

Universidade do Vale do Paraíba
Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica

CARLOS DAILTON GUEDES DE OLIVEIRA MORAES

**MECANISMOS DE RESPOSTAS NA LINHAGEM CELULAR HEP-2 APÓS
TRATAMENTOS COM TERAPIA FOTODINÂMICA E CICLOFOSFAMIDA**

São José dos Campos, SP
2020

CARLOS DAILTON GUEDES DE OLIVEIRA MORAES

**Mecanismos de respostas na linhagem celular HEp-2 após tratamentos
com terapia fotodinâmica e ciclofosfamida**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade do Vale do Paraíba, como requisito necessário para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Biomédica.

Orientador: Prof. Dr. Newton Soares da Silva

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

São José dos Campos, SP
2020

TERMO DE AUTORIZAÇÃO DE DIVULGAÇÃO DA OBRA

Ficha catalográfica

Moraes, Carlos Dailton Guedes de Oliveira
Mecanismos de respostas na linhagem celular HEp-2 após
tratamentos com terapia fotodinâmica e ciclofosfamida / Carlos
Dailton Guedes de Oliveira Moraes; orientador, Newton Soares da
Silva; co-orientadora Cristina Pacheco Soares. - São José dos
Campos, SP, 2020.

1 CD-ROM, 57 p.

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

Inclui referências

1. Engenharia Biomédica. 2. Terapia Fotodinâmica. 3.
Ciclofosfamida. 4. Proteínas de Choque Térmico. 5. Densidade
celular. I. Silva, Newton Soares da , orient. II. Soares,
Cristina Pacheco , co-orient. III. Universidade do Vale do
Paraíba. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica. IV.
Título.

Eu, Carlos Dailton Guedes de Oliveira Moraes, autor(a) da obra acima
referenciada:

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

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

São José dos Campos, 28 de Maio de 2020.

Carlos Dailton

Autor(a) da Obra

CARLOS DAILTON GUEDES DE OLIVEIRA MORAES

**“MECANISMOS DE RESPOSTAS NA LINHAGEM CELULAR HEP-2 APÓS
TRATAMENTOS COM TERAÍÁ FOTODINÂMICA E CICLOFOSFAMIDA.”**

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

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

PROF. DR. NEWTON SOARES DA SILVA _____

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

PROF.^ª DR.^ª NOALA VICENSOTO MOREIRA MILHAN - Unesp _____

Prof. Dr. Leandro José Raniero

Diretor do IP&D – Univap

São José dos Campos, 31 de março de 2020.

Data da defesa: 31 / Março / 2020

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, pois sem Ele eu não teria forças para essa longa jornada.

A minha mãe Robélia Guedes de Oliveira Moraes e ao meu pai Carlos Soares Moraes e pelo carinho e apoio, não medindo esforços para que eu pudesse chegar até esta etapa de minha vida.

A minha irmã Jéssica Tereza Guedes de Oliveira Moraes por sua capacidade de acreditar em mim.

O meu orientador Prof Dr Newton Soares por ter me aceitado como seu orientando e me guiar nesta jornada.

A minha co-orientadora Prof^a Dra Cristina Pacheco Soares por ter me aceitado em seu laboratório desde o início de minha graduação, ensinando em todo este percurso.

A Dra Isabel Chaves Silva Carvalho pelas conversas esclarecedoras, contribuição científica, apoio e amizade.

A todos os professores do curso, que foram tão importantes na minha vida acadêmica e no desenvolvimento desta monografia.

A todos os colegas que contribuíram direta e indiretamente para este trabalho.

AGRADECIMENTO

Primeiro a Deus, pois sem ele nada é possível e é graças a Ele que podemos explorar todo o nosso potencial e assim podemos trazer benefício à humanidade.

A nossos pais, por sustentar o incontestado da construção moral e civil que nos constitui.

Aos orientadores Dr Newton Soares da Silva e Dra Cristina Pacheco Soares, por construir um caminho longo, porém seguro para o aprendizado.

Aos amigos do Laboratório de Dinâmica de Compartimentos Celular, profissionais capazes que pude conviver e aprender com eles as mais diversas áreas do conhecimento.

A Dra Isabel Chaves Silva Carvalho e a Dra Geisa Nogueira Salles por me ensinar um pouco de seus saberes, ajudando a evoluir constantemente com as suas contribuições científicas, apoio e amizade.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES por todo o apoio.

“MELHOR É O FIM DAS COISAS DO QUE O PRINCÍPIO DELAS”
(Eclesiastes 7:8)

RESUMO

O câncer é a segunda doença mais letal no mundo, dentre eles pode ser destacado o câncer de laringe, visto que apresenta grande perspectiva de aumento para as próximas décadas. Deste modo são necessários estudos para o desenvolvimento de novas terapias, bem como a combinação de tratamentos já estabelecidos para melhor prognóstico dos pacientes. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a resposta da célula tumoral submetidas à Terapia Fotodinâmica (TFD), Ciclofosfamida (CFM) e aos tratamentos associados. A CFM é um quimioterápico já estabelecido na rotina clínica, pelo seu caráter alquilante e ciclo regulador utilizado para remissão do tumor. A TFD é um tratamento promissor, visto que proporciona a formação de espécies reativas de oxigênio capazes de induzir a morte celular, por meio da interação entre um fotossensibilizante, luz visível em um comprimento de onda adequado ao fotossensibilizante e o oxigênio molecular. Neste trabalho foram utilizadas células de carcinoma epidermoide de laringe (HEp-2), que foram divididas em grupos (Controle +, LED, AIPcS₄, LED + CFM, CFM, TFD, TFD + CFM, Morte), sendo avaliadas neste estudo pelos ensaios de Cristal Violeta, MTT e, imunomarcagem para GRP-78. O fotossensibilizante alumínio ftalocianina tetrassulfonada (AIPcS₄ na concentração de 5µM), foi utilizado para a TFD, e após 1 hora de incubação as células foram irradiadas com LED Biopdi / Irrad-Led5 660 com 660 nm de comprimento de onda, potência por área de 25 mW/cm², fluência de 5 J/cm², por 3 minutos e 20 segundos. A CFM foi utilizada na concentração de 200 µg/mL. Após os tratamentos, nos tempos de incubação de 24, 48 e 72 horas, foi possível verificar redução da densidade celular, pelo cristal violeta, dos grupos CFM, TFD e TFD + CFM em comparação ao Grupo Controle +. Ademais, observamos redução na atividade mitocondrial, pelo teste de MTT, nos grupos TFD e TFD + CFM em relação ao Grupo Controle + nos três períodos analisados. O grupo CFM, por outro lado, apresentou aumento na atividade mitocondrial em relação ao Grupo Controle + nos períodos 24 h e 48 h. O grupo CFM, no período de 72 h, não apresentou diferença estatística quando comparado ao Grupo Controle +. Além disso, pode ser verificado por imunomarcagem a presença da proteína de choque térmico GRP-78 nos grupos CFM, TFD e TFD + CFM, já o Grupo Controle + foi negativo para esta imunomarcagem. Assim, podemos concluir que os tratamentos tanto com a CFM, quanto com a TFD provocaram dano celular. Embora não apresente melhor eficiência na redução da densidade celular, o tratamento TFD + CFM foi mais promissor, visto que inibe a CFM inibe a proliferação celular de possíveis células sobreviventes a TFD.

Palavras Chaves: Terapia Fotodinâmica. Ciclofosfamida. Proteínas de Choque Térmico. Densidade celular. AIPcS₄.

Mechanisms of Response to HEp-2 Cell Line After Treatments with Photodynamic Therapy and Cyclophosphamide

ABSTRACT

Cancer is the second most lethal disease in the world; among which laryngeal cancer can be highlighted since it has a great prospect of increase for the next decades. Thus, studies for the development of new therapies are required, as well as studies evaluating the association of pre-existing treatments. The aim of this study was to evaluate the tumor cell response mechanisms under treatments with Photodynamic Therapy (PDT), Cyclophosphamide (CY) and an association of them. CY is a chemotherapy drug already established in the clinical routine, due to its alkylating character and regulatory cycle used for tumor remission. The PDT is a promising treatment, since it provides the formation of reactive oxygen species capable of inducing cell death, through the interaction between a photosensitizer, visible light at a wavelength suitable for the photosensitizer and molecular oxygen. In this work, cells of laryngeal squamous cell carcinoma (HEp-2) were used, which were divided into groups (Control, LED, AIPcS₄, LED + CY, CY, PDT, PDT + CY, Death), being evaluated by Violet Cristal test, MTT test and immunostaining to GRP-78. The photosensitizer tetrasulfonated aluminum phthalocyanine (AIPcS₄) was used for PDT, and after 1 hour of interaction the cultures were irradiated with Biopdi / Irrad-Led5 660 LEDs with 660 nm wavelengths, light intensity delivered 25 mW/cm², fluency of 5 J/cm², for 3 minutes and 20 seconds. CY was used at a concentration of 200 µg/mL for 24 h, 48 h, 72 h. It was possible to verify a reduction of cell density by the Violet Crystal test in CY, PDT and PDT + CY groups compared to control group, after 24 h, 48 h and 72 h. In addition, a decrease in mitochondrial activity was observed by MTT test in PDT and PDT + CY groups compared to control group in the three analyzed periods. Differently, CY group showed an increase in mitochondrial activity compared to control group 24 h and 48 h after the treatment. After 72 h, CY group showed no statistical difference compared to control group. Furthermore, the presence of the heat shock protein GRP-78 could be verified by immunolabeling in CY, PDT and PDT+CY groups, whereas the control group was negative to this immunolabeling. Thus, we can conclude that both treatments CY and PDT caused cellular damage. Although it does not show better efficiency in reducing cell density, the TFD + CFM treatment was more promising, since it inhibits CFM and inhibits cell proliferation of possible TFD surviving cells.

Keywords: Photodynamic Therapy. Cyclophosphamide. Heat Shock Proteins. Cell density. AIPcS₄.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Metabolização da Ciclofosfamida	17
Figura 2: Diagrama de Jablonski modificado	19
Figura 3: Esquema da reação de tipo 1 e 2 decorrente da TFD	20
Figura 4: Estrutura do alumínio ftalocianina tetrassulfonada (AIPcS ₄).....	22
Figura 5: Esquema da Metodologia	25
Figura 6: Ensaio Cristal Violeta no período de 24 h.....	30
Figura 7: Ensaio Cristal Violeta no período de 48 h.....	31
Figura 8: Ensaio Cristal Violeta no período de 72 h.....	32
Figura 9: Ensaio Cristal Violeta na comparação intragrupos	33
Figura 10: Ensaio MTT no período de 24 h.....	35
Figura 11: Ensaio MTT no período de 48 h.....	36
Figura 12: Ensaio MTT no período de 72 h.....	37
Figura 13: Ensaio MTT na comparação intragrupos	38
Figura 14: Imunomarcção GRP-78 - 24 h	40
Figura 15: Imunomarcção GRP-78 - 48 h	41
Figura 16: Imunomarcção GRP-78 - 72 h	42
Figura 17: Curva de Concentração da CFM no Período de 24 h.....	54
Figura 18: Curva de Concentração da CFM no Período de 48 h.....	55
Figura 19: Espectro de absorção do AIPcS ₄	56
Figura 20: Curva de Calibração do Fármaco Fotossensibilizante AIPcS ₄	57
Figura 21: Localização do Alumínio Ftalocianina Tetrassulfonada (AIPcS ₄) após a incubação nas células HEp-2	57
Figura 22: Ensaio Cristal Violeta para estabelecer a curva para da TFD	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALDH	Aldeído Desidrogenase
ALDH1A1	Aldeído Desidrogenase Classe 1A1
AlPcS ₄	Alumínio Ftalocianina Tetrassulfonada
ATCC	American Type Culture Collection
A _{fs}	Absorbância do Fs
cm ²	Centímetro quadrado
λ	Comprimento de onda
CV	Cristal Violeta
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
T ₁	Estado excitado tripleto
S ₀	Estado fundamental
EO	Estresse Oxidativo
FS	Fotossensibilizante
g	Grama
GRP-78	Proteína regulada por glicose de 78 kDa,
h	Hora
INCA	Instituto Nacional do Câncer
J	Joule

J/cm ²	Joules por centímetro quadrado
LEDs	Light Emitting Diode
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrometro
µM	Micromolar
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mW	Miliwatts
nm	Nanometro
ns	Não Significante
S ₁	Estado Excitado
BAD	Proteína D associada à bcl-2
BAX	Proteína X associada à bcl-2
BCL-2	Proteínas Proto-Oncogênicas c-bcl-2
rpm	Rotações por minuto
PBS	Solução Salina Tamponada com Fosfato
SFB	Soro Fetal Bovino
TFD	Terapia Fotodinâmica
MTT	3-(4,5-dimetil) tiazol-2-il-2,5-difenil brometo de tetrazólio

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS.....	14
2.1	Objetivo Geral.....	14
2.2	Objetivos Específicos	14
3	REVISÃO DE LITERATURA	15
3.1	Câncer	15
3.1.1	<i>Câncer de Laringe</i>	15
3.2	Ciclofosfamida	16
3.3	Terapia Fotodinâmica	18
3.3.1	Fotossensibilizante.....	20
3.4	GRP-78	22
4	METODOLOGIA	23
4.1	Cultura de Células.....	23
4.2	Grupos Experimentais.....	23
4.3	Plaqueamento.....	25
4.4	Terapia Fotodinâmica	26
4.4.1	<i>Fotossensibilizante</i>	26
4.4.2	<i>Irradiação</i>	26
4.5	Incubação com Ciclofosfamida	27
4.6	Teste de Densidade Celular Utilizando Cristal Violeta	27
4.7	Ensaio de Atividade Mitocondrial.....	27
4.8	Ensaio de Imunomarcção.....	28
4.9	Análise Estatística	28
5	RESULTADOS.....	29
5.1	Ensaio de Densidade Celular – Cristal Violeta.....	29
5.2	Ensaio de Atividade Mitocondrial – MTT	34
5.3	Imunomarcção das HSP	38
6	DISCUSSÃO	43
7	CONCLUSÃO	48
	REFERÊNCIAS	49
	Apêndices: Estudo Piloto.....	54
A	Determinação da Concentração do Quimioterápico CFM.....	54
B	Caracterização do Alumínio Ftalocianina Tetrassulfonada (AIPcS ₄).....	55
C	Determinação ideal para TFD	58
	Anexo A: Genotoxic effects of photodynamic therapy in laryngeal cancer cells – An in vitro study	59

1 INTRODUÇÃO

Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), o Brasil apresenta alta incidência de tumores malignos da laringe, representando o sexto sítio mais comum na população masculina com idade média de 40 anos. O tratamento depende da localização e extensão, podendo ser tratado com cirurgia, radioterapia e quimioterapia, contudo os tratamentos hoje ofertados apresentam muitos efeitos colaterais (BRASIL, 2011; BRASIL, 2016).

A quimioterapia pode atuar como agente estressor agindo na eliminação de células tumorais (FALGREEN *et al.*, 2015). Alguns quimioterápicos como a ciclofosfamida (CFM), interagem com o DNA, interferindo no ciclo celular, diminuindo assim a taxa proliferativa da célula. Além disto, é letal às células cancerígenas, sendo utilizado no tratamento do câncer para diminuição do volume tumoral (IIDA *et al.*, 2016).

Como alternativa para os tratamentos clássicos, temos a Terapia Fotodinâmica (TFD), a qual pode ser definida como uma reação entre fotossensibilizante (FS) e a luz na presença de oxigênio molecular, gerando efeito citotóxico por meio de reações oxidativas. Nessa terapia, o FS é utilizado e ativado por luz (sensibilização) causando morte celular, sendo que as ações separadas das partes não provocam o mesmo efeito proporcionado pelo conjunto aos tecidos biológicos (GALVÃO *et al.*, 2016; LACERDA; ALFENAS; CAMPOS, 2014).

Apesar da quimioterapia já ser uma técnica estabelecida na rotina clínica, apresentar limitações, podendo haver células sobreviventes. Deste modo, a associação entre a TFD e CFM pode ser uma combinação interessante ainda pouco explorada que poderia potencializar o tratamento contra o câncer.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a resposta celular, utilizando a linhagem tumoral HEP-2 após o tratamento com a Terapia Fotodinâmica tendo AIPcS₄ como fotossensibilizante, e o tratamento com a Ciclofosfamida, verificando a eficiência dos tratamentos em conjunto ou separadamente.

2.2 Objetivos Específicos

- a) Avaliar a Densidade Celular por meio do ensaio de Cristal Violeta após os tratamentos.
- b) Analisar a Atividade Mitocondrial por meio do ensaio de MTT após os tratamentos.
- c) Avaliar a expressão da Proteína de Choque Térmico (GRP-78) por meio do ensaio de imunomarcação após os tratamentos.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Câncer

O câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm como características alterações genéticas das células e o seu crescimento desordenado (BRASIL, 2018). De modo geral é uma doença complexa, visto que apresenta marca de instabilidade genética, anormalidades celulares e acúmulo de alterações moleculares múltiplas, tornando-se um problema de saúde pública mundial amplamente discutido nos meios de comunicação. Além disso, os tratamentos convencionais são agressivos, podendo ocorrer prognóstico insatisfatório, ou dificuldades em determinar quais pacientes estão em risco de progressão ou recorrência da doença. Observa-se também dificuldade em identificar o regime terapêutico mais eficaz para o paciente devido à heterogeneidade clínica dos tumores, dentre outros fatores (PARHI; MOHANTY; SAHOO, 2012; MORAES *et al.*, 2019).

Várias causas podem levar ao desenvolvimento da doença, dentre elas o meio ambiente, hábitos, costumes, alimentação, exposição às doenças ou agentes mutagênicos; e também a herança genética (BRASIL, 2016). Por fim, o envelhecimento populacional é um importante fator de risco, pois acarretam mudanças nas células, como o encurtamento dos telômeros, o que aumenta a suscetibilidade das mesmas às transformações, além da exposição celular por mais tempo aos diversos fatores de risco. Este fato explica a maior incidência de câncer na população idosa do que em outras faixas etárias (MAGALHÃES, 2013).

Dados indicam que haverá 600 mil novos casos de câncer no mundo nos próximos anos. Essa informação, alinhada ao fato de que a incidência de câncer no mundo cresceu 20% da última década, preocupa diversos órgãos que buscam combater esta patologia (BRASIL, 2018).

3.1.1 Câncer de Laringe

O câncer de laringe apresenta maior incidência em homens acima de 40 anos. Além disso, ele representa cerca de 25% dos tumores malignos que

acometem essa área, mais também o total de 2% de todas as doenças malignas (BRASIL, 2018). O diagnóstico é feito por laringoscopia incisional para exame histopatológico, sendo que a escolha baseia-se no estadiamento (CHOUDHARI *et al.*, 2013).

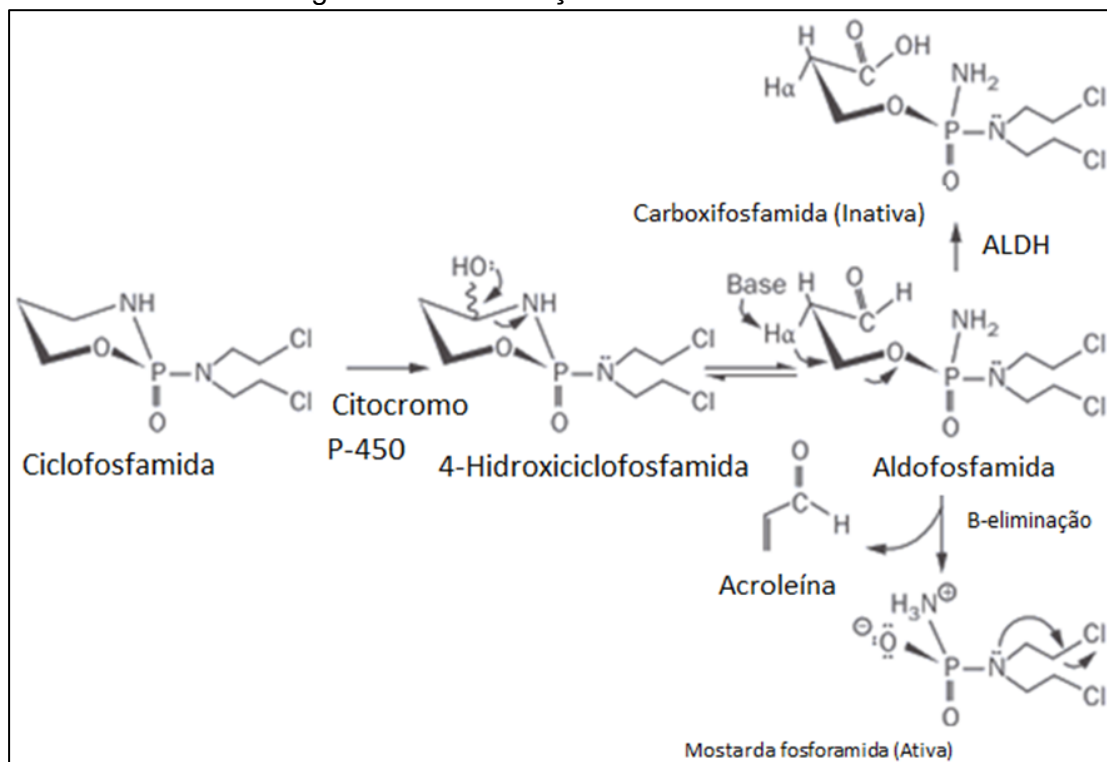
Evidências indicam o que uso de tabaco aumenta progressivamente os riscos de câncer de laringe. Outros fatores que têm sido associados são o histórico familiar, alimentação, situação socioeconômica desfavorável, exposição a produtos químicos, mal-uso da voz, excesso de gordura, e presença de HPV (sigla em inglês para Papiloma Vírus Humano). Por outro lado, o consumo adequado de frutas e hortaliças parece exercer efeito profilático, embora não influencie na doença já estabelecida (BRASIL, 2016).

3.2 Ciclofosfamida

A ciclofosfamida (CFM) é um dos agentes anticancerígenos, que mais de 60 anos após sua síntese, continua sendo amplamente utilizada como quimioterápico e desordem imunológicas (EMADI; JONES; BRODSKY, 2009; HE; DENG; YUE, 2017).

CFM é um agente alquilante que precisa ser metabolizado para ser utilizado como fármaco em tratamentos (Figura 1). É indicada principalmente no tratamento de leucemias, linfomas, rabdomyosarcomas, sarcomas de Ewing e tumores cerebrais, podendo também ser utilizada no tratamento de outros tipos de cânceres. Além disso, é utilizada em transplantes de medula óssea, e associada às células tronco no tratamento de reumatismo e lúpus eritematoso (CHUNG *et al.*, 2013; IIDA *et al.*, 2016).

Figura 1: Metabolização da Ciclofosfamida



Fonte: Adaptado de Emadi, Jones e Brodsky, 2009.

O Fármaco foi sintetizado a partir da substituição de um anel de oxazafosforina por um grupo metila, assim criando o pró-fármaco que seria ativo apenas em células cancerígenas. Assim é administrada na sua forma inativa, sendo metabolizada por células capazes de expressar altas concentrações de fosfamidase, enzima capaz de quebrar a ligação fosforo-nitrogênio, por fim convertendo o fármaco na sua forma ativa mais tóxica (EMADI; JONES; BRODSKY, 2009; KNUDSEN *et al.*, 2015).

Este quimioterápico tem influência no material genético da célula, já que interage com o DNA evitando sua duplicação, além de inativar proteínas necessárias para replicação e transcrição, na célula sadia, e principalmente, na célula cancerígena, devido à sua especificidade. Sabe-se também que existe relação direta entre a concentração empregada e a destruição de células, dentro dos limites de tolerância do hospedeiro (TRIPATHI; JENA, 2010; LIU *et al.*, 2012).

A ação citotóxica da mostarda nitrogenada está estreitamente relacionada com a reatividade dos grupos 2-cloroetil ligados ao átomo central de azoto. Em condições fisiológicas, sofre ciclização intramolecular por meio da

eliminação do cloreto, formando um cátion cíclico de aziridínio (etilenimínio). Este cátion, altamente instável, interage com os átomos de carbono do anel de aziridina, como resíduos de guanina de DNA. Esta reação libera o nitrogênio do agente alquilante e o torna disponível para reagir com a segunda cadeia lateral de 2-cloroetil, formando uma segunda ligação covalente com outro nucleófilo, interferindo na replicação e formando ligações cruzadas interfilamentos de DNA (RAFFAGHELLO *et al.*, 2008; BAO *et al.*, 2011). Além da interação com o DNA, a CFM também ativa mecanismos pró-apoptóticos como a BAX (proteína X associada à bcl-2) e BAD (proteína D associada à bcl-2), contornando com mecanismos celulares anti-apoptose como da família Bcl-2 (Proteínas Proto-Oncogênicas c-bcl-2), favorecendo a morte celular (COLEY, 2008).

Deste modo, a sensibilidade inerente das células cancerígenas a apoptose, após sofrer danos no seu DNA, e a expressão de outras enzimas, como a fosforamidase são importantes mecanismo de ação da CFM, tornando-a um fármaco de ampla indicação para o câncer. Contudo, o aumento de expressão de ALDH1A1 (aldeído desidrogenase classe 1A1), representa um fator de resistência das células tumorais, o que pode levar a uma resposta não satisfatória ao tratamento. O aumento de glutathione e glutathione S-transferase, em nível celular, também representa um fator de resistência à CFM, embora em menor grau (EMADI; JONES; BRODSKY, 2009; AGRAWAL *et al.*, 2017).

3.3 Terapia Fotodinâmica

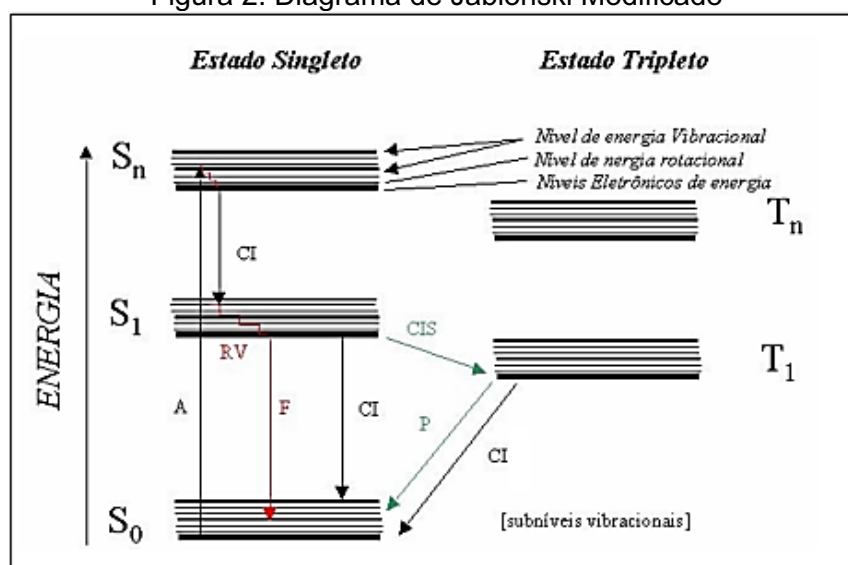
Desde os tempos primitivos, o homem busca alternativas para combater as diversas enfermidades que desafiam a vida. A história da terapia fotodinâmica (TFD) é baseada nas tentativas dos antigos egípcios para tratar doenças de pele com compostos absorvíveis pela luz (WEISS *et al.*, 2012). Na Índia e China, a luz solar era utilizada para tratamento de doenças da pele como psoríase e vitiligo, enquanto na Grécia antiga, o médico grego Heródoto definia a técnica como Helioterapia para a restauração da saúde (DOLMANS; FUKUMURA; JAIN, 2003).

A TFD pode ser definida como uma reação entre fotossensibilizante (FS) e luz na presença de oxigênio molecular, gerando efeito citotóxico por meio de reações oxidativas. Nesta terapia, um FS é utilizado e ativado por luz

(sensibilização), desencadeando mecanismos que causam a morte celular. Contudo, quando os componentes para a TFD são aplicados separadamente, ou seja, não ocorrendo interação entre o FS e a luz, não ocorre a ação da TFD (ACKROYD *et al.*, 2001; ALLISON, 2014; PACHECO-SOARES *et al.*, 2014).

O mecanismo de ação da TFD (Figura 2) começa quando a molécula do FS absorve fótons (A). Os elétrons do seu estado fundamental (S_0) são transferidos para um estado excitado singleto (S_n), existindo a probabilidade do processo de fluorescência (F) bem como o relaxamento vibracional (RV) do estado S_1 para o S_0 , como também a probabilidade de cruzamento inter-sistemas (CIS), levando ao estado excitado tripleto (T_n). A energia no estado T_1 pode ser dissipada pelo processo de fosforescência, quando o elétron retorna para o estado S_0 ou há transferência de energia para outras moléculas conforme ilustrado no diagrama de Jablonski (BATISTA; PAULO; MOREIRA, 2006).

Figura 2: Diagrama de Jablonski Modificado

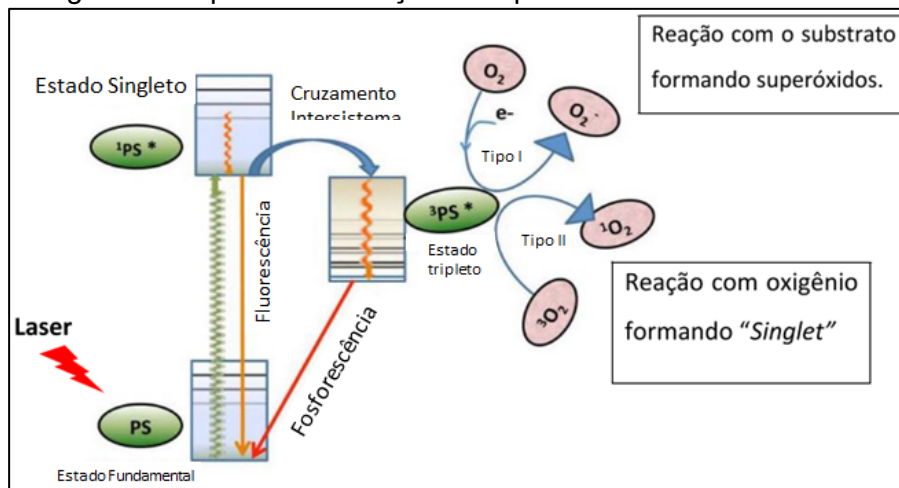


Fonte: Batista, Paulo e Moreira, 2006.

A transferência de elétrons entre o fotossensibilizante no estado tripleto excitado e os componentes do sistema, gera íons-radicais que então reagem com o oxigênio no estado fundamental, desestabilizando e resultando em produtos oxidados (Figura 3). Em geral, os processos de transferência de elétron são muito rápidos, já que ocorre a sobreposição dos orbitais envolvidos durante a formação do complexo excitado (ABRAMCZYK *et al.*, 2017). Além disso, a transferência de energia do fotossensibilizante, ativado pela irradiação,

para o oxigênio no estado tripleto, tendo por consequência a geração de oxigênio singleto, sendo este composto altamente citotóxico (SETLIK; SILVA, 2015).

Figura 3: Esquema da Reação de Tipo 1 e 2 Decorrente da TFD



Fonte: Adaptado de Kharkwal *et al.*, 2012.

A ação do oxigênio singleto na morte ou inviabilização de células tumorais tem sido evidenciada de diversas maneiras, como danos à membrana celular, mitocôndria e lisossomos, comprometendo a integridade celular. Além disso, podem ainda destruir o tumor indiretamente, causando danos ao endotélio vascular, o que resulta em hipóxia e, conseqüentemente, na morte celular. Além disso, nenhum efeito mutagênico sobre as células saudáveis foi reportado com a utilização da TFD, sendo demonstrada a segurança da terapia (KIM *et al.*, 2016; SILVA *et al.*, 2018).

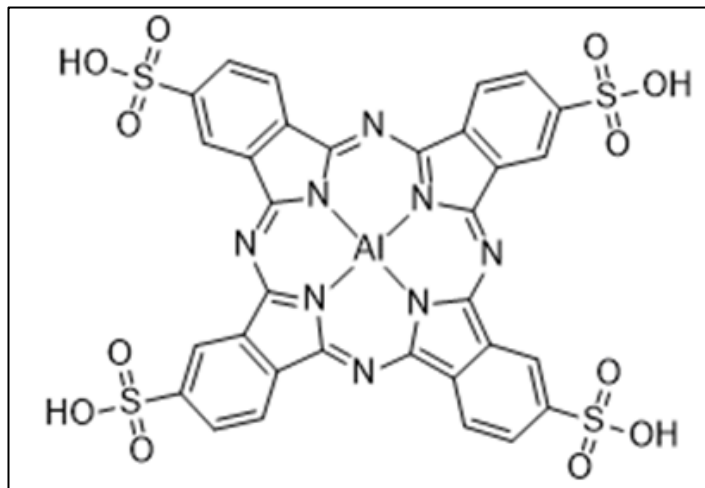
3.3.1 Fotossensibilizante

Os fotossensibilizantes (FS) possuem a capacidade de absorver luz visível em alguma região do espectro visível (banda de absorção ressonante), podendo induzir ou participar de reações fotoquímicas, favorecendo a produção de espécies reativas de oxigênio, causando dano oxidativo (SENTHILARASU; HAHN; LEE, 2007; SETLIK; SILVA, 2015). Os fotossensibilizantes são classificados em primeira geração, sendo representada pelas porfirinas, já a segunda geração é composta pelas clorinas e ftalocianinas, por fim a terceira

geração são os fármacos baseados em nanobiotecnologia (FERREIRA *et al.*, 2009).

A escolha do FS deve considerar determinadas características como a farmacocinética, biodistribuição, estrutura química e a interação com o tecido. Tais características determinarão o comportamento e os resultados desencadeados nas células, como a morte celular, que é o efeito desejado (LIN *et al.*, 2014). Além disso, o conhecimento aprofundado a respeito do alvo a ser tratado, aumenta as chances de se escolher um FS adequado (AKILOV *et al.*, 2008). Parâmetros como tempo de incubação pré-irradiação e fonte de luz adequada, são também características importantes para determinar o agente FS, bem como as características físico-químicas dos compostos (ABRAHAMSE; HAMBLIN, 2016). Outros pontos a serem destacados são pureza química, seletividade a célula alvo, estabilidade química e física, mínimos efeitos tóxicos aos tecidos normais, depuração sistêmica, entre outros (ROBERTSON; EVANS; ABRAHAMSE, 2009).

As propriedades fotofísicas das ftalocianinas estão relacionadas com o metal central. Deste modo, destacam-se os complexos Zn(II) e Al(III), por apresentarem propriedades fotoquímicas favoráveis à aplicação na TFD, ou seja, relativa longa-vida do estado singleto do oxigênio e longa-vida do estado tripleto, assim proporcionando alto rendimento quântico (LIU *et al.*, 2012; MORAES *et al.*, 2019). Porém, a presença de 4 grupos fenil está relacionado aos problemas de solubilidade de conseqüentemente de agregação. Para evitar esta desvantagem são adicionados grupos de ácido sulfônico como na AIPcS₄ (Figura 4), responsáveis pelo aumento da hidrossolubilidade (LIN *et al.*, 2014).

Figura 4: Estrutura do Alumínio Ftalocianina Tetrassulfonada (AlPcS₄)

Fonte: (MEDKOO, 2020).

3.4 GRP-78

As Proteínas de Choque Térmico (*Heat Shock Proteins* (HSP)) são proteínas produzidas pela própria célula, estando envolvidas em variadas atividades, principalmente ligadas à proteção fisiológica e patológica das células. Geralmente são expressas em situações de estresse, como no desenvolvimento tumoral, mas também atuam naturalmente em casos não estressantes, apenas para manter a integridade das proteínas celulares, colaborando para a restauração celular (KENNEDY *et al.*, 2014). Deste modo, são fundamentais para a sobrevivência das células, sendo relacionadas ao transporte e enovelamento de proteínas (KENNEDY; MNICH; SAMALI, 2014).

A proteína glicose ligada (GRP-78), também conhecida como BiP, é a maior chaperona do retículo endoplasmático (RE), que apresenta importante papel na oncogênese. A GRP-78 pertence a família das proteínas de choque térmico HSP-70 (LEE *et al.*, 2008).

A GRP-78 possui variadas funções dentro das células, podendo induzir a apoptose, mas também atuar na proteção e desenvolvimento celular. Estudos desta proteína em células tumorais, correlacionaram-na com a promoção e o crescimento do tumor. A atividade pleiotrópica como chaperona, da GRP-78, confere às células cancerígenas a capacidade de alterar atividades proteicas dos componentes do ciclo celular, das quinases e outras proteínas que estimulam o crescimento tumoral (CASTRO *et al.*, 2013; JUHASZ *et al.*, 2014).

4 METODOLOGIA

4.1 Cultura de Células

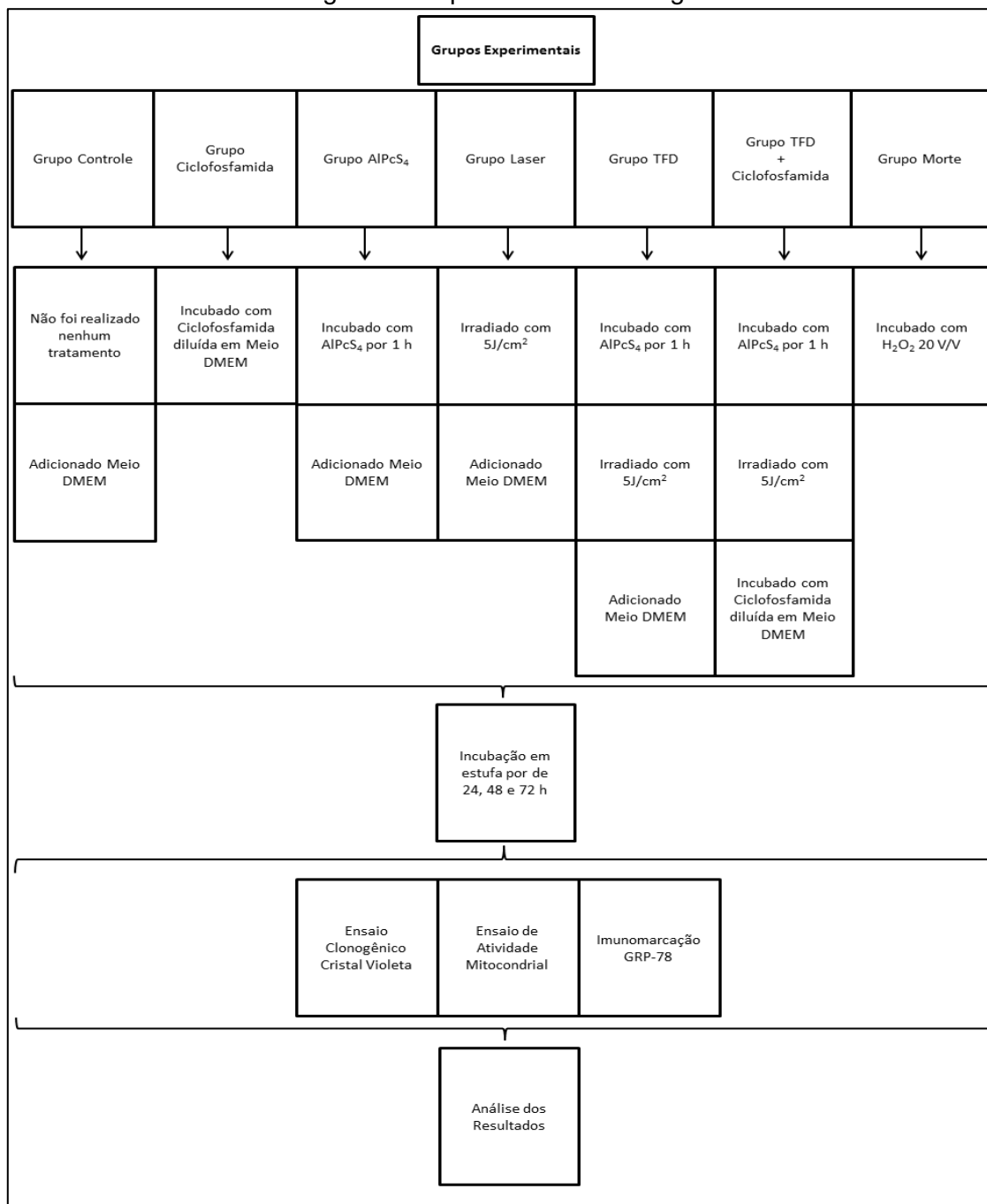
Células HEp-2 (carcinoma epidermoide de laringe ATCC – CCL-23), foram adquiridas da Associação Técnico Científica Paul Ehrlich - Banco de Células do Rio de Janeiro URFJ - RJ e cultivadas em garrafas de cultura celular 25 cm² com meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium - Gibco), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de antibiótico e antimicótico (Life Technologies), a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ em estufa incubadora (Panasonic Healthcare MCO-170AICUV-PA).

4.2 Grupos Experimentais

- a) Grupo Controle +: as células foram cultivadas em meio de cultura e não foram expostas aos tratamentos com a TFD e a Ciclofosfamida nos períodos de 24, 48 e 72 h.
- b) Grupo Ciclofosfamida: as células HEp-2 foram expostas a Ciclofosfamida na concentração de 200 µg/mL diluída em meio de cultura nos períodos de 24, 48 e 72 h.
- c) Grupo AIPcS₄: as células HEp-2 foram expostas a AIPcS₄ na concentração de 5 mM por 1 h, após estes períodos foram incubadas em meio de cultura nos períodos de 24, 48 e 72 h.
- d) Grupo LED: as células HEp-2 foram irradiadas, sendo em seguida incubadas em meio de cultura nos períodos de 24, 48 e 72 h.
- e) Grupo LED + Ciclofosfamida: as células HEp-2 foram irradiadas, em seguida foram expostas a Ciclofosfamida na concentração de 200 µg/mL diluída em meio de cultura nos períodos de 24, 48 e 72 h.

- f) Grupo Terapia Fotodinâmica: as células HEP-2 foram expostas a AIPcS₄ por 1 h, sendo realizada a irradiação a seguir. Após isto foram incubadas em meio de cultura nos períodos de 24, 48 e 72 h.
- g) Grupo Ciclofosfamida + Terapia Fotodinâmica: as células HEP-2 foram expostas a AIPcS₄ por 1 h, sendo realizado a irradiação, após a remoção do FS e adição de PBS. Após isso foram expostas à Ciclofosfamida na concentração de 200 µg/mL diluída em meio de cultura nos períodos de 24, 48 e 72 h.
- h) Grupo Morte: as células HEP-2 foram expostas a solução de peróxido de hidrogênio (20v/v) nos períodos de 24, 48 e 72 h.

Figura 5: Esquema da Metodologia



Fonte: Autor

4.3 Plaqueamento

As células HEp-2 foram plaqueadas (1×10^4 células/poço) em microplacas de 96 poços, com meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), sendo incubadas em estufa a temperatura de 37°C e 5% de CO₂, *overnight* para adesão das células (MORAES *et al.*, 2019).

4.4 Terapia Fotodinâmica

4.4.1 Fotossensibilizante

Vinte e quatro horas após o plaqueamento das células HEp-2, o meio de cultura foi retirado e os poços foram lavados duas vezes com solução salina tamponada com fosfato (PBS) para remoção das células não aderidas. Em seguida, foram adicionados 200 μ L da solução de Alumínio Ftalocianina Tetrassulfonada (AIPcS₄) (Porphyrin Frontier Scientific, Logan, UT, USA) a 5 μ M diluída em PBS e as células foram incubadas por 1 hora em estufa a uma temperatura de 37°C e 5% CO₂. Ao término deste período, a solução de AIPcS₄ foi retirada, então as células foram lavadas novamente duas vezes com PBS, para retirar o excesso do FS e foram irradiadas ou incubadas, dependendo do grupo (MORAES et al., 2019).

4.4.2 Irradiação

Após a lavagem das células com PBS para remoção do excesso de FS, foram adicionados 200 μ L de PBS em cada poço para o processo de irradiação. A irradiação foi realizada com o dispositivo LED's Biopdi/Irrad-Led5 660 (Biopdi – São Carlos, São Paulo, Brasil – Laboratório de Fotobiologia Aplicado a Saúde – IP&D, UNIVAP). Os parâmetros de irradiação utilizados foram: comprimento de onda de 660 nm \pm 5 nm; densidade de energia de 5 J/cm²; por 3 minutos e 20 segundos. O equipamento LED's Biopdi/Irrad-Led5 consiste em um sistema de 54 LEDs para irradiação, sendo cada LED com potência de 70 mW, cobrindo área de 150 cm², apresentando uma potência por área (fluência) de até 25 mW/cm². Após a irradiação, a solução de PBS foi descartada, sendo posteriormente adicionado 500 μ L de meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (contendo ou não ciclofosfamida, dependendo do grupo) e então as células foram incubadas por 24, 48 ou 72 h a uma temperatura de 37°C e 5% CO₂ (MORAES et al., 2019).

4.5 Incubação com Ciclofosfamida

Vinte e quatro horas após o plaqueamento das células HEP-2 (ou após a irradiação das mesmas, dependendo do grupo), os poços foram lavados duas vezes (PBS) para remoção das células não aderidas. Em seguida as células HEP-2 foram submetidas ao tratamento com a ciclofosfamida na concentração de 200 µg/mL, o qual consistiu em adicionar 500 µL de meio contendo solução de ciclofosfamida a 200 µg/mL. Então, as células foram incubadas em estufa, a uma temperatura de 37°C e 5% CO₂ nos períodos de 24, 48 ou 72 h (MORAES; CARVALHO; PACHECO-SOARES, 2017).

4.6 Teste de Densidade Celular Utilizando Cristal Violeta

As células foram lavadas com PBS a 37°C para a remoção das células não aderidas. Em seguida foram adicionados com 100 µL da solução de Cristal violeta por quatro minutos em temperatura ambiente. Após o período de incubação as placas foram lavadas com água corrente para retirada do excesso do corante das células. Após isso as células foram incubadas com 200 µL de Dimetilsulfóxido (DMSO) durante 1 h. Ao término do período de incubação efetuou-se a leitura no espectrofotômetro (SpectraCount Packard) com o comprimento de onda de 570 nm (MORAES et al., 2019).

4.7 Ensaio de Atividade Mitocondrial

A análise da atividade mitocondrial foi realizada pelo ensaio colorimétrico MTT [(brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolol)] (Sigma). As células foram lavadas com PBS a 37°C para a remoção das células não aderidas. Em seguida foram adicionados 100 µL da solução de MTT a 5 mg/mL e incubação por 2 h a 37°C, em 5% de CO₂. Após esse período, foi retirado a solução de MTT, sendo então as células incubadas com 200 µL de DMSO por 30 minutos sob agitação e a leitura realizada em espectrofotômetro a 570 nm (FONTANA *et al.*, 2017).

4.8 Ensaio de Imunomarcção

As células HEp-2 foram cultivadas sobre lamínulas de vidro em placas de 24 poços, sendo os procedimentos de plaqueamento e tratamento realizados como descrito anteriormente. Após os períodos de 24, 48 e 72 h da realização dos tratamentos, as células foram lavadas com PBS e fixadas com metanol (Sigma), e em seguida tratadas com solução para permeabilizar as células e inativar os sítios inespecíficos (1% de soro albumina bovina, 10% de soro fetal bovino, 0.3 M de glicina e 0.1% de Tween 20 diluídos em PBS) (Sigma-Aldrich). Após lavagem com PBS foi adicionado anticorpo GRP-78 (PA5-34941 Molecular Probes, Thermo Fischer Scientific) diluído em PBS na proporção de 1:500 incubado por 1 hora e 30 minutos em temperatura ambiente. Ao término deste período, as células foram incubadas com anticorpo secundário conjugado com FITC (Anti PA5-410900 Molecular Probes, Thermo Fischer Scientific – produzindo em mouse) na proporção 1:1000 diluído em PBS e incubado por 1 hora 30 minutos. Após lavagem em PBS, as lamínulas foram retiradas e montadas sobre lâminas contendo uma gota de ProLong™ Gold Antifade contendo DAPI (P36931, Sigma-Aldrich) para marcação de núcleo. A análise dos resultados foi em microscópio confocal Axio LSM 700 Carl Zeiss (MAFTOUM-COSTA *et al.*, 2008).

4.8 Análise Estatística

Os dados do presente trabalho foram apresentados na forma de média com desvio padrão, comparados pelo teste ANOVA Two-way (análise intergrupos em um mesmo tempo, e análise intragrupos entre tempos diferentes), sendo confirmados pelo teste de Tukey. A significância estatística admitida foi de $P < 0,05$, sendo que nenhum ajuste estatístico foi aplicado às amostras. Para a realização das análises estatísticas e gráficos foi utilizado o software GraphPad Prism 6® (GraphPad Inc., La Jolla, CA).

Todos os experimentos foram realizados com um número amostral de 9, sendo repetido 3 vezes separadamente. Deste modo, confirmando os resultados e aumentando a confiança dos experimentos realizados.

5 RESULTADOS

Os resultados a seguir estão divididos em tópicos, os quais foram sustentados pelo experimento piloto, podendo ser consultado no apêndice.

5.1 Ensaio de Densidade Celular – Cristal Violeta

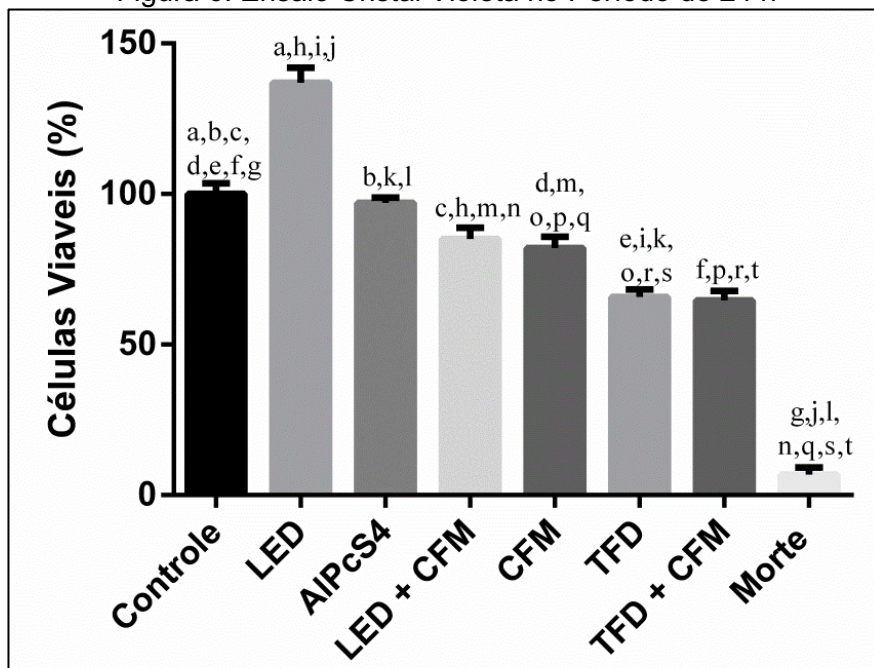
No período de 24 h, analisando a figura 6, pode ser observado aumento na densidade celular no grupo LED com $p < 0,0001$ (a) em relação ao Grupo Controle +, já o grupo AIPcS₄ não apresentou diferença estatística (b) quando comparado ao Grupo Controle +. Os grupos LED + CFM e CFM em comparação ao Grupo Controle + apresentam redução na densidade celular com $p = 0,0489$ (c) e $p = 0,0075$ (d) respectivamente. Por fim, os grupos TFD, TFD + CFM e Morte apresentam redução na densidade celular com $p < 0,0001$ (e, f, g) respectivamente em relação ao Grupo Controle +.

Para evidenciar a eficiência do grupo TFD, além de minimizar possíveis dúvidas se foram os componentes da terapia (LED ou FS) que proporcionaram redução da densidade celular, mas sim a combinação deles, sendo estabelecido como TFD. Assim, é possível observar diferença estatística entre o grupo TFD em relação os grupos LED e AIPcS₄ com $p < 0,0001$ (i, k) respectivamente.

Pode ser observado também que o grupo LED + CFM apresenta redução estatística na densidade celular em relação ao grupo LED com $p < 0,0001$ (h), evidenciando provável efeito de inibição da bioestimulação positiva. Além disso, o grupo LED + CFM não apresenta diferenças estatísticas (m) em relação ao grupo CFM, reforçando esta hipótese.

Ao analisar os grupos de tratamento (CFM, TFD e TFD + CFM) pode ser observada redução na densidade celular no grupo TFD com $p = 0,0266$ (o) e grupo TFD + CFM com $p = 0,0121$ (p), quando ambos são comparados ao grupo CFM. Já o grupo TFD em relação ao grupo TFD + CFM não apresenta diferença estatística (r). Por fim todos os grupos apresentaram diferença estatística em relação ao Grupo Morte com $p < 0,0001$ (g, j, l, n, q, s, t).

Figura 6: Ensaio Cristal Violeta no Período de 24 h



Fonte: (Autor)

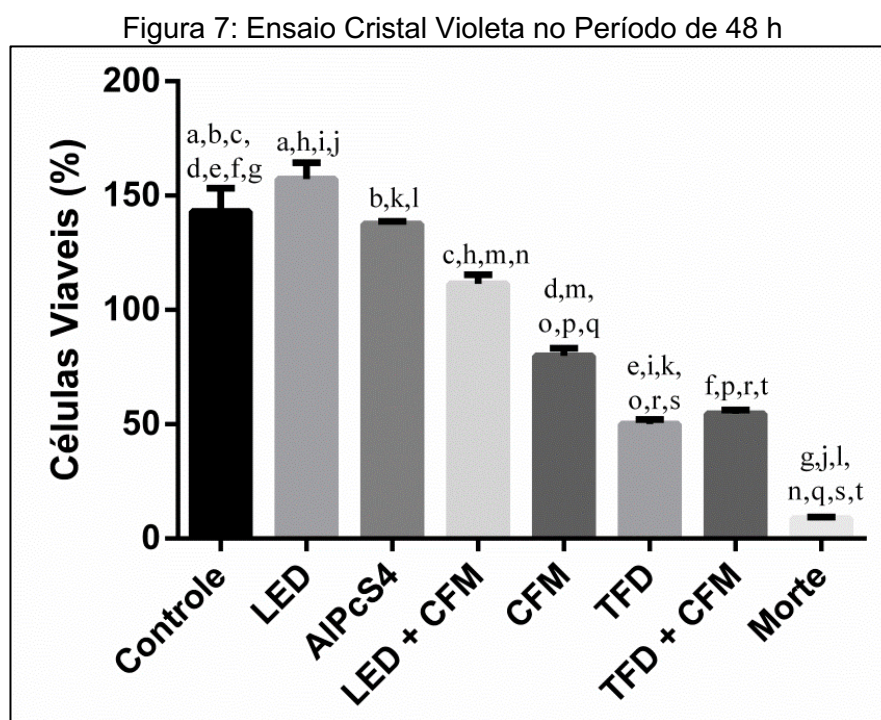
No período de 48 h, analisando a figura 7, pode ser observado aumento na densidade celular no grupo LED com $p = 0,0055$ (a) quando comparado ao Grupo Controle +. Já o grupo AIPcS₄ não apresenta diferença estatística (b) em relação ao Grupo Controle +. O grupo LED + CFM apresenta redução na densidade celular com $p = 0.0001$ (c) em comparação com o Grupo Controle +. Por fim, os grupos CFM, TFD, TFD + CFM e Morte apresentam redução na densidade celular com $p < 0.0001$ (d, e, f, g) respectivamente em relação ao Grupo Controle +.

Elucidando a eficiência do grupo TFD, além de tentar sanar prováveis questionamentos a respeito dos componentes da terapia (LED ou FS) dos quais a combinação deles proporcionou a redução da densidade celular, sendo estabelecido como TFD. Assim, é possível observar diferença estatística entre o grupo TFD em relação os grupos LED e AIPcS₄ com $p < 0,0001$ (i, k) respectivamente.

Pode ser observado também que o grupo LED + CFM apresenta redução estatística na densidade celular em relação ao grupo LED com $p < 0,0001$ (h), evidenciando provável efeito de inibição da bioestimulação positiva. Além disso, o grupo LED + CFM apresenta diferença estatísticas (m) em

relação ao grupo CFM, demonstrado que apesar da ação do quimioterápico, o efeito da bioestimulação positiva provavelmente ainda está ativo.

Ao analisar os grupos de tratamento (CFM, TFD e TFD + CFM) pode ser observada redução na densidade celular no grupo TFD com $p < 0,0001$ (o) e grupo TFD + CFM com $p < 0,0001$ (p), quando ambos são comparados ao grupo CFM. Já o grupo TFD em relação ao grupo TFD + CFM não apresenta diferença estatística (r). Por fim todos os grupos apresentaram diferença estatística em relação ao Grupo Morte com $p < 0,0001$ (g, j, l, n, q, s, t).



Fonte: (Autor)

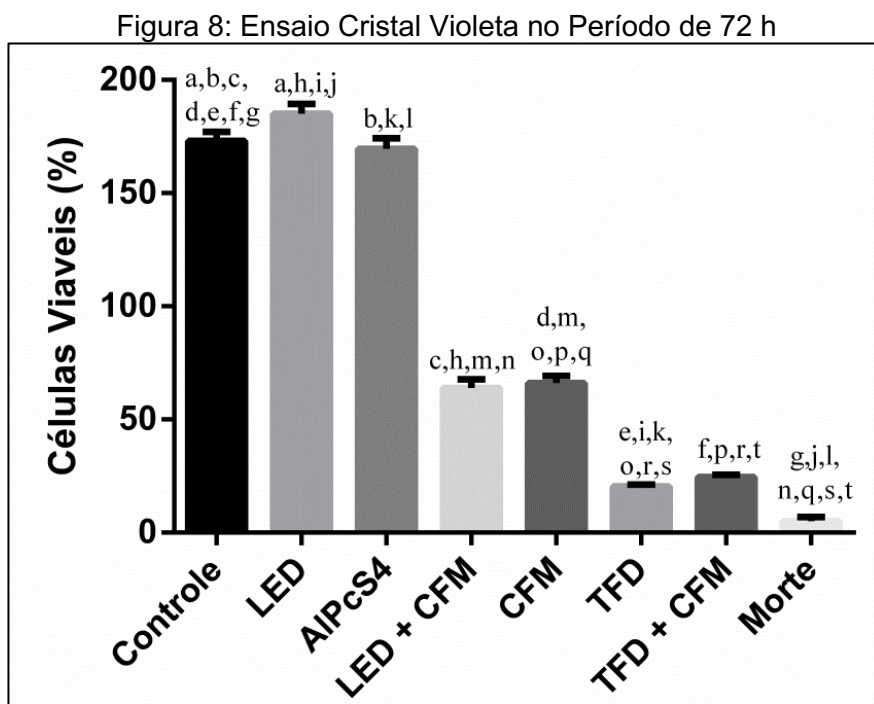
No período de 72 h, analisando a figura 8, pode ser observado aumento na densidade celular no grupo LED com $p = 0.0054$ (a) quando comparado ao Grupo Controle +. Já o grupo AIPcS₄ não apresenta diferença estatística (b) em relação ao Grupo Controle +. Por fim, os grupos LED+ CFM, CFM, TFD, TFD + CFM e Morte apresentam redução na densidade celular com $p < 0.0001$ (c, d, e, f, g) respectivamente em relação ao Grupo Controle +.

Para evidenciar a eficiência do grupo TFD, além de minimizar possíveis dúvidas se foram os componentes da terapia (LED ou FS) que proporcionaram redução da densidade celular, mas sim a combinação deles, sendo estabelecido como TFD. Assim, é possível observar diferença estatística entre

o grupo TFD em relação os grupos LED e AlPcS₄ com $p < 0,0001$ (i, k) respectivamente.

Pode ser observado também que o grupo LED + CFM apresenta redução estatística na densidade celular em relação ao grupo LED com $p < 0,0001$ (h), evidenciando provável efeito de inibição da bioestimulação positiva. Além disso, o grupo LED + CFM não apresenta diferença estatísticas (m) em relação ao grupo CFM, reforçando esta hipótese.

Ao analisar os grupos de tratamento (CFM, TFD e TFD + CFM) pode ser observada redução na densidade celular no grupo TFD com $p < 0,0001$ (o) e grupo TFD + CFM com $p < 0,0001$ (p), quando ambos são comparados ao grupo CFM. Já o grupo TFD em relação ao grupo TFD + CFM não apresenta diferença estatística (r). Por fim todos os grupos apresentaram diferença estatística em relação ao Grupo Morte com $p < 0,0001$ (g, j, l, n, q, s, t).



Fonte: (Autor)

A análise intragrupos, na figura 9, pode-se realizar a comparação entre os 3 períodos. Assim, pode-se observar aumento da densidade celular do Grupo Controle + na comparação de 24 h em relação aos períodos de 48 h e 72 h com $p < 0,0001$ (a, b) respectivamente, bem como na comparação de 48 h

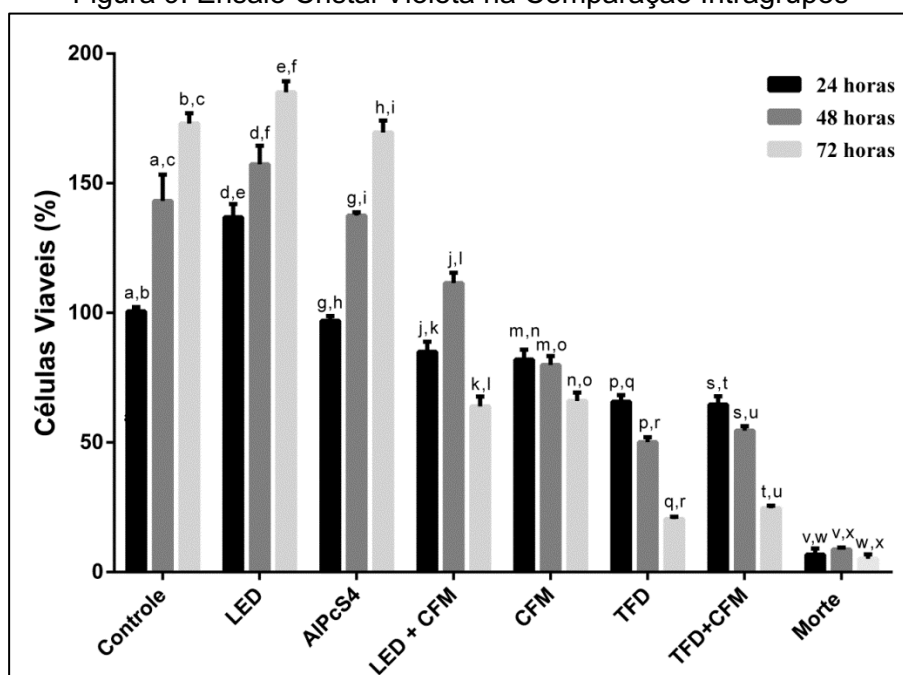
e 72 h com $p < 0,0001$ (c). Semelhantemente nos grupos LED com $p < 0,0001$ (d, e, f), e também nos grupos AIPcS₄ com $p < 0,0001$ (g, h, i).

Por outro lado, o grupo LED + CFM apresenta aumento na viabilidade na comparação do período de 24 h em relação 48 h com $p < 0,0001$ (j), mas redução na viabilidade entre 24 h em relação ao período de 72 h com $p < 0,0001$ (k). Consequentemente é possível observar redução na densidade celular entre os períodos de 48 h e 72 h com $p < 0,0001$ (l).

Ao analisar os grupos tratados, pode-se observar nos grupos CFM que houve diferença estatística entre os períodos de 24 h e 48 h com $p = 0,0054$ (m), e entre os períodos de 24 h e 72 h com $p < 0,0001$ (n). Fato seguido na comparação entre os períodos de 48 h e 72 h com $p < 0,0001$ (o). Semelhantemente, comparação entre os 3 períodos nos grupos TFD com $p < 0,0001$ (p, q, r) apresentaram redução na densidade celular. Bem como nos grupos TFD + CFM com $p < 0,0001$ (s, t, u).

Contudo, o Grupo Morte não apresenta diferença estatística entre os períodos analisados (v, w, x).

Figura 9: Ensaio Cristal Violeta na Comparação Intragrupos



Fonte: (Autor)

5.2 Ensaio de Atividade Mitocondrial – MTT

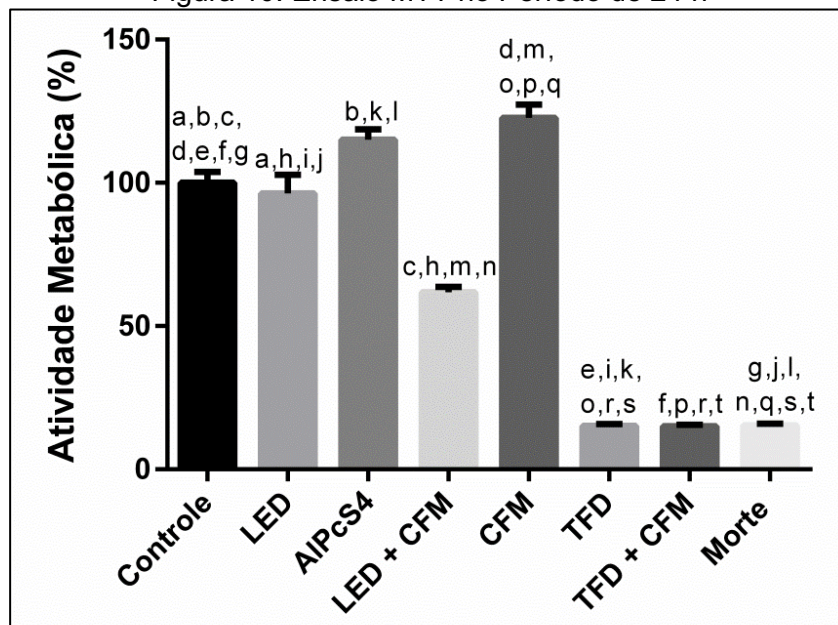
No período de 24 h, analisando a figura 10, pode ser observado um aumento significativo na atividade mitocondrial nos grupos AIPcS₄ e CFM com $p < 0.0001$ (b, d) quando comparados ao Grupo Controle +. Já o grupo LED não apresenta diferença estatística (a) em relação ao Grupo Controle +. Por fim, os grupos LED + CFM, TFD, TFD + CFM e Morte apresentam redução significativa na atividade mitocondrial com $p < 0.0001$ (c, e, f, g) respectivamente em relação ao Grupo Controle +.

Para evidenciar a eficiência do grupo TFD, além de minimizar possíveis dúvidas se foram os componentes da terapia (LED ou FS) que proporcionaram redução da atividade mitocondrial, mas sim a combinação deles, sendo estabelecido como TFD. Assim, é possível observar diferença estatística entre o grupo TFD em relação os grupos LED e AIPcS₄ com $p < 0,0001$ (i, k) respectivamente.

Pode ser observado também que o grupo LED + CFM apresenta redução estatística na densidade celular em relação ao grupo LED com $p < 0,0001$ (h), evidenciando provável aceleração da metabolização do quimioterápico por meio do efeito de inibição da bioestimulação positiva. Além disso, o grupo LED + CFM apresenta diferenças estatísticas (m) em relação ao grupo CFM, reforçando esta hipótese.

Ao analisar os grupos de tratamento (CFM, TFD e TFD + CFM) pode ser observada redução na atividade mitocondrial no grupo TFD com $p < 0,0001$ (o) e grupo TFD + CFM com $p < 0,0001$ (p), quando ambos são comparados ao grupo CFM. Já o grupo TFD em relação ao grupo TFD + CFM não apresenta diferença estatística (r). Por fim todos os grupos apresentaram diferença estatística em relação ao Grupo Morte com $p < 0,0001$ (g, j, l, n, q, s, t).

Figura 10: Ensaio MTT no Período de 24 h



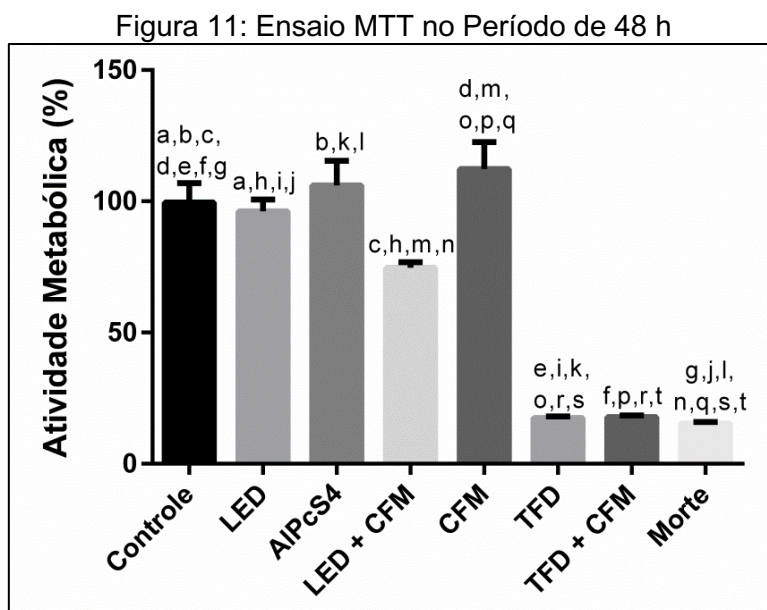
Fonte: (Autor)

No período de 48 h, analisando a figura 11, pode ser observado um aumento significativo na atividade mitocondrial no grupo CFM com $p < 0,0001$ (d) quando comparados ao Grupo Controle +. Já o grupo LED e AIPcS₄ não apresenta diferença estatística (a, b) em relação ao Grupo Controle +. Por fim, os grupos LED + CFM, TFD, TFD + CFM e Morte apresentam redução significativa na atividade mitocondrial com $p < 0,0001$ (c, e, f, g) respectivamente em relação ao Grupo Controle +.

Para evidenciar a eficiência do grupo TFD, além de minimizar possíveis dúvidas se foram os componentes da terapia (LED ou FS) que proporcionaram redução da atividade mitocondrial, mas sim a combinação deles, sendo estabelecido como TFD. Assim, é possível observar diferença estatística entre o grupo TFD em relação os grupos LED e AIPcS₄ com $p < 0,0001$ (i, k) respectivamente.

Pode ser observado também que o grupo LED + CFM apresenta redução estatística na densidade celular em relação ao grupo LED com $p < 0,0001$ (h), evidenciando provável aceleração da metabolização do quimioterápico por meio do efeito de inibição da bioestimulação positiva. Além disso, o grupo LED + CFM apresenta diferenças estatísticas (m) em relação ao grupo CFM, reforçando esta hipótese.

Ao analisar os grupos de tratamento (CFM, TFD e TFD + CFM) pode ser observada redução na atividade mitocondrial no grupo TFD com $p < 0,0001$ (o) e grupo TFD + CFM com $p < 0,0001$ (p), quando ambos são comparados ao grupo CFM. Já o grupo TFD em relação ao grupo TFD + CFM não apresenta diferença estatística (r). Por fim todos os grupos apresentaram diferença estatística em relação ao Grupo Morte com $p < 0,0001$ (g, j, l, n, q, s, t).



Fonte: (Autor)

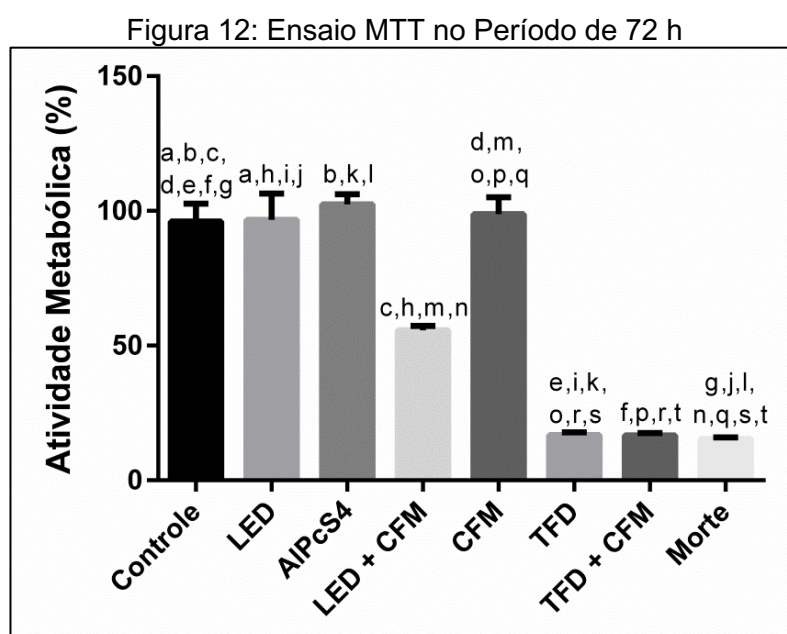
No período de 72 h, analisando a figura 12, pode ser observado que os grupos LED, AIPcS₄ e CFM não apresentam diferença estatística (a, b, c) em relação ao Grupo Controle +. Já os grupos LED + CFM, TFD, TFD + CFM e Morte apresentam redução significativa na atividade mitocondrial com $p < 0,0001$ (c, e, f, g) respectivamente em relação ao Grupo Controle +.

Para evidenciar a eficiência do grupo TFD, além de minimizar possíveis dúvidas se foram os componentes da terapia (LED ou FS) que proporcionaram redução da atividade mitocondrial, mas sim a combinação deles, sendo estabelecido como TFD. Assim, é possível observar diferença estatística entre o grupo TFD em relação os grupos LED e AIPcS₄ com $p < 0,0001$ (i, k) respectivamente.

Pode ser observado também que o grupo LED + CFM apresenta redução estatística na densidade celular em relação ao grupo LED com $p < 0,0001$ (h), evidenciando provável aceleração da metabolização do

quimioterápico por meio do efeito de inibição da bioestimulação positiva. Além disso, o grupo LED + CFM apresenta diferença estatísticas (m) em relação ao grupo CFM, reforçando esta hipótese.

Ao analisar os grupos de tratamento (CFM, TFD e TFD + CFM) pode ser observada redução na atividade mitocondrial no grupo TFD com $p < 0,0001$ (o) e grupo TFD + CFM com $p < 0,0001$ (p), quando ambos são comparados ao grupo CFM. Já o grupo TFD em relação ao grupo TFD + CFM não apresenta diferença estatística (r). Por fim todos os grupos apresentaram diferença estatística em relação ao Grupo Morte com $p < 0,0001$ (g, j, l, n, q, s, t).



Fonte: (Autor)

A análise intragrupos, na figura 13, pode-se realizar a comparação entre os 3 períodos. Assim, pode-se observar que não houve diferença estatística na atividade metabólica no Grupo Controle + nas comparações entre os períodos de 24 h, 48 h e 72 h (a, b, c). Semelhantemente, o grupo LED não apresentou alteração na atividade metabólica (d, e, f), e também nos grupos AIPcS₄ com $p < 0,0001$ (g, h, i).

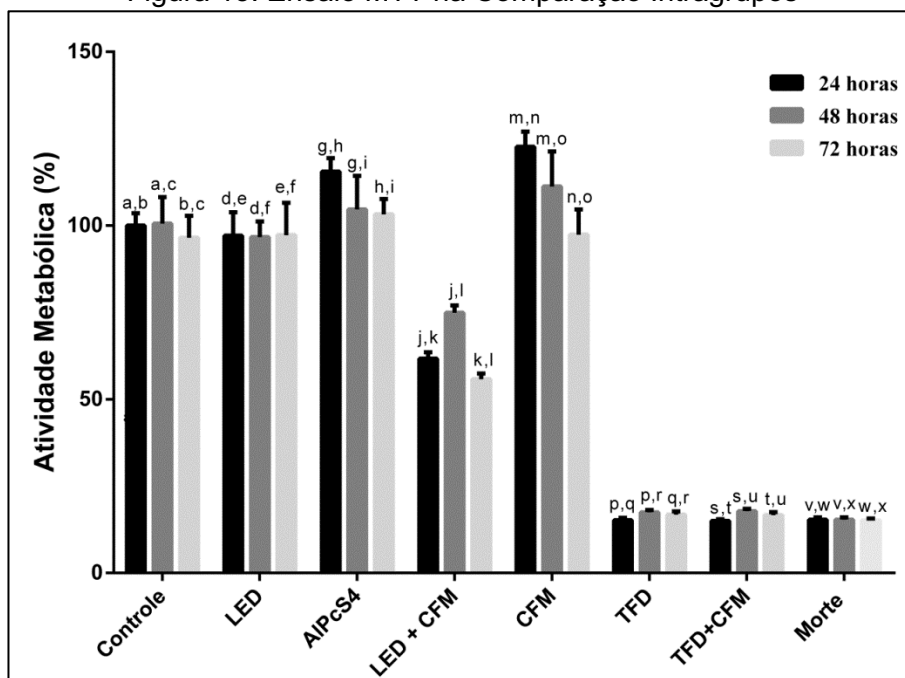
Por outro lado, o grupo AIPcS₄ apresenta aumento na atividade metabólica no período de 24 h quem comparação com os períodos de 48 h com $p < 0,0001$ (g) e 72 h com $p < 0,0001$ (h).

Já o grupo LED + CFM apresenta aumento na atividade metabólica entre os períodos de 24 h e 48 h com $p < 0,0001$ (j). Sendo seguida de redução desta atividade na comparação dos períodos de 48 h e 72 h com $p < 0,0001$ (l), bem como na comparação dos períodos de 24 h e 72 h com $p = 0,0317$ (k).

Pode-se observar também que o grupo CFM apresenta redução da atividade metabólica escalonada em todas as comparações entre os períodos de 24 h, 48, e 72 h com $p < 0,0001$ (m, n, o).

Por fim, os grupos tratados (TFD e TFD + CFM) bem como o Grupo Morte não apresentam diferença estatística entre os períodos analisados (p, q, r, s, t, u, v, w, x).

Figura 13: Ensaio MTT na Comparação Intragrupos



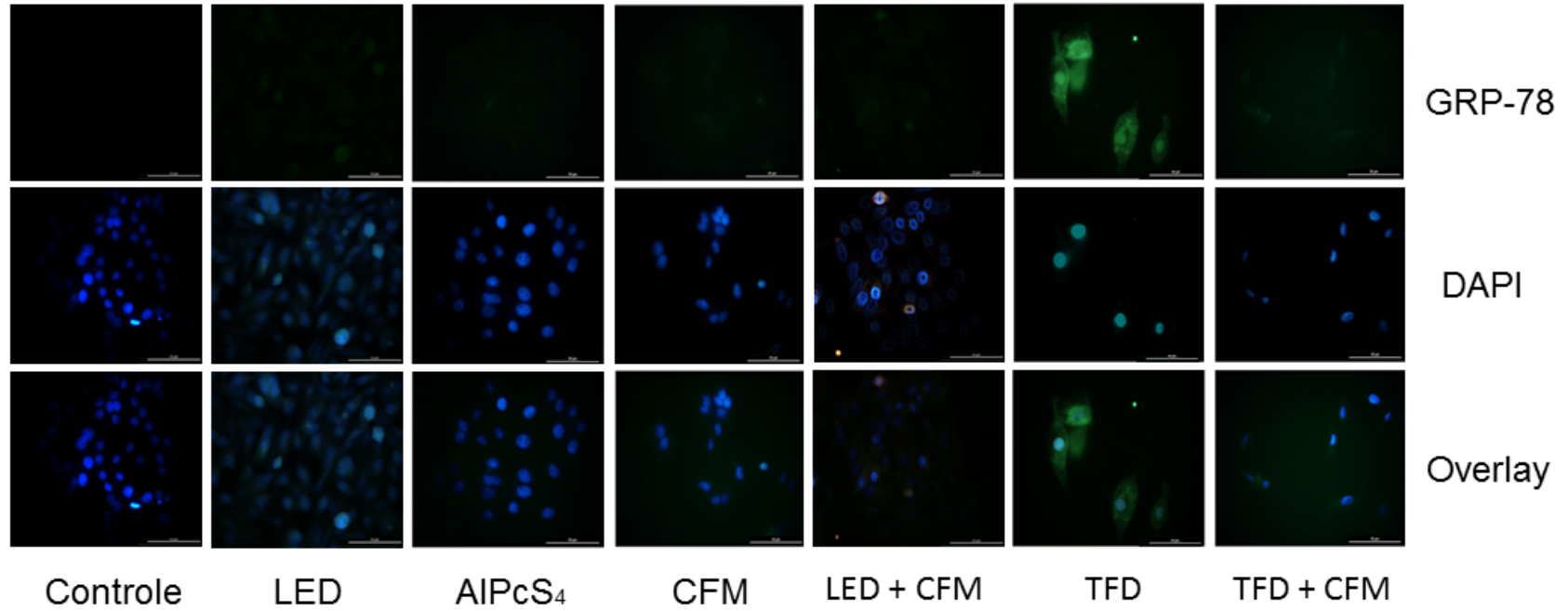
Fonte: (Autor)

5.3 Imunomarcção das HSP

A imunomarcção para GRP-78 nos períodos de 24 h, 48 h e 72 h, após o tratamento dos grupos controle, LED, AIPcS₄, CFM, LED + CFM, TFD e TFD + CFM, respectivamente, está ilustrada nas figuras 14, 15 e 16. Observa-se em verde marcação positiva para a proteína de choque térmico GRP-78, em azul marcação do núcleo da célula HEP-2 e por fim, a sobreposição das duas imagens anteriores. Nos grupos CFM, TFD + CFM e principalmente no grupo

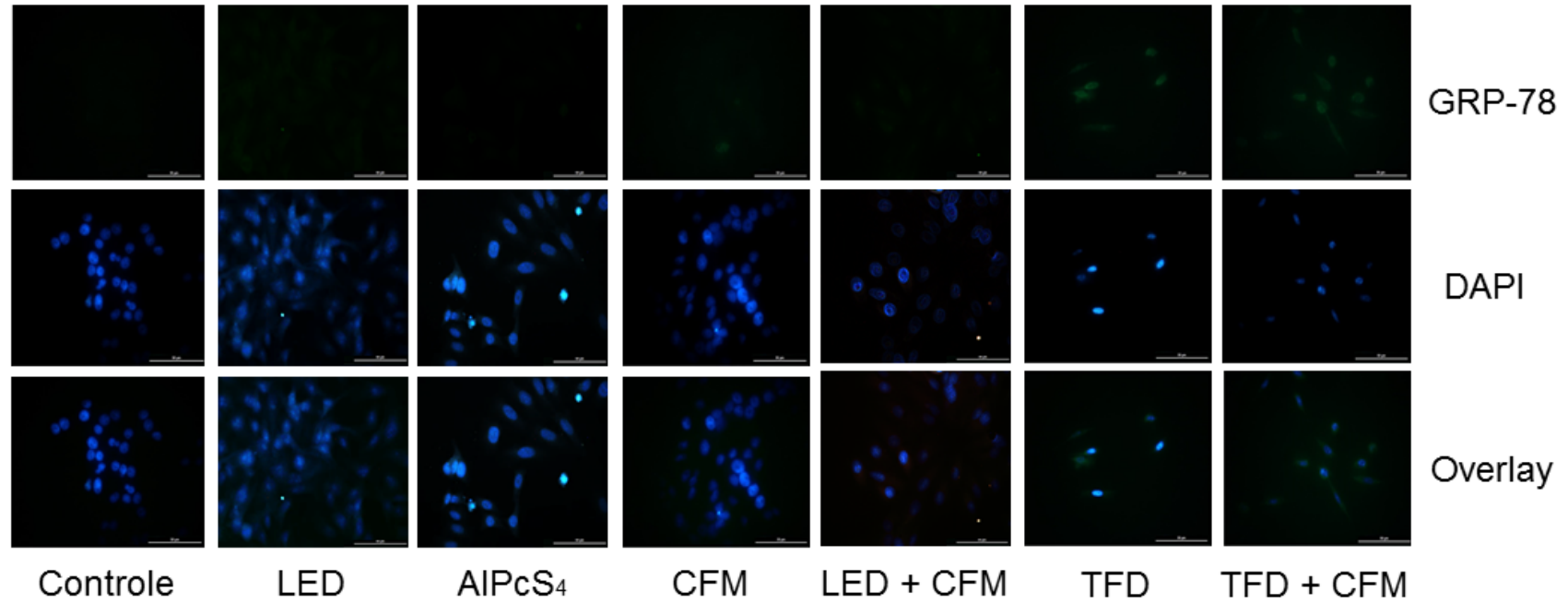
TFD, foi observada marcação positiva para GRP-78, sendo que os demais grupos foram submarcados.

Figura 14: Imunomarcção GRP-78 - 24 h
24 Horas



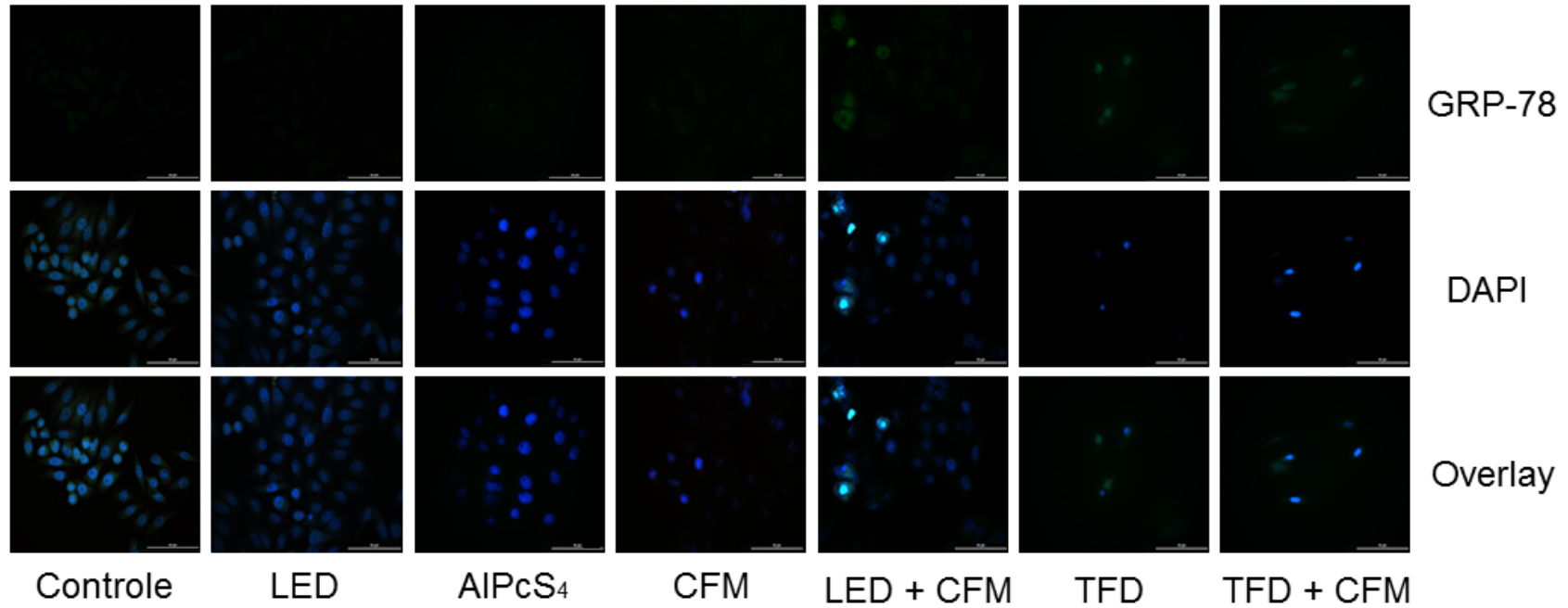
Fonte: Autor

Figura 15: Imunomarcção GRP-78 - 48 h
48 Horas



Fonte: Autor

Figura 16: Imunomarcção GRP-78 - 72 h
72 Horas



Fonte: Autor

5 DISCUSSÃO

No presente estudo, as células tumorais (HEp-2) responderam positivamente aos tratamentos, conforme verificado nos ensaios de densidade celular, atividade mitocondrial e imunomarcação da GRP-78. Deste modo, demonstrando a interação da luz com o fotossensibilizador (AIPcS₄) e oxigênio na produção de EROS, que causou danos às células tumorais, bem como a ação alquilante da CFM.

Primeiramente, o grupo CFM apresentou redução na densidade celular evidenciado pelo ensaio de cristal violeta, estando de acordo com Emadi, Jones e Brodsky (2009) que em sua revisão demonstra a capacidade da CFM em ser clivada pela mostarda fosforamidase na célula tumoral, causando a morte celular. Reforçando esta hipótese lida *et al.* (2016) evidenciaram a capacidade da CFM de induzir sua ativação pelo citocromo P-450 (isto é, aumentando a hidroxilação) na mitocôndria, deste modo aumentando a necessidade energética da célula e conseqüentemente aumentando o metabolismo celular. Além disso, foi destacado por Inoue e Tani (2014) que a terapia com CFM causa maior ou menor dano dependendo de dois fatores. O primeiro deles é o grau da atividade mitótica da célula. Dessa forma, quando a célula apresenta alta taxa mitótica a CFM causa maior taxa de morte celular, por este motivo a CFM é utilizada para tratamento de câncer. O outro fator é a dosagem do fármaco ministrado, justificando deste modo a morte celular. O estudo de Lasalvia-Prisco *et al.* (2012) está de acordo com nosso, visto que também foi utilizada baixas concentrações de CFM no tratamento de câncer. Esses autores observaram que a CFM apresenta atividade antiangiogênica devida à sua capacidade antiproliferativa sobre as células, mas também antitolerogênica por depleção (perda de elementos fundamentais) seletiva de células T regulatórias e restauração das funções efectoras T e NK na imunidade

Os resultados do grupo TFD apresentam similaridades com os estudos de Muehlmann *et al.* (2015), no qual foi observado quase 100% de queda na densidade celular com LED 660 nm, 4.4 J/cm², em tratamento *in vitro* em 4 linhagens de células tumorais. Além disso, estudo de Dobson, Queiroz e Golding (2018) observou que a densidade de energia pode estar relacionada ao padrão de morte celular, ou seja, em densidades de energias próximas de 5

J/cm² ocorre morte por apoptose e conforme aumenta a energia, pode ocorrer morte por necrose. Este mecanismo está de acordo com Moraes *et al.* (2019) que verificaram redução metabólica celular de 90%, a qual pode ser relacionada ao dano causado às diversas organelas, principalmente a mitocôndria, que é responsável pela capacidade energética celular. Esses achados corroboram os nossos resultados. Além disso, com análise de 24, 48 e 72 h de tratamento com TFD é possível observar que estes resultados estão em discordância com os estudos de Lucky, Soo e Zhang (2015) a respeito da resistência cancerígena a TFD, visto que o mesmo verificou diferentes fotossensibilizantes de uso clínico para a aplicação da TFD, que levaram resistência tumoral a TFD. Contudo, avaliando esta revisão pode-se observar que os parâmetros para TFD não foram respeitados, acarretando a perda de eficiência da terapia, ou seja, não houve excitação do FS de forma a produzir as espécies reativas de oxigênio em quantidade suficiente para causar a morte celular. Por outro lado, a resistência a TFD quando utilizada em parâmetros maximizados segundo Zamarrón *et al.* (2015) é inviabilizada, devido à baixa capacidade metabólica da célula tumoral, assim minimizando a capacidade da célula de realizar mitose, e conseqüentemente em dar origem a um clone que seja resistente a TFD.

Ao analisar o grupo TFD + CFM observa-se redução da população celular, embora tenha sido igualmente significativa ao grupo TFD. Isto, segundo Xin *et al.* (2018), relaciona-se ao fato do dano fotofísico ser referente à TFD. Por outro lado, He, Deng e Yue (2017), ressaltaram que a CFM precisa ser primeiramente metabolizada, liberando assim seu princípio ativo tóxico para as células cancerígenas. Desse modo, pode ser justificado o fato de que a TFD apresenta dano mais impactante do que o dano proporcionado pelo quimioterápico, assim mascarando o efeito da CFM no tratamento, enquanto a TFD quase que imediatamente começa a causar danos oxidativo nas estruturas celulares.

Além disso, deve-se destacar também que o tratamento em conjunto irá apresentar benefícios complementares, isto pode ser observado no estudo de Agrawal *et al.* (2017), no qual evidenciou que a CFM apresenta interação com o hormônio da insulina, aumentando significativamente a suscetibilidade de células tumorais a ação da ciclofosfamida, observando um aumento do efeito

citotóxico, em até duas vezes em células tumorais. Assim, a insulina não apenas promove aumento da taxa de apoptose quando seguida pela CFM, mas também o mecanismo desse fenômeno pode estar ligado à autofagia, que se mostrou correlacionado com a morte celular, diminuindo a sobrevivência da célula tumoral. Esta linha de raciocínio acha-se em Falgreen (2015), o qual observou que o mecanismo citotóxico da CFM, pode ser verificado também através da liberação de citocinas relacionadas ao estresse das células malignas, desta maneira atraindo os macrófagos, NK e células T para o microambiente da célula maligna, potenciando a sinalização, e encaminhando à célula tumoral à morte.

Vale destacar também que a CFM anula o efeito de bioestimulação, isto segundo Khaloozadeh, Yazdanbakhsh e Homaei-Shandiz (2008) ocorre devido ao caráter alquilante, inibindo a divisão celular, visto que afeta principalmente a síntese do material genético, alterando a função do DNA e conseqüentemente afetando o ciclo celular, deste modo minimizando a bioestimulação do LED. Além disso, Aravind *et al.* (2012) enraizaram que com o efeito da bioestimulação em aumentar a eficiência energética e a capacidade mitocondrial, ocorre um aumento na taxa de conversão da CFM pelo citocromo P-450 em sua forma ativa, e conseqüentemente a diminuição da taxa metabólica da célula, devido ao dano proporcionado pela CFM. Seguindo esta linha, Magnabosco Neto e Westphalen (2018) observou que a bioestimulação, aumenta a eficiência dos medicamentos administrados, além de proporcionar uma melhora nas condições clínicas dos pacientes.

Reginato *et al.* (2013) evidenciaram que o principal benefício do tratamento conjunto está na presença de um antígeno de rejeição de tumor, ou seja, a capacidade das células tumorais em contornar a resposta do sistema imune, assim as células T reguladoras (CD25 +, Foxp3 +) são inibidores potentes da imunidade antitumoral, e sua remoção por doses baixas de ciclofosfamida potencializa a resposta imune, podendo ser esta resposta induzida e aumentada pela TFD, podendo ocorrer a reversão epigenética, acarretando o aumento da expressão tumoral do MHC classe I e a expressão de outros antígenos tumorais até então imperceptíveis as células do sistema imune.

Gupta *et al.* (2010) a fim de estudar a capacidade de sobrevivência das células tumorais que foram estressadas em consequência aos danos observados pelos tratamentos, bem como o seu processo de resposta contra o estímulo estressante, realizou-se a avaliação da GRP-78 no lúmen do retículo endoplasmático das células cancerígenas

Os grupos tratados apresentaram diversos danos em seus compartimentos celulares, sendo verificada a marcação positiva de GRP-78. Esta resposta, segundo Murphy, (2013) está relacionada ao sistema de tamponamento do estresse celular, seja de estímulos extrínsecos (fisiológicos, virais e ambientais) ou intrínsecos (replicativos). Como tal, a GRP-78 serve a uma função crítica de sobrevivência na célula, impedindo a morte celular. Isto pode ser verificado quando a GRP-78 assume um papel citoprotetor contra a via de atuação do quimioterápico ou outros mecanismos que causem danos à célula.

Estudo de Casas *et al.* (2011) evidenciaram a influência da TFD em induzir a autofagia, apoptose e necrose em células de câncer, assim ativando enzimas antioxidantes, diminuindo a ação de proteínas de resistência a múltiplos fármacos, aumentando as vias pro-apoptóticas, bem como a expressão de GRP-78. Ainda, segundo Wozniak *et al.* (2018) sob ação da TFD ou outro agente que proporcione morte celular em grande escala, como quimioterápicos, a GRP-78 pode ser liberada ao meio externo (pelo fato das células estarem mortas). Dessa forma, pode atuar como sinalizadora de antígenos tumorais para o sistema imunológico contra as células tumorais.

Estudos de Juhasz *et al.* (2014) destacam o caráter dual das HSPs, entre elas a GRP-78, visto que esta proteína pode atuar na promoção e crescimento do tumor, contribuindo para a tumorigênese por sua atividade pleiotrópica como chaperona, contribuindo para a tumorigênese por sua atividade pleiotrópica como chaperona, conferindo às células cancerígenas a capacidade de alterar atividades proteicas dos componentes do ciclo celular, das quinases e outras proteínas que estimulam o crescimento tumoral. Por outro lado, dependendo do grau de estresse celular, a GRP-78 pode gerar o acúmulo de citocromo C no citoplasma, promover agentes pró-apoptóticos como as caspases, encaminhando a célula à morte. Este fato justifica a necessidade de combinações de tratamento, sendo confirmado por Rodríguez *et al.* (2015) o

qual evidência o efeito indutor, ou seja, ao invés de proporcionar a citoproteção, a GRP-78 ativa a via das capases, causando a morte celular, dependendo das condições de tratamentos e o tipo de célula cancerígena. Além disso, estudo de Evans, Chang e Gestwicki (2010), está em concordância com nossos resultados, visto que ele relaciona a presença de GRP-78 com a capacidade de inibir várias vias de morte celular, incluindo a apoptose intrínseca, levando a resistência à TFD, entretanto, ela pode também estar associada ao fator indutor de apoptose (AIF), levando à indução da apoptose independente de caspase, sendo ativada principalmente por tratamentos combinados de caráter mais letal, assim não conseguindo prevenir a apoptose e, contrariamente, promovendo a morte celular.

Por fim, é exequível verificar a resposta celular em diferentes modos de tratamentos, bem como a eficiência separadamente ou em conjunto, conforme observado nos ensaios de densidade celular, atividade mitocondrial e Imunomarcagem da GRP-78. Assim, foi possível efetuar análise de estudos que realizaram estudos da CFM e TFD de maneira separada, comparando ao presente estudo da CFM e TFD que foi executado conjuntamente.

6 CONCLUSÃO

TFD utilizando AIPcS₄ como fotossensibilizante, sendo irradiado por 3 minutos e 20 segundos, totalizando 5 J/cm² é um tratamento eficaz contra as células HEP-2, ocorrendo uma queda significativa na densidade celular, bem como diminuição na atividade metabólica avaliada pelo ensaio de MTT. Além disso, é possível observar a GRP-78 por meio do ensaio de imunomarcação.

A CFM apresenta redução na densidade celular, no metabolismo celular, alterando a expressão de proteínas GRP-78, embora com menor eficiência, quando comparada a TFD.

O tratamento em conjunto da TFD com CFM não apresenta aumento na morte celular quando comparada separadamente com TFD ou CFM. Contudo a interação ainda pode ser válida, visto que a CFM pode apresentar capacidade de anular possíveis efeitos de bioestimulação positiva da TFD.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAMSE, H.; HAMBLIN, M. R. New photosensitizers for photodynamic therapy. **Biochemical Journal**, v. 473, n. 4, p. 347–364, 15 fev. 2016.
- ABRAMCZYK, H. *et al.* Photostability of biological systems—Femtosecond dynamics of zinc tetrasulfonated phthalocyanine at cancerous and noncancerous human Breast tissues. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 332, p. 10–24, 2017.
- ACKROYD, R. *et al.* The History of Photodetection and Photodynamic Therapy. **Photochemistry and Photobiology**, v. 74, n. 5, p. 656–669, 2007.
- AGRAWAL, S. *et al.* Insulin-induced enhancement of MCF-7 breast cancer cell response to 5-fluorouracil and cyclophosphamide. **Tumor Biology**, v. 39, n. 6, 2017.
- AKILOV, O. E. *et al.* Prospects for the use of differentiation-modulating agents as adjuvant of photodynamic therapy for proliferative dermatoses. **The Journal of Dermatology**, v. 35, n. 4, p. 197–205, abr. 2008.
- ALLISON, R. R. Photodynamic therapy: oncologic horizons. **Future Oncology**, v. 10, n. 1, p. 123–124, 2014.
- ARAVIND, S. R. *et al.* Antitumor and Immunopotentiating Activity of Polysaccharide PST001 Isolated from the Seed Kernel of Tamarindus indica : An In Vivo Study in Mice. **The Scientific World Journal**, v. 2012, p. 1–14, 2012.
- BATISTA, B. G.; PAULO, J. M.; MOREIRA, R. M. Publicação cdtm-959 calibração do fluorímetro – 10AU. 2006.
- BAO, L. *et al.* Increased Expression of P-Glycoprotein Is Associated with Doxorubicin Chemoresistance in the Metastatic 4T1 Breast Cancer Model. **The American Journal of Pathology**, v. 178, n. 2, p. 838–852, fev. 2011.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer – INCA. **Incidência de câncer**. Brasília: Ministério da Saúde, 2011.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer – INCA. **Síntese de Resultados e Comentários**. Brasília: Ministério da Saúde, 2016.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer – INCA. **Estima cerca 600 mil casos novos câncer**. Brasília: Ministério da Saúde, 2018.
- CASAS, A. *et al.* Mechanisms of Resistance to Photodynamic Therapy. **Current Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 16, 2011.

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.

CHOUDHARI, Milind K. *et al.* Anticancer activity of Indian stingless bee propolis: an in vitro study. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, 2013.

CHUNG, N. G. *et al.* Reduced dose cyclophosphamide, fludarabine and antithymocyte globulin for sibling and unrelated transplant of children with severe and very severe aplastic anemia. **Pediatric Transplantation**, v. 17, n. 4, p. 387–393, 2013.

COLEY, H. M. Mechanisms and strategies to overcome chemotherapy resistance in metastatic breast cancer. **Cancer treatment reviews**, v. 34, n. 4, p. 378-390, 2008.

DOBSON, J.; QUEIROZ, G. F.; GOLDING, J. P. Photodynamic therapy and diagnosis: Principles and comparative aspects. **The Veterinary Journal**, v. 233, p. 8–18, mar. 2018.

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

EMADI, A.; JONES, R. J.; BRODSKY, R. A. Cyclophosphamide and cancer: golden anniversary. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 6, n. 11, p. 638–647, 2009.

EVANS, C. G.; CHANG, L.; GESTWICKI, J. E. Heat Shock Protein 70 (Hsp70) as na Emerging Drug Target. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 53, n. 12, p. 4585–4602, 2010.

FALGREEN, S. *et al.* Predicting response to multidrug regimens in cancer patients using cell line experiments and regularised regression models. **BMC cancer**, v. 15, n. 1, p. 235, 2015.

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.

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.

GALVÃO, L. E. G. *et al.* Daylight photodynamic therapy: pharmacoeconomics of methyl aminolevulinatate cream use for facial actinic keratoses. **Surg Cosmet Dermatol.**, v. 8, n. 3, p. 246-9, 2016.

GUPTA, S. C. *et al.* Heat shock proteins in toxicology: How close and how far? **Life Sciences**, v. 86, n. 11–12, p. 377–384, 2010.

HE, X.; DENG, Y.; YUE, W. Investigating critical genes and gene interaction networks that mediate cyclophosphamide sensitivity in chronic myelogenous leukemia. **Molecular Medicine Reports**, v. 16, n. 1, p. 523–532, 2017.

IIDA, J. *et al.* Inhibition of cancer cell growth by ruthenium complexes. **Journal of Translational Medicine**, v. 14, n. 1, p. 48, 2016.

INOUE, H.; TANI, K. Multimodal immunogenic cancer cell death as a consequence of anticancer cytotoxic treatments. **Cell Death & Differentiation**, v. 21, n. 1, p. 39-49, 2014.

JUHASZ, K. *et al.* The Complex Function of Hsp70 in Metastatic Cancer. **Cancers**, v. 6, n. 1, p. 42-66, 2014.

KENNEDY, D. *et al.* Regulation of apoptosis by heat shock proteins. **IUBMB life**, v. 66, n. 5, p. 327-338, 2014.

KENNEDY, D.; MNICH, K.; SAMALI, A. Heat shock preconditioning protects against ER stress-induced apoptosis through the regulation of the BH3-only protein BIM. **FEBS Open Bio**, v. 4, p. 813-821, 2014.

KHALOOZADEH, H.; YAZDANBAKHSI, P.; HOMAEI-SHANDIZ, F. The optimal dose of CAF regimen in adjuvant chemotherapy for breast cancer patients at stage IIB. **Mathematical Biosciences**, v. 213, n. 2, p. 151–158, 2008.

KHARKWAL, G. B. *et al.* Lasers Therapy for Infections: Clinical Applications. **Surg Med Photodynamic**. v. 43, p. 755-67, 2012.

KIM, Jisun *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.

KNUDSEN, S. *et al.* Development and Blind Clinical Validation of a MicroRNA Based Predictor of Response to Treatment with R-CHO(E)P in DLBCL. **PLOS ONE**, v. 10, n. 2, p. e0115538, 18 fev. 2015.

LACERDA, M. F. L. S; ALFENAS, C. F; CAMPOS, C. N. Terapia fotodinâmica associada ao tratamento endodôntico-revisão de literatura. **RFO UPF**, v. 19, n. 1, p. 115-120, 2014.

LASALVIA-PRISCO, E. *et al.* Addition of an induction regimen of antiangiogenesis and antitumor immunity to standard chemotherapy improves survival in advanced malignancies. **Medical Oncology**, v. 29, n. 5, p. 3626-3633, 2012.

LEE, H. K. *et al.* GRP78 is overexpressed in glioblastomas and regulates glioma cell growth and apoptosis. **Neuro-oncology**, v. 10, n. 3, p. 236-243, 2008.

- LIN, S. *et al.* Development of a multifunctional luciferase reporters system for assessing endoplasmic reticulum-targeting photosensitive compounds. **Cell Stress and Chaperones**, v. 19, n. 6, p. 927–937, 2014.
- LIU, F. *et al.* The cyclophosphamide metabolite, acrolein, induces cytoskeletal changes and oxidative stress in Sertoli cells. **Molecular Biology Reports**, v. 39, n. 1, p. 493–500, 2012.
- LUCKY, S. S.; SOO, K. C.; ZHANG, Y. Nanoparticles in Photodynamic Therapy. **Chemical Reviews**, v. 115, n. 4, p. 1990–2042, 2015.
- MAFTOUM-COSTA, M. *et al.* Mitochondria, endoplasmic reticulum and actin filament behavior after PDT with chloroaluminum phthalocyanine liposomal in HeLa cells. **Cell Biology International**, v. 32, n. 8, p. 1024–1028, 2008.
- MAGALHÃES, J. P. How ageing processes influence cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 13, n. 5, p. 357–365, 2013.
- MAGNABOSCO NETO, A. E.; WESTPHALEN, F. H. Effectiveness of low level laser used in the prevention and treatment of oral mucositis in patients with breast cancer undergoing adjuvant chemotherapy. **Journal of Dental Science, Oral and Maxillofacial Research**, v. 1, n. 2, p. 79–83, 2018.
- MEDKOO Biosciences. **AIPcS4**. Disponível em: <https://www.medkoo.com/products/10466>. Acesso em: 03 mar. 2020.
- MORAES, C. D. G. O.; CARVALHO, I. C. S.; PACHECO-SOARES, C. Interação da ciclofosfamida e a terapia fotodinâmica no tratamento de câncer de laringe HEp-2 – estudo in vitro. **Revista Univap**, p. 1–6, 2017.
- MORAES, C. D. G. O. *et al.* Genotoxic effects of photodynamic therapy in laryngeal cancer cells – An in vitro study. **Experimental Biology and Medicine**, v. 244, n. 3, p. 262–271, 2019.
- MUEHLMANN, L. A. *et al.* Aluminium-phthalocyanine chloride nanoemulsions for anticancer photodynamic therapy : Development and in vitro activity against monolayers and spheroids of human mammary adenocarcinoma MCF-7 cells. **Journal of nanobiotechnology**, v. 13, n. 1, p. 36, 2015.
- MURPHY, M. E. The HSP70 family and cancer. **Carcinogenesis**, v. 34, n. 6, p. 1181–1188, 2013.
- PACHECO-SOARES, C. *et al.* Evaluation of photodynamic therapy in adhesion protein expression. **Oncology Letters**, v. 8, n. 2, p. 714–718, 2014.
- PARHI, P.; MOHANTY, C.; SAHOO, S. K. Nanotechnology-based combinational drug delivery: an emerging approach for cancer therapy. **Drug Discovery Today**, v. 17, n. 17–18, p. 1044–1052, 2012.

RAFFAGHELLO, L. *et al.* Starvation-dependent differential stress resistance protects normal but not cancer cells against high-dose chemotherapy.

Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 105, n. 24, p. 8215–8220, 2008.

REGINATO, E. *et al.* Photodynamic therapy plus regulatory T-cell depletion produces immunity against a mouse tumour that expresses a self-antigen.

British journal of cancer, v. 109, n. 8, p. 2167-2174, 2013.

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

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

SENTHILARASU, S.; HAHN, Y. B.; LEE, S. Structural analysis of zinc phthalocyanine (ZnPc) thin films: X-ray diffraction study. **Journal of Applied Physics**, v. 102, n. 4, 2007.

SETLIK, J.; SILVA, R. C. O uso da terapia fotodinâmica como tratamento alternativo para o câncer de pele do tipo não-melanoma. **Revista Saúde e Desenvolvimento**, v. 7, n. 4, p. 195–206, 2015.

SILVA, A. C. P. *et al.* Atividade fotodinâmica e conceitos: um experimento demonstrativo. **Química Nova**, v. 41, n. 6, p. 706-712, 2018.

TRIPATHI, D. N.; JENA, G. B. Astaxanthin intervention ameliorates cyclophosphamide-induced oxidative stress, DNA damage and early hepatocarcinogenesis in rat: Role of Nrf2, p53, p38 and phase-II enzymes. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 696, n. 1, p. 69–80, 2010.

WEISS, A. *et al.* Angiogenesis inhibition for the improvement of photodynamic therapy: The revival of a promising idea. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer**, v. 1826, n. 1, p. 53–70, 2012.

WOZNIAK, M. *et al.* The effect of in vitro photodynamic therapy on increase of osteopontin and heat shock protein 70 expression in squamous cell and colon carcinoma. **IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics**, v. 1–1, 2018.

XIN, J. *et al.* AIPcS₄ -PDT for gastric cancer therapy using gold nanomicellar drug carriers. **International journal of nanomedicine**, v. 13, p. 2017, 2018.

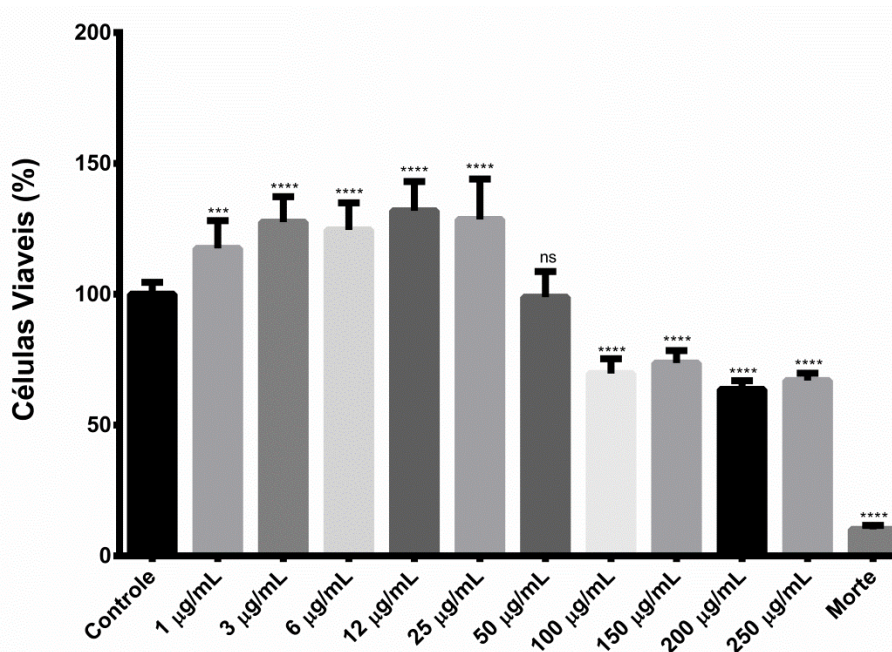
ZAMARRÓN, A. *et al.* Isolation and characterization of PDT-resistant cancer cells. **Photochem Photobiol Sci.**, v. 14, n. 8, p. 1378-89, 2015.

Apêndices: Estudo Piloto

A Determinação da Concentração do Quimioterápico CFM

Analisando a figura 17, pode ser observado um aumento na densidade celular na concentração de 1 µg/mL com diferença estatística $p = 0,0001$, e nas concentrações de 3 a 25 µg/mL com $p < 0,0001$. Na concentração de 50 µg/mL não apresenta diferença estatística em relação ao Grupo Controle +. Já nas concentrações de 100 a 250 µg/mL e no Grupo Morte pode ser verificada uma redução na densidade celular com $p < 0,0001$. Assim, como já era esperado, visto que a CFM é um fármaco que apresenta resposta dose dependente.

Figura 17: Curva de Concentração da CFM no Período de 24 h



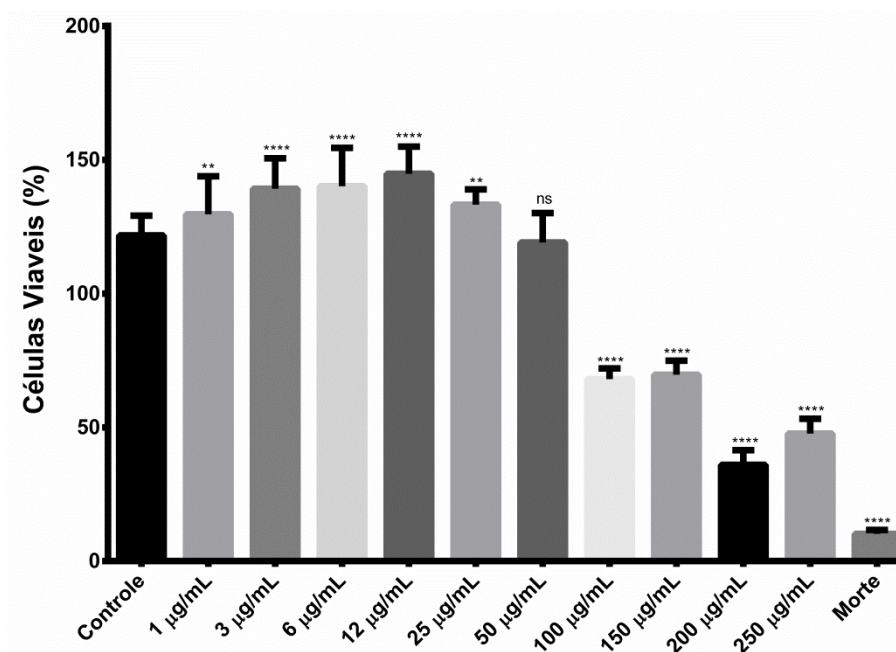
(****) Extremamente Significante ($p < 0,0001$), (***) Muito significativa ($P = 0,0001$), (ns) Não Significante.

Fonte: (Autor)

Analisando a figura 18, pode ser observado um aumento na densidade celular na concentração de 1 µg/mL com diferença estatística $p = 0,0055$, nas concentrações de 3 a 12 µg/mL com $p < 0,0001$, e na concentração de 25 µg/mL houve aumento na densidade celular com $p = 0,0055$. Na concentração de 50 µg/mL não apresenta diferença estatística em relação ao Grupo Controle +. Já nas concentrações de 100 a 250 µg/mL e no Grupo Morte pode ser verificada uma redução na densidade celular com $p < 0,0001$. Assim, como já

era esperado, visto que a CFM é um fármaco que apresenta resposta dose dependente.

Figura 18: Curva de Concentração da CFM no Período de 48 h

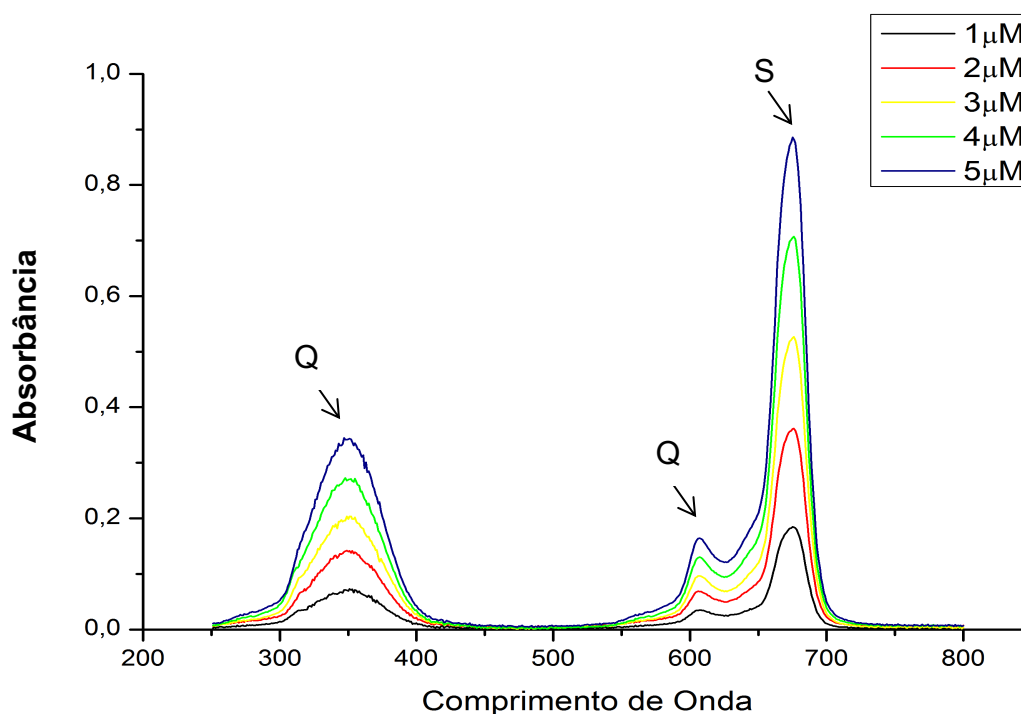


(****) Extremamente Significante ($p < 0,0001$), (***) Muito significativa ($p = 0,0001$), (**) pouco significativa ($p = 0,0055$), (ns) Não Significante.

Fonte: (Autor)

B Caracterização do Alumínio Ftalocianina Tetrassulfonada (AIPcS₄)

Analisando a figura 19, pode ser observada a relação entre a concentração do fotossensibilizante AIPcS₄ e a absorvância, apresentando a banda de Soret (S) em 675 nm e as bandas Q nas regiões de 347 nm, 623 nm. Deste modo podendo ser caracterizada a AIPcS₄ como esperado.

Figura 19: Espectro de absorção do AIPcS₄

Fonte: (Autor)

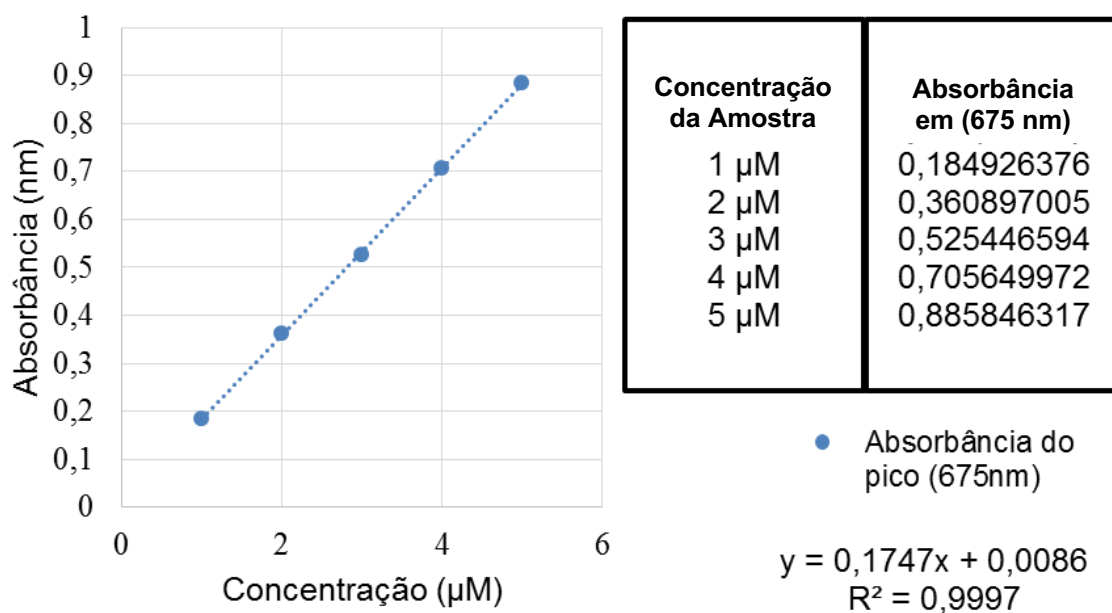
Por meio da identificação dos picos, foi possível gerar a curva de calibração da AIPcS₄ no qual foi realizada a relação entre as concentrações das amostras e a absorbância existente no pico máximo, 675 nm. A função atribui ao valor de y a absorbância esperada e ao valor de x a concentração do fotossensibilizante. Foi realizada então a curva de calibração da AIPcS₄.

Equação 1: Equação da reta referente ao pico de 675 nm

$$y = 0,1747x + 0,0086$$

Analisando a reta, representada na figura 20 pode ser observada a relação entre os pontos, em densidade óptica de 675 nm, das concentrações do fotossensibilizante (AIPcS₄) e dos valores de absorbância. Com a curva de calibração da AIPcS₄ foi possível identificar o nível de linearidade da diluição do fármaco fotossensível, sendo representada por $R^2 = 0,9997$, demonstrando assim uma confiabilidade de 99,97% da diluição. Evitando assim perda de fotossensibilizante, ou perda de atividade fotossensível decorrente de agregados da AIPcS₄.

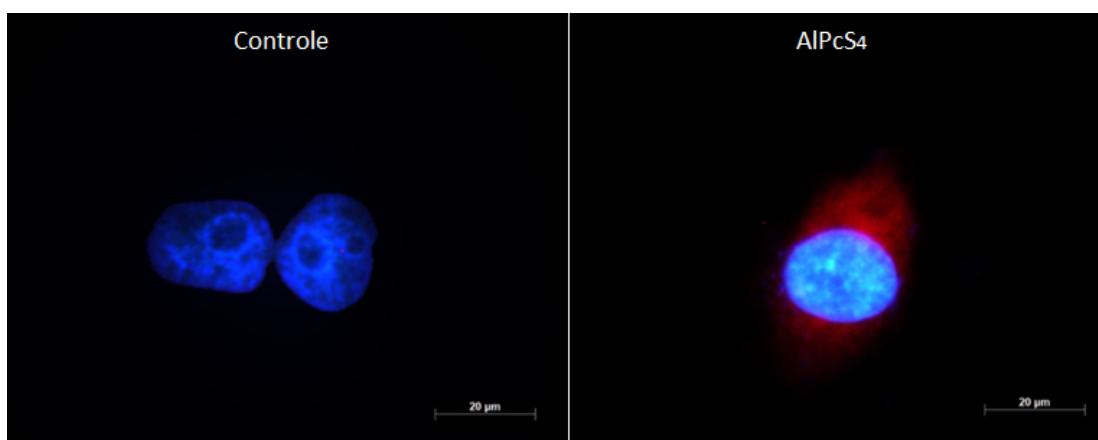
Figura 20: Curva de Calibração do Fármaco Fotossensibilizante AIPcS₄



Fonte: (Autor)

Analisando a figura 21, pode ser observado em vermelho a AIPcS₄ internalizada na célula HEp-2 após 1 h de incubação e em azul o núcleo da célula corado com DAPI, permanecendo praticamente inalterado conforme o aumento do tempo de incubação da AIPcS₄. Atendendo as expectativas sobre o tempo de incubação do FS.

Figura 21: Localização do Alumínio Ftalocianina Tetrassulfonada (AIPcS₄) Após a Incubação nas Células HEp-2

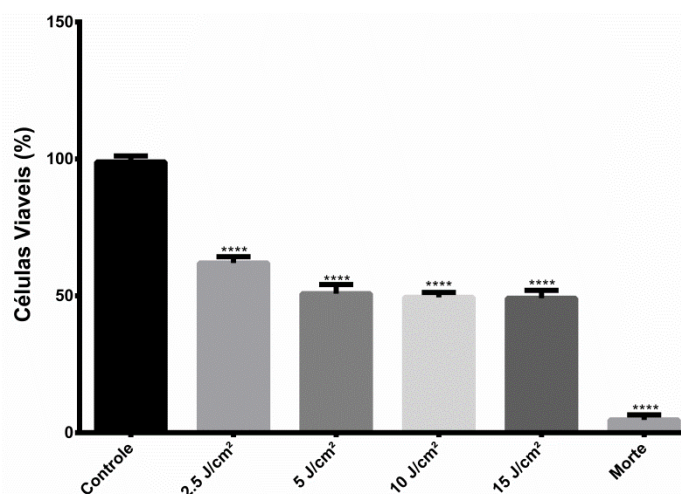


Fonte: (Autor)

C Determinação ideal para TFD

Analisando a figura 22, pode ser observada diminuição na densidade celular em todos os grupos de TFD com $p < 0,0001$. Porém foi estabelecida a dose de energia de 5 J/cm² como grupo tratamento na TFD, pois foi o mais eficiente em causar morte celular. Visto que os grupos TFD 10 J/cm² e 15 J/cm² são estatisticamente iguais ao TFD 5 J/cm², atingindo os resultados esperado.

Figura 22: Ensaio Cristal Violeta para Estabelecer a Curva para da TFD



(****) Extremamente Significante ($p < 0,0001$).

Fonte: (Autor)

Anexo A: Genotoxic effects of photodynamic therapy in laryngeal cancer cells – An *in vitro* study

Genotoxic effects of photodynamic therapy in laryngeal cancer cells – An *in vitro* study

Carlos Dailton Guedes de Oliveira Moraes¹, Bruno Henrique Godoi¹, Isabel Chaves Silva Carvalho¹, Jessica Cristina Pinto¹, Rafaella Carvalho Rossato¹, Newton Soares da Silva² and Cristina Pacheco Soares¹ 

¹Institute of Research and Development – IP&D, Universidade do Vale do Paraíba – UNIVAP, Laboratory Dynamics of Cellular Compartments, Sao Paulo 12244-000, Brazil; ²Institute of Research and Development – IP&D, Universidade do Vale do Paraíba – UNIVAP, Laboratory of Cell Biology and Tissue, Sao Paulo, CEP 12244-000, Brazil
Corresponding author: Cristina Pacheco Soares. Email: cpsouares@univap.br

Impact statement

Recently, the use of photodynamic therapy grows as an alternative treatment for cancer, since it has a noninvasive characteristic and affinity to the tumor tissue. Accordingly, understanding the therapy's foci of action is important for the technique improvement. This work aims to understand the genotoxic effect triggered by the therapy action, thus evidencing the permanent changes caused to the genetic material of the tumor cell after the treatment. Therefore, to increase the knowledge in this study field, the methodology of the comet assay and count of micronucleus formed after the therapy was adopted in order to understand if the damage caused to the DNA of tumor cell makes its replication process unfeasible in future generations. The study allows a better therapeutic approach to the cancer treatment, making the process of association between therapies a more effective option during the disease treatment.

Abstract

Photodynamic therapy provides the formation of reactive oxygen species that are capable of inducing cell death. Human laryngeal carcinoma (HEp-2) cells have been evaluated in this study under PDT treatment. Cells were treated with photosensitizer aluminum phthalocyanine tetrasulfonate (AIPcS₄) and irradiated with a Biopdi/Irrad-Led5 660 LED with 660 nm wavelength, intensity of delivered light of 25 mW/cm², power of 70 mW, fluence of 5 J/cm² for 24 h and 48 h, and then evaluated. Cell population was not increased by PDT treatment after the tested period. The apoptosis assay demonstrated that control groups exhibit approximately 60% of living cells in the 24 h and 48 h periods, however. A significant increase in apoptotic cells was observed after the photodynamic therapy treatments, for both 24 and 48 h groups. Over 50% of cells were under apoptosis after photodynamic therapy, evidencing a death process generated from the oxidative damage of the treatment. Comet assay and micronucleus assessments, both of which evaluate genotoxicity, demonstrated favorable results to damages caused by the photodynamic therapy treatment. Thus, photodynamic therapy is proposed to damage nuclear cells and the subcellular structure of carcinogenic cells.

Keywords: Cancer, photodynamic, genotoxicity, DNA, cell, damage

Experimental Biology and Medicine 2019; 0: 1–10. DOI: 10.1177/1535370219826544