

Universidade do Vale do Paraíba – UNIVAP  
Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento – IP&D  
Mestrado em Engenharia Biomédica

Gabrielle dos Santos Vitorio

**Ação da Terapia Fotodinâmica em linhagem celular de *gliossarcoma 9L/lacZ* utilizando baixas fluências e concentrações de Fotoenticine e Photodithazine.**

São José dos Campos

2022

Gabrielle dos Santos Vitorio

**Ação da Terapia Fotodinâmica em linhagem celular de *gliossarcoma 9L/lacZ* utilizando baixas fluências e concentrações de Fotoencicine e Photodithazine.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Biomédica da Universidade do Vale do Paraíba como pré-requisito para obtenção do título Mestre em Engenharia Biomédica.

Orientador: Juliana Ferreira Strixino

Co-orientador: Juliana Guerra Pinto

São José dos Campos

2022

**TERMO DE AUTORIZAÇÃO DE DIVULGAÇÃO DA OBRA**

**Ficha catalográfica**

Vitorio, Gabrielle dos Santos  
Ação da Terapia Fotodinâmica em linhagem celular de  
glosssarcoma 9L/lacZ utilizando baixas fluências e concentrações  
de Fotoenticine e Photodithazine / Gabrielle dos Santos Vitorio;  
orientadora, Juliana Ferreira Strixino; co-orientadora Juliana  
Guerra Pinto. - São José dos Campos, SP, 2022.  
1 CD-ROM, 75 p.

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

Inclui referências

1. Engenharia Biomédica. 2. glosssarcoma. 3. terapia  
fotodinâmica. 4. clorinas. 5. proteína de choque. I. Strixino,  
Juliana Ferreira, orient. II. Pinto, Juliana Guerra, co-orient.  
III. Universidade do Vale do Paraíba. Programa de Pós-Graduação  
em Engenharia Biomédica. IV. Título.

Eu, Gabrielle dos Santos Vitorio, 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, 7 de Junho de 2022.

*Gabrielle Vitorio*

Autor(a) da Obra

**GABRIELLE DOS SANTOS VITORIO**

**“AÇÃO DA TERAPIA FOTODINÂMICA EM LINHAGEM CELULAR DE *Gliossarcoma* 9L/*lacZ* UTILIZANDO BAIXAS FLUÊNCIAS E CONCENTRAÇÕES DE FOTOENTICINE E PHOTODITHAZINE”.**

3

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

PROF.<sup>ª</sup> DR.<sup>ª</sup> CRISTINA PACHECOSOARES *Cristina Pacheco Soares*  
PROF.<sup>ª</sup> DR.<sup>ª</sup> JULIANA FERREIRA STRIXINO *Juliana Ferreira Strixino*  
PROF.<sup>ª</sup> DR.<sup>ª</sup> JULIANA GUERRA PINTO *Juliana Guerra Pinto*  
PROF.<sup>ª</sup> DR.<sup>ª</sup> MAIARA LIMA CASTILHO *Maiara Lima Castilho*  
PROF.<sup>ª</sup> DR.<sup>ª</sup> DAYANE BATISTA TADA *Dayane Batista Tada*

Prof.<sup>ª</sup> Dr.<sup>ª</sup> Lúcia Vieira  
Diretora do IP&D – Univap  
São José dos Campos, 03 de março 2022.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à **Fapesp** (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo suporte financeiro, o qual possibilitou a concretização desse projeto.

À **FVE** (Fundação Valeparaibana de Ensino) e a **Capes** (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela bolsa cedida para a realização do curso de Mestrado em Engenharia Biomédica.

Ao Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba (**UNIVAP**), pelo espaço cedido para o desenvolvimento da nossa pesquisa.

Ao **Laboratório de Fotobiologia Aplicada à Saúde**, que me deu todo o apoio para chegar até aqui, desde a Iniciação Científica, e em especial à minha orientadora **Professora Dr<sup>a</sup> Juliana Ferreira Strixino** e minha coorientadora **Professora Dr<sup>a</sup> Juliana Guerra**, por terem compartilhado comigo o conhecimento e me ajudado a construir maturidade durante esses anos, e aos meus colegas de laboratório, **Dr<sup>a</sup> Luciana Cortez** e **Me. Bruno Henrique Godoi**, que por diversas vezes me auxiliaram no desenvolvimento desse projeto.

Ao **Instituto de Física de São Carlos** (USP São Carlos), pela doação dos fotossensibilizadores utilizados neste estudo.

Ao Laboratório de Dinâmica de Compartimento Celulares da **Professora Dr<sup>a</sup> Cristina Pacheco Soares**, o qual sempre se disponibilizaram para ajudar no desenvolvimento desse projeto, cedendo muitas vezes seu espaço, materiais e conhecimento. Obrigada por todo carinho!

Ao Laboratório de Biologia Celular e Tecidual do Professor **Dr. Newton Soares da Silva**, pela disponibilização do seu espaço para o desenvolvimento dos experimentos.

Ao **Laboratório de Nanossensores** do Professor Dr. Leandro José Raniero pelos equipamentos e tempo cedidos.

À **Central de Laboratórios Multiusuários**, em especial à Professora Dr<sup>a</sup> Priscila, pela disponibilização do seu tempo, conhecimento e manuseio de equipamentos para realização desse projeto.

Às minhas colegas de laboratório, **Beatriz e Rafaella**, por compartilharem comigo os momentos vivenciados nesses dois anos.

À minha família, **Silvana, Emerson, Kauê** e meu cachorro **Dobby**, por serem minha base e os maiores motivadores para eu continuar alcançando o melhor de mim.

Ao meu namorado, **Pedro**, por me incentivar sempre e ser meu maior companheiro nessa jornada.

E à **Deus**, que me deu o milagre da vida, a bênção de uma família maravilhosa, força e fé para ir à luta e conquistar os planos que ele traçou para mim.

## RESUMO

O Gliossarcoma é um câncer agressivo, com alta propensão metastática. Atualmente seu tratamento consiste em ressecção cirúrgica seguida de radio-quimioterapia, oferecendo baixa expectativa e qualidade de vida. Como proposta alternativa, a Terapia Fotodinâmica (TFD) se apresenta como método seletivo de tratamento, combinando o uso de um fotossensibilizador (FS), oxigênio molecular e luz. Esses três elementos geram as espécies reativas de oxigênio, levando à morte celular. O objetivo desse estudo foi avaliar a ação da TFD utilizando as clorinas Fotoencina (FTC) e Photodithazine (PDZ) em baixas concentrações e fluências, verificando a diferença entre seus efeitos. Foram utilizadas células 9L/lacZ e concentrações de  $1,55 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ,  $12,50 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e  $50,00 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de ambas clorinas. As células foram irradiadas com um dispositivo a base de LED em 660 nm nas fluências de  $1 \text{ J/cm}^2$ ,  $5 \text{ J/cm}^2$  e  $10 \text{ J/cm}^2$ , em  $25 \text{ mW/cm}^2$ . Observou-se que ambas clorinas apresentam indícios da formação de fotoprodutos após irradiação e são internalizadas em toda extensão citoplasmática, com restrição ao núcleo. Os testes de citotoxicidade demonstraram redução  $>98\%$  da viabilidade celular e queda na atividade mitocondrial  $>86\%$  nas concentrações de  $50,00 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e  $12,50 \mu\text{g.mL}^{-1}$  em todas as fluências de luz testadas, entretanto a concentração de  $1,55 \mu\text{g.mL}^{-1}$  não apresentou um resultado tão eficaz na fluência de  $1 \text{ J/cm}^2$ . Houve alteração na adesão celular após TFD conforme diminuição da concentração, no qual as células desprendidas se apresentavam mortas, indicando que o desprendimento celular corresponde à uma característica do processo de morte celular, assim como as alterações morfológicas apresentadas, como a perda da extensão citoplasmática, adquirindo formato arredondado. A imunodeteção de HSP70 diminuiu, enquanto a de HSP27 aumentou após TFD com o FTC. Com isso, conclui-se que ambos FS foram eficazes na TFD em células de gliossarcoma, com destaque para a concentração de  $50,00 \mu\text{g.mL}^{-1}$  na fluência de  $5 \text{ J/cm}^2$ . Além disso, levando em consideração a elevada imunodeteção da HSP27 na TFD com o FTC, o PDZ se apresenta como um promissor FS para ser empregado na TFD com células 9L/lacZ, encorajando estudos *in vivo*.

**Palavras Chaves:** gliossarcoma; terapia Fotodinâmica; clorinas; adesão celular; proteína de choque.

## **Action of Photodynamic Therapy in gliosarcoma cell line 9L/lacZ using low fluences and concentrations of Fotoenticine and Photodithazine.**

### **ABSTRACT**

Gliosarcoma is an aggressive cancer with a high metastatic propensity. Currently, its treatment consists of surgical resection followed by radiochemotherapy, offering low life expectancy and quality. As an alternative proposal, Photodynamic Therapy (PDT) is presented as a selective method of treatment, combining the use of a photosensitizer (PS), molecular oxygen and light. These three elements generate the reactive oxygen species, leading to cell death. The objective of this study was to evaluate the action of PDT using the chlorins Fotoenticine (FTC) and Photodithazine (PDZ) at low concentrations and fluences, verifying the difference between their effects. 9L/lacZ cells and concentrations of  $1.55 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ,  $12.50 \mu\text{g.mL}^{-1}$  and  $50.00 \mu\text{g.mL}^{-1}$  of both chlorines were used. Cells were irradiated with an LED-based device at 660 nm at fluences of  $1 \text{ J/cm}^2$ ,  $5 \text{ J/cm}^2$  and  $10 \text{ J/cm}^2$ , at  $25 \text{ mW/cm}^2$ . It was observed that both chlorines show evidence of the formation of photoproducts after irradiation and are internalized throughout the cytoplasm, with restriction to the nucleus. The cytotoxicity tests showed a  $>98\%$  reduction in cell viability and a  $>86\%$  decrease in mitochondrial activity at concentrations of  $50.00 \mu\text{g.mL}^{-1}$  and  $12.50 \mu\text{g.mL}^{-1}$  in all light fluences tested, however the concentration of  $1.55 \mu\text{g.mL}^{-1}$  did not present such an effective result at the fluence of  $1 \text{ J/cm}^2$ . There was a change in cell adhesion after PDT as the concentration decreased, in which the detached cells were dead, indicating that cell detachment corresponds to a characteristic of the cell death process, as well as the morphological alterations presented, such as the loss of cytoplasmic extension, acquiring a rounded shape. Immunodetection of HSP70 decreased, while that of HSP27 increased after PDT with FTC. Thus, it is concluded that both FS were effective in PDT in gliosarcoma cells, with emphasis on the concentration of  $50.00 \mu\text{g.mL}^{-1}$  at a fluence of  $5 \text{ J/cm}^2$ . Furthermore, taking into account the high immunodetection of HSP27 in PDT with FTC, PDZ presents itself as a promising FS to be used in PDT with 9L/lacZ cells, encouraging in vivo studies.

**Keywords:** gliosarcoma; photodynamic therapy; chlorines; cell adhesion; shock protein.

## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| Figura 1: Estimativa da incidência de variados tipos de câncer para 2020 no Brasil.   | 18 |
| Figura 2: Esquematização do princípio da TFD.   | 22 |
| Figura 3: Estrutura Química do PDZ.   | 25 |
| Figura 4: Estrutura Química do FTC.   | 25 |
| Figura 5: Ilustração da forma do método de diluição seriada realizada para a quantificação pelo Método de Bradford.   | 33 |
| Figura 6: Espectro de Absorção das clorinas. A – Espectro de Absorção do FTC nas concentrações de 50,00 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , 12,50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 1,55 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . B - A – Espectro de Absorção do PDZ nas concentrações de 50,00 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , 12,50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 1,55 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .  | 35 |
| Figura 7: Comparação dos espectros de absorção do FTC e do PDZ na concentração de 1,55 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , antes, imediatamente após irradiação (iFTC e iPDZ) e 18h após irradiação (pFTC e pPDZ). A – FTC e fluência de 1 $\text{J/cm}^2$ ; B – FTC e fluência de 5 $\text{J/cm}^2$ ; C – FTC e fluência de 10 $\text{J/cm}^2$ ; D – PDZ e fluência de 1 $\text{J/cm}^2$ ; E – PDZ e fluência de 5 $\text{J/cm}^2$ ; F – PDZ e fluência de 10 $\text{J/cm}^2$ .  | 36 |
| Figura 8: Comparação dos espectros de absorção do FTC e do PDZ na concentração de 12,50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , antes, imediatamente após irradiação (iFTC e iPDZ) e 18h após irradiação (pFTC e pPDZ). A – FTC e fluência de 1 $\text{J/cm}^2$ ; B – FTC e fluência de 5 $\text{J/cm}^2$ ; C – FTC e fluência de 10 $\text{J/cm}^2$ ; D – PDZ e fluência de 1 $\text{J/cm}^2$ ; E – PDZ e fluência de 5 $\text{J/cm}^2$ ; F – PDZ e fluência de 10 $\text{J/cm}^2$ . | 37 |
| Figura 9: Comparação dos espectros de absorção do FTC e do PDZ na concentração de 50,00 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , antes, imediatamente após irradiação (iFTC e iPDZ) e 18h após irradiação (pFTC e pPDZ). A – FTC e fluência de 1 $\text{J/cm}^2$ ; B – FTC e fluência de 5 $\text{J/cm}^2$ ; C – FTC e fluência de 10 $\text{J/cm}^2$ ; D – PDZ e fluência de 1 $\text{J/cm}^2$ ; E – PDZ e fluência de 5 $\text{J/cm}^2$ ; F – PDZ e fluência de 10 $\text{J/cm}^2$ . | 38 |
| Figura 10: Internalização do FS em células 9L/lacZ por Microscopia Confocal de fluorescência. A – 50,00 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ FTC; B – 12, 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ FTC; C – 1,55 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ FTC; D – 50,00 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ PDZ; E – 12,50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ PDZ; F – 1,55 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ PDZ; cabeça de seta – núcleo corado com DAPI; seta a: citoplasma; seta b: FS.   | 39 |
| Figura 11: Análise da viabilidade celular pelo Azul de Tripán em células 9L/lacZ. A – Células tratadas com TFD e FTC. B - Células tratadas com TFD e PDZ. Símbolos para $p < 0.01$ : $\gamma$ , $\beta$ , * e $\alpha$ .  | 40 |
| Figura 12: Análise da atividade mitocondrial em células 9L/lacZ. A – Células tratadas com TFD e FTC. B – Células tratadas com TFD e PDZ. Símbolos para $p < 0.01$ : *, •, o e $\alpha$ .  | 41 |
| Figura 13: Análise quantitativa do número de células presentes no sobrenadante após 18h da aplicação da TFD, na fluência de 5 $\text{J/cm}^2$ , nas células de gliossarcoma. Símbolos para $p < 0.01$ : * e $\alpha$ .  | 42 |
| Figura 14: Análise qualitativa das imagens obtidas pelo teste de exclusão com o Azul de Tripán, demonstrando o desprendimento celular conforme diminuição da concentração celular após aplicação da TFD na fluência de 5 $\text{J/cm}^2$ em células da  |    |

|  |    |
|--|----|
| linhagem 9L/lacZ. A – 1,55 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ do FTC; B – 12,50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ do FTC; C – 50,00 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ do FTC; D – 1,55 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ do PDZ; E – 12,50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ do PDZ; F – 50,00 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ do PDZ; Aumento de 40X. ....   | 43 |
| Figura 15: Análise da viabilidade celular de células que se desprenderam após 18h da TFD, irradiadas a 5 J/cm <sup>2</sup> . Símbolos para p<0.01: * e • A – Células tratadas com TFD e FTC. B – Células tratadas com TFD e PDZ. ....  | 44 |
| Figura 16: Micrografia obtida por microscopia eletrônica de varredura de células 9L/lacZ irradiadas em um dispositivo de LED em 660 nm, 5 J/cm <sup>2</sup> e 25 mW/cm <sup>2</sup> , representando o controle claro. Magnificação: 600 x. ....  | 45 |
| Figura 17: Micrografia obtida por microscopia eletrônica de varredura de células 9L/lacZ submetidas à TFD na fluência de 5 J/cm <sup>2</sup> e 25 mW/cm <sup>2</sup> . A – 1,55 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ FTC; B – 12,50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ FTC; C – 50,00 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ FTC; D – 1,55 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ PDZ; E – 12,50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ PDZ; F – 50,00 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ PDZ. Magnificação: 150x. ....  | 46 |
| Figura 18: Micrografia obtida por microscopia eletrônica de varredura de células 9L/lacZ submetidas à TFD na fluência de 5 J/cm <sup>2</sup> e 25 mW/cm <sup>2</sup> . A – 1,55 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ FTC; B – 12,50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ FTC; C – 50,00 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ FTC; D – 1,55 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ PDZ; E – 12,50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ PDZ; F – 50,00 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ PDZ. Seta: arredondamento celular; Cabeça de seta: irregularidade na superfície celular; Magnificação: 1,50k x. .... | 47 |
| Figura 19: Análise da imunodeteção da proteína HSP27 antes e após TFD na fluência de 5 J/cm <sup>2</sup> . A – Imunodeteção da HSP27 na TFD com o FTC nas concentrações de 1,55 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , 12,50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 50,00 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . B – Imunodeteção da HSP27 na TFD com o PDZ nas concentrações de 1,55 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , 12,50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 50,00 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . ....  | 48 |
| Figura 20: Análise da imunodeteção da proteína HSP70 antes e após TFD na fluência de 5 J/cm <sup>2</sup> . A – Imunodeteção da HSP70 na TFD com o FTC nas concentrações de 1,55 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , 12,50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 50,00 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . B – Imunodeteção da HSP70 na TFD com o PDZ nas concentrações de 1,55 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , 12,50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 50,00 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . ....  | 49 |
| Figura 21: Análise da viabilidade celular com Azul de Tripán em células L929 submetidas à TFD. A – L929 tratadas com TFD e FTC na fluência de 5 J/cm <sup>2</sup> . B – L929 tratadas com TFD e PDZ na fluência de 5 J/cm <sup>2</sup> . Símbolos para p<0.01: *. ....   | 51 |
| Figura 22: Análise da viabilidade celular das células L929 presentes no sobrenadante após 18h do tratamento com a TFD, na fluência de 5 J/cm <sup>2</sup> . ....   | 51 |
| Figura 23: Análise qualitativa do desprendimento celular após 18h da TFD nas células L929 na fluência de 5 J/cm <sup>2</sup> , utilizando as imagens obtidas pelo teste de viabilidade com Azul de Tripán. A – 1,55 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de FTC; B – 12,50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de FTC; C – 50,00 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de FTC; D – 1,55 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de PDZ; E – 12,50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de PDZ; F – 50,00 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de PDZ; Aumento 40x. ....   | 52 |

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| Tabela 1: Parâmetros de Irradiação..... | 28 |
|---|----|

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|                |  |
|----------------|--|
| DAPI           | 4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride               |
| DMEM           | Dulbecco's Modified Eagle Medium                             |
| DMSO           | Dimetilsulfóxido   |
| DNA            | Ácido desoxirribonucleico, do inglês "deoxyribonucleic acid" |
| EDTA           | Ácido etilenodiamino tetra-acético                           |
| EGFR           | Fator de crescimento epidérmico                              |
| ERO            | Espécies Reativas de Oxigênio                                |
| FS             | Fotossensibilizador  |
| FTC            | Fotoenticine   |
| GBM            | Glioblastoma Multifome                                       |
| GS             | Gliossarcoma   |
| HSP            | Heat Shock Proteins  |
| IDH            | Isocitrado Desidrogenase                                     |
| iFTC           | imediatamente após irradiação do Fotoenticine                |
| INCA           | Instituto Nacional de Câncer                                 |
| iPDZ           | imediatamente após irradiação do Photodithazine              |
| LED            | Diodo emissor de luz, do inglês "light-emitting diode"       |
| M              | Molar  |
| MEV            | Microscópio Eletrônico de Varredura                          |
| MGMT           | O6-methylguanine-DNA methyltransferase                       |
| MTT            | (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5diphenyltetrazoliumbromide) |
| NaCl           | Cloreto de Sódio   |
| nm             | nanometro  |
| O <sub>2</sub> | Oxigênio Molecular   |
| OMS            | Organização Mundial da Saúde                                 |
| PBS            | Tampão fosfato salino  |
| PDZ            | Photodithazine   |
| pFTC           | após 18 horas de irradiação do Fotoenticine                  |
| pPDZ           | após 18 horas de irradiação do Photodithazine                |
| RIPA           | Tampão RIPA (originalmente utilizado para radioimunoensaio)  |
| SNC            | Sistema Nervoso Central                                      |
| TFD            | Terapia Fotodinâmica   |

TMZ

temozolomida

RCF

Força Centrífuga Relativa

## SUMÁRIO

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO</b> .....   | <b>15</b> |
| 1.1 Objetivo geral .....  | 16        |
| 1.2 Objetivos específicos .....   | 17        |
| <b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....  | <b>18</b> |
| 2.1 Câncer .....  | 18        |
| 2.2 Gliossarcoma.....   | 19        |
| 2.3 Tratamento.....   | 20        |
| 2.4 Terapia fotodinâmica .....  | 21        |
| 2.5 Fotossensibilizador.....  | 23        |
| 2.6 Proteínas de Choque Térmico .....   | 26        |
| <b>3 METODOLOGIA</b> .....  | <b>27</b> |
| 3.1 Linhagem Celular .....  | 27        |
| 3.2 Fotossensibilizador.....  | 27        |
| 3.3 Fontes de luz .....   | 27        |
| 3.4 Análise dos Espectros de Absorção .....   | 28        |
| 3.5 Internalização dos FS pela linhagem 9L/lacZ.....  | 28        |
| 3.6 Ensaios de citotoxicidade do FS .....   | 29        |
| 3.7 Análise da viabilidade e aderência celular pelo método de exclusão com Azul de Tripán .....     | 29        |
| 3.8 Análise da atividade mitocondrial .....   | 30        |
| 3.9 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....  | 31        |
| 3.10 Extração e análise da imunodeteção das proteínas heat shock proteins (HSP) HSP27 e HPS 70..... | 32        |
| 3.10.1 <i>Extração das proteínas</i> .....  | 32        |
| 3.10.2 <i>Padronização das proteínas</i> .....  | 32        |
| 3.10.3 <i>Quantificação das proteínas totais e de HSP relativo</i> .....                            | 33        |
| 3.11 Análise Estatística.....   | 34        |
| <b>4 RESULTADOS</b> .....   | <b>35</b> |
| 4.1 Análise dos Espectros de Absorção .....   | 35        |
| 4.2 Internalização Celular dos FS .....   | 38        |
| 4.3 Análise de viabilidade e atividade mitocondrial.....  | 39        |
| 4.4 Alterações na adesão celular.....   | 41        |
| 4.5 Análise da viabilidade das células do sobrenadante .....  | 43        |
| 4.6 Análise da alteração morfológica por MEV .....  | 45        |
| 4.7 Análise da imunodeteção das proteínas HPS 27 e HPS 70.....                                      | 47        |
| 4.8 Análise da viabilidade e adesão celular da linhagem L929 após TFD .....                         | 50        |
| <b>5 DISCUSSÃO</b> .....  | <b>53</b> |
| <b>6 CONCLUSÃO</b> .....  | <b>63</b> |
| <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....   | <b>64</b> |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>ANEXO 1 CERTIFICADO DE PARTICIPAÇÃO DO “I FÓRUM ON-LINE DE TECNOLOGIAS DA LUZ NA SAÚDE” REALIZADO ENTRE OS DIAS 28 A 30 MAIO DE 2020. ....</b>                    | <b>15</b> |
| <b>ANEXO 2 - CERTIFICADO DE PUBLICAÇÃO .....</b>   | <b>16</b> |
| <b>ANEXO 3 - PUBLICAÇÃO COMO CO-AUTORIA .....</b>  | <b>17</b> |
| <b>ANEXO 4 - CERTIFICADO DE PARTICIPAÇÃO DO “II FÓRUM ON-LINE INTERNACIONAL DE TECNOLOGIAS DA LUZ NA SAÚDE” REALIZADO ENTRE OS DIAS 20 A 22 DE MAIO DE 2021.....</b> | <b>18</b> |
| <b>ANEXO 5 - PUBLICAÇÃO COMO PRIMEIRO AUTOR.....</b>   | <b>19</b> |
| <b>ANEXO 6 - PUBLICAÇÃO COMO CO-AUTOR.....</b>   | <b>20</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença de alta incidência em qualquer lugar do mundo, sem distinção de etnia, renda, cultura ou localização geográfica. Por ano são registrados aproximadamente 14 milhões de novos casos, sendo esperado para os anos de 2020-2022 o aparecimento de 625 mil novos casos somente no Brasil (FIOCRUZ, 2018; INCA, 2020).

Os tumores originados no Sistema Nervoso Central (SNC) geralmente são os mais agressivos, como por exemplo o Gliossarcoma (GS). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o GS trata-se de “uma variante de glioblastoma (GB) de tipo selvagem Isocitrado Desidrogenase (IDH) caracterizado por um padrão de tecido bifásico com áreas alternadas exibindo diferenciação glial e mesenquimal” (DARDIS *et al.*, 2021). O GS é um câncer de difícil diagnóstico, representando 3,2 casos a cada 100.000. Apresenta propensão no desenvolvimento de metástases extracranianas, facilitando o envolvimento da medula espinhal (1% dos gliomas de coluna) e desenvolvimento de novos cânceres (HONG *et al.*, 2021; JIN *et al.*, 2020).

A sobrevida do paciente com GS normalmente está em torno de 15 meses, muitas vezes prolongados pela ressecção cirúrgica concomitante com quimio-radioterápicos. Entretanto, o emprego desses métodos terapêuticos também proporciona ao paciente o desencadeamento de uma série de efeitos colaterais, levando conseqüentemente à uma péssima qualidade de vida. A principal limitação dos métodos atualmente utilizados trata-se da falta da exclusividade de ataque às células do tecido tumoral, visto que também atinge o tecido saudável vizinho. Na Terapia Fotodinâmica (TFD) esse problema é contornado pelo seu princípio de seletividade (FREIRE *et al.*, 2018; JIN *et al.*, 2020).

A TFD apresenta-se no ramo terapêutico como um método promissor, conquistando espaço nas pesquisas clínicas para o tratamento de diferentes tipos de tumores. Seu efeito se dá pela combinação simultânea de uma substância fotossensível, luz e oxigênio molecular (O<sub>2</sub>). A irradiação da célula com o fotossensibilizador (FS) permite que essa substância passe de seu estado fundamental para seu estado excitado, transferindo energia para O<sub>2</sub> molecular que pode seguir para o estado singleto ou tripleto. O estado tripleto retém energia que gera espécies reativas de oxigênio (ERO) necessárias para induzir a morte celular (CRAMER; CHEN, 2020).

A seletividade da TFD está relacionada à emissão de luz focada no tecido tumoral, evitando com que as células vizinhas saudáveis sofram os impactos do tratamento, minimizando os efeitos colaterais (FERREIRA *et al.*, 2016).

A escolha do FS é um dos principais objetivos de estudo das pesquisas clínicas atuais. Diversas características devem ser analisadas para aprovar o uso de uma substância fotossensível na TFD para cada tipo de tumor, como por exemplo a capacidade de internalização, baixa citotoxicidade, alta produção de ERO, pouca agregação em meios fisiológicos, entre outros. Dentre diversos tipos de FS, as clorinas se destacam pelos resultados promissores, rápida depuração do organismo e absorção em 660 nm, possibilitando o tratamento de lesões mais profundas, como é o caso do GS (DE OLIVEIRA *et al.*, 2015; FONTANA *et al.*, 2017)

Photodithazine (PDZ) trata-se de um sal N-dimetilglucamina de clorina (e6) comercializado pela empresa Russa Veta-Grande LLC. Na literatura é possível encontrar estudos *in vitro* e *in vivo* com diversos tipos de tumores, incluindo os cerebrais, apresentando resultados otimistas (FONTANA *et al.*, 2017; ONO *et al.*, 2018; PONOMAREV *et al.*, 2000; ROMANKO *et al.*, 2004; VITORIO *et al.*, 2021). Seu uso também tem sido observado em estudos antimicrobianos, assim como a clorina Fotoenticine (FTC), comercializado pela empresa Nuevas Tecnologias Cientificas-NTC- Lianera Asturias. Ambas clorinas já foram alvo de estudos publicados analisando a TFD como alternativa de tratamento para o GS, incentivando a continuação de seus estudos de modo a fornecer um completo embasamento científico para avanços no estudo *in vivo* (DE ALMEIDA *et al.*, 2020; HAMBLIN, 2020).

### **1.1 Objetivo geral**

O objetivo deste estudo foi realizar uma análise comparativa dos efeitos da TFD com as clorinas FTC e PDZ como alternativa de tratamento do gliossarcoma, utilizando baixas concentrações, diferentes fluências de luz e avaliando fatores importantes no processo de morte celular, como a alteração morfológica, perda da adesão e alteração na imunodeteção de proteínas.

## 1.2 Objetivos específicos

1. Analisar os espectros de absorção dos FS após irradiação.
2. Analisar a internalização dos FS em baixas concentrações;
3. Analisar a viabilidade celular utilizando os FS em baixas concentrações e baixas fluências de luz;
4. Analisar a alteração na adesão celular antes e após TFD e avaliar a viabilidade das células suspensas no meio após TFD;
5. Analisar alterações na estrutura de sustentação celular pela Microscopia Eletrônica de Varredura em células tratadas;
6. Avaliar as diferenças na imunodeteção de proteínas de choque térmico (HSP) (HSP 27 e HSP 70) antes e após a TFD;
7. Avaliar a citotoxicidade dos FS nas células L929 e os efeitos da TFD na adesão celular.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA



### 2.1 Câncer

O câncer é uma doença agressiva e silenciosa que figura entre as principais causas de morte da população em quase todos os países e variadas faixas etárias, com predominância entre 30 e 69 anos. Seu surgimento pode se dar tanto por fatores genéticos como por fatores externos, levando cerca de 7,6 milhões de pessoas por ano à óbito, sendo 70% dos óbitos de cidadãos de países de média e baixa renda (INCA, 2019; OPAS, 2020)

O diagnóstico de câncer repercute tanto nas relações pessoais e na autoestima do acometido, como também na família e na sociedade como um todo, gerando perda da produtividade econômica. No Brasil, ocorrem cerca de 87 mil óbitos registrados na população economicamente ativa (entre 15 e 65 anos), causando um déficit de 15 bilhões de reais por ano, sem considerar os custos de internações e tratamentos que dobrariam esse valor, segundo especialistas da Agência Internacional para Pesquisa do Câncer (FIOCRUZ, 2018; WENTZEL, 2018).

Figura 1: Estimativa da incidência de variados tipos de câncer para 2020 no Brasil.

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

| Localização primária        | Casos  | %     |   |  | Localização primária        | Casos  | %     |
|-----------------------------|--------|-------|---|--|-----------------------------|--------|-------|
| Próstata                    | 65.840 | 29,2% | <b>Homens</b>  <b>Mulheres</b>  |  | Mama feminina               | 66.280 | 29,7% |
| Cólon e Reto                | 20.540 | 9,1%  |   |  | Cólon e Reto                | 20.470 | 9,2%  |
| Traqueia, Brônquio e Pulmão | 17.760 | 7,9%  |   |  | Colo do útero               | 16.710 | 7,5%  |
| Estômago                    | 13.360 | 5,9%  |   |  | Traqueia, Brônquio e Pulmão | 12.440 | 5,6%  |
| Cavidade Oral               | 11.200 | 5,0%  |   |  | Glândula Tireoide           | 11.950 | 5,4%  |
| Esôfago                     | 8.690  | 3,9%  |   |  | Estômago                    | 7.870  | 3,5%  |
| Bexiga                      | 7.590  | 3,4%  |   |  | Ovário                      | 6.650  | 3,0%  |
| Linfoma não Hodgkin         | 6.580  | 2,9%  |   |  | Corpo do útero              | 6.540  | 2,9%  |
| Laringe                     | 6.470  | 2,9%  |   |  | Linfoma não Hodgkin         | 5.450  | 2,4%  |
| Leucemias                   | 5.920  | 2,6%  |   |  | Sistema Nervoso Central     | 5.230  | 2,3%  |

\* Números arredondados para múltiplos de 10

Fonte: INCA, 2020.

Determinadas regiões em que o tumor surge podem trazer maior risco ao paciente, devendo-se adotar as medidas de tratamento o mais rápido possível. Entretanto ainda há uma grande dificuldade de diagnóstico possibilitando realizar o prognóstico do paciente, levando tumores que apesar de serem menos recorrentes,

se tornarem os mais agressivos, como por exemplo o câncer cerebral (ALMEIDA *et al.*, 2005; SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2020)

O Instituto Nacional de Câncer (INCA) apresentou um relatório estimando o aparecimento de 5.870 casos novos de câncer do sistema nervoso central em homens e 5.230 em mulheres, para cada ano do triênio 2020-2022 no Brasil (Figura 1). Apesar de não serem os tumores mais incidentes no sexo masculino, por exemplo, esses são os tipos de tumores que mais levarão à óbito, tornando necessário uma análise cuidadosa sobre as características de cada tumor e a pesquisa de novas abordagens de tratamento, visto que as atuais não apresentam eficácia e muitas vezes ocorrendo recidiva (BECHET *et al.*, 2014; INCA, 2020; SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2020).

O câncer cerebral é um dos mais agressivos tumores, levando muitos pacientes e familiares à depressão ou instabilidade emocional por conta do diagnóstico tardio, curto tempo de sobrevida e baixa qualidade de vida, principalmente durante o tratamento. Representam a segunda causa mais comum de morte por câncer entre os jovens e ocupa o sexto lugar na perda de anos produtivos. Dentre os tumores cerebrais mais comuns encontram-se os gliomas (70%), e dentro dessa classe os GS (BECHET *et al.*, 2014; HAMBSCHE *et al.*, 2017).

## 2.2 Gliossarcoma

O GS é um tumor derivado do GB, um tipo de glioma mais fácil de ser identificado. Apesar de seu comportamento clínico e suas características radiológicas serem parecidos, quando são realizados estudos histopatológicos e de expressão genética é possível observar diferenças, levando à conclusão de que a partir do GB originou-se o GS (DARDIS *et al.*, 2021; YOSHIDA *et al.*, 2018).

O GS é descrito como uma combinação de células gliais neoplásicas e elementos mesenquimais, correspondendo somente de 2 a 8% dos gliomas de alto grau. Atinge frequentemente o lobo temporal, sendo predominantemente diagnosticado na faixa etária entre 40 e 60 anos de idade, com tendência para o sexo masculino. Apresenta IDH selvagem e altas chances de causar metástases extracranianas quando comparado ao GB (KRUSE; PEERBOOM, 2018; WANG *et al.*, 2020).

Contém prognóstico desfavorável, proporcionando ao paciente sobrevida ao redor de meses. Seus sintomas clínicos quase sempre são acompanhados de

convulsões e fortes dores de cabeça. Assim como GB, também é dividido em dois subtipos: um mais delimitado, semelhante ao meningioma, e um mais invasivo, como o GB (CASTELLI *et al.*, 2016; VEGA *et al.*, 2014).

Estudos realizaram análises quanto à diferença de expressão de determinados genes no GB e GS. Foi observado que a mutação p53 é vista em 23% dos GS contra 11% dos GB e que a amplificação do receptor de fator de crescimento epidérmico (EGFR) é encontrada em apenas 4% dos GS, enquanto no GB está em torno de 35%. Além disso, a mutação do IDH e a metilação do gene MGMT (O6-methylguanine-DNA methyltransferase) indicam um prognóstico favorável ao GB, enquanto no GS esses fatores não são observados. No geral o GS é caracterizado como uma forma mais rara e agressiva do GB, visto que clinicamente ambos acabam sendo abordados com o mesmo método de tratamento (HASHMI *et al.*, 2018; KRUSE; PEEREBOOM, 2018; OH *et al.*, 2016).

### 2.3 Tratamento

A abordagem de tratamento convencional consiste na avaliação primária da possibilidade de redução da massa tumoral pelo processo cirúrgico, visto que esse procedimento se trata de um método eficiente na eliminação das células malignas, minimizando o risco de comprometer partes essenciais para o funcionamento do cérebro, dependendo da sua localização, por exemplo. A fim de se otimizar a ressecção cirúrgica, atualmente pode ser utilizados fluoróforos durante o procedimento atuando como guia emitindo fluorescência para identificar com clareza a região tumoral (AHMED *et al.*, 2019; ISHIKAWA *et al.*, 2015).

Entretanto, tendo em vista o caráter infiltrativo, invasivo e metastático do GS, somente esse procedimento não é suficiente para garantir a cura do paciente, além de ter um risco de atingir funções motoras e linguísticas, impactando sua qualidade de vida. Sendo assim, é necessário a aplicação de terapias adjuntas, combinando a radioterapia e quimioterapia, as quais se destacam por eliminar grande parte das células neoplásicas remanescentes (CASTELLI *et al.*, 2016; HUO *et al.*, 2014).

O processo de radioterapia baseia-se na utilização de radiação ionizante aplicada visando eliminar as células malignas e controlar o crescimento do tumor. Uma das vantagens da radioterapia é que com a redução da região tumoral, muitos efeitos provocados pelo seu crescimento são aliviados, podendo aumentar a sobrevida em

até 15 semanas, todavia a radioterapia apresenta diversas limitações e a aplicação de altas doses de radiação pode desencadear efeitos adversos durante o período de tratamento (ALMEIDA *et al.*, 2005; PEREIRA; MAIA, 2016; WANG *et al.*, 2020).

A quimioterapia baseia-se na utilização de um fármaco que tem como alvo principal o dano direto ao DNA. Para o tratamento do GS foi observado que o fármaco mais utilizado é a temozolomida (TMZ), visto que é um dos poucos quimioterápicos que apresentam capacidade de ultrapassar a barreira hematoencefálica e meninges. Entretanto, apesar de diminuir significativamente a região tumoral, a aplicação da quimioterapia não é seletiva, tornando o tratamento agressivo, afetando as células alvo e podendo comprometer as células saudáveis do tecido adjacente, proporcionando numerosos efeitos colaterais e debilitando a saúde do paciente. Além disso, com a aplicação de diversas doses do quimioterápico, as células malignas que apresentam alta capacidade de gerar mutações desenvolvem mecanismos de resistência e se tornam mais difíceis de serem eliminadas (ROCHA, 2015; TIRAPELLI *et al.*, 2011).

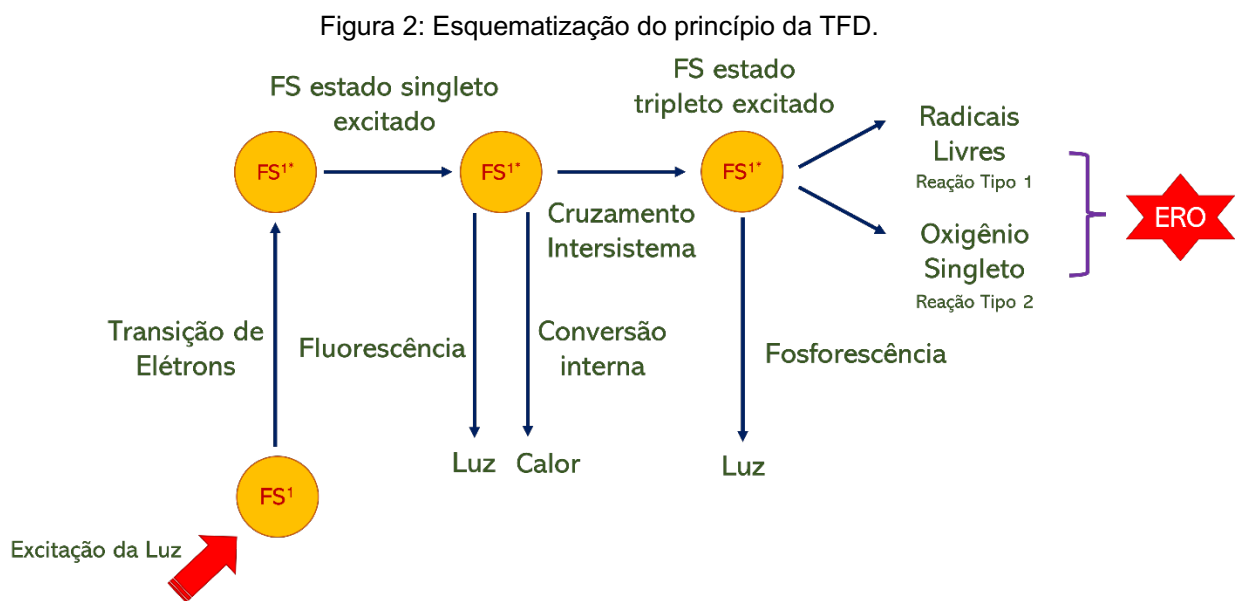
Sendo assim, o paciente perde qualidade de vida com desses métodos de tratamento, que por vezes podem não ser eficientes no combate ao câncer, favorecendo o surgimento de recidiva do tumor. Esses fatores são alguns dos mais relevantes para o incentivo de novas pesquisas em busca do tratamento ideal. Baseado nessa problemática, o estudo da Terapia Fotodinâmica (TFD) como tratamento para o câncer vêm sendo analisado cuidadosamente e já apresenta permissão de uso clínico para o câncer de pulmão, câncer de mama, hepatocarcinoma, entre outros, nos Estados Unidos (SANTOS *et al.*, 2019; NATH; OBAID; HASAN, 2019).

## **2.4 Terapia fotodinâmica**

A TFD é empregada no uso clínico de diversas patologias dermatológicas, oftalmológicas e vem sendo utilizada para o tratamento de câncer. Seu conceito é aplicado desde muito tempo, entretanto somente em 1900 seu uso passou a ser alvo de estudos quando o cientista Oscar Raab observou a morte de espécies de *Paramecium* expostos acidentalmente ao corante laranja de acridina combinada com a luz solar. A partir dos resultados promissores, diversas pesquisas passaram foram

realizadas na busca de um método de tratamento eficaz e que produza menos efeitos colaterais para o paciente com câncer (MANSOORI *et al.*, 2019).

A TFD se baseia na interação de três componentes essenciais e não tóxicos quando isolados: FS, O<sub>2</sub> molecular e luz em comprimento de onda correspondente ao espectro de absorção do FS. Quando o FS é internalizado pela célula e ocorre a incidência de luz no local, uma reação será desencadeada permitindo a interação do FS excitado com o O<sub>2</sub>. De maneira geral, o elétron externo do FS é excitado do estado fundamental (S<sub>0</sub>) para o primeiro estado excitado de curta duração (S<sub>1</sub>), nesse estado o FS pode perder energia pela emissão de luz fluorescente ou por conversão interna de calor ou pode sofrer o cruzamento intersistema, no qual a molécula passa para um estado excitado de tempo de vida longo (T<sub>1</sub>). A partir desse estado, o FS pode perder energia pela emissão de luz fosforescente ou reagir fotoquimicamente por meio de dois tipos de reações (AGOSTINIS *et al.*, 2011; MANSOORI *et al.*, 2019).



Fonte: O autor.

Na reação tipo um ocorre a transferência de elétrons pela interação do FS com as moléculas circundantes, proporcionando a criação de radicais livres que apresentam potencial de reação com biomoléculas (ex: lipídios e proteínas), levando a destruição dessas e gerando mais radicais livres; já pela reação tipo dois há a transferência direta de energia do FS para o oxigênio no estado fundamental, permitindo a geração de oxigênio singlete, altamente reativo, oxidante e transitório (MANSOORI *et al.*, 2019; DENIS *et al.*, 2011).

Com a formação dessas ERO, diversos mecanismos de morte celular podem ser desencadeados, como: citotoxicidade direta nas células alvo, levando à morte celular pelas vias de necrose ou apoptose, por exemplo; destruição da microvasculatura, eliminando o suporte nutricional das células tumorais; e a estimulação da resposta inflamatória e imunológica, permitindo a ativação de células da série branca no combate às células malignas sobreviventes. Devido ao curto período de vida útil das ERO, o dano proporcionado pela TFD é local e limitado à região irradiada, caracterizando o processo como uma terapia mais seletiva (LOBO *et al.*, 2020; MANSOORI *et al.*, 2019; DENIS *et al.*, 2011)

O uso da TFD no tratamento de câncer é permitido em alguns países e para cânceres de fácil acesso, atuando de forma curativa e paliativa. Sua aplicação pode se dar tanto de forma isolada, como combinada com outros métodos de tratamento. Para o sucesso da terapia diversos fatores devem ser avaliados, sendo um deles a utilização do FS mais adequado para o tratamento daquela doença. Dessa forma, as pesquisas atuais buscam encontrar o FS mais apropriado para ser utilizado em cada tipo de câncer, avaliando, por exemplo, a menor concentração combinada com a menor fluência de luz necessária para que a terapia apresente resultados promissores (BERNAL *et al.*, 2015).

## **2.5 Fotossensibilizador**

A escolha do FS a ser utilizado no tratamento é uma das etapas mais importantes para o sucesso da TFD. Assim como os quimioterápicos, cada fármaco fotossensível interage de forma diferente com cada tipo de célula, entretanto existem pré-requisitos que devem ser avaliados para possibilitar a continuação dos estudos referentes àquele FS (DE ALMEIDA *et al.*, 2020).

Algumas das características que devem ser observadas são: (1) absorção em comprimentos de ondas entre 600 nm e 750 nm, visto que são regiões que proporcionam uma penetração entre 5 mm a 20 mm, gerando um efeito terapêutico adequado; (2) baixa citotoxicidade na ausência de luz, (3) alta afinidade pelo tecido tumoral; (4) rápida internalização pelas células, (5) alta capacidade de geração de ERO quando realizado a TFD, (6) rápida depuração do organismo e fotossensibilidade não prolongada e (7) baixa agregação em tecidos biológicos (DE OLIVEIRA *et al.*, 2015).

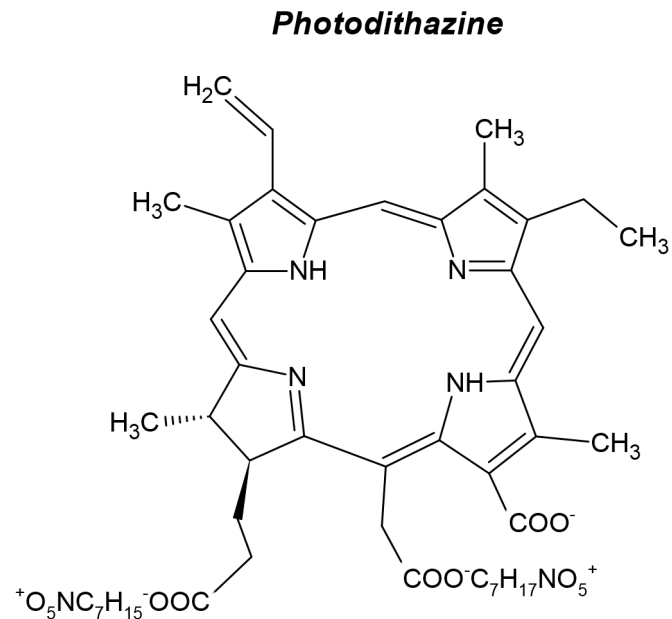
O FS quando em contato com as células poderá ser internalizado tanto pelas células saudáveis como pelas células cancerígenas, entretanto o FS é rapidamente eliminado das células sadias, visto que essas apresentam alta permeabilidade dos vasos sanguíneos e alta drenagem linfática, ao contrário das células tumorais, viabilizando o emprego da TFD como método seletivo de tratamento (SETLIK; CÁSSIO, 2015).

Existem diversos tipos de FS, como por exemplo as porfirinas, clorinas, ftalocianinas, nanopartículas conjugadas a um FS, alguns corantes, como o Azul de Metileno, entre outros. Cada uma dessas categorias apresentam suas vantagens e desvantagens, por exemplo, as ftalocianinas e as nanopartículas apresentam elevado custo de produção; os corantes apresentam limitações de utilização para tecidos profundos; e as porfirinas apresentam tempo prolongado de depuração do corpo e baixa seletividade para o tecido tumoral (DE OLIVEIRA *et al.*, 2015; SETLIK; CÁSSIO, 2015).

Visando contornar essas desvantagens das porfirinas, desenvolveram-se as clorinas. Elas podem ser derivadas de porfirinas reduzidas, de plantas ou puramente sintéticas. No geral apresentam uma banda maior de absorção, rápida depuração do corpo, baixa agregação e rápida internalização. Algumas clorinas que estão sendo estudadas e apresentam resultados promissores são o Foscan, Photochlor e o Photodithazine (PDZ) (ONO, 2016; SETLIK; CÁSSIO, 2015).

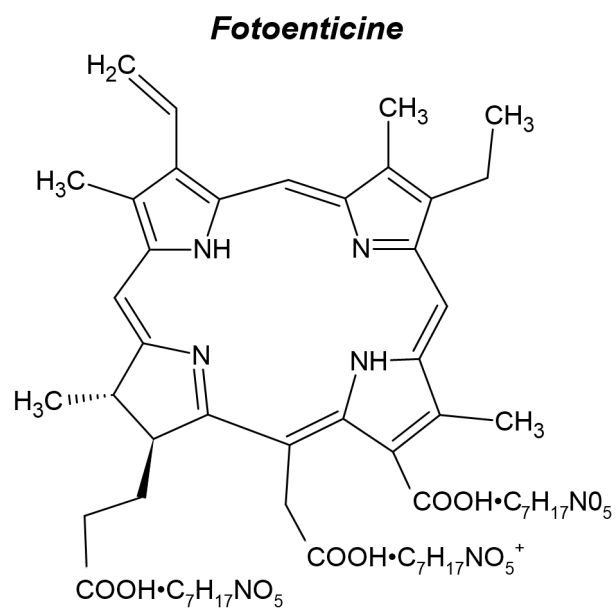
O PDZ é um derivado de clorina e6, de origem russa, produzido a partir da *Spirulina platensis*, com adição de N-metil-D-glucamina 0,5% como agente solubilizante e estabilizante, de modo que essa clorina seja hidrossolúvel. Seu uso já é aprovado em alguns países, apresenta estudos clínicos que demonstram excelentes resultados na redução do conteúdo tumoral e também foi observado atuando na área microbiológica como potente FS (ONO, 2016; SETLIK; CÁSSIO, 2015).

Figura 3: Estrutura Química do PDZ.



Outra clorina que vêm ganhando espaço na pesquisa como potencial FS é o Fotoenticine (FTC). Essa clorina sintética foi desenvolvida por uma empresa espanhola, apresenta ações antimicrobianas e resultados promissores quando utilizado na TFD com linhagem celular de gliossarcoma (DE ALMEIDA *et al.*, 2020).

Figura 4: Estrutura Química do FTC.



Os efeitos desencadeados após a aplicação da TFD são nossos objetos de estudo, entre eles a alteração da adesão celular, característica do processo de morte celular quando a célula tem sua estrutura de sustentação danificada, sendo assim uma etapa importante para avaliar se a terapia está desencadeando processos-chaves que permitem a morte da célula maligna.

## 2.6 Proteínas de Choque Térmico

As proteínas de choque térmico, do inglês *Heat Shock Proteins* (HSP), são normalmente superexpressas frente a algum estresse celular, assumindo a posição de proteção e auxiliando as células a combater possíveis danos. Esse grupo de proteínas faz parte da família das proteínas chaperonas molecular, responsáveis por interagir com outras proteínas auxiliando na formação, dobramento e transporte trans-membrana. (CASTRO *et al.*, 2013; SOARES *et al.*, 2019).

Apesar do nome, as HSP podem ser induzidas por infecção, inflamação, estresse oxidativo ou hipóxia, por exemplo. Sua diferenciação ocorre pelo peso molecular, em que suas quatro principais classes são 27 kDa (HSP27), 60 kDa (HSP60), 70 kDa (HSP70) e 90 kDa (HSP90) (BUTTROS; ORSATTI; NAHAS, 2018).

A elevação da expressão das HSP tem se mostrado uma resposta frequente após a aplicação da TFD, já que a célula maligna sofre um estresse oxidativo, permitindo com que os mecanismos de defesa das células sejam ativados. Entretanto, quando a TFD é utilizada em parâmetros capazes de reduzir significativamente a porcentagem de células viáveis, a produção das HSP podem ser inibidas e proporcionar a cascata de eventos que definem o processo de morte (RODRÍGUEZ *et al.*, 2016; SOARES *et al.*, 2019)

Seu estudo na TFD é de extrema importância para complementar os dados sobre a eficácia do tratamento, visto que quando essas proteínas se apresentam no meio extracelular, por exemplo, podem indicar o desencadeamento da morte celular, induzindo até mesmo a resposta inflamatória e ativando macrófagos pelo sistema imune (BUTTROS; ORSATTI; NAHAS, 2018; RODRÍGUEZ *et al.*, 2019).

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 Linhagem Celular

Nesse projeto foram utilizadas células de gliossarcoma, provenientes de tecido cerebral de ratos (*Rattus norvegicus*) com morfologia fibroblástica de linhagem 9L/lacZ (BCRJ® CRL-2200TM), e células de fibroblastos murinos originários de tecido conjuntivo linhagem L929 fornecidos pela Gibco®, mantidas em meio DMEM (Gibco) com F12 (Gibco), suplementado com 10% Soro Fetal Bovino, 1% de solução de Penicilina/Estreptomicina (LGC Biotecnologia), acondicionados em estufa de cultura a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>.

#### 3.2 Fotossensibilizador

Para o estudo, foi utilizado a clorina espanhola Fotoenticine (FTC), da empresa Nuevas Tecnologías Científicas – NTC - Llanera (Asturias) e a clorina russa Photodithazine (PDZ), produzida pela Veta-Grand®, ambas concedidas pelo Instituto de Física de São Carlos – USP São Carlos. O FTC apresenta massa molar calculada a partir da estrutura de aproximadamente 1185 g.mol<sup>-1</sup> e o PDZ tem a massa molar de 987,1 g.mol<sup>-1</sup>, informação fornecida pelo fabricante Veta-Grand®. Comercialmente apresentam-se na concentração de 7,1 mg.mL<sup>-1</sup> e 5 mg.mL<sup>-1</sup> respectivamente, e para esse estudo foram utilizadas nas concentrações de 50,00 µg.mL<sup>-1</sup>, 12,50 µg.mL<sup>-1</sup> e 1,55 µg.mL<sup>-1</sup>, diluídas em PBS, Tampão fosfato-salino do inglês “Phosphate-buffer saline”, nos quais as duas primeiras foram previamente estudadas em projetos realizados anteriormente pelo laboratório (DE ALMEIDA *et al.*, 2020; VITORIO *et al.*, 2021), com a inserção de uma menor concentração. O PDZ e o FTC foram mantidos no escuro durante o processo e armazenado a 4°C.

#### 3.3 Fontes de luz

Foi utilizado um dispositivo à base de LED (Biopdi/Irrad-Led 660) com emissão de luz na região de 660 nm. O dispositivo é formado de 54 LEDs, com 70 mW de potência. Inicialmente foram utilizadas três fluências: 1 J/cm<sup>2</sup>, 5 J/cm<sup>2</sup> e 10 J/cm<sup>2</sup> na

irradiância de 25 mW/cm<sup>2</sup>. Posteriormente foi escolhido a melhor fluência de luz identificada pelos testes de citotoxicidade.

Tabela 1: Parâmetros de Irradiação.

| Fluência (J/cm <sup>2</sup> ) | Irradiância (mW/cm <sup>2</sup> ) | Tempo de irradiação |
|-------------------------------|-----------------------------------|---------------------|
| 1                             | 25                                | 40s                 |
| 5                             | 25                                | 3min20s             |
| 10                            | 25                                | 6min40s             |

Fonte: O autor.

### 3.4 Análise dos Espectros de Absorção

Para observar o efeito da interação da luz com os FS foi realizado uma análise comparativa dos espectros antes e após irradiação, utilizando o equipamento Espectrofotômetro DeNovix, na região UV-Visível, para quantificar as bandas de absorção, cujo caminho óptico é de 1 cm. Para melhor organização do experimento, 10 µL dos FS foram transferidos para 3 placas de 96 poços nas concentrações de 50,00 µg.mL<sup>-1</sup>, 12,50 µg.mL<sup>-1</sup> e 1,55 µg.mL<sup>-1</sup>, porém o equipamento necessita apenas de 2 µL para obter a leitura do espectro.

Primeiramente foi realizada a medida das bandas de absorção dos FS mantidos no escuro. Depois as placas foram submetidas a irradiação com 3 fluências de luz diferentes para cada placa (1 J/cm<sup>2</sup>, 5 J/cm<sup>2</sup> e 10 J/cm<sup>2</sup>) e foi realizada uma nova medida de absorção imediatamente após a irradiação. Após essa etapa, a placa foi acondicionada em estufa a 37°C e os FS foram avaliados novamente 18h após a irradiação, tempo utilizado nesse estudo para verificar os efeitos da TFD. Os dados foram convertidos em gráficos e comparados em seus diferentes grupos experimentais.

### 3.5 Internalização dos FS pela linhagem 9L/lacZ

Em placas de 24 poços com lamínulas redondas ao fundo, foram transferidas 1x10<sup>5</sup> células, 24h antes do experimento. Um poço representava o grupo controle, sem FS, e os outros tiveram a adição do FTC e do PDZ.

As células foram incubadas com os FS por 1h em estufa a 37°C. Após esse período o FS foi retirado, os poços lavados uma vez com PBS a temperatura ambiente

e adicionados 100 µl de paraformaldeído 4% (Dinâmica Química Contemporânea LTDA), para fixação celular, deixados por 10 minutos. O paraformaldeído foi retirado e os poços lavados mais uma vez com PBS. Sobre uma lâmina foi adicionado uma gota do *Prolong* com marcador nuclear DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride) (Invitrogen - Thermo Fisher Scientific), para cada grupo experimental. Todo o processamento foi realizado no escuro e as lâminas examinadas em microscópio confocal LSM 700 Zeiss. Para o marcador DAPI foi utilizada excitação em 405 nm e emissão captada em 461 nm, já para as clorinas foi utilizado para excitação o laser de 488 nm e emissão captada acima de 500 nm.

### **3.6 Ensaios de citotoxicidade do FS**

Todos os ensaios de citotoxicidade foram realizados em triplicata, em placas de 96 poços, com uma concentração celular de  $1 \times 10^4$  células/poço. Para cada experimento havia pelo menos duas placas, uma representando o grupo escuro e a outra o grupo claro. O grupo escuro permite a análise da citotoxicidade do FS em seu estado fundamental, ou seja, verifica se ele sozinho é capaz de desencadear algum processo de morte celular em contato com as células. O grupo claro corresponde a TFD, onde observamos se a combinação dos três elementos da terapia desencadeia os processos de morte celular.

Foi aguardado cerca de 24h para a adesão das células plaqueadas. Após esse período, os FS foram incubados por 1h em estufa à 37°C, na ausência de luz. Para o grupo escuro, após esse período, foi retirado o FS em contato com as células e adicionado meio de cultura. Já para o grupo claro, após a incubação, o FS foi retirado, foram adicionados 100 µL de PBS em cada poço e placa irradiada de acordo com a fluência de luz desejada. Após a irradiação, o PBS foi retirado e adicionou-se o meio de cultura. Os testes foram analisados após 18h da irradiação.

### **3.7 Análise da viabilidade e aderência celular pelo método de exclusão com Azul de Tripán**

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

Esse teste foi realizado tanto na linhagem 9L/lacZ como na L929, para observar os efeitos da TFD nas células malignas e saudáveis.

Após 18h da irradiação, o meio de cultura de cada poço foi transferido para eppendorfs, para analisar a viabilidade de células que perderam a adesão durante esse período. Os eppendorfs foram centrifugados a 1050 RCF por 10 min. O pellet formado foi ressuspenso em 30  $\mu$ L de solução de azul de Tripán (Sigma®) a 0,2%. Após 5 minutos de incubação, foi adicionado 10  $\mu$ L do eppendorf em uma câmara de Neubauer para contagem das células.

Para as células aderidas na placa, foram adicionados 70  $\mu$ L de solução de azul de Tripán 0,2% em cada poço. Após 5 minutos, a solução de azul de Tripán foi retirada e adicionado 100  $\mu$ L de PBS.

Os poços foram fotografados por meio de câmara 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, por meio do software ImageJ® (Plugins – Analyze – Cell Counter).

A análise da alteração da aderência celular após TFD foi realizada quantitativamente e qualitativamente por meio das imagens obtidas.

### **3.8 Análise da atividade mitocondrial**

A atividade mitocondrial foi avaliada por meio do teste de MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5diphenyltetrazoliumbromide) (Invitrogen - Thermo Fisher Scientific), que consiste na redução do sal de MTT em cristais de Formazana, por células viáveis.

Após 18 h da realização dos tratamentos, foi adicionado a cada poço 50  $\mu$ L de MTT diluído em PBS ( $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), suavemente agitado e incubado por 3 h a 37 °C em atmosfera umidificada na ausência de luz. Após esse período, foi retirado a solução de MTT e acrescentado 100  $\mu$ L de DMSO (Dimethyl sulfoxide) (LGC Biotencologia) em cada poço para a solubilização dos cristais de formazan.

A densidade óptica foi medida em leitor óptico de microplaca (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:

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

Em que Abs células tratadas corresponde à absorvância das células submetidas à TFD, Abs branco corresponde à absorvância do DMSO e Abs controle corresponde à absorvância do grupo controle daquela triplicata.

### 3.9 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Foram plaqueadas  $1 \times 10^5$  células em 2 placas de 24 poços com lamínulas redondas ao fundo: uma placa representava o grupo escuro e a outra o grupo claro, irradiado na fluência de  $5 \text{ J/cm}^2$ . Após 18h da TFD, as células foram lavadas com PBS uma vez e fixadas durante 1h com uma solução específica para MEV contendo Glutaraldeído 2,5% (Dinâmica Química Contemporânea LTDA), Paraformaldeído 4,0% (Dinâmica Química Contemporânea LTDA), Tampão cacodilato (Electron Microscopy Sciences) 0,1M, Cloreto de cálcio 1mM (estoque 50 mM) (Sigma) e  $\text{H}_2\text{O}$  osmose. Após esse período, as células foram lavadas três vezes com tampão cacodilato 0,1 M e pós fixadas com Ósmio (Electron Microscopy Sciences) por 30 min. Novamente as células foram lavadas com tampão cacodilato 0,1 M, por três vezes, sendo cada vez incubada por 10 min, e posteriormente foram desidratadas com etanol seguindo a sequência:

- a. 15 min com álcool 70%
- b. 15 min com álcool 90%
- c. 15 min com álcool 100% (repetido 4x).

Após esse processo, foi adicionado uma gota de HDMS (hexadimetil disilazona) (Electron Microscopy Sciences) e as lamínulas secaram em ambiente seco e fechado à temperatura ambiente. Posteriormente foram metalizadas na Metalizadora Emitech K550X com metal de ouro, no tempo de 2min e potência de 25mA. A captura das imagens foi realizada pelo equipamento MEV EVO MA 10 Zeiss Acoplado EDX da Central de Laboratórios Multiusuários do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba.

### **3.10 Extração e análise da imunodeteção das proteínas heat shock proteins (HPS) HSP27 e HPS 70**

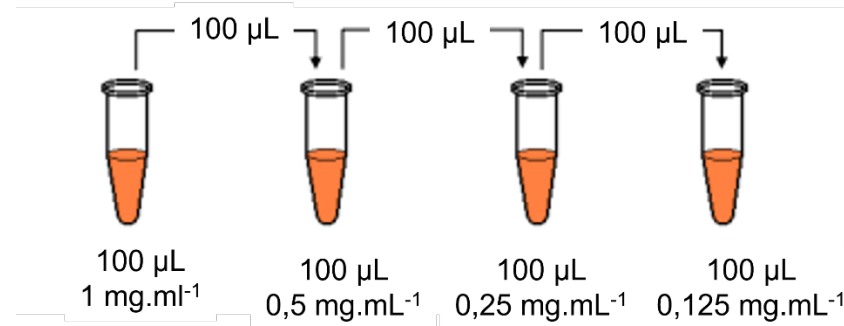
#### ***3.10.1 Extração das proteínas***

Foram plaqueadas  $1 \times 10^5$  células em placas de 6 poços e aguardados de cinco a sete dias para o crescimento das células sobre toda a extensão dos poços, realizando a troca do meio de cultura a cada dois dias. Após esse processo, as células foram submetidas à TFD e incubadas por 18h após tratamento. Os poços foram lavados uma vez com PBS gelado, as células de cada poço foram raspadas e transferidas para tubos de 15 mL. Os tubos foram centrifugados por 10 min a 1050 RFC, foi descartado o sobrenadante e adicionado 1 mL de solução Tampão RIPA (Solução Base: Tris 50 mM (BioAgency); NaCl (Sigma) 150 mM e EDTA 1mM (AnalytiCals); Detergentes: Triton-X 100 (Sigma), NP 40 (Sigma) E SDS 0,1% (Invitrogen); Inibidores de Proteases: Aproptinina  $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$  (Sigma), PMSF e Leupctina  $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$  (Sigma); Inibidores de Fosfatase: Ortovanato de Sódio 10 mM (Sigma)), ressuspendido no pellet e incubado por 30min a  $4^\circ\text{C}$  em banho de gelo. Após incubação as células foram centrifugadas por 20min a  $4^\circ\text{C}$  em 15.777 G. O sobrenadante foi transferido para microtubos e foi realizada a quantificação de proteínas totais pelo Método de Bradford.

#### ***3.10.2 Padronização das proteínas***

Foi preparado uma solução de BSA a  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$  e realizado as diluições seriadas em  $\text{H}_2\text{O}$  (Milli-Q) para a obtenção das demais concentrações ( $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ ;  $0,25 \text{ mg.mL}^{-1}$  e  $0,125 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) procedendo como demonstrado no esquema abaixo.

Figura 5: Ilustração da forma do método de diluição seriada realizada para a quantificação pelo Método de Bradford.



Fonte: O autor.

Posteriormente, foram adicionados em uma placa de 96 poços 2 µL de cada amostra diluída (1:10 ou mais) com 158 µL água Milli-Q e 40 µL reagente de Bradford. As amostras foram incubadas a temperatura ambiente por 5 minutos e foi mensurada a absorção no Espectrofotômetro (SpectraCount Packard) com filtro em 570 nm.

### 3.10.3 Quantificação das proteínas totais e de HSP relativo

Após a obtenção desses dados, foi realizado o cálculo de concentração de proteínas totais, tirando a média das absorbâncias de cada grupo e relacionando essa média com a concentração de albumina gerada na diluição seriada. Foi gerado um gráfico de dispersão e obtido a equação da reta referente aos dados obtidos, o qual permitiu a quantificação das proteínas de cada teste.

Posteriormente, foi adicionado em duas placas de 96 poços os antígenos que foram sensibilizados (HSP27 e HSP70, um em cada placa). O antígeno foi diluído em tampão bicarbonato 0,1 m pH = 9,0 e adicionado em cada poço 100 µL de solução tampão e a amostra na concentração de 10 µg, deixado em agitação por 5 min e descansado “overnight”.

As placas foram lavadas com PBS-Tween 0,02% duas vezes, posteriormente foram “bloqueadas” com a solução PBSTL [PBS-Tween 0,02% (1000 mL) (Synth) + leite (3g)], agitadas e incubadas na estufa 37°C durante 1 h. As placas foram novamente lavadas duas vezes com PBSTL e aplicado o anticorpo primário diluído em PBSTL, que foi agitado e incubado na estufa 37°C por mais 1 h. Posteriormente as placas sofreram mais três lavagens com PBSTL e foi aplicado o anticorpo secundário em PBSTL, que foi agitado e incubado em por 1 h em estufa à 37°C. As

placas foram lavadas três vezes com PBS-Tween 0,02% e foi aplicado a solução Orto-fenilenodiamina dihidroclorato (OPD) (Merk) por 30 min em câmara escuro. Posteriormente foi adicionado 50 µl de HCl 0,1 M, para parar a reação, e a leitura foi realizada no Espectrofotômetro (SpectraCount Packard) com filtro em 490 nm.

### **3.11 Análise Estatística**

Os dados provenientes dos testes acima citados foram submetidos ao teste ANOVA – one way (BioEstat 5.0), utilizando como nível de significância  $\alpha = 0,05$ .

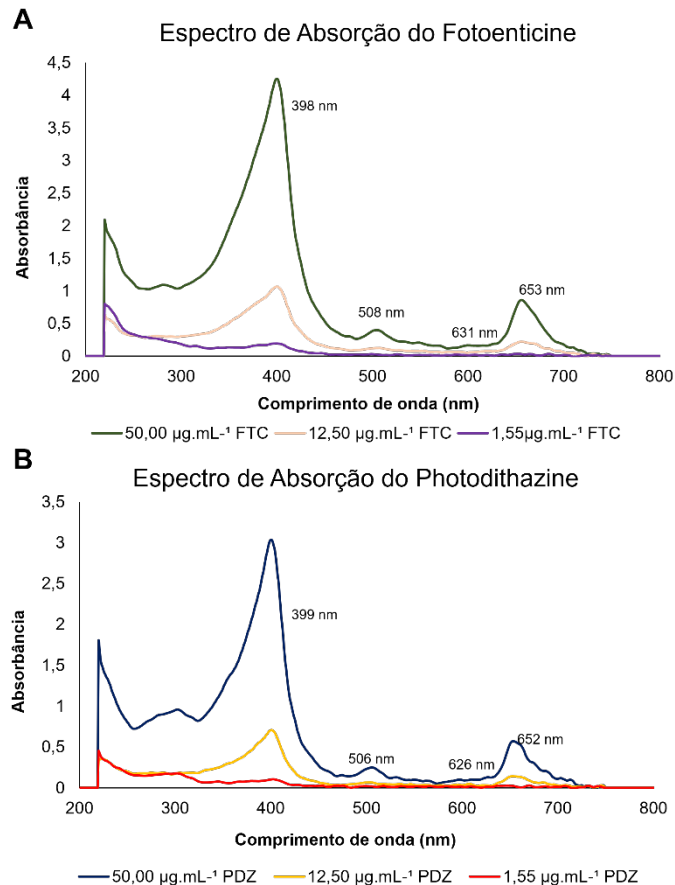
## 4 RESULTADOS

### 4.1 Análise dos Espectros de Absorção

Os espectros de absorção do FTC e do PDZ demonstraram bandas de absorção com absorvância máxima na região de 400 nm, correspondendo à banda de Soret, e 3 bandas Q em torno de 500 a 700 nm (Figura 6).

Quanto menor a concentração do FS, menor é a intensidade das bandas, sendo assim, podemos observar que a menor concentração utilizada neste estudo apresentou formação de bandas com intensidade baixa, tanto na banda de Soret, como nas 3 bandas Q. Conseguimos identificar a banda na região do 400 nm, que é uma banda de maior intensidade, entretanto a banda na região do 660 nm é quase imperceptível. Além disso, a intensidade das bandas do FTC foi maior do que a do PDZ.

Figura 6: Espectro de Absorção das clorinas. A – Espectro de Absorção do FTC nas concentrações de  $50,00 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ,  $12,50 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e  $1,55 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . B - A – Espectro de Absorção do PDZ nas concentrações de  $50,00 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ,  $12,50 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e  $1,55 \mu\text{g.mL}^{-1}$ .

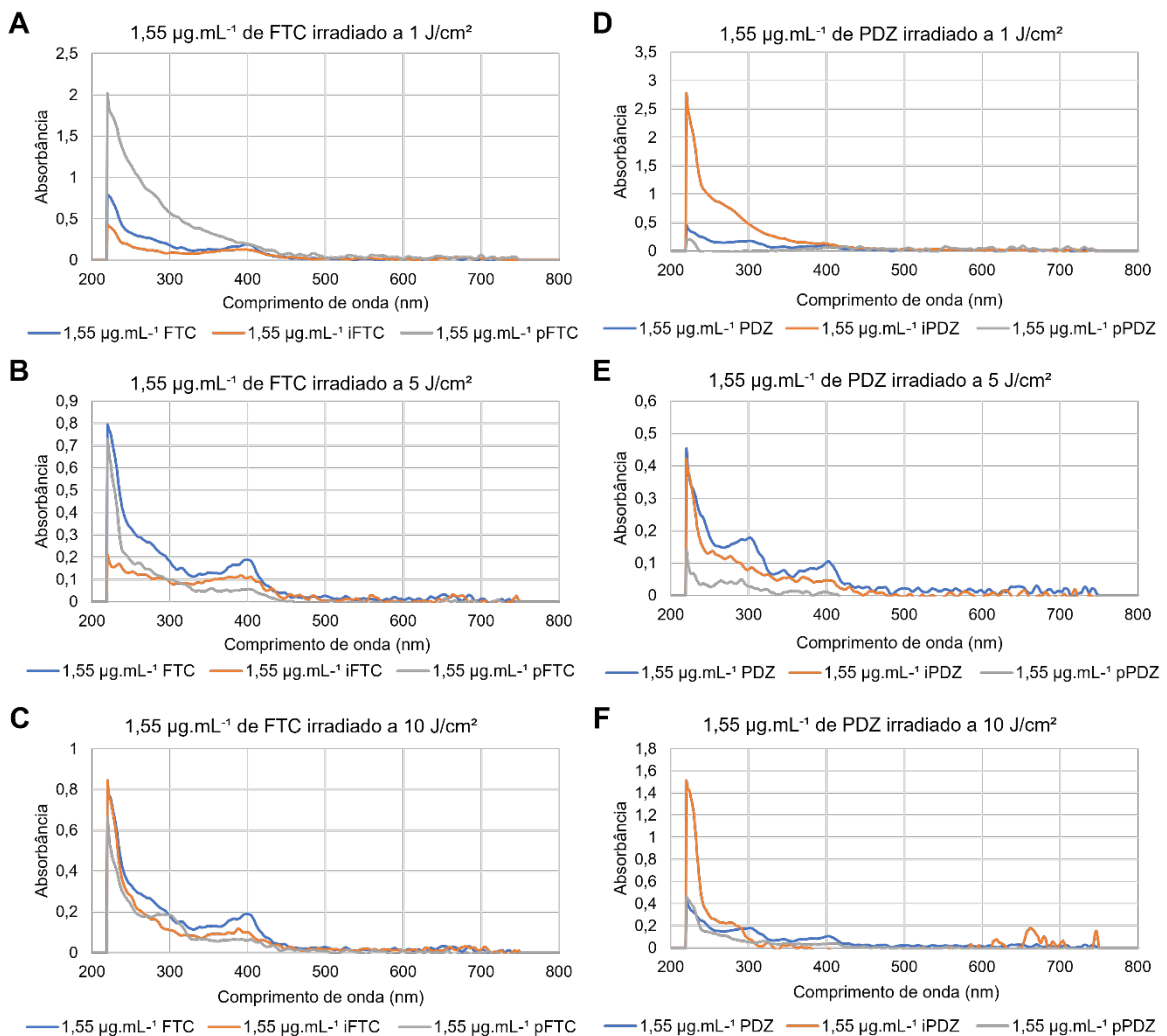


Fonte: O autor.

Após imediata exposição à luz, os espectros de absorção do FTC e do PDZ apresentaram redução da intensidade, com decaimento contínuo após 18h da irradiação.

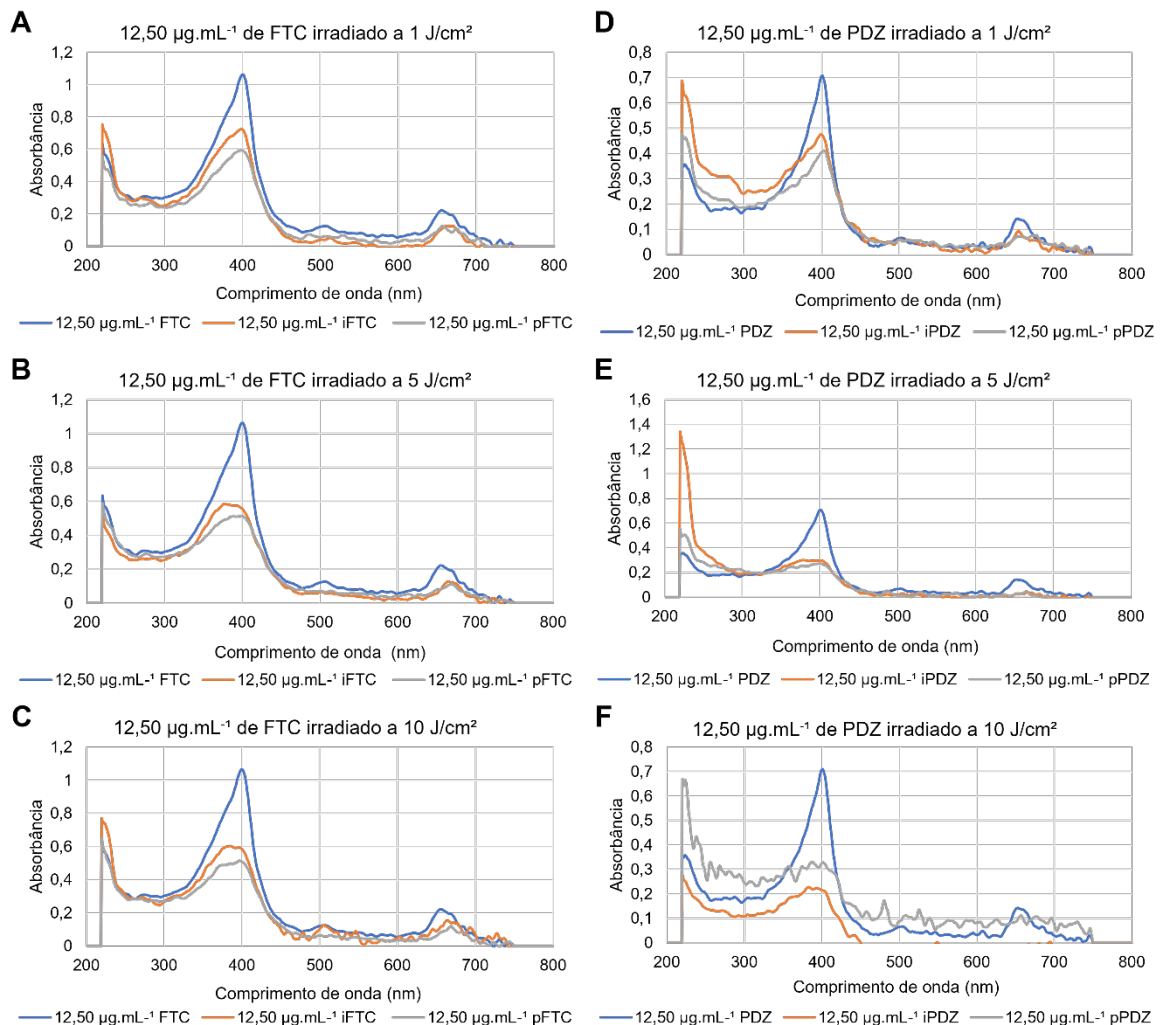
Além disso, apresentaram deslocamento para a direita na banda próxima a região do 660 nm, comprimento de onda utilizado na irradiação para o processo da TFD em células da linhagem 9L/lacZ. Esse deslocamento foi observado nitidamente na concentração de  $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$  em todas as fluências de luz utilizadas, tanto na análise imediata após irradiação, como na análise após 18h de irradiação (Figura 7 a Figura 9).

Figura 7: Comparação dos espectros de absorção do FTC e do PDZ na concentração de  $1,55 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , antes, imediatamente após irradiação (iFTC e iPDZ) e 18h após irradiação (pFTC e pPDZ). A – FTC e fluência de  $1 \text{ J/cm}^2$ ; B – FTC e fluência de  $5 \text{ J/cm}^2$ ; C – FTC e fluência de  $10 \text{ J/cm}^2$ ; D – PDZ e fluência de  $1 \text{ J/cm}^2$ ; E – PDZ e fluência de  $5 \text{ J/cm}^2$ ; F – PDZ e fluência de  $10 \text{ J/cm}^2$ .



Fonte: O autor.

Figura 8: Comparação dos espectros de absorção do FTC e do PDZ na concentração de  $12,50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , antes, imediatamente após irradiação (iFTC e iPDZ) e 18h após irradiação (pFTC e pPDZ). A – FTC e fluência de  $1 \text{ J}/\text{cm}^2$ ; B – FTC e fluência de  $5 \text{ J}/\text{cm}^2$ ; C – FTC e fluência de  $10 \text{ J}/\text{cm}^2$ ; D – PDZ e fluência de  $1 \text{ J}/\text{cm}^2$ ; E – PDZ e fluência de  $5 \text{ J}/\text{cm}^2$ ; F – PDZ e fluência de  $10 \text{ J}/\text{cm}^2$ .

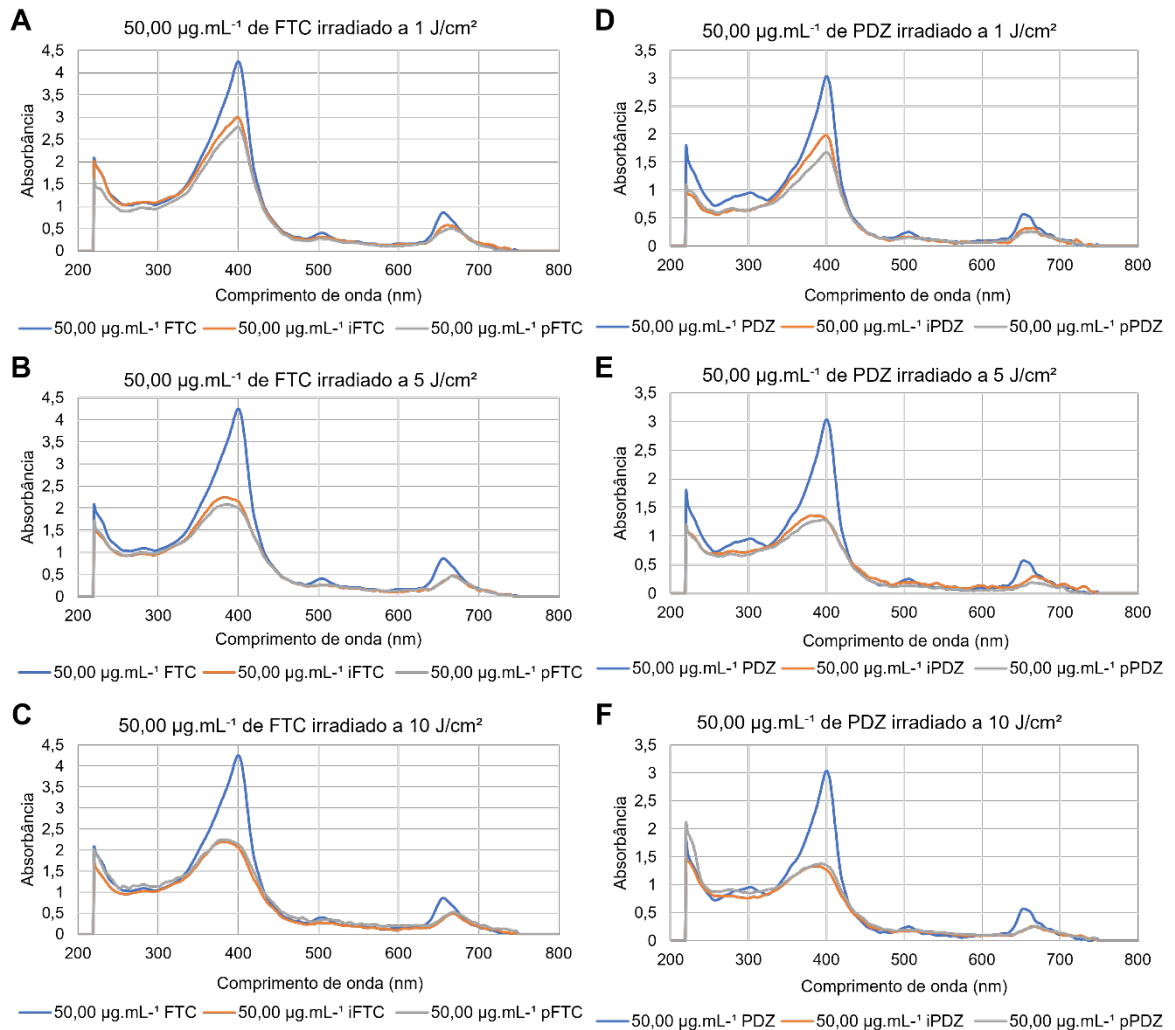


Fonte: O autor.

Nas menores concentrações, após a irradiação, os espectros dos FS ficaram mais difíceis de serem comparados, visto a diminuição da absorbância.

Entre as fluências de luz testadas não houve diferenças significativas na queda da intensidade das bandas, entretanto podemos observar que a fluência de  $5 \text{ J}/\text{cm}^2$  foi a que apresentou maior queda em ambos FS.

Figura 9: Comparação dos espectros de absorção do FTC e do PDZ na concentração de  $50,00 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , antes, imediatamente após irradiação (iFTC e iPDZ) e 18h após irradiação (pFTC e pPDZ). A – FTC e fluência de  $1 \text{ J/cm}^2$ ; B – FTC e fluência de  $5 \text{ J/cm}^2$ ; C – FTC e fluência de  $10 \text{ J/cm}^2$ ; D – PDZ e fluência de  $1 \text{ J/cm}^2$ ; E – PDZ e fluência de  $5 \text{ J/cm}^2$ ; F – PDZ e fluência de  $10 \text{ J/cm}^2$ .



Fonte: O autor.

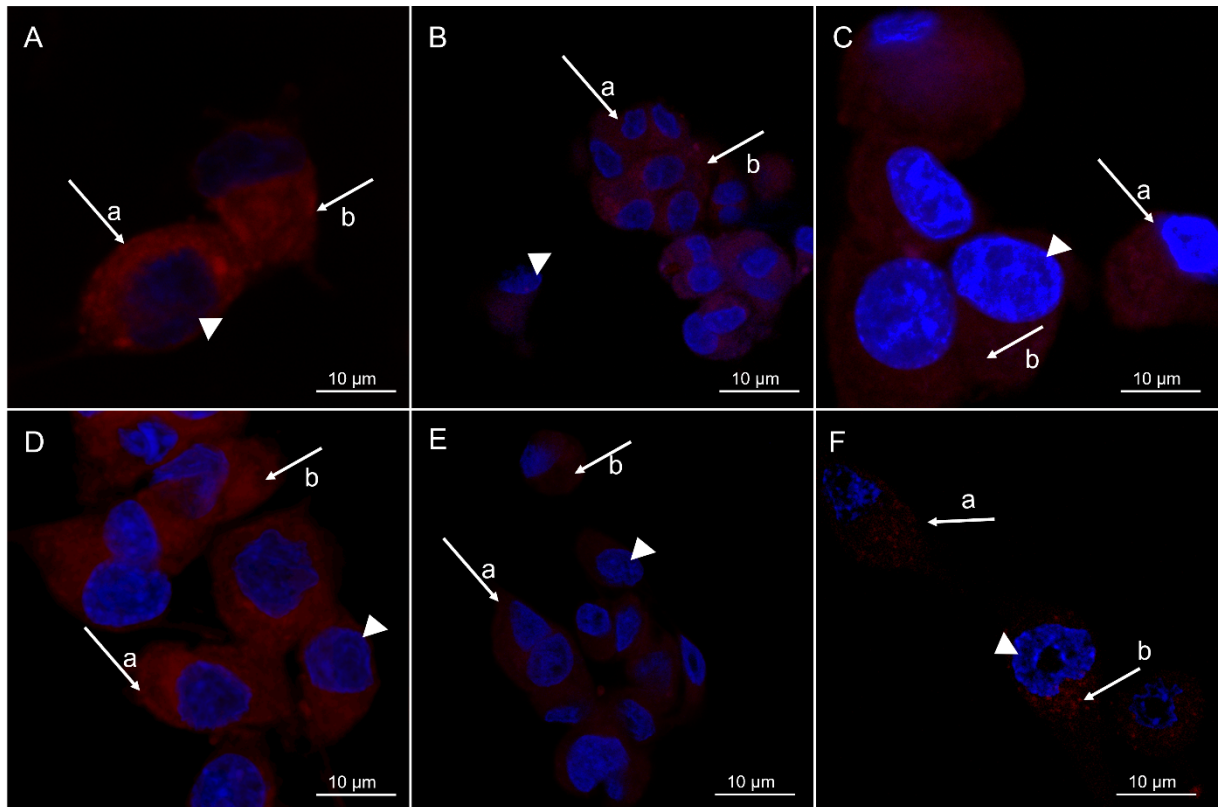
## 4.2 Internalização Celular dos FS

Pela imagem obtida utilizando a Microscopia Confocal de fluorescência, pode-se observar que houve internalização do FTC e do PDZ em todas as concentrações empregadas neste estudo, nas células 9L/lacZ (Figura 10).

A cor azul é resultado da excitação do DAPI, agregado ao DNA da célula no núcleo, enquanto o FS excitado emite o sinal obtido em vermelho, observado na região citoplasmática. Os FS não apresentaram sobreposição com a marcação nuclear, indicando que não estão localizados nessa estrutura, apenas margeando a região.

É possível observar que quanto menor a concentração, menor é a intensidade do sinal do FS internalizado, demonstrando ser concentração-dependente. Entretanto, isso não significa necessariamente que os efeitos pós TFD serão menores, sendo assim necessário a realização dos testes de citotoxicidade.

Figura 10: Internalização do FS em células 9L/lacZ por Microscopia Confocal de fluorescência. A – 50,00  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  FTC; B – 12, 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  FTC; C – 1,55  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  FTC; D – 50,00  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  PDZ; E – 12,50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  PDZ; F – 1,55  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  PDZ; cabeça de seta – núcleo corado com DAPI; seta a: citoplasma; seta b: FS.



Fonte: O autor.

### 4.3 Análise de viabilidade e atividade mitocondrial

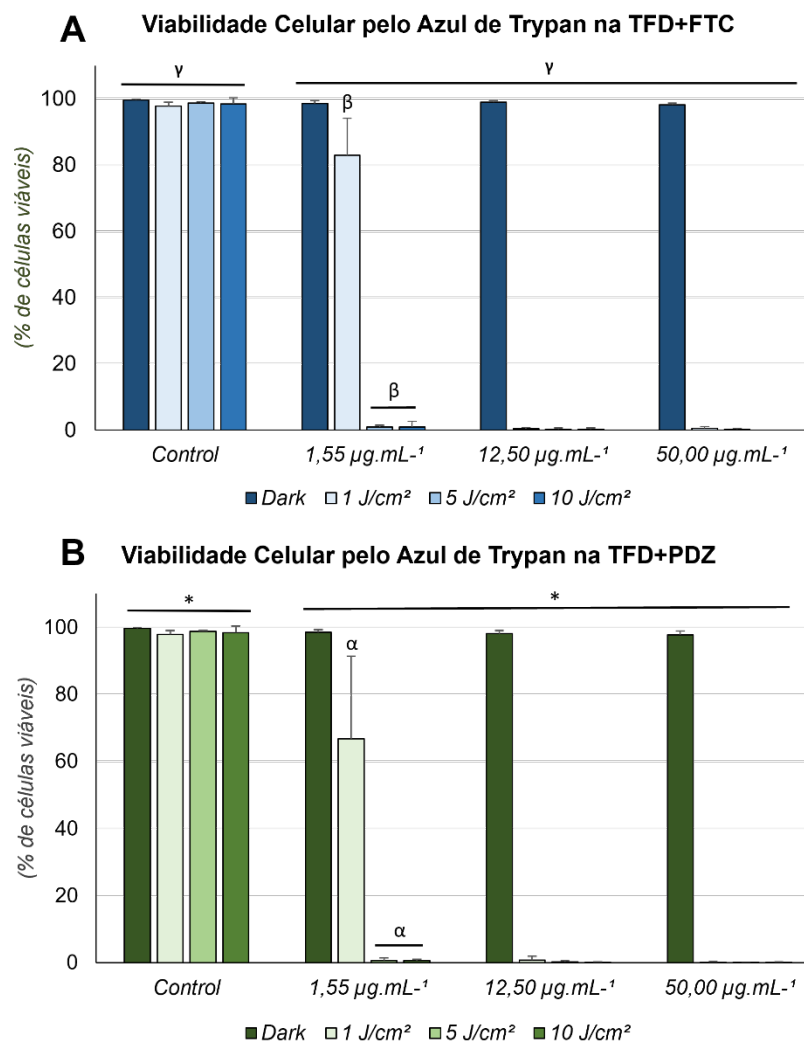
Pelo teste de viabilidade celular com o azul de tripan e análise da atividade mitocondrial (Figura 11 e 12), podemos observar que as concentrações de 50,00  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e 12,50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do FTC e do PDZ apresentaram respostas semelhantes em todas as fluências de luz utilizadas, com >98% de redução da viabilidade e >86% da redução da atividade mitocondrial.

Já a menor concentração não foi tão eficiente na fluência de 1  $\text{J/cm}^2$ , apresentando redução <20% da viabilidade celular quando utilizado o FTC e redução <35% quando utilizado o PDZ.

A concentração de  $1,55 \mu\text{g.mL}^{-1}$  do FTC e do PDZ apresentaram redução da atividade mitocondrial, indicando que apesar de não afetar a quantidade de células viáveis, a TFD altera o metabolismo mitocondrial das células tratadas, apresentando redução de até  $>84\%$ .

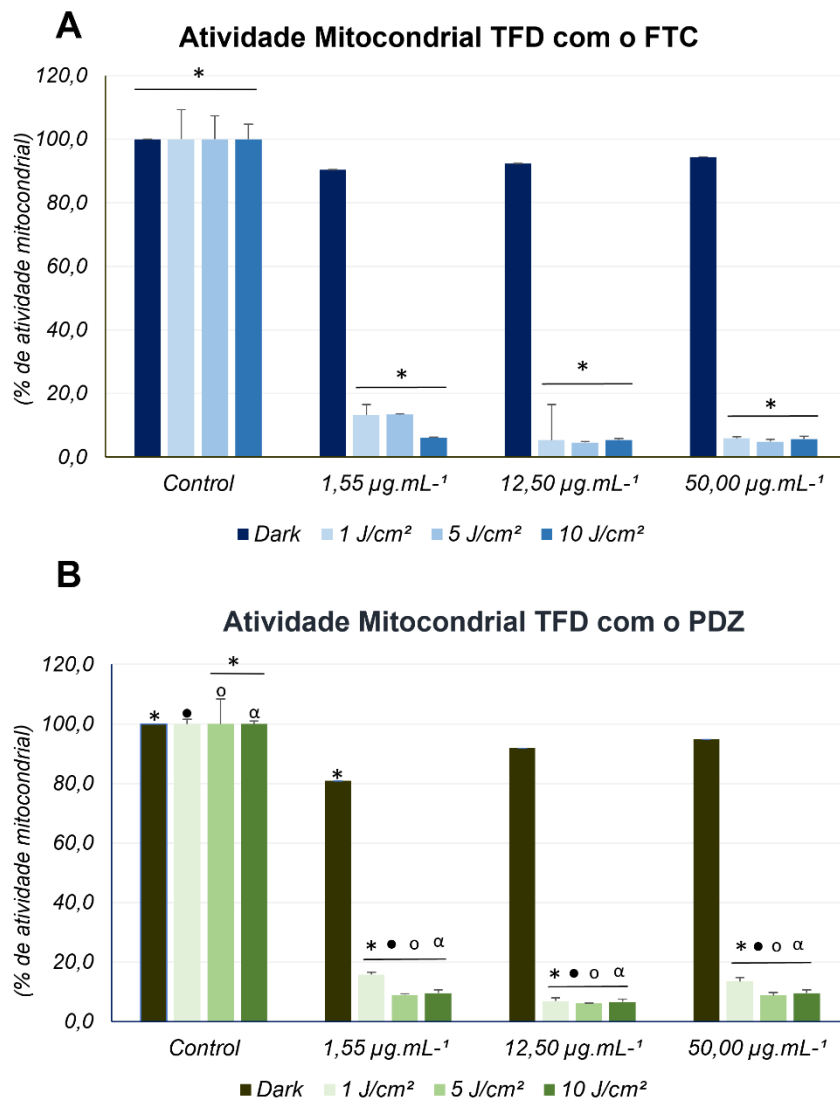
Sendo assim, o resultado do MTT corrobora com o Tripán nas maiores fluências.

Figura 11: Análise da viabilidade celular pelo Azul de Tripán em células 9L/lacZ. A –Células tratadas com TFD e FTC. B - Células tratadas com TFD e PDZ. Símbolos para  $p < 0.01$ :  $\gamma$ ,  $\beta$ , \* e  $\alpha$ .



Fonte: O autor.

Figura 12: Análise da atividade mitocondrial em células 9L/lacZ. A – Células tratadas com TFD e FTC. B – Células tratadas com TFD e PDZ. Símbolos para  $p < 0.01$ : \*, •, o e  $\alpha$ .



Fonte: O autor.

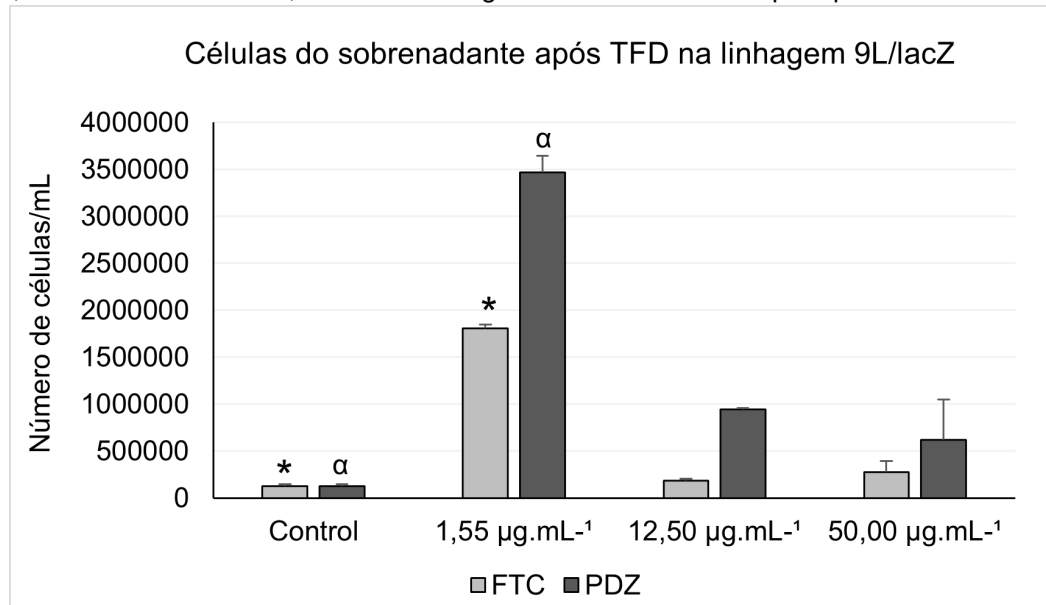
#### 4.4 Alterações na adesão celular

Durante a execução dos experimentos, não foi observada diferença na alteração da adesão celular entre as três fluências testadas. Sendo assim optou-se por seguir utilizando a fluência de 5 J/cm<sup>2</sup>, a qual foi a menor fluência a apresentar resultados satisfatórios na redução da viabilidade em todas as concentrações.

Após submeter as células à TFD, foi observado que a quantidade de células aderidas na placa se alterou conforme a diminuição da concentração do FS (Figura 13).

Na maior e na concentração intermediária podemos visualizar que a quantidade de células que se desprendem da placa utilizada para o experimento é menor do que a quantidade de células presente na concentração de 1,55  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Isso pode ser observado quantitativamente, assim como qualitativamente conforme Figura 14.

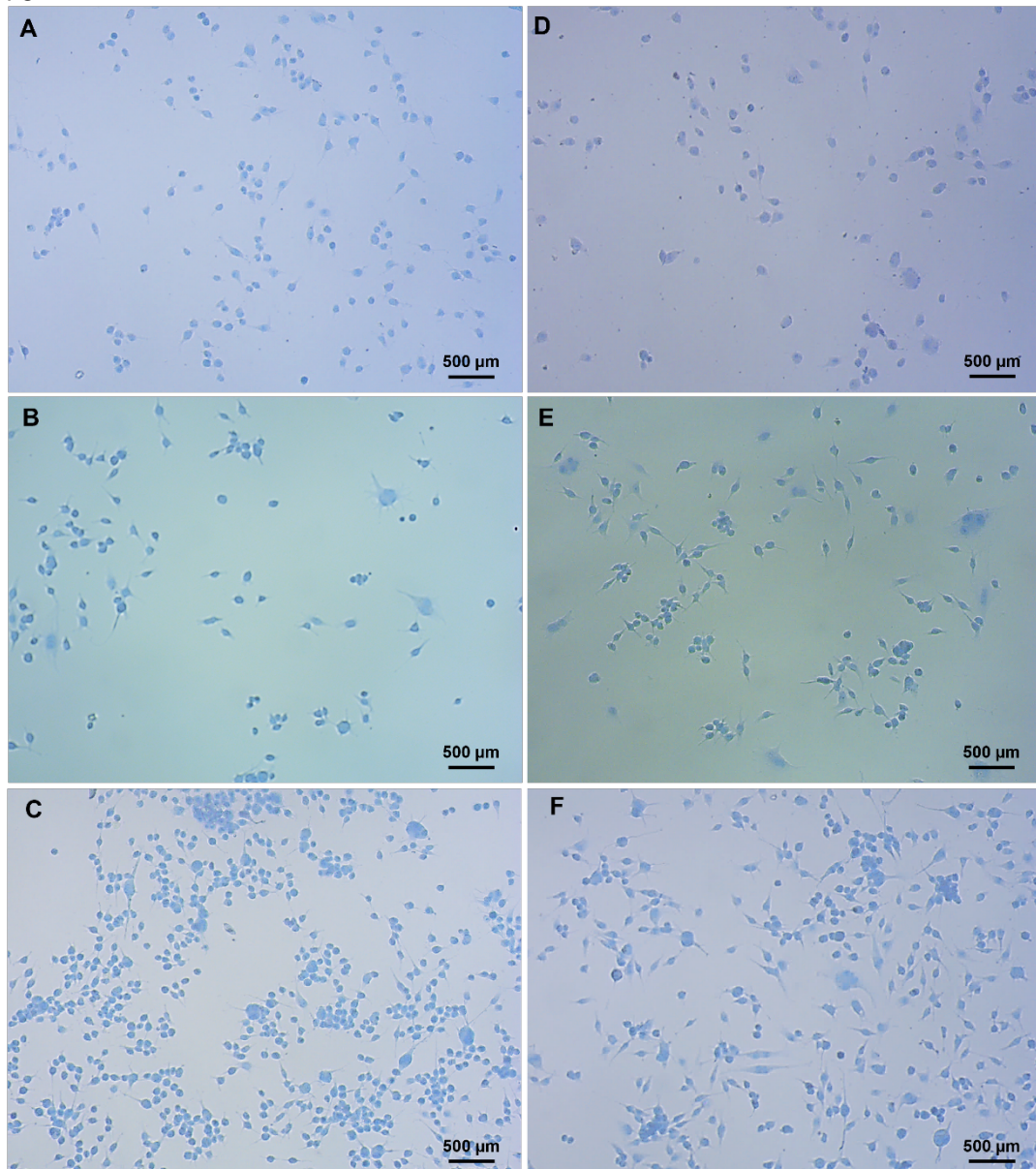
Figura 13: Análise quantitativa do número de células presentes no sobrenadante após 18h da aplicação da TFD, na fluência de 5  $\text{J/cm}^2$ , nas células de gliossarcoma. Símbolos para  $p < 0.01$ : \* e  $\alpha$ .



Fonte: O autor.

O desprendimento celular pode ser um resultado do estresse sofrido pela TFD, processo de morte celular, ciclo celular, entre outros. Tendo em vista isso, as células do sobrenadante foram transferidas para uma placa nova e incubadas por até 72h para verificar se haveria a adesão. Foi observado que somente as células do grupo controle aderiam novamente, as que foram submetidas a TFD não apresentavam mais essa capacidade.

Figura 14: Análise qualitativa das imagens obtidas pelo teste de exclusão com o Azul de Tripán, demonstrando o desprendimento celular conforme diminuição da concentração celular após aplicação da TFD na fluência de 5 J/cm<sup>2</sup> em células da linhagem 9L/lacZ. A – 1,55 µg.mL<sup>-1</sup> do FTC; B – 12,50 µg.mL<sup>-1</sup> do FTC; C – 50,00 µg.mL<sup>-1</sup> do FTC; D – 1,55 µg.mL<sup>-1</sup> do PDZ; E – 12,50 µg.mL<sup>-1</sup> do PDZ; F – 50,00 µg.mL<sup>-1</sup> do PDZ; Aumento de 40X.

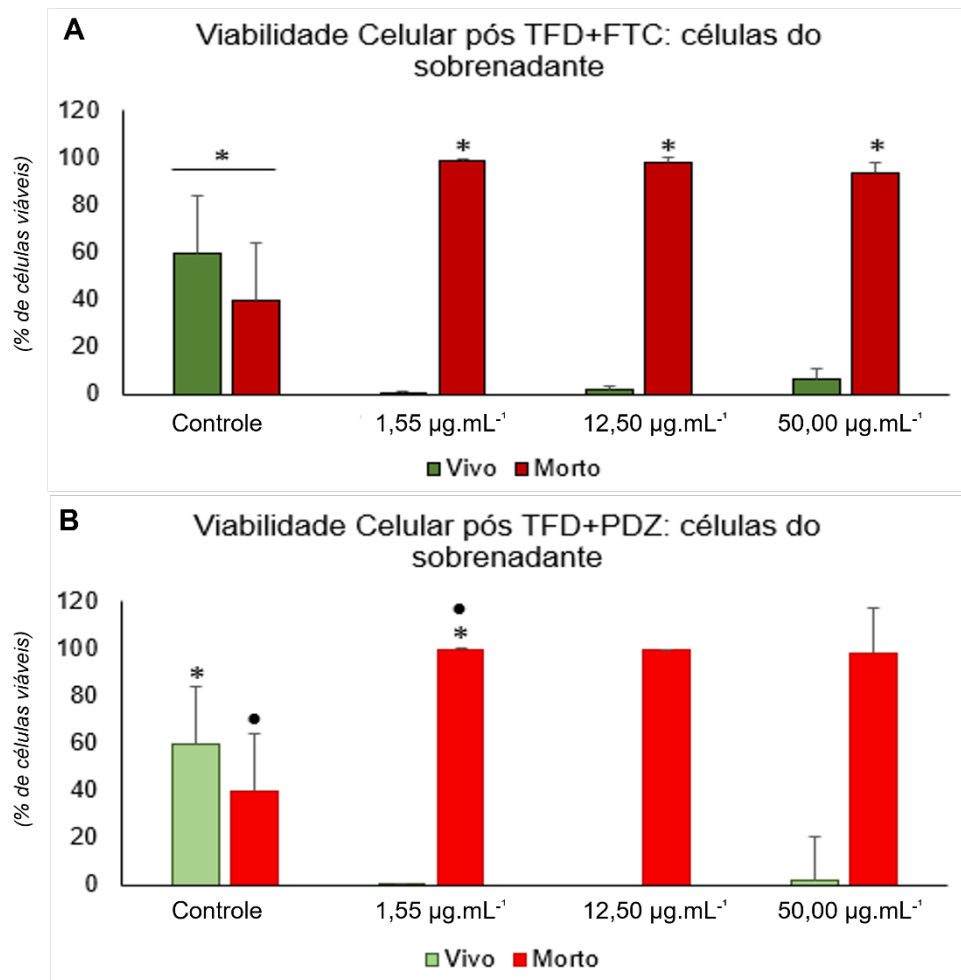


Fonte: O autor.

#### 4.5 Análise da viabilidade das células do sobrenadante

O desprendimento celular aliado a incapacidade de aderir novamente à placa, pode ser um indício do processo de morte celular. Sendo assim, foi realizado o teste de viabilidade das células que desprenderam após a TFD.

Figura 15: Análise da viabilidade celular de células que se desprenderam após 18h da TFD, irradiadas a 5 J/cm<sup>2</sup>. Símbolos para p<0.01: \* e • A – Células tratadas com TFD e FTC. B – Células tratadas com TFD e PDZ.



Fonte: O autor.

Nos grupos controles foi observado a presença de células, representando a interferência que os processos experimentais podem ocasionar na adesão celular, levando, conseqüentemente, ao desprendimento de células viáveis. Por exemplo, a pipetagem, a troca de meio e soluções, entre outros fatores externos.

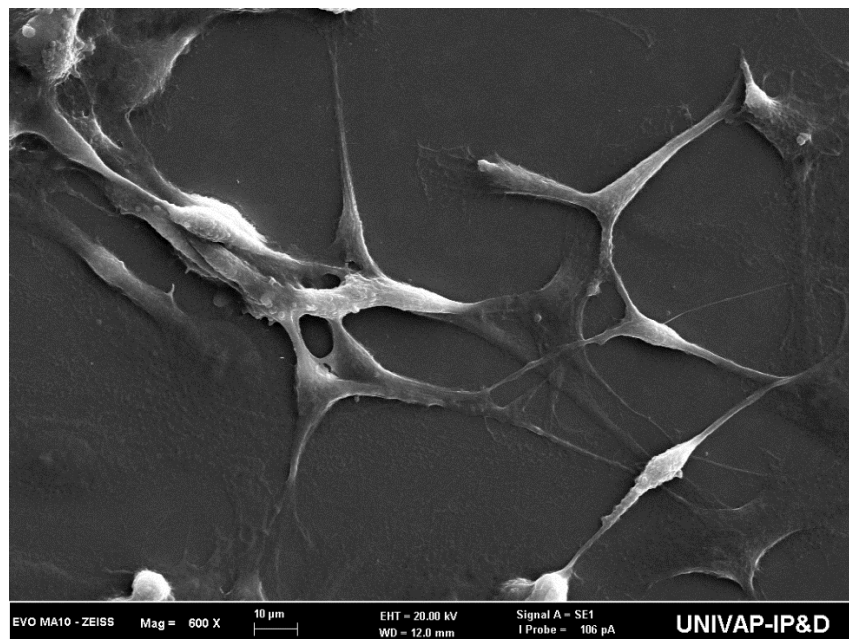
Já a análise da viabilidade das células tratadas com a TFD na fluência de 5 J/cm<sup>2</sup> demonstrou que >90% das células estavam mortas, tanto quando tratadas com o FTC, como com o PDZ (Figura 15).

Isso contribuiu com o indício de que o desprendimento celular nos grupos tratados pode corresponder ao desencadeamento da morte celular

#### 4.6 Análise da alteração morfológica por MEV

Pode-se observar pela Figura 16 as células da linhagem 9L/lacZ em seu formato padrão: característica fusiforme e sem muitas irregularidades na sua estrutura de sustentação. Mesmo quando irradiadas com a luz na fluência de  $5 \text{ J/cm}^2$ , as células não apresentaram alterações, visto que a luz não é capaz de desencadear um processo citotóxico para as células.

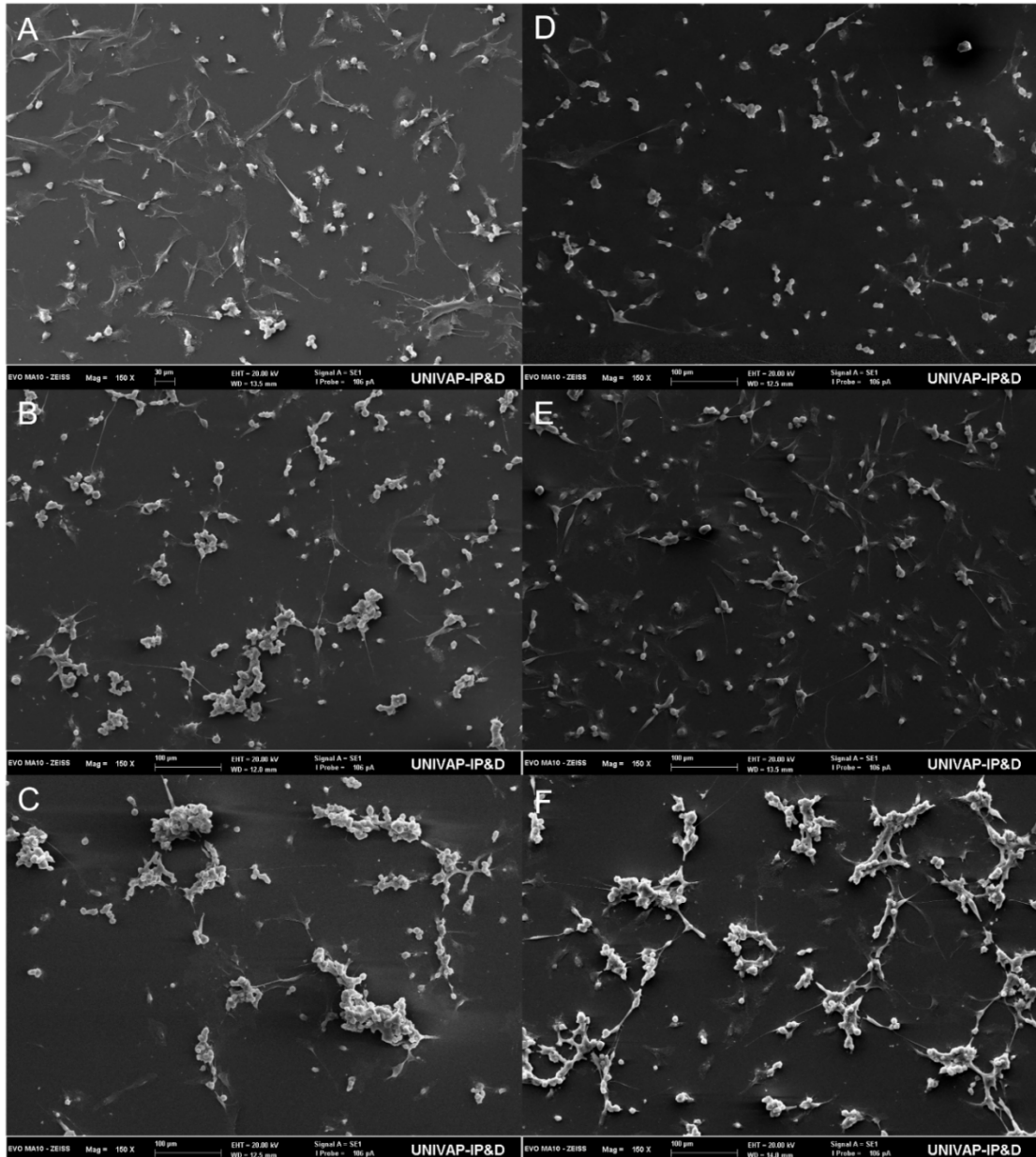
Figura 16: Micrografia obtida por microscopia eletrônica de varredura de células 9L/lacZ irradiadas em um dispositivo de LED em  $660 \text{ nm}$ ,  $5 \text{ J/cm}^2$  e  $25 \text{ mW/cm}^2$ , representando o controle claro. Magnificação:  $600 \times$ .



Fonte: O autor.

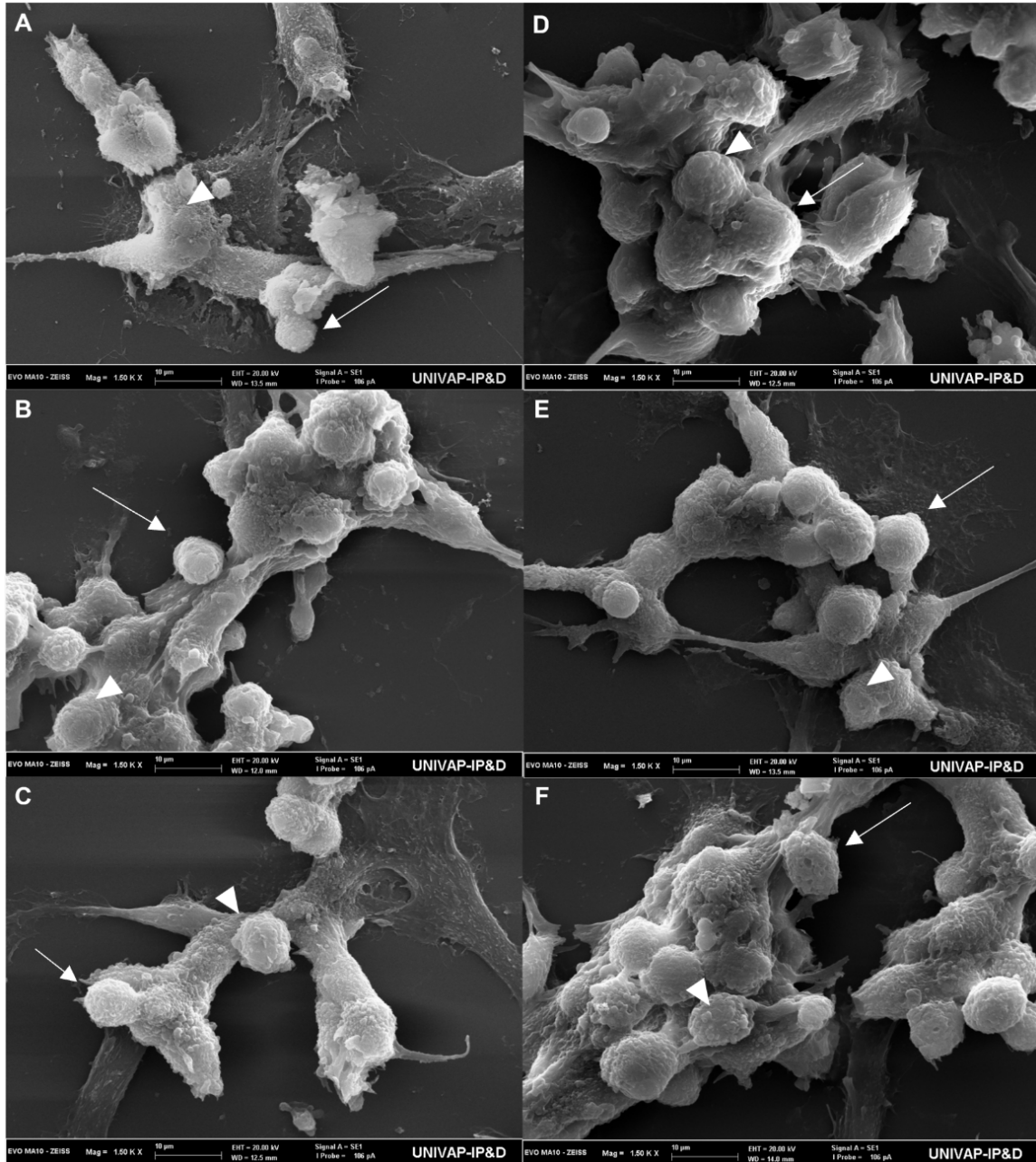
Já nas células submetidas à TFD com ambos FS, foi possível observar a diferença na disposição das células no campo com menor magnificação, em que as células incubadas com a menor concentração se apresentam mais afastadas uma das outras, na concentração intermediária há campos com células isoladas e células agregadas, enquanto na maior concentração as células estão agregadas (Figura 17). Além disso em todas as concentrações houve alteração de sua morfologia com a perda do aspecto fusiforme, modificado pelo estresse celular, causando o arredondamento das células e maiores irregularidades na estrutura de sustentação, como processo indicativo de morte celular (Figura 18).

Figura 17: Micrografia obtida por microscopia eletrônica de varredura de células 9L/lacZ submetidas à TFD na fluência de 5 J/cm<sup>2</sup> e 25 mW/cm<sup>2</sup>. A – 1,55 µg.mL<sup>-1</sup> FTC; B – 12,50 µg.mL<sup>-1</sup> FTC; C – 50,00 µg.mL<sup>-1</sup> FTC; D – 1,55 µg.mL<sup>-1</sup> PDZ; E – 12,50 µg.mL<sup>-1</sup> PDZ; F – 50,00 µg.mL<sup>-1</sup> PDZ. Magnificação: 150x.



Fonte: O autor.

Figura 18: Micrografia obtida por microscopia eletrônica de varredura de células 9L/lacZ submetidas à TFD na fluência de 5 J/cm<sup>2</sup> e 25 mW/cm<sup>2</sup>. A – 1,55 µg.mL<sup>-1</sup> FTC; B – 12,50 µg.mL<sup>-1</sup> FTC; C – 50,00 µg.mL<sup>-1</sup> FTC; D – 1,55 µg.mL<sup>-1</sup> PDZ; E – 12,50 µg.mL<sup>-1</sup> PDZ; F – 50,00 µg.mL<sup>-1</sup> PDZ. Seta: arredondamento celular; Cabeça de seta: irregularidade na superfície celular; Magnificação: 1,50k x.



Fonte: O autor.

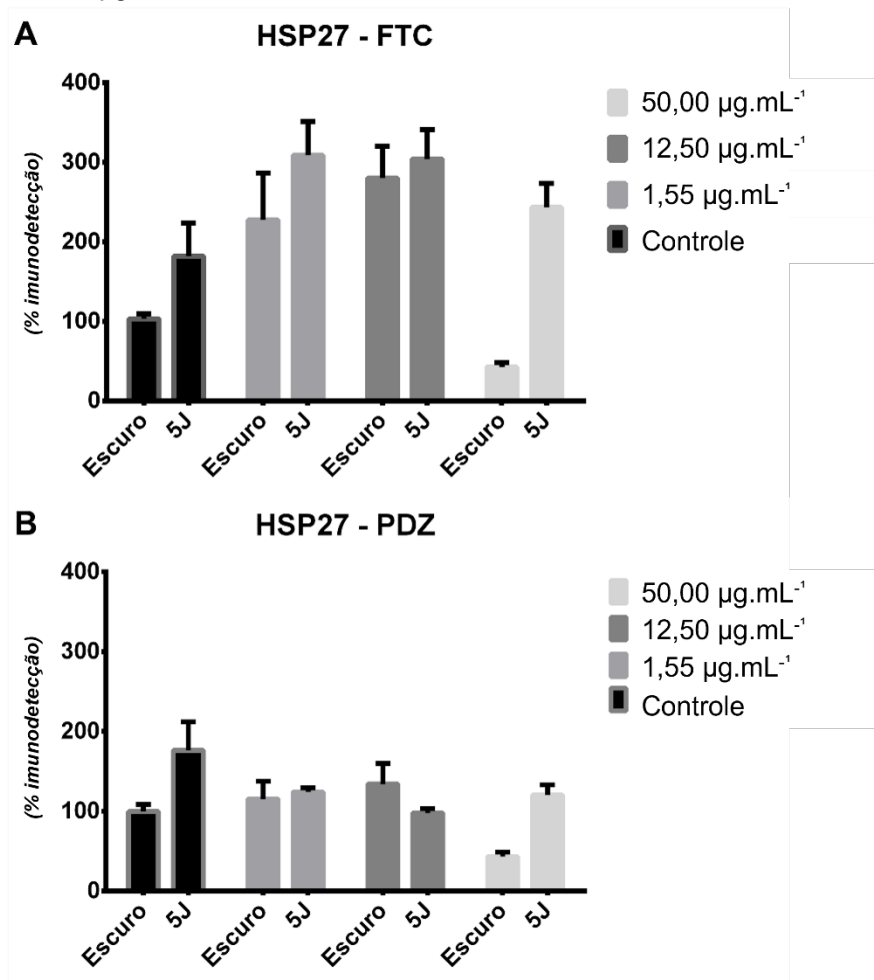
#### 4.7 Análise da imunodeteção das proteínas HPS 27 e HPS 70

Pela análise da imunodeteção da HSP27 podemos observar que quando as células são expostas a luz ou entram em contato com o FS nas concentrações de 1,55 µg.mL<sup>-1</sup> e 12,50 µg.mL<sup>-1</sup>, há o aumento da produção de HSP27 comparadas ao grupo

controle, no qual podemos visualizar maior aumento quando em contato com o FTC. Já na concentração de  $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$  houve uma diminuição da sua imunodeteccção, tanto no FTC como no PDZ (Figura 19).

Quando as células são tratadas com TFD e FTC, há um aumento na imunodeteccção da HSP27 em todas as concentrações testadas, onde podemos observar que quanto menor a concentração, maior é o aumento da sua imunodeteccção, quando comparados ao grupo controle.

Figura 19: Análise da imunodeteccção da proteína HSP27 antes e após TFD na fluência de  $5 \text{ J/cm}^2$ . A – Imunodeteccção da HSP27 na TFD com o FTC nas concentrações de  $1,55 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ,  $12,50 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e  $50,00 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . B – Imunodeteccção da HSP27 na TFD com o PDZ nas concentrações de  $1,55 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ,  $12,50 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e  $50,00 \mu\text{g.mL}^{-1}$ .

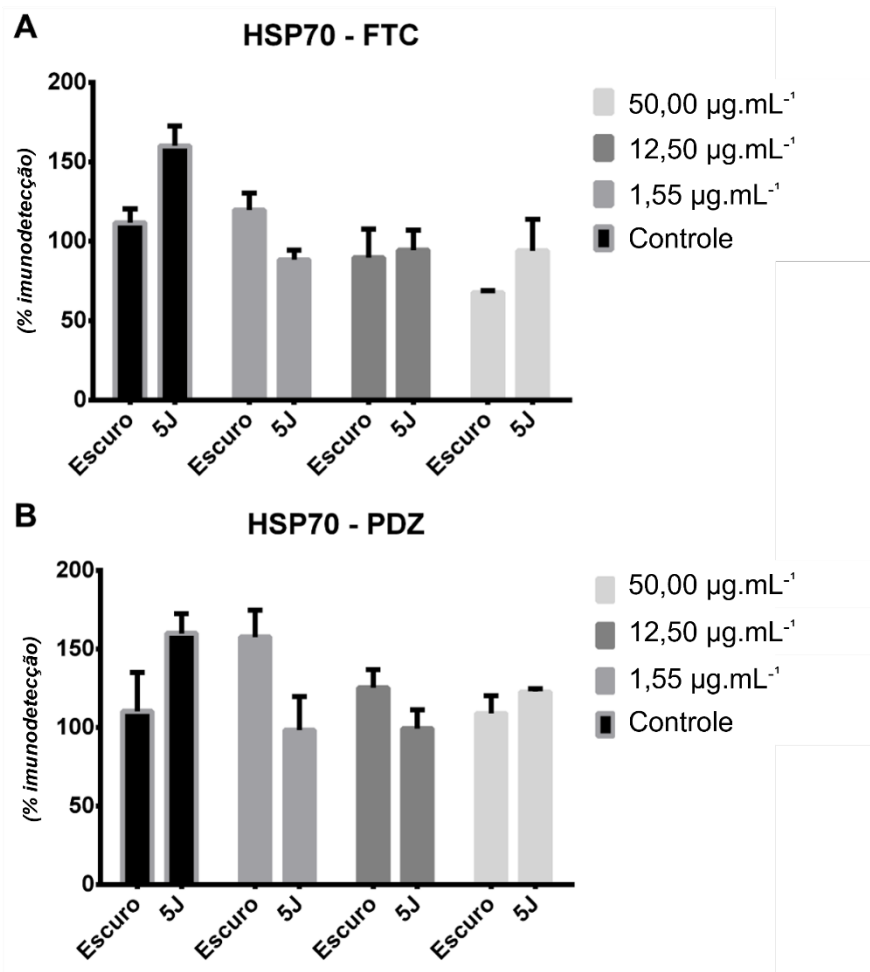


Fonte: O autor.

Quanto a imunodeteccção da HSP70, foi observado que a exposição à luz e o contato direto somente com o FS nas concentrações de  $1,55 \mu\text{g.mL}^{-1}$  do FTC e nas concentrações  $1,55 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e  $12,50 \mu\text{g.mL}^{-1}$  do PDZ, apresentaram aumento da

imunodeteccção da HSP70. As demais concentrações ou apresentaram diminuição da imunodeteccção ou mantiveram os níveis próximos ao expresso pelo grupo controle (Figura 20).

Figura 20: Análise da imunodeteccção da proteína HSP70 antes e após TFD na fluência de 5 J/cm<sup>2</sup>. A – Imunodeteccção da HSP70 na TFD com o FTC nas concentrações de 1,55 µg.mL<sup>-1</sup>, 12,50 µg.mL<sup>-1</sup> e 50,00 µg.mL<sup>-1</sup>. B – Imunodeteccção da HSP70 na TFD com o PDZ nas concentrações de 1,55 µg.mL<sup>-1</sup>, 12,50 µg.mL<sup>-1</sup> e 50,00 µg.mL<sup>-1</sup>.



Fonte: O autor.

Na aplicação da TFD com o FTC, se observa que as concentrações apresentaram diminuição na imunodeteccção de HSP70, comparadas ao grupo controle, com níveis de imunodeteccção semelhantes entre os grupos.

Apenas a concentração de 50 µg.mL<sup>-1</sup>, quando comparados ao grupo controle, demonstra diferença estatística significativa com  $p = 0,0029$ . Enquanto que nos grupos TFD as três concentrações apresentaram diferença estatística quando comparados ao grupo controle, com  $p < 0,0001$  para todas as concentrações. Na TFD com o PDZ,

as concentrações também apresentaram diminuição da imunodeteção de HSP70 quando comparadas ao grupo controle, resultado semelhante ao encontrado com a TFD e o FTC.

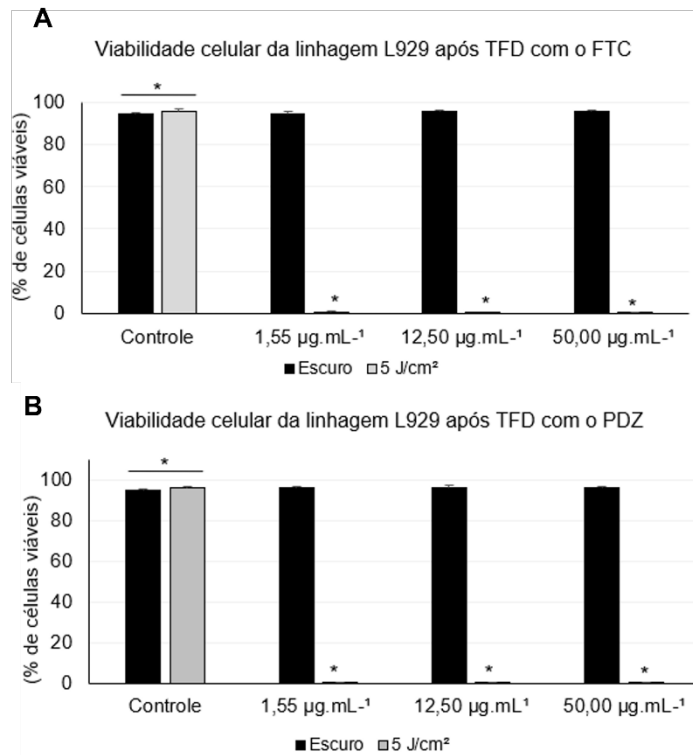
A concentração de 1,55  $\mu\text{g. mL}^{-1}$ , quando comparado ao grupo controle, demonstrou diferença estatística significativa com  $p = 0,0086$ . Enquanto que nos grupos TFD as três concentrações apresentaram diferença estatística quando comparados ao grupo controle, com  $p= 0,0029$  para a concentração de 1,55  $\mu\text{g. mL}^{-1}$ ,  $p= 0,0010$  para 12,50  $\mu\text{g. mL}^{-1}$  e  $p= 0,0419$  para 50,00  $\mu\text{g. mL}^{-1}$ .

#### **4.8 Análise da viabilidade e adesão celular da linhagem L929 após TFD**

Conforme observamos durante os experimentos com as células 9L/lacZ a eficácia da TFD e seus efeitos no desprendimento celular, se optou por realizar testes de viabilidade celular com as células de fibroblastos, a qual representam as células sádias, para comparar se os efeitos provocados na alteração da adesão eram os mesmos.

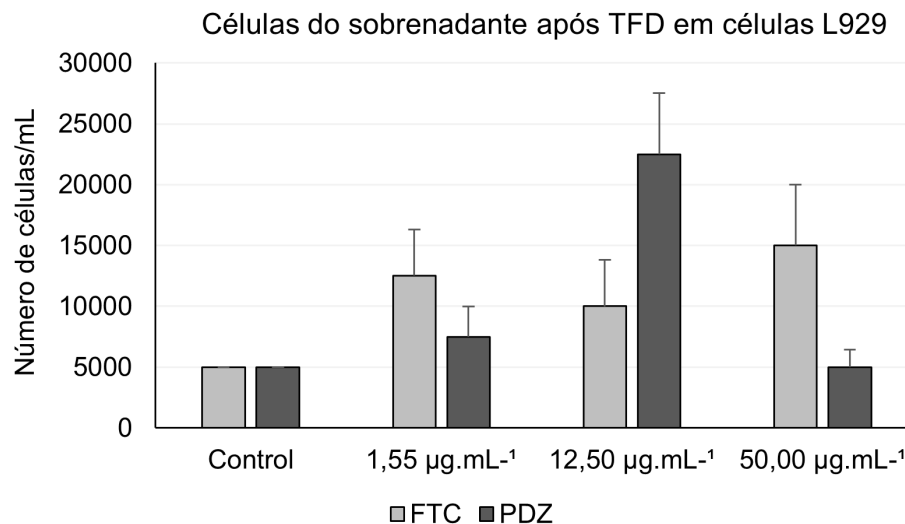
A princípio o teste nos permite avaliar que os FS não foram citotóxicos para os fibroblastos, visto que no grupo escuro todas as concentrações testadas mantiveram alta viabilidade celular. Já quando foi utilizado fluência de 5  $\text{J/cm}^2$  podemos observar que a TFD com ambas clorinas possibilitou quase que a completa redução da viabilidade celular em todas as concentrações testadas. Ou seja, se as células saudáveis forem privadas do contato com a luz, restringindo a emissão de luz apenas na região tumoral, haverá grandes chances da TFD ser um sucesso no tratamento de gliossarcoma (Figura 21).

Figura 21: Análise da viabilidade celular com Azul de Tripán em células L929 submetidas à TFD. A – L929 tratadas com TFD e FTC na fluência de 5 J/cm<sup>2</sup>. B – L929 tratadas com TFD e PDZ na fluência de 5 J/cm<sup>2</sup>. Símbolos para p<0.01: \*.



Fonte: O autor.

Figura 22: Análise da viabilidade celular das células L929 presentes no sobrenadante após 18h do tratamento com a TFD, na fluência de 5 J/cm<sup>2</sup>.



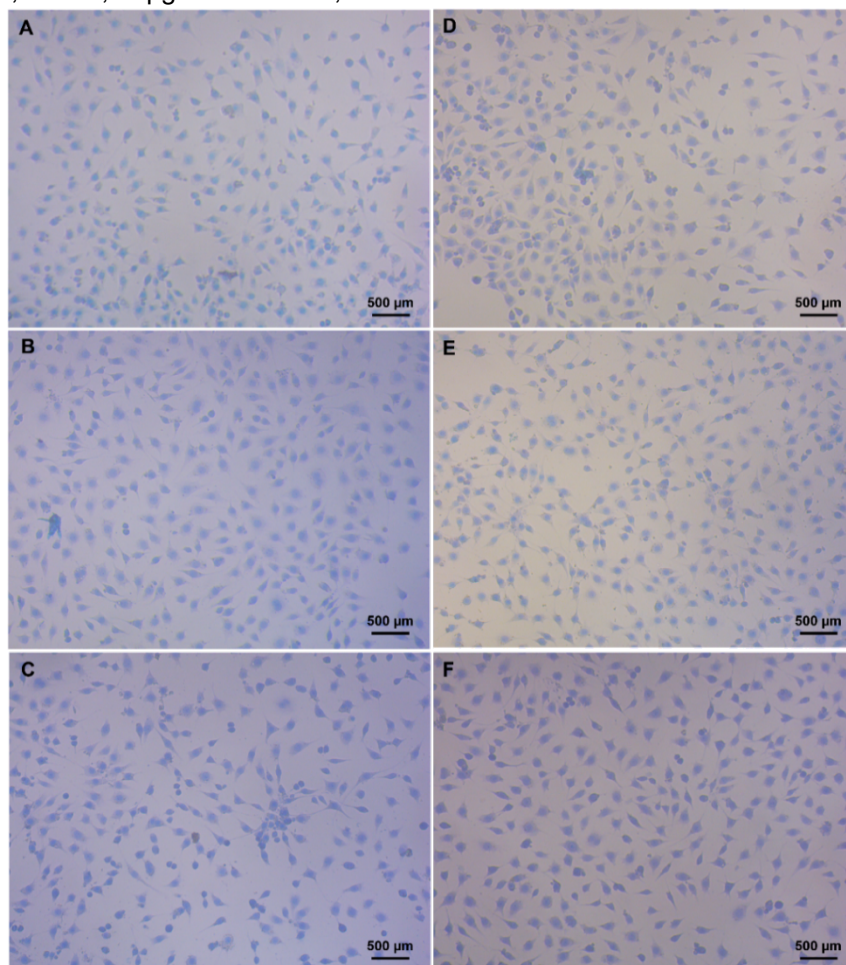
Fonte: O autor.

Com relação ao desprendimento celular após terapia, não foi visto o mesmo padrão de resposta da 9L/lacZ. Foi observado pouca quantidade de células no

sobrenadante, sendo uma maior quantidade na concentração de  $12,50 \mu\text{g.mL}^{-1}$  do PDZ (Figura 22).

Esse resultado corrobora com a análise qualitativa realizada por meio das imagens com o Azul de Tripan, em que não há discrepância no número de células para cada concentração comparado a quantidade antes da TFD (Figura 23), indicando que a alteração na adesão se trata de uma característica da célula tumoral.

Figura 23: Análise qualitativa do desprendimento celular após 18h da TFD nas células L929 na fluência de  $5 \text{ J/cm}^2$ , utilizando as imagens obtidas pelo teste de viabilidade com Azul de Tripan. A –  $1,55 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de FTC; B –  $12,50 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de FTC; C –  $50,00 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de FTC; D –  $1,55 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de PDZ; E –  $12,50 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de PDZ; F –  $50,00 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de PDZ; Aumento 40x.



Fonte: O autor.

## 5 DISCUSSÃO

A busca por um tratamento ideal para o câncer envolve um histórico longo e cheio de inovações nas pesquisas clínicas, que propõem a redução dos efeitos colaterais e maior expectativa de vida. A TFD é um dos métodos terapêuticos empregados em estudos científicos, visto seus potenciais efeitos no tratamento de diversos tipos de doenças, não se limitando a uma área específica. Seu uso pode ser um importante aliado no tratamento ao câncer, contribuindo na diminuição dos efeitos indesejáveis, visto que sua premissa é atingir majoritariamente as células doentes, aumentando a sobrevida dos pacientes (FERREIRA *et al.*, 2016).

Um dos principais motivos para a TFD ainda não ser amplamente usada na clínica é a difícil adequação do composto fotossensível, o qual compõe seus elementos essenciais. Neste estudo foi realizada a análise de duas clorinas (FTC e PDZ), ambas testadas anteriormente *in vitro* como alternativa de tratamento do GS e com resultados significativos e otimistas para continuação de seus estudos (DE ALMEIDA *et al.*, 2020; FONTANA *et al.*, 2017; VITORIO *et al.*, 2021).

O uso de fluências de luz e concentrações dos FS mais baixas em teste *in vitro* caracteriza um passo importante para o avanço no estudo *in vivo*, visto que adequar esses parâmetros da TFD para menores doses pode garantir um menor impacto ao organismo, aumentando as chances de aprovação para o tratamento de câncer.

A análise do espectro de absorção dos FS permite observarmos a formação de bandas específicas que possam produzir efeitos significativos quando a emissão de luz é adequada para seu comprimento de onda. Ambos FS apresentaram resultados semelhantes, se enquadrando no padrão observado em clorinas (FERREIRA, 2007; KUSTOV *et al.*, 2021), onde há a formação de uma banda mais intensa na região de 400 nm, correspondendo à banda de Soret, e 3 bandas Q em torno de 500 a 660 nm. Apesar das semelhanças, o FTC apresentou uma intensidade de absorção maior que a do PDZ em todas as bandas.

Sabe-se que a emissão de luz no comprimento de onda de 660 nm é preferencial para o tratamento do câncer cerebral, em razão da profundidade que a luz nesse comprimento de onda consegue atingir. Além disso, há uma maior disponibilização de fótons para a ativação do FS (CRAMER; CHEN, 2020),

possibilitando com que o mesmo possa obter alto rendimento quântico do oxigênio singleto.

O oxigênio singleto forma-se como resultado dos processos químicos da TFD, em que a luz causa a excitação do FS do seu estado fundamental para o estado tripleto excitado, o qual pode retornar ao seu estado fundamental emitindo luz fluorescente ou então interagir com o oxigênio molecular das células, levando à formação de oxigênio singleto. Pelos estudos realizados por Kustov e colaboradores em 2022 foi observado que o PDZ e a clorina Fotoran e6 apresentam alto rendimento quântico, sugerindo que mais da metade das moléculas dos FS excitadas passaram a interagir com o oxigênio molecular (KUSTOV *et al.*, 2021). Visto a semelhança do espectro do FTC com as clorinas citadas, podemos supor que seu rendimento quântico possa ser semelhante favorecendo a atuação dos FS na TFD com boas expectativas para o tratamento.

A excitação dos FS pela luz também produz efeitos quanto a alteração do espectro de absorção, o qual apresentou redução da intensidade das bandas, com decaimento contínuo após 18h, e deslocamento para a direita na região próxima à 660 nm, em ambos FS. Essas observações foram mais evidentes nas concentrações de 50,00  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  e 12,50  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  quando irradiadas na fluência de 1  $\text{J}/\text{cm}^2$  e 5  $\text{J}/\text{cm}^2$ . A análise imediata e após 18h da irradiação na fluência de 10  $\text{J}/\text{cm}^2$  apresentou espectros com poucas diferenças na intensidade e sem deslocamento na banda de 660nm na concentração de 12,50  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , em razão da irregularidade do espectro. Na concentração de 1,55  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  dos FS não foi possível a avaliação após irradiação, já que suas bandas apresentaram baixa intensidade.

A redução da intensidade de absorção pode ser sugerida tanto como um processo de supressão e/ou fotodegradação do composto fotossensível, no qual essa diferenciação só poderia ser esclarecida por meio de estudos sobre as quebras de ligações ou formações de radicais livres.

Sabe-se que a diminuição de absorbância é caracterizada pelo processo denominado fotocloreamento, do inglês “photobleaching”, correspondente ao desaparecimento de algumas estruturas do FS devido sua degradação (FERREIRA, 2007). Com relação ao deslocamento entre as bandas de 640-660 nm, estudos apontam que essa alteração seja sugestiva da formação de fotoprodutos quando aliado à fotodegradação do FS (BONNETT; MARTINEZ, 2001; CORREA, 2006).

A adequação da quantidade de fotoprodutos produzido pela terapia é um fator importante para contribuir com o sucesso desta, pois a rápida fotodegradação do FS pode interferir na eficácia da TFD, restringindo o desencadeamento dos processos de morte celular para um seleto grupo de célula e induzindo a aplicação de mais sessões do tratamento, que pode estimular a resistência das células remanescentes. No entanto, a presença de fotoprodutos em níveis ideais tem ação direta na cinética de eliminação do FS do organismo, permitindo que haja diminuição da sua concentração em células normais e otimização do processo de morte celular das células malignas, a qual naturalmente concentra quantidades maiores de FS (CORREA, 2006; FERREIRA *et al.*, 2009).

Embora tenhamos observado a diminuição da intensidade de absorção na banda de Soret, não houve nenhuma alteração significativa quanto ao seu deslocamento após irradiação ou sob aumento de concentração, indicando que os FS estudados não são capazes de desenvolver agregados em altas quantidades, o que poderia atrapalhar a eficácia deles na TFD (CORREA, 2006). Apesar de ambos apresentarem esses indícios, em razão da diminuição de intensidade de forma mais abrupta, podemos supor que o FTC apresenta menos formas agregadas do que o PDZ, porém essa diferença não impactou na internalização dos FS pelas células 9L/lacZ.

Pela microscopia confocal de fluorescência foi observado que em todas as concentrações de ambos FS houve o acúmulo dessas substâncias em toda extensão citoplasmática, sem interação com a região nuclear. A capacidade de internalização desses FS já havia sido constatada em estudos anteriores com concentrações maiores (DE ALMEIDA *et al.*, 2020; VITORIO *et al.*, 2021), bem como a co-localização em organelas citoplasmática chaves para a TFD. Com o presente estudo conseguimos observar que apesar da diminuição da concentração para  $1,55 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , o comportamento de acúmulo dos FS no citoplasma continua o mesmo, embora ocorra a diminuição aparente do sinal de fluorescência. Contudo, os efeitos da TFD nessa concentração não alteraram a redução das células viáveis pelos testes de citotoxicidade.

Os resultados do teste de exclusão com o azul de tripan e a análise da atividade mitocondrial pelo MTT apresentaram coerência em todas as concentrações nas fluências de  $5 \text{ J/cm}^2$  e  $10 \text{ J/cm}^2$ , atingindo redução significativa da viabilidade celular,

com o percentual acima de 99, e para a atividade mitocondrial acima de 86. Quanto a fluência de  $1 \text{ J/cm}^2$ , foi observado os mesmos efeitos com os outros parâmetros de irradiação nas concentrações de  $50,00 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e  $12,50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , entretanto a concentração de  $1,55 \mu\text{g.mL}^{-1}$  não apresentou o mesmo padrão de redução da viabilidade, embora a atividade mitocondrial dessas células estivessem afetadas. Essa diferença de resposta observada pode ser consequência da baixa intensidade de absorção nessa concentração aliada à aparente diminuição do sinal do FS na internalização celular, permitindo que em baixas fluências não houvesse a ativação dos mesmos efeitos da TFD que ocorre nas outras fluências.

Quanto a redução da atividade mitocondrial é importante ressaltar que o ensaio de MTT permite a avaliação de um conjunto de atividades enzimáticas relacionadas ao metabolismo celular. Seu princípio se baseia na redução do sal de MTT em cristais de Formazana por enzimas dependentes de NADPH nas mitocôndrias de células viáveis. Um estudo recente fez um levantamento de diferentes metodologias empregadas nesse teste como avaliação citotóxica e foi descrito que diversas outras atividades celulares estimulam a redução desse sal, podendo afetar sua confiabilidade quando analisado isoladamente (CARREÑO *et al.*, 2021).

O próprio cristal de Formazana é capaz de causar dano na membrana celular durante sua exocitose, produzindo uma queda na atividade mitocondrial que não provém da ação do tratamento. Com isso, a queda na atividade mitocondrial das células tratadas com  $1,55 \mu\text{g.mL}^{-1}$  dos FS pode estar ocorrendo: (1) pelo estado de senescência das células, (2) por células que permaneceram viáveis com atividade mitocondrial afetada (como observado nos testes de citotoxicidade), (3) por interferentes de processos naturais da célula e (4) componentes do meio de cultura em excesso, como a concentração de glicose. Por isso há a necessidade de completar os resultados com o Azul de Tripán, o qual avalia a viabilidade celular pela integridade da membrana citoplasmática (CARREÑO *et al.*, 2021).

Dessa forma, conforme os resultados apresentados nos testes de citotoxicidade, pode-se deduzir que a quantidade de fotoprodutos e o rendimento quântico do oxigênio singleto estão sendo em taxas adequadas. Pensando em utilizar uma menor fluência que produza alterações significativas na TFD em todas as concentrações deste estudo, deu-se continuidade nos testes utilizando a fluência de  $5 \text{ J/cm}^2$ .

Diversos eventos são desencadeados na ativação dos efeitos antitumorais da TFD, como os danos citotóxicos direto nas células tumorais e à vasculatura tumoral, reação inflamatória e imunológica (CORREA, 2006; KUSTOV *et al.*, 2021). Durante a realização do teste com o Azul de Tripán foi observado outra característica que pode ser característica do processo de morte celular, a alteração no número de células aderidas após TFD. Notou-se que com a diminuição da concentração dos FS, também ocorria o desprendimento das células após 18h do tratamento.

Tendo em vista que diversas moléculas e proteínas de adesão estão localizadas na membrana celular, a mesma pode ser afetada durante a TFD, diretamente ou por dano secundário, desencadeando esse desprendimento (ROBERTSON; EVANS; ABRAHAMSE, 2009)

Entretanto, é importante ressaltar a dualidade que a perda da adesão caracteriza para o processo de tratamento do câncer cerebral, visto que essa alteração também pode ser uma resposta temporária frente à um estresse sofrido pela célula, correspondendo à um processo metastático, o qual contribuiria para fortalecer os indícios de que o GS é um câncer de alta propensão para metástases extracranianas (LOWDER *et al.*, 2019).

Com isso, foi verificado a necessidade de analisamos a viabilidade das células que se apresentavam desprendidas no sobrenadante após as 18h da TFD, o qual permitiu observarmos que mais de 90% dessas células estavam mortas em ambas clorinas testadas. Além disso, também foram quantificadas as células em cada grupo, corroborando com o resultado observado qualitativamente nas imagens obtidas pelo teste com o Azul de Tripán. As concentrações de  $1,55 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e  $12,50 \mu\text{g.mL}^{-1}$  apresentaram maior impacto na alteração da adesão celular, despertando maior atenção com o uso dessas concentrações em estudos *in vivo*, de modo a descartar a possibilidade dessas células causarem a propagação de metástases.

Conforme apontado, essa alteração na capacidade de adesão das células tratadas pode estar vinculada com um dano direto na estrutura celular de sustentação. Sendo assim, a recombinação dos filamentos de actina proporcionam alterações na morfologia celular decorrentes dos efeitos da TFD. Todas as concentrações submetidas à TFD com o FTC e o PDZ foram capazes de estressar as células tratadas, alterando sua característica fusiforme para assumir formas arredondadas, indicativas do estresse oxidativo. Esses resultados corroboram com as alterações observadas

em estudos anteriores, com outras concentrações, utilizando o método de Giemsa para a análise da morfologia (DE ALMEIDA *et al.*, 2020; FONTANA *et al.*, 2017; VITORIO *et al.*, 2021).

Nos estudos de Ma e colaboradores (2021) também foi possível observar alterações morfológicas após TFD com Clorina e6 em células de câncer de cólon humano (SW480) utilizando uma baixa concentração ( $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), irradiadas na fluência de  $6 \text{ J/cm}^2$ . Os autores relataram atrofia celular e diminuição acentuada tanto no número de pseudópodes como no número de células após tratamento, corroborando com os resultados deste estudo.

Além dos resultados semelhantes nas alterações morfológicas, a TFD+Clorina e6 em células de SW480 também reduziu significativamente o número de células viáveis. A concentração de  $1,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$  apresentou redução aproximada de 50% das células viáveis e a concentração de  $8 \mu\text{g.mL}^{-1}$  reduziu  $>80\%$  (MA *et al.*, 2021). Dessa forma, apesar da atuação das clorinas PDZ e FTC se sobressaírem na redução da viabilidade celular das células 9L/lacZ, atingindo  $>86,6\%$  de redução da viabilidade e atividade mitocondrial na menor concentração, o grupo de clorinas atingiu resultados otimistas nos parâmetros aplicados, indicando sua eficiência na TFD de diversos tipos de câncer.

As alterações no aspecto morfológico das células estão intrinsicamente relacionados na alteração da expressão de proteínas, visto que elas são responsáveis por determinar a forma e estrutura das células, bem como participar dos processos vitais. Sendo assim, uma das classes de proteínas importantes de serem analisadas na TFD são proteínas de choque térmico. Essas proteínas podem apresentar elevada expressão após um estresse oxidativo, como ocorre na TFD, com o intuito de “proteger” as células dos processos desencadeados para a ativação das vias apoptótica e de necrose celular. Além disso participam também na modulação da autofagia, conferindo resistência a TFD, e regulam a resposta inflamatória e imune (PEREZ, 2014; RODRÍGUEZ *et al.*, 2016)

As HSP podem ser classificadas como cross-priming, HSP indutoras de inflamação ou chaperonas (SOARES *et al.*, 2019). As HSP chaperonas apresentam capacidade de interagir reversivelmente com outras proteínas e auxiliar na formação, dobramento e transporte transmembrana. Quando há uma alteração que permita a elevação do estresse oxidativo, essas HSP aumentam sua expressão e auxiliam na

síntese e maturação das proteínas afetadas anteriormente pelo estresse, substituindo-as por novas, assim como no reparo de proteínas passíveis de restauração (CASTRO *et al.*, 2013).

A proteína HSP70 é uma das mais conservadas das HSP, com atuação direta na inibição da cascata de evento da via apoptótica. Sua análise pode ser utilizada como um indicativo de estresse oxidativo, visto sua facilidade de expressão após o estresse celular frente a um dano. A HSP70 auxilia no dobramento das proteínas, permitindo que proteínas afetadas pelo estresse possam se recuperar do dano, desenvolvendo papel de protetora contra lesões. Ou seja, ela está disponível para ajudar proteínas que participam desde a estrutura celular até a processo metabólicos das organelas celulares (CASTRO *et al.*, 2013).

Apesar do papel desenvolvido, quando os efeitos da TFD são extensos as HSP70 não conseguem exercer sua função citoprotetora adequadamente. Sua movimentação do citoplasma para a superfície celular é estimulada para auxiliar na contenção dos danos na membrana celular, entretanto dependendo dos parâmetros aplicados na TFD, esse evento pode ser insuficiente, possibilitando o desencadeamento dos processos de morte celular. Após a aplicação da TFD nos parâmetros suficientes para inviabilizar as células, as HSP70 são liberadas das células e capturadas por macrófagos, resultando na produção da citocina inflamatória fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), estimulando o sistema imune. (RODRÍGUEZ *et al.*, 2016).

Neste estudo podemos observar que após a TFD, em ambos FS, houve diminuição na imunodeteção de HSP70, comparado ao controle irradiado. Normalmente é relatado na literatura que essa proteína se apresenta elevada após a terapia, de modo a auxiliar as células a se recuperarem do estresse desencadeado (RODRÍGUEZ *et al.*, 2016), entretanto esse comportamento não foi observado na TFD com o FTC e PDZ em células da linhagem 9L/lacZ.

Esse resultado pode estar relacionado à eficácia da terapia nos parâmetros utilizados neste estudo, no qual observamos pelos testes de citotoxicidade a alta redução na porcentagem de células viáveis após a TFD e os efeitos provocados na adesão e morfologia celular. Esses parâmetros estão possivelmente impossibilitando o aumento da expressão de HSP70, solicitada pela célula como uma proteína restauradora. Dessa forma, níveis normais de expressão são estimuladas, porém

devido ao extenso efeito oxidativo da TFD, a HSP70 pode estar sendo inviabilizada, quando no meio extracelular, pelos macrófagos e estimulando a resposta imune, conforme explicado anteriormente, possibilitando o controle e/ erradicação das células remanescentes (RODRÍGUEZ *et al.*, 2016).

A presença da HSP27 já foi observado em alguns estudos como um importante fator de resistência à apoptose quando expressa após um estresse oxidativo em células Jurkat, correspondente a uma linhagem de linfócitos T, derivada da leucemia (ALOY *et al.*, 2008). A HSP27 é capaz de inibir a via apoptótica pelo aumento intracelular de glutathiona antioxidante (GSH), pelo impedimento da liberação do citocromo c mitocondrial ou pela sua ligação direta ao citocromo c (RODRÍGUEZ *et al.*, 2016). Além disso, essa proteína também foi apontada como um marcador metastático para cânceres de estômago, colón e esôfago, contribuindo também na invasão do tumor e resistência à TFD (FERNÁNDEZ-GUARINO *et al.*, 2020; KIM *et al.*, 2016; SOARES *et al.*, 2019)

Foi observado que a menor e a concentração intermediária apresentaram aumento da imunodeteção de HSP27 após TFD com o FTC, enquanto a TFD com o PDZ não apresentou aumento de imunodeteção. Como detalhado anteriormente, a HSP27 é uma importante proteína de resistência à apoptose, sua expressão elevada na TFD com o FTC pode indicar a tentativa de bloqueio do desencadeamento de morte celular pela via apoptótica. Isso se apresenta de acordo com um trabalho anterior realizado pelo grupo, no qual foi observado que a via de morte predominante na TFD com o FTC em células 9L/lacZ é via necrótica, seguida da apoptose tardia, pela análise realizada com marcação de iodeto de propídeo e anexina em citometria de imagem (ALMEIDA *et al.*, 2019).

A proteína HSP27 pode estar inibindo o processo apoptótico, entretanto como observado nos testes de citotoxicidade, o efeito na redução da viabilidade celular após TFD é de alto impacto, sendo assim, mesmo que via de apoptose seja dificultada, outras vias estão sendo acionadas para desencadear a morte dessa célula. Esse resultado deve então ser analisado cuidadosamente para avaliar a aplicação da TFD com o FTC nos parâmetros utilizados, já que para o tratamento de câncer cerebral é preconizado evitar a via necrótica devido a extensão dos efeitos inflamatórios (SILVA; SOARES, 2014).

Outro detalhe que merece atenção é o uso da TFD na concentração de 1,55  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e 12,50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  em condições *in vivo*, visto que, em razão do aumento da imunodeteção da HSP27, proteína que atua no desenvolvimento da resistência à TFD e desempenha papel de marcador de metástase, esses parâmetros podem trazer malefícios para a terapia, visto a alta quantidade de células que perdem a adesão após a 18h da TFD.

Tendo em vista os resultados otimistas apresentados pela TFD com o FTC e o PDZ no tratamento do gliossarcoma e os efeitos desencadeados pelo tratamento nas células, buscamos avaliar também o comportamento que a terapia apresentaria em células fibroblásticas com relação à alteração da adesão celular, para entender se essa resposta era característica da linhagem de gliossarcoma ou se também aconteceria em células saudáveis.

A princípio foi observado que os FS não alteraram a viabilidade das células L929, demonstrando que quando essas substâncias entram em contato com as células e não são irradiadas, a terapia se torna segura e seletiva. Porém quando essas células foram irradiadas, as respostas da TFD foram desencadeadas apresentando redução na viabilidade celular, em todas as concentrações testadas.

Sendo assim, esses resultados nos permite esclarecer o princípio da seletividade da TFD. A abordagem seletiva da terapia não significa que somente as células malignas irão internalizar o FS. Todas as células podem internalizar o FS, porém já foi constatado que as células malignas demoram mais para “expulsar” essa substância do seu conteúdo intracelular, acumulando maior concentração de FS em seu citoplasma, visto sua alta atividade metabólica (BARCESSAT, 2013). Além disso, a seletividade também ocorre quando se detecta a área tumoral durante a ressecção cirúrgica, por exemplo, podendo ser empregado o uso de fluoróforos para evidenciar o limite entre o tecido tumoral e o saudável, e dessa forma aplicando a luz apenas no tecido alvo, evitando que o tecido adjacente seja atingido (BECHET *et al.*, 2014).

Com isso, somente as células malignas desencadearão os efeitos da TFD, minimizando os efeitos nas células saudáveis que circundam a lesão. A depuração do FS do organismo deve ocorrer o mais rápido possível, variando para cada tipo de FS, de modo que o paciente não precise ficar privado do contato com a luz por muito tempo e volte para sua rotina (FERREIRA *et al.*, 2016).

Em estudos de casos reportados por Rynda e colaboradores em 2018, foi evidenciado que a TFD não apresenta efeitos colaterais sistêmicos em tecidos saudáveis, como os que ocorrem com as outras terapias empregadas atualmente, confirmando a hipótese apresentada acima, em que as células fibroblásticas do tecido saudável circundante não serão afetadas como as células malignas (RYNDA *et al.*, 2018).

Quanto ao desprendimento celular após 18h da TFD, não foi observado alteração na adesão das células L929 quando submetidas à terapia com todas as concentrações testadas na fluência de 5 J/cm<sup>2</sup> de ambos FS. Ou seja, a perda da adesão representou um processo característico da célula tumoral 9L/lacZ, o qual precisa aprofundar seus estudos para que possamos entender melhor o que está ocorrendo e o que pode representar um problema para a TFD.

Dessa forma, em razão do risco que representa a utilização das baixas concentrações, torna-se mais interessante para a aprovação do estudo *in vivo* da TFD com o FTC e o PDZ no GS, o emprego de parâmetros que produzam maior estabilidade na adesão celular, permitindo com que outros efeitos citotóxicos desencadeados pelas vias de morte celular sejam ativados primeiramente, a fim de garantir que aquela célula esteja morta e não cause preocupações quanto a propagação de metástases. Para isso, a utilização de concentrações mais altas, como a de 50,00 µg.mL<sup>-1</sup>, pode atuar de forma coerente na modulação dos efeitos da TFD, possibilitando que esses eventos sejam desencadeados em uma sequência correta, proporcionando um tratamento mais seguro para o paciente.

## 6 CONCLUSÃO

Com o presente trabalho pode-se concluir que o FTC e o PDZ apresentaram resultados promissores na TFD como método alternativo de tratamento para as células 9L/lacZ.

Ambos FS apresentaram formação de bandas na região de 660 nm, a qual apresentou deslocamento para a direita e diminuição de intensidade de absorção após a irradiação. Todas as concentrações testadas se internalizaram na extensão citoplasmática e apresentaram elevada redução da viabilidade celular e atividade mitocondrial nas fluências de 5 J/cm<sup>2</sup> e 10 J/cm<sup>2</sup>. Houve alterações na morfologia e na adesão celular após a TFD em ambos FS, indicando os processos característico da morte celular. O desprendimento celular após TFD foi maior nas menores concentrações e as células desprendidas estavam em sua maioria mortas. No entanto esse comportamento foi característico das células 9L/lacZ, já que o mesmo não aconteceu com as células de fibroblasto L929. Por fim, a imunodeteção da proteína HSP70 diminuiu após TFD com ambos FS, entretanto a imunodeteção de HSP27 aumentou após TFD com FTC, podendo caracterizar uma resposta desfavorável.

Dessa forma, foi evidenciado que a concentração de 50,00 µg.mL<sup>-1</sup> de ambos FS irradiados na fluência de 5 J/cm<sup>2</sup> apresentou maior vantagem para o uso na TFD no tratamento do gliossarcoma, com destaque para o PDZ, visto que esse não apresentou aumento na imunodeteção da HSP27, encorajando a continuação de seus estudos para o método *in vivo*.

## REFERÊNCIAS

- AGOSTINIS, P. *et al.* Photodynamic Therapy of Cancer : An Update. **American Cancer Society**, v. 61, p. 250–281, 2011.
- AHMED, F. I. *et al.* Evaluating the Association Between the Extent of Resection and Survival in Gliosarcoma Study design. **Cureus.**, v. 11, n. 4, 2019.
- ALMEIDA, R. M. S. *et al.* Avaliação do efeito da terapia fotodinâmica com fotoencina em células de gliosarcoma 9L/LacZ. *In: ENCONTRO LATINO AMERICANO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA*, 21., 2019. **Anais...**, Univap: São José dos Campos, 2019, p. 1–6.
- ALMEIDA, V. L. *et al.* Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o dna: uma introdução. **Química Nova**, v. 12, n. 1, p. 118–129, 2005.
- ALOY, M. T. *et al.* Protective Role of Hsp27 Protein Against Gamma Radiation-Induced Apoptosis and Radiosensitization Effects of Hsp27 Gene Silencing in Different Human Tumor Cells. **International Journal of Radiation Oncology Biology Physics**, v. 70, n. 2, p. 543–553, 2008.
- BARCESSAT, A. R. P. **Análise da expressão de marcadores de morte celular em lesões potencialmente malignas orais induzidas com 4-NQO e tratadas com terapia fotodinâmica.** 2013. Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.
- BECHET, D. *et al.* Photodynamic therapy of malignant brain tumours: A complementary approach to conventional therapies. **Cancer Treatment Reviews**, v. 40, n. 2, p. 229–241, 2014.
- 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.
- BONNETT, R.; MARTINEZ, G. Photobleaching of Sensitisers Used in Photodynamic Therapy. **ChemInform**, v. 33, n. 11, p. no-no, 2001.
- BUTTROS, D. DE A. B.; ORSATTI, C. L.; NAHAS, E. A. P. **Associação das HSP 60 e 70 com fatores de risco cardiovascular em mulheres na pós-menopausa tratadas de câncer de mama Associação das HSP 60 e 70 com fatores de risco cardiovascular em mulheres na pós-menopausa tratadas de câncer de mama.** 2018. Tese (doutorado) - Universidade do Estado Paulista, Botucatu, 2018.
- CARREÑO, E. A. *et al.* Considerations and technical pitfalls in the employment of the MTT assay to evaluate photosensitizers for photodynamic therapy. **Applied Sciences (Switzerland)**, v. 11, n. 6, 2021.
- CASTELLI, J. *et al.* Prognostic and therapeutic factors of gliosarcoma from a multi-institutional series. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 129, n. 1, p. 85–92, 2016.

CASTRO, S. V. *et al.* Proteínas de choque térmico hsp 70: Estrutura e atuação em resposta ao estresse celular. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 7, n. 4, p. 261–271, 2013.

CORREA, J. C. **Fotodegradação do photoditazine e citotoxicidade dos fotoprodutos formados após irradiação com laser**. 2006. Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.

CRAMER, S. W.; CHEN, C. C. Photodynamic Therapy for the Treatment of Glioblastoma. **Frontiers in Surgery**, v. 6, n. January, p. 1–11, 2020.

DARDIS, C. *et al.* Gliosarcoma vs. glioblastoma: a retrospective case series using molecular profiling. **BMC Neurology**, v. 21, n. 1, p. 1–13, 2021.

DENIS, T. G. *et al.* Combination approaches to potentiate immune response after photodynamic therapy for cancer. **Photochemical and Photobiological Sciences**, v. 10, n. 5, p. 792–801, 2011.

DE ALMEIDA, R. M. S. *et al.* Analysis of the effect of photodynamic therapy with Fotoenticine on gliosarcoma cells. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 30, n. December 2019, p. 101685, 2020.

DE OLIVEIRA, K. T. *et al.* Conceitos Fundamentais e Aplicações de Fotossensibilizadores do Tipo Porphirinas, Clorinas e Ftalocianinas em Terapias Fotônicas. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 1, p. 310–335, 2015.

FERNÁNDEZ-GUARINO, M. *et al.* Cytoplasmic Increase in Hsp70 Protein : A Potential New Biomarker of Early Infiltration of Cutaneous Squamous Cell Carcinoma Arising from Actinic Keratosis. **Cancers (Basel)**, v. 12, n. 5, p. 1–11, 2020.

FERREIRA, J. *et al.* Can efficiency of the photosensitizer be predicted by its photostability in solution? **Laser Physics**, v. 19, n. 9, p. 1932–1938, 2009.

FERREIRA, J. **Estudo e correlação de diferentes derivados de hematoporfirina e clorinas no processo de terapia fotodinâmica**. 2007. Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

FERREIRA, M. G. A. *et al.* Terapia Fotodinâmica no Tratamento de Neoplasias. **Revista Científica de Medicina Veterinária**, v. 13, n. 43, p. 106-115, 2016.

FIOCRUZ. **Câncer: impactos afetivos, sociais e econômicos**. 2018. Disponível em: <https://radis.ensp.fiocruz.br/index.php/home/noticias/cancer-impactos-afetivos-sociais-e-economicos>. Acesso em: 20 fev. 2022.

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.

FREIRE, M. E. M. *et al.* Calidad de vida relacionada con la salud de los pacientes con cáncer en atención paliativa. **SciELO**, v. 27, n. 2, p. 1–13, 2018.

HAMBLIN, M. R. Photodynamic Therapy for Cancer: What's Past is Prologue. **Photochemistry and Photobiology**, v. 96, n. 3, p. 506–516, 2020.

HAMBSCH, P. *et al.* Efficient cell death induction in human glioblastoma cells by photodynamic treatment with Tetrahydroporphyrin-Tetratosylat ( THPTS ) and ionizing irradiation. **Oncotarget**, v. 8, n. 42, p. 72411–72423, 2017.

HASHMI, F. A. *et al.* Biological characteristics and outcomes of gliosarcoma. **J. Pak. Med. Assoc.**, v. 68, n. August, p. 1273–1275, 2018.

HONG, C. S. *et al.* Hypermutated phenotype in gliosarcoma of the spinal cord. **npj Precision Oncology**, v. 5, n. 1, p. 1–6, 2021.

HUO, Z. *et al.* Primary gliosarcoma with long-survival: Report of two cases and review of literature. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 7, n. 9, p. 6323–6332, 2014.

INCA. **Estimativa | 2020 Incidência Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2019

INCA. **Brasil - estimativa dos casos novos. 2020**. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/estimativa/estado-capital/brasil>. Acesso em: 13 set. 2021.

ISHIKAWA, T. *et al.* **Critical Role of ABCG2 in ALA-Photodynamic Diagnosis and Therapy of Human Brain Tumor**. 1. ed. [s.l.]: Elsevier Inc., 2015.

JIN, M. C. *et al.* Evaluating Surgical Resection Extent and Adjuvant Therapy in the Management of Gliosarcoma. **Frontiers in Oncology**, v. 10, n. March, p. 1–9, 2020.

KIM, J. *et al.* Effects of HSP27 downregulation on PDT resistance through PDT-induced autophagy in head and neck cancer cells. **Oncology Reports**, v. 35, n. 4, p. 2237–2245, 2016.

KRUSE, M. L.; PEEREBOOM, D. M. Neurological Complications of Sarcomas. *In*: SCHIFF, D.; ARRILLAGA, I.; WEN, P. **Cancer Neurology in Clinical Practice: Neurological Complications of Cancer and its Treatment**. 3rd. ed. [s.l.: Springer]. p. 515–526, 2018.

KUSTOV, A. V *et al.* Transurethral Resection of Non-Muscle Invasive Bladder Tumors Combined with Fluorescence Diagnosis and Photodynamic Therapy with Chlorin e 6 -Type Photosensitizers. **J Clin Med.**, v. 11, n. 1, 2021.

LOBO, A. C. S. *et al.* Immune Responses after Vascular Photodynamic Therapy with Redaporfin. **J Clin Med.**, v. 9, n. 1, p. 1–16, 2020.

LOWDER, L. *et al.* Gliosarcoma: distinct molecular pathways and genomic alterations identified by DNA copy number/SNP microarray analysis. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 143, n. 3, p. 381–392, 2019.

MA, H. *et al.* Photodynamic effect of chlorin e6 on cytoskeleton protein of human

colon cancer SW480 cells. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 33, n. December 2020, p. 102201, 2021.

MANSOORI, B. *et al.* Photodiagnosis and Photodynamic Therapy Photodynamic therapy for cancer : Role of natural products. **Photodiagnosis Photodyn Ther.**, v. 26, n. May, p. 395–404, 2019.

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. **Photochem Photobiol.**, v. 95, n. 6, p. 1288-1305, 2019.

OH, J. E. *et al.* Genetic Alterations in Gliosarcoma and Giant Cell Glioblastoma. **Brain Pathology**, v. 26, n. 4, p. 517–522, 2016.

ONO, B. A. **Avaliação da resposta fotodinâmica em células de melanoma murino utilizando Photodithazine**. 2016. Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

ONO, B. A. *et al.* Subcellular localization and photodynamic activity of Photodithazine (glucosamine salt of chlorin e6) in murine melanoma B16-F10: an in vitro and in vivo study. **Optical Methods for Tumor Treatment and Detection: Mechanisms and Techniques in Photodynamic Therapy XXVII**, v. 1047616, n. February, p. 44, 2018.

OPAS, O. P. A. DA S. **Câncer**. Disponível em: [https://www.paho.org/pt/topicos/cancer#:~:text=O câncer é a segunda,de baixa e média renda](https://www.paho.org/pt/topicos/cancer#:~:text=O%20c%C3%A2ncer%20%C3%A9%20a%20segunda,de%20baixa%20e%20m%C3%A9dia%20renda). Acesso em: 12 set. 2021.

PEREIRA, A.; MAIA, L. Intervenção Neuropsicológica e Tumor Cerebral Intervenção Neuropsicológica : Tumor Cerebral. **Revista Eletrônica de Portales Medicos**, p. 1–15, 2016.

PEREZ, L. E. V. **Efeito do estresse subletal com a utilização de LED no desenvolvimento e na qualidade de embriões bovinos produzidos in vitro**. 2014. 63 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2014.

PONOMAREV, G. V. *et al.* The first experience of Photodithazine clinical application for photodynamic therapy of malignant tumors. **Optical Methods for Tumor Treatment and Detection: Mechanisms and Techniques in Photodynamic Therapy IX**, v. 1, p. 138–144, 2000.

ROBERTSON, C. A.; EVANS, D. H.; ABRAHAMSE, H. Journal of Photochemistry and Photobiology B : Biology Photodynamic therapy ( PDT ): A short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT. **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**, v. 96, n. 1, p. 1–8, 2009.

ROCHA, C. R. R. **Mecanismos de resistência à quimioterápicos em células tumorais**. 2015. Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

RODRÍGUEZ, M. E. *et al.* Heat shock proteins in the context of photodynamic therapy: Autophagy, apoptosis and immunogenic cell death. **Photochemical and Photobiological Sciences**, v. 15, n. 9, p. 1090–1102, 2016.

RODRÍGUEZ, M. E. *et al.* Heat shock protein 27 modulates autophagy and promotes cell survival after photodynamic therapy. **Photochemical and Photobiological Sciences**, v. 18, n. 2, p. 546–554, 2019.

ROMANKO, Y. S. *et al.* Effect of photodynamic therapy with photodithazine on morphofunctional parameters of M-1 sarcoma. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 138, n. 6, p. 584–589, 2004.

RYNDA, A. Y. *et al.* Therapeutic pathomorphosis in malignant glioma tissues after photodynamic therapy with chlorin e6 (reports of two clinical cases). **Biomedical Photonics**, v. 7, n. 3, p. 4–20, 2018.

SANTOS, A. F. *et al.* Photodynamic therapy in cancer treatment - an update review. **Journal of Cancer Metastasis and Treatment**, v. 5, 2019.

SETLIK, J.; CÁSSIO, R. D. S. O uso da terapia fotodinâmica como tratamento alternativo para o câncer de pele do tipo não- melanoma photodynamic therapy as an alternative treatment for non-melanoma skin últimos anos . Por definição , câncer é uma desordem na multiplicação das células. **Revista Saúde e Desenvolvimento**, v. 7, n. 4, p. 195–206, 2015.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 70, n. 1, p. 7–30, 2020.

SILVA, A. C. S.; SOARES, C. P. **Caracterização de células resistentes a terapia fotodinâmica**. [s.l: s.n.], 2014.

SOARES, C. P. *et al.* Avaliação de proteínas de choque térmico em células neoplásicas de laringe (hep-2) após tratamento fotodinâmico. **Revista Univap**, v. 25, n. 48, p. 43–62, 2019.

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

VEGA, E. *et al.* Gliosarcoma : un tumor cerebral poco común ( Gliosarcoma , a rare brain tumor ). **Avances en Biomedicina**, v. 3, n. 3, p. 165–170, 2014.

VITORIO, G. S. *et al.* Analysis of the effects of Photodynamic therapy with Photodithazine on the treatment of 9l/lacZ cells, in vitro study. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 34, n. February, p. 102233, 2021.

WANG, X. *et al.* Treatments of gliosarcoma of the brain: a systematic review and meta-analysis. **Acta Neurologica Belgica**, v. 121, n. 6, p. 1789-1797, 2020.

WENTZEL, M. Quanto o câncer custa à economia do Brasil?. **BBC**, 2018. Disponível

em: <https://www.bbc.com/portuguese/geral-43047430>. Acesso em: 2 mar. 2021.

YOSHIDA, Y. *et al.* Case Report Gliosarcoma with primitive neuronal, chondroid, osteoid and ependymal elements. **Neuropathology**, v. 38, n. 4, p. 392-399, 2018.

**ANEXO 1 CERTIFICADO DE PARTICIPAÇÃO DO “I FÓRUM ON-LINE DE TECNOLOGIAS DA LUZ NA SAÚDE” REALIZADO ENTRE OS DIAS 28 A 30 MAIO DE 2020.**



**I Fórum *On-line* de Tecnologias da Luz na Saúde**

Certificamos que **Gabrielle dos Santos Vitorio**, participou do evento:  
 I Fórum *On-line* de Tecnologias da Luz na Saúde, realizado em plataforma remota, nos dias  
 28, 29 e 30 de maio de 2020, contabilizando carga horária total de 14 horas.

I Fórum *On-line* de Tecnologias da Luz na Saúde,  
 30 de maio de 2020.







Sílvia Cristina Nunez  
 Comissão Organizadora



## ANEXO 2 - CERTIFICADO DE PUBLICAÇÃO

Trabalho intitulado “Alteração da aderência celular após TFD com Photodithazine em células de Gliossarcoma, estudo *in vitro*” no “I Fórum On-line de Tecnologias da Luz na Saúde” realizado entre os dias 28 a 30 maio de 2020.



### ANEXO 3 - PUBLICAÇÃO COMO CO-AUTORIA

Artigo “Analysis of the effect of photodynamic therapy with Fotoenticine on gliosarcoma cell” na revista internacional Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, disponível em Junho de 2020.





Photodiagnosis and Photodynamic Therapy


Volume 30, June 2020, 101685



## Analysis of the effect of photodynamic therapy with Fotoenticine on gliosarcoma cells

Rainara Moreno Sanches de Almeida <sup>a</sup>, Leticia Corrêa Fontana <sup>a</sup>, Gabrielle dos Santos Vitorio <sup>a</sup>, André Henrique Correia Pereira <sup>a</sup>, Cristina Pacheco Soares <sup>b</sup>, Juliana Guerra Pinto <sup>a</sup>, Juliana Ferreira-Strixino <sup>a</sup> 

Show more 

+ Add to Mendeley  Share  Cite

<https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2020.101685>

[Get rights and content](#)

**ANEXO 4 - CERTIFICADO DE PARTICIPAÇÃO DO “II FÓRUM ON-LINE INTERNACIONAL DE TECNOLOGIAS DA LUZ NA SAÚDE” REALIZADO ENTRE OS DIAS 20 A 22 DE MAIO DE 2021.**



## ANEXO 5 - PUBLICAÇÃO COMO PRIMEIRO AUTOR

Artigo “Analysis of the effects of Photodynamic therapy with Photodithazine on the treatment of 9l/lacZ cells, *in vitro* study” na revista internacional “Photodiagnosis and Photodynamic Therapy” disponível em Junho de 2021.




Photodiagnosis and Photodynamic Therapy

Volume 34, June 2021, 102233



### Analysis of the effects of Photodynamic therapy with Photodithazine on the treatment of 9l/lacZ cells, *in vitro* study

Gabrielle dos Santos Vitorio, Rainara Moreno Sanches de Almeida, Juliana Guerra Pinto, Leticia Correa Fontana, Juliana Ferreira-Strixino  

[Show more](#) 

[+](#) Add to Mendeley [🔗](#) Share [📄](#) Cite

<https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2021.102233>

[Get rights and content](#)

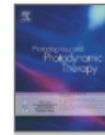
## ANEXO 6 - PUBLICAÇÃO COMO CO-AUTOR

Artigo “Photodynamic effect of photoporphyrin IX in gliosaroma 9l/lacZ cell line” na revista internacional “Photodiagnosis and Photodynamic Therapy” em 2022.




Photodiagnosis and Photodynamic Therapy



Volume 37, March 2022, 102669



### Photodynamic effect of protoporphyrin IX in gliosarcoma 9l/lacZ cell line

Letícia Corrêa Fontana <sup>a</sup>, Juliana Guerra Pinto <sup>a</sup>, Gabrielle dos Santos Vitorio <sup>a</sup>, Isabelle Ferreira <sup>a</sup>, Cristina Pacheco-Soares <sup>b</sup>, Leandro Ariel Mamone <sup>c</sup>, Juliana Ferreira Strixino <sup>a</sup>  

Show more 

+ Add to Mendeley  Share  Cite

<https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2021.102669>

[Get rights and content](#)