



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA  
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia



**“AVALIAÇÃO FOTODINÂMICA EM CÉLULAS TUMORAIS DO  
CÂNCER DE MAMA E FIBROBLASTO UTILIZANDO O  
FOTOSENSIBILIZADOR BACTERIOCLORINA – TRISMA”**

**NAHRYDA SAMARA DOS SANTOS LOPES \***

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE EM BIOTECNOLOGIA do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos.

***Orientador:***

Prof. Dr. Clovis W. Oliveira de Souza

***Co-orientadora:***

Profa. Dra. Marciana Uliana Pereira Machado

\* bolsista CAPES - 1574964

**São Carlos - SP  
2018**





UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA  
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia



**“AVALIAÇÃO FOTODINÂMICA EM CÉLULAS TUMORAIS DO  
CÂNCER DE MAMA E FIBROBLASTO UTILIZANDO O  
FOTOSENSIBILIZADOR BACTERIOCLORINA – TRISMA”**

**NAHRYDA SAMARA DOS SANTOS LOPES \***

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE EM BIOTECNOLOGIA do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos.

***Orientador:***

Prof. Dr. Clovis W. Oliveira de Souza

***Co-orientadora:***

Profa. Dra. Marciana Uliana Pereira Machado

\* bolsista CAPES - 1574964

**São Carlos - SP  
2018**





UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia  
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

---

**Folha de Aprovação**

---

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Nahryda Samara dos Santos Lopes, realizada em 23/02/2018:

---

Prof. Dr. Clóvis Wesley Oliveira de Souza  
UFSCar

---

Prof. Dr. Sebastião Pratavieira  
IFSC/USP

---

Profa. Dra. Cristina Kurachi  
IFSC/USP



*Com todo meu amor e carinho, dedico este trabalho para  
minha família, pelos ensinamentos, amor e carinho.*





# Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus por seus cuidados em minha vida, e por me fazer trilhar esse caminho. Agradeço Senhor, por cada dificuldade encontrada durante o desenvolvimento deste trabalho, pois foram elas que me fizeram crescer e aprender. Agradeço pela saúde e força que me deu para que agora esteja chegando ao final desta etapa. Se eu cheguei, é porque assim foi a sua vontade e seus planos para a minha vida.

Ao meu orientador Prof. Dr. Clovis Wesley O. de Souza pela oportunidade de realizar este projeto, pela sua confiança em minha capacidade de desenvolvê-lo. Pelos ensinamentos, pela presença e assistência constante em todos os passos, pela paciência, pela amizade, por compreender que cada aluno tem seu tempo e pelos inúmeros incentivos, que me motivaram e que foram fundamentais nos momentos mais complicados durante o trabalho. Terminei essa etapa extremamente grata com a orientação.

À minha coorientadora, Profa. Dra. Marciana Uliana Pereira pela orientação, pela síntese da bacterioclorina-trisoma, pelas discussões produtivas ao longo deste trabalho, pelo incentivo, suporte e amizade.

À Profa. Dra. Fernanda Freitas Anibal por abrir as portas do seu laboratório, pelas discussões e suporte durante o desenvolvimento do projeto.

Aos colegas de laboratório Giovana e Diego que me receberam logo quando entrei no laboratório, me ensinaram as primeiras regras do laboratório e algumas técnicas experimentais; Matheus que sempre estava disposto a me ajudar; Laura e Thati pela amizade, conversas e paciência nos momentos de estresse.

À Zélia, técnica do laboratório, que assume o papel de “mãe do laboratório”, por toda ajuda (que são muitas), todo apoio, conselhos, paciência e amizade que conquistamos durante esse período.

Às colegas do laboratório de Parasitologia, Débora e Genoveva pela amizade e principalmente pela paciência por me ensinar as técnicas de cultivo celular.

Ao Dr. Sebastião Pratavieira, pelos ensinamentos sobre microscopia confocal, por todas as dicas e pelo agradável convívio.

Aos meus amigos desde a época de iniciação científica, Welinson e Carol Vaso, que dispôs de todo o tempo para me ajudar, apoiar e dar conselhos. Por perder tarde e noites me ajudando e me dando total apoio e incentivo.

Ao colega Bruno Ono pela ajuda nos ensaios de microscopia de confocal, dicas de apresentação e formatação, todo apoio e paciência.

As colegas Angelina e Milene por toda ajuda na técnica de citometria de fluxo e por passar grande parte da experiência de vocês com células.

À minha família, em especial aos meus pais e avós maternos, exemplos de pessoas, por todo apoio, paciência e dedicação, não só durante esta fase, mas em toda a minha vida. Vocês foram essenciais!

Ao Rodolfo, por todo seu apoio, paciência, carinho e amor. Por sua companhia de feriados e finais de semana no laboratório e estudando. Você é uma pessoa especial na minha vida!

A CAPES pela bolsa concedida durante esse dois anos.

Ao PPGBIOTEC e a UFSCar pela oportunidade e crescimento profissional durante todo esse tempo.

*“Apesar dos nossos defeitos, precisamos enxergar que somos pérolas únicas no teatro da vida e entender que não existem pessoas de sucesso ou pessoas fracassadas. O que existe são pessoas que lutam pelos seus sonhos ou desistem deles”.*

**Augusto Cury**



## RESUMO

O câncer de mama apresenta-se como um dos principais problemas de saúde entre as mulheres, o primeiro câncer em incidência e o segundo em número de óbitos. Esse tipo de tumor apresenta um alto grau de recorrência, devido a falhas que ocorre no tratamento e o aparecimento de metástase que é a principal causa de morte. A terapia fotodinâmica aparece como uma alternativa terapêutica promissora, a qual pode ser utilizada para tratar vários tipos de tumores, esta técnica utiliza a luz a qual estimula o fotossensibilizador, proporcionando a formação espécies reativas de oxigênio, os quais causam danos irreversíveis as células, ocasionando a morte celular. O objetivo desse trabalho foi avaliar, em experimentos *in vitro*, a eficácia de um novo fotossensibilizador (FS) da classe da bacterioclorina, a bacterioclorina – trisma utilizando a terapia fotodinâmica em células tumorais. Os melhores parâmetros para a terapia fotodinâmica foram observados contra células de câncer de mama, respectivamente, a linhagem MCF-7. Para realizar a terapia fotodinâmica foram utilizadas sete diferentes doses do fotossensibilizador, 0,01  $\mu\text{M}$ ; 0,1 $\mu\text{M}$ ; 0,5  $\mu\text{M}$ ; 1,0 $\mu\text{M}$ ; 2,5 $\mu\text{M}$ ; 5,0 $\mu\text{M}$  e 10 $\mu\text{M}$  e três diferentes doses de luz 2, 7 e 15  $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$ . Foram realizados testes de viabilidade celular, citometria de fluxo e microscopia confocal para avaliar a morte celular e atividade citotóxica da bacterioclorina – trisma nas células. As concentrações a partir de 0,5  $\mu\text{M}$  apresentaram 80% de morte celular independente das doses de luz utilizadas (2, 7 e 15  $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$ ). No estudo de colocalização verificou-se a maior similaridade com o lisossomo, e na citometria demonstrou que o tipo de morte celular foi por apoptose. O fotossensibilizador bacterioclorina – trisma demonstrou bom resultado possibilitando futuros protocolos eficientes de Terapia fotodinâmica contra a linhagem tumoral do tipo MCF-7.

**Palavras-chave:** Câncer, infravermelho, terapia fotodinâmica.

## Abstract

Breast cancer is one of the main health problems among women. It is the first cancer in incidence and the second in the number of deaths. This type of tumor presents a high degree of recurrence due to failures in the treatment and the occurrence of metastasis which is the leading cause of death. Photodynamic therapy appears as a promising therapeutic alternative, which can be used to treat various types of tumors. This technique uses light, which stimulates the photosensitizer and provides the formation of reactive oxygen species, causing irreversible damage to cells and cell death. The goal of this work was to evaluate in vitro the efficacy of a new photosensitizer (FS) of bacteriochlorin class, bacteriochlorin - trism, using photodynamic therapy in tumor cells. To perform the photodynamic therapy were used seven different doses of the photosensitizer: 0.01  $\mu\text{M}$ , 0.1  $\mu\text{M}$ , 0.5  $\mu\text{M}$ , 1.0  $\mu\text{M}$ , 2.5  $\mu\text{M}$ , 5.0  $\mu\text{M}$ , and 10  $\mu\text{M}$ , and three different light doses 2, 7, and 15  $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$ . Cell viability tests, flow cytometry, and confocal microscopy were performed to evaluate cell death and cytotoxic activity of bacteriochlorin - trism in cells. Concentrations from 0.5  $\mu\text{M}$  showed 80% cell death independent of the light doses used. In the colocalization study, the highest similarity with lysosome was found, and in cytometry, it was shown that the type of cell death was by apoptosis. The best parameters for photodynamic therapy were observed against breast cancer cells (MCF-7 strain). The photosensitizer bacteriochlorin - trism demonstrated good results enabling future efficient protocols of photodynamic therapy against MCF - 7 type tumoral lineage.

**Keywords:** Cancer, infrared, photodynamic therapy.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Propagação da luz através dos tecidos.....	19
<b>Figura 2.</b> Diagrama de Jablonski simplificado – mecanismo geral de geração de espécies reativas de oxigênio mediadas por luz.....	20
<b>Figura 3.</b> Espectro de absorção de três diferentes tipos de FS .....	303
<b>Figura 4.</b> Características adquiridas pelas células tumorais... <b>Erro! Indicador não definido.</b> 26	
<b>Figura 5.</b> Etapas da obtenção da bacterioclorina-Trisma. ....	33
<b>Figura 6.</b> Biotable a base de LEDs.....	36
<b>Figura 7.</b> Espectro de absorção da Bacterioclorina-trisma a 10 $\mu$ M em meio DMEM e PBS.....	41
<b>Figura 8.</b> Viabilidade celular de fibroblasto (linhagem HFF-1) após incubação com seis diferentes concentrações de bacterioclorina-trisma e dose de luz 2, 7 e 15J cm <sup>-2</sup> .....	42
<b>Figura 9.</b> Viabilidade celular de câncer de mama (linhagem MCF-7) após incubação com seis diferentes concentrações de bacterioclorina-trisma e dose de luz 2, 7 e 15 J cm <sup>-2</sup> .....	42
<b>Figura 10.</b> <b>Erro! Indicador não definido.</b> 46	
<b>Figura 11.</b> Gráfico de fluorescência da bacterioclorina-trisma, quando excitada em 402 nm, indicando que o fotossensibilizador tem emissão em torno de 700 e 800 nm. ....	46
<b>Figura 12.</b> <b>Erro! Indicador não definido.</b> do núcleo celular linhagem HFF-1.....	48
<b>Figura 13.</b> Marcação do núcleo celular linhagem MCF-7. ....	49
<b>Figura 14.</b> Marcação da mitocôndria celular linhagem HFF.....	50
<b>Figura 15.</b> Marcação da mitocôndria celular linhagem MCF-7.....	51
<b>Figura 16.</b> Marcação do lisossomo celular linhagem HFF-1.....	52
<b>Figura 17.</b> Marcação do lisossomo celular linhagem MCF-7.....	53
<b>Figura 18.</b> Marcação do retículo endoplasmático linhagem HF-1.....	54
<b>Figura 19.</b> Marcação do retículo endoplasmático linhagem MCF-7.....	55
<b>Figura 20.</b> Efeito da bacterioclorina-trisma sobre a apoptose. Células HFF-1ou MCF-7 foram analisadas por citometria de fluxo após tratamento com iodeto de propídio (PI) e PE-Anexina V.....	60



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Fotossensibilizadores reconhecidos mundialmente com aplicações em testes clínicos.....	22
<b>Tabela 2.</b> Marcadores e fotossensibilizador utilizados nas células e seus respectivos comprimentos de excitação e emissão.....	37
<b>Tabela 3.</b> Coeficiente de Pearson e Coeficiente de Mander para as linhagens HFF-1 e MCF.....	56
<b>Tabela 4.</b> Porcentagens de apoptose obtidas por citometria de fluxo das linhagens celulares HFF-1 e MCF-7 .....	58

# SUMÁRIO

	Pág.
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>17</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>18</b>
<b>2.1 Câncer .....</b>	<b>18</b>
<b>2.2 Câncer de Mama .....</b>	<b>20</b>
<b>2.3 Tratamentos para o câncer de mama .....</b>	<b>22</b>
<b>2.3 Terapia Fotodinâmica .....</b>	<b>24</b>
<b>2.4 Fotossensibilizadores e Bacterioclorina .....</b>	<b>28</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>32</b>
<b>3.1 Objetivo Geral.....</b>	<b>32</b>
<b>3.2 Objetivos Específicos .....</b>	<b>32</b>
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>34</b>
<b>4.1 Bacterioclorina - Trisma .....</b>	<b>34</b>
<b>4.2 Linhagens e cultivo de células.....</b>	<b>34</b>
<b>4.3 Terapia Fotodinâmica (TFD).....</b>	<b>36</b>
<b>4.4 Fonte de Luz .....</b>	<b>36</b>
<b>4.5 Determinação da Citotoxicidade por teste de MTT.....</b>	<b>37</b>
<b>4.6 Microscopia Confocal .....</b>	<b>38</b>
<b>4.7.1 Coeficiente de Pearson.....</b>	<b>39</b>
<b>4.7.2 Coeficiente de Mander.....</b>	<b>39</b>
<b>4.8 Determinação da morte celular por citometria de fluxo .....</b>	<b>40</b>
<b>4.9 Análise Estatística .....</b>	<b>41</b>
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>	<b>42</b>
<b>5.1 Microscopia Confocal .....</b>	<b>47</b>
<b>5.1.1 Citometria de Fluxo .....</b>	<b>59</b>
<b>6.CONCLUSÕES.....</b>	<b>62</b>
<b>7.SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS.....</b>	<b>62</b>
<b>8.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>63</b>





## 1. INTRODUÇÃO

Câncer é o nome dado a um grupo de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células que crescem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se para outras regiões do corpo. O tumor pode ser dividido em dois tipos, tumor benigno que se multiplica vagarosamente, se assemelha ao tecido original e geralmente não fazem metástase, e tumor maligno, que as células são muito agressivas e se multiplica rapidamente, ocorrendo o processo que chamamos de metástase, atingindo outros órgão e tecidos, sendo considerado um risco de vida para o paciente. As causas do câncer podem ser variadas, e divide-se em fatores internos, por exemplo, a herança genética e fatores externos, como tabagismo, estilo de vida, ambiente, radiação, alimentação, entre outros (GREAVES; MALEY, 2012).

Esta doença é um problema de saúde pública, principalmente nos países em desenvolvimento, que segundo o INCA, 2016 (Instituto Nacional do Câncer), estima-se para as próximas décadas mais de 20 milhões de casos novos para 2025. Os principais tipos de câncer mais incidente no mundo foram pulmão (1,8 milhão), mama (1,7 milhão), intestino (1,4 milhão) e próstata (1,1 milhão) (INCA, 2016).

Segundo o INCA, estimou-se para o Brasil no biênio de 2016-2017 a ocorrência de cerca de 600 mil casos novos de câncer, sendo o câncer de pele o mais incidente em todo país, em homens e mulheres. Em 2016, 596 mil novos casos de câncer de pele no Brasil foram diagnosticados. (INCA, 2016).

Os tratamentos mais comuns e os mais utilizados para o câncer são: cirurgia, quimioterapia e radioterapia, porém esses tipos de tratamento possuem vários efeitos colaterais para o paciente. Dessa forma, a terapia fotodinâmica (TFD) vem sendo cada dia mais estudada para tratamento alternativo de várias doenças, inclusive o câncer, a fim de obter excelentes resultados e sem efeitos adversos (DIE OLIVEIRA, et al., 2015).

A TFD é uma técnica utilizada para tratar vários tipos de doenças onde a luz estimula o fotossensibilizador dentro das células, formando espécies reativas de oxigênio (EROS) ocasionando a morte celular. Uma característica importante da TFD é um acúmulo do FS em células neoplásicas do que em células saudáveis, permitindo que o efeito fotodinâmico ocorra de forma seletiva em células doentes, proporcionando a morte das mesmas e preservando as células saudáveis, favorecendo o diagnóstico e acompanhamento do tratamento (KIESSLICH, et al., 2006; BROWN, et al., 2004).

Visto que o câncer é uma doença “dolorosa”, que atinge milhares de pessoas, e que possui um tratamento complexo envolvendo várias etapas, como cirurgia, quimioterapia, radioterapia, entre outros, esse trabalho tem como justificativa a descoberta de um novo fotossensibilizador bem como a aplicação deste como um novo tratamento eficaz para o câncer. Esse tratamento tende a ser um tratamento alternativo com menores efeitos colaterais, o que se diferentemente dos tratamentos atuais.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Câncer**

Câncer é o nome empregado a um conjunto de doenças que envolvem uma dinâmica de modificações no genoma de uma célula, levando a um crescimento desordenado (GREAVES; MALEY, 2012). Segundo Robins (2013), o câncer é um desarranjo genético causado por mutações do DNA que na maioria das vezes são adquiridas espontaneamente ou induzidas por agressões do ambiente. Além disso, os cânceres demonstram alterações epigenéticas, como a modificação nas histonas, que são as proteínas responsáveis pela compactação e descompactação do DNA, e aumento focal da metilação de DNA (ROBINS, 2013). Essas alterações genéticas e epigenéticas alteram a expressão e função de genes que regulam os processos celulares fundamentais, como crescimento, sobrevivência e envelhecimento celular.

Dividindo-se rapidamente, estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, ocorrendo à formação de tumores malignos, que podem se espalhar para várias regiões do corpo, e quando não controlada podem levar a falência de órgãos e consequentemente a morte do paciente (GREAVES; MALEY, 2012).

O câncer tem sido amplamente estudado em diferentes aspectos, desde prevenção da doença até novos tratamentos de cura (HANAHAN E WEINBERG, 2011; WHO, 2014). O estilo de vida influencia sobremaneira a suscetibilidade do indivíduo ao desenvolvimento de câncer, de maneira que mais da metade dos novos casos da doença podem ser prevenidos ou eliminados com mudanças de hábitos ou abstenção à exposição ao tabaco, sedentarismo e nutrição inadequada (COLDITZ et al., 2012; WHO, 2014). Os tratamentos variam desde cirurgia, quimioterapia, radioterapia, até terapia imune e terapia alvo, que são os medicamentos que interferem no crescimento das células tumorais (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2015).

Os tumores são tecidos complexos, constituídos por diferentes tipos de células que participam em interações heterotípicas umas com as outras. Essa complexidade gera

desafios consideráveis para a descrição da biologia do câncer e seu tratamento, inspirando estudos nos contextos celular, molecular e fisiológico (MASOUDI – NEJAD; ASGARI, 2015). Para o desenvolvimento do câncer é necessário um conjunto de modificações moleculares e bioquímicas nas células normais que se resume em uma instabilidade genômica que afetam os circuitos que regem a proliferação celular normal, com consequências na homeostase tecidual como um todo (BOZIC, et al., 2010).

A incidência crescente de casos de neoplasia tem ocasionado uma transformação no perfil epidemiológico da população, seja pelo aumento da exposição aos fatores cancerígenos, pelo envelhecimento populacional, pelo aprimoramento das tecnologias para o diagnóstico, como também pela elevação do número de óbitos por câncer (INCA, 2012). A OMS (Organização Mundial da Saúde) estima para o ano de 2030, 21,4 milhões de casos incidentes, 13,2 milhões de mortes e 75 milhões de pessoas vivas com câncer (INCA, 2014). O câncer de pele do tipo não melanoma (182 mil casos novos) é o mais incidente na população brasileira, seguido pelos tumores da próstata (69 mil), mama feminina (57 mil), cólon e reto (33 mil), pulmão (27 mil), estômago (20 mil) e colo do útero (15 mil), acompanhando o mesmo perfil da magnitude observada para a América Latina (INCA, 2014).

Nos diferentes tipos de tumores foram identificadas e classificadas oito alterações essenciais na fisiologia da célula que, em conjunto determinam o crescimento maligno. Tais características incluem: autossuficiência nos sinais de crescimento, insensibilidade a inibidores de crescimento, evasão da morte celular por apoptose, potencial replicativo ilimitado, desenvolvimento da angiogênese, capacidade de invasão em tecidos e metástase, reprogramação das vias metabólicas e capacidade de escapar do sistema imune (KUMAR, et al. 2013). Estas oito características que diferem células normais das tumorais são possíveis por duas características finais que causam alterações necessárias para a transformação maligna, que são a instabilidade genômica e o quadro de inflamação crônica (**Figura 5**) (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

**Figura 4:** Características adquiridas pelas células tumorais. Modificado de Hanahan & Weinberg, 2011.



## 2.2 Câncer de Mama

Câncer de mama é o nome dado às neoplasias derivadas de células originárias da mama, sendo as mais comuns classificadas como carcinomas, por sua origem epitelial. Existem dois tipos de carcinomas que podem se desenvolver no tecido mamário: o carcinoma ductal, o tipo mais comum, originado nos ductos mamários e o carcinoma luminal, que se origina nos ácinos mamários. Os dois tipos podem ser classificados como in situ ou invasivo, dependendo do estágio no qual se encontram, delimitado ou invadindo tecidos adjacentes, sendo o invasivo considerado o mais agressivo, pois pode progredir para a formação de metástase em outros tecidos (POURTEIMOOR et al., 2016).

Além dessa classificação por origem, também é possível identificar o câncer de mama pela presença ou ausência de receptores hormonais. Sendo assim, é subdividido em: positivos para receptores de hormônio estrógeno (ER), ou progesterona (PR), positivos para receptores hormonais e do fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2) e os triplos negativos (TNBC: Triple Negative Breast Cancer), que não expressam ER, PR e HER2. Essas características são parte indispensável para a avaliação diagnóstica e orientações nas intervenções terapêuticas (RAKHA; ELLIS, 2011).

Mesmo com todos os avanços tecnológicos recentes as pacientes com câncer de mama ainda sofrem com a reincidência da doença, favorecendo o surgimento de

metástase, sendo este a principal causa associada a morte por este tipo de câncer (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2015). Para o câncer de mama, o problema de reincidência do tumor é maior nos casos de tumores do tipo triplo negativo (TNBC) por não apresentarem receptores para hormônios esteróides (ER ou PR) ou para o fator de crescimento epidermal (HER2), dessa forma são classificados como o subtipo mais agressivo, pois não apresenta terapias direcionadas. Por isso, o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, sempre visando acionar mecanismos em uma seletiva e uma eficiente morte da célula tumoral, que provoque menos efeitos adversos e um efeito clínico efetivos (ECKHARDT et al., 2012).

É o segundo tipo de câncer mais frequente no mundo, acometendo uma a cada oito mulheres (ZHU, 2011; NOORI E HASSAN, 2012; INCA, 2014). No Brasil, segundo o Instituto Nacional do Câncer, esperavam-se 57.960 mil novos casos de câncer de mama para o ano de 2016, com um risco estimado de mais de 56 casos a cada 100 mil mulheres (INCA, 2016). A taxa de sobrevivência de 5 anos para o tumor primário é de 99%. No entanto, de um terço de total de pacientes com câncer apresenta metástase distantes, e a taxa de sobrevida neste caso diminuiu para 23% (MA, et al., 2015). Além de ser o mais frequente na população feminina, o câncer de mama é também a maior causa de morte por câncer entre as mulheres em todo o mundo, com cerca de 520 mil mortes por ano (INCA, 2016).

É uma doença considerada multifatorial, e existem vários fatores associados ao seu desenvolvimento. A idade, assim como em vários outros tipos de câncer, é um dos principais fatores que está relacionado com o desenvolvimento do câncer de mama, contudo outros fatores de risco já estão estabelecidos, como por exemplo, os fatores genéticos, hormonais e aqueles relacionados com a vida reprodutiva da mulher (CANCER; ATLAS, 2012). O fator ligado a hereditariedade, uma vez que cerca de 4 a 9% dos casos de câncer de mama estão relacionados pela mutação em determinados genes transmitidos, especialmente os genes BRCA1 e BRCA2 (*Breast cancer 1 e 2*), respectivamente. Mulheres com histórico de câncer na família, especialmente câncer de mama e ovários, podem ter uma predisposição genética e são consideradas de alto risco para a doença (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2015).

Os tumores de mama, quando diagnosticados e tratados quando ainda permanecem confinados no tecido mamário, apresentam uma alta taxa de cura, porém, após ser estendido e colonizado para outros sítios secundários, essa taxa de cura diminui significativamente. Sendo assim, o desenvolvimento de metástase apresenta-se como o

fator principal da causa da morte de pacientes com esse tipo de câncer. (AHMAD, 2013).

Os métodos mais recomendados para o diagnóstico precoce do câncer de mama são exames clínicos das mamas e a mamografia. Quando se tem um diagnóstico da doença em estágio inicial, o câncer de mama apresenta um bom prognóstico com taxa de aproximadamente 65% de sobrevivência dos pacientes, mas mesmo assim as taxas de mortalidade continuam crescendo. No Brasil e em outros países em desenvolvimento, esse aumento muito provavelmente é devido ao fato de que a doença só é diagnosticada em estágios mais avançados. Na população mundial, a sobrevivência média após cinco anos da doença é de 61% (INCA, 2014).

### **2.3 Tratamentos para o câncer de mama**

Hoje em dia, os principais tratamentos para o câncer de mama são quimioterapias, radioterapias, terapia hormonal, cirurgia ou uma combinação destes. As causas para tanto são o baixo poder citotóxico sobre os diferentes tipos de células que constituem o tumor e a falta de especificidade do tratamento (AHMAD, 2013). A escolha do tratamento é direcionada conforme as diferentes fases do crescimento e a progressão do tumor. Os tratamentos aplicados hoje são baseados na ressecção do tumor, controle local, aplicação da terapia sistêmica, terapia endócrina e terapia direcionadas, dependendo da presença de ER, PR e HER2 (MA, et al., 2015). As terapias de largo espectro de ação, como a quimioterapia, são projetadas para evitar que o tumor volte, matando as células em divisão, e são a única opção de tratamento sistêmico atualmente disponível para o subtipo triplo negativo (ECKHARDT et al., 2012).

Compostos com alvo ER e HER2 estão entre as terapias mais bem sucedidas (RAKHA; ELLIS, 2011). Outras terapias já estão em desenvolvimento. Como por exemplo, a inibição de poli (ADP – ribose) polimerase (PARP) tem demonstrado eficácia em alguns pacientes com mutações em BRCA1 e BRCA2. Contudo, em pacientes com câncer do tipo triplo negativo que não têm as mutações BRCA, a eficácia de inibidores da PARP é questionável (ECKHARDT et al., 2012).

Os estágios avançados do câncer de mama são amplamente caracterizados por metástase e de resistência a drogas. Metástase para órgãos como pulmão, ossos, fígado e cérebro, limitam severamente a possibilidade de cirurgia e também não apresentam terapias direcionadas. A resistência é outro desafio muito relevante. Muitos pacientes com câncer de mama não respondem a terapias direcionadas desde o início do

tratamento, já outros pacientes respondem a terapias específicas, e mostram sinais de melhora apenas inicialmente, passando para o estágio refratário da doença, apresentando a chamada resistência adquirida. Quadros de metástase e de resistência aos medicamentos quase sempre resultam em mal prognóstico e levam a uma doença progressivamente agressiva (AHMAD, 2013).

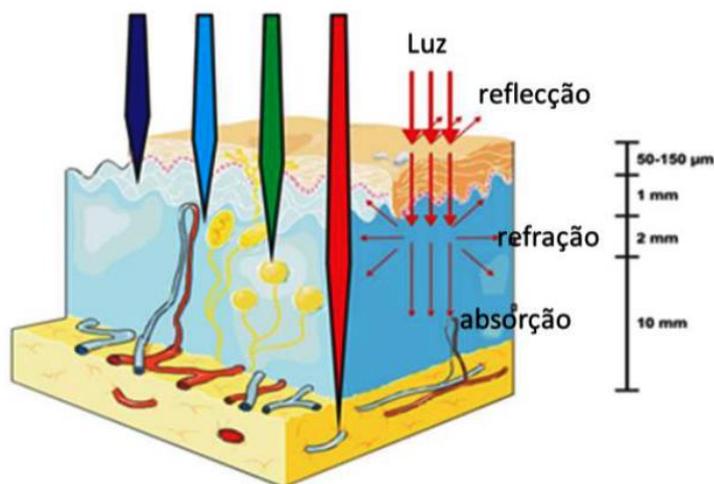
### 2.3 Terapia Fotodinâmica

A TFD vem se destacando como uma importante técnica terapêutica utilizada no combate a neoplasias, psoríase, doenças bacterianas, doenças virais, micoses, tratamentos odontológicos e dermatológicos (DE OLIVEIRA et al., 2015). Esse tratamento envolve a administração de um fotossensibilizador no tecido tumoral, seguida da ativação desse por uma luz com comprimento de onda específico (ISSA; MANELA-AZULAY, 2010).

A TFD é uma modalidade terapêutica minimamente invasiva, baseada na administração de um agente fotossensibilizador que pode ser ativado por irradiação local com luz visível (AGOSTINIS et al., 2011). As vantagens da terapia fotodinâmica em comparação com outros tratamentos convencionais, são a morbidade reduzida a longo prazo e o fato principalmente da terapia não interferir em outros tratamentos (ACEDO et al., 2014), devido a essa característica, ela pode ser utilizada em conjunto com outras terapias, contornando as possíveis deficiências dos tratamentos convencionais (SPRING et al., 2015). A terapia fotodinâmica já vem sendo utilizada como modalidade terapêutica em vários países para o tratamento de vários tipos de cânceres, como pulmão, bexiga, esôfago, pele, entre outros (AGOSTINIS, et al., 2011). O presente trabalho teve como foco avaliar a eficácia da bacterioclorina-trisoma e estudar os mecanismos moleculares envolvidos em sua citotoxicidade, contribuindo assim com a relação ao seu modo de ação e abrangência da terapia.

Essa modalidade terapêutica possui outra característica diferenciada, que é o acúmulo seletivo do fotossensibilizador (FS) nas células doentes, seja pelo uso sistêmico ou pela aplicação local. Por exemplo, quando se tem uma região com tumor, a concentração do FS nas células neoplásicas deverá ser maior do que em células normais, fazendo com que o efeito fotodinâmico ocorra em células doentes preservando as células normais (DE OLIVEIRA et al., 2015). Do ponto de vista fotofísico e dos FS, são almejadas moléculas com bandas de absorção na região compreendida entre 600- 750 nm, já que a irradiância de luz nestes comprimentos de onda fornece um efeito terapêutico adequado com penetrações que variam de 5 – 20 mm; este também é um aspecto importante da TFD, pois proporciona tratar lesões de médias dimensões (MANOEL et al., 2014; TETARD et al., 2014). A luz vermelha e infravermelha, compreendida entre 600 e 1200nm, são as que mais penetram nos tecidos, conforme mostra a **figura 1**.

**Figura 1:** Propagação da luz através dos tecidos. Fonte: AGOSTINIS et al., 2011.



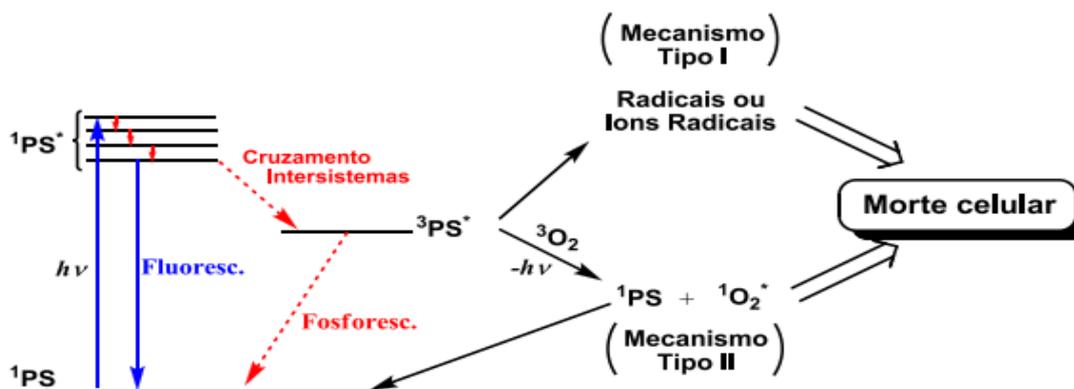
Um resultado terapêutico insatisfatório da TFD em alguns tipos de câncer ocorre devido a utilização de fotossensibilizadores com propriedades ópticas, bioquímicas, farmacocinéticas inferiores e/ou variações do genótipo e fenótipo tumoral, o que pode influenciar positivamente a sobrevivência de células tumorais após o dano oxidativo produzido pela TFD (BROEKGAARDEN, 2015). Também já foi relatado na literatura que a eficiência desta terapia pode estar relacionada com a incorporação do fotossensibilizador nas células.

O tratamento com TFD é dividido em duas etapas, na primeira, o FS acumula-se preferencialmente nas células tumorais após sua administração tópica ou sistêmica. Na segunda, o tumor fotossensibilizado é exposto à luz de comprimento de onda específico que coincide com o espectro de absorção do agente fotossensibilizante (ISSA; MANELA-AZULAY, 2010). Após absorver a luz em comprimentos de onda adequados, o PS é excitado para seu estado eletrônico excitado (que é um estado singleto ( $1PS^*$ )) podendo retornar ao estado fundamental emitindo energia por fluorescência ou sofrer um processo de inversão de spin denominado cruzamento intersistemas indo para o estado de maior energia, o tripleto excitado ( $3PS^*$ ). Por ser uma configuração instável, quando o fotossensibilizador retorna dessas moléculas ao estado fundamental de energia envolve perda por fosforescência, entretanto, no estado  $3PS^*$  muitos pigmentos orgânicos possuem níveis de energia adequados para realizar transferências de energia para o oxigênio molecular ( $O_2$ ). Nas transições eletrônicas,

interações tripleto-triplete, permite que o fotossensibilizador interaja com o oxigênio molecular, uma vez que este se apresenta na forma tripleto em seu estado fundamental. Dessa forma, o  $O_2$  que ocorre naturalmente no estado tripleto ( $^3O_2$ ), é fotoexcitado pelo fotossensibilizador ( $^3PS^*$ ) indo para o estado singleto ( $^1O_2^*$ ) (DE OLIVEIRA et al., 2015 (**Figura 2**)).

Neste estado o oxigênio torna-se extremamente reativo proporcionando danos as moléculas biológicas e posteriormente a destruição celular; este processo é denominado de mecanismo do tipo II (MANOEL et al., 2014). Há ainda uma possibilidade de formação de espécies radicais ou peróxidos, que chamamos de mecanismo do tipo I, dependendo do fotossensibilizador e meio celular, este mecanismo pode ser em maior ou menor ocorrência. Em ambos os mecanismos ocorre a formação das espécies reativas de oxigênio (ROS – do inglês *Reactive Oxygen Species*) sendo que, as espécies produzidas no mecanismo do tipo II (oxigênio singleto) são as mais relevantes nos tratamentos por TFD (DE OLIVEIRA et al., 2015; MANOEL et al., 2014).

**Figura 2.** Diagrama de Jablonski simplificado – mecanismo geral de geração de espécies reativas de oxigênio mediadas por luz. Fonte: DE OLIVEIRA et al. (2015).



Como discutido anteriormente, a TFD prova ser eficaz na indução de respostas tumorais, bem como a melhora da sobrevida e qualidade de vida do paciente, e usada como tratamento de primeira linha para doenças como o câncer. Ao rever os ensaios clínicos e estudos nos últimos dez anos, alguns problemas gerais se tornam evidentes. Um grande problema está relacionado aos efeitos adversos (EAs) associados à TFD. Quando administrado os FSs, especialmente da primeira geração, a fotossensibilidade

da pele é um dos mais comuns EAs, os pacientes devem evitar luz solar e luz artificial forte por semanas, o que é altamente indesejável quando eles estão chegando ao final da vida (STRATEN, et al., 2017). Outro EA frequentemente relatado é dor.

O principal mecanismo da dor induzida pela PDT ainda não foi elucidado, mas vários estudos declaram que o motivo da dor esta relacionada com o tamanho da área tratada durante a localização, o tipo FS, tipo de lesão, sexo, idade e protocolo de luz também foram mencionados (FINK, et al., 2015). Várias estratégias para o combate da dor foram testadas, mas nenhuma aliviou totalmente a dor induzida pela TFD (FINK, et al., 2015). A ocorrência de EAs como inflamação febre e náusea é tipicamente dependente de localização do FS, que são freqüentemente administrado com medicação para o controle desses efeitos (STRATEN, et al., 2017).

Outra desvantagem é a eficácia decrescente do TFD para lesões maiores, especialmente com PSs de primeira geração devido à penetração tecidual inadequada de luz ou FS, tumores volumosos ou profundos que são mais difícil de tratar com TFD (YANO, et al., 2012). Até FS de segunda geração são menos eficazes em lesões maiores, caso em que a cirurgia é mais eficaz (DE VISSCHER et al., 2013; YANO, et al., 2012). O FS mais eficaz tende a ser difícil de dissolver devido à hidrofobicidade e pode formar agregados que apresentam problemas no tecido tumoral penetrante (CASTANO, et al., 2005). A penetração tecidual permanece um tópico de preocupação para a eficácia da TFD, especialmente quando comparado com quimioterapia sistêmica, radioterapia ou cirurgia (STRATEN, et al., 2017).

Além de lesões maiores, a TFD também não é indicada para tumores metastáticos. Quase todos os estudos clínicos excluem pacientes com metástase tumoral, pois é quase impossível atingir esses tumores com luz, por isso a metástase continua sendo um dos maiores desafios na terapia do câncer e a TFD não é uma exceção (STRATEN, et al., 2017).

## 2.4 Fotossensibilizadores e Bacterioclorina

Os fotossensibilizadores são tipicamente divididos em gerações com base no tempo de desenvolvimento e suas características específicas. A primeira geração de PSs são as hematoporfirinas (Hp) que surgiram no século XIX. O primeiro Hp, formado a partir de sangue seco, era uma mistura de várias porfirinas, cada uma com suas próprias características (STRATEN, et al., 2017). Foi inicialmente usado como uma ferramenta de diagnóstico fluorescente para cânceres, mas devido à sua natureza heterotípica, grandes doses foram necessárias para alcançar os efeitos desejados. Além disso, quando processado foi formado um derivado de hematoporfirina que tinha melhores propriedades de localização do tumor e poderia ser usado como um PS para tratar gliomas por meio de TFD STRATEN, et al., 2017.

Outra etapa de purificação resultou na formação de outro derivado de hematoporfirina (Photofrin®), primeiro FS a ser estudado em detalhes que foi aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos e da Agência Europeia de Medicina (EMA) para uso clínico no tratamento do câncer (KESSEL, 1986, 1989). Sua estrutura química apresentou uma variação significativa entre lotes e tentativas de fracionamento em suas moléculas com frequência, e acabou produzindo misturas tão complicadas quanto seu material de partida (BAYONA et al., 2016). Outros erros encontrados foram: longa duração na pele ocasionando fotossensibilidade até 8 semanas após a administração; falta de uma banda de absorção de tamanho razoável >650 nm. Apesar dessas deficiências, Photofrin continua a ser o FS mais usado (BAYONA et al., 2016).

Isso levou ao desenvolvimento da segunda geração de PSs que foram feitos para superar as limitações da primeira geração. Eles consistem em todos os tipos de porfirinas geralmente divididas em porfirinas, clorinas, texafirinas e ftalocianinas, cada grupo consistindo em numerosos tipos de PS. (ORMOND & FREEMAN, 2013). Os PSs de segunda geração visam aumentar a pureza e a reprodutibilidade do PS para ter um melhor controle sobre produção e comportamento de drogas. O objetivo de usar PSs de segunda geração foi alcançar seletividade do tumor e reduzir a dose total da droga (STRATEN, et al., 2017). O efeito adicional de doses menores significa que o produto é eliminado mais rapidamente e a fotossensibilidade da pele pode ser reduzida de semanas para dias. As propriedades fotoquímicas destes novos PS foram ajustadas de modo a utilizar a absorção preferencial de luz em comprimentos de onda maior para que possam ser usados para tratar tumores em tecidos mais profundos (O'CONNOR et al., 2009).

A produção de um bom fotossensibilizador ainda é um grande desafio para pesquisadores. As características esperadas para um bom FS são fotofísicas favoráveis; baixa toxicidade na ausência de luz; fotossensibilidade não prolongada; farmacocinética favorável, ou seja, faz com que o organismo libere de uma forma mais adequada; alta afinidade e penetração no tecido doente em detrimento do tecido saudável (seletividade) e principalmente; baixa agregação em soluções, preferencialmente aquosas / biológicas (SIMPLICIO et al., 2002).

Um bom fotossensibilizador deve ter baixos níveis de toxicidade no escuro e uma baixa probabilidade de efeitos adversos. O FS deve absorver a luz na região do infra-vermelho com comprimento de onda ideal para atingir o tecido. Bandas de absorção com comprimentos de onda mais curtos têm menor penetração no tecido e são mais propensos a levar à fotossensibilidade da pele, enquanto que bandas de absorção com comprimento de onda mais elevado possui uma maior penetração nos tecidos, e conseqüentemente um melhor resultado do tratamento. Para a TFD é ideal fotossensibilizadores com absorção maior que 600nm, em comprimentos de onda maiores que 1200nm a água tem uma absorção substancial, já em comprimentos de onda maiores que 850nm os fótons podem não ter energia suficiente para as reações fotoquímicas. Dessa forma, comprimentos de onda na faixa entre 600 e 800nm são determinantes para a prática clínica da TFD, sendo tal faixa conhecida como janela terapêutica (BAYONA et al., 2016).

Muitos tipos diferentes de fotossensibilizadores têm sido sintetizados e testados como possíveis agentes na terapia fotodinâmica. A tabela 1, indica os fotossensibilizadores que são utilizados em aplicações clínicas.

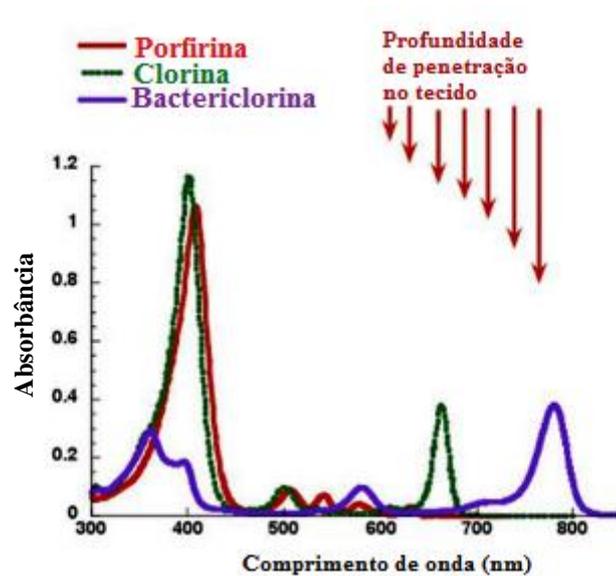
**Tabela 1:** Fotossensibilizadores reconhecidos mundialmente com aplicações em testes clínicos.

FS	Comprimento de excitação	Aprovado	Indicação
Photofrin	630nm	Mundialmente	Pulmão, esôfago, ducto biliar, bexiga, cérebro, ovário
Ameluz / Levulan	635nm	Mundialmente	Pele, bexiga, cérebro, esôfago
Metvix / Metvixa	570-670nm	Mundialmente	Carcinoma basocelular
Foscan	652nm	Europa	Cabeça e pescoço, pulmão, cérebro, pele, ducto biliar
Laserphyrin	664nm	Japão	Fígado, cabeça e pescoço
Visudyne	690nm	Mundialmente	Pele
SGX301	570-650nm	Estados Unidos	Linfoma cutâneo de células T
Redaporfin	749nm	Estados Unidos	Ducto biliar

Adaptado de STRATEN, et al., 2017.

Os compostos à base de porfirina, especialmente as clorinas e bacterioclorinas mostraram-se enormes interesse para TFD utilizada para tratamento do câncer (PANDEY et al., 2016). As clorinas e bacterioclorinas vêm se destacando entre os FS mais utilizados em tratamentos com TFD. Isto ocorre devido ao fato desses fotossensibilizadores apresentarem uma banda de absorção maior (**Figura 3**), razão pelo qual são considerados FS de segunda geração, o que permite tratamentos de lesões mais profundas devido à alta penetração do infravermelho (DE OLIVEIRA et al., 2015). As bacterioclorinas são apropriadas para tratamento de câncer com TFD e possui uma larga janela terapêutica, entre 720 – 900nm, que faz com tenha uma maior penetração e seja menos nocivo para os tecidos humanos (PEREIRA et al., 2010).

**Figura 3.** Espectro de absorção de três diferentes tipos de FS. (Bayona et al., 2017)



Apesar de apresentar uma maior absorção, e estar dentro da janela terapêutica para a terapia fotodinâmica, essa clorina não possui boa solubilidade, o que prejudica sua utilização em TFD (MOREIRA ET AL, 2010). Devido a isso, foi sintetizada a bactericlorina com o grupo trisma, o qual apresenta três hidroxilas (-OH), a fim de melhorar a solubilidade do mesmo, tornando-o mais anfifílico a fim de melhorar o desempenho fotodinâmico.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

O presente trabalho teve como objetivo avaliar, em experimentos *in vitro*, a ação fotodinâmica da bacterioclorina – trisma como fotossensibilizador em linhagem de células tumorais de câncer de mama e fibroblasto.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Estabelecer parâmetros experimentais, como dose de luz; concentração do FS e tempo de incubação, para estabelecer protocolos para a inativação de células tumorais da linhagem de câncer de mama MCF-7 e comparar com a linhagem de fibroblasto HFF-1.
- Verificar a colocalização do fotossensibilizador nas células através de marcadores de núcleo, mitocôndria, lisossomo e retículo endoplasmático; e utilização de imagens no microscópio confocal, ou seja, verificar em qual estrutura celular esta ocorrendo a interação do fotossensibilizador, entendendo melhor como esta ocorrendo a inativação das células tumorais.
- Identificar o tipo de morte celular através de ensaios feito com a citometria de fluxo.

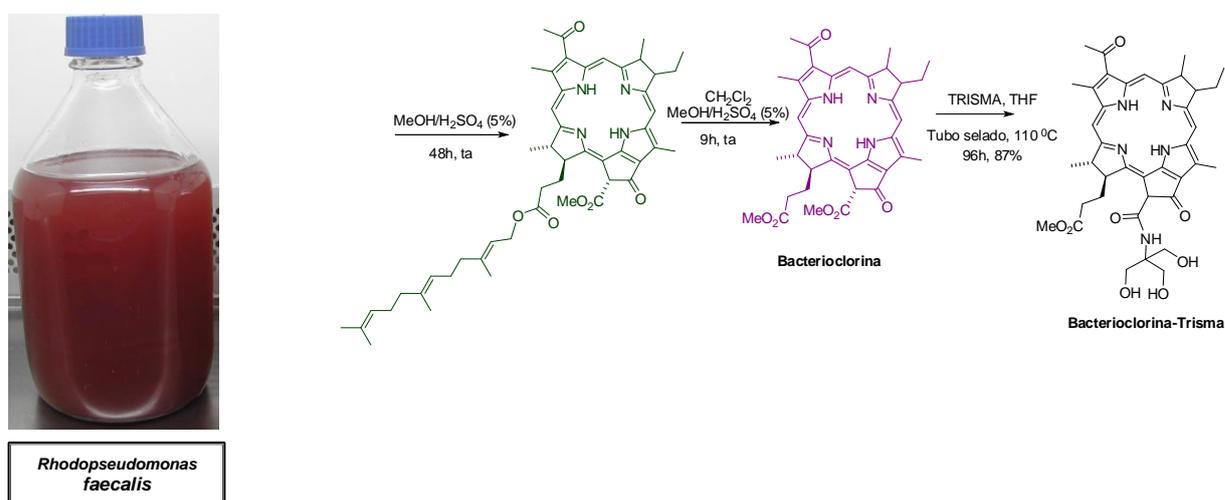


## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Bacterioclorina - Trisma

Neste trabalho foi utilizado como FS, a bacterioclorina-trisma obtida no laboratório de Química Orgânica da Universidade Federal de São Carlos. Para sua obtenção, foi inicialmente realizada a extração do pigmento bacterioclorofila da bactéria purpura não sulfurosa *Rhodopseudomonas faecalis*, que foi cultivada no Laboratório de Microbiologia e Parasitologia, com uma solução de metanol/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5% sob atmosfera de argônio a fim de evitar possível oxidação, posteriormente adicionada o Trisma<sup>®</sup> através de uma transesterificação (**Figura 6**). O grupo Trisma<sup>®</sup> foi adicionado para melhor a solubilidade da bacterioclorina, deixando a molécula mais anfifílica. A bacterioclorina – Trisma foi purificada em coluna cromatográfica e identificada por ressonância magnética nuclear (RMN), após a amostra foi fracionada em tubos contendo 0,5mg para facilitar a sua utilização. As amostras foram armazenadas em microtubos de 1 ml, acondicionados no *freezer*, em temperatura de aproximadamente – 18<sup>o</sup> C, e protegidos da luz.

**Figura 5.** Etapas da obtenção da bacterioclorina-Trisma. Fonte: Elaborada pela autora.



### 4.2 Linhagens e cultivo de células

Foi utilizada uma linhagem de célula tumoral e uma linhagem de célula sadia, câncer de mama MCF-7 e fibroblasto HFF-1, respectivamente as linhagens foram fornecidas pela colaboradora Dr. Natalia Mayumi Inada, do Instituto de Física da Universidade de São Paulo, em São Carlos.

As células encontravam-se em frascos de cultura celular, com meio de cultivo para sua manutenção, constituído de meio *Dulbecco's Modified Eagle's medium* - DMEM (Sigma – Aldrich) com vermelho fenol para as linhagens HFF-1 e MCF-7, ambos os meios suplementados com 10% de soro fetal bovino (SFB LGC Biotecnologia) e 1% de solução de antibióticos (Penicilina 10 Unidades/ml e Estreptomicina 10µg/ml, Gibco). Os frascos foram mantidos em estufa incubadora umidificada a 37<sup>o</sup>C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

Para a realização do experimento, aproximadamente 24 horas antes, as células foram desagregadas da garrafa de cultivo com tripsina 1% (*Trypsin* – EDTA 0,5% , Gibco) e a suspensão foi centrifugada por 5 minutos a 1500 rotações por minuto (R. P. M.) para que o conteúdo celular decantasse e formasse um *pellet*. Em seguida, o sobrenadante foi descartado, e o *pellet* foi ressuscitado em um volume conhecido para a realização da contagem de células na câmara de *Neubauer* com azul de tripan. Em um microtubo de 1,5 ml foi adicionado 100µL de azul de tripan 0,4% (Gibco) e 100µL da suspensão celular, que já se encontrava devidamente homogeneizada, gerando uma diluição de 1:2. Após a homogeneização, 10µL da suspensão celular foi adicionado na câmara de *Neubauer*, e as células viáveis, ou seja, aquelas que permaneciam sem coloração, pois o corante só marca as células cuja a membrana foi danificada, foram contadas em cada um dos quatro quadrantes laterais, com auxílio do microscópio óptico.

Após o término da contagem de células viáveis, o número de célula por mililitro (ml) da suspensão original, foi determinado pela seguinte equação:

$$\frac{N^{\circ} \text{ de célula}}{\text{ml}} = \frac{n^{\circ} \text{ de células contadas}}{n^{\circ} \text{ de quadrantes contados}} \times 10^4 \times \text{diluição} \quad [ 1 ]$$

A cada teste, foram utilizadas placas de 24 poços e inoculados 400µL (contendo 10<sup>5</sup> de células por ml) de suspensão celular por poço. Então, preparou-se 9.600 µl de suspensão celular para cada placa a ser utilizada, contendo 10<sup>5</sup> células por ml. Esta suspensão foi preparada com meio DMEM, suplementado com 10% de soro fetal bovino. As placas foram mantidas em estufa por 24 horas, a 37°C e CO<sub>2</sub> 5% para ocorrer a aderência das células nas placas. Todos os procedimentos envolvendo células, com exceção da contagem na câmara de *Neubauer* no microscópio óptico e o tratamento fotodinâmico realizado no equipamento *Biotable*, foram realizados assepticamente em cabine de segurança biológica, e todos os materiais utilizados e meio eram esterilizados.

### **4.3 Terapia Fotodinâmica (TFD)**

Duas placas contendo células foram preparadas de acordo com o procedimento descrito no item 4.2. Após 24 horas de incubação, o meio de cultura foi removido cuidadosamente e os poços foram lavados com solução tampão salino fosfato (PBS) duas vezes, pois o vermelho fenol contido no meio de cultura DMEM pode interferir na passagem de luz, resultando em um resultado falso positivo/negativo.

Para preparo da solução estoque do FS, 0,5mg de bacterioclorina - trisma foi dissolvido em 500µL de DMSO, obtendo uma concentração inicial de 1402 µM. As concentrações do fotossensibilizador utilizadas foram 0,01µM; 0,1µM; 0,5µM; 1µM; 2,5µM; 5µM e 10µM. Para atingir as concentrações que foram utilizadas, a solução inicial do FS, que já estava diluída em DMSO, foi diluída novamente em meio incompleto DMEM sem vermelho fenol (Gibco), pois o fotossensibilizador tem uma coloração, o que pode interferir nos resultados, quando utilizado o meio DMEM com vermelho de fenol. Para as sete diferentes concentrações do FS utilizadas, foram plaqueadas em triplicatas 200µL de cada concentração de bacterioclorina - trisma. Como controles foram utilizados o meio DMEM sem vermelho de fenol e meio com a maior concentração de DMSO obtida nas diluições do FS.

Após a adição da bacterioclorina - trisma, as duas placas foram incubadas por 30 minutos, tempo necessário para a absorção do fotossensibilizador nas células, em estufa a 37°C e atmosfera de CO<sub>2</sub> a 5%. Para encontrar o tempo necessário de incubação, realizaram-se testes pilotos com o tempo de 15, 30 e 60 minutos, e verificou-se que com 30 minutos de incubação ocorreu uma boa absorção do FS em ambas as linhagens celulares.

Após este período inicial de incubação, retirou-se o FS, lavou-se com solução de PBS e adicionou-se 500µl de meio DMEM sem vermelho fenol. Uma das placas foi mantida no escuro pelo mesmo tempo de irradiação da placa iluminada, para determinação da toxicidade no escuro (*dark toxicity*) e a outra placa foi irradiada conforme descrito no item 4.4. Todos os experimentos foram realizados em três experimentos independentes.

### **4.4 Fonte de Luz**

Para irradiar as amostras foi utilizado um equipamento com fonte de luz infravermelha (MMOptics Ltda, São Carlos – SP), a base de lâmpadas *Light Emitting*

Diode (LEDs) de 780nm, denominado Biotable (**Figura 7**) e operando a  $20 \text{ mW cm}^{-2}$ . O uso desse equipamento permite irradiar todos os poços de forma homogênea para realização dos experimentos de inativação fotodinâmica. Foram utilizadas as doses de 2, 7 e  $15 \text{ J cm}^{-2}$ .

**Figura 6.** Biotable a base de LED's de 780 nm. Fonte: Elaborada pela autora.



Após o tempo de irradiação, retirou-se o meio DMEM sem vermelho fenol, adicionou-se  $500 \mu\text{L}$  de meio DMEM com vermelho fenol completo e incubou-se por 24 horas em estufa a  $37^\circ\text{C}$  e atmosfera de  $\text{CO}_2$  5%. O mesmo procedimento foi realizado com a placa que foi mantida no escuro.

#### **4.5 Determinação da Citotoxicidade por teste de MTT**

Para determinar o efeito da bacterioclorina-trisma e da TFD sobre a viabilidade celular, após as 24 horas de incubação posterior aos tratamentos, o meio foi removido cuidadosamente, os poços foram lavados com PBS, em seguida foi adicionado  $200 \mu\text{L}$  em cada poço da solução de MTT ((3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide –  $0,5 \text{ mg/ml}$  – Sigma Aldrich), a solução foi preparada com  $5 \text{ mg}$  de MTT, 80% de meio DMEM sem vermelho fenol e soro fetal bovino e 20% de PBS . Ambas a placas foram mantidas em incubadora de  $\text{CO}_2$  com temperatura de  $37^\circ\text{C}$  por 4 horas. Decorrido este período foi retirado o meio e adicionado  $200 \mu\text{l}$  de DMSO para dissolução dos cristais de formazan formado. As soluções formadas foram transferida para placas de 96 poços e as absorbâncias de cada poço foram então medidas em  $550 \text{ nm}$  pelo leitor de microplaca (Microplate Reader, modelo TP- Reader NM).

Para o cálculo da viabilidade celular, foi considerado como 100% de viabilidade os valores de absorvância fornecidos pelos poços que as células foram cultivadas somente com o meio de cultura.

#### **4.6 Microscopia Confocal**

Para avaliar o tempo de absorção da bacterioclorina-trisma nas células, utilizou-se a técnica de microscopia eletrônica, que avaliou o tempo de incubação e a penetração do FS nas linhagens celulares. Utilizou-se o microscópio confocal de fluorescência Zeiss (modelo LSM 780 invertido) com excitação por um fotón (LASER Diodo 405 nm). Esse aparelho é equipado com detectores GaAsP de alta sensibilidade para imagem espectral (400-700 nm).

Utilizou-se a técnica de microscopia confocal para caracterizar a localização celular do fotossensibilizador utilizado. Comparou-se a emissão resultante de uma cultura de células vivas incubadas com o fotossensibilizador e um marcador fluorescente padrão do núcleo e das organelas mitocôndria, lisossomo ou retículo endoplasmático. DAPI (4',6 - diamidino diamidino diamidino-2- fenil-indol; Molecular Probes) foi utilizado como marcador do núcleo, MitoTracker Green (Invitrogen) utilizado como marcador mitocondrial, LysoTracker Red (Molecular Probes) como marcador de lisossomo e ER-Tracker Green (Molecular Probes) como marcador de retículo endoplasmático. Imagens confocais foram obtidas no microscópio Zeiss (modelo LSM 780 invertido) com excitação por um fotón (LASER Diodo 405, 488 e 514 nm). Para a coleta das imagens, plaqueou-se  $10^4$  células/ml em microplacas com lamínula de vidro fixa ao fundo, incubou-se por 24 horas em estufa a 37° e CO<sub>2</sub> 5%. Após a incubação, retirou-se o meio e adicionou-se 10µl do marcador e incubou-se por 15 minutos conforme orientação do fornecedor, em seguida retirou-se o marcador e adicionou-se o fotossensibilizador, incubando por 30 minutos. Retirou-se o fotossensibilizador, realizou a lavagem das células com solução de PBS e adicionou-se meio DMEM completo para a realização da captura das imagens em microscópio confocal de fluorescência Zeiss (modelo LSM 780 invertido). Cada marcador e a bacterioclorina - trisma foram excitados nos seus respectivos comprimento de onda excitação e a fluorescência adquirida na faixa de emissão, conforme ilustra a tabela 2.

**Tabela2.** Marcadores e fotossensibilizador utilizados nas células e seus respectivos comprimentos de excitação e emissão.

<b>Marcador/FS</b>	<b>Excitação</b>	<b>Emissão</b>
<b>DAPI</b>	<b>405 nm</b>	<b>410-508 nm</b>
<b>MitoTracker</b>	<b>488 nm</b>	<b>496-614 nm</b>
<b>LysoTracker</b>	<b>405 nm</b>	<b>410-543 nm</b>
<b>ER-Tracker</b>	<b>514 nm</b>	<b>521-598 nm</b>
<b>Bactericlorina – trisma</b>	<b>405 nm</b>	<b>615-700 nm</b>

Para a análise de colocação dos marcadores entre as moléculas foi realizado o cálculo do coeficiente de correlação, como o coeficiente de Pearson e o coeficiente de Mander, utilizando o software Image J (Bolte, et al 2006).

#### **4.7.1 Coeficiente de Pearson**

O coeficiente de Person calcula o grau da correlação linear entre duas variáveis quantitativas. É um índice adimensional com valores situados ente -1,0 e 1,0, que reflete a intensidade de uma relação linear entre dois conjuntos de dados, sendo -1,0 considerado correlação ausente e 1,0 considerado excelente correlação. Esse coeficiente é medido como a porcentagem de sobreposição de pixel, de acordo com a equação 2.

$$CP = \frac{\sum_i (R_i - \bar{R}) \times (G_i - \bar{G})}{\sqrt{\sum_i (R_i - \bar{R})^2 \times (G_i - \bar{G})^2}} \quad [2]$$

$R_i$  e  $G_i$  representam o valor da intensidade no pixel “i”, e  $R$  e  $G$  representam a intensidade média nos respectivos canais. Esse teste mostra se há uma relação linear entre as intensidades dos respectivos canais em cada pixel da imagem, indicando a colocação de dois fluoróforos (MALGDAY, et al 1986).

#### **4.7.2 Coeficiente de Mander**

O coeficiente de Mander também mede a correlação entre duas variáveis, porém os valores médios de intensidade não são empregados no cálculo. São calculados dois coeficientes,  $M_1$  e  $M_2$ , conforme equação 3. Neste cálculo o valor zero também se refere a uma correlação negativa, enquanto que o valor 1 se refere a uma correlação positiva.

$$M_1 = \frac{\sum_i R_i, co-localizado}{\sum_i R_i}, e M_2 = \frac{\sum_i G_i, co-localizado}{\sum_i G_i} \quad [3]$$

#### 4.8 Determinação da morte celular por citometria de fluxo

Os experimentos para a análise de morte celular foram realizados em citômetro de fluxo FACS FACSCalibur equipado com laser de argônio e software C6 CellQuest (Becton Dickinson). Para cada amostra foram adquiridos 10.000 eventos de dois experimentos independentes.

As células apoptóticas foram identificadas através da marcação da Anexina V que atua como indicativo de apoptose inicial e incorporação do iodeto de propídio como indicativo de apoptose inicial, apoptose tardia e necrose utilizando-se o kit comercial (FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit, BD, Biosciences). A Anexina V é uma proteína que possui uma alta afinidade por fosfatidilserina, então quando adicionada ao meio extracelular tende a se ligar a esse lipídeo tornando-se possível a identificação das células em processo de apoptose. Já o iodeto de propídio, é um marcador fluorescente de morte celular capaz de se ligar ao DNA. Por ser um composto pouco lipossolúvel, o iodeto de propídio só é capaz de atravessar a membrana citoplasmática quando a mesma está danificada, ou seja, com o processo de morte por necrose iniciado. O procedimento de marcação foi realizado conforme as instruções do fornecedor, resumidamente:

As células ( $1 \times 10^5$  /poço) foram plaqueadas em placas de 24 poços e incubadas por 24 horas. Em seguida foram tratadas com diferentes concentrações (0,1 $\mu$ M e 0,5 $\mu$ M) do fotossensibilizador, exceto os controles, a fim de conseguir visualizar a apoptose ainda em fase inicial em doses de luz de 7 J cm<sup>-2</sup>. Logo após, as placas foram centrifugadas durante 5 minutos a 1200 RPM para a retirada da suspensão, em seguida células foram lavadas com solução de PBS e centrifugadas novamente a 1200 RPM por 5 minutos. Após a centrifugação, retirou-se a solução de PBS e adicionou-se 200 $\mu$ l de solução tampão de ligação, 5  $\mu$ L de PE-Anexina V e 5 $\mu$ l iodeto de propídio por poço e incubou-se em temperatura ambiente e ao abrigo da luz por 15 min. Em seguida as células foram centrifugadas novamente, removeu-se o sobrenadante e foram recolhidas com um *cell scrapper* e ressuspendidas em 500  $\mu$ L de tampão de ligação 1x. As amostras foram analisadas num citômetro BD Accuri C6 e a fluorescência quantificada através do software CSampler.

Como controles experimentais, foram preparadas amostras não marcadas com anexina - FITC/PI, amostras marcadas apenas com anexina – FITC e amostras marcadas

apenas com PI. Estas análises foram consideradas de um mínimo de 10.000 eventos adquiridos em dois experimentos independentes. Esses experimentos foram realizados no Laboratório de Biologia Molecular da UFSCar de responsabilidade da professora Dra. Heloisa S. Selistre de Araújo.

#### **4.9 Análise Estatística**

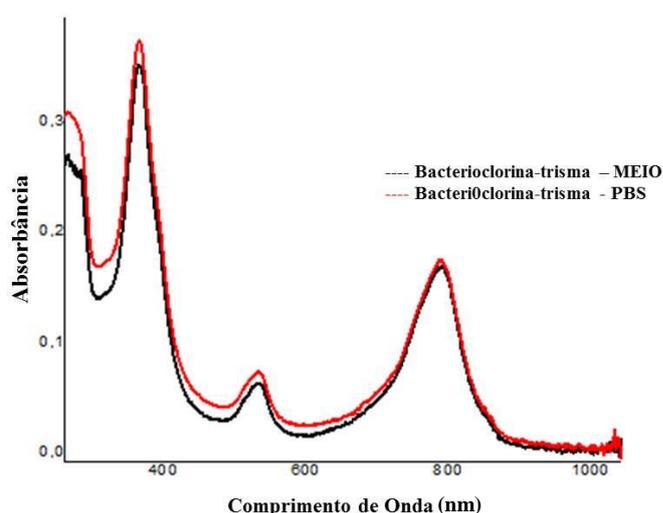
Os resultados obtidos foram submetidos a análise estatística com o software OriginPro 9.1, estabelecendo um valor mínimo de  $p < 0,05$  (nível de significância) e grau de confiança em torno de 95%. Todos os dados foram analisados e passaram no teste de normalidade. A comparação entre os grupos experimentais foi realizada pela análise de variância (ANOVA) e a comparação entre as medias pelo de Tukey.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Como desejamos avaliar a inativação de células tumorais com TFD, foram inicialmente realizados ensaios com as células de câncer de mama MCF-7 e fibroblasto HFF-1 para avaliar os efeitos citotóxicos do fotossensibilizador bacterioclorina- trisma, bem como avaliar sua atividade fotodinâmica em diferentes condições.

Diferentemente de outros fotossensibilizadores, a bacterioclorina-trisma possui um comprimento de onda maior (Figura 7), que faz com que sua absorção na pele seja ainda mais eficiente.

**Figura 7.** Espectro de absorção da Bacterioclorina-trisma a 10 $\mu$ M em meio DMEM e PBS. Fonte: Elaborada pela autora.

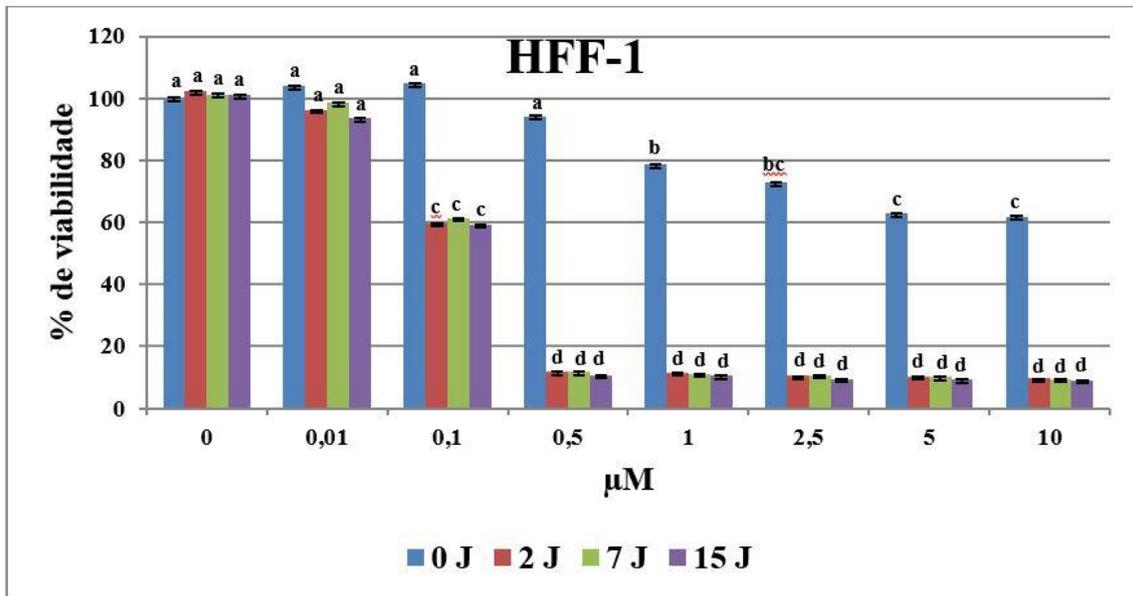


Para ser um bom fotossensibilizador, o mesmo não deve apresentar toxicidade no escuro, deve apenas causar danos às células quando irradiado com uma luz em comprimento de onda específico, pois assim preserva as células saudáveis. Para isso, foram realizados testes no escuro com o fotossensibilizador bacterioclorina-trisma, além da avaliação de diferentes concentrações de FS (0,01 $\mu$ M; 0,1 $\mu$ M; 0,5 $\mu$ M; 1,0 $\mu$ M; 2,5 $\mu$ M; 5 $\mu$ M e 10 $\mu$ M) com diferentes doses de luz de 2, 7 e 15 J cm<sup>-2</sup>, podendo avaliar a eficiência da TFD como representado nas Figuras 8 e 9. As placas que foram irradiadas apresentaram uma maior taxa de morte celular nas linhagens HFF-1 e MCF-7 em quase todas as concentrações, com exceção das concentrações 0,1 $\mu$ M que apresentou uma taxa de morte celular em torno de 40% e 0,01 $\mu$ M que não apresentou morte celular com diferença significativa em relação aos controles de meio de cultura e somente irradiadas ( $p < 0,05$ ).

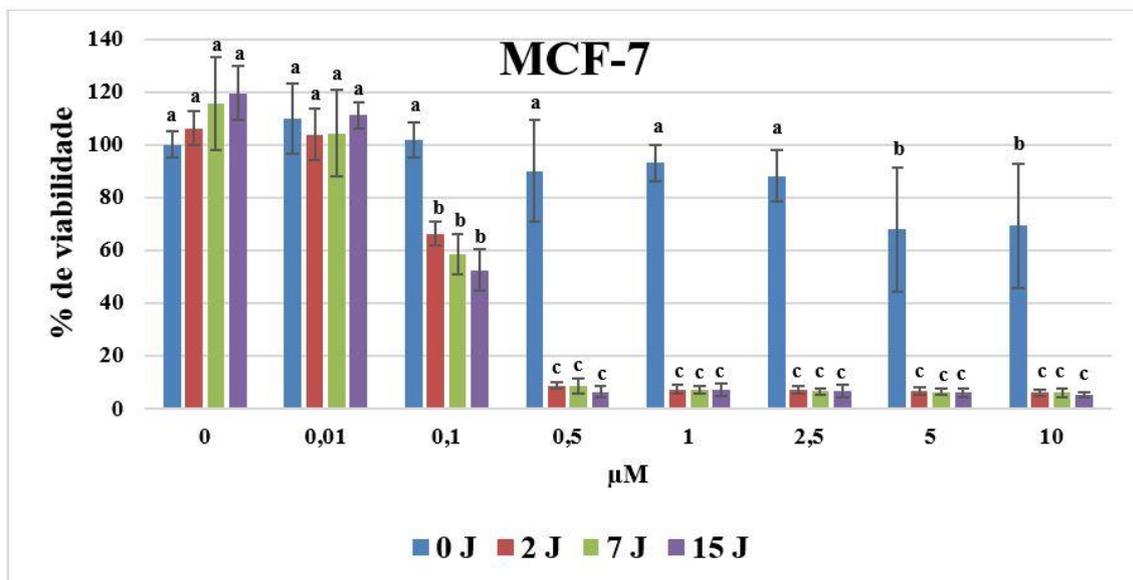
Com relação as placas que permaneceram protegidas da luz, ou seja, que não foram irradiadas, as células de mama e os fibroblastos não apresentaram diferença significativa de citotoxicidade ( $p < 0,05$ ) no escuro em doses até  $2,5\mu\text{M}$  do fotossensibilizador para células tumoral e até  $0,5\mu\text{M}$  para fibroblasto, , diferentemente das doses mais altas, que em ambas as células apresentaram citotoxicidade no escuro, diminuindo para 60% a viabilidade celular, conforme ilustra os figura 7 (HFF-1) e 8 (MCF-7).

Os resultados demonstraram que a viabilidade das células de linhagem MCF-7 foram inibidas, e essa inibição ocorreu por conta da concentração utilizada do fotossensibilizador e da dose de luz irradiada. Como pode ser observado na Figura 8, nas concentrações de  $10\mu\text{M}$ ;  $5\mu\text{M}$ ;  $2,5\mu\text{M}$ ;  $1,0\mu\text{M}$ ;  $0,5\mu\text{M}$  quando foram irradiadas com doses de luz 15, 7 e 2 J/cm, ocasionou uma redução em torno de 90% da viabilidade das células MCF-7, ou seja, ocorreu uma alta mortalidade celular com a maioria das concentrações do FS utilizadas. Resultados que demonstram que as doses de luz utilizados no presente estudo não interferiu significativamente na taxa de morte celular ( $p > 0,05$ ).

**Figura 8.** Viabilidade celular de fibroblasto (linhagem HFF-1) após incubação de 30 minutos com seis diferentes concentrações de bacterioclorina-trisma e dose de luz 2, 7 e 15 J cm<sup>-2</sup>. Letras diferentes representa diferença significativa (p<0,05).



**Figura 9.** Viabilidade celular de câncer de mama (linhagem MCF-7) após incubação com seis diferentes concentrações de bacterioclorina-trisma e dose de luz 2, 7 e 15 J cm<sup>-2</sup>. Letras diferentes representa diferença significativa (p<0,05).



Os testes de TFD frente à linhagem de células de fibroblastos HFF-1, também apresentou toxicidade considerável, o que não é desejável, uma vez que são células não tumorais. No entanto, as vantagens de utilizar a TFD, é que ocorreu uma baixa toxicidade no escuro e que após a administração do FS, ele possivelmente irá se

concentrar nas células tumorais e com isso, podem-se preservar as células saudáveis, além disso, pode-se aplicar a luz para a realização de TFD em uma área específica (no tumor por exemplo), preservando as células não tumorais.

Estudos feitos por MROZ, et al., (2010), utilizando bacterioclorinas (0,5 $\mu$ M) em câncer de pele, combinados com 730 nm de luz infravermelho mostrou-se uma maior taxa de morte celular em torno de 70% de melanoma pigmentado e não pigmentado, comparando com resultados do fotossensibilizador comercial que absorve na região do infravermelho (635nm), o Photofrin® (6 $\mu$ M), além disso, os bacterioclorinas utilizadas por MORZ, et al., (2010) são eficazes em concentrações significativamente mais baixas, assim reduzindo alguns possíveis efeitos colaterais. Comparando com os resultados deste trabalho, a bacterioclorina-trisma mostrou-se mais eficaz em concentrações baixas para o câncer de mama, diminuindo a viabilidade celular para 10%, ou seja, ocorreu a morte celular em 90%, apresentando melhores resultados em relação aos estudos de MROZ et al., (2010).

Com este trabalho foi demonstrado que a bacterioclorina-trisma apresentou características que são importantes e fundamentais, tais como dose baixa de luz e baixa concentração do fotossensibilizador, que podem ser utilizadas no futuro para uma terapia contra o câncer.

Todos os dados revelaram que a bacterioclorina-trisma exibiu muitas das propriedades necessárias para serem consideradas como um bom fotossensibilizador para inativação fotodinâmica. Um fotossensibilizador efetivo deve ter espectros de absorção em longos comprimentos de onda, o que permite a penetração em tecidos mais profundos e diminuição de lesões inespecíficas (ZHANG et al., 2015). Por exemplo, 630 nm de luz possui uma penetração <0,5 cm, enquanto 700 nm de luz atinge uma profundidade de cerca de 0,8cm na pele (FINLAY et al., 2004). *In vitro*, após tratamento com o FS bacterioclorina-trisma na ausência de luz, houve mudança significativa na taxa de sobrevivência celular em comparação com o grupo controle, porém em doses mais altas do fotossensibilizador ocorreu uma baixa citotoxicidade no escuro em ambas as linhagens celulares. No entanto, quando irradiadas as células incubadas com a bacterioclorina-trisma no comprimento de onda 780 nm, observamos um efeito citotóxico substancial nas células alvo, o que indicou sua alta eficiência. Na terapia fotodinâmica é desejável baixa dose de luz e baixa concentração do fotossensibilizador (BRUNDISH & LOVE, 2000), coincidindo com os resultados obtidos, pois ocorreu uma alta taxa de morte celular com baixa dose de luz e baixa

concentração do fotossensibilizador, não causando citotoxicidade no escuro nessas respectivas doses.

Segundo de Oliveira e colaboradores (2015), a luz não atua apenas no processo de excitação do fotossensibilizador, mas gera uma série de benefícios para uma rápida recuperação das regiões lesionadas. De fato, as atividades citotóxicas acabam por se concentrar nas células doentes, pois o fotossensibilizador tende a se acumular em uma maior concentração nestas células.

Nos resultados da linhagem celular tumoral, observou-se uma fotoestimulação na viabilidade celular, principalmente quando irradiadas com doses de luz maiores, mas que não apresentaram diferenças significativas em relação ao controle não irradiado ( $p > 0,05$ ).

Nossos resultados foram melhores do que os obtidos em outros trabalhos que também utilizaram a TFD para o tratamento de células tumorais utilizando outros fotossensibilizadores. Hoi e colaboradores utilizaram a ftalocianina como FS e conseguiram 80% de morte celular em células MCF-7 (HOI, et al., 2012). Já após TFD com o fotossensibilizador mitoxantrone foi obtido 96% de morte nas mesmas células, em condições diferentes de doses de luz e fotossensibilizador, utilizou-se dose de luz de  $30 \text{ J cm}^{-2}$  e  $250 \mu\text{M}$  do fotossensibilizador, porém o controle não irradiado, também apresentou diminuição na viabilidade celular, em torno de 60%, demonstrando que o fotossensibilizador apresentou uma alta taxa de toxicidade no escuro, o que não é desejável para a prática de terapia fotodinâmica (ALLISON; SIBATA, 2010; AGOSTINIS et al., 2011; MONTAZERABADI et al., 2012). Com a bacterioclorina-trisma, obtivemos mais de 80% de morte nas células, e toxicidade no escuro somente em altas concentrações do fotossensibilizador.

A bacterioclorina-trisma apresentou resultados eficientes, quando comparado com Hamblin (2010) e Zhang (2015). Hamblin e colaboradores (2010) utilizando o fotossensibilizador bacterioclorina para o câncer de pele, dose de luz de  $5 \text{ J cm}^{-2}$  e  $1 \mu\text{M}$  do FS obteve uma taxa de morte de 98% e não apresentou toxicidade no escuro, porém seu tempo de incubação foi muito longo, 24 horas. Já nos trabalhos de Zhang et al., 2015, utilizando o FS bacterioclorina para o câncer de esôfago, o tempo de incubação foi de 30 minutos, não apresentou citotoxicidade no escuro, mas as doses de luz (4, 8 e  $16 \text{ J cm}^{-2}$ ) e do FS ( $6 \mu\text{M}$ ) utilizadas foram maiores e obteve morte celular em torno de 80%.

Moura et al., 2017, utilizando uma nanoemulsão de ftalocianina de cloro – alumínio ( $< 0,4\mu\text{M}$ ) como fotossensibilizador no câncer de mama, dose de luz de 6, 30 e  $60 \text{ J cm}^{-2}$ , obteve uma taxa de morte celular em torno de 40 a 60%, seu tempo de incubação foi de 15 minutos, não apresentou toxicidade no escuro e apresentou maior taxa de morte em célula tumoral.

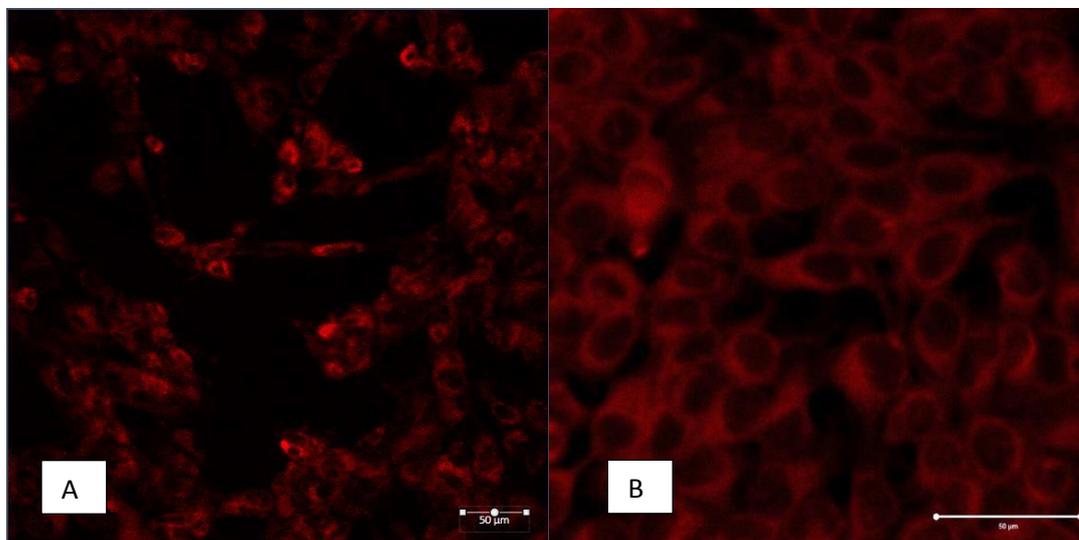
Um resultado não esperado da TFD em alguns tipos de câncer ocorre devido a utilização de fotossensibilizadores com propriedades ópticas, bioquímicas, farmacocinéticas inferiores e/ou variações do genótipo e fenótipo tumoral, o que pode influenciar positivamente a sobrevivência de células tumorais após o dano oxidativo produzido pela TFD (BROEKGAARDEN, 2015).

Para contornar a deficiência de algumas estratégias da TFD já utilizadas e que falharam no seu objetivo final de induzir a morte celular, alguns grupos de pesquisa visam melhorar ou desenvolver novas estratégias da terapia utilizando o aprimoramento dos fotossensibilizadores e abordagens da engenharia para melhorar o acesso de luz ou entrega do fotossensibilizador em regiões específicas e de difícil alcance da luz. Porém, pouca pesquisa tem sido desenvolvida sobre a biologia por trás da resistência terapêutica discutindo os mecanismos de sobrevivência que são gerados em consequência da TFD (BROEKGAARDEN, 2015).

## 5.1 Microscopia Confocal

Para se obter bons resultados de inativação das células tumorais, é importante que o fotossensibilizador tenha interação com a célula, sendo assim, foi realizado uma avaliação utilizando microscopia confocal, observando qual é o melhor tempo de incubação. Observou-se que em 30 minutos de incubação, já havia ocorrido uma interação do FS com a célula, o que pode ser visualizado pela sua coloração vermelha na **Figura 10 A e B**.

**Figura 10.** Microscopia confocal – A - Linhagem HFF-1. B - Linhagem MCF-7. Foi empregada a cor falsa vermelha para mostrar a fluorescência da Bacterioclorina-Trisma quando excitada em 402nm, indicando que o fotossensibilizador foi absorvido pelas células após 30 minutos.

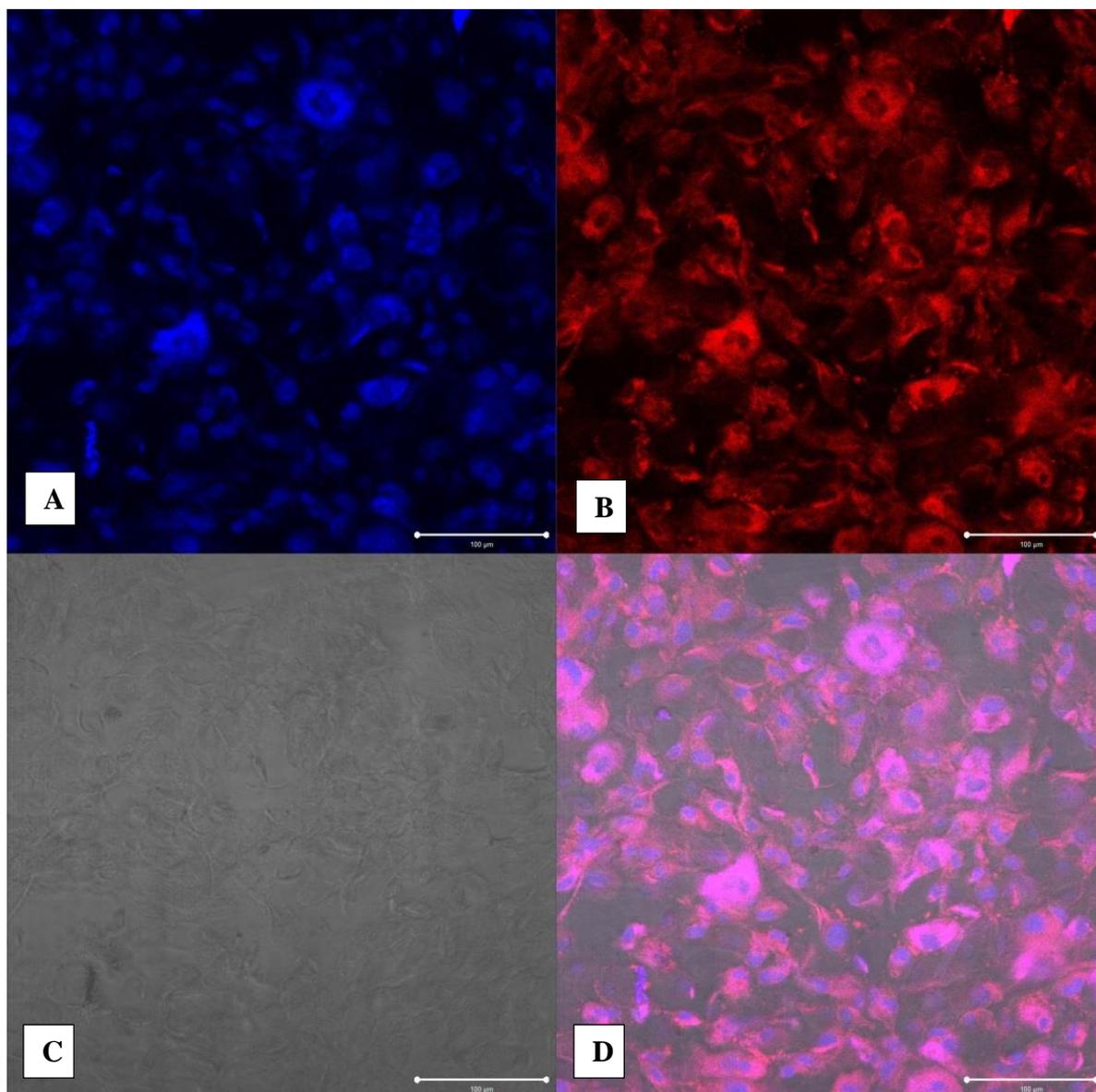


Com a técnica de microscopia confocal, é possível indentificar também a organela que tem a maior concentração do fotossensibilizador. A marcação das organelas celulares pode indicar a presença do fotossensibilizador intracelular através da fluorescência de dois fluoróforos em uma mesma organela. Para determinar a localização intracelular do fotossensibilizador em organelas envolvidas no mecanismo de morte celular, as células foram incubadas com a bacterioclorina-trisma com os marcadores de núcleo (DAPI), de mitocôndria (MitoTracker), de lisossomo (LysoTracker Red) e de retículo endoplasmático (ER-Tracker Green).

As imagens de fluorescência que foram obtidas após a marcação das organelas celulares da linhagem HFF-1 e MCF-7 são apresentadas, respectivamente nas figuras 12 a 19. Utilizou-se as cores falsas azul, para marcação de núcleo e lisossomo, a cor verde para marcar mitocôndria e retículo endoplasmático e a vermelha para a bacterioclorina – trisma.

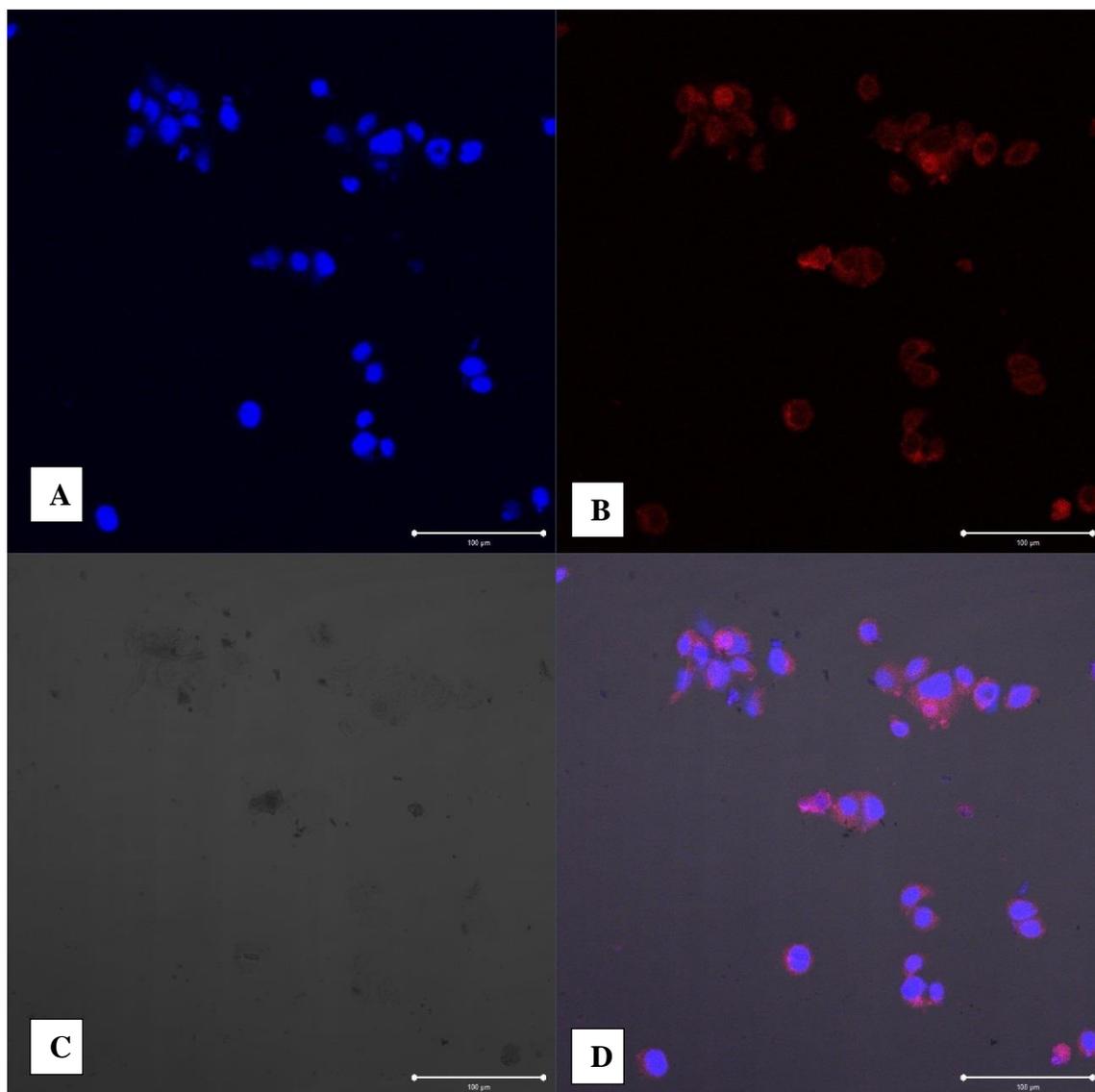
**Figura 12.** Marcação do núcleo celular da linhagem HFF-1. A) Fluorescência do núcleo, B) Fluorescência da bacterioclorina-trisma, C) Imagem de transmissão, D) Fluorescência sobreposta.

Fonte: Elaborada pela autora.



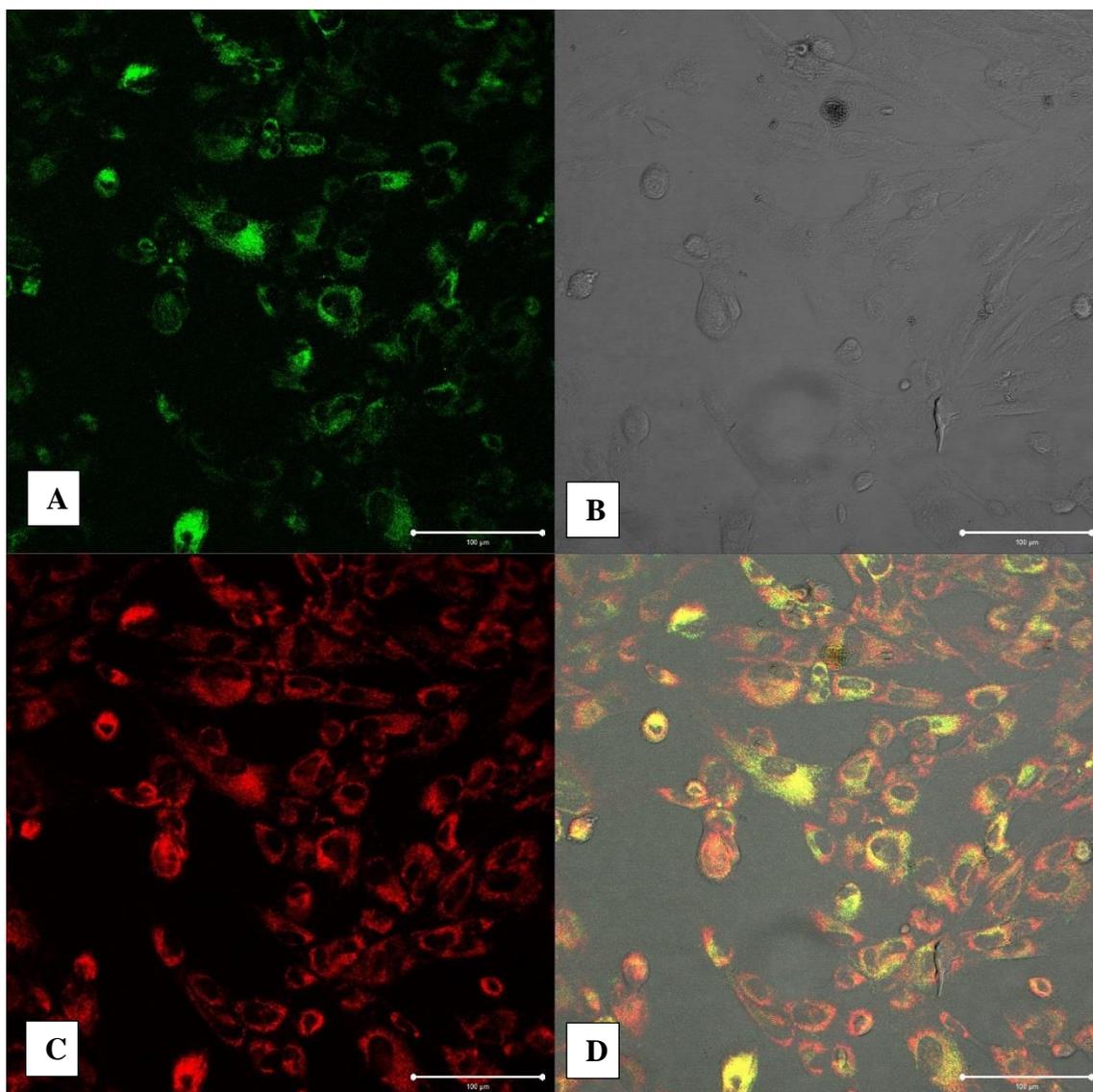
**Figura 13.** Marcação do núcleo celular da linhagem MCF-7. A) Fluorescência do núcleo, B) Fluorescência da bacterioclorina-trisma, C) Imagem de transmissão, D) Fluorescência sobreposta.

Fonte: Elaborada pela autora.



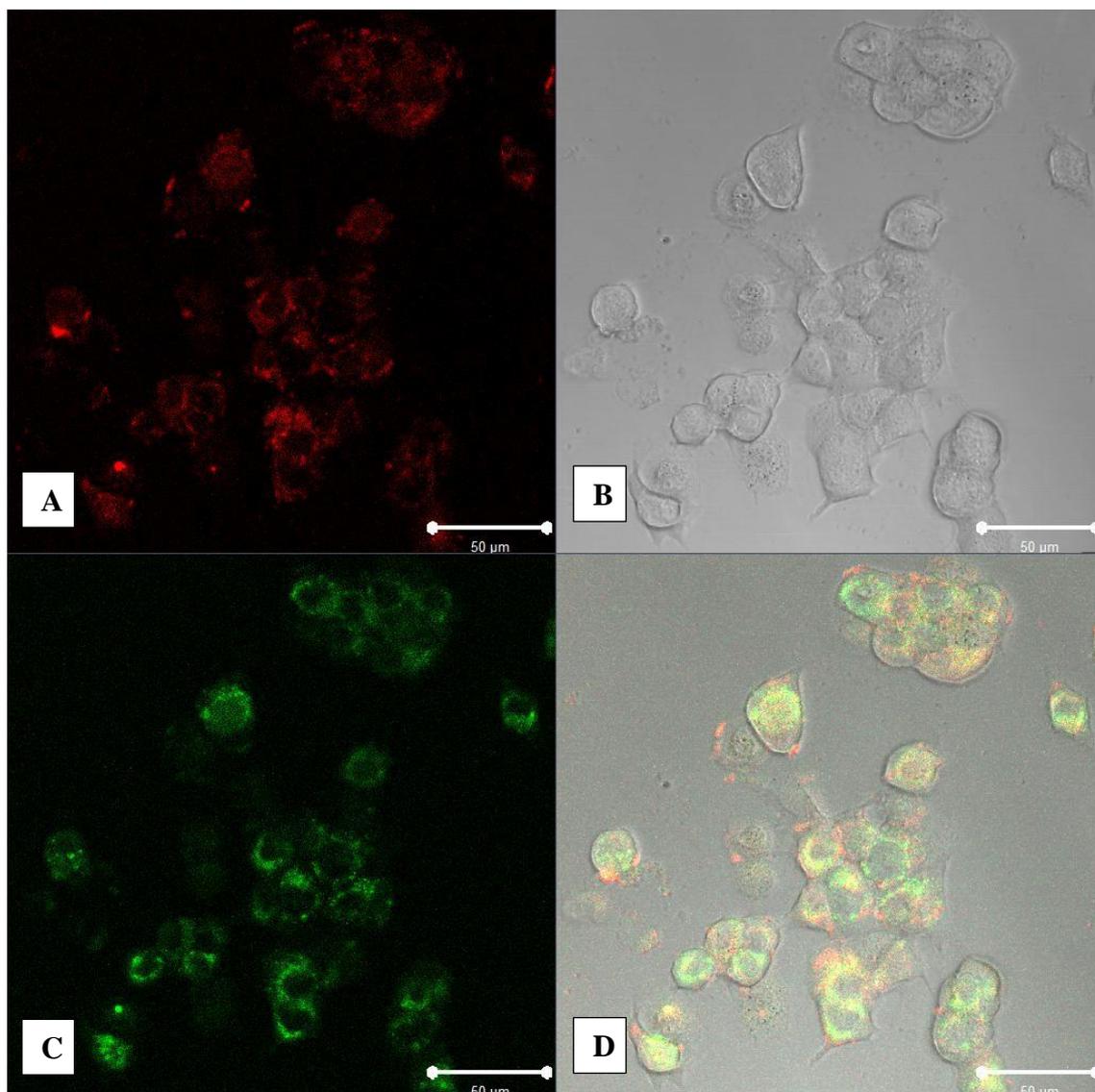
**Figura 14.** Marcação do mitocôndria celular da linhagem HFF-1. A) Fluorescência da mitocôndria, B) Imagem de transmissão, C) Fluorescência da bacterioclorina-trisma, D) Fluorescência sobreposta.

Fonte: Elaborada pela autora.



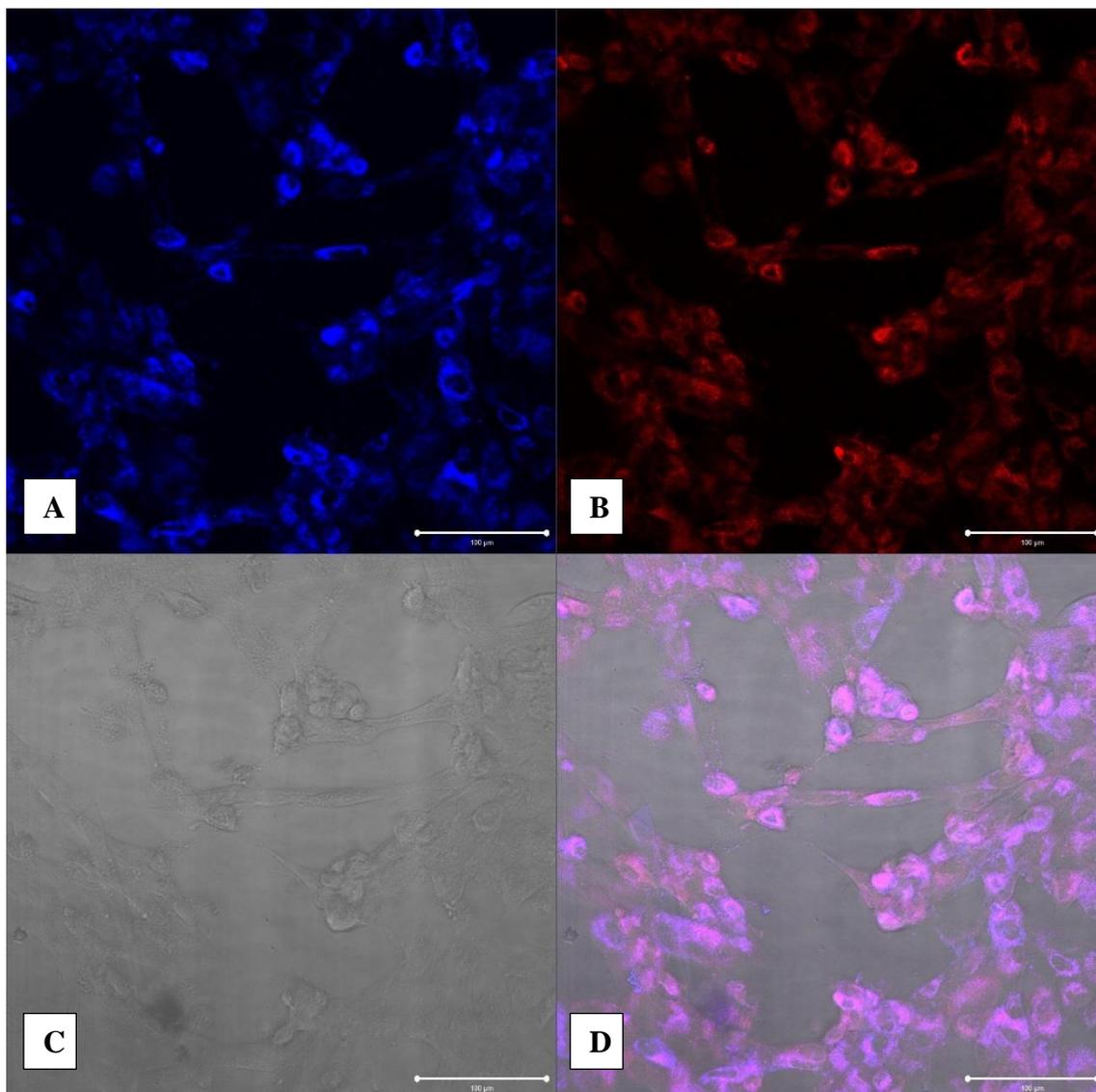
**Figura 15.** Marcação da mitocôndria celular da linhagem MCF-7. A) Fluorescência da bacterioclorina-trisma, B) Fluorescência do lisossomo, C) Imagem de transmissão, D) Fluorescência sobreposta.

Fonte: Elaborada pela autora.



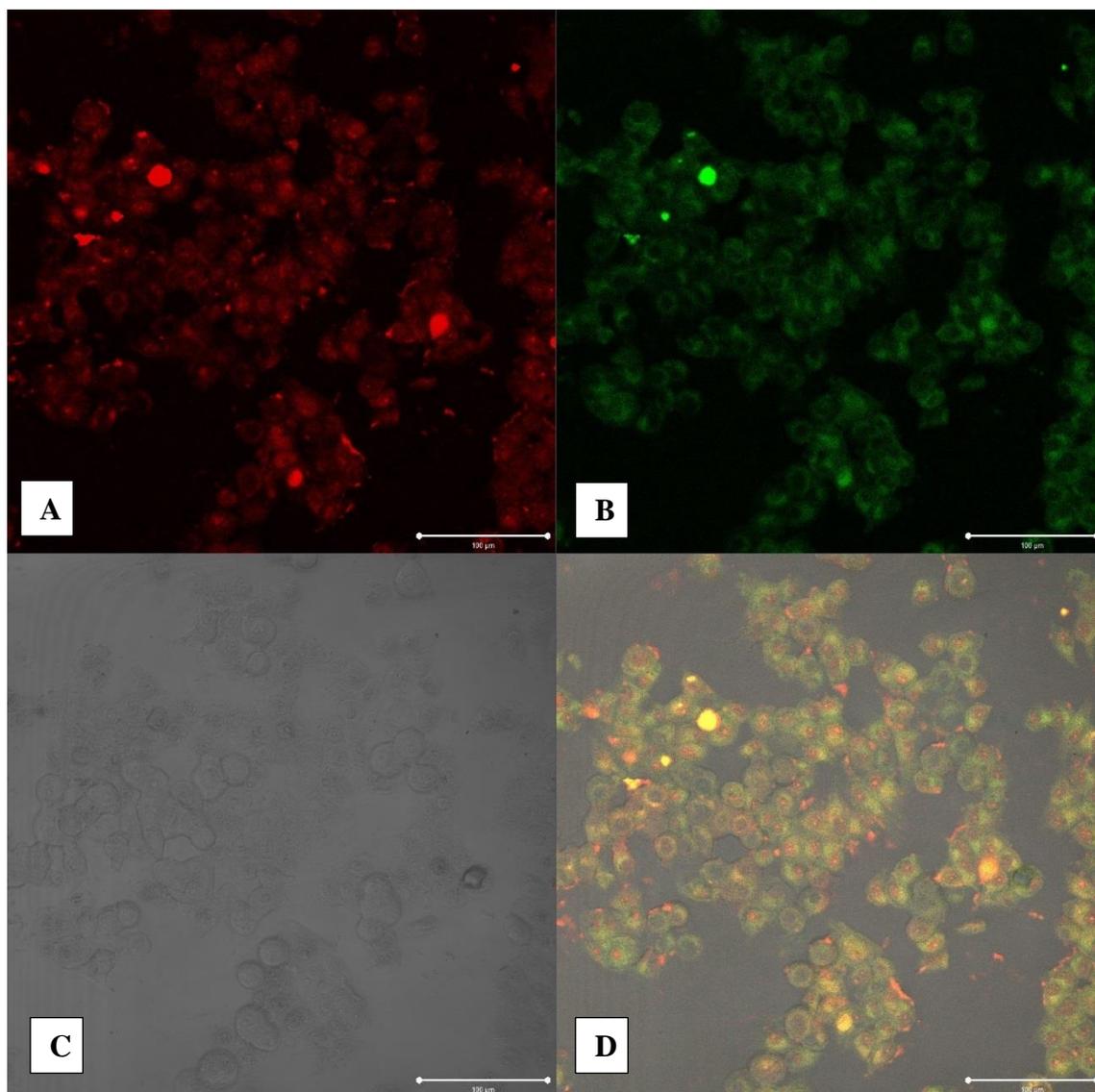
**Figura 16.** Marcação do lisossomo celular da linhagem HFF-1. A) Fluorescência do lisossomo, B) Fluorescência da bacterioclorina-trisma, C) Imagem de transmissão, D) Fluorescência sobreposta.

Fonte: Elaborada pela autora.



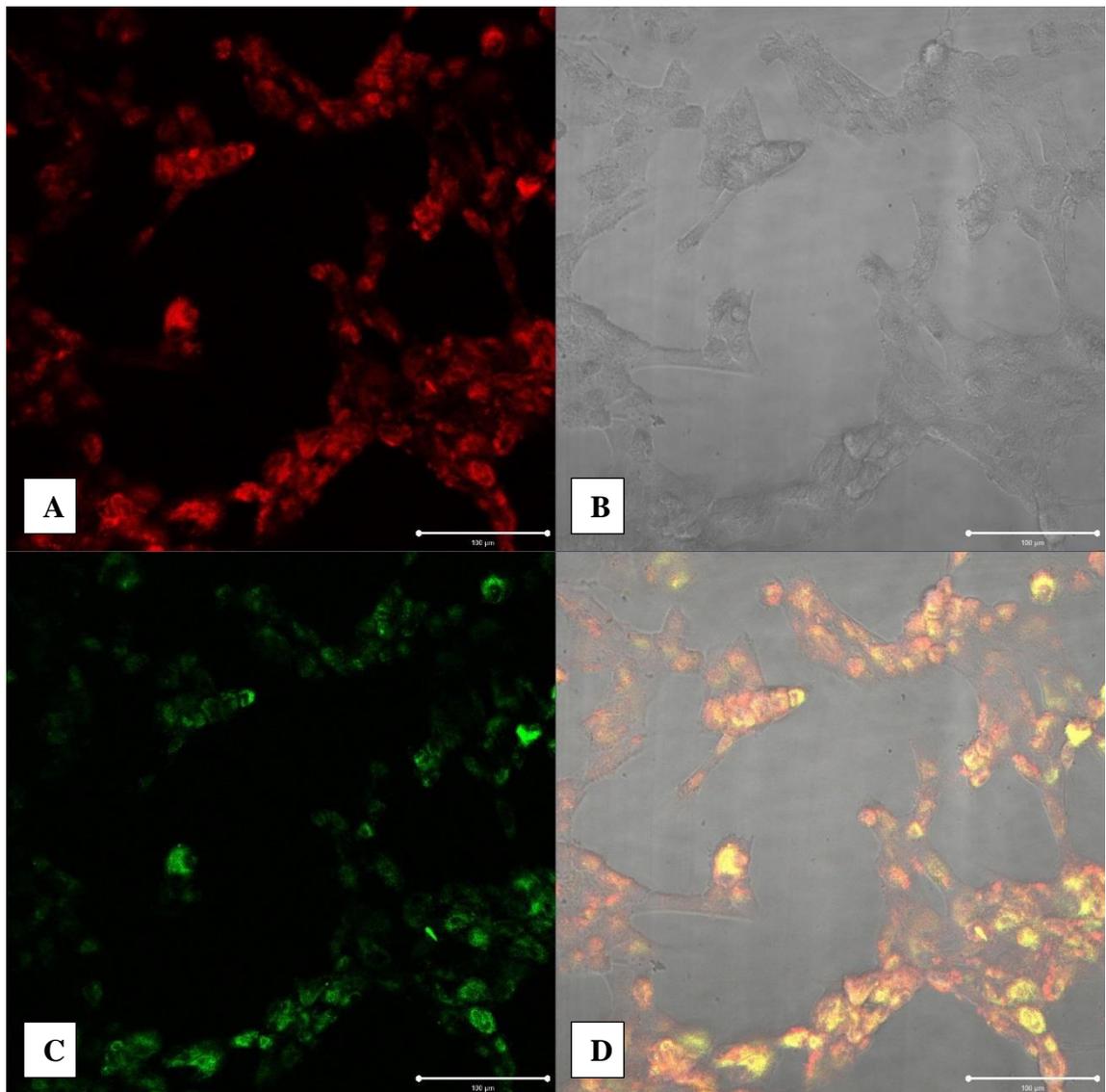
**Figura 17.** Marcação do lisossomo celular da linhagem MCF-7. A) Fluorescência da bacterioclorina-trisma, B) Fluorescência do lisossomo, C) Imagem de transmissão, D) Fluorescência sobreposta.

Fonte: Elaborada pela autora.



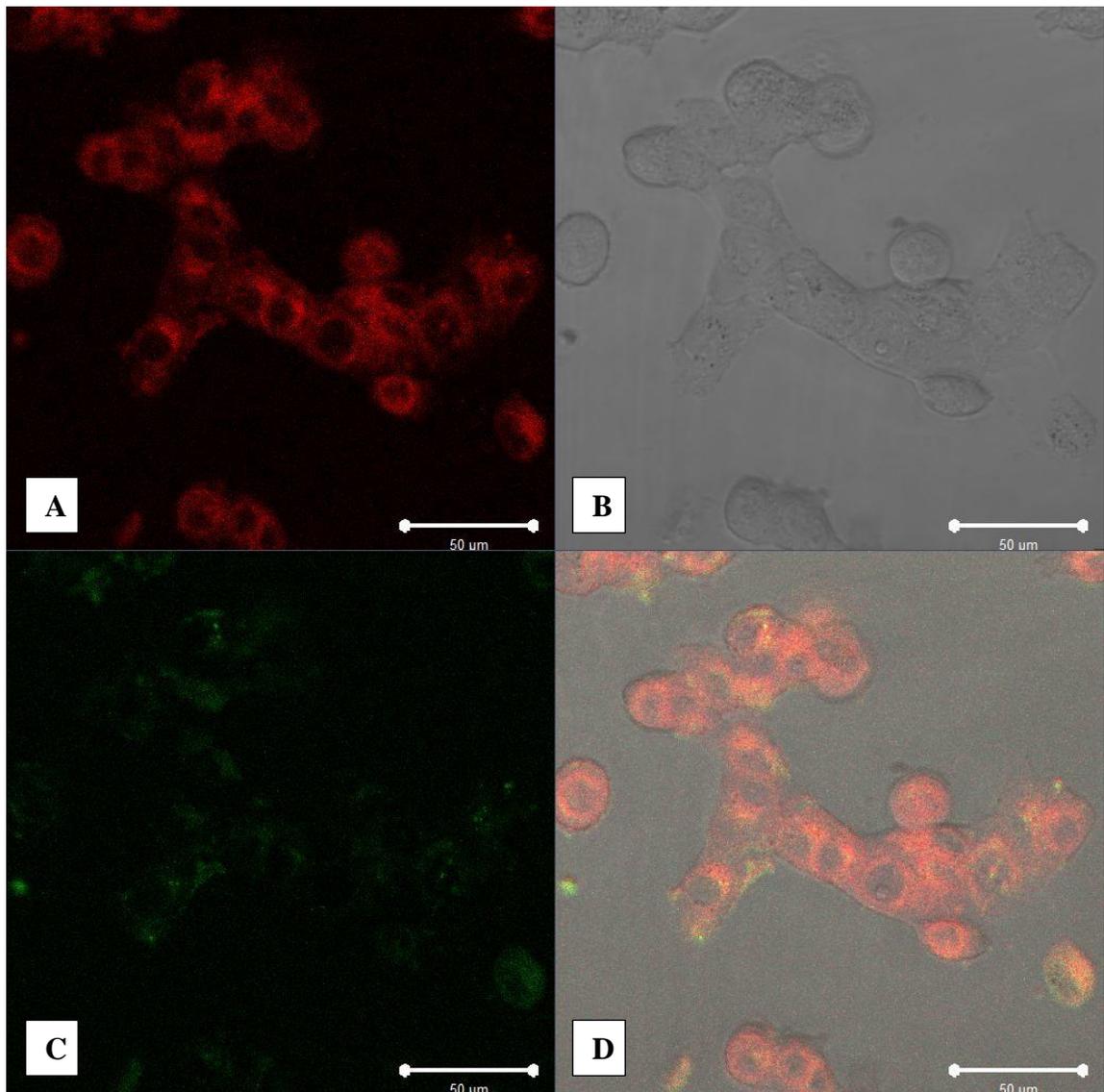
**Figura 18.** Marcação do retículo endoplasmático celular da linhagem HFF-1. A) Fluorescência da bacterioclorina-trisma, B) Imagem de transmissão, C) Fluorescência do retículo endoplasmático, D) Fluorescência sobreposta.

Fonte: Elaborada pela autora.



**Figura 19.** Marcação do retículo endoplasmático celular da linhagem MCF-7. A) Fluorescência da bacterioclorina-trisma, B) Imagem de transmissão, C) Fluorescência do retículo endoplasmático, D) Fluorescência sobreposta.

Fonte: Elaborada pela autora.



Em ambas a linhagens celulares, ocorreu a fluorescência em todas as organelas, com exceção do retículo endoplasmático que na célula de linhagem HFF-1 (Figura 18) ocorreu uma maior fluorescência em relação à linhagem tumoral MCF-7 (Figura 19).

Na tabela 3 são apresentadas as médias coeficiente de Pearson e coeficiente de Mander para as linhagens HFF-1 e MCF-7 calculados em amostras contendo  $10^4$  células/ml a partir de imagens das 4 organelas obtidas em microscopia confocal e calculadas com auxílio do software ImageJ.

**Tabela 3.** Coeficiente de Pearson e Coeficiente de Mander para as linhagens HFF-1 e MCF-7 (média  $\pm$  desvio padrão).

	Linhagem celular					
	HFF -1			MCF -7		
	Pearson	M1	M2	Pearson	M1	M2
Núcleo	0,427 $\pm$ 0,06	0,895 $\pm$ 0,04	0,946 $\pm$ 0,01	0,412 $\pm$ 0,03	0,635 $\pm$ 0,10	0,409 $\pm$ 0,07
Mitocôndria	0,427 $\pm$ 0,04	0,594 $\pm$ 0,16	0,832 $\pm$ 0,06	0,336 $\pm$ 0,04	0,687 $\pm$ 0,18	0,556 $\pm$ 0,13
Lisossomo	0,513 $\pm$ 0,11	0,868 $\pm$ 0,04	0,895 $\pm$ 0,07	0,192 $\pm$ 0,14	0,998 $\pm$ 0	0,701 $\pm$ 0,03
R.E.*	0,550 $\pm$ 0,07	0,917 $\pm$ 0,06	0,654 $\pm$ 0,09	0,269 $\pm$ 0,04	0,477 $\pm$ 0,15	0,579 $\pm$ 0,13

\* R.E. – Retículo endoplasmático

Os valores obtidos para o coeficiente de Pearson da relação das imagens de fluorescência das linhagens HFF-1 e MCF-7 entre a Bacterioclorina-trisma/DAPI, Bacterioclorina-trisma/mitocôndria, Bacterioclorina-trisma/lisossomo e Bacterioclorina-trisma/retículo endoplasmático, pode se observar que todos os valores obtidos são positivos e acima de 0,2. Esta constatação representa uma demonstração da localização no lisossomo da linhagem MCF-7 preferencial para o fotossensibilizador utilizado, o que faz com que esta organela celular esteja mais propensa a danos fotoquímicos induzidos pela terapia fotodinâmica. Em 1993, os lisosomas foram propostos para ser um alvo intracelular crítico para a localização de FS (GEZE, et al., 1993). No entanto, estudos sucessivos (BERG & MOAN, 1994) descobriram que, embora o FS localizado no lisossomo pode levar à morte celular após a iluminação, a eficácia relativa é significativamente menor que a observada com FS localizado em mitocôndrias e outras organelas (MACDONALD, et al., 1999).

O coeficiente de Pearson de 0,550 para a linhagem HFF-1 demonstrou uma boa correlação do retículo endoplasmático com a bacterioclorina-trisma (FIGURA 18).

Quando calculado os valores para o Coeficiente de Mander, M<sub>1</sub> e M<sub>2</sub>, para a linhagem de HFF-1 entre a Bacterioclorina-trisma e o DAPI foram de 0,946 e 0,895,

esse valores próximo de 1 indicam que ocorreu uma alta frequência na presença destes dois fluoróforos no mesmo pixel da imagem analisada, portanto mesma localização celular (Figura 12). O mesmo não ocorreu com a linhagem MCF-7 onde os valores de  $M_1$  e  $M_2$  para o marcador DAPI foram 0,635 e 0,409. Para a linhagem MCF-7 o melhor resultado obtido entre  $M_1$  e  $M_2$  foram 0,998 e 0,701 entre a bacterioclorina-trisima e o lisossomo, como mostra a figura 17. Esses valores próximos de 1 indicam a alta frequência entre os dois fluoróforos no mesmo pixel da imagem analisada, ou seja, houve um localização celular.

Nagata et al., 2003 mostraram que o FS, ATX-S10 (Na) à base de clorina tinha um sítio primário de acumulação em lisossomos, mas as células foram submetidas a apoptose após doses de iluminação levando a 70% de morte celular, sugerindo que as vias apoptóticas podem ser ativadas por desestabilização mitocondrial após o dano de lisossomos por TFD.

Através das imagens de fluorescência obtidas após a marcação dos componentes celulares, pode-se observar que a fluorescência das mitocôndrias, lisossomos e retículo endoplasmático estão distribuídas por toda a célula, sendo o retículo endoplasmático com menor concentração.

O coeficiente de Pearson não corrobora com o coeficiente de Mander para as imagens demonstradas, pois o coeficiente de Pearson para a linhagem tumoral demonstrou que houve uma parcial localização no núcleo, já o coeficiente de Mander demonstrou localização no lisossomo. Para a linhagem de células sadias (HFF-1) o coeficiente de Pearson demonstrou localização no retículo endoplasmático e o coeficiente de Mander demonstrou localização no núcleo. Esta divergência de resposta também foram observadas por Dunn et al (2011) e Bolte; Cordelières (2006)

Para os tratamentos utilizando a terapia fotodinâmica, a localização do fotossensibilizador é essencial, pois dependendo da organela, a geração de espécies reativas do oxigênio pode levar a diferentes tipos de morte. Os valores de Pearson e Mander analisados separadamente podem levar a falsas interpretações, por isso foi calculado os dois para ver se houve ou não a colocalização (POWERS, et al., 2011).

### 5.1.1 Citometria de Fluxo

Para verificar a capacidade da bacterioclorina-trisma de induzir a morte celular nas células tumorais da linhagem MCF-7, foram realizados testes com o kit PE Annexin V Apoptosis Detection Kit (BD Biosciences). O kit é composto por um fluoróforo, a ficoeritrina (PE), ligado à anexina V, uma proteína capaz de se ligar à fosfatidilserina, um fosfolípido de membrana, mantido normalmente na face citosólica, que é externalizado no início da apoptose e iodeto de propídio, corante fluorescente marcador de viabilidade celular que possui alta afinidade pelo DNA mas é excluído por células vivas que possuem membrana plasmática íntegra (NEVES E BRINDLE, 2014). Os resultados pela citometria de fluxo estão apresentados na Figura 20.

As porcentagens de apoptose (inicial e tardia) foram obtidas através da citometria para os tratamentos com as seguintes doses do fotossensibilizador: 0,1 e 0,5 $\mu$ M para as linhagens de HFF-1 e MCF-7. Foram realizados controles sem nenhum tratamento e controle tratados apenas com o fotossensibilizador se nenhuma irradiação. Todos os controles apresentaram taxa de células vivas acima de 80%. Para verificar que não havia interferência da fluorescências do FS com os marcadores (FITIC e PI) usados na metodologias foram analisadas amostras que receberam tratamentos apenas com o FS e sem a marcação para a Anexina V.

Na tabela 4 estão apresentados os valores médios das porcentagens obtidos para apoptose nos respectivos tratamentos com ambas as linhagens celulares.

**Tabela 4.** Porcentagens de apoptose (inicial e tardia) obtidas por citometria de fluxo das linhagens celulares HFF-1 e MCF-7. Tempo de incubação de 30 minutos, dose de luz de 7 J cm<sup>-2</sup> e período de pós irradiação de 24 horas. Fonte: Elaborada pela autora.

	Linhagem Celular					
	HFF -1			MCF -7		
	Apoptose Inicial (%)	Apoptose tardia (%)	Total (%)	Apoptose Inicial (%)	Apoptose tardia (%)	Total (%)
0,1 $\mu$ M Escuro	0	0	0	7,3	11,0	18,3
0,1 $\mu$ M Luz	18,9	17,3	36,2	7,1	16,6	23,7
0,5 $\mu$ M Escuro	3,3	3,0	6,3	7,5	7,5	15,0
0,5 $\mu$ M Luz	28,6	19,6	48,2	26,3	30,4	56,7

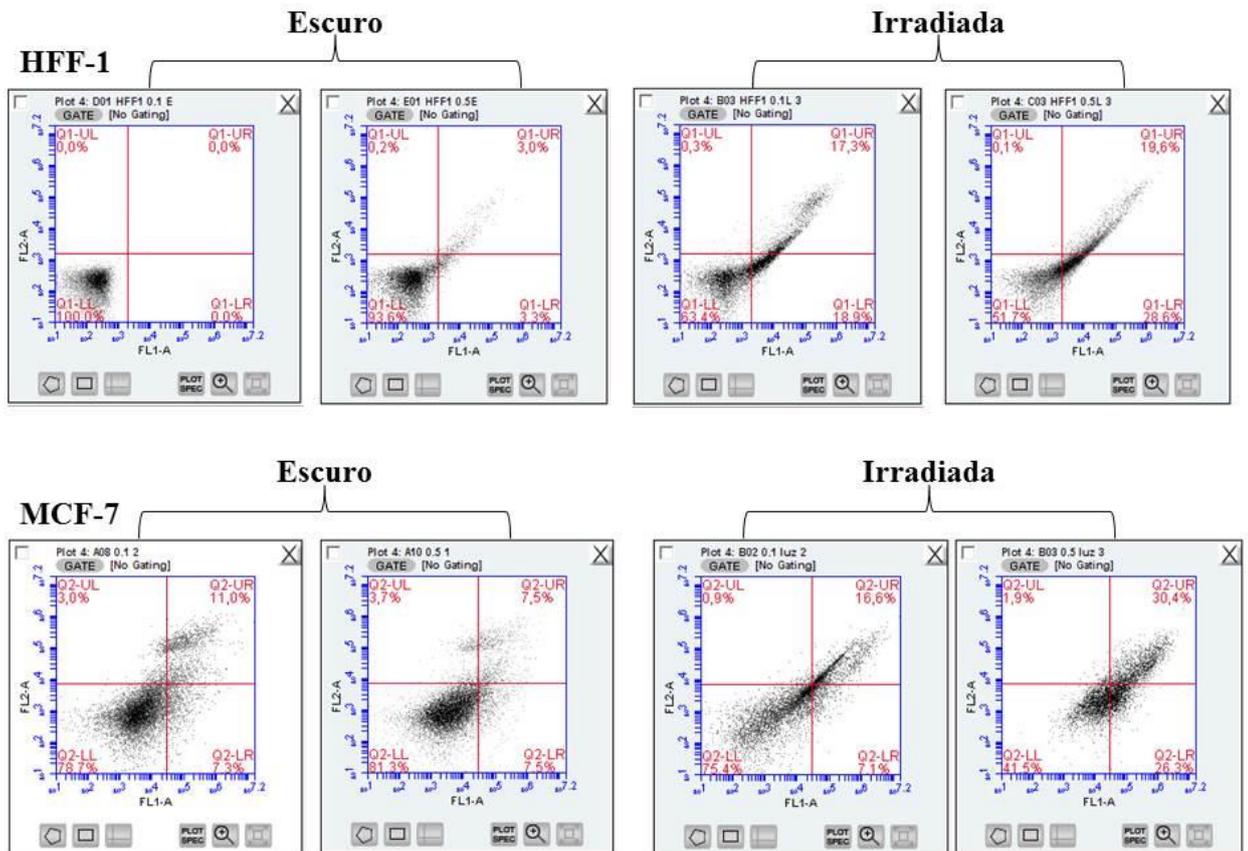
Pelos valores obtidos, pode-se observar que o tratamento com 0,5 $\mu$ M da bacterioclorina-trisma e dose de luz 7 J cm<sup>-2</sup> apresentou uma maior porcentagem de apoptose para ambas as linhagens celulares, sendo em maior proporção para apoptose tardia.

Na figura 20 é possível observar os gráficos de pontos obtidos através da citometria de fluxo. Os gráficos apresentam a fluorescência de iodeto de propídio (PI) no eixo x e de PE, ligado à anexina V, no eixo y. No quadrante superior esquerdo (UL) estão as células marcadas somente com PI, ou seja, mortas por necrose. No quadrante inferior direito (LR) aparecem as células marcadas somente com PE-Anexina V, externalizando fosfatidilserina, o que pode significar apoptose inicial. No quadrante superior direito (UR) estão as células duplo-positivo, portanto em apoptose tardia. As células duplo-negativo, ou seja, vivas, aparecem no quadrante inferior esquerdo (LL). Nota-se que houve um aumento gradual no número de células apoptóticas proporcional ao aumento da concentração de bacterioclorina-trisma utilizada no tratamento das amostras.

Com relação à morte celular, a quantificação desta ainda é um fator crítico para se determinar o potencial de um composto ou de uma terapia em eliminar as células do tumor. Os nossos resultados demonstraram uma eficiência o potencial da bacterioclorina-trisma para este fim, porém um melhor entendimento sobre os diferentes efetores e as vias ativadas responsáveis pela citotoxicidade é fundamental para aprimorar o tratamento (HOI, et al., 2012). Existem poucos estudos *in vitro* detalhando os mecanismos moleculares envolvidos induzidos pela TFD que comparem as células tumorais das células normais. Nos primeiros trabalhos, acreditava-se que a TFD apenas por apoptose ou necrose acidental, mas, relatos recentes acredita-se que o mecanismo de morte celular que ocorre por conta da TFD é na verdade dependente das condições de tratamento empregadas, concentração e localização intracelular do fotossensibilizador, além do tipo celular (GARG, et al., 2013).

Neste estudo nos preocupamos em mater um enfoque em cultura celulares, com o intuito de desvendar os mecanismos envolvidos na morte celular por bacterioclorina – trisma, mas matendo os parâmetros importantes na eficácia da TDF e toxicidade das células.

**FIGURA 20.** Efeito da bacterioclorina-trisma sobre a apoptose. Células HFF-1ou MCF-7 foram analisadas por citometria de fluxo após tratamento com iodeto de propídio (PI) e PE-Anexina V. As células foram tratadas com diferentes concentrações do fotossensibilizador. Cada ponto dos gráficos representa uma célula, no eixo x: fluorescência de PI e no eixo y: PE, ligado a anexina V. Quadrante UL: células marcadas somente com PI. Quadrante LR: células marcadas com PE-Anexina V. Quadrante UR: células duplo-positivo. Quadrante LL: células duplo-negativo. As imagens correspondem a uma replicata representativa de cada condição.



## 6.CONCLUSÕES

O fotossensibilizador bacterioclorina – trisma, que demonstrou um bom resultado e revelou ser possível estabelecer futuramente um protocolo eficiente de TFD contra a linhagem celular MCF-7. Resultados destes experimentos revelaram uma alta morte celular nas células que foram irradiadas com 15, 7 e 2 J cm<sup>-2</sup> e nas concentrações maiores que 0,1µM utilizadas do fotossensibilizador foram capazes de promover a inativação das células em torno de 80%. A microscopia confocal e a citometria de fluxo demonstrou que o fotossensibilizador tem uma maior concentração no lisossomo da célula tumoral, e o tipo de morte identificado foi por apoptose.

Finalmente, com o conjunto de dados obtidos neste estudo, sugerimos que a bacterioclorina-trisma poderia ser uma alternativa terapêutica eficaz e segura contra a proliferação de células do câncer de mama, com a possibilidade de minimizar de forma drástica os efeitos adversos.

## 7.SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS

- Determinar a quantidade de bacterioclorina – trisma interiorizadas nos diferentes tipos celulares.
- Averiguar a produção de oxigênio singleto
- Avaliar as diferenças morfológicas após terapia fotodinâmica através do teste de laranja de acridina.
- Avaliar a farmacocinética e farmacodinâmica do fotossensibilizador *in vivo*.
- Avaliar a eficácia da TFD utilizando bacterioclorina – trisma *in vivo*.

## 8.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACEDO, P.; STOCKERT, J.C; CAÑETE, M.; VILLANUEVA, A. Two combined photosensitizers: a goal for more effective photodynamic therapy of câncer. *Cell death & disease*, v. 5, p. e1122, 2014.
- AGOSTINIS, P.; BERG, K. A.; FOSTER, T. H.; GIROTTI, A. W.; GOLLNICK, S. O.; HAHN, S. M.; HAMBILN, M. R.; JUZINIENE, A.; KESSEL, D.; KORBELIK, M.; MOAN, J.; MROZ, P.; NOWIZ, D.; PIETTE, J.; WILLSON, B. C.; GOLAB, J. Photodynamic Therapy of cancer: An update. *American Cancer Society*, v. 61, p. 250 – 281, 2011.
- AHMAD, A. Pathways to breast cancer recurrence. *ISRN oncology*, v. 2013, p. 290568, 2013.
- ALEJANDRA MARTINEZ DE PINILLOS BAYONA<sup>1</sup>, A. M. P.; MROZ, P.; THUNSHELLE<sup>1</sup>, C.; HAMBLIN<sup>1</sup>, M. R. Design features for optimization of tetrapyrrole macrocycles as antimicrobial and anticancer photosensitizers. *Chem Biol Drug Des* 2017; 89: 192-206.
- ALLISON, R. R.; SIBATA, C. H. Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: A clinical review. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v. 7, n. 2, p. 61 – 75, 2010.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. *Cancer Facts & Figures 2015*. Cancer Facts & Figures 2015, p. 1 – 9, 2015.
- BAYONA, M. P.; MROZ, P.; THUNSHELLE; C.; HAMBLIN, M.R. Design features for optimization of tetrapyrrole macrocycles as antimicrobial and anticancer photosensitizers. *Chem Biol Drug Des*. 2017 Feb;89(2):192-206.
- BERG K, MOAN J. Lysosomes as photochemical targets. *Int J Cancer*. v. 59. p. 814-22, 1994
- BOLTE, S.; CORDELIERES, F. P. A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *Journal of Microscopy*, v. 224, n. 3, p. 213-232, 2006.
- BOZIC, I.; ANTAL, T.; OHTSUKI, H.; CARTER, H.; KIM, D.; CHEN, S.; KARCHIN, R.; KINZLER, K. W.; VOGELSTEIN, B.; NOWAK, M. A. Accumulation of driver and passenger mutations during tumor progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of American*, v. 107, n. 43, p. 18545 – 50, 2010.
- BROEKGAARDEN, M. Tumor cell survival pathways activated by photodynamic therapy: a molecular framework for inhibition strategies. *Cancer metastasis review*, p. 1 – 78, 2015.
- BROWN, S.; BROWN, E.; WALKER, I. The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment. *Lancet Oncology*, v. 5, n. 8, p. 479 – 508, 2004.
- BRUNDISH D.E., LOVE W.G. Photodynamic therapy comes of age. *IDrugs Investig Drugs J* 3(12):1487–1508, 2000.
- CANCER, T.; ATLAS, G. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. p. 1 – 10, 2012.

CASTANO, A.P.; DEMIDOVA, T.N.; HAMBLIN, M.R. Mechanisms in photodynamic therapy: Part three-photosensitizer pharmacokinetics, biodistribution, tumor localization and modes of tumor destruction. *Photodiagn. Photodyn. Ther.*, n. 2, p. 91–106, 2005.

CLAVICO, L. S., TRINDADE, G. S., RODRIGUES, O., REIS TRINDADE, R. A. Campanha de prevenção ao câncer da pele (Rio Grande - RS): perfil epidemiológico dos atendidos. *Revista Saúde e Pesquisa*, v. 8, n. 1, p. 113-123, jan./abr. 2015 - ISSN 1983-1870 - e-ISSN 2176-9206.

COLDITZ, G.A.; WOLIN, K.Y.; GEHLERT, S. Applying what we know to accelerate cancer prevention. *Sci Transl Med.* v. 4, p. 1-9, 2012.

DE VISSCHER, S.A.; MELCHERS, L.J.; DIJKSTRA, P.U.; KARAKULLUKCU, B.; TAN, I.B.; HOPPER, C.; ROODENBURG, J.L.; WITJES, M.J. mTHPC-mediated photodynamic therapy of early stage oral squamous cell carcinoma: A comparison to surgical treatment. *Ann. Surg. Oncol.*, n. 20, p. 3076–3082, 2013.

ECKHARDT, B. L.; FRANCIS, P. A.; PARKER, B. S.; ANDERSON, R. L. Strategies for the discovery and development of therapies for metastatic breast cancer. *Natura Reviews Drugs Discovery*, v. 11, n. 6, p. 479 – 497, 2012.

FINK, C.; ENK, A.; GHOLAM, P. Photodynamic therapy—Aspects of pain management. *J. Dtsch Dermatol. Ges.*, n. 13, p. 15–22, 2015.

FINLAY J.C., MITRA S., PATTERSON M.S., FOSTER T.H. (2004) Photobleaching kinetics of Photofrin in vivo and in multicell tumour spheroids indicate two simultaneous bleaching mechanisms. *Phys Med Biol* 49(21):4837–4860.

GARG, A. D.; DUDEK, A. M.; AGOSTINIS, P. Cancer immunogenicity, danger signals, and DAMPs: What, when , and how ? *Biofactors*, v. 39, n. 4, p. 355 – 367, 2013.

GEZE M, MORLIERE P, MAZIERE JC, SMITH KM, SANTUS R. Lysosomes, a key target of hydrophobic photosensitizers proposed for photochemotherapeutic applications. *J Photochem Photobiol B.* 1993; 20 : 23-35.

GREAVES, M. ; MALEY, C. C. Clonal evolution in cancer. *Nature*, v. 481, n. 7381, p. 306 – 313, 2012.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: The Next Generation. *Cell*, v.144, n. 5, p. 646-674, 2011.

HOI, S. W. –H.; WONG, H. M.; CHAN, J. Y. –W.; YUE, G. G. L.; TSE, G. M. –K.; LAW, B. K. –B.; FONG, W. P.; FUNG, K. P. Photodynamic therapy of Pheophorbide a inhibits the proliferation of human breast tumour via both caspase-dependent and independent apoptotic pathways in in vitro and in vivo models. *Phytotherapy research: PTR*, v. 26, n. 5, p. 734 – 42, 2012.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). Estimativa 2014: incidência de câncer no Brasil. Coordenação Geral de Ações Estratégicas, Coordenação de Prevenção e Vigilância. Rio de Janeiro: INCA, 2014.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil. Coordenação Geral de Ações Estratégicas, Coordenação de Prevenção e Vigilância. Rio de Janeiro: INCA, 2016.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). Coordenação Geral de Ações Estratégicas. Coordenação de Educação ABC do

câncer: abordagens básicas para o controle do câncer. 2ª ed. rev. e atual. Rio de Janeiro: INCA; 2012.

ISSA, M. C.A., MANELA-AZULAY, M. Terapia fotodinâmica: revisão da literatura e documentação iconográfica. *An Bras Dermatol.* 2010;85(4):501-11.

KESSEL, D. *Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med.* v. 49, p.901, 1986

KESSEL, D. *Photochem. Photobiol.* v. 50, p. 345, 1989.

KIESSLICH, T.; KRAMMER, B.; PLAETZER, K. Cellular mechanisms and prospective applications of hypericin in photodynamic therapy. *Current Medicinal Chemistry*, v. 13, n. 18, p. 2189 – 2204, 2006.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; ASTER, J. C. *Robbins Patologia Básica.* 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013.

LEBLANC, W.G., VIDAL, L., KIRSNER, R.S., LEE D.J., CABAN-MARTINEZ, A.J., MCCOLLISTER, K.E. et al. Reported skin cancer screening if us adult workers. *J Am Acad Dermatol [Internet].* 2008 July [cited 2013 Dec 20];59(1):55-63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3209702/>.

MA, R.; FENG, Y.; LIN, S.; CHEN, J.; LIN, H.; LIANG, X.; ZHENG, H.; CAI, X. Mechanisms involved in breast cancer liver metastasis. *Journal of Translational Medicine*, v. 13, n. 1, p. 1 – 10, 2015.

MACDONALD IJ, MORGAN J, BELLNIER DA, ET AL. Subcellular localization patterns and their relationship to photodynamic activity of pyropheophorbide-a derivatives. *Photochem Photobiol.* V.70; p. 789-97, 1999.

MALGDAY, R. G.; KREBS, D. B. Understanding correlation coefficients and regression. *Physical Therapy*, v. 66, n. 1, p. 110 – 114, 1986.

MANOEL, C. A.; PAOLILLO, F.R.; DE MENEZES, P. F. C. *Conceitos fundamentais e práticos da Fotoestética, Compacta: São Carlos, 2014.*

MASOUDI – NEJAD, A.; ASGARI, Y. Metabolic cancer biology: Structural – based analysis of cancer as a metabolic disease, new sigths and opportunities for disease treatment. *Seminars in cancer biology*, v. 30, p. 21 – 29, 2015.

MONTAZERABADI, A. R.; SAZGARNIA, A.; BAHREYNI-TOOSI, M. H.; AHMADI, A.; SHAKERI-ZADEH, A.; ALEDAVOOD, A. Mitoxantrone as a prospective photosensitizer for photodynamic therapy of breast cancer. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v. 9, n. 1, p. 45 – 61, 2012.

MOREIRA A.P. A, SABÓIA V.M., RIBEIRO C.R.B. Câncer de pele não melanoma e risco ocupacional de trabalhadores ao ar livre: revisão integrativa. *Revista de enfermagem UFPE online.* Recife, 9(12):1310-9, dez., 2015.

MOREIRA, L. M.; RODRIGUES, M. R.; OLIVEIRA, H. P. Influence off diffrent water-ethanol solvente systems on the spectroscopic and physicochemical properties of the macrocycles compounds pheophytin and chlorophyll alpha. *Quimica Nova*, v. 33, n. 2, p. 258-262, 2010.

MOURA, L. D. Tratamento de Câncer de mama utilizando terapia fotodinâmica com nanoemulsão de Ftalocianina de cloro alumínio. *Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Brasília, 2017.*

MROZ, P.; HUANG, Y.Y.; SZOKALSKA, A.; ZHIYENTAYEV, T.; JANJUA, S.; NIFLI, A.P.; SHERWOOD, M.E.; RUZIE, C.; BORBAS, K.E.; FAN, D.; KRAYER, M.; BALASUBRAMANIAN, T.; YANG, E.; KEE, H.L.; KIRMAIER, C.; DIERS, J.R.; BOCIAN, D.F.; HOLTEN, D.; LINDSEY, J.S.; HAMBLIN, M.R. Stable synthetic bacteriochlorins overcome the resistance of melanoma to photodynamic therapy. *FASEB. J.*, v.24, p. 3160–3170, 2010.

NAGATA S, OBANA A, GOHTO Y, NAKAJIMA S. Necrotic and apoptotic cell death of human malignant melanoma cells following photodynamic therapy using an amphiphilic photosensitizer ATX-S10(Na). *Lasers Surg Med*, v. 33 : p.64-70, 2003.

NEVES, A. A.; BRINDLE, K. M. Imaging cell death. *J Nucl Med*, v. 55, n. 1, p. 1-4, Jan 2014.

NOORI S.; HASSAN Z. M. Tehranolide inhibits cell proliferation via calmodulin inhibition, PDE, and PKA activation. *Tumor Biol.* v. 35, p. 257-64, 2014.

O'CONNOR, A. E.; GALLAGHER, W. M.; BYRNE, A.T. Porphyrin and nonporphyrin photosensitizers in oncology: Preclinical and clinical advances in photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.* v.85, p.1053–1074, 2009.

OLIVEIRA, K. T., SOUZA, J. M., GOBO, N. R. S., DE ASSIS, F. F., BROCKSOM, T. J. Conceitos Fundamentais e Aplicações de Fotossensibilizadores do Tipo Porfirinas, Clorinas e Ftalocianinas em Terapias Fotônicas. *Revista Virtual de Química*, v. 7, n. 1, p. 310-335, 2015.

ORMOND, A. B.; FREEMAN, H. S. Dye sensitizers for photodynamic therapy. *Materials*, v.6, p.817–840, 2013.

PANDEY, R. K., KESSEL, D., DOUGHERTY, T. J., EDS. Handbook of Photodynamic Therapy, Updates on Recent Applications of Porphyrin- Based Compounds; World Scientific: Hackensack, NJ, 2016; Chapters 1–19, p. 3–548.

PEREIRA, M. M.; MONTEIRO, C. J. P.; SIMOES, A. V. C.; PINTO, S. M. A.; ABREU, A. R.; SA, G. F. F.; SILVA, E. F. F.; ROCHA, L. B.; DABROWSKI, J. M.; FORMOSINHO, S. J.; SIMÕES, S.; ARNAUT, L. G. Synthesis and photophysical characterization of a library of photostable halogenated bacteriochlorins: an access to near infrared chemistry. *Tetrahedron*, 2010, 66, 9545 – 9551.

POURTEIMOOR, V.; MOHAMMADI-YEGANEH, S.; PARYAN, M. Breast cancer classification and prognostication through diverse systems along with recent emerging findings in this respect; the dawn of new perspectives in the clinical applications. *Tumor Biology*, p. 1-21, 2016// 2016. ISSN 1423-0380.

POWERS, S. K.; KAVAZIS, A. N.; JACKSON, M. J. Reactive oxygen species: impact o skeletal muscle. *Comprehensive Physiology*, v. 1, n. 2, p. 941 – 969, 2011.

RAKHA, E. A., ELLIS, I. O. Modern classification of breast cancer: should we stick with morphology or convert to molecular profile characteristics. *Advances in anatomic pathology*, v. 18, n. 4, p. 255 – 267, 2011.

SIMPLICIO, F. I.; MAIONCHI, F.; HIOKA, N. Terapia fotodinâmica: Aspectos farmacológicos, aplicações e avanços recentes no desenvolvimentos de medicamentos. *Química Nova*, 2002, 25, 801.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer Statistics, 2015. *CA Cancer J Clin*, v. 65, n. 1, p. 5 – 29, 2015.

SPRING, B. Q.; RIZVI, I.; XU, N.; HASAN, T. The role of photodynamic therapy in overcoming cancer drug resistance. *Photochemical & photobiological sciences: Official journal of the European photochemistry Association and the European Society for Photobiology*, v. 14, p. 1476 – 1491, 2015.

STRATEN, D. V.; MASHAYEKHI, V.; BRUIJN, H. S.; OLIVEIRA, S.; ROBINSON, D. J. Oncologic Photodynamic Therapy: Basic Principles, Current Clinical Status and Future Directions. *Cancers*, v. 9, p. 19, 2017.

TETARD, M. C.; VERMANDEL, M.; MORDON, S.; LEJEUNE, J.P.; REYNS, N. Experimental use of photodynamic therapy in high grade gliomas: A review focused on 5- aminolevulinic acid. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v. 11, n. 3, p. 319-330, 2014.

WHO – World Health Organization. Disponível em: <http://www.who.int/cancer/en/>. Acesso em 28/06/2017.

YANO, T.; MUTO, M.; MINASHI, K.; IWASAKI, J.; KOJIMA, T.; FUSE, N.; DOI, T.; KANEKO, K.; OHTSU, A. Photodynamic therapy as salvage treatment for local failure after chemoradiotherapy in patients with esophageal squamous cell carcinoma: A phase II study. *Int. J. Cancer*, n. 131, p. 1228–1234, 2012.

ZHANG, L. J.; O'SHEA D.; ZHANG, C.; · YI-JIA YAN, Y.; WANG, L.; CHEN, Z. L. Evaluation of a bacteriochlorin-based photosensitizer's anti-tumor effect in vitro and in vivo. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2015 141:1921–1930.

ZHU Q.; PAO G. M.; HUYNH A. M.; SUH H.; TONNU N.; NEDERLOF P. M.; GAGE F. H.; VERMA I. M. BRCA1 tumor suppression occurs via heterochromatin-mediated silencing. *Nature*. v. 477, p. 179-84, 2011.