profa. Dra. Juliana Ferreira Strixino aprovado pelo CEUA sob inscrição A02/CEUA/2017, em 25 de maio de 2017, com vigência até 10/11/2017, tem seu pedido de prorrogação aprovado para 10/11/2019 com base no projeto FAPESP 2016/20022-7.



Nádia M. R. de Campos Velho, Profa. Dra.
Coordenação CEUA/UNIVAP