



**UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOFOTÔNICA APLICADA ÀS**  
**CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**José Marcelo Lacerda Alves Gonçalves**

**Terapia Fotodinâmica com Fotossensibilizadores**  
**Fenotiazínicos: Mecanismos de Morte Celular**

**SÃO PAULO, SP**  
**2019**



**JOSÉ MARCELO LACERDA ALVES GONÇALVES**

**Terapia Fotodinâmica com Fotossensibilizadores  
Fenotiazínicos: Mecanismos de Morte Celular**

Dissertação apresentada à  
Universidade Nove de Julho, para  
obtenção do título de Mestre em  
Biofotônica aplicada às Ciências da  
Saúde.

**Orientadora:** Profa. Dra. Christiane Pavani

**SÃO PAULO, SP**

**2019**

## Ficha catalográfica

Gonçalves, José Marcelo Lacerda Alves Gonçalves  
Terapia Fotodinâmica com Fotossensibilizadores  
Fenotiazínicos: Mecanismos de Morte Celular / José  
Marcelo Lacerda Alves Gonçalves Gonçalves. -- São  
Paulo, 2019.  
47 f.

Orientador: Christiane Pavani Pavani.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em  
Biofotônica aplicada às Ciências da Saúde) --  
Universidade Federal da Bahia, Universidade Nove de  
Julho, 2019.

1. Terapia Fotodinâmica. 2. Mecanismo de Morte  
Celular. 3. Fenotiazinas. 4. Fotossensibilizadores.  
5. Azul de metileno, Azure A e Azure B. I. Pavani,  
Christiane Pavani. II. Título.

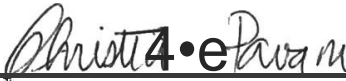
szo Paulo, 04 de fevereiro d9 2019

0 0V 0

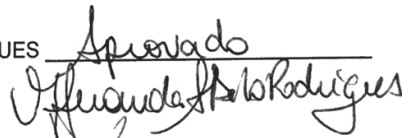
Aluno (a): José Marcelo Lacerda Alves Gongalves

Tltulo da DissertagSo: Terapia fotodinâmica com foto6Sensibilizadores fenotiazinicos: Mecanismos de morte celular"

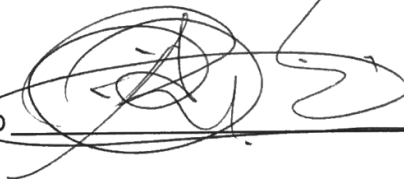
Presidents. PROF. DR. CHRISTIANE PAVANI

  
Christiane Pavan

Membro: PROF. DR. MARIA FERNANDA SETUBAL DESTRO RODRIGUES

  
Maria Fernanda Setubal Destro Rodrigues

Membro: PROF DR ANDERSON ORZARI RIBEIRO



Dedico este trabalho definitivamente à Deus, por ser único e fundamental em minha vida, autor de meu destino, meu único direcionador, socorro bem presente na hora da angústia. Também dedico a meu pai, José Alves e minha mãe, Maria Lucia. Estendo ainda esta dedicatória aos meus irmãos e irmãs; Suelan, Marcos, Marcio, Mauricio e Gabriela. E claro, sem esquecer a minha amada esposa Dinamara e as minhas bênçãos, que as chamo de filhas, Julia e Sophia.

**Ao meu consolador...**

**Nos momentos que pensei em desistir, com  
uma voz doce e suave ao meu coração, soprou o vento  
da tranquilidade e serenidade, e assim, me forneceu  
forças para eu continuar a caminhada.**

**Obrigado Deus...**

*À minha amada...*

*Não. Não teria chegado até aqui ...*

*Jamais...*

*Se você não estivesse ao meu lado...*

*Você me impulsionou, me ergueu, me ajudou...*

*Confesso, se não estivesse ao meu lado, eu teria fracassado...*

*Obrigado meu amor, minha guerreira!*

*Te amo...*

*Minha Dina...*

Mãe...

Não há palavras...

A senhora, durante esses anos que me dediquei a este projeto (Mestrado), cuidou dos meus maiores bens, minhas filhas. Quando cheguei exausto, nunca precisei dizer absolutamente nada, a senhora me compreendia de uma forma que nem eu mesmo conseguiria entender...

Obrigado Mãe, jamais irei esquecer de tudo que fez por mim.

Pai...

Do seu jeito...

Brigou comigo, disse, você vai conseguir...

Tem que conseguir...

As vezes discutia comigo por não entender por que eu estava tão cansado... "Você escolheu isso, precisa aguentar"...

Amo vocês, pai e mãe...



## **Agradecimentos**

Definitivamente agradeço primeiramente a minha orientadora professora Dra. Christiane Pavani, afinal, através dela, a sua organização profissional, o seu poder em entender as minhas dificuldades, a humanidade, o coração, e claro, não tem como não agradecer pelos feedbacks. Foram essenciais no meu desenvolvimento como profissional e principalmente como aluno/pesquisador.

Agradeço ainda, aos demais professores do Programa de Pós-Graduação em Biofotônica Aplicada Às Ciências da Saúde, que de forma direta ou indireta foram fundamentais na concretização deste projeto. Agradeço a Coordenação da professora Dra. Kristianne Porta Santos Fernandes pela dedicação pelo programa mencionado acima, programa este que me acolheu e escancarou as portas das oportunidades acadêmicas e profissionais. Claro que não posso deixar de agradecer aos excepcionais técnicos do laboratório de pesquisa; Eduardo, Haryanne e Núbia, sempre com um sorriso nos lábios, prontos a nos atender nas nossas mais intensas necessidades. Deixo aqui também o meu agradecimento à técnica do laboratório e professora Caren Cristina Grabulosa, sempre com muita humildade e pronta a atender os alunos, sejam eles, iniciadores científicos ou Pós doutorandos, com o mesmo entusiasmo e dedicação, sem discernir patentes. Estendo ainda meu agradecimento à secretária do PPG Priscila Kelly, por todas as vezes que solicitei ajuda (não foram poucas), e sempre com empatia e um sorriso enorme me atendeu maravilhosamente.

Agradeço aos meus Iniciadores Científicos Bruno, que por muito tempo me acompanhou durante o projeto, mas que por dificuldades naturais ao longo do caminho da graduação, precisou se afastar temporariamente, mas foi fundamental na minha trajetória. Ao aluno Lucas, que demonstrou responsabilidade e empenho ao longo deste percurso. Ao aluno Vinicius, pelo pronto atendimento e funcionalidade para equipe. À aluna Haryanne, que mesmo pelo pouco tempo no programa, demonstrou empenho e responsabilidade. Preciso obviamente agradecer a minha fantástica colega de mestrado que se tornou amiga, Gabriela Benedito, que durante esse processo foi de fundamental importância, afinal, uma vez ela me enviou uma mensagem que me levou às lágrimas, talvez ela nem lembre, mas ficou fixado em minha memória, e claro,

no coração; “os guerreiros também se cansam, quando se sentir cansado, descanse. Mas não desista, ok?”. Jamais irei esquecer. Estendo este agradecimento às suas alunas; Ysabelle, Natália e Marcella, sempre disponíveis a ajudar a nossa “pequena grande equipe”. É imprescindível mencionar nesse agradecimento os até então, colegas, mas que, sem sombra de dúvidas, tornaram-se amigos. Eles me ensinaram que a amizade aparece de um lugar de onde menos imaginamos. São eles; Ellen Perim, Marcia Makabe, Marlon Cruz, Andreia La Selva, Elza Ferri, Felipe Silva, Rodrigo Fernando, Thalita Molinos e Veridiana Delle. Eles foram simplesmente incríveis. Ao Professor Maurício da Silva Baptista do Laboratório de Processos Fotoinduzidos e Interfaces do Instituto de Química da USP por ter cedido a linhagem celular utilizada nesta pesquisa, por autorizar o uso dos equipamentos e pela colaboração ao longo do projeto. Não posso de maneira alguma deixar de agradecer aos professores que despertaram em mim o sonho de vivenciar tudo isso que estou vivendo hoje. Se posso me considerar um professor, vocês são os grandes responsáveis. São eles; Zaide Frazão, Miriam Furmankiewicz, Adriana Covino, Joselma Siqueira, Flavia Tamancoldi, Silvia Junior, Deborah Abuhab, Alerrandro Carvalho, Kátia Marcelino, Fernanda Pitanga, Carla Perencin, Priscyla Borges, Wanda Bray, Fernando Franco e João Carlos. Não teria como esquecer as coordenadoras; Neusa Fukuya e Irene. E por fim, agradeço à Universidade Nove de Julho por ter me proporcionado a realização de um dos maiores sonhos da minha vida, a de me tornar um professor, a profissão que na minha modesta opinião, considero a mais linda e a única que todas as outras profissões são dependes para se tornar possível.

## RESUMO

A terapia fotodinâmica é uma promissora opção de tratamento que pode ser utilizada em diversas áreas da saúde. A técnica é baseada na combinação de um agente fotossensibilizador (FS) e luz. O FS após exposição à radiação visível, gera espécies reativas de oxigênio que levam à morte celular. As fenotiazinas são uma classe de moléculas que apresentam propriedades adequadas para a Terapia Fotodinâmica, sendo que somente o Azul de Metileno (AM) e Azul de Toluidina têm sido amplamente estudados. Recentemente outras fenotiazinas, como o Azure A (AA) e Azure B (AB), começaram a ser estudadas e foi relatado que a eficácia das fenotiazinas é dependente da agregação. Neste contexto, ainda não se sabe se a agregação influencia no mecanismo de morte celular fotoinduzido. O objetivo deste trabalho foi avaliar os mecanismos de morte celular induzidos por terapia fotodinâmica com os FS AA, AB e AM. Foram realizados ensaios para quantificação da produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, e avaliação de mecanismos de morte celular utilizando as concentrações de IC<sub>50</sub> dos fotossensibilizadores, em diferentes tempos após a exposição à luz. Os resultados mostraram que AM foi o FS que apresenta maior produção de espécies reativas (de oxigênio e de nitrogênio), seguido por AB, enquanto a produção destas espécies fotoinduzida por AA é muito baixa, sem diferença em relação ao grupo controle. O FS AM é o mais efetivo em causar morte celular dentre os FS testados e também o FS que causa maior perda de potencial de membrana mitocondrial. Todos os FS levam à alguma marcação com iodeto de propídeo 3h após a irradiação, porém somente AA continua apresentando elevada marcação PI<sup>+</sup> em 24 e 48h após o tratamento. Outros ensaios ainda são necessários para esclarecer os mecanismos de morte celular fotoinduzida após TFD, porém existem indícios que AA causa necrose em maior extensão devido à perda de integridade de membrana celular dos diferentes tempos após tratamento, enquanto AM e AB causaria necrose em certa extensão, porém apoptose seria o mecanismo majoritariamente envolvido.

Palavras-chave: Terapia fotodinâmica, Compostos Fenotiazínicos, Azul de metileno, Azure A, Azure B, Mecanismo de morte celular, fotossensibilizadores.

## ABSTRACT

Photodynamic therapy is a promising treatment option that can be used in several areas of health. The technique is based on the combination of a photosensitizing agent and light. The photosensitizer after exposure to visible radiation, generates reactive oxygen species that lead to cell death. Phenothiazinium dyes are a class of molecules that have properties suitable for Photodynamic Therapy, with only Methylene Blue and Toluidine Blue being extensively studied. Recently other phenothiazinium dyes, such as Azure A and Azure B, have started to be studied and it has been reported that their efficacy is dependent on aggregation. In this context, it is not yet known whether aggregation influences the mechanism of photoinduced cell death. The objective of this work was to evaluate the mechanisms of cell death induced by photodynamic therapy with the photosensitizers Azure A, Azure B and Methylene Blue, relating to the production data of reactive oxygen species. Tests were performed to quantify the production of reactive oxygen and nitrogen species, and evaluation of mechanisms of cell death using the IC<sub>50</sub> concentrations of photosensitizers, at different times after exposure to light. The results showed that Methylene Blue was the photosensitizer that presented the highest production of reactive species (oxygen and nitrogen), followed by Azure B, whereas the production of these species photoinduced by Azure A is very low, with no difference in relation to the control group. Methylene blue is the most effective in causing cell death among the compounds tested and the photosensitizer that causes greater loss of mitochondrial membrane potential. All SFs lead to some labeling with propidium iodide 3h after irradiation, but only AA continues to present high PI + marking at 24 and 48h after treatment. Other assays are still needed to clarify the mechanisms of photodamaged cell death after photodynamic Therapy, but there are indications that Azure A causes necrosis to a greater extent due to loss of cell membrane integrity at different times after treatment, whereas Methylene Blue and Azure B would cause necrosis to some extent, but apoptosis would be the mechanism most involved.

Key words: Photodynamic therapy, Phenothiazinium dyes, Methylene blue, Azure A, Azure B, Mechanism of cell death, photosensitizers.

# SUMÁRIO

Resumo .....	10
Abstract.....	11
Lista de abreviaturas.....	14
Lista de Figuras .....	15
1. JUSTIFICATIVA DO TRABALHO .....	18
2. CONTEXTUALIZAÇÃO .....	19
3. OBJETIVOS.....	27
3.1 Objetivos Gerais .....	27
3.2 Objetivos específicos:.....	27
4. MÉTODOS.....	28
4.1 Cultura Celular.....	28
4.2 Medidas de Estresse Oxidativo celular:.....	28
4.2.1 Quantificação de produção de espécies reativas de oxigênio utilizando a sonda DCFDA.....	28
4.2.2 Dosagem da síntese de óxido nítrico (NO).....	29
4.3 Mecanismos de Morte Celular .....	30
4.3.1 Marcação de Alaranjado de Acridina e Iodeto de Propídeo (AO/PI) .....	30
4.3.2 AAU (MTT, VN e CV) .....	31
4.3.3 Potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ).....	32
4.3.4 Citometria de Fluxo com Anexina V e Iodeto de Propídeo .....	32
5. RESULTADOS .....	33
5.1 Quantificação de produção de espécies reativas de oxigênio utilizando a sonda DCFDA.....	33
5.2 Dosagem da síntese de óxido nítrico (NO).....	34
5.3 Marcação de Alaranjado de Acridina e Iodeto de Propídeo (AO/PI) .....	35

5.4 AAU (MTT, VN e CV).....	40
5.5 Potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ).....	43
6. DISCUSSÃO.....	46
7. CONCLUSÃO .....	49
7. PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA NO PERÍODO .....	50
8. REFERÊNCIAS .....	51
ANEXO .....	56
Informações para membros externos de bancas.....	62

## LISTA DE ABREVIATURAS

AA: Azure A

AB: Azure B

AM: Azul de metileno

AO: Alaranjado de Acridina

CT: Controle

DCFDA: 2',7'- diclorodihidrofluoresceína diacetato

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

FSs: Fotossensibilizadores

FS: Fotossensibilizador

HpD: Derivado de Hematoporfirina

LED: Diodo emissor de luz

MTT: (3-(4,5-Dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-brometo de tetrazólio

PI: Iodeto de Propídeo

PBS: Tampão fosfato salino

Rh: Rodamina 123

ROS: Espécies reativas de oxigênio

SDS: Dodecil sulfato de sódio

SFB: Soro fetal bovino

TFD: Terapia fotodinâmica

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Diagrama de Jablonski**..... 19
- Figura 2: Azul de metileno – agregação e fotoquímica.** Esquerda: Espectros de absorção do monômero (azul) e dímero (vermelho) do azul de metileno.<sup>15</sup> Direita: Reações fotoquímicas do azul de metileno.  $AM^+$ ,  $^1AM^+$ ,  $^3AM^+$  são o azul de metileno no estado fundamental, no estado singlete excitado e triplete excitado, respectivamente.  $AM^\bullet$  e  $AM^{2+\bullet}$  são radicais do azul de metileno semi-reduzido e semi-oxidado, respectivamente;  $\Omega_1$  é a absorção da luz;  $\phi_f$ ,  $\phi_{nr}$ ,  $\phi_T$  são rendimentos quânticos de fluorescência, não radiativo e triplete, respectivamente. As reações representam: (1) o decaimento espontâneo do  $^3AM^+$ , (2) reação do  $^3AM^+$  com o oxigênio molecular, (3) supressão redox depois da excitação do dímero no estado fundamental, (4) oxidação do  $AM^\bullet$  pelo oxigênio molecular retornando ao estado fundamental e gerando radical superóxido e (5) dimerização do  $AM^+$  no estado fundamental.<sup>13</sup>..... 20
- Figura 3. Características morfológicas da apoptose** <sup>23</sup>..... 22
- Figura 4: Vias da Apoptose.** Representação da via intrínseca e extrínseca da morte celular programada. <sup>18</sup>..... 24
- Figura 5: Mecanismo da autofagia.**<sup>18</sup>..... 25
- Figura 6: Estrutura Química dos Fotossensibilizadores estudados.**  
..... 26
- Figura 7: Hidrólise e oxidação do DCFDA** ..... 29
- Figura 8: Esquema reacional do método de Griess** <sup>32</sup>..... 30
- Figura 9: Histogramas das amostras marcadas com DCFDA após TFD.** As células foram tratadas com A) Controle; B) AA 6  $\mu\text{mol/L}$ ; C) AB 2  $\mu\text{mol/L}$ ; D) AM 1  $\mu\text{mol/L}$  em DMEM 1% SFB por 3 horas e expostas à radiação por 12 minutos e 20 segundos utilizando um sistema LED emitindo em  $639 \pm 10 \text{ nm}$ , com irradiância de  $2,9\text{mW/cm}^2$ , exposição radiante final de  $7 \text{ J/cm}^2$ ..... 33
- Figura 10: Produção de espécies reativas de oxigênio.** As células foram tratadas com AM 1  $\mu\text{mol/L}$ , Azure A 6  $\mu\text{mol/L}$  e Azure B 2  $\mu\text{mol/L}$  em DMEM 1% SFB por 3 horas. A placa foi exposta à radiação por 12 minutos e 20 segundos utilizando um sistema LED emitindo em  $639 \pm 10 \text{ nm}$ , com irradiância de  $2,9\text{mW/cm}^2$ , exposição radiante final de  $7 \text{ J/cm}^2$ ..... 34
- Figura 11: Dosagem indireta da produção de óxido nítrico pelo método de Griess após 3h (A) e 24h (B) da irradiação.** As células foram tratadas com AM 1  $\mu\text{mol/L}$ , Azure A 6  $\mu\text{mol/L}$  e Azure B 2  $\mu\text{mol/L}$  em DMEM 1% SFB por 3 horas. A placa foi exposta à radiação por 12 minutos e 20 segundos utilizando um sistema LED emitindo em  $639 \pm 10 \text{ nm}$ , com irradiância de  $2,9\text{mW/cm}^2$ , exposição radiante final de  $7 \text{ J/cm}^2$ ..... 34
- Figura 12: Imagens de microscopia de fluorescência de células marcadas com AO/PI 3 h após TFD.** As células foram tratadas com AM 1  $\mu\text{mol/L}$ , Azure A 6  $\mu\text{mol/L}$  e Azure B 2  $\mu\text{mol/L}$  em DMEM 1% SFB por 3 horas. A placa foi exposta à radiação por 40 minutos utilizando um sistema LED emitindo em  $639 \pm 10 \text{ nm}$ ,



com irradiância de 2,9mW/cm<sup>2</sup>, exposição radiante final de 7 J/cm<sup>2</sup>. A marcação foi realizada com AO/PI 2,0 µg/mL..... 36

**Figura 13: Imagens de microscopia de fluorescência de células marcadas com AO/PI 24 h após TFD.** As células foram tratadas com AM 1 µmol/L, Azure A 6 µmol/L e Azure B 2 µmol/L em DMEM 1% SFB por 3 horas. A placa foi exposta à radiação por 40 minutos utilizando um sistema LED emitindo em 639 ± 10 nm, com irradiância de 2,9mW/cm<sup>2</sup>, exposição radiante final de 7 J/cm<sup>2</sup>. A marcação foi realizada com AO/PI 2,0 µg/mL..... 37

**Figura 14: Imagens de microscopia de fluorescência de células marcadas com AO/PI 48h após TFD.** As células foram tratadas com AM 1 µmol/L, Azure A 6 µmol/L e Azure B 2 µmol/L em DMEM 1% SFB por 3 horas. A placa foi exposta à radiação por 40 minutos utilizando um sistema LED emitindo em 639 ± 10 nm, com irradiância de 2,9mW/cm<sup>2</sup>, exposição radiante final de 7 J/cm<sup>2</sup>. A marcação foi realizada com AO/PI 2,0 µg/mL..... 38

**Figura 15: Contagem de células PI(+), 3, 24 e 48h após TFD.** As células foram tratadas com AM 1 µmol/L, Azure A 6 µmol/L e Azure B 2 µmol/L em DMEM 1% SFB por 3 horas. A placa foi exposta à radiação por 40 minutos utilizando um sistema LED emitindo em 639 ± 10 nm, com irradiância de 2,9mW/cm<sup>2</sup>, exposição radiante final de 7 J/cm<sup>2</sup>. Contagem de 25 fotos, em 3 experimentos independentes. \*p<0,05 em relação ao CT, #p<0,05 em relação ao AM..... 39

**Figura 16: Ensaio de Viabilidade Celular MTT, NR, CV para os FS no IC<sub>50</sub> avaliados 3h após a irradiação.** As células foram tratadas com AM 1 µmol/L, Azure A 6 µmol/L e Azure B 2 µmol/L em DMEM 1% SFB por 3 horas. A placa foi exposta à radiação por 40 minutos utilizando um sistema LED emitindo em 639 ± 10 nm, com irradiância de 2,9mW/cm<sup>2</sup>, exposição radiante final de 7 J/cm<sup>2</sup>. \*p<0,05 em relação ao CT, #p<0,05 em relação ao AM..... 40

**Figura 17: Ensaio de Viabilidade Celular MTT, NR, CV para os FS no IC<sub>50</sub> avaliados 24h após a irradiação.** As células foram tratadas com AM 1 µmol/L, Azure A 6 µmol/L e Azure B 2 µmol/L em DMEM 1% SFB por 3 horas. A placa foi exposta à radiação por 40 minutos utilizando um sistema LED emitindo em 639 ± 10 nm, com irradiância de 2,9mW/cm<sup>2</sup>, exposição radiante final de 7 J/cm<sup>2</sup>. \*p<0,05 em relação ao CT, #p<0,05 em relação ao AM, \$p<0,05 em relação ao AA..... 41

**Figura 18: Ensaio de Viabilidade Celular MTT, NR, CV para os FS no IC<sub>50</sub> avaliados 48h após a irradiação.** As células foram tratadas com AM 1 µmol/L, Azure A 6 µmol/L e Azure B 2 µmol/L em DMEM 1% SFB por 3 horas. A placa foi exposta à radiação por 40 minutos utilizando um sistema LED emitindo em 639 ± 10 nm, com irradiância de 2,9mW/cm<sup>2</sup>, exposição radiante final de 7 J/cm<sup>2</sup>. \*p<0,05 em relação ao CT, #p<0,05 em relação ao AM..... 42

**Figura 19: Unidades arbitrárias de autofagia (AAU) 3, 24 e 48h após a irradiação.** As células foram tratadas com AM 1 µmol/L, Azure A 6 µmol/L e Azure B 2 µmol/L em DMEM 1% SFB por 3 horas. A placa foi exposta à radiação por 40 minutos utilizando um sistema LED emitindo em 639 ± 10 nm, com irradiância de 2,9mW/cm<sup>2</sup>, exposição radiante final de 7 J/cm<sup>2</sup>. \*p<0,05 em relação ao CT, #p<0,05 em relação ao AM..... 43

**Figura 20: Gráficos de pontos para marcação dupla de Rodamina 123 e iodeto de propídeo.** As células foram tratadas com A) Controle; B) AA 6  $\mu\text{mol/L}$ ; C) AB 2  $\mu\text{mol/L}$ ; D) AM 1  $\mu\text{mol/L}$  em DMEM 1% SFB por 3 horas e expostas à radiação por 12 minutos e 20 segundos utilizando um sistema LED emitindo em  $639 \pm 10 \text{ nm}$ , com irradiância de  $2,9\text{mW/cm}^2$ , exposição radiante final de  $7 \text{ J/cm}^2$  ..... 44

**Figura 21: Potencial de membrana mitocondrial 3h após a irradiação.** As células foram tratadas com AM 1  $\mu\text{mol/L}$ , Azure A 6  $\mu\text{mol/L}$  e Azure B 2  $\mu\text{mol/L}$  em DMEM 1% SFB por 3 horas. A placa foi exposta à radiação por 40 minutos utilizando um sistema LED emitindo em  $639 \pm 10 \text{ nm}$ , com irradiância de  $2,9\text{mW/cm}^2$ , exposição radiante final de  $7 \text{ J/cm}^2$ ,  $n=3$ .  $*p<0,05$  em relação ao CT. .... 45

## 1. JUSTIFICATIVA DO TRABALHO

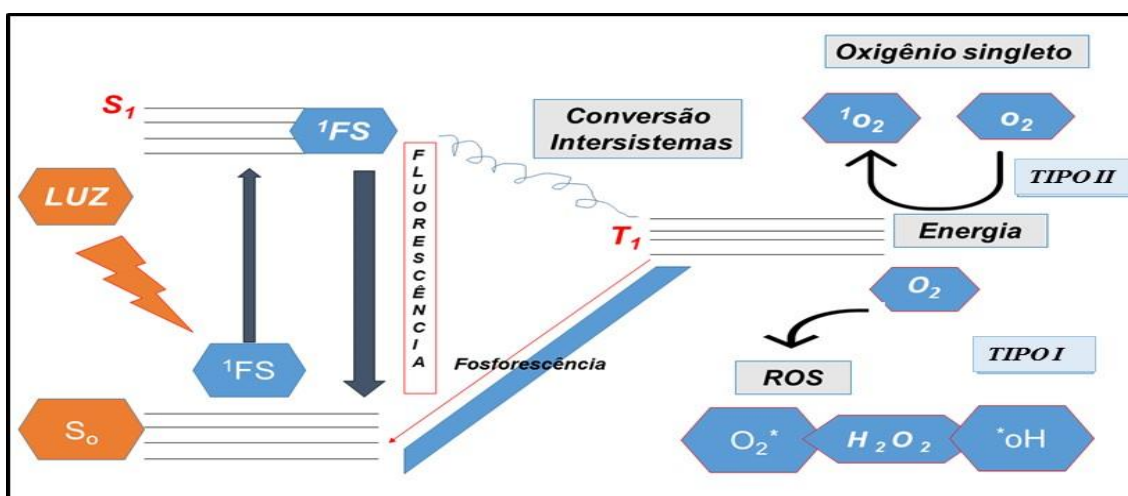
A terapia fotodinâmica é uma terapia promissora para o tratamento de cânceres. Porém, ainda existem muitos pontos a serem melhor compreendidos para que a terapia possa ser utilizada de maneira efetiva. Inicialmente acreditava-se que para uma maior ação da terapia, o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, especialmente o oxigênio singlete, seria essencial. Com o tempo, viu-se que este parâmetro está relacionado com a morte celular, porém, outros parâmetros como a agregação, localização celular do fotossensibilizador, tipo de alvo celular e subproduto de oxidação gerado são também importantes. Desta forma, cada vez mais torna-se necessário compreender a relação entre a estrutura e a atividade dos fotossensibilizadores para que seja possível potencializar o efeito da terapia em doenças cujo tratamento ainda seja difícil, caro e nem sempre efetivo.

Este trabalho deu continuidade à um trabalho anterior do grupo, em que uma série de compostos fenotiazínicos foi estudada em termos da capacidade em causar a morte de células de linhagem de carcinoma por terapia fotodinâmica. No estudo anterior verificou-se que os compostos mais efetivos eram aqueles que apresentavam menor agregação, pois, em meio orgânico a produção de oxigênio singlete era elevada, enquanto em meio aquoso (em que ocorre agregação) a produção de oxigênio singlete era reduzida. Porém, ainda não havia sido estabelecida uma relação da agregação com a morte celular, de modo que este se tornou o ponto inicial para o desenvolvimento deste estudo.

## 2. CONTEXTUALIZAÇÃO

A terapia fotodinâmica (TFD) é uma técnica promissora nas diferentes áreas da saúde, entre elas, a odontologia e a medicina, e tem sido estudada na inativação de micro-organismos e no tratamento de diversos tipos de câncer<sup>1-5</sup>. Esta técnica baseia-se no uso de um agente fotossensibilizador (FS) que, após absorção da luz visível, gera espécies reativas de oxigênio que culminam em seu efeito citotóxico (**Figura 1**). A absorção de um fóton de luz promove a excitação do FS do estado fundamental para o estado excitado singlete. Neste estado, o FS pode regressar ao estado fundamental por emissão de fluorescência ou passar ao estado excitado tripleto, onde pode interagir com o oxigênio molecular de duas formas distintas: transferência de elétrons (reação tipo I) levando à formação de radicais, e transferência de energia (reação do tipo II) levando à formação de oxigênio singleto<sup>6</sup>.

Devido às reações do Tipo I e Tipo II, as espécies oxidativas são produzidas, levando à oxidação de biomoléculas essenciais à homeostase celular.<sup>7</sup>

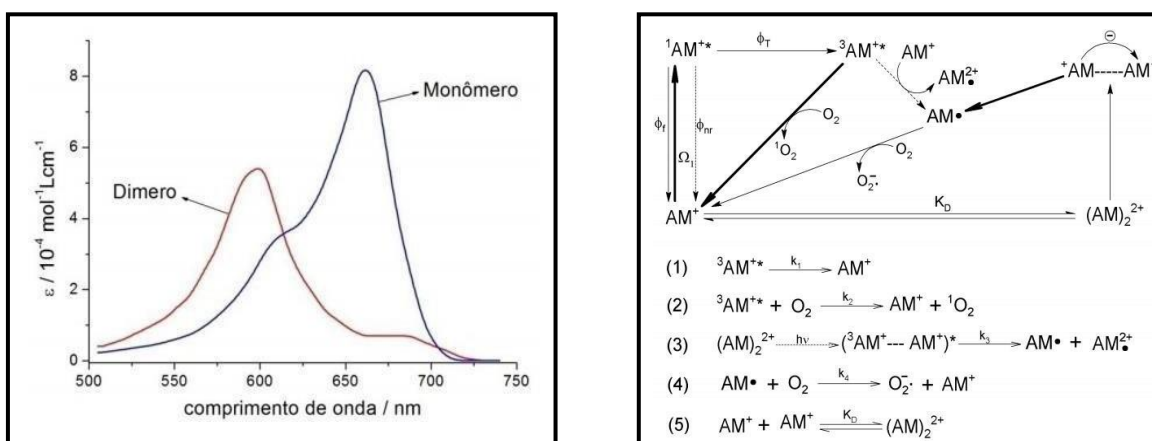


**Figura 1: Diagrama de Jablonski.**

Diversas novas moléculas têm sido desenvolvidas e estudadas como FS, porém, muitas delas apresentam elevado custo<sup>8-10</sup>. Por se tratar de um FS com baixo custo, o Azul de Metileno AM tem sido um agente muito investigado no Brasil. Na área da odontologia, por exemplo, o AM tem sido investigado como FS para terapia antimicrobiana induzindo de 95 a 99% de taxa de redução de

espécies como *A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis*, *P. intermedia* e *Streptococcus sanguis*<sup>11</sup>. Também foi relatado efeito em bactérias periodontais patogênicas<sup>12</sup>. Em termos de tratamento antitumoral, foi relatado tratamento de tumor subcutâneo xenotransplantado (adeno-carcinoma, G-3) em camundongos utilizando AM 1% e subsequente irradiação a 662 nm com 100 J/cm<sup>2</sup> que levou à completa destruição do tumor em 79% dos animais tratados<sup>6</sup>.

O AM apresenta peculiaridades em termos de suas propriedades físico-químicas e fotoquímicas, formando agregados dependendo do meio em que está veiculado<sup>13,14</sup>. O espectro de absorção pode ser utilizado para identificação das formas agregada e não agregada do AM, uma vez que o monômero apresenta máximo de absorção em 664nm e o dímero 590nm<sup>15</sup>. Além disso, de acordo com o seu estado de agregação o AM age fotoquimicamente por mecanismos diferentes. Quando em monômeros, AM eletronicamente excitado resulta na produção de oxigênio singlete; enquanto na forma de dímeros, há formação de radicais<sup>16</sup>.



**Figura 2: Azul de metileno – agregação e fotoquímica.** Esquerda: Espectros de absorção do monômero (azul) e dímero (vermelho) do azul de metileno.<sup>15</sup> Direita: Reações fotoquímicas do azul de metileno.  $AM^+$ ,  $^1AM^{+*}$ ,  $^3AM^{+*}$  são o azul de metileno no estado fundamental, no estado singlete excitado e triplete excitado, respectivamente.  $AM^\bullet$  e  $AM^{2+\bullet}$  são radicais do azul de metileno semi-reduzido e semi-oxidado, respectivamente;  $\Omega_1$  é a absorção da luz;  $\phi_f$ ,  $\phi_{nr}$ ,  $\phi_T$  são rendimentos quânticos de fluorescência, não radiativo e triplete, respectivamente. As reações representam: (1) o decaimento espontâneo do  $^3AM^{+*}$ , (2) reação do  $^3AM^{+*}$  com o oxigênio molecular, (3) supressão redox depois da excitação do dímero no estado fundamental, (4) oxidação do  $AM^\bullet$  pelo oxigênio molecular retornando ao estado fundamental e gerando radical superóxido e (5) dimerização do  $AM^+$  no estado fundamental.<sup>13</sup>

As propriedades do AM são amplamente conhecidas, no entanto, ainda há pouco a respeito de outras fenotiazinas, como o Azure A (AA) e Azure B (AB). Recentemente, em nosso grupo de pesquisa, foi verificado que a agregação das

fenotiazinas é um parâmetro determinante na efetividade do FS, sendo que, quanto menor a agregação, maior será a efetividade<sup>17</sup>. Comparando, AA, AB e AM, a efetividade aumenta na série AA<AB<AM devido à redução da agregação. Diante das diferenças observadas na efetividade destas fenotiazinas, é possível também que possam existir diferenças em termos das respostas celulares induzidas após TFD. Vários estudos têm mostrado que diversos mecanismos de morte celular podem ser desencadeados por TFD: Necrose, apoptose, autofagia e paraptose<sup>18,19</sup>.

A morte celular através da necrose apresenta algumas características específicas, entre elas; aumento do volume celular, agregação da cromatina, desorganização do citoplasma, edema das organelas, diminuição da capacidade para manter a concentração de ATP, perda da integridade da membrana plasmática e consequente ruptura celular. Células com a membrana citoplasmática lesionada, ou seja, sem homeostase, ficam impossibilitadas de manter ou gerar o gradiente de potencial eletroquímico que origina o potencial de membrana. De acordo com estas circunstâncias, é totalmente possível determinar a integridade da membrana através da retenção ou exclusão de corantes como o iodeto de propídeo, (PI)<sup>20</sup>. A sua ligação direta no DNA permite a comprovação da morte celular. No processo de morte celular por necrose, o conteúdo celular extravasa no tecido, provocando reação inflamatória local. Necrose pode ser considerada um tipo de morte acidental, isto é, uma resposta passiva ao dano celular, porém, alguns estudos mais recentes, demonstram que a necrose também pode ser regulada geneticamente (necroptose)<sup>8,21</sup>.

Apoptose é um mecanismo controlado de morte, que depende de ATP para ocorrer. Durante esse processo, a célula sofre alterações na sua morfologia que são características desse tipo de morte celular: diminuição de volume, diminuição de aderência com a matriz extracelular e células próximas, condensação da cromatina, divisão internucleossômica do DNA e formação dos corpos apoptóticos<sup>22</sup> (**FIGURA 3**). A apoptose pode ser desencadeada por via extrínseca e intrínseca. **Via extrínseca:** Esta via é desencadeada pela ligação específica a um grupo de receptores de membrana da superfamília dos receptores de fatores de necrose tumoral (rTNF). Todos os membros da família rTNF tem a posse de um subdomínio extracelular rico em cisteína que permitem a identificação de seus ligantes. A porção citoplasmática desses receptores, que

contém uma sequência de 65 aminoácidos chamada "domínio de morte" dão sequência à sinalização. Desta forma, esta ligação é capaz de ativar a cascata das caspases. Inicialmente ocorre a ativação da caspase-8, que na sequência irá ativar a caspase-3, efetivando a morte por apoptose. **Via intrínseca:** Esta via é ativada por estresse intracelular ou extracelular como a contenção de fatores de crescimento, danos no DNA, diminuição da taxa de oxigênio (hipóxia) ou ativação de oncogênese. Os sinais que são promovidos em resposta a estes danos ocorrem principalmente para a mitocôndria.<sup>18</sup>

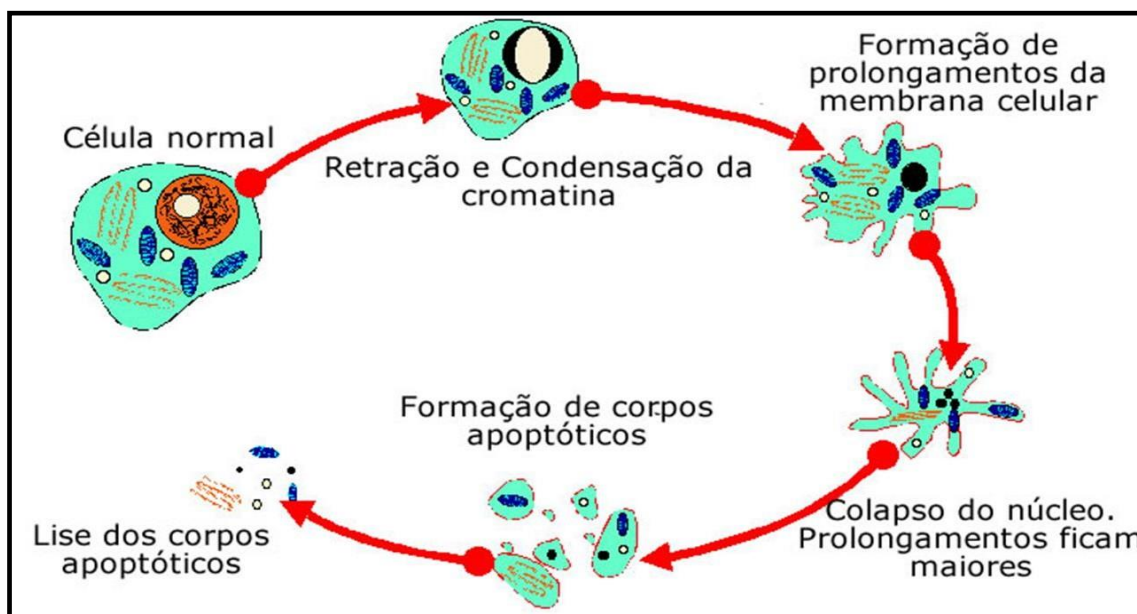


Figura 3. Características morfológicas da apoptose <sup>23</sup>.

O potencial de membrana mitocondrial é gerado pela diferença de concentrações de íons no interior e no exterior da mitocôndria e, como componente do gradiente eletroquímico, está totalmente relacionado com a formação de ATP na célula<sup>2420</sup>. A transferência de elétrons ao longo da cadeia transportadora é acompanhada pela passagem forçada de prótons transmembrana mitocondrial e a energia inerente nesta diferença de concentração de prótons, a força próton-motora, remete uma conservação de parte da energia da oxidação, posteriormente utilizada na formação de ATP. Foi identificado que a absorção de fótons de luz pela cadeia transportadora de elétrons levaria à elevação da força próton-motora, intensificando o potencial de membrana mitocondrial.<sup>25</sup> As mitocôndrias demonstram constante potencial

transmembrana ( $\Delta\psi$ ) ao redor  $-180$  mV gerada por bombas de prótons dos íons acoplados a cadeia de transporte de elétrons<sup>9</sup>. A magnitude do  $\Delta\psi$  é em torno de seis vezes superior ao potencial transmembrana presente em membranas citoplasmáticas<sup>9</sup>. Este potencial é força motora para direcionamento de FS catiônicos para a mitocôndrias.

Certas vias de apoptose são desencadeadas por TFD quando se envolve receptores de morte por membrana plasmática, mitocôndrias, lisossomos, retículo endoplasmático, caspases e proteínas da família Bcl2. Grande parte dos FS utilizados na TFD se localizam em mitocôndrias, lisossomos e/ou demais membranas intracelulares.<sup>23</sup> A fotoativação de determinado FS quando localizado em mitocôndria determina a liberação do citocromo c, que de certa forma, deverá ou não necessariamente ser acompanhada por perda do potencial da membrana mitocondrial e abertura da PTPC (complexo de poros de transição de permeabilidade).<sup>18</sup> O citocromo c liberado é participante do complexo apoptosoma, para então, gerar a caspase-9 ativada, que por sua vez, cliva e ativa a caspase 3. A caspase 3 é a principal efetora e responsável pela clivagem das demais caspases, em especial as caspases 6, 7 e 8. As caspases efetoras fragmentam numerosas proteínas, incluindo lâminas nucleares, desta forma, ocasionando a quebra nuclear; PARP e DNA-PK, levando a uma inibição de reparação do DNA; ICAD, liberando CAD ativo para degradar o DNA e outras proteínas que atuam na estrutura celular e adesão. Uma outra importante fase, do processo apoptótico envolve a degradação do DNA, via de ativação de endonucleases, desintegração nuclear e formação de “corpos apoptóticos”. Estes corpos apoptóticos são removidos de forma muito rápida e efetiva do tecido pelos macrófagos. Este processo é sinalizado pela translocação da fosfatidilserina do lado interno para o lado externo da bicamada lipídica da membrana membrana celular.<sup>26</sup>

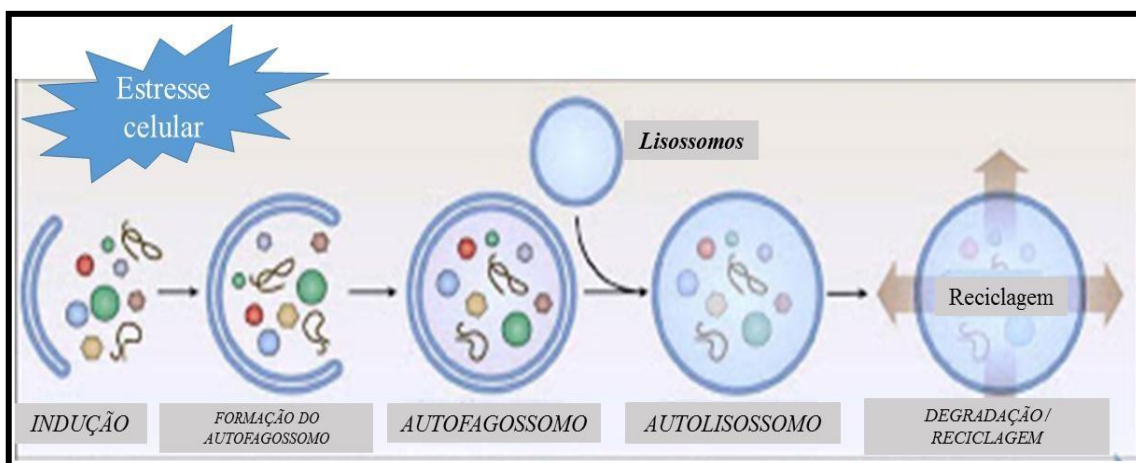
Nas situações em que os receptores de morte da superfície celular Fas e TNFR participam, a ligação aos respectivos ligantes ocasiona à ativação da caspase-8, o que deverá resultar na ativação da caspase 3 mesmo que não ocorra o envolvimento da mitocôndria. Caspase-8 fragmenta o homólogo Bcl-2 para ocorrer a fragmentação pró-apoptotico tBid que pode ter ação sobre as mitocôndrias para levar a liberação do citocromo c.





condensação da membrana plasmática, a ativação da caspase-3, a fragmentação do DNA e a vacuolização citoplasmática. Diversos estudos analisaram processos similares paraptóticos em vários modelos, mas os tipos de mecanismos subentendidos à paraptose, em especial os sinais responsáveis pelo processo de desenvolvimento da vacuolização citoplasmática ainda não obtiveram resultados efetivos. Porém, é entendido que quando ocorre a sinalização no retículo endoplasmático este importante modelo de morte celular é bem aparente. A vacuolização ocorre de maneira progressiva indicando uma ruptura no retículo endoplasmático, levando a este modelo de morte celular, estes vacúolos se apresentam de forma ácida, desta forma, facilitando a degradação das estruturas celulares prejudicadas.<sup>28,29</sup>

A Autofagia é um processo catabólico muito importante para a manutenção do sistema de equilíbrio celular (homeostase), onde lisossomos digerem o conteúdo celular danificado, como organelas e proteínas. Inicialmente uma membrana envolve a estrutura a ser degradada (autofagossomo - **Figura 5**). Logo após, a fusão com um lisossomo forma o autolisossomo, onde efetivamente ocorre a degradação do conteúdo. Mesmo entendendo que a autofagia atua em um nível basal, conduzido pelas proteínas Atg (autofagia-relacionado), um grande número de fatores que desencadeiam estresse celular pode ativá-lo. De acordo com a extensão desta ativação, a autofagia deve desencadear a morte celular<sup>9,23</sup>.

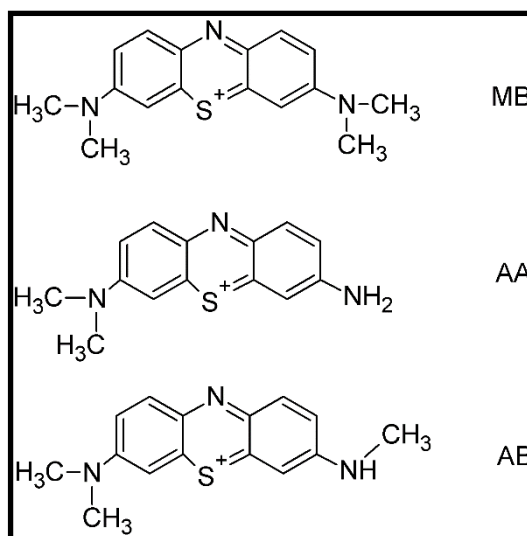


**Figura 5: Mecanismo da autofagia.**<sup>18</sup>

O mecanismo de morte celular desencadeado está associado às organelas que são danificadas durante a TFD bem como, à dose de TFD, isto é,

concentração de FS e energia utilizada. Altas doses da TFD geralmente desencadeiam a morte por necrose, doses intermediárias geram a morte por apoptose, enquanto doses baixas da TFD, induzem a morte por autofagia<sup>8,9</sup>. Em termos das organelas, mitocôndrias e lisossomos são consideradas os alvos principais da TFD. Inicialmente, considerava-se que os danos causados em mitocôndrias estavam diretamente associados à morte por apoptose, através da ativação das caspases. Porém, de acordo com a dose de luz fornecida e a concentração de FS, a extensão do dano nesta organela pode ser exacerbada ou limitada, levando à necrose ou à ativação da autofagia, respectivamente. Lesões em lisossomos também podem levar aos diferentes mecanismos de morte celular citados anteriormente. As elevadas doses de TFD induzem a destruição uniforme desta organela, irá liberar altas concentrações de enzimas lisossomais (como catepsinas B, D, L) no citoplasma, resultando em necrose não regulada. Em contrapartida, o dano parcial aos lisossomos ocasiona a liberação de hidrolases, que são capazes de ativar as proteínas pró-apoptóticas, desta forma, desencadeando a paraptose e/ ou a inibição do fluxo autofágico. Como consequência, este último fenômeno, compromete mecanismos de citoproteção e leva à morte celular autofágica<sup>8</sup>.

Diante deste contexto, considerando a similaridade estrutural entre os FS fenotiazínicos e as diferentes tendências de agregação e efetividade, neste estudo foram investigadas as vias de morte celular pelos FSs Azure A, Azure B e Azul de Metileno (**Figura 6**) após o dano fotoinduzido em células em cultura.



**Figura 6: Estrutura Química dos Fotossensibilizadores estudados.**

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivos Gerais**

O objetivo geral deste estudo é comparar os mecanismos de morte celular induzidos em células neoplásicas em cultura após tratamento das mesmas por Terapia Fotodinâmica com Azure A, Azure B e Azul de Metileno.

#### **3.2 Objetivos específicos:**

Os objetivos específicos deste projeto são:

- Mensurar o estresse oxidativo intracelular fotoinduzido;
- Avaliar a viabilidade celular através de diferentes metodologias (MTT, VN, CV ) e avaliar a presença de indícios de mecanismos de autofagia por meio da determinação das unidades arbitrárias de autofagia (AAU);
- Avaliar de forma qualitativa a presença de indícios dos mecanismos de morte celular por meio da marcação com alaranjado de acridina e Iodeto de Propídeo (vacúolos ácidos característicos de autofagia, condensação de cromatina e a permeabilização da membrana plasmática);
- Avaliar o efeito da terapia fotodinâmica no potencial de membrana mitocondrial por meio da marcação do Rodamina 123 e Iodeto de Propídeo;

## 4. MÉTODOS

### 4.1 Cultura Celular

Para este estudo a linhagem de adenocarcinoma epitelial de cérvix humano, conhecida como HeLa (ATCC – CCL-2) foi cultivada em garrafas de 75 cm<sup>2</sup> em estufa (37° C, 5% CO<sub>2</sub>, ambiente umedecido) no meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM). Este meio foi suplementado com Soro Fetal Bovino (SFB) 10% além de 0,1% de antibióticos penicilina/estreptomicina e antimicótico. Foi realizada uma monitorização rigorosa das células ao microscópio, no mínimo, uma vez a cada dois dias e o meio DMEM 10% foi substituído até a garrafa atingir a 80% da confluência. O subcultivo foi realizado duas vezes na semana e a cada três meses as células eram descartadas e um novo vial da mesma passagem era descongelado.

### 4.2 Medidas de Estresse Oxidativo celular:

#### 4.2.1 *Quantificação de produção de espécies reativas de oxigênio utilizando a sonda DCFDA*

A medida de estresse oxidativo pode ser realizada por meio da quantificação da oxidação da sonda 2',7'- diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFDA). Esta sonda não fluorescente cruza as membranas celulares, é desesterificada a 2',7'- diclorohidrofluoresceína (DCFH) e é transformada em 2',7'- diclorofluoresceína (DCF) com elevada fluorescência logo depois da oxidação (**Figura 7**). Uma grande diversidade de ROS podem oxidar DCFH para DCF <sup>8,30</sup>.

As células foram semeadas em placas de 12 poços na densidade de (1x10<sup>5</sup> cels/poço). As células foram tratadas com FSs por 3 horas nas concentrações de seu IC<sub>50</sub> (1 µmol/L AM, 6 µmol/L AA e 2 µmol/L AB, em DMEM 1% SFB). Após 2,5 horas de incubação com os FSs (isto é, 30 minutos antes do término da incubação) adicionamos DCFDA para atingir uma concentração final de 5.0 µmol/L, mantendo sob incubação por adicionais 30 minutos. Após a finalização da incubação, os sobrenadantes foram retirados e as células foram lavadas com PBS. A placa foi exposta à radiação durante um período de 12 minutos e 20 segundos utilizando um sistema LED emitindo em 639 ± 10 nm, com irradiância de 2,9mW/cm<sup>2</sup>, chegando a uma exposição radiante final de 7

J/cm<sup>2</sup>. Ao término da irradiação, as células foram tripsinizadas e realizamos a leitura em citômetro de fluxo Accuri C6 BD no filtro FL1 505-520nm. A porcentagem de aumento nas espécies reativas de oxigênio foi calculada em função do controle (células sem tratamento com FS)<sup>12</sup>. Foram realizados 3 experimentos independentes.

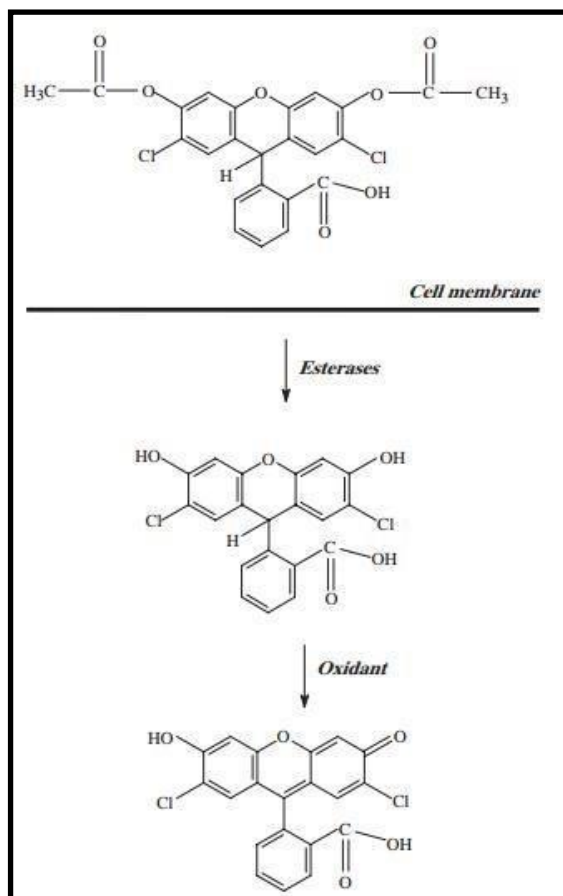


Figura 7: Hidrólise e oxidação do DCFDA

#### 4.2.2 Dosagem da síntese de óxido nítrico (NO)

Utiliza-se o método de Griess para dosagem de NO, uma vez que o mesmo permite a quantificação de nitritos, produtos de oxidação estáveis do metabolismo do NO, nos sobrenadantes do meio de culturas celulares. O método baseia-se na reação do nitrito com a sulfanilamida em meio ácido que resulta em um sal de diazônio, reagindo com o cloridrato de N-(1-naftil) etilenodiamina levando à formação de um composto de coloração rósea, cuja intensidade de cor é diretamente proporcional à concentração de nitrito na amostra<sup>12</sup> (**Figura 8**). Os procedimentos de semeadura das células, incubação com os FSs e

irradiação foram os mesmos descritos anteriormente. Uma amostra de 50  $\mu$ L do sobrenadante de cada poço recebeu o reagente de Griess (1% de sulfanilamida (SA), 0,1% de dihidrocloreto de N-1-naftilenodiamina (NED) e 2,5% de ácido orto-fosfórico) e foi determinada a absorbância em 540nm em um leitor de microplacas, utilizando-se como branco meio de cultura e reagente de Griess. Foi utilizada uma curva padrão com nitrito de sódio para a determinação da concentração de nitritos em cada amostra<sup>31</sup>.

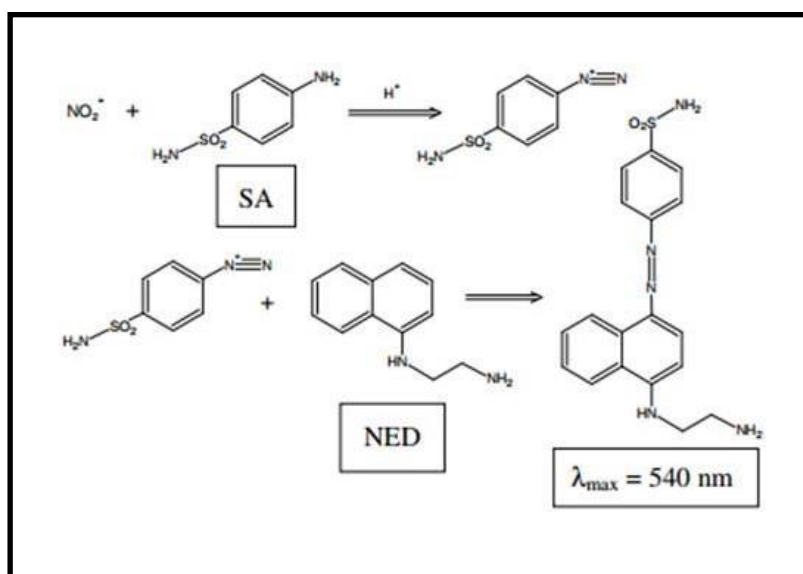


Figura 8: Esquema reacional do método de Griess <sup>32</sup>

### 4.3 Mecanismos de Morte Celular

Todos os experimentos descritos abaixo iniciaram-se pelo tratamento das células com os FSs por 3 horas nas concentrações de seu  $\text{IC}_{50}$  (1  $\mu\text{mol/L}$  AM, 6  $\mu\text{mol/L}$  AA e 2  $\mu\text{mol/L}$  AB, em DMEM 1% SFB). Ao finalizar a incubação as células foram lavadas e mantidas em PBS e a placa foi submetida à irradiação como descrito anteriormente<sup>17</sup>

#### 4.3.1 Marcação de Alaranjado de Acridina e Iodeto de Propídeo (AO/PI)

Em diferentes períodos de tempo após a TFD (3, 24 e 48 horas), o meio DMEM foi aspirado de cada um dos poços da placa e em seguida as células foram lavadas 2 vezes com PBS. Foram adicionados Alaranjado de Acridina e Iodeto de propídeo 2,0  $\mu\text{g/mL}$  em PBS. A placa foi incubada por 10 minutos à

temperatura ambiente e protegida de luz. Por fim, as células foram lavadas em PBS e levadas ao microscópio de fluorescência, ZOE™ Bio-rad Laboratories, Câmera monocromática, CMOS de 12 bits, 5 megapixels para registro das imagens<sup>30</sup>. Após o registro das imagens, foi realizada contagem manual das células marcadas com iodeto de propídeo no programa Image J, NHI.

#### **4.3.2 AAU (MTT, VN e CV)**

Realizou-se a semeadura de 3 placas de 48 poços na densidade de (30.000 cels/poço), sendo uma placa para cada tempo de análise. Após o período de aderência, as células foram tratadas com FSs por 3 horas nas concentrações de seu IC<sub>50</sub> (1 µmol/L AM, 6 µmol/L AA e 2 µmol/L AB, em DMEM 1% SFB). Após a finalização da incubação, os sobrenadantes foram retirados e as células foram lavadas com PBS. A placa foi exposta à radiação durante um período de 12 minutos e 20 segundos utilizando um sistema LED emitindo em  $639 \pm 10$  nm, com irradiância de 2,9mW/cm<sup>2</sup>, chegando a uma exposição radiante final de 7 J/cm<sup>2</sup>. Em períodos de 3, 24 e 48h após a irradiação os diferentes ensaios de viabilidade foram realizados. Para o MTT, as células foram tratadas com MTT 75µg/ mL em DMEM 1% de SFB por 2 horas a 37° C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após este período, a solução de incubação foi retirada e os cristais de formazen foram solubilizados em isopropanol. Por fim, realizou-se a leitura de absorção em espectrofotômetro leitor de placas a 620 nm. Para o ensaio de vermelho neutro, as células foram incubadas com 80 µg/mL de Vermelho Neutro de em DMEM 1% SFB por 2 horas a 37° C e 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida, o meio foi aspirado, as células foram lavadas por duas vezes em PBS e o corante incorporado foi eluído em ácido acético a 1 % (v/v) em solução de etanol a 50 % (v/v) em água. Por fim, realiza-se a leitura de absorbância em 492 nm. Nos mesmos poços em que foi realizado o ensaio de Vermelho Neutro, realizou-se a análise por incorporação de Cristal violeta. As células foram lavadas com água destilada por 2x. Em seguida, as células foram tratadas com solução de CV a 0,02% (m/v) em água destilada por 5 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, o corante foi aspirado, as células lavadas por 2x em água destilada e eluiu-se em solução de citrato de sódio a 0,1 mol/L em etanol a 50% (v/v). Por último, realizou-se a leitura de absorbância em 620 nm (leitor de placas Anthos



2020). O experimento foi realizado em triplicata, em 3 experimentos independentes.

#### **4.3.3 Potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ )**

Duas horas após o tratamento das células com os FSs e irradiação, as células foram tripsinizadas e marcadas com rodamina 123 (1  $\mu\text{g/mL}$ ) por 30 minutos, à temperatura ambiente e no escuro. Em seguida, as células foram marcadas com iodeto de propídeo (1  $\mu\text{g/mL}$ ) por 5 minutos, à temperatura ambiente e no escuro. As células foram avaliadas por citometria de fluxo, sendo que a fluorescência da rodamina é detectada no filtro FL-1 ( $\lambda < 550 \text{ nm}$ ) e o iodeto de propídeo em FL-3 filter (600 nm  $< \lambda < 645 \text{ nm}$ )<sup>30</sup>.

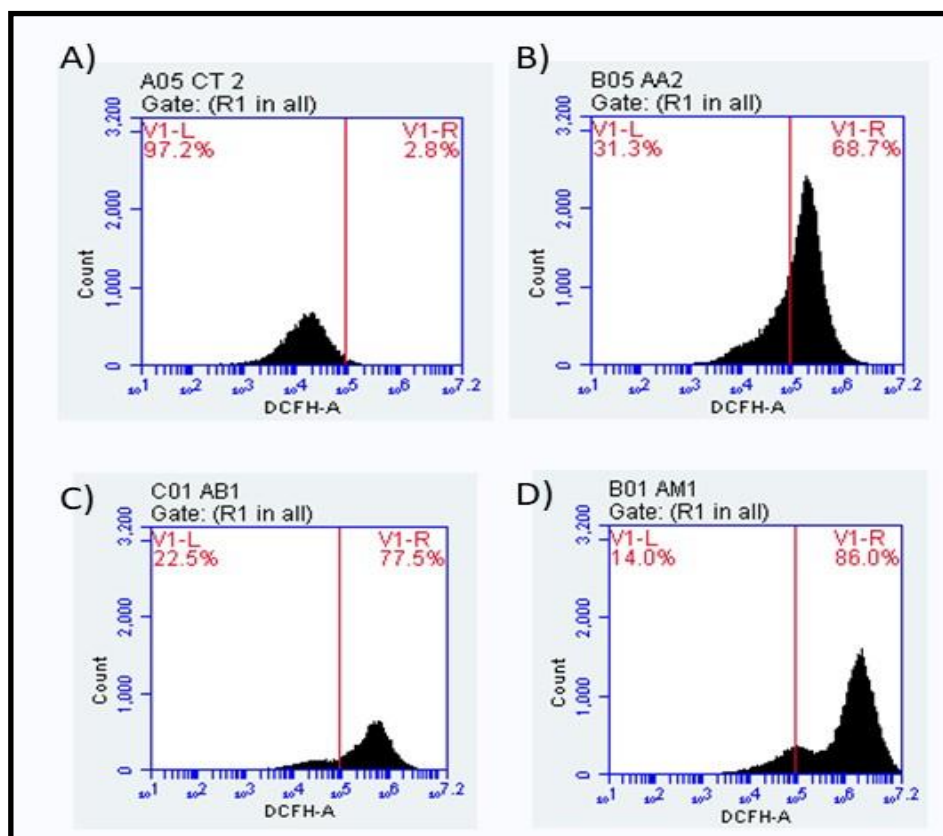
#### **4.3.4 Citometria de Fluxo com Anexina V e Iodeto de Propídeo**

Após o tratamento das células com os FSs e irradiação, as células foram tripsinizadas com tripsina diluída 10x e marcadas com Anexina V-FITC e de iodeto de Propídeo por incubação por 10 minutos a temperatura ambiente e protegida da luz. As células foram avaliadas por citometria de fluxo, sendo que a fluorescência da rodamina é detectada no filtro FL-1 ( $\lambda < 550 \text{ nm}$ ) e o iodeto de propídeo em FL-3 filter (600 nm  $< \lambda < 645 \text{ nm}$ ).

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Quantificação de produção de espécies reativas de oxigênio utilizando a sonda DCFDA

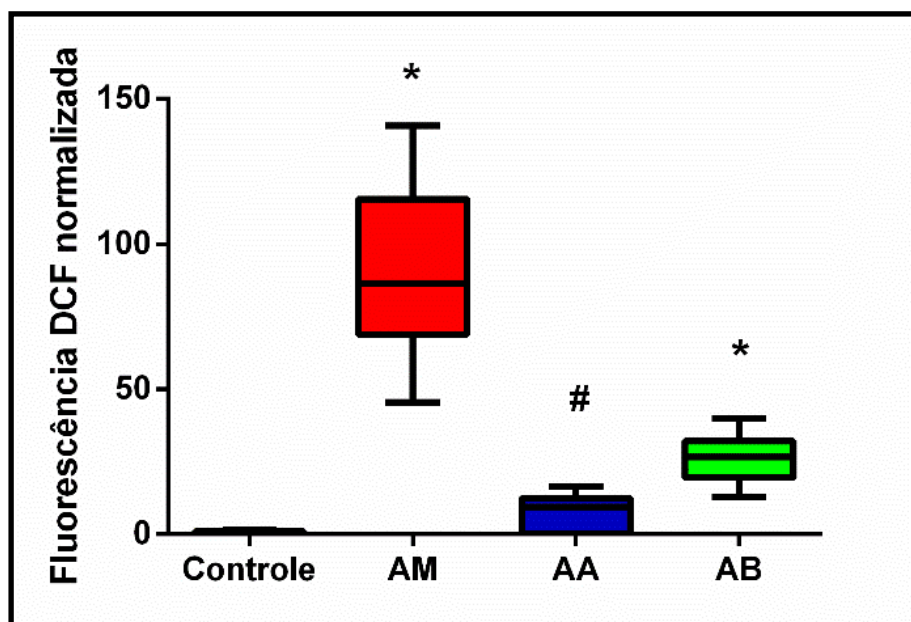
Na **Figura 9** estão apresentados os histogramas representativos das amostras analisadas. É possível verificar que a intensidade média de fluorescência do DCF das amostras tratadas com os FS difere do controle, sendo que o máximo de contagem de eventos está sempre à direita da linha vermelha utilizada como referência para as células tratadas por TFD, enquanto no grupo controle este máximo se encontra do lado esquerdo da linha de referência.



**Figura 9: Histogramas das amostras marcadas com DCFDA após TFD.** As células foram tratadas com A) Controle; B) AA 6  $\mu\text{mol/L}$ ; C) AB 2  $\mu\text{mol/L}$ ; D) AM 1  $\mu\text{mol/L}$  em DMEM 1% SFB por 3 horas e expostas à radiação por 12 minutos e 20 segundos utilizando um sistema LED emitindo em  $639 \pm 10 \text{ nm}$ , com irradiância de  $2,9 \text{ mW/cm}^2$ , exposição radiante final de  $7 \text{ J/cm}^2$ .

Os valores da intensidade média de cada amostra foram normalizados em função do grupo controle, nos 3 experimentos independentes realizados. Ao final, as intensidades de fluorescência foram apresentadas na **Figura 10**. É possível notar que houve aumento na produção de espécies reativas de oxigênio para os tratamentos de TFD em relação ao controle. AM foi o FS que promoveu

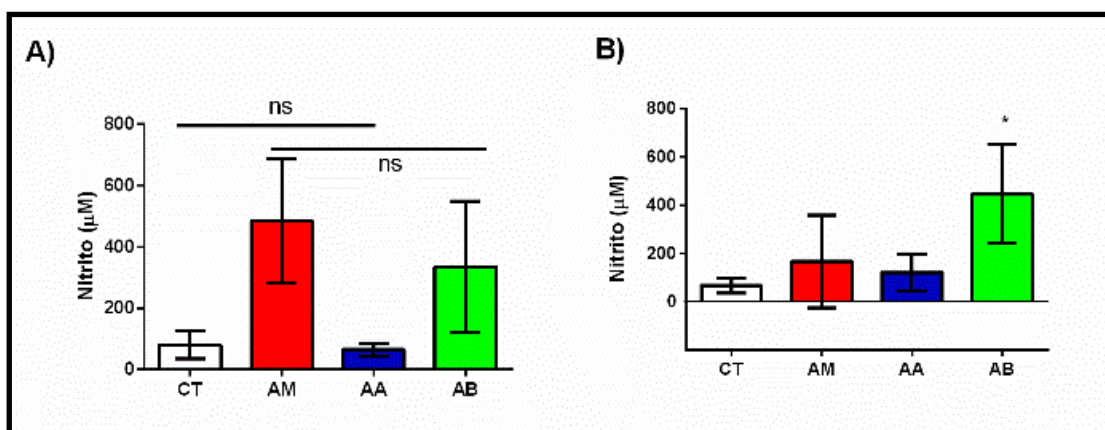
a maior produção de EROs, seguido de AB, enquanto o AA não apresentou diferença estatística em relação ao grupo controle.



**Figura 10: Produção de espécies reativas de oxigênio.** As células foram tratadas com AM 1  $\mu\text{mol/L}$ , Azure A 6  $\mu\text{mol/L}$  e Azure B 2  $\mu\text{mol/L}$  em DMEM 1% SFB por 3 horas. A placa foi exposta à radiação por 12 minutos e 20 segundos utilizando um sistema LED emitindo em  $639 \pm 10$  nm, com irradiância de  $2,9\text{mW/cm}^2$ , exposição radiante final de  $7 \text{ J/cm}^2$ .

## 5.2 Dosagem da síntese de óxido nítrico (NO)

A dosagem de óxido nítrico no sobrenadante foi realizada por meio do método indireto, que envolve a quantificação dos nitritos, que são produtos de oxidação estáveis do NO. A quantificação 3 e 24h após a irradiação das amostras, está apresentada na Figura 11.



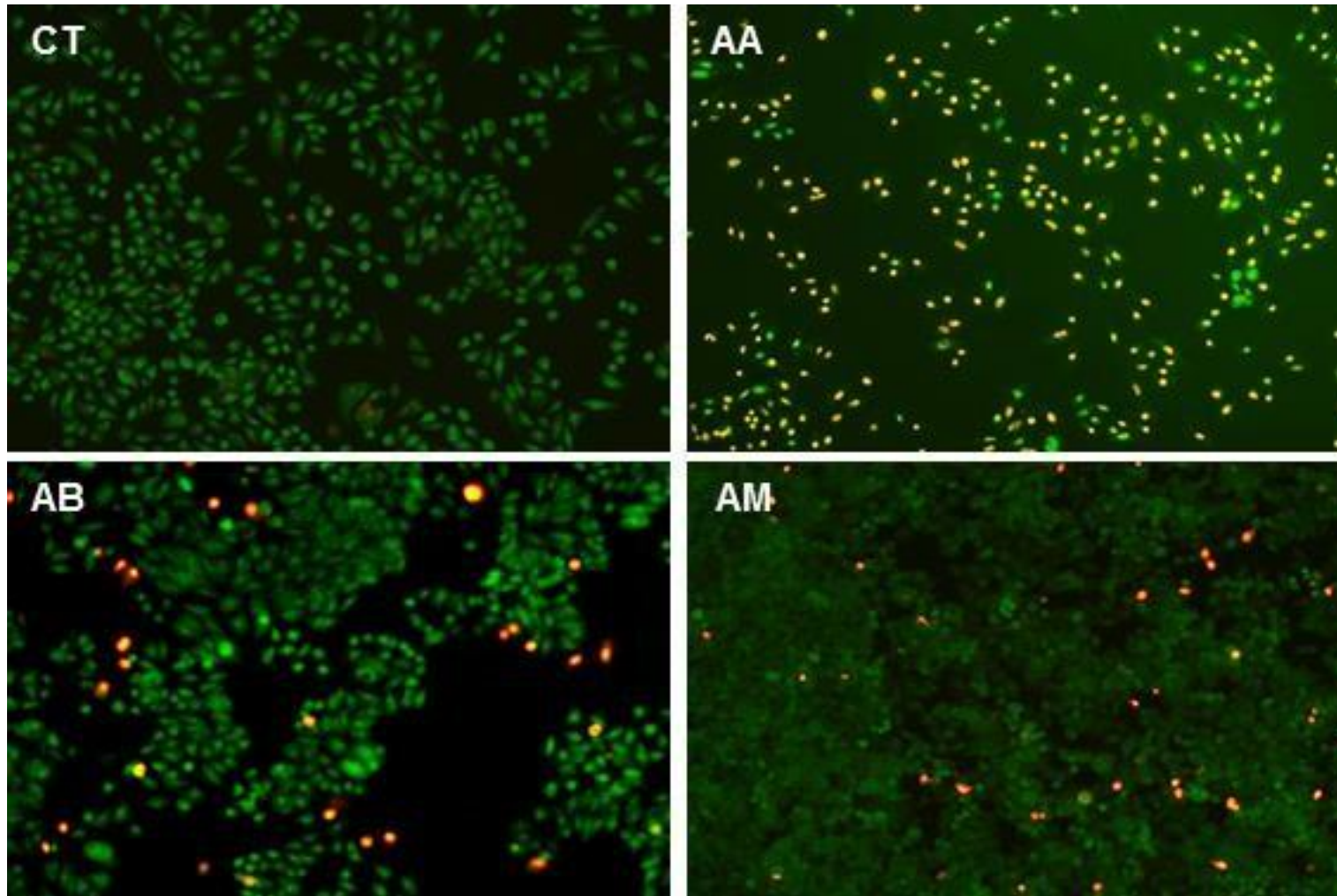
**Figura 11: Dosagem indireta da produção de óxido nítrico pelo método de Griess após 3h (A) e 24h (B) da irradiação.** As células foram tratadas com AM 1  $\mu\text{mol/L}$ , Azure A 6  $\mu\text{mol/L}$  e Azure B 2  $\mu\text{mol/L}$  em DMEM 1% SFB por 3 horas. A placa foi exposta à radiação por 12 minutos e 20 segundos utilizando um sistema LED emitindo em  $639 \pm 10$  nm, com irradiância de  $2,9\text{mW/cm}^2$ , exposição radiante final de  $7 \text{ J/cm}^2$ .

É possível perceber que 3 horas após a irradiação, AB e AM apresentaram maior produção de óxido nítrico que os grupos CT e AA. Por outro lado, 24 horas após a irradiação os níveis de óxido nítrico permaneceram elevados somente no grupo tratado com AB.

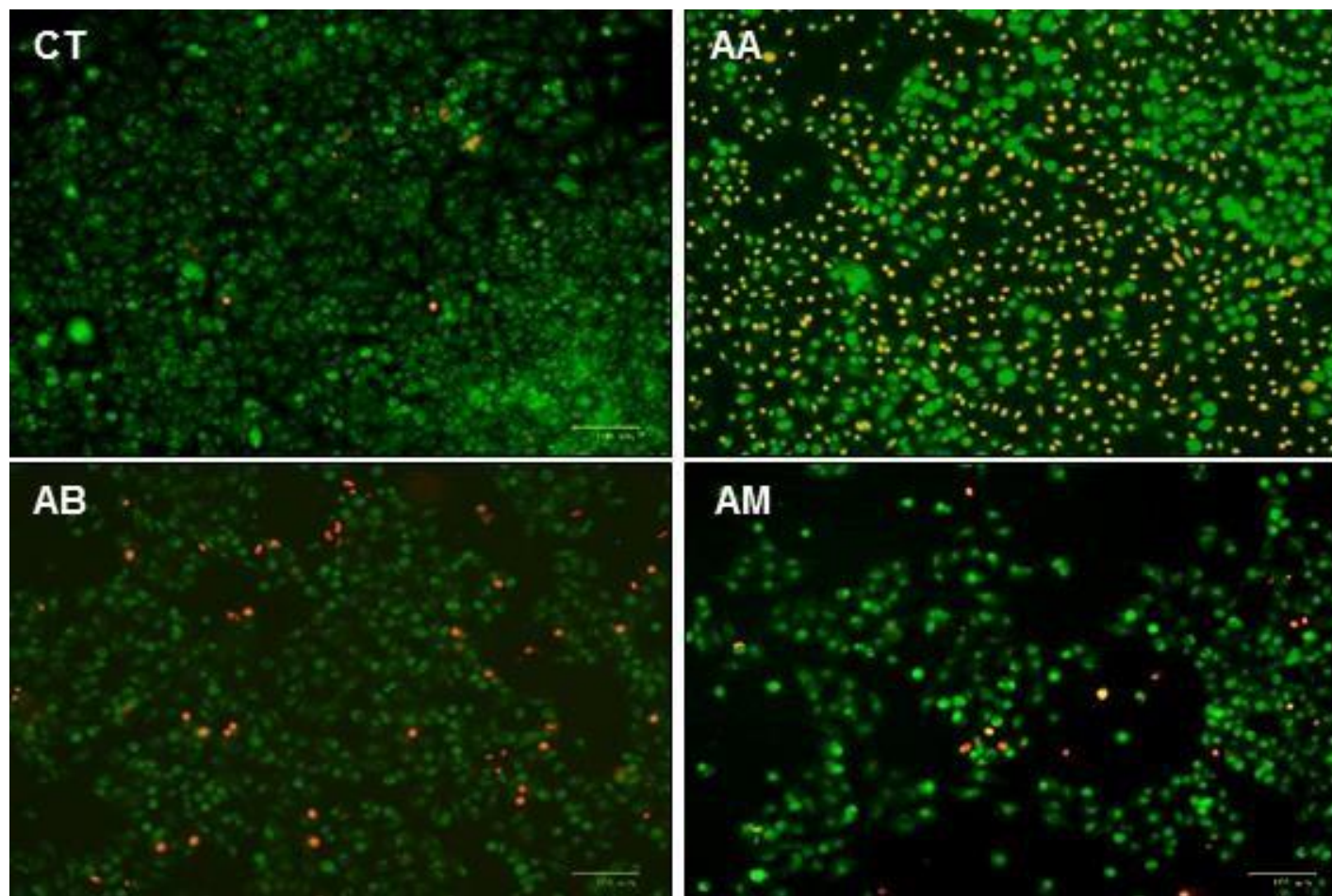
### **5.3 Marcação de Alaranjado de Acridina e Iodeto de Propídeo (AO/PI)**

Foi realizada marcação com AO/PI em 3 tempos diferentes após a irradiação e as fotos obtidas estão apresentadas na Figura 12, Figura 13 e Figura 14 para 3, 24 e 48h após a TFD, respectivamente. É possível notar que existem células que apresentam citoplasma marcado em verde e células marcadas em vermelho, sendo que a proporção entre elas é variável. O Alaranjado de acridina é um corante utilizado para marcar células viáveis, sendo que o mesmo vai emitir fluorescência verde quando estiver no citoplasma e laranja quando em ambiente ácido. Por outro lado, o iodeto de propídeo é somente internalizado por células cuja integridade da membrana plasmática foi comprometida, intercalando-se ao DNA e apresentando fluorescência vermelha<sup>33</sup>. Levando-se em consideração o tempo após a TFD, a coloração apresentada e a morfologia da célula é possível ter indícios os mecanismos de morte celular que estão ocorrendo<sup>33</sup>:

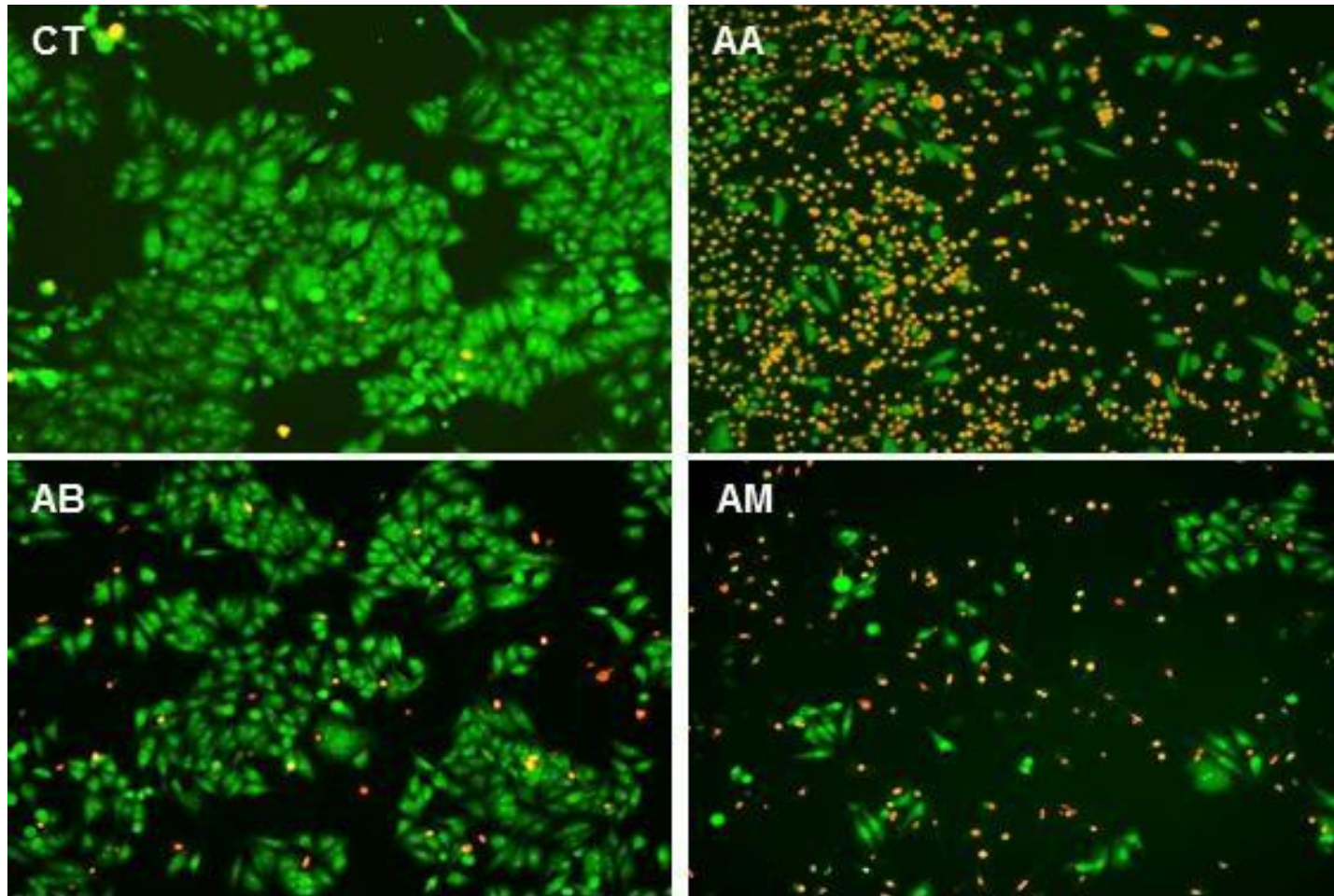
- As células vivas apresentam coloração verde, com núcleo brilhante.
- Células necróticas aparecem com núcleo vermelho, logo nas primeiras horas após a TFD.
- Células em processo inicial de apoptose apresentam coloração verde, mas é possível observar condensação de cromatina perinuclear, com visualização de fragmentos.
- Células no final da apoptose aparecerão com núcleo vermelho.
- Células em processo de autofagia apresentam coloração verde, com presença de vacúolos alaranjados/vermelhos no citoplasma.



**Figura 12:** Imagens de microscopia de fluorescência de células marcadas com AO/PI 3 h após TFD. As células foram tratadas com AM 1  $\mu\text{mol/L}$ , Azure A 6  $\mu\text{mol/L}$  e Azure B 2  $\mu\text{mol/L}$  em DMEM 1% SFB por 3 horas. A placa foi exposta à radiação por 40 minutos utilizando um sistema LED emitindo em  $639 \pm 10 \text{ nm}$ , com irradiância de  $2,9\text{mW/cm}^2$ , exposição radiante final de  $7 \text{ J/cm}^2$ . A marcação foi realizada com AO/PI 2,0  $\mu\text{g/mL}$ .

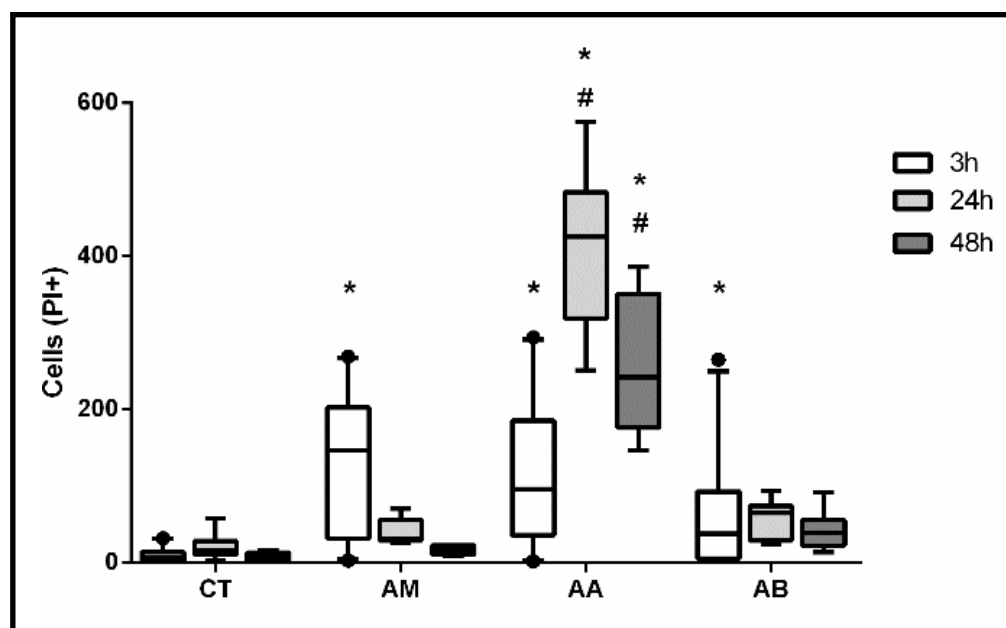


**Figura 13: Imagens de microscopia de fluorescência de células marcadas com AO/PI 24 h após TFD.** As células foram tratadas com AM 1  $\mu\text{mol/L}$ , Azure A 6  $\mu\text{mol/L}$  e Azure B 2  $\mu\text{mol/L}$  em DMEM 1% SFB por 3 horas. A placa foi exposta à radiação por 40 minutos utilizando um sistema LED emitindo em  $639 \pm 10 \text{ nm}$ , com irradiância de  $2,9\text{mW/cm}^2$ , exposição radiante final de  $7 \text{ J/cm}^2$ . A marcação foi realizada com AO/PI 2,0  $\mu\text{g/mL}$ .



**Figura 14: Imagens de microscopia de fluorescência de células marcadas com AO/PI 48h após TFD.** As células foram tratadas com AM 1  $\mu\text{mol/L}$ , Azure A 6  $\mu\text{mol/L}$  e Azure B 2  $\mu\text{mol/L}$  em DMEM 1% SFB por 3 horas. A placa foi exposta à radiação por 40 minutos utilizando um sistema LED emitindo em  $639 \pm 10$  nm, com irradiância de  $2,9\text{mW/cm}^2$ , exposição radiante final de  $7 \text{ J/cm}^2$ . A marcação foi realizada com AO/PI 2,0  $\mu\text{g/mL}$ .

Utilizando o programa de computador Image J, foi realizada a contagem das células marcadas com PI em todas as fotos que foram registradas. O resultado final está apresentado na **Figura 15**. O grupo controle, em todos os tempos estudados, apresentou o menor número de células PI (+) em relação aos demais grupos.



**Figura 15: Contagem de células PI(+), 3, 24 e 48h após TFD.** As células foram tratadas com AM 1  $\mu\text{mol/L}$ , Azure A 6  $\mu\text{mol/L}$  e Azure B 2  $\mu\text{mol/L}$  em DMEM 1% SFB por 3 horas. A placa foi exposta à radiação por 40 minutos utilizando um sistema LED emitindo em  $639 \pm 10 \text{ nm}$ , com irradiância de  $2,9 \text{ mW/cm}^2$ , exposição radiante final de  $7 \text{ J/cm}^2$ . Contagem de 25 fotos, em 3 experimentos independentes. \* $p < 0,05$  em relação ao CT, # $p < 0,05$  em relação ao AM.

Na avaliação 3 horas após o tratamento (**Figura 12**), AB e AM apresentaram maior número de células PI (+) que o grupo CT, sem apresentar diferença estatística entre si; enquanto AA foi o tratamento que apresentou o maior número de células PI (+).

Na avaliação 24 horas após o tratamento (**Figura 13**), AM não apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao CT; para o tratamento com AB foi observada quantidade intermediária enquanto AA novamente foi o tratamento que apresentou o maior número de células PI (+).

Por fim, na avaliação realizada 48 horas após a TFD (**Figura 14**), foi observada diferença estatisticamente significativa entre todos os tratamentos avaliados, sendo que AB apresentou o maior número de células PI (+) que o CT;

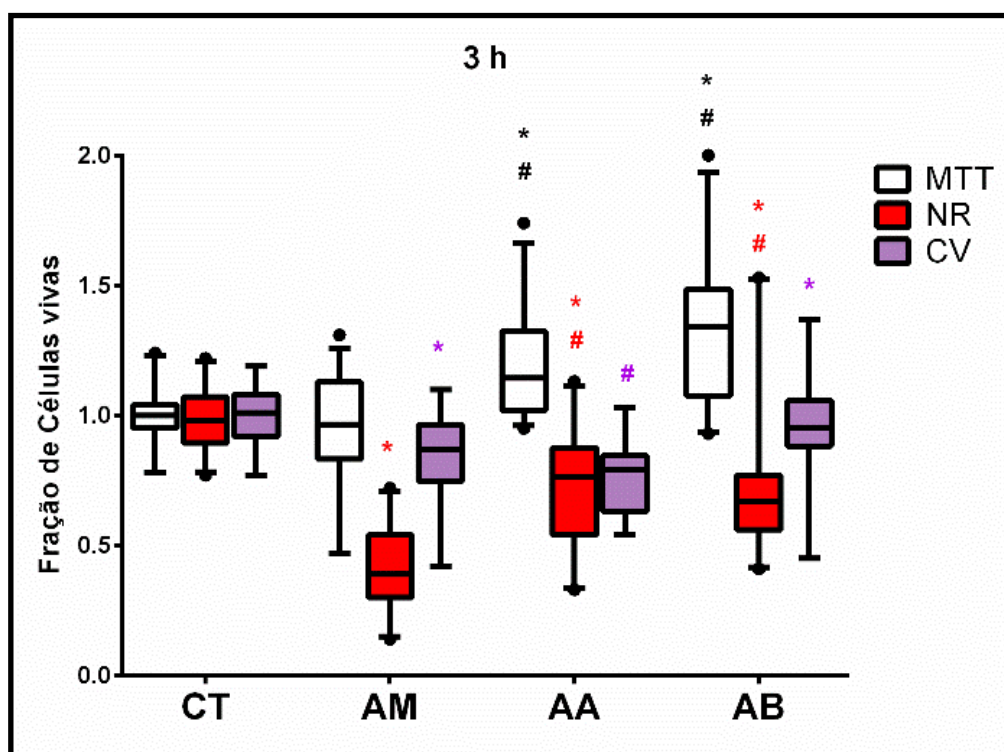


AM maior número de células PI (+) que AB e mais uma vez AA foi o tratamento que apresentou o maior número de células PI (+).

#### 5.4 AAU (MTT, VN e CV)

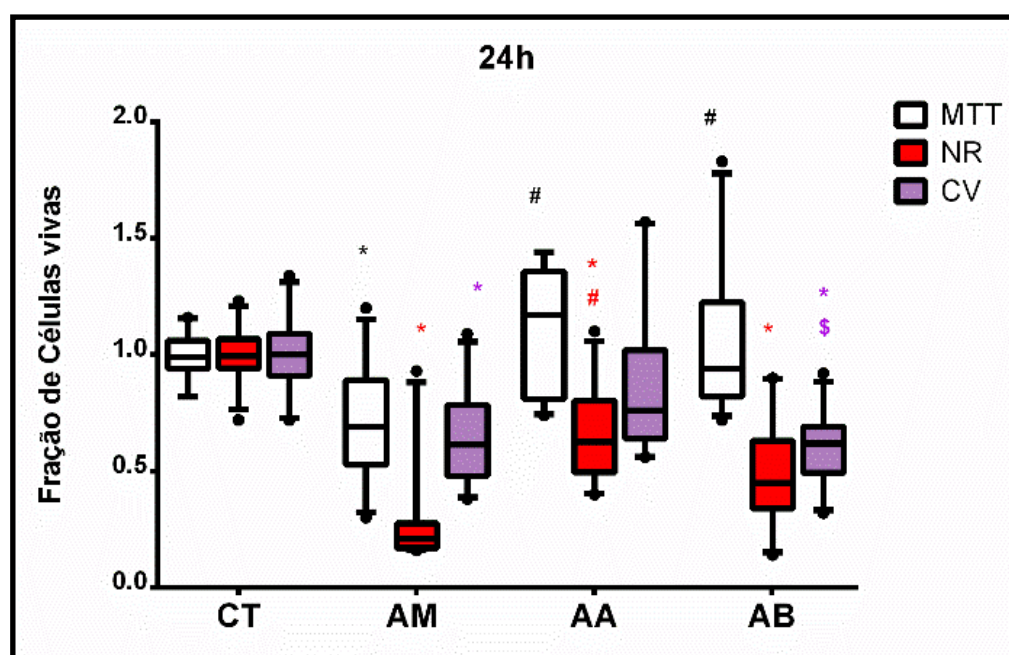
Foram realizados ensaios de viabilidade por 3 metodologias diferentes e em 3 diferentes tempos de avaliação 3, 24 e 48h após a irradiação.

Na **Figura 16**, a avaliação de viabilidade celular pelo método do MTT 3h após a irradiação mostrou aumento de viabilidade nos grupos tratados com AA e AB. Por outro lado, pelo método do VN, todos os FS causaram redução na fração de células vivas em relação ao grupo CT, sendo que a maior redução ocorreu no grupo AM. Por fim, no ensaio de CV, AM e AB causaram redução da fração de células vivas em relação ao grupo CT. Desta forma, somente a TFD com AM causou diminuição da viabilidade celular em todos os métodos analisados.



**Figura 16: Ensaios de Viabilidade Celular MTT, NR, CV para os FS no IC<sub>50</sub> avaliados 3h após a irradiação.** As células foram tratadas com AM 1  $\mu\text{mol/L}$ , Azure A 6  $\mu\text{mol/L}$  e Azure B 2  $\mu\text{mol/L}$  em DMEM 1% SFB por 3 horas. A placa foi exposta à radiação por 40 minutos utilizando um sistema LED emitindo em  $639 \pm 10 \text{ nm}$ , com irradiância de  $2,9 \text{ mW/cm}^2$ , exposição radiante final de  $7 \text{ J/cm}^2$ . \* $p < 0,05$  em relação ao CT, # $p < 0,05$  em relação ao AM.

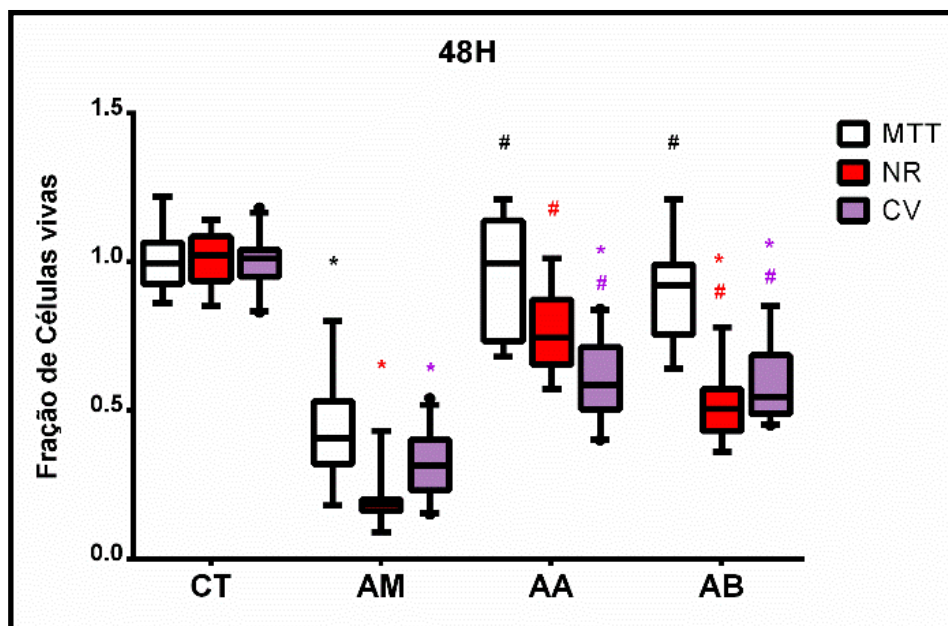
Na **Figura 17**, estão apresentados os dados de viabilidade após 24h da irradiação. Pelo método do MTT, somente a TFD com AM diminuiu a fração de células vivas em relação ao grupo controle. Por outro lado, pelo método do VN, todos os FS causaram redução na fração de células vivas em relação ao grupo controle, sendo que a maior redução ocorreu no grupo AM. Os resultados obtidos pelo método CV mostraram que AM e AB causaram redução na fração de células vivas em relação ao grupo CT. Neste tempo após irradiação, novamente somente o AM causou redução na viabilidade celular em todos os ensaios realizados.



**Figura 17: Ensaios de Viabilidade Celular MTT, NR, CV para os FS no IC<sub>50</sub> avaliados 24h após a irradiação.** As células foram tratadas com AM 1  $\mu\text{mol/L}$ , Azure A 6  $\mu\text{mol/L}$  e Azure B 2  $\mu\text{mol/L}$  em DMEM 1% SFB por 3 horas. A placa foi exposta à radiação por 40 minutos utilizando um sistema LED emitindo em  $639 \pm 10 \text{ nm}$ , com irradiância de  $2,9\text{mW/cm}^2$ , exposição radiante final de  $7 \text{ J/cm}^2$ . \* $p < 0,05$  em relação ao CT, # $p < 0,05$  em relação ao AM, \$ $p < 0,05$  em relação ao AA.

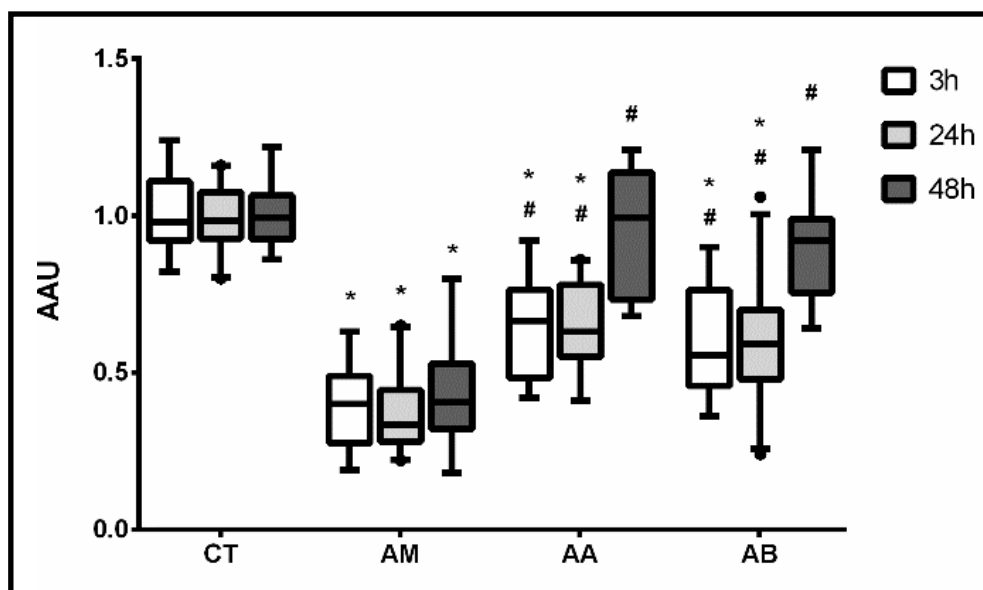
Na **Figura 18**, estão apresentados os dados de viabilidade celular após 48h da irradiação. Pelo método do MTT, a TFD com AM diminuiu a fração de células vivas em relação ao grupo controle. Pelo método do VN, AM e AB causaram redução na fração de células vivas em relação ao grupo controle, sendo que a maior redução ocorreu no grupo AM. Os resultados obtidos pelo método CV mostraram que todos os FS causaram redução na fração de células vivas em

relação ao grupo CT. Neste tempo após irradiação, novamente somente o AM promoveu redução na viabilidade celular em todos os ensaios realizados.



**Figura 18: Ensaio de Viabilidade Celular MTT, NR, CV para os FS no IC<sub>50</sub> avaliados 48h após a irradiação.** As células foram tratadas com AM 1  $\mu\text{mol/L}$ , Azure A 6  $\mu\text{mol/L}$  e Azure B 2  $\mu\text{mol/L}$  em DMEM 1% SFB por 3 horas. A placa foi exposta à radiação por 40 minutos utilizando um sistema LED emitindo em  $639 \pm 10 \text{ nm}$ , com irradiância de  $2,9 \text{ mW/cm}^2$ , exposição radiante final de  $7 \text{ J/cm}^2$ . \* $p < 0,05$  em relação ao CT, # $p < 0,05$  em relação ao AM

Na Figura 19, estão apresentados os dados de unidades arbitrárias de autofagia, que se trata de uma relação entre os diferentes métodos de viabilidade celular, de modo que a superestimação da viabilidade pelo método do VN seria um indício de acúmulo de vacúolos ácidos, seja pela indução de autofagia ou pelo bloqueio do fluxo autofágico. Os dados mostram que nenhum dos FS mostraram valores de AAU acima de 1 em nenhum dos tempos avaliados. Os resultados para o AM, em 3, 24 e 48h após a irradiação mostram valores de AAU abaixo de 0,5. Os valores de AAU são similares para AA e AB, sendo que para 3 e 24h são próximos a 0,6 enquanto em 48h são próximos a 0,9.



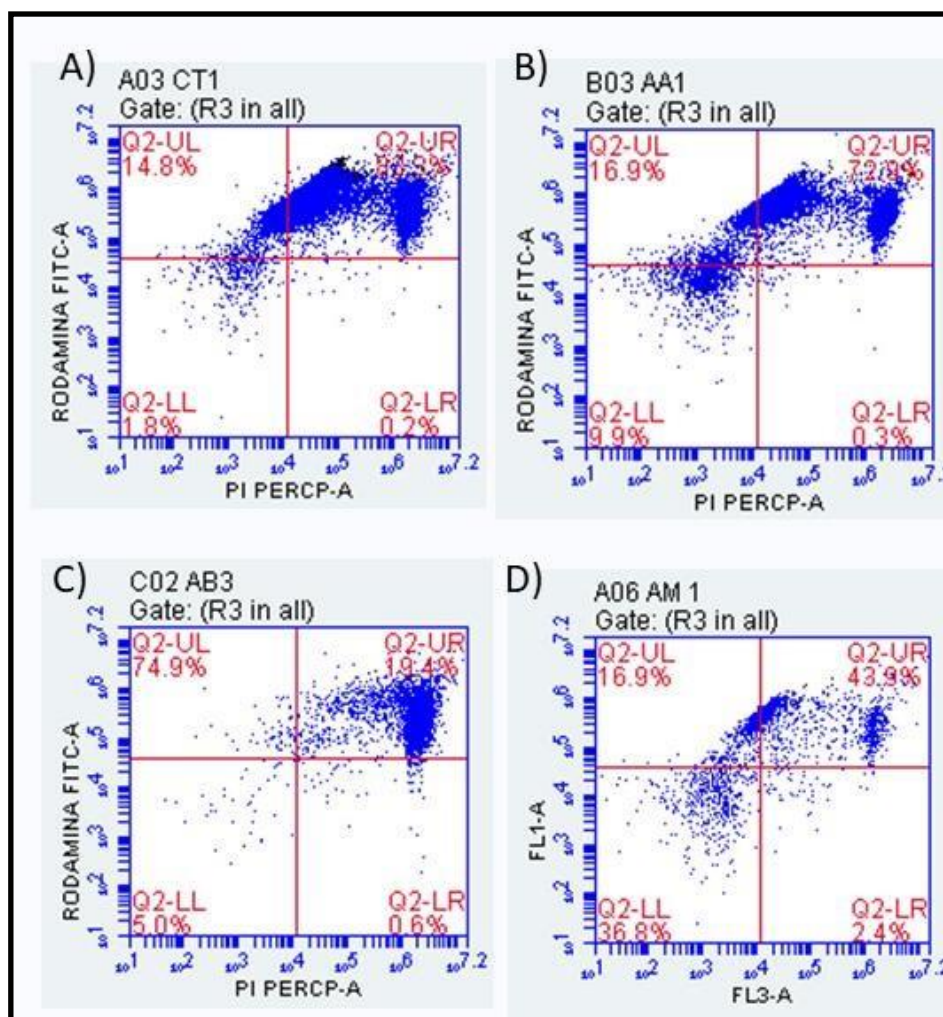
**Figura 19: Unidades arbitrárias de autofagia (AAU) 3, 24 e 48h após a irradiação.**

As células foram tratadas com AM 1  $\mu\text{mol/L}$ , Azure A 6  $\mu\text{mol/L}$  e Azure B 2  $\mu\text{mol/L}$  em DMEM 1% SFB por 3 horas. A placa foi exposta à radiação por 40 minutos utilizando um sistema LED emitindo em  $639 \pm 10 \text{ nm}$ , com irradiância de  $2,9 \text{ mW/cm}^2$ , exposição radiante final de  $7 \text{ J/cm}^2$ .

\* $p < 0,05$  em relação ao CT, # $p < 0,05$  em relação ao AM.

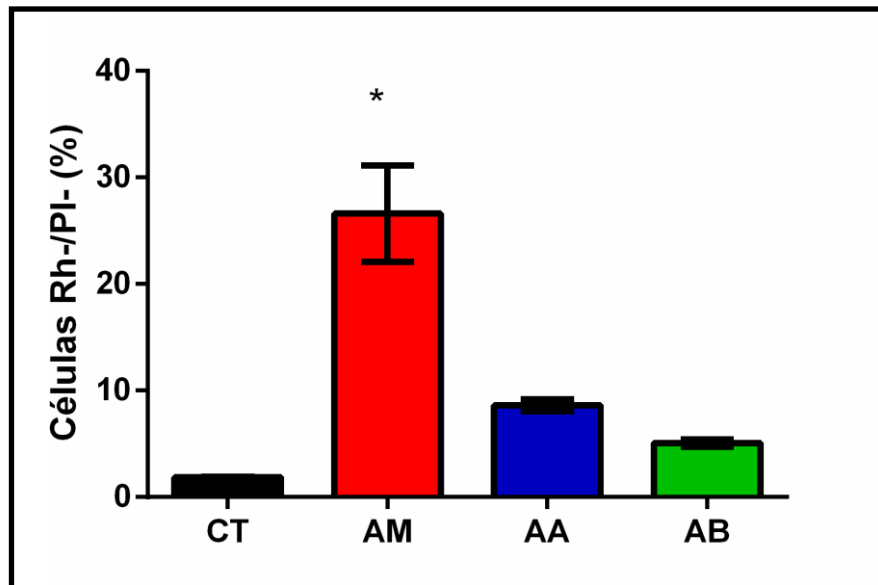
### 5.5 Potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ )

Na **Figura 20** estão apresentados os gráficos de pontos gerados pela dupla marcação das amostras com rodamina (eixo y) e iodeto de propídeo (eixo x). O gráfico tem 4 regiões demarcadas: Direita Superior ( $\text{Rh}^+/\text{PI}^+$ ), Direita inferior ( $\text{Rh}^-/\text{PI}^+$ ), Esquerda Superior ( $\text{Rh}^+/\text{PI}^-$ ) e Esquerda Inferior ( $\text{Rh}^-/\text{PI}^-$ ). As células marcadas em  $\text{Rh}^+/\text{PI}^+$  são células com potencial de membrana mitocondrial porém com membrana celular com integridade comprometida enquanto as células  $\text{Rh}^-/\text{PI}^-$  são células que apresentam perda de potencial de membrana mitocondrial porém com membrana celular íntegra.



**Figura 20: Gráficos de pontos para marcação dupla de Rodamina 123 e iodeto de propídeo.** As células foram tratadas com A) Controle; B) AA 6  $\mu\text{mol/L}$ ; C) AB 2  $\mu\text{mol/L}$ ; D) AM 1  $\mu\text{mol/L}$  em DMEM 1% SFB por 3 horas e expostas à radiação por 12 minutos e 20 segundos utilizando um sistema LED emitindo em  $639 \pm 10 \text{ nm}$ , com irradiância de  $2,9 \text{ mW/cm}^2$ , exposição radiante final de  $7 \text{ J/cm}^2$ .

Os valores de porcentagem de células Rh<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup> das amostras foram registrados e os valores médios para cada tratamento foram apresentados na **Figura 21**. Os resultados apontaram uma elevação estatisticamente significativa na porcentagem de células que apresentaram perda de potencial de membrana mitocondrial quando foi realizada TFD com AM quando comparados com os demais grupos.



**Figura 21: Potencial de membrana mitocondrial 3h após a irradiação.** As células foram tratadas com AM 1  $\mu\text{mol/L}$ , Azure A 6  $\mu\text{mol/L}$  e Azure B 2  $\mu\text{mol/L}$  em DMEM 1% SFB por 3 horas. A placa foi exposta à radiação por 40 minutos utilizando um sistema LED emitindo em  $639 \pm 10$  nm, com irradiância de  $2,9\text{mW/cm}^2$ , exposição radiante final de  $7 \text{ J/cm}^2$ ,  $n=3$ . \* $p<0,05$  em relação ao CT.

## 6. DISCUSSÃO

Em estudo anterior do grupo, foi apresentada a relação entre a agregação dos FS fenotiazínicos e a morte celular fotoinduzida, sendo que quanto menor a agregação, maior a extensão de morte celular.<sup>17</sup> Sabe-se que a agregação reduz a produção de oxigênio singlete, o mecanismo tipo II, porém a presença de agregados já foi relacionada à produção de outras espécies reativas de oxigênio, do mecanismo tipo I.<sup>13</sup>

Neste estudo, foi possível verificar que a produção de espécies reativas de oxigênio intracelular, bem como a produção de espécies reativas de nitrogênio no sobrenadante é maior no AM, intermediária para AB e baixa para AA. Desta forma a produção de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio é inversamente proporcional à agregação, isto é, a produção destas espécies é maior, quanto menor a agregação do FS.

Com o intuito de relacionar a produção de espécies reativas de oxigênio, agregação e efetividade do FS, determinou-se a viabilidade celular usando os métodos do MTT, VN e CV. A análise de viabilidade celular em tratamentos que envolvem o uso de laser é bastante complexa, uma vez que os ensaios colorimétricos mais comuns podem apresentar resultados irreais. O ensaio do MTT é baseado na atividade de enzimas mitocondriais que levam à formação do cristal de formazan, cuja concentração é avaliada espectrofotometricamente. Já é conhecido o efeito da fotobiomodulação em células, por meio da absorção da luz pelas mitocôndrias, devido ao citocromo c oxidase, que promove aumento da atividade mitocondrial<sup>34</sup>. Baixas densidades de energia de fotobiomodulação produzem pequenas quantidades de EROs que podem estimular processos positivos para o organismo, como proliferação, diferenciação e viabilidade<sup>34</sup>. As espécies reativas de oxigênio geradas pela fotobiomodulação, podem iniciar a sinalização redox e ativar fatores de transcrição sensíveis a redox, como a via Akt / GSK3beta e o fator nuclear kappa B (NF-kB). Esses fatores de transcrição estimulam as respostas de sobrevivência antiapoptótica e / ou celular<sup>35</sup>. A determinação de viabilidade por meio do método do MTT poderia levar a um resultado de viabilidade superestimado. A viabilidade celular por meio do ensaio do VN é baseada na incorporação do VN por lisossomos. A utilização deste ensaio para determinar a viabilidade celular após o tratamento por TFD pode

levar à superestimação deste parâmetro, pois o VN também é retido em vacúolos ácidos associados ao processo autofágico<sup>36</sup>. Já a quantificação de viabilidade celular por meio da marcação com cristal violeta está relacionada à quantidade de células aderidas, pois o mesmo se liga às proteínas e DNA, sendo que após o tratamento por TFD, pode haver células aderidas que já sofreram o dano fotoinduzido e estão em processo de morte celular<sup>37</sup>. Desta forma, a análise da viabilidade deve ser realizada por meio de mais de uma metodologia.

No período de 3h após a irradiação, foi observado aumento na viabilidade das células tratadas com AA e AB, de modo que pode ter havido algum dano celular e, neste pequeno período após o tratamento as células estão com metabolismo ativado tentando realizar uma recuperação das organelas danificadas (autofagia) ou somente houve indução metabólica devido ao efeito estimulador da exposição à luz vermelha (fotobiomodulação). Nos outros períodos avaliados (24 e 48h) não foi visualizado este efeito estimulador da atividade mitocondrial.

Os diferentes ensaios de viabilidade celular mostraram que AM é o FS mais efetivo, seguido pelo AB e por fim AA, corroborando com o estudo anterior do grupo, em que somente o ensaio de MTT foi utilizado.<sup>17</sup> Uma vez que a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio foi maior no tratamento com AA, pode-se dizer que a indução de morte celular por meio do processo de fotossensibilização está relacionada à produção de espécies reativas de oxigênio. Alguns trabalhos mostram que quanto maior a produção de espécies reativas de oxigênio, maior a extensão da morte celular<sup>25,38</sup>. Por outro lado, existem estudos que mostram que a produção de espécies reativas de oxigênio é importante na indução de morte celular, porém, não há uma relação direta entre estes parâmetros. Neste caso, a localização do dano fotoinduzido (que está diretamente relacionada à localização celular do FS e sua realocação após irradiação) seria um fator mais relevante, junto com outros parâmetros<sup>8,39,40</sup>. Da mesma forma, a localização celular do FS é determinante no mecanismo de morte celular fotoinduzido<sup>8,9,30,41,42</sup>.

Relatos da literatura informam que o AM se localiza preferencialmente em mitocôndrias e lisossomos, de modo que o mesmo poderia induzir morte celular por diversos mecanismos: Necrose, apoptose e autofagia<sup>39,40</sup>. Os diferentes mecanismos desencadeados dependem da concentração de FS e parâmetros



de irradiação utilizados. Não existem relatos acerca da localização celular de AA e AB, que poderiam sugerir a localização celular do dano fotoinduzido por estes FS e o tipo de morte celular desencadeado. Este parâmetro não foi avaliado no decorrer deste estudo, mas pretende-se realizá-lo para a publicação do artigo científico.

A avaliação do potencial de membrana mitocondrial mostrou que AM é o FS que provoca a maior redução no potencial de mitocôndria. A perda do potencial de mitocôndria é considerada o “ponto sem retorno” do processo apoptótico<sup>43</sup>. A perda do potencial da membrana mitocondrial leva a uma liberação de proteínas tóxicas do espaço intermembranas para o citosol que, por fim, ativa um circuito de retroalimentação positiva que amplifica o sinal apoptótico. A ativação de caspases, após a perda do potencial da membrana mitocondrial, acelera a fase de execução da morte celular <sup>43</sup>. A perda do potencial de mitocôndria gerada por AM também poderia estar associada à morte por necroptose, porém as células HeLa não expressam níveis detectáveis de RIPK3 e, portanto, morrem exclusivamente por apoptose.

Devido à possibilidade de indução de morte celular por autofagia, realizou-se a determinação das unidades arbitrárias de autofagia baseada na comparação entre a viabilidade determinada pelos métodos de NR, MTT e CV<sup>36</sup>. Porém, este ensaio não mostrou indícios de autofagia em nenhum dos processos de morte desencadeados pelos FS utilizados. O ensaio de marcação com iodeto de propídeo e alaranjado de acridina, que pode evidenciar, por meio da presença de marcação laranja, a existência de vacúolos ácidos associados com o processo de autofagia, também não mostrou nenhum indício da ativação desta via de reciclagem/morte celular.

Por outro lado, no ensaio AO/PI foi verificado que AA foi o tratamento que apresentou o maior número de células PI (+). A perda da integridade da membrana celular poucas horas após o dano fotoinduzido indica a existência de morte celular via necrose <sup>42,44</sup>. Dos compostos da série estudada, a tendência de agregação é maior para AA e menor para AM.<sup>17</sup> O agregado é mais lipofílico que o monômero, de modo que a interação com as membranas é maior. Sabe-se que o dano em membranas é potencializado e apresenta uma cinética mais rápida, em FS que se ligam mais fortemente às membranas<sup>44,45</sup>. Estes dados indicam que a maior agregação do AA faz com que este FS se localize na

membrana celular, levando à morte celular por necrose. Porém outros experimentos ainda são necessários para confirmar esta hipótese. Deda e colaboradores mostraram que a localização de FS na membrana celular pode levar à indução do mecanismo de morte celular por necrose <sup>42</sup>. Além disso, após 24 e 48h AA continuou sendo o FS que apresentou maior número de células marcadas PI(+) que poderia indicar a presença de outros mecanismos de morte celular associados.

Outros experimentos são necessários para que seja possível inferir os mecanismos de morte celular que estão sendo desencadeados pelos FS estudados, como por exemplo a marcação de Anexina V e PI e avaliação da ativação de caspase-3. Estas metodologias podem mostrar a ativação de diferentes pontos do mecanismo apoptótico de modo a complementar as observações feitas até aqui.

## **7. CONCLUSÃO**

Com base nos resultados pode-se concluir que a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio está diretamente ligada à efetividade do FS, sendo determinada pela agregação do mesmo. Os dados sugerem que AA, por apresentar maior agregação, localiza-se na membrana celular e desencadeia mecanismo de morte celular por necrose, porém, outros experimentos são necessários para confirmar a sua localização celular e a presença dos agregados em membranas. O AM foi o FS mais efetivo em causar morte celular, apresentando redução de viabilidade em todas as metodologias colorimétricas avaliadas. A perda do potencial de membrana mitocondrial induzida por AM, que seria um ponto sem retorno no processo apoptótico, sugere a indução deste mecanismo de morte que pode ser confirmado por meio da realização de marcação com Anexina V e PI e avaliação da ativação de caspase-3. Não existem indícios claros da indução de nenhum mecanismo específico de morte celular pelo AB, porém devido às duas características intermediárias entre AA e AM, acredita-se que o mesmo poderia estar induzindo morte por necrose em uma pequena extensão e também morte por apoptose.

## 7. PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA NO PERÍODO

### ARTIGO

- FRANCISCO, CML; **GONÇALVES, JMLA**; BRUM, BS; SANTOS, TPC; FRANCO, ALS; SILVA, DFT; PAVANI, C. The photodynamic efficiency of phenothiazinium dyes is aggregation dependent. *New Journal of Chemistry*, p. 14438-14443, 2017.

### RESUMOS

- GONÇALVES, JMLA; PAVANI, C. Photodynamic Therapy with Phenothiazinium Photosensitizers: Mechanisms of Cell Death, 2018, THE WORLD CONVENTION FOR PHOTOBIO-MODULATION (LOW LEVEL LASER THERAPY). France-Nice, 2018.

- **GONÇALVES, JMLA**; PAVANI, C. GOULART, HS. The Photodynamic Efficacy of Phenothiazinium Photosensitizers is directly proportional to the oxidative stress photoinduced. XV Encontro de Iniciação Científica e XII Seminário Nacional de Pesquisa, Livro de Resumos, 2018.

- **GONÇALVES, JMLA**; FRANCISCO, CML; BRUM BS; SANTOS, TPC; LINO-DOS- SANTOS-FRANCO, A.; SILVA, DFT.; PAVANI, C. Phenothiazine photodynamic efficiency is aggregation dependent. Proceedings of FIL, 2017, p.7.

- BRUM, BS; **GONÇALVES, JMLA**; FRANCISCO, CML; SANTOS, TPC; PAVANI, C. A agregação determina a eficácia da Terapia Fotodinâmica com Fenotiazinas. XIV Encontro de Iniciação Científica UNINOVE, Livro de Resumos, 2017. p. 82.

## 8. REFERÊNCIAS

1. Melo MAS, Rolim JPML, Passos VF, Lima RA, Zanin ICJ, Codes BM, et al. Photodynamic antimicrobial chemotherapy and ultraconservative caries removal linked for management of deep caries lesions. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2015;12(4):581–6.
2. Ichinose-Tsuno A, Aoki A, Takeuchi Y, Kirikae T, Shimbo T, Lee M-C, et al. Antimicrobial photodynamic therapy suppresses dental plaque formation in healthy adults: a randomized controlled clinical trial. *BMC Oral Health*. 2014;14(1):152.
3. Moreira AL, Novaes AB, Grisi MF, Taba M, Souza SL, Palioto DB, et al. Antimicrobial Photodynamic Therapy as an Adjunct to Non-Surgical Treatment of Aggressive Periodontitis: A Split-Mouth Randomized Controlled Trial. *J Periodontol*. 2015;86(3):376–86.
4. Lucena SR, Salazar N, Gracia-Cazaña T, Zamarrón A, González S, Juarranz Á, et al. Combined treatments with photodynamic therapy for non-melanoma skin cancer. *Int J Mol Sci*. 2015;16(10):25912–33.
5. Tardivo JP, Adami F, Correa JA, Pinhal MAS, Baptista MS. A clinical trial testing the efficacy of PDT in preventing amputation in diabetic patients. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2014;11(3):342–50.
6. Gupta A, Avci P, Sadasivam M, Chandran R, Parizotto N, Vecchio D, et al. Shining light on nanotechnology to help repair and regeneration. *Biotechnol Adv* [Internet]. 2012; Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.08.003>
7. Baptista MS, Cadet J, Di Mascio P, Ghogare AA, Greer A, Hamblin MR, et al. Type I and Type II Photosensitized Oxidation Reactions: Guidelines and Mechanistic Pathways. *Photochem Photobiol*. 2017;93(4):912–9.
8. Bacellar IOL, Tsubone TM, Pavani C, Baptista MS. Photodynamic efficiency: From molecular photochemistry to cell death. *Int J Mol Sci*. 2015;16(9):20523–59.
9. Tsubone TM, Pavani C, Bacellar IOL, Baptista MS. In search of specific PDT photosensitizers: Subcellular Localization and Cell death pathways. In: Hamblin MR, Yingying Huang, editors. *Imaging in Photodynamic*

- Therapy. CRC Press; 2016. p. 149–82.
10. Pavani C, Francisco CML, Gobo NRS, de Oliveira KT, Baptista MS. Improved photodynamic activity of a dual phthalocyanine–ALA photosensitiser. *New J Chem*. 2016;40(11):9666–71.
  11. Queiroz AC, Adelino F, Freitas P, Andrade D, Novaes AB, Taba M, et al. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology Antimicrobial photodynamic therapy associated to nonsurgical periodontal treatment in smokers : Microbiological results. *J Photochem Photobiol B Biol* [Internet]. 2014;141:170–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2014.10.017>
  12. Carvalho VF, Andrade PVC, Rodrigues MF, Hirata MH, Hirata RDC, Pannuti CM, et al. Antimicrobial photodynamic effect to treat residual pockets in periodontal patients: A randomized controlled clinical trial. *J Clin Periodontol*. 2015;42(5):440–7.
  13. Junqueira HC, Severino D, Dias LG, Gugliotti MS, Baptista MS. Modulation of methylene blue photochemical properties based on adsorption at aqueous micelle interfaces. *Phys Chem Chem Phys* [Internet]. 2002;4(11):2320–8. Available from: <http://xlink.rsc.org/?DOI=b109753a>
  14. Moreira LM, Lyon JP, Lima A, Codognoto L, Severino D, Baptista MS, et al. The Methylene Blue Self-aggregation in Water / Organic Solvent Mixtures : Relationship Between Solvatochromic Properties and Singlet Oxygen Production. *Orbital Electron J Chem*. 2017;9(4):279–89.
  15. Bergmann K, O’Konski CT. A Spectroscopic Study of Methylene Blue Monomer, Dimer, and Complexes With Montmorillonite. *J Phys Chem*. 1963;67(10):2169–77.
  16. Hirohara S, Oka C, Totani M, Obata M, Yuasa J, Ito H, et al. Synthesis, photophysical properties, and biological evaluation of trans-bisthioglycosylated tetrakis(fluorophenyl)chlorin for photodynamic therapy. *J Med Chem*. 2015;58(21):8658–70.
  17. Francisco CML, Gonçalves JMLA, Brum BS, Santos TPC, Lino-Dos-Santos-Franco A, Silva DFT, et al. The photodynamic efficiency of phenothiazinium dyes is aggregation dependent. *New J Chem*. 2017;41(23):14438–43.
  18. Oleinick NL, Morris RL, Belichenko I. The role of apoptosis in response to

- photodynamic therapy: what , where , why , and how. *Photochem Photobiol Sci.* 2002;1:1–21.
19. Mroz P, Yaroslavsky A, Kharkwal GB, Hamblin MR, Hospital MG. Cell Death Pathways in Photodynamic Therapy of Cancer. *Cancers (Basel).* 2011;3:2516–39.
  20. Paulo S. Avaliação do ciclo celular de células tronco / progenitoras hemopoéticas da medula óssea de camundongos submetidos à desnutrição protéica. 2010;
  21. Kubiak M, Łysenko L, Gerber H, Nowak R. Cell reactions and immune responses to photodynamic therapy in oncology. *Postepy Hig Med Dosw.* 2016;70:735–42.
  22. Miranda C, Francisco L, Miranda C, Francisco L. Avaliação de fotossensibilizadores fenotiazínicos para Terapia Fotodinâmica. 2016.
  23. Grivicich I, Regner A, Rocha AB da. Apoptosis: Programmed Cell Death. *Rev Bras Cancerol.* 2007;53(3):335–43.
  24. Lopes T, Reis A, Hewitt C, Roseiro C. Citometria de fluxo - Funcionalidade celular on-line em bioprocessos.
  25. Pavani C, Uchoa AF, Oliveira CS, Baptista S. Effect of zinc insertion and hydrophobicity on the membrane interactions and PDT activity of porphyrin photosensitizers. 2009;233–40.
  26. Anazetti MC. Morte Celular por Apoptose: uma visão bioquímica e molecular Apoptosis Cell Death: biochemistry and molecular aspects. 2007;37–58.
  27. Sperandio S, Poksay K, Belle I De, Lafuente MJ, Liu B, Nasir J, et al. Paraptosis : mediation by MAP kinases and inhibition by AIP-1 / Alix. *Cell Death Differ.* 2004;11(10):1066–75.
  28. Wang Y, Zhu X, Yang Z, Zhao X. Honokiol induces caspase-independent paraptosis via reactive oxygen species production that is accompanied by apoptosis in leukemia cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013;430:876–82.
  29. Gandin V, Pellei M, Tisato F, Porchia M, Santini C, Marzano C. A novel copper complex induces paraptosis in colon cancer cells via the activation of ER stress signalling. *J Cell Mol Med.* 2012;16(1):142–51.
  30. Pavani C, Iamamoto Y, Baptista MS. Mechanism and efficiency of cell

- death of type II photosensitizers: Effect of zinc chelation. *Photochem Photobiol.* 2012;88(4):774–81.
31. Giustarini D, Rossi R, Milzani A, Dalle-donne I. Nitrite and Nitrate Measurement by Griess Reagent in Human Plasma: Evaluation of Interferences and Standardization. *Methods Enzymol.* 2008;440(7):361–80.
  32. Ramos LA, Cavaleiro CCS, Cavaleiro ÉTG. Determinação de nitrito em águas utilizando extrato de flores. *Quim Nova.* 2006;29(5):1114–20.
  33. Baskic D, Popovic S, Ristic P, Arsenijevic N. Analysis of cycloheximide-induced apoptosis in human leukocytes: Fluorescence microscopy using annexin V / propidium iodide versus acridin orange / ethidium bromide. *Cell Biol Int.* 2006;30:924–32.
  34. Article O. Methylene blue mediated photobiomodulation on human osteoblast cells. 2017;
  35. Djavid GE, Bigdeli B, Goliaei B, Nikoofar A. Photobiomodulation leads to enhanced radiosensitivity through induction of apoptosis and autophagy in human cervical cancer cells. 2017;11:1–12.
  36. Martins WK, Severino D, Souza C, Stolf BS, Baptista MS. Rapid screening of potential autophagic inductor agents using mammalian cell lines. *Biotechnol J.* 2013 Jun;8(6):730–7.
  37. Feoktistova M, Geserick P, Levekus M. Crystal Violet Assay for Determining Viability of Cultured Cells. *Cold Spring Harb Protoc.* 2016;4:pdb.prot087379.
  38. Deda DK, Pavani C, Caritá E, Baptista MS, Toma HE, Araki K. Correlation of photodynamic activity and singlet oxygen quantum yields in two series of hydrophobic monocationic porphyrins. *J Porphyr Phthalocyanines.* 2012 Jan;16(1):55–63.
  39. Oliveira CS, Turchiello R, Kowaltowski AJ, Indig GL, Baptista MS. Major determinants of photoinduced cell death: Subcellular localization versus photosensitization efficiency. *Free Radic Biol Med.* 2011;51(4):824–33.
  40. Martins WK, Santos NF, Rocha C de S, Bacellar IOL, Tsubone TM, Viotto AC, et al. Parallel damage in mitochondria and lysosomes is an efficient way to photoinduce cell death. *Autophagy.* 2018;0(0):1.
  41. Tsubone TM, Martins WK, Pavani C, Junqueira HC, Itri R, Baptista MS.

- Enhanced efficiency of cell death by lysosome-specific photodamage. *Sci Rep.* 2017;7(1).
42. Deda DK, Pavani C, Caritá E, Baptista MS, Toma HE, Araki K. Control of Cytolocalization and Mechanism of Cell Death by Encapsulation of a Photosensitizer. *J Biomed Nanotechnol.* 2013 Aug;9(8):1307–17.
  43. Feoktistova M, Wallberg F, Tenev T, Geserick P, Leverkus M, Meier P. Techniques to distinguish apoptosis from necroptosis. *Cold Spring Harb Protoc.* 2016;2016(4):311–5.
  44. Bacellar IOL, Pavani C, Sales EM, Itri R, Wainwright M, Baptista MS. Membrane damage efficiency of phenothiazinium photosensitizers. *Photochem Photobiol.* 2014;90(4):801–13.
  45. Bacellar IOL, Oliveira MC, Dantas LS, Costa EB, Junqueira HC, Martins WK, et al. Photosensitized Membrane Permeabilization Requires Contact-Dependent Reactions between Photosensitizer and Lipids. *J Am Chem Soc.* 2018;140(30):9606–15.



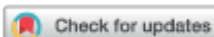
## ANEXO

Anexo A. Artigo publicado em co-autoria.



NJC

PAPER



Cite this: *New J. Chem.*, 2017, **41**, 14438

Received 18th June 2017,  
Accepted 23rd October 2017

DOI: 10.1039/c7nj02173a

rsc.li/njc

## The photodynamic efficiency of phenothiazinium dyes is aggregation dependent

Claudia M. L. Francisco, José M. L. A. Gonçalves, Bruno S. Brum, Thabata P. C. Santos, Adriana Lino-dos-Santos-Franco, Daniela F. T. Silva and Christiane Pavani \*

The evaluation of the  $IC_{50}$  values of phenothiazinium dyes in neoplastic immortalized cells (HeLa) in the dark and under irradiation showed that the effectiveness of the photosensitizers (PSs) increased in the order of Azure A (AA) < Azure B (AB) < Methylene Blue (MB). Singlet oxygen production was similar in all of the compounds and the cell uptake of MB was lower than those of AA and AB. The evaluation of the dimer to monomer ratio showed that aggregation increased in the order of MB < AB < AA. Thus, the photodynamic efficiency of these PSs was dependent on aggregation. In order to improve the effectiveness of photodynamic therapy (PDT), it is important to develop phenothiazinium dyes with structural modifications and/or to design formulations that could reduce aggregation.

### Introduction

Photodynamic therapy (PDT) is a therapeutical aid for the treatment of cancers, infections, and some benign diseases, which employs the use of a photosensitizer (PS) that is associated with light. The mechanism of action is based on the production of reactive oxygen species (ROS), among them, singlet oxygen ( $^1O_2$ ), which reacts with the lipids and proteins of organelles, leading to cell death.<sup>1–6</sup> Several types of PSs have been investigated for their use in PDT, such as porphyrins, chlorines, phthalocyanines and phenothiazinium dyes (PDs). PDs are a group of molecules presenting an organic structure that is composed of three aromatic rings containing sulfur and nitrogen as heteroatoms. Due to their positive charge, PDs interact very well with biological membranes, including the mitochondrial membrane. Methylene blue (MB) is a PD that has been evaluated in several clinical trials and in experimental models for PDT studies,<sup>7–12</sup> mainly due to its high absorption of light in the region between 550 nm and 700 nm.<sup>3</sup> It is known that MB may aggregate depending upon the medium. The degree of aggregation may easily be determined by an analysis of the absorption spectra. While monomers exhibit maximum absorption at 664 nm, dimers have this maximum displaced at 590 nm.<sup>13</sup> In addition, the excitation of dimers and monomers triggers different photochemical mechanisms: while monomer excitation results in singlet oxygen production (type II

reactions), the excitation of the dimers generates radicals, such as superoxide radical anions (type I reactions).<sup>14,15</sup> Other PDs, which present similar structures (Fig. 1), such as Azure A (AA) and Azure B (AB), may also present interesting activities for PDT, but there is a lack of information regarding their photophysical, photochemical and photobiological properties.<sup>16</sup> In this context, the objective of this work was to compare the photodynamic efficiency of the PDs MB, AA and AB, in an *in vitro* model, when using a neoplastic cell line.

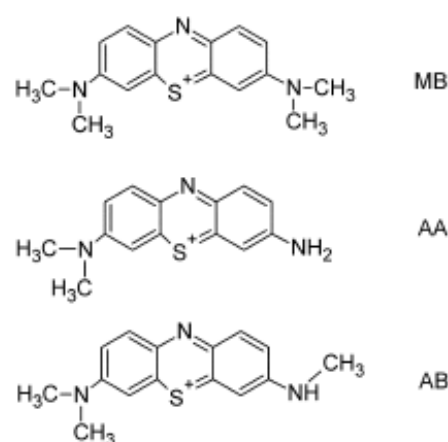


Fig. 1 Structures of the photosensitizers. Methylene blue (MB); Azure B (AB) and Azure A (AA).

Programa de Pós-graduação em Biofotônica Aplicada às Ciências da Saúde,  
Universidade Nove de Julho – UNINOVE, São Paulo, Brazil.  
E-mail: christipavani@gmail.com

## Results and discussion

In order to evaluate the photodynamic efficiency of the photosensitizers (PSs), the  $IC_{50}$  values were determined in the dark and under irradiation. The cytotoxicity and phototoxicity data

that were obtained are shown in Fig. 2. A dose-dependent relationship was observed; *i.e.*, the increase in PS concentrations was directly related to the reduction in the number of viable cells. In the dark, the  $IC_{50}$  values for MB, AA and AB were 182, 141 and 78  $\mu\text{mol L}^{-1}$  respectively. Note that AB was more

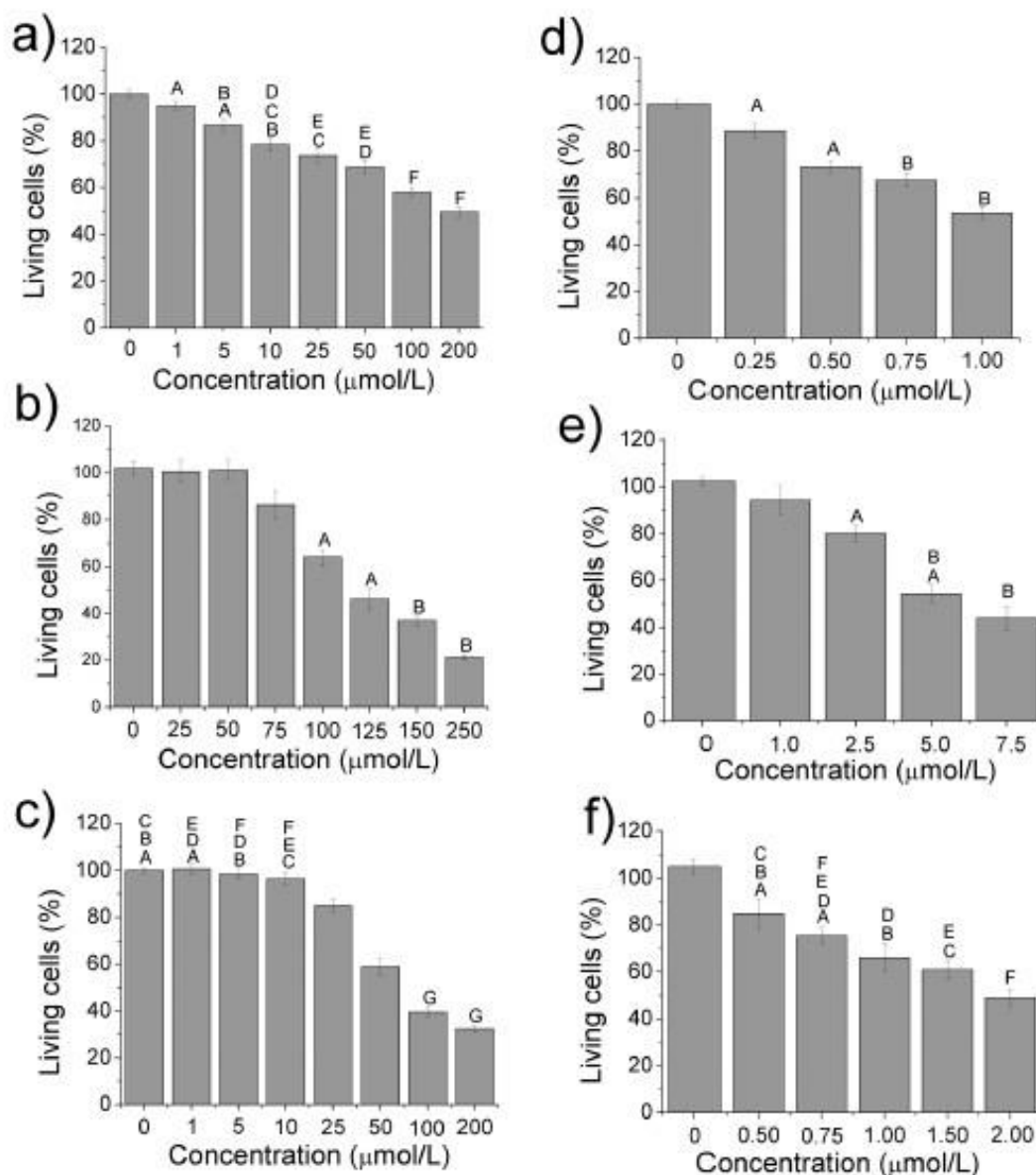


Fig. 2 Cytotoxicity and phototoxicity of PD in HeLa cells. Percentage of viable cells after 3 h of incubation in the dark (a–c) or after being irradiated (d–f) for 40 minutes with a red LED ( $639 \pm 10$  nm,  $2.9 \text{ mW cm}^{-2}$  reaching the total radiant exposure of  $7.0 \text{ J cm}^{-2}$ ). The percentages of living cells were determined 48 h after the treatments by using the MTT assay. Methylene blue (a and d); Azure A (b and e); Azure B (c and f). Data are presented as average  $\pm$  SE. The characters above the boxes indicate the statistics. The paired columns presenting the same characters indicate the absence of a statistical difference, all the other comparisons presented significant difference by the ANOVA test and the Bonferroni post-test ( $p < 0.05$ ). Three independent experiments were performed for all the compounds.

cytotoxic than the other PSs under this condition. The  $IC_{50}$  values under irradiation were 1.1, 6.3, 1.8  $\mu\text{mol L}^{-1}$  for MB, AA and AB, respectively. The phototoxicity of MB and AB were similar, whereas AA was shown to be less phototoxic. Since these PSs have similar structures, a huge difference in their efficiency was not expected. It is known that PDs can be reduced to the leuko form by mitochondrial enzymes.<sup>17,18</sup> The colorless leuko form is not photochemically active, and it may affect the total phototoxicity. However, at higher concentrations, MB may localize at the mitochondria and the PDT effect can be reached through lysosomal damage.<sup>19</sup> Indeed, since MB, AA and AB present similar structures, it was not expected that the production of leuko form to be too different among them.

An irradiation time of 40 minutes with an irradiance of 2.9  $\text{mW cm}^{-2}$  was used, resulting in a final radiant exposure of 7  $\text{J cm}^{-2}$ . This particular value of radiant exposure has already been used with effectiveness in the literature. Pavani *et al.* used a combination of a red LED and a blue LED to concurrently excite two distinct PSs, using 7.2  $\text{J cm}^{-2}$  for the red and 7.9  $\text{J cm}^{-2}$  for the blue.<sup>20</sup> The literature has shown that cell uptake is an important factor in the effectiveness of PSs, being more important than the production of ROS.<sup>2,19,21,22</sup> Thus, in order to explain the differences in effectiveness between molecules, the cell uptake was measured (Fig. 3). While AA and AB showed a similar uptake, MB presented a smaller one. Amphiphilicity is a property that influences the PS cell uptake.<sup>2,21,23</sup> In this sense, the symmetry in the MB molecule reduced its amphiphilic character, while the asymmetry resulting from the removal of the methyl groups from the periphery of the chromophore in the azures (AA and AB) increased the amphiphilic character of these PSs, resulting in a greater cell uptake. Although the lower uptake of MB was easily justified by its chemical structure, the values have shown that MB had the lowest uptake among these PSs, which would not explain its greater effectiveness. Since singlet oxygen is a ROS with a high cytotoxic capacity, the quantum yields of singlet oxygen production in water and methanol were evaluated (Table 1).

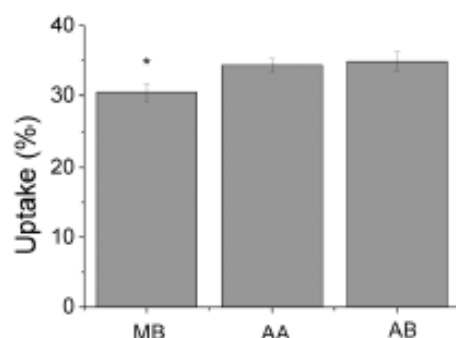


Fig. 3 Cell uptake of PD, measured after 3 h of incubation with 10  $\mu\text{mol L}^{-1}$  PS solutions in DMEM 1% FBS; data presented as average  $\pm$  SE. \* $p < 0.05$  by the ANOVA test and the Bonferroni post-test.

Table 1 The quantum yield of singlet oxygen production

Photosensitizer	$\phi\Delta^a$	$\phi\Delta^b$
MB	$0.07 \pm 0.002$	$0.50^{24}$
AA	$0.06 \pm 0.002$	0.53
AB	$0.05 \pm 0.010$	0.52

<sup>a</sup> Determined in water using MB in methanol as standard. <sup>b</sup> Determined in methanol using MB in methanol as standard. 5  $\mu\text{M}$  solutions of MB, AA and AB were used.

It was observed that the quantum yield values of singlet oxygen production were similar among the PSs, regardless of the solvent used. Note that the values that were obtained in methanol were higher than those that were obtained in water. It is known that the production of singlet oxygen is dependent on the solvent dielectric constant.<sup>25</sup> The values of quantum yields of singlet oxygen production for MB in water were variable, with values between 0.60 and 0.37.<sup>26</sup> These differences that were observed in the quantum yield values of singlet oxygen production in water may be related to aggregation. Junqueira *et al.* have shown that MB aggregates in aqueous solution.<sup>14</sup> In addition, the type of photochemical reaction that occurs is modulated by the degree of MB aggregation. While monomers generate singlet oxygen, dimers produce free radicals.<sup>14,25</sup> Due to the structural similarity, azures may also present aggregation, as was observed for MB. Thus, it is now believed that the singlet oxygen quantum yield values of the PSs in water were low due to the aggregation, whereas in methanol the solute-solute interaction was reduced, the relative amount of monomers was higher, and consequently, higher was the production of singlet oxygen. In view of the differences that were observed in the singlet oxygen production in water and methanol, and due to the known aggregation of MB, the dimer to monomer ratios (D/M) of the PDs were evaluated in both water and phosphate buffered saline (PBS - Fig. 4). It was observed that the higher the concentration that was evaluated, the higher the D/M value, regardless of the PS and the medium used. In addition, the aggregation in PBS was higher than that in water.

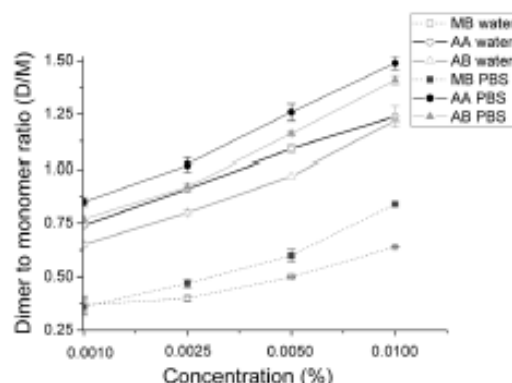


Fig. 4 Dimer to monomer ratios (D/M) in water and PBS. The wavelengths used in this calculation were 590 and 664 nm for MB, 588 and 630 nm for AA, and 593 and 645 nm for AB.

Table 2 Photodynamic efficiency

Photosensitizer	PI	Cell uptake	Overlay	PDTe
MB	165.5	29.8	0.79	7.0
AA	22.4	34.6	1	0.6
AB	43.3	35.9	1	1.2

$$PI = IC_{50} \text{ dark}/IC_{50} \text{ irr}; PDTe = PI(\text{cell uptake} \times \text{overlay})$$

This effect was due to the presence of electrolytes, since the aggregation was higher in those solutions with a higher ionic strength.<sup>25,27</sup> The presence of methyl groups in the periphery of the chromophore reduced the tendency of PDs to aggregate due to a steric effect.<sup>28,29</sup> Therefore, MB with 4 peripheral methyl groups presented the lowest aggregation tendency; AB, with 3 methyl groups, presented intermediate aggregation and AA, which has only 2 peripheral methyl groups, presented the highest tendency of aggregation among the compounds studied. As a way of comparing PSs in terms of their efficiency in causing cell death and in order to establish a relationship with aggregation, photodynamic efficiency (PDTe) was calculated based on the presented Phototoxicity index (PI).<sup>30</sup> The PI is calculated from the dark to irradiated  $IC_{50}$  ratio, since the higher the dark  $IC_{50}$  and the lower the irradiated  $IC_{50}$ , the more efficient were the PSs (Table 2). Besides, the cell uptake and the absorption of light were parameters that affected the  $IC_{50}$  values. Therefore, the PI was corrected with the cell uptake values (Fig. 3 and Table 2) and with the absorption at the excitation wavelength. The LED parameters that were used in this work were chosen based on the literature, and the absorption properties of the compounds used. The light emitted by the LED was not coherent and collimated as a LASER, emitting in a broader range of the electromagnetic spectrum. Thus, the red LED used in this study covers the wavelengths between 629 and 649 nm, allowing for its use with the PSs that have absorption within this range (the MB monomers presented absorption maxima at 664 nm, AA at 630 nm and AB at 644 nm, in aqueous solution).<sup>21</sup> In this way, the range of wavelengths covered by the LED was enough to excite the PSs used. Since the photodynamic efficiency was dependent on light absorption, the overlay of the absorption spectra of the PSs and LED emission spectra was calculated (Table 2).

When considering PDTe, MB was the most efficient PS, since it presented the highest PI, with the lowest cell uptake and light absorption at the excitation wavelength. There was an inverse relationship between aggregation and PDTe of these PSs; *i.e.*, while the PDTe increased in the order AA < AB < MB, the aggregation decreased in the same sequence. This result has shown that the aggregation was a parameter that determined the effectiveness of PDs. Biel and coworkers showed that the efficacy of antimicrobial PDT with MB was related to its ability to form dimers, especially for Gram-positive bacteria.<sup>32,33</sup> However, here we found an opposite tendency; *i.e.*, the higher the ability to form dimers, the lower the PDT efficacy in mammalian cells. Thus, it seems that monomers have higher participation in PDT's capacity of reducing cancer cells. Other PSs such as porphyrins and phthalocyanines also present aggregation

related effectiveness.<sup>26,34,35</sup> Thus, it is important to control the aggregation of PSs to increase the effectiveness of PDT protocols.

## Conclusions

In view of the obtained results, it was possible to conclude that MB was the most effective PS in this series, due to the presence of the four peripheral groups that reduced aggregation. On the other hand, AA was a less effective PS, because it presented a greater intermolecular interaction, and consequently, a higher degree of aggregation. Aggregation was a parameter that was dependent on the molecular structure of the PS and that has been shown to be a determinant factor for PDT effectiveness. In this sense, the development of PDs with structural modifications, and the development of formulations that can reduce aggregation, can result in more effective PDT protocols.

## Experimental

### Chemicals

The photosensitizers were used as received. Methylene Blue (tetramethylthionine chloride, p.a.) was purchased from Labsynth (Diadema, Brazil). Azure B (*N,N,N'*-trimethylthionine chloride, purity >85%) and Azure A (*N,N*-dimethylthionine chloride, purity >70%) were acquired from Sigma-Aldrich. For the cell assays, stock solutions of PSs were prepared in sterile water, and subsequently, they were diluted in DMEM culture medium at the required concentrations. PBS was prepared from the salts, purchased from Synth (Diadema, Brazil) with the following concentrations: 137 mmol L<sup>-1</sup> NaCl; 2.7 mmol L<sup>-1</sup> KCl; 8.1 mmol L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1.47 mmol L<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> at pH 7.2.

### Cell culture

The HeLa cell line (Human epithelial cervix adenocarcinoma ATCC CCL-2) was cultured in DMEM medium (Dulbecco's Modified Eagle Medium-Vitrocell<sup>®</sup>, Campinas, Brazil), supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 0.1% penicillin/streptomycin (Vitrocell<sup>®</sup>, Campinas, Brazil). The cells were grown in 75 cm<sup>2</sup> culture bottles (Sarstedt<sup>®</sup>, Nümbrecht, Germany) and kept in an incubator (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, humid atmosphere).

### Cytotoxicity and phototoxicity

Fifty thousand (50 000) cells per well were seeded in 48-well plates (Kasvi<sup>®</sup>, Curitiba, Brazil) and kept in an incubator. After 18–24 hours, the cells were washed with PBS and received the PS solutions (0 to 250 μmol L<sup>-1</sup>) in DMEM supplemented with 1% FBS. Plates were maintained in the incubator for 3 hours.<sup>2,30</sup> At the end of the incubation period, the cells were washed with PBS and in the presence of PBS, one plate was kept in the dark for 40 minutes, while the others were subjected to irradiation for 40 minutes, by using an LED system emitting at 639 ± 12 nm, with an irradiance of 2.9 mW cm<sup>-2</sup> and a final radiant exposure of 7 J cm<sup>-2</sup>. The irradiance and the radiant exposure were calculated based on the effective potency; *i.e.*, the potency of

the system was measured after covering of the experimental plates. The area of the device was 96 cm<sup>2</sup> and the LEDs were linearly polarized. After these procedures, the PBS was removed from the plates and the cells were cultured in 10% FBS DMEM in an incubator for an additional 48 h. The determination of cell viability was performed by using the MTT-colorimetric method (3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide purchased from Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, Missouri, USA).<sup>26</sup> Briefly, the cells were washed with PBS and then incubated with MTT 75 µg mL<sup>-1</sup> 1% FBS DMEM for 2 hours. The solutions were aspirated and 300 µL of isopropanol (Synth, Diadema, Brazil) was added, solubilizing the generated formazan crystals. An absorption measurement at 550 nm was performed using a SpectraMax iix plate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, USA). The percentage of living cells was calculated from a function of the absorption that was obtained from the cells that were maintained without the PS (control). All of the data were generated from three independent experiments with  $n = 6$  in each of them.

#### Cell uptake

The cells were seeded in 12-well plates at a density of 240 000 cells per well. After a period of 18–24 hours, the cells were treated with 10 µmol L<sup>-1</sup> of the MB, AA and AB solutions in DMEM 1% FBS, for 3 hours in the dark. At the end of the incubation, 500 µL of the supernatant from each well was removed and mixed with 500 µL of 100 mmol L<sup>-1</sup> sodium dodecyl sulfate solution (SDS), reserving the solutions for quantification. The remainder of the supernatant was discarded. The adhered cells were washed with ice-cold PBS and 700 µL of 50 mmol L<sup>-1</sup> SDS solution was added to each well, promoting cell lysis. The quantification of the PSs was performed by reading the values of spectrophotometric absorption (Ocean Optics UV-VIS Spectrophotometer DH-2000-BAL). Each PS was tested in triplicate and three independent experiments were performed.

#### Quantum yields of singlet oxygen production (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>)

The PSs were excited with an OPO Rainbow tunable laser (Quantel, France) that was pulsed by an Nd: YAG Laser, 5 ns, Brilliant (Quantel, France). Singlet oxygen emission decay at 1270 nm was detected using a Hamamatsu Photomultiplier R5509, cooled in liquid nitrogen. Data were then stored in the computer.<sup>2,20,27</sup> The quantum yield of singlet oxygen production was calculated from the ratio between the absorbance and the phosphorescence intensities of the samples and the standard, while performing suitable corrections for the index of refraction and their lifetime in the different media. Solutions with an absorbance of around 0.2–0.3 at 664 nm (using a cuvette with a 1.0 cm optical path) were used, since this was the excitation wavelength. As a standard, a MB solution in methanol was used.<sup>24</sup>

#### Determination of dimer to monomer ratio

By using a UV-1800 Spectrophotometer (Shimadzu, Japan), the absorption spectra of the PDs were recorded in water and in PBS, using the wavelength range of 500 nm to 800 nm.

The monomer–dimer ratio was determined by establishing the ratios between the absorbance values of the two main absorption bands, one near 590 nm (a characteristic of the MB dimer absorbance) and the other, near 664 nm (a characteristic of the monomer absorbance).<sup>23</sup>

#### Statistical analysis

The InStat Software Version 3.1 (GraphPad, La Jolla, USA) was used. The Kolmogorov and Smirnov test was used in order to verify the normality of the data. Inferential analyses were performed by using one-way analysis of variance (ANOVA) and Bonferroni's post-test. Values of  $p < 0.05$  were considered significant.

#### Conflicts of interest

There are no conflicts to declare.

#### Acknowledgements

The authors thank the São Paulo Research Foundation (FAPESP) for financial support of this research (Grant Numbers 2012/50680-5 and 2016/03037-0). We thank Prof. Dr Mauricio da Silva Baptista who kindly allowed us to use the singlet oxygen measurement equipment.

#### References

- J. P. Tardivo, A. Del Giglio, C. S. de Oliveira, D. S. Gabrielli, H. C. Junqueira, D. B. Tada, D. Severino, R. D. F. Turchiello and M. S. Baptista, *Photodiagn. Photodyn. Ther.*, 2005, 2, 175–191.
- C. Pavani, A. F. Uchoa, C. S. Oliveira, Y. Yamamoto and M. S. Baptista, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2009, 8, 233–240.
- I. O. L. Bacellar, T. M. Tsubone, C. Pavani and M. S. Baptista, *Int. J. Mol. Sci.*, 2015, 16, 20523–20559.
- T. N. Demidova and M. R. Hamblin, *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.*, 2004, 17, 245–254.
- J. Cadet, S. Mouret, J.-L. Ravanat and T. Douki, *Photochem. Photobiol.*, 2012, 88, 1048–1065.
- M. Gracanin, C. L. Hawkins, D. I. Pattison and M. J. Davies, *Free Radical Biol. Med.*, 2009, 47, 92–102.
- J. Marotti, A. C. C. Aranha, C. de, P. Eduardo and M. S. Ribeiro, *Rev. Assoc. Paul. Cir. Dent.*, 2008, 62, 2370–2373.
- D. Mostafa, E. Moussa and M. Alnougair, *Photodiagn. Photodyn. Ther.*, 2017, 19, 56–66.
- C. L. Nascimento, M. S. Ribeiro, F. P. Sellera, G. H. P. Dutra, A. Simões and C. R. Teixeira, *Photodiagn. Photodyn. Ther.*, 2015, 12, 36–44.
- B. Obstoy, M. Salaun, P. Bohn, L. Veresezan, R. Sesboué and L. Thiberville, *Photodiagn. Photodyn. Ther.*, 2016, 15, 109–114.
- A. F. dos Santos, L. F. Terra, R. A. M. Wailemann, T. C. Oliveira, V. de, M. Gomes, M. F. Mineiro, F. C. Meotti,

- A. Bruni-Cardoso, M. S. Baptista and L. Labriola, *BMC Cancer*, 2017, 17, 194.
- 12 Z. S. Silva, Y.-Y. Huang, L. F. de Freitas, C. M. França, S. B. Botta, P. A. Ana, R. A. Mesquita-Ferrari, K. P. Santos Fernandes, A. Deana, C. R. Lima Leal, R. A. Prates, M. R. Hamblin and S. K. Bussadon, *Sci. Rep.*, 2016, 6, 33270.
- 13 K. Bergmann and C. T. O'Konski, *J. Phys. Chem.*, 1963, 67, 2169–2177.
- 14 H. C. Junqueira, D. Severino, L. G. Dias, M. S. Gugliotti and M. S. Baptista, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2002, 4, 2320–2328.
- 15 D. Severino, H. C. Junqueira, M. Gugliotti, D. S. Gabrielli and M. S. Baptista, *Photochem. Photobiol.*, 2003, 77, 459–468.
- 16 L. M. Moreira, J. P. Lyon, S. M. S. Tursi, I. Trajano, M. P. Felipe, M. S. Costa, M. R. Rodrigues, L. Codognato and H. P. M. De Oliveira, *Spectroscopy*, 2010, 24, 621–628.
- 17 D. Gabrielli, E. Belisle, D. Severino, A. J. Kowaltowski and M. S. Baptista, *Photochem. Photobiol.*, 2004, 79, 227–232.
- 18 A. Blázquez-Castro, J. C. Stockert, F. Sanz-Rodríguez, A. Zamarróna and A. Juarranza, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2009, 8, 371–376.
- 19 C. S. Oliveira, R. Turchiello, A. J. Kowaltowski, G. L. Indig and M. S. Baptista, *Free Radical Biol. Med.*, 2011, 51, 824–833.
- 20 C. Pavani, C. M. L. Francisco, N. R. S. Gobo, K. T. de Oliveira and M. S. Baptista, *New J. Chem.*, 2016, 40, 9666–9671.
- 21 F. M. Engelmann, I. Mayer, D. S. Gabrielli, H. E. Toma, A. J. Kowaltowski, K. Araki and M. S. Baptista, *J. Bioenerg. Biomembr.*, 2007, 39, 175–185.
- 22 F. Ricchelli, L. Franchi, G. Miotto, L. Borsetto, S. Gobbo, P. Nikolov, J. C. J. Bommer and E. Reddi, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2005, 37, 306–319.
- 23 L. M. O. Lourenço, P. M. R. Pereira, E. Maciel, M. Válega, F. M. J. Domingues, M. R. M. Domingues, M. G. P. M. S. Neves, J. A. S. Cavaleiro, R. Fernandes, J. P. C. Tomé, Y. Iamamoto, M. R. M. Domingues, R. Santuse and P. Morliere, *Chem. Commun.*, 2014, 50, 8363.
- 24 R. W. Redmond and J. N. Gamlin, *Photochem. Photobiol.*, 1999, 70, 391–475.
- 25 L. M. Moreira, J. P. Lyon, A. P. Romani, D. Severino, M. R. Rodrigues and H. P. M. de Oliveira, *Adv. Aspects Spectrosc.*, 2012, 393–422.
- 26 F. Wilkinson, W. P. Helman and A. B. Ross, *J. Phys. Chem. Ref. Data*, 1993, 22, 113.
- 27 S. C. Núñez, A. S. Garcez, I. T. Kato, T. M. Yoshimura, L. Gomes, M. S. Baptista and M. S. Ribeiro, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2014, 13, 595–602.
- 28 A. E. da and H. Machado, *Quím. Nova*, 2000, 23, 237–243.
- 29 C. C. Jayme, I. R. Caloni and A. C. Tedesco, *Spectrochim. Acta, Part A*, 2016, 153, 178–183.
- 30 B. A. Albani, B. Pen, N. A. Leed, N. A. B. G. De Paula, C. Pavani, M. S. Baptista, K. R. Dunbar and C. Turro, *J. Am. Chem. Soc.*, 2014, 136, 17095–17101.
- 31 M. Havelcová, P. Kubát and I. Němcová, *Dyes Pigm.*, 1999, 44, 49–54.
- 32 M. Usacheva, M. Teichert and M. Biel, *Lasers Surg. Med.*, 2001, 29, 165–173.
- 33 M. N. Usacheva, M. C. Teichert and M. A. Biel, *J. Photochem. Photobiol., B*, 2003, 71, 87–98.
- 34 N. Siraj, P. E. Kolic, B. P. Regmi and I. M. Warner, *Chem. – Eur. J.*, 2015, 21, 14440–14446.
- 35 T. Ikeuchi, J. Mack, T. Nyokong, N. Kobayashi and M. Kimura, *Langmuir*, 2016, 32, 11980–11985.
- 36 W. K. Martins, D. Severino, C. Souza, B. S. Stolf and M. S. Baptista, *Biotechnol. J.*, 2013, 8, 730–737.
- 37 I. O. L. Bacellar, C. Pavani, E. M. Sales, R. Itri, M. Wainwright and M. S. Baptista, *Photochem. Photobiol.*, 2014, 90, 801–813.

## **INFORMAÇÕES PARA MEMBROS EXTERNOS DE BANCAS**

Caro(a) professor(a), agradecemos ter aceitado nosso convite, ficaremos muito honrados com sua presença. Para facilitar sua análise, esclarecemos que os trabalhos de dissertação e tese do Programa de Pós-graduação em Biofotônica Aplicada às Ciências da Saúde devem seguir a seguinte estrutura:

1. Contextualização do objeto de estudo com a respectiva justificativa;
2. Objetivos que devem estar alinhados aos artigos publicados;
3. Métodos. Toda metodologia utilizada no(s) artigo(s);
4. Resultados. Descrição dos resultados ainda não publicados e/ou apenas a referência completa do(s) manuscrito(s) publicado(s) ou aceito(s) para publicação no caso de todos resultados já terem sido aceitos ou publicados. Os artigos devem estar disponíveis na seção “Anexos”.
5. Discussão. Abordagem do conjunto dos resultados frente à literatura pertinente;
6. Conclusão. Descrição concisa do significado dos resultados;
7. Anexo. Informações adicionais não reportadas nas seções anteriores e o(s) artigo(s) publicado(s) ou submetido(s) a publicação.