



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia
RENORBIO

AVALIAÇÃO DA TERAPIA FOTODINÂMICA ASSOCIANDO O LASER
VERMELHO A SOLUÇÃO FENOTIAZÍNICA SOBRE MELANOMA MURINO
B16F10

Gustavo Miranda Pires Santos

Salvador
2018



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia
RENORBIO

AVALIAÇÃO DA TERAPIA FOTODINÂMICA ASSOCIANDO O LASER
VERMELHO A SOLUÇÃO FENOTIAZÍNICA SOBRE MELANOMA MURINO
B16F10

Gustavo Miranda Pires Santos

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO) do Ponto Focal Bahia da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia. Área de concentração Biotecnologia em saúde.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Luiz Barbosa Pinheiro

Salvador
2018

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Universitário de Bibliotecas (SIBI/UFBA),
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Santos, Gustavo Miranda Pires
AVALIAÇÃO DA TERAPIA FOTODINÂMICA ASSOCIANDO O
LASER VERMELHO A SOLUÇÃO FENOTIAZÍNICA SOBRE MELANOMA
MURINO B16F10 / Gustavo Miranda Pires Santos. --
Salvador, 2018.
86 f.

Orientador: Antonio Luiz Barbosa Pinheiro.
Tese (Doutorado - Renorbio) -- Universidade
Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde,
2018.

1. Melanoma. 2. Terapia Fotodinâmica. 3. Autofagia
. I. Pinheiro, Antonio Luiz Barbosa. II. Título.



Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Universidade Federal da Bahia - UFBA
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Av. Reitor Miguel Calmon s/n - Vale do Canela
40100-000, Salvador-BA



Telefone: (71) 3283-8826 - E-mail: renorbio@ufba.br

TERMO DE APROVAÇÃO

A TESE:

“Avaliação da Terapia Fotodinâmica associando o laser vermelho a solução fenotiazínica sobre melanoma murino B16F10”

Elaborada por:

GUSTAVO MIRANDA PIRES SANTOS

Foi aprovada por todos os membros da banca examinadora e aceita pelo Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Renorbio como requisito parcial à obtenção do título de

DOUTOR EM BIOTECNOLOGIA

Salvador, Bahia, 23 de fevereiro de 2018

BANCA EXAMINADORA:

Dr. Antônio Luiz Barbosa Pinheiro
(Orientador)

Universidade Federal da Bahia

Dr. Jean Nunes dos Santos
(Examinador Interno)

Universidade Federal da Bahia

Dr.ª Juliana Santos de Carvalho Monteiro
(Examinadora Externa)

Universidade Estadual de Feira de Santana

Dr. Luiz Guilherme Pinheiro Soares
(Examinador Externo)

Universidade Federal da Bahia

Dr.ª Patrícia Ramos Cury
(Examinadora Externa)

Universidade Federal da Bahia

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais que sempre me incentivaram a seguir em frente

Ao irmão que é meu grande amigo

À minha esposa pela força e paciência

Aos amigos de laboratório Susana Carla, Pedro Crugeira, Fernando José e Sandra Fagnani pelo apoio, discussões e correções

Aos professores do programa Renorbio/UFBA pelos ensinamentos

Ao prof. Antonio Pinheiro pela orientação e acolhimento

À FAPESB (termo de outorga 04282014)

“Uma mente que se abre a uma nova ideia
jamais volta ao seu tamanho original.”
Albert Einstein.

ESTRUTURA DA TESE

Esta tese é apresentada em formato de Artigo Científico. As listas de figuras, tabelas, siglas e abreviaturas contêm as ilustrações, tabelas, siglas e abreviaturas apresentadas na introdução e referencial teórico deste trabalho.

RESUMO

Este estudo trata-se da avaliação da terapia fotodinâmica associando uma solução fenotiazinica ao Laser vermelho ($\lambda=660\text{nm}$) contra células de melanoma B16F10. Para tanto, foram realizadas três etapas: prospecção; avaliação da terapia fotodinâmica contra melanoma; avaliação da terapia fotodinâmica contra macrófagos infectados e não infectados. Deste modo foi possível demonstrar que a maior parte das patentes depositadas sobre o tema utilizam porfirinas como fotossensibilizador, que o maior depositante de patentes nesta área são os Estados Unidos da América e que as cinco maiores instituições depositantes são empresas privadas. Já na segunda fase do estudo foi demonstrada a capacidade da terapia fotodinâmica, associando uma solução fenotiazinica ao Laser vermelho ($\lambda=660\text{nm}$), em aumentar a produção de ROS intracelular, bem como a produção massiva de autofagia, além de reduzir a proliferação de células de melanoma B16F10. Por último, a fim de avaliar a seletividade da terapia fotodinâmica, associando uma solução fenotiazinica ao Laser vermelho ($\lambda=660\text{nm}$), foram usados macrófagos infectados e não infectados. Esta última etapa demonstrou-se que a terapia fotodinâmica, associando uma solução fenotiazinica ao Laser vermelho ($\lambda=660\text{nm}$), reduz o número de patógenos intracelulares sem reduzir o número de macrófagos, este fato está associado à indução de um maior 'burst' oxidativo nos macrófagos que resulta na eliminação de patógenos. Enquanto, em macrófagos não infectados a terapia fotodinâmica, associando uma solução fenotiazinica ao Laser vermelho ($\lambda=660\text{nm}$), não produziu o aumento de ROS. Assim foi possível concluir que a terapia fotodinâmica foi seletiva sendo capaz de causar alterações ultraestruturais e reduzir a proliferação de células de melanoma B16F10, mas incapaz de produzir o mesmo efeito em macrófagos, infectados ou não.

Palavras-chave: Câncer; Autofagia; Laser; Terapia Fotodinâmica

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the photodynamic therapy associated with a phenothiazine solution to the Red Laser ($\lambda=660\text{nm}$) against B16F10 melanoma cells. Three steps were taken: prospecting; evaluation of photodynamic therapy against melanoma; evaluation of photodynamic therapy against infected and uninfected macrophages. In the first stage, we show that most of the patents deposited on the subject use porphyrins as a photosensitizer, that the largest patent holder in this area is the United States of America and that the five largest depositors are private companies. In the second phase of the study, the capacity of photodynamic therapy was demonstrated increasing intracellular ROS production, as well as mass production of autophagy, and reducing the proliferation of melanoma B16F10. Finally, to evaluate the selectivity of photodynamic therapy infected and uninfected macrophages were used. In this step the photodynamic therapy's group reduced the number of intracellular pathogens without reducing the number of macrophages. This fact is associated with the induction of a greater oxidative burst in the macrophages that results in the elimination of pathogens. While, in uninfected macrophages, photodynamic therapy did not produce an increase in ROS. Thus, it was possible to conclude that photodynamic therapy was selective and capable of causing ultrastructural alterations and reducing proliferation of B16F10 melanoma cells, but unable to produce the same effect in infected or non-infected macrophages.

Keywords: Cancer; Autophagy; Laser; Photodynamic Therapy

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1:** Esquema da reação fotodinâmica tipo I. S => fotossensibilizador. A=> molécula que será oxidada. Fonte: MACHADO, 2000..... 17
- Figura 2:** Esquema da reação fotodinâmica tipo II. Fonte: MACHADO, 2000..... 17
- Figura 3:** Absorção de luz pela melanina, hemoglobina e água. A absorção de luz pela melanina é aproximadamente 10 vezes maior na faixa espectral do azul que na faixa espectral do vermelho. Fonte: <https://www.globeamt.com/product/deka-minisilk-ft/>..... 21
- Figura 4:** Esquema para a ativação da autofagia pela terapia fotodinâmica e suas vias subsequentes de sobrevivência e morte tumoral. Fonte: GARG & AGOSTINIS, 2015..... 22
- Figura 5:** Processo esquemático da necrose celular. Fonte: <https://basicmedicalkey.com/cell-injury-aging-and-death/>. Adaptado para português..... 68
- Figura 6:** Micrografia eletrônica de necrose celular. Fonte: CRAWFORD *et al.*,2017. 68
- Figura 7:** Dois modelos para a montagem de caspases maduras. No modelo de montagem intramolecular, as duas subunidades do heterodímero maduro são derivadas da mesma molécula precursora. Alternativamente, no modelo de montagem intermolecular as subunidades p20 e p10 do heterodímero originam-se de dois precursores diferentes. Fonte: LAMKANFI *et al.*,2002. Adaptado para português..... 69
- Figura 8:** Esquema resumido da apoptose evidenciando as vias extrínseca e intrínseca. Setas azuis => ativação da via; setas azuis com “X” vermelho => via bloqueada; setas azuis pontilhadas => sequência da via em caso de ativação; setas vermelhas => vias de controle/inibição. Adaptado de KROEMER, GALLUZZI & BRENNER, 2007..... 70
- Figura 9:** Esquema resumido do controle negativo da apoptose evidenciando as vias extrínseca e intrínseca. Setas azuis => ativação da via; setas azuis com “X” vermelho => via bloqueada; setas azuis pontilhadas => sequência da via em caso de ativação; setas vermelhas => vias de controle/inibição. Adaptado de KROEMER, GALLUZZI & BRENNER, 2007... 71
- Figura 10:** Micrografia eletrônica de *Leishmania* após tratamento. seta amarela mostra uma célula truncada (catástrofe mitótica). Fonte: acervo do autor..... 72
- Figura 11:** Esquema resumido da necroptose evidenciando as vias de ativação e bloqueio. Setas azuis => ativação da via; setas azuis com “X” vermelho => via bloqueada; setas azuis pontilhadas => sequência da via em caso de ativação; setas vermelhas => vias de controle/inibição. Adaptado de NAJAFOV, CHEN & YUAN, 2017..... 72

Figura 12: Esquema resumido da piroptose evidenciando as vias de ativação e bloqueio. Setas azuis => ativação da via; setas azuis com “X” vermelho => via bloqueada; setas azuis pontilhadas => sequência da via em caso de ativação. Adaptado de TAABAZUING, OKONDO & BACHOVCHIN, 2017. 74

Figura 13: Esquema resumido de ativação da autofagia. O complexo ATG 1 atua sobre a membrana do retículo endoplasmático (RE) recrutando o complexo fosfatidilinositol 3-quinase, formando assim uma estrutura pré-autofágica (PAS). A maturação de PAS em autofagossomo ocorre após a ação do complexo ATG 8. O fim do processo acontece após o fusionamento do autofagossomo com o lisossomo e consequente digestão do conteúdo vesicular. Setas azuis => ativação da via. Adaptado de LIN & BAEHRECKE, 2015 74

Figura 14: Processo autofágico em diferentes estágios de ativação em eucariotos. A) células não tratadas exibindo pequenas vesículas citoplasmáticas. B) células tratadas apresentando estrutura com membranas concêntricas (figura de mielina) caracterizando processo autofágico mais intenso. Fonte: acervo pessoal do autor. 75

Figura 15: Esquema de morte programada diferenciando apoptose e autofagia. Fonte: BURSCH *et al.*, 2004. Adaptado para português. 76

Figura 16: Diferentes condições uma glândula: glândula normal; tumor glandular não invasivo (células rosa); tumor glandular invasivo (maligno – células vermelhas). Fonte: BERNS *et al.*, 2017 77

Figura 17: Esquema de formação de dímeros de pirimidina no DNA após a irradiação com UV. 78

Figura 18: Esquema de progressão tumoral baseada na instabilidade genética e seleção natural de clones. A) Multiplicação de células sem quaisquer alterações genéticas. B) Multiplicação de células com alterações genéticas e formação de novas linhagens mais ‘adaptadas’ favorecendo a progressão tumoral. C) Multiplicação de células com alterações genéticas e demasiada instabilidade genética e regressão tumoral em função da seleção natural. Fonte CAHILL *et al.*, 1999. Adaptado para português. 79

Figura 19: Esquema de ativação genética para a progressão tumoral pela via RAS-BRAF. Fonte: SHARMA, HUANG & HAMBLIN, 2005. Adaptado para português. 82

Figura 20: Progressão do melanoma considerando os níveis de Clark e a espessura de Breslow. Fonte: Canto & Oliveira (2007). 82

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	16
2.1	OBJETIVO GERAL	16
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3	REFERENCIAL TEORICO	17
3.1	TERAPIA FOTODINÂMICA (TFD - PDT)	17
3.1.1	<i>Princípios básicos da Terapia Fotodinâmica</i>	17
3.1.2	<i>Fotossensibilizadores</i>	18
3.1.3	<i>Fontes emissoras de luz na terapia fotodinâmica</i>	19
3.1.4	<i>Terapia fotodinâmica vs melanoma</i>	19
4	CAPÍTULOS	23
4.1	ESTUDO PROSPECTIVO	23
4.2	TERAPIA FOTODINÂMICA CONTRA MELANOMA B16F10 (PARTE I)	30
4.3	TERAPIA FOTODINÂMICA CONTRA MELANOMA B16F10 (PARTE II)	36
4.4	SISTEMA IMUNE E A TERAPIA FOTODINÂMICA	42
5	CONCLUSÃO	56
	REFERÊNCIAS	57
	ANEXO I – OUTROS ARTIGOS EM TERAPIA FOTODINÂMICA	64
	APENDICE I	67
5.1	MORTE CELULAR	67
5.1.1	<i>Necrose</i>	67
5.1.2	<i>Apoptose</i>	69
5.1.3	<i>Mortes celulares programadas não apoptóticas</i>	71
5.2	CÂNCER	76
5.2.1	<i>UM BREVE HISTORICO SOBRE O CÂNCER</i>	76
5.2.2	<i>CARCINOGENESE</i>	77
5.2.3	<i>MELANOMA</i>	80

1 INTRODUÇÃO

A produção tecnológica deve ser acompanhada de uma prospecção tecnológica e uma busca de anterioridade. Este primeiro evento, no geral, é produzido a partir do estudo de patentes depositadas. Assim é possível avaliar o nível de desenvolvimento de uma determinada tecnologia e suas respectivas possibilidades de crescimento. No Brasil o principal banco de patentes consultados é INPI. Enquanto a busca de anterioridade está relacionada à identificação dos produtos e processos, relacionados à tecnologia em questão, já desenvolvidos.

A terapia fotodinâmica é uma modalidade terapêutica que utiliza um cromóforo exógeno que quando fotoativado libera ROS. Existem muitas classes de cromóforos passíveis de fotoativação, os principais são as porfirinas e seus derivados. Estes compostos tem o maior pico de absorção na faixa espectral do azul, onde produzem maior efeito fotodinâmico, contudo podem ser fotoativados em outras faixas espectrais.

A maioria dos tipos de morte celular é fisiológica, estas são classificadas como morte celular programada. Enquanto, quadro de morte não programadas estão relacionadas a casos de alterações abruptas. Basicamente existem cinco tipos de morte celular programada, sendo uma dependente de caspase, apoptose, e os outros tipos independentes de caspases.

O controle da progressão celular e da morte celular são realizados por dois grupos de genes: os protooncogenes, que regulam o ciclo celular, e o genes supressores de tumor, que ativam as vias de morte programadas. Falhas nestes mecanismos de controle podem gerar neoplasias.

O câncer é um conjunto de mais de 100 patologias, estima-se que ocorra em 1 a cada 3 americanos durante a vida (NIH, 1999). Entre 2003 e 2008 cerca de 29 milhões de pessoas, no mundo, foram diagnosticadas com algum tipo de câncer. Em 2008 foram registrados 7,6 milhões de óbitos, em termos percentuais corresponde à 13% de todas as mortes de 2008, além disso, mais de 50% destes casos de óbitos ocorrem em países em desenvolvimento (OMS, 2008).

Dentre os tipos de câncer mais comuns estão câncer de próstata, câncer do colo de útero, leucemia, câncer de estômago, câncer de pele. Este último ainda pode ser subdividido em vários tipos de câncer de pele onde o subtipo mais letal é o melanoma (OMS, 2004). O melanoma corresponde a cerca de 3 a 4% de todos os tumores cutâneos malignos (ALMEIDA *et al.*, 2001), contudo é responsável por aproximadamente 80% das mortes por câncer de pele (INCA, 2007).

Dentre as terapias utilizadas podemos citar a cirurgia, a quimioterapia, a radioterapia, a terapia biológica – que utiliza interferon ou interleucina-2 – e a terapia fotodinâmica (TFD)

(NIH, 2010). Esta última, a terapia fotodinâmica, pode ser considerada uma alternativa terapêutica não invasiva (CHAVANTES, 2009).

A terapia fotodinâmica baseia-se na associação de três elementos: um composto fotossensível (fotossensibilizador) que é atóxico, uma fonte de luz visível (LED ou LASER) e a presença de oxigênio molecular. Assim, no processo de fotoativação o fotossensibilizador que era inerte absorve fótons e passa para um estado excitado. Neste estado o composto tende a retornar ao estado natural e transfere sua energia para o oxigênio, que por sua vez, pode apresentar-se como oxigênio tripleto ou recombinar-se passando para o estado singleto (CHAVANTES, 2009). Outro efeito que pode ser associado à terapia fotodinâmica é a produção de radicais livres (CASTANO *et al.*, 2004). Esse fato é relevante uma vez que a indução do estresse oxidativo por ser uma ferramenta útil na quimioterapia do câncer (FANG, NAKAMURA & YIER, 2007)

A terapia fotodinâmica pode apresentar diferentes alvos intracelulares que são dependentes da afinidade do fotossensibilizador por uma determinada molécula ou organela. Sendo assim, podemos observar a ação da terapia fotodinâmica na mitocôndria, nos lisossomos, na membrana plasmática, no complexo de Golgi ou no retículo endoplasmático (CASTANO *et al.*, 2004) e por atuar em diferentes estruturas a terapia fotodinâmica pode induzir a diferentes tipos de morte celular incluindo a apoptose e a necrose (ROBERTSON, EVANS & ABRAHAMSE, 2009). Segundo Castano e colaboradores, em 2005, para determinar o tipo de morte celular e suas respectivas vias devem ser considerados: o tipo e a localização do fotossensibilizador, a dose de energia, o comprimento de onda (λ) específico e o tipo celular. Os mecanismos de morte celular podem ser avaliados por sondas fluorescentes e por técnicas ultraestruturais. A microscopia eletrônica é empregada tanto para estudos em câncer, quanto em doenças parasitárias (RODRIGUES & DE SOUZA, 2008; MENNA-BARRETO *et al.*, 2009; VANNIER-SANTOS & CASTRO, 2009).

Genericamente, em 1990, a necrose induzida pela terapia fotodinâmica foi associada à alta e rápida produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (ROBERTSON, EVANS & ABRAHAMSE, 2009), que pode causar danos celulares irreversíveis e por consequente ocasionando as alterações demonstradas por Ketabchi e colaboradores, em 1998. A apoptose, por sua vez, possui alvos celulares mais definidos nos protocolos de terapia fotodinâmica onde os mais descritos são, dentre as organelas, o lisossomo, a mitocôndria, a membrana plasmática e o retículo endoplasmático, dentre as moléculas tem-se, por exemplo, Fas-FADD ligado à procaspase-8, Ca^{++} e Bcl-2 (ALMEIDA *et al.*, 2004; CASTANO *et al.*, 2005).

Apesar da autofagia ainda não estar relacionada positivamente à terapia fotodinâmica, por ser um mecanismo de sobrevivência bem definido e conservado, existem relatos de que a depleção de Bcl-2, cuja expressão está relacionada aos efeitos antiapoptóticos, e/ou à redução

de Beclin-1, podem desequilibrar a formação do complexo Bcl-2/Beclin-1, que mantém a homeostase celular em situações de carência de nutrientes e induzem à morte autofágica (PATTINGRE *et al.*,2005; CASTANO *et al.*,2005).

Além dos efeitos antitumorais a terapia fotodinâmica possui mais duas vias de ação que podem auxiliar na redução e morte do tumor. A primeira atua na ativação do sistema imune: com ativação dos macrófagos; influxo de neutrófilos; produção de anticorpos; ativação de células citotóxicas, enquanto a segunda via tem sua atuação no tecido endotelial, reduzindo o aporte de nutrientes e causando hipóxia (CASTANO *et al.*,2005).

Davids e Kleemann, em 2011, apontam a terapia fotodinâmica como um tipo de tratamento minimamente invasivo que apresenta boa eficácia em casos oncológicos e não-oncológicos e capaz de ser um tratamento coadjuvante nos casos de melanoma. Dentre os fotossensibilizadores mais utilizados estão as porfirinas e seus derivados. Contudo, compostos diferentes dos anteriormente citados podem ser utilizados como fotossensibilizadores capazes de reduzir a proliferação de melanoma murino B16F10.

A fim de ampliar as alternativas para a terapia fotodinâmica contra o melanoma murino B16F10, neste trabalho, foram estudados os efeitos da terapia fotodinâmica contra células de melanoma, bem como a ação da terapia fotodinâmica contra macrófagos. Para tanto, foram avaliadas a capacidade antiproliferativa, a produção de ROS, a integridade membranar e a indução de autofagia.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a eficácia da terapia fotodinâmica, utilizando uma solução fenotiazínica e laser vermelho, contra células de melanoma murino B16F10.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Realizar prospecção tecnológica de fotofármacos e tratamentos relacionados à terapia fotodinâmica.

Avaliar a proliferação celular de melanoma após a terapia fotodinâmica em 24 horas.

Avaliar produção de ROS nas células de melanoma B16F10 após a terapia fotodinâmica.

Avaliar alterações membranares promovidas após a terapia fotodinâmica.

Avaliar processo autofágico promovido após a terapia fotodinâmica

Avaliar seletividade da terapia fotodinâmica usando macrófagos infectados e não infectados.

Avaliar produção de ROS macrófagos infectados e não infectados após a terapia fotodinâmica.

3 REFERENCIAL TEORICO

3.1 TERAPIA FOTODINÂMICA (TFD - PDT)

3.1.1 Princípios básicos da Terapia Fotodinâmica

O tratamento do câncer baseado em fotoquimioterapia é chamado Terapia Fotodinâmica (inglês: photodynamic therapy - PDT) (Dougherty *et al.*, 1998), este é baseado no uso de corantes não-tóxicos, que tem seletividade por alguns tecidos ou células e quando ativados pela luz visível, produzem ou induzem a célula a produzir Espécies Reativas Oxigênio (ROS), como Oxigênio Singleto (DOBSON, QUEIROZ e GOLDING, 2018).

A ação desses corantes, conhecidos como fotossensibilizadores depende basicamente de dois tipos de reação, onde o fotossensibilizadores, quando excitado reage diretamente com substratos oxidáveis, através de transferência de elétrons ou removendo átomos de hidrogênio de moléculas biológicas, como fosfolipídios, colesterol, entre outras, ou reagem com o oxigênio molecular produzindo oxigênio singleto, e reduzindo o corante a seu estado fundamental (MARTIN & LOGSDON, 1987; NÚÑEZ, 2007) (figuras 1 e 2).

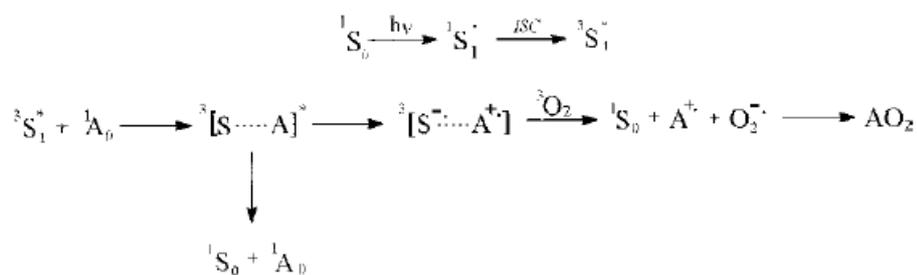


Figura 1: Esquema da reação fotodinâmica tipo I. S => fotossensibilizador. A=> molécula que será oxidada. Fonte: MACHADO, 2000.

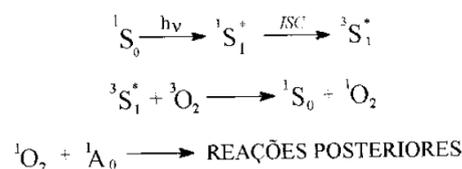


Figura 2: Esquema da reação fotodinâmica tipo II. Fonte: MACHADO, 2000.

O oxigênio singleto é um dos principais mediadores do dano fotoquímico causado por fotossensibilizadores usados na PDT, por ter um tempo de meia vida curto (em água 4,0 μ s), por conta disso seu raio de ação é reduzido, corroborando com o princípio de que a PDT atua de maneira localizada (MACHADO, 2000).

A maioria dos fotossensibilizadores tem seletividade por células alteradas (neoplásicas ou não) isto ocorre porque as células normais eliminam o corante em aproximadamente 24h enquanto as células neoplásicas, por exemplo, permanecem com o corante num intervalo de 24 a 72 h (National Cancer Institute, 2011). Um fotossensibilizador ideal deve atender as seguintes características: Atoxicidade ou pouca toxicidade quando não irradiado; estabilidade cinética e termodinâmica; síntese rápida, barata e com alto rendimento; seletividade por células-alvo; ser ampla e rapidamente absorvido pela célula; não ser absorvido ou ser eliminado rapidamente pelas células não-alvo; ter um comprimento de onda para sua ativação dentro do espectro; apresentar alta capacidade de produzir ROS; não apresentar efeito mutagênico (GONZALES, 2007; VAN STRATEN et al., 2017).

A terapia fotodinâmica no tratamento do câncer é indicada em estágios iniciais, quando métodos tradicionais de tratamento não são recomendados ou podem causar sequelas irreversíveis, tratamento de regiões tubulares, como esôfago, traqueia, brônquios. As contraindicações da terapia fotodinâmica podem ser divididas em contraindicações severas, como no caso de paciente com deficiência cardiorrespiratória, caquexia, lúpus eritematoso sistêmico, ou contra indicações restritas, no caso de reações alérgicas e/ou metástase regional ou distante (FERREIRA & MENEZES, 2008).

3.1.2 Fotossensibilizadores

Fotossensibilizadores são moléculas que apresentam propriedades fotoquímicas, que em geral, podem na presença da luz ser fotoconvertidas em outras moléculas bem como apresentarem alguma luminescência. Atualmente muitos compostos são utilizados como fotossensibilizadores utilizados nos protocolos de fotoinativação e estes podem ser classificados em diferentes “famílias” e gerações (CALLAGHAN e SENGE, 2018).

Em linhas gerais, o fotossensibilizador ideal é aquele que só apresenta toxicidade após a fotoativação, apresenta alta seletividade e afinidade pelas células-alvo, além de ser inativo contra células e tecidos humanos. Seguindo este raciocínio tem-se como grupo utilizados para o tratamento de câncer as famílias que albergam na sua estrutura química núcleo tetrapirrólicos, como por exemplo, a família das porfirinas (VO-DINH, 2015).

É de senso comum, contudo, que compostos coloridos que são formados por moléculas que possuem metais, como Al, Ga, Si, Zn, ou mesmo enxofre ou oxigênio na sua estrutura, bem como a presença de anéis aromáticos, como o benzeno, pontes de nitrogênio e que possam doar ou receber elétrons tem, ao menos em teoria, a chance de serem utilizados como fotossensibilizadores. Neste caso podemos citar como exemplos: Ftalocianinas; Fenotiazinas; Riboflavinas, dentre outras (WAINWRIGHT *et al.*, 2009).

3.1.3 Fontes emissoras de luz na terapia fotodinâmica

O uso de terapias baseadas em efeitos fotoquímicos era realizada por civilizações antigas como fenícios e egípcios, apesar dos seus respectivos mecanismos de ação fossem desconhecidos. Consequentemente, a utilização destas modalidades terapêuticas eram empíricas (ABDEL-KADER, 2014).

Após 1960 com o advento da tecnologia LASER e pouco tempo depois do LED os estudos envolvendo fototerapia tornaram-se mais profundos. Além disso, o aumento no número de equipamentos estimulou o interesse científico. A partir deste momento foi possível regular, nos aparelhos, parâmetros importantes, tais como a densidade de energia, comprimento de onda e a potência, para as terapias fotônicas (PIMENTA, 1990).

Atualmente existem diferentes estudos que apontam fontes emissoras de luz como LASER e LED como equipamentos eficazes. Entretanto, existem outras fontes luz citadas na literatura como eficazes, tal como lâmpadas alógenas (semelhante às utilizadas em projetor de slides), porém vale a pena ressaltar com este tipo de lâmpadas a determinação dos parâmetros da luz tornam-se inviáveis (GOLDMAN, 2007).

Sabendo que a terapia fotodinâmica é uma particularidade da fototerapia que exige a associação da luz e um fotossensibilizador. Tem-se que o efeito fotoquímico ocorrerá no fotossensibilizador após a ação da luz, culminando na liberação de oxigênio singleto em um local específico. Contudo para obter esta reação é preciso utilizar um comprimento de onda específico, ou seja, um comprimento de onda que quando absorvido pelo fotossensibilizador seja capaz de alterar a camada de valência dos seus elétrons (VO-DINH, 2015).

Os principais alvos da terapia fotodinâmica tem como principais alvos a membrana, núcleo e mitocôndrias. Para tanto são utilizados diferentes fotossensibilizadores, pois, no geral, cada um apresenta afinidade por um alvo celular específico. Além disso existe a possibilidade de utilizar fotossensibilizadores nanoencapsulados ou mesmo ligados à anticorpos, assim nestes métodos de entrega de fotossensibilizadores busca-se o aumento da especificidade pelo alvo celular da terapia fotodinâmica (WAINWRIGHT, 2009).

3.1.4 Terapia fotodinâmica vs melanoma

A terapia fotodinâmica já é utilizada como método de tratamento ou método auxiliar no tratamento de diferentes tipos câncer. A principal família química utilizada como fotossensibilizador é a das porfirinas, que tem dois picos de absorção de luz visível: o

primeiro e mais intenso na faixa espectral do azul e o segundo pico menos intenso na faixa espectral do vermelho. Esta diferença de intensidade na absorção da luz resulta na diferença proporcional da produção de ROS (GOLDMAN, 2007; PIRES-SANTOS *et al.*, 2015).

Outro fator importante associado às porfirinas é a ação de proteínas membrana ligadas à resistência às drogas sobre os compostos desta família química. Estas proteínas já foram descritas em diferentes tipos celulares, sendo que sua presença confere à célula a capacidade de bombear porfirinas para fora da célula. Estas proteínas foram denominadas MRP ou ABC, que além de serem descritas em células tumorais podem ser expressas em células normais, tais como hepatócitos, células renais e pulmonares (BORST *et al.*, 1999; GABER *et al.*, 2017).

Nos casos de tumores pigmentados, como o melanoma, a terapia fotodinâmica apresenta uma desvantagem associada à competição de melanina e do fotossensibilizador pela luz. Portanto, protocolos terapêuticos propostos com os comprimentos de onda na faixa espectral do vermelho e infravermelho possuem uma interferência menor que os protocolos que utilizam a faixa espectral do azul para este tipo de barreira física (figura 3). Vale a pena ressaltar que além do comprimento de onda o sucesso da terapia está relacionado à outros fatores, tais como doses de energia e concentrações do composto usadas (SACZKO *et al.*, 2005; MONTEIRO *et al.*, 2016).

Outras moléculas também são citadas como fotossensibilizadores eficazes em modelos *in vitro* e *in vivo*. Dentre estas moléculas podem ser citadas ftalocianinas, clorinas e verteporfina. Todos estes compostos foram testados em associação com luzes cujos comprimentos de onda pertencem à faixa espectral do vermelho/infravermelho próximo foram utilizados contra tumores tipo melanoma (DABROWSKI *et al.*, 2011; BALDEA & FILIP, 2012).

Os principais efeitos antitumorais citados após a terapia fotodinâmica foram: inibição da proliferação tumoral; indução de morte celular e regressão do tumor. Enquanto os menos frequentes foram: redução de metástase por destruição dos vasos linfáticos; conservação dos tecidos normais adjacentes ao tumor e aumento da sobrevivência dos indivíduos submetidos aos protocolos (DABROWSKI *et al.*, 2011; BALDEA & FILIP, 2012).

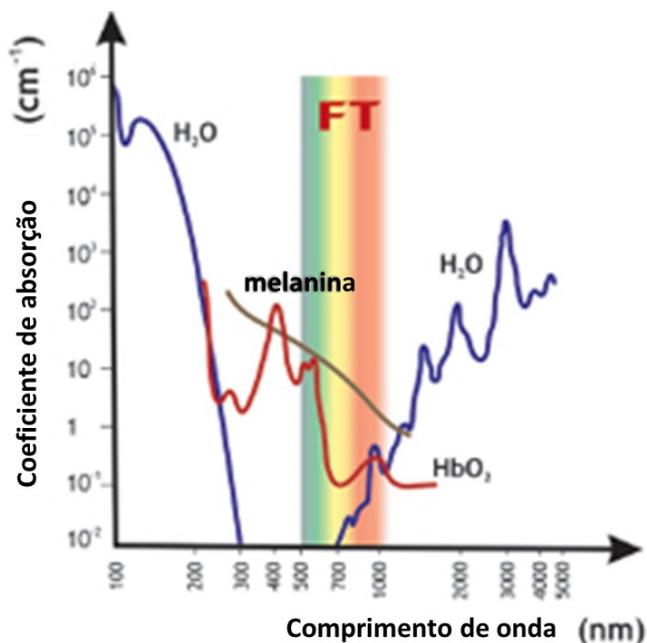


Figura 3: Absorção de luz pela melanina, hemoglobina e água. A absorção de luz pela melanina é aproximadamente 10 vezes maior na faixa espectral do azul que na faixa espectral do vermelho. Fonte: <https://www.globeamt.com/product/deka-minisilk-ft/>

A indução de morte celular pela terapia fotodinâmica depende de vários fatores: tipo de câncer; tipo de fotossensibilizador, concentração e seu respectivo sítio de ligação; comprimento de onda e dose de energia. Os três tipos de morte celular mais estudados são a apoptose, a necrose e a morte autofágica, este último dos três processos é o menos entendido (SACZKO, 2005).

A autofagia é conhecida principalmente por sua ação na sobrevivência da célula, bem como da sua participação na manutenção tumoral. Entretanto existem relatos referentes a ação letal da autofagia, principalmente, em tumores como uma nova possibilidade terapêutica a ser explorada. Sabe-se que a macroautofagia quando superexpressa induz a morte autofágica, no caso da terapia fotodinâmica os principais alvos subcelulares são retículo endoplasmático, mitocôndrias, núcleo e lisossomos (GARG & AGOSTINIS, 2015) (figura 4).

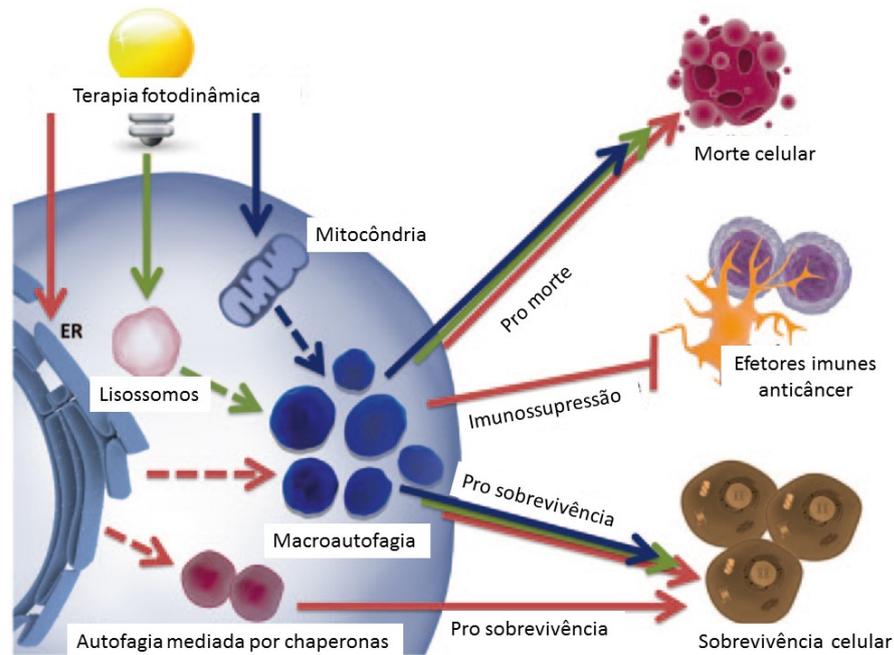


Figura 4: Esquema para a ativação da autofagia pela terapia fotodinâmica e suas vias subsequentes de sobrevivência e morte tumoral. Fonte: GARG & AGOSTINIS, 2015.

O melanoma possui ao menos cinco mecanismos de resistência contra a terapia fotodinâmica: 1) interferência ótica – promovida pela melanina; 2) mecanismos antioxidantes; 3) sequestro dos fotossensibilizadores pelo melanossomos; 4) bombas de efluxo; 5) resistência à apoptose. Portanto, conhecê-los é o primeiro passo para elaboração de um protocolo terapêutico com maiores chances de sucesso (SHARMA, HUANG & HAMBLIN, 2015).

4 CAPÍTULOS

4.1 estudo prospectivo

Prospective study of luminous radiation associated technology photosensitive compounds for treatment of diseases

Gustavo M. Pires-Santos^{a,b}, Susana C. P. S. de Oliveira^{a,b}, Juliana S. C. Monteiro^{a,b,c}, Fernando José Pires Sampaio^{a,b}, Aldo Brugnera^{b,d}, Fátima Antônia Aparecida Zanin^{b,d}, Paulo Almeida^e and Antônio L. B. Pinheiro^{*a,b}

^a Center of Biophotonics, Federal University of Bahia, Salvador, BA, Brazil, 40110-150; ^b National Institute of Optics and Photonics, São Carlos, SP, Brazil, 13560-970; ^c Department of Biology, Estate University of Feira de Santana, Feira de Santana, BA, Brazil, 44036-900; ^d Brugnera & Zanin Institute, São Paulo, SP, Brazil 01434-000; ^e Institute of Health Sciences, Federal University of BA, Brazil, 40231-300.

ABSTRACT

Prospective studies are based on the analysis of patent documents and aims to assess the both technological history and development providing innovation opportunities. This study was a technological prospection mapping aiming to identify breakthrough in PDT and the new possibilities of the technology. Therefore, research in the bank patent 'Spacenet Patent Search' was performed using determinants descriptors associated with the theme: 'A61K41', 'A61N5 / 06'. Were analyzed in this study 326 documents. In evaluating these patents, it was possible to observe an increase in the number of deposits over time, with peak between 1990 and 2000. The highest number of inventors of this area are part of the private sector and the US appear as main producer of technology. It was also observed that blue light, porphyrins and their derivatives are the main topics. It may be concluded that PDT still offers a large opportunity for growth as several wavelengths, and photosensitizers that may be used in the technique

Keywords: PDT, Prospecting, Porphyrins

1. INTRODUCTION

The production of knowledge in general may be accomplished in two ways: the first is related to the production of papers and second the production of patents. The distinction between these two forms of knowledge production is related to the rights to the use of this knowledge. Thus, papers are associated with public knowledge and any individual can take advantage of its benefits. While the patent documents are associated with the protection of knowledge, an intellectual property¹.

The production of knowledge and technology are important factors for the development of a community. Transfers of scientific knowledge and technology directly affect human development. In this regard, countries with different economic conditions have different profiles of production and transfer of knowledge and technology. Brazil, for example, accounts for approximately 3% of publications worldwide scientific articles, but the contribution of patents

Mechanisms for Low-Light Therapy X, edited by Michael R. Hamblin, James D. Carroll, Praveen Arany,
Proc. of SPIE Vol. 9309, 93090Y · © 2015 SPIE · CCC code: 1605-7422/15/\$18 · doi: 10.1117/12.2079199

Proc. of SPIE Vol. 9309 93090Y-1

is about 30 times smaller. However, in developing countries, there is greater disparity between the number of published papers and the number of patents being the later smaller^{2,3}.

Prospection is a scientific method that studies the technological developments and can serve as a guiding agent in the development process. This field of science help to establish the state of the art technology exposing its structure and its possible positive and negative projections⁴. Technological prospection, therefore, is a form of study that conducts a survey of existing technology, and identify the evolutionary stage of this technology and its integration into society. The technological prospecting may have as object of study competitors and related technologies and technological gaps⁵.

Prospective studies may be carried out into three ways: prior art search, technology mapping and development prospects. In the first case, the focus is to understand the technologies described to date. The mapping discusses items related to the inventors, applicants, application date of the patent, the place of production and deposit the patent. By consequent, when dealing with prospects the key points are: the current use of technology, potential technological gaps to be filled or even development of new technologies^{3,6}.

In this study, a technological prospecting was carried out on photodynamic therapy, aimed mapping the technology, and tried to identify gaps to be filled and new technological possibilities that culminate in the improvement of health.

2. METHODOLOGY

This is a technology mapping study therefore, it was adopted as review criteria: the country, the technological evolution, depositors and determinants codes involved. This monitoring were used records of national and international patents (Tab. 1).

Table 1: Criteria for analysis used as direct targets in the prospective study

Analysis Criteria	
Types of monitoring	Identify
Internationale	Priority country Temporal evolution of technological Depositors Involved Codes

For this study, the following determinants codes: 'A61K41' and 'A61N5 / 06' were listed. These two codes according to the bank patents 'Spacenet Patent Search' means respectively: 'Obtaining materials by treatment with waves or particles' and 'therapies for emission of light radiation'. Using these two descriptors allow the use of only one search strategy described in Table 2.

Table 2: Summary of strategies for patent searching using codes as descriptors elements

Search strategies	A61K41	A61N5/06	TOTAL
1	X		14067
2		X	34924
3	X	X	1207 (326)

After the definition of analysis and strategy of search criteria patent documents the bank of patents ' Spacenet Patent Search' were researched and analyzed.

3. RESULTS AND DISCUSSION

By performing search using codes 1207 patents were found, however after excluding replicates, 326 patent documents were used (Tab. 2). For the analysis, they were separated by year, country, depositors involved and related codes. Evaluation of the publication period showed that the total number of patent applications increases with respect to time, without formation of stagnation horizontal areas (Fig. 1). This may be related to the successes achieved by the apparatus, materials and proposed protocols. However when evaluating the deposits per year, it may be seen that, the peak of deposits of patent documents took place between 1999 and 2003, where the number of deposit was approximately 500% as compared to deposits of the previous decade (Fig. 2).

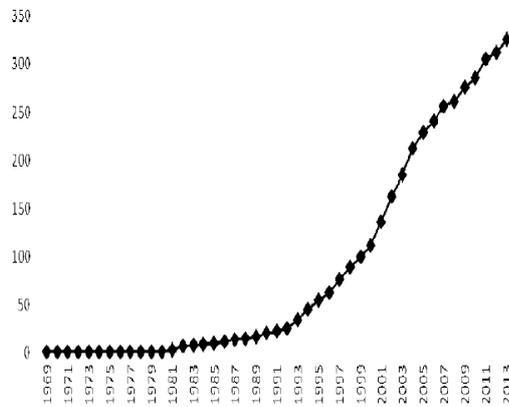


Figure 1: Progression of annual accumulated deposits of patent documents.

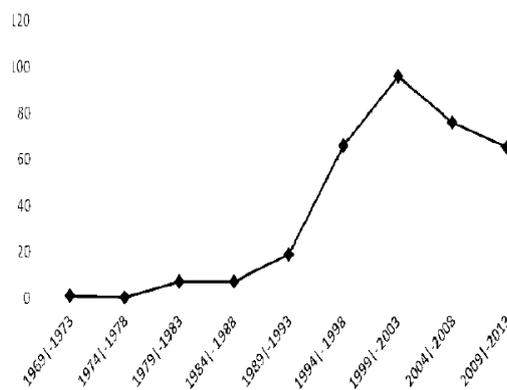


Figure 2: Number of patent filings deposits separated by periods of five years.

Regarding involvement in patent registrations, it was observed that, only 38.9% of deposits countries or international institutions had only one 'priority number'. Therefore, it was considered only the first record (the oldest). The three countries and / or international organizations that hold more deposits are, respectively, US, Japan and World Organizations (WO). On this area of knowledge, Americans have a hegemony of the records, with around two thirds of the world's deposits. The second country with the most patents filed over the issue has placed approximately 10% of US deposits (Fig. 3).

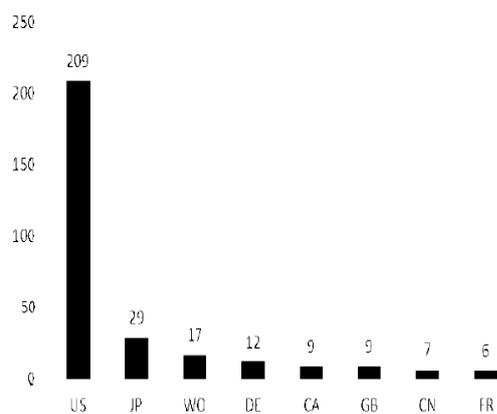


Figure 3: Number of patent applications deposits segregated by country.

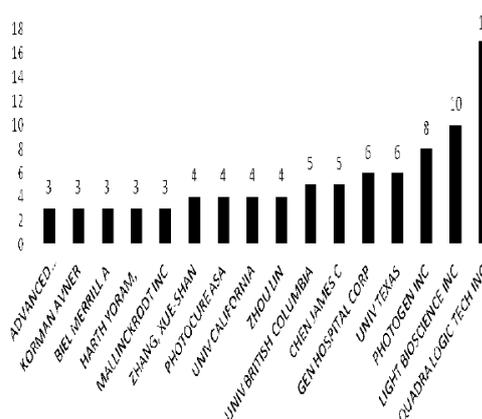


Figure 4: Number deposits of patent applications segregated by depositors.

Noteworthy that Brazil has not submitted patent applications in this area despite having several research centers dealing with the topic. Therefore, corroborating the data presented³, the production of knowledge in this area has not been converted into patents as in the scientific scenario as a whole.

When evaluating the depositors, it may be seen that, only 12% of these are universities. This situation may be seen also in the top five depositors, where universities have less than 20% of the deposits. However, private companies appear as stimulating agents for the studies and deposit of patents in this area, as some private institutions have more patent documents than some countries such as 'QUADRA LOGIC TECH INC' (Fig. 4).

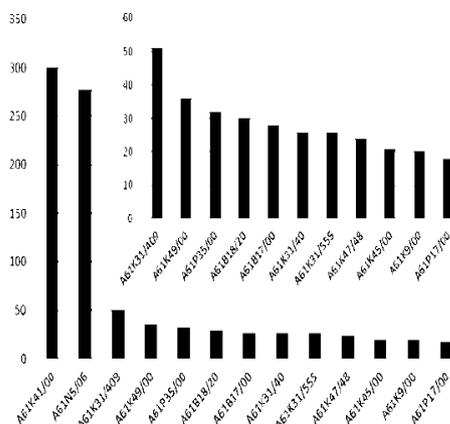


Figure 5: Number of patent applications deposits segregated for periods of five years.

Assessing the codes, it was observed the predominance of the following codes: A61K41 / 00 and A61N5 / 06, where the sum of their respective occurrences approaches 600 times (Fig. 5). However, an artefact was detected as the search engine patent documents codes used these codes for all typed of patents. Therefore, they were excluded from the analysis. After exclusion, three main search codes referred to the derivative organic assets to porphyrins; porphyrins used in photodynamic therapy for in vivo treatments; antineoplastic agents, which correspond respectively to A61K31 / 409 codes; A61K49 / 00 and A61P35 / 00 were found and used for analysis. These parameters are associated closely to the assumptions of this technology, which are the use of photosensitive molecules; production of free radicals by photochemical reactions and determination of specific targets, such as anti-cancer therapy⁷.

Initially, photodynamic therapy used mainly blue light and porphyrins and its derivatives. Other wavelengths such as $\lambda = 630$ nm were only used in cases of deeper tumors. This alternative was possible as some porphyrins exhibit a small absorption peak in this range. However, despite this wavelength presents a deeper penetration it also reduces the activation of the photosensitizer and the consequent release of free radicals⁸.

Currently, there are studies using other wavelengths, and new antitumor photosensitizers having different origins and types of production. This may increase the interest in the subject, as well as the applications of therapies using light radiation, such as antimicrobial photodynamic therapy (which present lethality against bacteria, fungi and parasites)^{9,10}.

4. CONCLUSION

From the results, it may be concluded that PDT still offers a large opportunity for growth as several wavelengths, and photosensitizers that may be used in the technique.

REFERENCES

- [1]OECD, [National Innovation Systems,] "Organization for Economic Co-operation and Development," 1-49 (1997).
- [2]Amparo, K.K.S., Ribeiro, M.C.O., Guarieiro, L.L.N. "Estudo de caso utilizando mapeamento de prospecção tecnológica como principal ferramenta de busca científica," *Perspec. Cienc. Inf.* 17, 195-209 (2012)
- [3]Quintella, C. M., Meira, M., Guimarães, A. K., Tanajura, A. S., da Silva, H. R. G., "Prospecção Tecnológica como uma Ferramenta Aplicada em Ciência e Tecnologia para se Chegar à Inovação," *Rev. Virtual Quim.* 3, 406-415 (2011).
- [4]Coelho, G. M., [Prospecção Tecnológica: Metodologias e Experiências Nacionais e Internacionais], Instituto Nacional de Tecnologia, Rio de Janeiro, Brasil, 1-105 (2003)
- [5]WIPO, [WIPO Patent Report: statistics on worldwide patent activities,] "World Intellectual Property Organization," 1-60 (2007)
- [6]Santos, S.A., Moreira, J.J.S., Dall'Agnol, R.P., Pires, E.A., Brito, L.B. "Estudo Prospectivo sobre Tecnologia Assistiva para Pessoa com Surdez no Âmbito Educacional," *Cader. Prospec.* 8, 12-19 (2014)
- [7]Espacenet. Accessed 06/02/2014. <<http://worldwide.espacenet.com/>> (2014).
- [8]Zelickson, B. D., "Mecanismo de ação do ácido aminolevulinico tóxico," [Terapia Fotodinâmica,]. Elsevier, Rio de Janeiro Brasil, 1-11 (2006).
- [9]Wainwright, M. "The development of phenothiazinium photosensitisers," *Photodiagn. Photodyn. Ther.* 2, 263-272 (2005).
- [10]Wainwright, M. "The emerging chemistry of blood product disinfection," *Chem. Soc. Rev.* 31, 128-136 (2002)

4.2 TERAPIA FOTODINÂMICA CONTRA MELANOMA B16F10 (PARTE I)

Phenothiazinium dyes in association with diode red laser against B16F10 melanoma cells: in vitro study.

Anderson F. S. Miranda^c, Gustavo M. P. Santos^c, Susana C. P. S. de Oliveira^{a,b}, Juliana S. C. Monteiro^{a,b,e}, Fernando J. P. Sampaio^a, Rafael Araújo Gomes Júnior^c, Aldo Brugnera Junior^{a,b,d}, Maria F. M. Gesteira^a, Fátima A. A. Zanin^{a,b,d}, Antônio L. B. Pinheiro^{a,b,d} and Marcos A. Vannier-Santos^c.

^a Center of Biophotonic, School of Dentistry, Federal University of Bahia, Salvador, BA, Brazil, 40110-150;

^b National Institute of Optics and Photonics, São Carlos, SP, Brazil, 13560-970

^c Laboratory of Parasite Biology, Centro de Pesquisas Gonçalo Muniz, Fundação Oswaldo Cruz FIOCRUZ, Salvador, BA, INCT-INPeTAM, Brazil.

^d Brugnera & Zanin Institute, São Paulo, SP, Brazil 01434-000

^e Department of Biology, Estate University of Feira de Santana, Feira de Santana, BA, Brazil, 44036-900.

ABSTRACT

In Brazil solar incidence is high and continuous throughout the year. Body exposure to sunlight may be a key point in the rates of individuals affected by melanoma and other types of skin cancer in many countries. Brazil already occupies the 15th place in the ranking of melanoma cases and the limitations presented by drugs used in the therapy of this cancer, new approaches are being used in an attempt to decrease the mortality of this malignancy. The aim of this study was to evaluate the effects of phenothiazinium dyes (PD) associated with laser light on murine melanoma (B16F10) in vitro by measuring cell growth using colorimetric assay before and after photodynamic therapy. We used a diode laser (λ 660nm, 2.4 J/cm², 40 mW, 60 s, CW) associated with PD at 12.5 μ g/mL, time pre-irradiation of 30 minutes). The following groups were tested: control (LF-), PD (L-F+), Laser (L+F-), Laser + PD (L+F+). The results showed a significant reduction in cell growth in the group treated by the photodynamic therapy compared to the control at 24 and 48 h ($p < 0.001$). Were showing at 30 min PD has a dose-dependent response on B16F10 cells, but at 24 h did not demonstrated this response.

Keywords: Light, PDT, Melanoma, Laser.

1. INTRODUCTION

Phenothiazinium dyes (PD), like methylene blue and toluidine blue O, are photosensitizer cationic molecules. When this photosensitizer is irradiated, process named Photodynamic Therapy (PDT)¹, they release Reactive Oxygen Species (ROS), *e.g.* oxygen singlet (O^{\cdot}), promoting cells death via different pathways². this technique was show to be effective upon microbes including bacteria³ fungi⁴, parasitic⁵, as well as, pathologies such as oral disease⁶ and cancer⁷. The clinic its administration may be topical, oral, infusion into the bladder, intravenous, intratumoral injection⁸. Some research link the effect of PDT using other photosensitizer, as porphyrin or 5-aminolevulinic acid in diseases including cancer^{9,10}.

Melanoma is the most aggressive skin cancer with low overall survival, but if detected early and removed by surgery there is possibility to cure¹¹. Clark *et al.*¹² describe five stages to prognostic where stage I is most superficial and curable, and stage V is most invasive and metastatic with bad prognostics. The treatment of this malignant neoplasm is inefficient and the drugs used display remarkable adverse effects. Therefore, new approaches to improve chemotherapy efficacy are required¹³.

- albp@ufba.br; phone 55 71 3283-9010; fax 55 71 3283-9010; www.laser.odontologia.ufba.br

Mechanisms for Low-Light Therapy IX, edited by Michael R. Hamblin, James D. Carroll, Praveen Arany,
Proc. of SPIE Vol. 8932, 893212 · © 2014 SPIE · CCC code: 1605-7422/14/\$18 · doi: 10.1117/12.2038466

Proc. of SPIE Vol. 8932 893212-1

In this study we used the PD in association with a diode red light, to evaluate if this PDT has a inhibitory action in melanoma growth cell culture, and also the toxicity of PD before and after irradiation.

2. METHODOLOGY

Cell Culture

Melanoma B16F10 cells were obtained from Institute of Biophysics, Federal University of Rio de Janeiro. The cells were maintained in RPMI 1640 (Gibco), supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS) (Invitrogen). For experiments, the cells were removed by addition Trypsin/EDTA (Gibco) and centrifuged in 380 g for 10 minutes. They were incubated at 37°C and 5% CO₂.

Photodynamic Therapy (PDT)

The B16F10 after the trypsinization were incubated in 24 well plate in a 2x10⁵ cell/well, for 30 minutes in the dark, with 12.5µg/mL of PD, RPMI 1640 and FBS (10%). Then they were irradiated with diode red laser (Twin Flex®, MMOptics, São Carlos, SP, Brazil), emitting light at 660nm wavelength. We used energy density of 2.4 J/cm² and potency of 40 mW for 60 seconds and they were washed with RPMI to remove de PD excesses and incubated at 37°C and 5% CO₂ for 24 or 48h.

Toxicity of PD in B16F10 cells

The PD (methylene blue and toluidine O blue in a 1:1 proportion) was obtained by Formula, (Salvador, Brazil). To evaluate the growth of B16F10 cells, PD was add on 24 well plate cultures at different concentrations for 24 h at 37 °C and 5% CO₂. The treatment of B16F10 cells with PD were also made for 30 minutes, followed by a wash with RPMI 1640 and incubation at same conditions.

Colorimetric Assay

To evaluate if the PDT is able to decrease the development of B16F10, we used the colorimetric assay¹⁴ to indicate indirectly the growth of cells. The cells were washed with sterile PBS to remove debris and unviable cells then they were fixed with methanol 100% (0.5 mL/well) for 10 minutes, and washed with borate buffer (pH 8.7) then we added methylene blue (0.1% in borate buffer)(0.5 mL/well) for 10 minutes and supernatants were plated in 96-well plate and read at 655 nm.

Statistical Analysis

All experiments were performed in triplicate and repeated independently. The statistical analysis was performed employing ANOVA and Tukey post-test using GraphPad Prism 5.0 software, with * to p<0.05, ** to p<0.001 and *** to p< 0.0001 as significance level.

3. RESULTS

The aim of this study was to evaluate the effect of PD upon B16F10 cells growth, using PD before and after its association with LASER light.

The effects of PD in association with LASER do not influence in effects of PD without irradiation in B16F10 cells growth.

We used LASER light irradiation to stimulate PD and evaluate the effects on B16F10 growth by colorimetric assay. The conditions were described as Control (L-P-), LASER (L+P-) PD (L-P+) and PDT (L+P+). The cells in L+P- were only irradiated in absence PD to survey if the light has any effect on B16F10. Melanoma cells in L-P+ sample were incubated in presence of PD with no irradiation. All cells in L-P+ and L+P+ sample were incubated for 30 minutes with PD (12.5 $\mu\text{g/mL}$) and L+P+ after that were irradiated with LASER, and all conditions were incubated for 24 and 48 h. After incubation of 24h (Figure 1-A) was possible evaluate what L+P- as compared to L-P- show a growth, but did not show significance. The L+P+ (PDT) showed statistically significant inhibition as compared to L-P- and L+P-, but do not as compared to L-P+, demonstrating the cytotoxicity of PD. When incubated for 48h (Figure 1-B) the inhibition was similar, L+P- had no statistical significance as compared with L-P-. L-P+, L+P+ significantly inhibited B16F10 cells growth, but did not show significant difference.

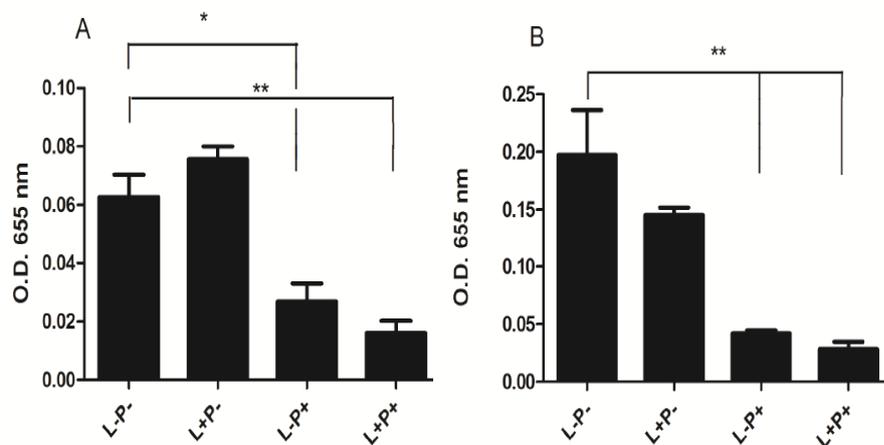


Figure 1. Effect of PDT on B16F10 in 24 and 48h. (A) 24h after PDT. We observed inhibited B16F10 growth on L-P+ and L+P+, as compared to dark control group (L-P- vs L+P-), and L+P- did not demonstrate inhibition. Similarly between L-P+ and L+P+ there was no statistical significance. (B) After 48 h PDT we observed that inhibition in growth of melanoma cells was significant only in L-P+ and L+P+ as compared to L-P-. We used ANOVA and Tukey post-test for statistical analysis with * ($p < 0.05$) and ** ($p < 0.001$).

PD dose-dependent and time-dependent cytotoxicity on B16F10 cells

In order to evaluate the PD cytotoxicity upon melanoma cells, the B16F10 cultures were exposed to different concentrations (100; 50; 25; 12.5; 6.25; 3.12; 1.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 30 minute and 24 hours proliferation was accrued by colorimetric assay. The PD treatment produced a dose-dependent effect in B16F0 growth in 30 minute (Figure 2-A). In the major concentrations, ranging from 100 – 6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ displayed marked 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, shows great inhibition compare with control and last concentration with hyper statistical significance ($p < 0.0001$) on cancer cell growth. In 24h (Figure 2-B) all concentrations were highly cytotoxic with no apparent dose-dependently under these conditions.

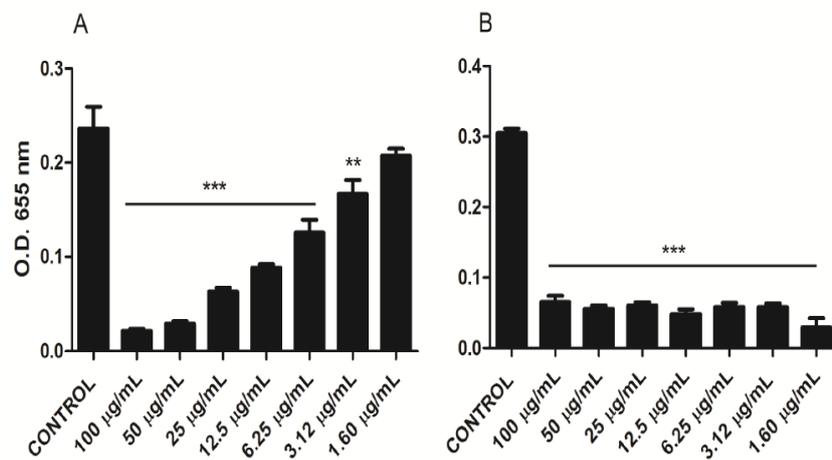


Figure 2. Cytotoxicity of PD on B16F10. (A) On 30 min. Dose-dependent response showing in the 3.12–100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ range PD as highly significant (***) ($p < 0.0001$) (B) In 24h all concentration showed high inhibition with no apparent dose-dependently under these conditions Data were analyzed using ANOVA and Tukey post-test with *** ($p < 0.0001$)

4. DISCUSSION

The photosensitizer used on PDT must preferentially be non-toxic before irradiation, quickly absorbed by cells among other features¹⁵. The methylene blue and toluidine blue O used in this study have been show to be rapidly absorbed by tissues and is actuated at 600-660 nm wavelength¹⁶. The PDT using PD has demonstrated in some bacterial models to be effective against *Staphylococcus aureus* and multi-drug resistant *Escherichia coli*¹⁷ and *Candida albicans*¹⁸. As performed in other cancer models like sarcomas PDT show high antitumoral activity¹⁹. In our work we verified that PDT using PD and LASER, produced remarkable effects on B16F10 proliferation, demonstrating efficacy against B16F10.

We also notice that PD has a high cytotoxicity on B16F10. Cytotoxicity was reported in *Staphylococcus aureus*²⁰, *Leishmania braziliensis*²¹ models. Furtherer approaches are under way to determine suitable, safe conditions for PD use both in vitro and in vivo.

5. CONCLUSION

The present study indicates that PDT using PD as photosensitizer is a possible approach against melanoma cells, but further investigation is refused to elucidate optimal conditions and mechanisms of melanoma death involved.

REFERENCES

- [1] Dougherty, T. J., Gomer, C. J., Henderson, B W, Jori, G., Kessel, D., Korbek, M., Moan, J., Peng, Q., "Photod Ther," J. Natl. Cancer Inst. 90, 889-905 (1998).
- [2] Gad,F., Zahra,T., Hasan,T., Hamblin, M. R., "Effects of Growth Phase and Extracellular Slime on Photodynamic Inactivation of Gram-Positive Pathogenic Bacteria," Antimic. Agent. Chemother. 48 2173-2178 (2004)
- [3] Denis,T. G. S., Hamblin, M. R., [An Introduction to Photoantimicrobials: Photodynamic Therapy as a Novel Method of Microbial Pathogen Eradication]; Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances, A. Méndez-Vilas (Ed.), 675-683 (2011).
- [4] Kvaal, S. I., Warloe, T., "Photodynamic Treatment of Oral Lesions," J. Environment Pathol. Toxicol. Oncol. 26, 127-133 (2007).
- [5] Song, D., Lindoso, J. A. L., Oyafuso,L. K., Kanashiro,E. H. Y., Cardoso, J. L., Uchoa, A. F. João Tardivo, P., Baptista, M. S., "Photodynamic Therapy Using Methylene Blue to Treat Cutaneous Leishmaniasis," Photomed. Laser Surg. 29, 711-716 (2011).
- [6] Nastri, L., Donnarumma G., Porzio C., De Gregorio V., Tufano M.A., Caruso F., Mazza C., Serpico R., "Effects of toluidine blue-mediated photodynamic therapy on periopathogens and periodontal biofilm: in vitro evaluation," Int. J. Immunopathol. Pharmacol. 23, 1125-32 (2010).
- [7] Lim, E. J., Oak, C., Heo, J., Kim, Y., "Methylene blue-mediated photodynamic therapy enhances apoptosis in lung cancer cells," Oncol. Rep. 30, 856-862 (2013).
- [8] Folkes, L. K., Wardman, P., "Enhancing the Efficacy of Photodynamic Cancer Therapy by Radicals from Plant Auxin (Indole-3-Acetic Acid)," Cancer Res. 63, 776-779 (2003).
- [9] Guyon, L., Ascencio, M., Collinet,P., Mordon, S., "Photodiagnosis and photodynamic therapy of peritoneal metastasis of ovarian cancer," Photodiag. Photod. Ther. 9, 16-31 (2012).
- [10] Lee, T. Y., Cheon, Y. K., Shim, C. S., "Current Status of Photodynamic Therapy for Bile Duct," Cancer Clin. Endosc. 46, 38-44 (2013).
- [11] Shackleton, M., Quintana, E., "Progress in understanding melanoma propagation," Mol. Oncol. 5, 451-457 (2010).
- [12] Clark, W. H. Jr., From, L. Bernardino, E. A., Mihm, M. C. "The Histogenesis and Biologic Behavior of Primary Human Malignant Melanomas of the Skin," Cancer Res. 29, 705-726 (1969).
- [13] Finn, L., Markovic, S. N., Joseph, R. W., "Therapy for metastatic melanoma: the past, present, and future," BMC Med. 10, 23-28 (2012).
- [14] Lshai-Michaeli, R., Eldort, A., Vlodavsky, I., "Heparanase activity expressed by platelets, neutrophils, and lymphoma cells releases active fibroblast growth factor from extracellular matrix," Cell Reg. 1, 833-842 (1990).
- [15] Kalka,K., Merk, H., Mukhtar, H., "Photodynamic therapy in dermatology," J. Am. Acad. Dermatol. 42, 389-413 (2000).
- [16] Maisch, T. "Anti-microbial photodynamic therapy: useful in the future?," Lasers Med. Sci. 22, 83-91 (2007).
- [17] Kashef, N., Abadi, G. R. S., Djavid, G. E., "Phototoxicity of phenothiazinium dyes against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and multi-drug resistant *Escherichia coli*," Photod. Photod. Ther. 9, 11-15 (2012).

- [18] Rodrigues, G. B., Dias-Baruffia, M., Holmanb, N., Wainwright, M., Braga, G. U. L., "In vitro photodynamic inactivation of *Candida* species and mouse fibroblasts with phenothiazinium photosensitisers and red light," *Photod. Photod. Ther.* 10, 141-149 (2013).
- [19]Cincotta, L., Foley, J. W., MacEachern,T., "Novel Photodynamic Effects of a Benzophenothiazine on Two Different Murine Sarcomas," *Cancer Res.* 54, 1249-1258 (1994).
- [20] Phoenix, D. A., Sayed, Z., Hussain, S., Harris,F., Wainwright, M., "The phototoxicity of phenothiazinium derivatives against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*," *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 39, 17-22 (2003).
- [21] Barbosa, A. F., Sangiorgi, B. B., Galdino, S. L., Barral-Netto,M., Pitta, I. R., Pinheiro, A. L., "Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy (PACT) Using Phenothiazine Derivatives as Photosensitizers Against *Leishmania braziliensis*," *Lasers Surg. Med.* 44, 850-855 (2012).

4.3 TERAPIA FOTODINÂMICA CONTRA MELANOMA B16F10 (PARTE II)

Lases in Medical Science
<https://doi.org/10.1007/s10103-018-2489-6>

ORIGINAL ARTICLE



ROS-induced autophagy reduces B16F10 melanoma cell proliferative activity

Gustavo Miranda Pires Santos¹ · Susana C. P. S. Oliveira^{1,2} · Juliana C. S. Monteiro^{1,2} · Sandra R. Fagnani¹ · Fernando Pires Sampaio¹ · Neandder Andrade Correia¹ · Pedro J. L. Crujeira¹ · Antonio L. B. Pinheiro^{1,3,4}

Received: 9 October 2017 / Accepted: 19 March 2018
 © Springer-Verlag London Ltd, part of Springer Nature 2018

Abstract

Cancer is a pathology characterized by increased cell progression and/or reduced programmed cell death. Melanoma shows a rapid increase in cell progression and its resistance to chemotherapy is associated with uncontrolled apoptosis and to mechanisms that increase the flow of the drug out of the cell. The objective of this study was to evaluate the effects of photodynamic therapy (PDT) on the cell proliferation and cellular alterations in B16F10 murine melanoma. For that, four experimental groups were evaluated: the control group; laser group ($\lambda = 660 \text{ nm}$, 40 mW, 2.4 J/cm^2); photosensitizer group (solution containing methylene blue and toluidine blue 1:1–12.5 $\mu\text{g/mL}$); PDT group. The incubation time was 30 min. Fluorescence microscopy assays were performed without fixation with the DAPI, monodansylcadaverine (MDC), and dihydroethidium (DHE) probes. Cell proliferation was also determined at 24-h time. The tests were performed in triplicate and the statistical test used was ANOVA with Tukey post-test. The results demonstrate that the plasma membrane of the cells of all the experimental groups remained intact, ROS production and autophagy significantly increased ($p < 0.0005$ and $p < 0.0071$, respectively) only in the PDT group. The cell proliferation essay showed a reduction of 74.2% on the PDT group in relation to the control group. The present study demonstrated that oxidative stress promoted by photodynamic therapy may induce autophagy and consequently reduce cell proliferation in B16F10 melanoma.

Keywords Cancer · Autophagy · Photodynamic therapy

Introduction

Cancer is a pathology characterized by increased cell progression and/or reduction of programmed cell death. Melanoma is

a type of skin cancer that shows a rapid increase in cell progression. In approximately 40–60% of melanomas, there is a mutation in the encoding BRAF gene. The most common mutation is a result of the replacement of the amino acid valine (V) by glutamic acid (E) at the codon 600 of the BRAF gene. This change activates the MAPKinase, an important intracellular signaling pathway that emits proliferation stimuli into the cell [1].

Resistance to chemotherapy in this type of cancer is associated with the lack of control in the programmed death processes, as well as mechanisms that increase the flow of the drug out of the cell [2].

These facts emphasize the need to search for new treatment alternatives that are more efficient and that overcome the mechanisms of tumor resistance. Because of the difficulty in inducing apoptosis in melanoma, other processes that may culminate in cell death need to be activated, such as autophagy.

Autophagy is a process of lysosomal-mediated cytoplasmic recycling and degradation. Therefore, to culminate in cell

✉ Antonio L. B. Pinheiro
 albp@ufba.br

¹ Center of Biophotonics, School of Dentistry, Federal University of Bahia – UFBA, Av. Araújo Pinho, 62, Canelã, Salvador, BA 40110-150, Brazil

² Department of Biology, Feira de Santana State University, Avenida Transnordestina, s/n - Novo Horizonte, CEP, Feira de Santana, BA 44036-900, Brazil

³ National Institute of Basic Optics and Applied to Life Sciences, Physics Institute of São Carlos, University of São Paulo, Av. Trabalhador São-Carlense, 400, Parque Arnold Schmidt, São Carlos, SP 13566-590, Brazil

⁴ Biomedical Engineering Institute, Universidade Brasil, São Paulo, SP 08230-030, Brazil

death, it is necessary to regulate the ATG orthologue genes, Bcl-2 and BAX expression, in addition to assessing the stage of tumor progression [3, 4].

In the induction of autophagy, different cellular targets can be defined, the main ones being mitochondria and the endoplasmic reticulum. In these targets, the production reactive oxygen species—ROS initially promotes lipid peroxidation. Chemotherapeutics and photodynamic therapy can act on these cellular structures producing ROS and breaking cellular homeostasis [5]. The production of ROS in photodynamic therapy occurs through the photoactivation of a chemical compound, potentializing its cytotoxic effect. This photoactivation depends on a specific interaction between the light and the compound used [6].

The reduction of cellular proliferation characterized by the action of autophagic vacuoles is known as programmed type II death. While types I and II are characterized by other events. Type I-programmed death is morphologically like classical apoptosis pathways (with activation of caspases); however, molecules are activated, for example by NK cells, such as endonuclease G and Omi/HtrA2. Type III programmed death is characterized by the absence of lysosomal action during the progression of cell death [7].

Photodynamic therapy (PDT) has been used for treating several types of cancer. However, most studies and patents involve the use of porphyrin's derivatives. These substances are photoactivated by blue light in which spectral absorption band is the same as of the melanin. Because of this, protocols using other spectral bands such as red and infrared may be an alternative. Besides, protocols capable of activating alternative pathways of programmed cell death are interesting for treating melanomas [8, 9].

It was hypothesized that the reduction of the proliferation of B16F10 murine melanoma cells could be achieved by photodynamic therapy. Thus, the aim of the present study was to evaluate the effects of photodynamic therapy on the cellular proliferative activity and cellular alterations of murine melanoma B16F10 cells.

Material and methods

Cell culture

Murine melanoma cells B16F10 (ATCC: CRL-6475) were maintained in RPMI 1640 (Gibco, Grand Island, NY, USA) medium containing 10% Foetal Bovine Serum (FBS) (Gibco, Grand Island, NY, USA), 5 µg/mL Enrofloxacin (Baytril®, Bayer Corp, Toronto, Ontario, Canada), and 12.5 µg/mL of Amphotericin B (Gibco, Grand Island, NY, USA) at 37 °C and 5% CO₂ atmosphere. All the assays were performed in triplicate. All the assays were performed in 24-well plate with 4×10^4 .

Photodynamic therapy

For photodynamic therapy, the B16F10 cells were treated with the photosensitizer (solution containing methylene blue and toluidine blue 1:1–12.5 µg/mL) (A Fórmula Laboratory, Salvador, BA, Brazil), following the pre-irradiation time of 30 min, incubated at 37 °C and 5% CO₂, in the dark. After the time described, the PDT was performed using a diode laser ($\lambda = 660$ nm, 40 mW, and 2.4 J/cm² for 1 min TwinFlex®, MMOptics, São Carlos, São Paulo, Brazil). After irradiation, cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.2; the culture medium was replaced then the samples were incubated in an oven at 37 °C and 5% CO₂.

Colorimetric assay

Twenty-four hours after using the PDT protocols, the plate was washed with PBS pH 7.2 and the viable cells were fixed with methanol (Synth, Diadema, SP, Brazil) for 15 min. After that, the plate was washed with PBS, pH 7.2, and the cells were stained with methylene blue 1000 µg/ml (Synth, Diadema, SP, Brazil) in buffered borate 0.1 M, pH 8.7, for 10 min. The excess of color was removed by washing with buffered borate 0.01 M, pH 8.7, and the color absorbed by attached cells was extracted with 500 µL of HCl 0.1 M (Synth, Diadema, SP, Brazil). The optical density of each well was obtained in 655 nm using a microplate reader (SpectraMax®, Medical Device Corporation, Orleans Drive Sunnyvale, Ca.) [10].

Percent of inhibition

The percent of inhibition were calculated with the following equation:

$$\text{Percent of inhibition} = (1 - (\text{standard/sample})) \times 100$$

Fluorescence microscopy

Fluorescence microscopy analyses included the detection of ROS, evaluation of membrane integrity, and detection of autophagy. For assays of fluorescence microscopy, the cells were live. The cells were cultured on glass coverslips (12 mm) in a 24-well plate. All photomicrographs are at $\times 400$.

Detection of ROS

For the detection of ROS, the fluorescence probe dihydroethidium (DHE) (Molecular Probes, Invitrogen, Eugene, OR, USA) was used, at concentration 5 µM/mL. After 10 min of incubation, at 37 °C, the cells were washed with PBS, pH 7.2, and then observed under an Olympus

BX51 fluorescence microscope. DHE is excited at about 460–495 nm and emitted light is observed with filters for red fluorescence.

Assessment of membrane integrity

The 4,6-diamino-2-phenylindole probe (DAPI) (Molecular Probes, Invitrogen, Eugene, OR, USA) was used to evaluate membrane integrity in live cells, as it can mark the genetic material in fixed cells or the cell must be permeabilized. Ten micrograms per milliliter of DAPI was applied on with well containing the different experimental groups. All fluorescence observations were made with an Olympus BX51 microscope equipped with epifluorescent illumination. DAPI is excited at about 350 nm and emitted light is observed with filters for blue fluorescence [11].

Detection of autophagy

The autophagic process was detected using the fluorescent probe monodansylcadaverine (MDC) (Molecular Probes, Invitrogen, Eugene, Oregon, USA) a marker of autophagic vacuoles. To perform this test, MDC probe was added (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) to the culture medium containing the cells. After 10 min of incubation with the label, the culture medium was removed and the coverslips were removed for observation of the cells. This observation was performed on an Olympus BX51. MDC is excited at about 350 nm and emitted light is observed with filters for blue fluorescence.

Quantification of epifluorescence

For the quantification of cell epifluorescence, the software “Image J” was used, adapting the analysis protocols of O’neal, Landis, and Isaacs [12]; Bakr [13]; and Jensen [14]. Initially, background subtraction was carried out and was followed by the selection of the region of interest using the counterstained image that was binarized and used as a mask to filter the original image. Once the selected area was determined, the fluorescence intensity of each photomicrography was measured.

Statistical analyses

The verification of significance in cell growth and evaluation of fluorescence micrographs were performed using the ANOVA statistical test with Tukey’s multiple comparison post-test with the help of GraphPad Prism® 5.0 software.

Results

Detection of ROS

Photodynamic therapy produced significantly higher ($p < 0.0005$) amounts of ROS in the PDT treated cells (Fig. 1).

Assessment of membrane integrity

The DAPI is a probe that marks the genetic material, however at the first moment it was not possible to observe this marking because the probe crosses the whole plasma membrane and discontinues at different speeds. It was observed that, after 24 h of the treatment, the cell membranes of all the experimental and control groups remained intact (Fig. 2).

Assessment of autophagy

The photodynamic therapy was able to induce cellular changes compatible with autophagy. These changes were evidenced with the use of the MDC fluorescent probe. The fluorescence signals emitted by the PDT group were about four times greater than in the control group and this difference was statistically significant ($p < 0.0071$) (Figs. 3 and 4). Figure 4d showed increased fluorescence and evidences the autophagy and Fig. 4 a–c showed basal and diffuse marking.

Cell proliferation

In addition to autophagic processes, cell proliferation was reduced in 24-h in the PDT group when compared to the control group. This reduction between the PDT group and the control group was 74.2% and presented a statistically significant

Fig. 1 Production of ROS in the control and in the different experimental groups after PDT protocol. Arbitrary fluorescence unit (AFU). $p < 0.0005$

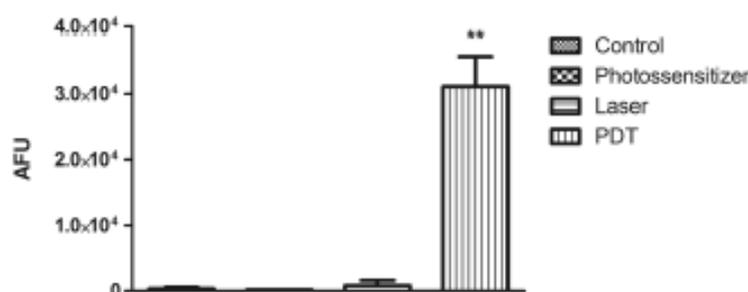
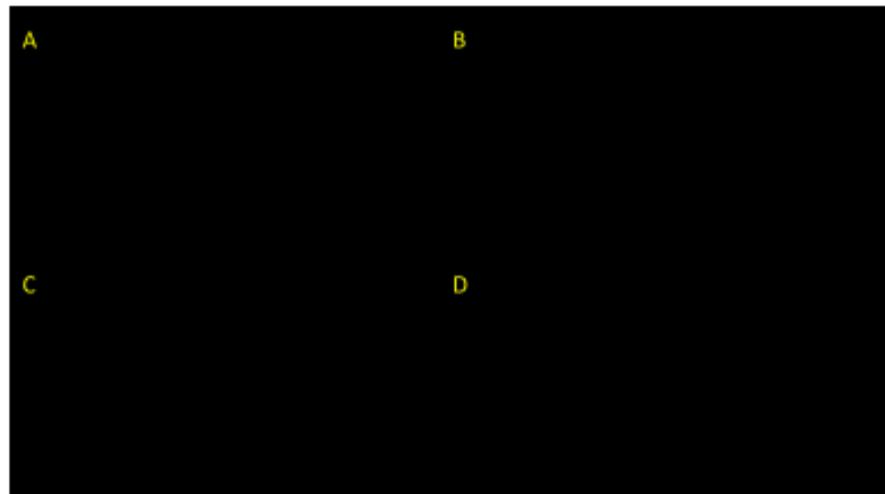


Fig. 2 Photomicrograph showing the absence of fluorescence by DAPI in all the experimental groups. **a** The control group, **b** The laser group, **c** The photosensitizer group, **d** The PDT group



difference ($p < 0.0002$). The photosensitizer group showed a 55% inhibition (Fig. 5). Photodynamic therapy, however, potentiated the antitumor effect of the compound by approximately 40% ($p = 0.05$).

Discussion

Melanin absorbs light in the spectral range from UV to blue, which reduces the possibility of using compounds in photodynamic therapy, such as those derived from porphyrins that exhibit their maximum absorption peaks in this spectral range. Therefore, the search for compounds that can be excited in other spectral bands, such as the red band, is fundamental for the development of more efficient protocols [8, 15]. Thus, the present study demonstrated the feasibility of PDT in the adopted parameters.

Free radicals produced in the cell have several actions. However, at high levels, they produce oxidative stress, which causes damage to DNA, proteins, and lipids [16]. Molecules such as H_2O_2 can increase intracellular ROS and consequently activate mTOR-independent autophagy

in tumor cells. Photodynamic therapy also generates intracellular ROS, as demonstrated in the present study, and just as H_2O_2 also increases the autophagic pathway [17]. Those cellular events show significant difference between the PDT group and control group, about ten times more AFU in the PDT group.

Phenothiazines have been reported as antitumor by their ability to fragment DNA, trigger caspase-3 activation, alter BAX and BCL-2 expression, and alter mitochondrial redox balance. These effects may reduce cell proliferation in culture, corroborating the data of the present study [18, 19]. In this study, after PDT, ROS levels increased, about 100 times more in the PDT group, and in response to oxidative stress, the cells started the autophagic process. As this event did not happen on the photosensitizer group, it is suggestive that the activated antitumoral pathways are different when using phenothiazines compounds and photoactivated ones. The present study demonstrated that significantly increased ROS formation caused by PDT-induced autophagy in B16F10 melanoma cells causing a reduction in the proliferative activity of these tumor cells.

Fig. 3 Detection of autophagic vacuoles in the different experimental groups. Arbitrary fluorescence unit (AFU). ($p < 0.0071$)





Fig. 4 Fluorescence micrographs of the different experimental groups. Cells of the control group (a), laser group (b), and photosensitizer group (c) presenting discrete and diffuse labeling. The PDT cell group (d) showing massive fluorescent labeling

Autophagy is a process that is involved in maintaining cell viability in case of senescence or metabolic imbalance. This process can also be triggered to contain damage caused by oxidative stress [20]. However, this process is also related to programmed type II death [21], corroborating the data presented in this study, there was a reduction of the proliferation of cells in the PDT group that presented a massive number of autophagic vacuoles and intact membranes, as presented in Fig. 4.

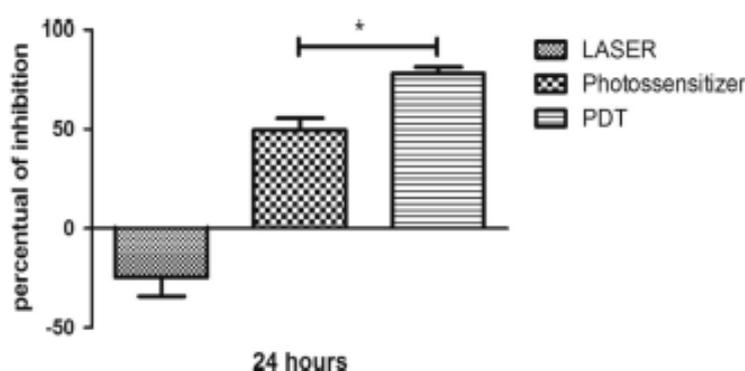
The autophagy to preclude cell viability and to activate type II-programmed death requires a massive number of autophagic vacuoles associated with mitochondrial damage, as damaged cells are unable to re-establish homeostasis [22]. Phenothiazines may bind to membrane proteins, nucleic acids, and mitochondrial structures and these structures may be targets of PDT [23, 24], this fact may

therefore explain how mitochondria may be targets of the therapy presented in this study.

Successful use of TFD depends on some factors such as the concentration of the photosensitizer and energy density. As the proposed protocol used a very low energy density (2.4 J/cm^2) it could be safely increased, and this may potentialize the outcome [25].

Finally, it must be mentioned that porphyrins have their maximum absorption peak in the blue spectral range; however, they can be photoactivated at lower peaks, such as by red light. It is worth mentioning that, even producing a smaller photodynamic effect, these porphyrins have clinical viability. Another key point is that, in addition to the phenothiazines, there are other compounds that can be used as photosensitizers that absorb red light such as the phenothiazines used in the present study [26–29].

Fig. 5 Percentage inhibition in melanoma cell proliferation in the different experimental groups relative to the control. The laser group presented a negative peak due to its proliferative action



Conclusion

The present study demonstrated that oxidative stress promoted by photodynamic therapy may induce autophagy and consequently reduce cell proliferation in B16F10 melanoma.

Funding This work has been funded by the FAPESB (Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado da Bahia) grant 04282014.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical approval The use of commercial murine cells (Murine melanoma cells B16F10 (ATCC: CRL-6475) does not need the approval of the Ethics Committee according to Brazilian regulations.

References

- Huang T, Zhuge J, Zhang WW (2013) Sensitive detection of BRAF V600E mutation by amplification refractory mutation system (ARMS)-PCR. *Biomarker Res* 1(1):1–6
- Liu H, He Z, Simon HU (2013) Targeting autophagy as a potential therapeutic approach for melanoma therapy. *Semin Cancer Biol* 23:352–360
- Li X, Wu D, Shen J, Zhou M, Lu Y (2013) Rapamycin induces autophagy in the melanoma cell line M14 via regulation of the expression levels of Bcl-2 and Bax. *Oncol Lett* 5:167–172
- Nóyo A, Weeraratna AT (2016) Autophagy—an emerging target for melanoma therapy. *F1000Res* 5:1–9
- Scherz-Shouval R, Elazar Z (2007) ROS, mitochondria and the regulation of autophagy. *Trends Cell Biol* 17(9):1–6
- Agostinis P, Berg K, Cengel KA, Foster TH, Girotti AW, Golnick SO, Hahn SM, Hamblin MR, Juzeniene A, Kessel D, Korbelik M, Moan J, Mroz P, Nowis D, Piette J, Wilson BC, Golub J (2011) Photodynamic therapy of cancer: an update. *CA Cancer J Clin* 61(4):250–281
- Bursch W, Ellinger A, Gerner C, Schulte-Hermann R (2004) Caspase independent and autophagic cell death. In: Lockshin RA, Zakeri Z (eds) *When cells die II*. Wiley-Liss, New York, p 275–310
- Pires-Santos GM, Oliveira SCPS, Monteiro JSC, Sampaio FJP, Brugnara A, Zanin FAA, Almeida P, Pinheiro ALB (2015) Prospective study of luminous radiation associated technology photosensitive compounds for treatment of diseases. *Proc SPIE* 9309: 1–7
- Huang YY, Vecchio D, Avci P, Yin R, Garcia-Diaz M, Hamblin MR (2013) Melanoma resistance to photodynamic therapy: new insights. *Biol Chem* 394(2):239–250
- Ishai-Michaeli R, Eldor A, Vlodavsky I (1990) Heparanase activity expressed by platelets, neutrophils, and lymphoma cells releases active fibroblast growth factor from extracellular matrix. *Cell Regul* 1:833–842
- Kepp O, Galluzzi L, Lipinski M, Yuan J, Kroemer G (2011) Cell death assays for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 10:221–237
- O’neal ME, Landis DA, Isaacs R (2002) An inexpensive, accurate method for measuring leaf area and defoliation through digital image analysis. *J Econ Entomol* 95(6):1190–1194
- Bakr EM (2005) A new software for measuring leaf area, and area damaged by *Tetranychus urticae* Koch. *JEN* 129(3):173–175
- Jensen EC (2013) Quantitative analysis of histological staining and fluorescence using ImageJ. *Anat Rec* 296:378–381
- Davids LM, Kleemann B (2011) Combating melanoma: the use of photodynamic therapy as a novel, adjuvant therapeutic tool. *Cancer Treat Rev* 37:465–475
- Schieber M, Chandel NS (2014) ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Curr Biol* 24(10):R453–R462
- Luo Y, Zou P, Jing Z, Wang J, Zhou D, Liu L (2011) Autophagy regulates ROS-induced cellular senescence via p21 in a p38 MAPK α dependent manner. *Exp Gerontol* 46(11):860–867
- Gil-Ad I, Shtaf B, Levkovitz Y, Nordanberg J, Taler M, Korov I, Weizman A (2006) Phenothiazines induce apoptosis in a B16 mouse melanoma cell line and attenuate *in vivo* melanoma tumor growth. *Oncol Rep* 15:107–112
- Latocha M, Ba AZ, Polaniak R, Kuamierz D, Nowosad A, Jurzak M, Romak E, Kokocińska M, Sliupkas-Dyrda E (2015) Molecular Effects of Amine Derivatives Of Phenothiazine On Cancer Cells C-32 And Ssb-19 *In Vitro*. *Acta Pol Pharma Drug Res* 72(5):909–915
- Scherz-Shouval R, Elazar Z (2007) ROS, mitochondria and the regulation of autophagy. *Trends Cell Biol* 17(9):422–427
- Xie Z, Klionsky DJ (2007) Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nat Cell Biol* 9(10):1102–1109
- Boya P, González-Polo R, Casares N, Perfittini JL, Dessen P, Larochette N, Métivier D, Mdey D, Souquere S, Yoshimori T, Pierron G, Codogno P, Kroemer G (2005) Inhibition of macroautophagy triggers apoptosis. *Mol Cell Biol* 11:1025–1040
- Munt O, Lorke DE, Hasan M, Petroianu GA (2011) Cellular and molecular actions of methylene blue in the nervous system. *Med Res Rev* 31:93–117
- Nogueira JJ, González L (2014) Molecular dynamics simulations of binding modes between methylene blue and DNA with alternating GC and AT sequences. *Biochemist* 53:2391–2412
- Oliveira SCPS, Monteiro JSC, Santos GMP, Sampaio FJP, Soares AP, Soares LGP, Pinheiro ALB (2017) LED antimicrobial photodynamic therapy with phenothiazinium dye against *Staphylococcus aureus*: an *in vitro* study. *J Photochem Photobiol B Biol* 175:46–50
- Pandey RK, Joshi P (2014) Synthesis and biological significance of porphyrin-based photosensitizers in photodynamic therapy. In: Vo-Dinh T (ed) *Biomedical photonics handbook*, 2nd edn. CRC Press, Boca Raton, p 31–65
- Issa MCA, Fassini A, Boechat M, Ferolla ACJ (2016) Photodynamic therapy in photoaging: literature review. *Surg Cosmet Dermatol* 8(4 Suppl. 1):S10–S16
- Wainwright M (2009) Photosensitizers in biomedicine. Wiley-Blackwell
- Zelickson BD (2005) Mechanisms of action of topical aminolevulinic acid. In: Goldman MP (ed) *Photodynamic therapy*, 1st edn. Elsevier Saunders, Philadelphia, p 1–12

4.4 SISTEMA IMUNE E A TERAPIA FOTODINÂMICA

Manuscript Details

Manuscript number	PDPDT_2017_285_R1
Title	Effects of AmPDT using Phenothiazine-derived drugs and red light on the macrophage x <i>S. aureus</i> interface
Article type	Research Paper

Abstract

The aim of this study was to evaluate the lethal potential of macrophages infected with *Staphylococcus aureus* after AmPDT using phenothiazine derivatives (a solution containing 1:1 methylene blue and O toluidine blue) and laser (660 nm, 40 mW, 60 s, 12 J/cm²) or LED (632 ± 2 nm, 145 mW, 40 s, 12 J/cm²). Six experimental groups were evaluated: Control Group (untreated); Photosensitizer group (phenothiazines - 12.5 µg/mL); Laser Group; LED Group; Laser AmPDT Group; and LED AmPDT Group. The pre-irradiation time used in this study was 5 minutes. Macrophages and bacteria were cultured in specific culture media and / or allowed interaction between the cell types. Subsequently, tests were carried out to evaluate microbial proliferation, ROS production by macrophages and survival capacity of *S. aureus* after phagocytosis. Fluorescence microscopy assays were performed with the H2DCFDA probe, after AmPDT, at the initial time (0h), 4-h and 12-h. The tests were performed in triplicate and the statistical test used was ANOVA with Tukey post-test. After AmPDT, a statistically significant difference ($p > 0.0001$) was observed between the microbial growth of the control group and the AmPDTs groups. Laser AmPDT and LED AmPDT groups presented, respectively, reductions of 84.2% and 81.5% when compared to control and 53.3% and 46% when compared to the photosensitizer group. It is concluded that the therapeutic protocols presented in this study increased the phagocytic capacity, the response rate of the phagocytes and the consequent reduction of the numbers of *S. aureus* for both AmPDT protocols, however the increase in ROS production was only observed in the group irradiated with Laser light.

Keywords	Laser; LED; Macrophages; PDT.
Corresponding Author	Antonio Pinheiro
Corresponding Author's Institution	School of Dentistry, Federal University of Bahia
Order of Authors	Gustavo Pires-Santos, Susana Carla Sampaio de Oliveira, Juliana Monteiro, Sandra Fagnani, Fernando J. Pires Sampaio, pedro Crugeira, Paulo Fernando de Almeida, Antonio Pinheiro
Suggested reviewers	Aletta Karsten, Anna Janaszewska, Mark Wainwright

Abstract

The aim of this study was to evaluate the lethal potential of macrophages infected with *Staphylococcus aureus* after PACT using phenothiazine derivatives (a solution containing 1:1 methylene blue and O toluidine blue) and laser (660 nm, 40 mW, 60 s, 12 J/cm²) or LED (632 ± 2 nm, 145 mW, 40 s, 12 J/cm²). Six experimental groups were evaluated: Control Group (untreated); Photosensitizer group (phenothiazines - 12.5 µg/mL); Laser Group; LED Group; Laser PACT Group; and LED PACT Group. The pre-irradiation time used in this study was 5 minutes. Macrophages and bacteria were cultured in specific culture media and / or allowed interaction between the cell types. Subsequently, tests were carried out to evaluate microbial proliferation, ROS production by macrophages and survival capacity of *S. aureus* after phagocytosis. Fluorescence microscopy assays were performed with the H₂DCFDA probe, after PACT, at the initial time (0h), 4-h and 12-h. The tests were performed in triplicate and the statistical test used was ANOVA with Tukey post-test. After PACT, a statistically significant difference ($p > 0.0001$) was observed between the microbial growth of the control group and the PACTs groups. Laser PACT and LED PACT groups presented, respectively, reductions of 84.2% and 81.5% when compared to control and 53.3% and 46% when compared to the photosensitizer group. It is concluded that the therapeutic protocols presented in this study increased the phagocytic capacity, the response rate of the phagocytes and the consequent reduction of the numbers of *S. aureus* for both PACT protocols, however the increase in ROS production was only observed in the group irradiated with Laser light.

Keywords: Laser; LED; Macrophages; PACT.

1. Introduction

Macrophages and neutrophils are main cell involved on phagocytosis [1]. Pathogen internalization can occur basically in two ways: active (phagocytosis) and passive. Passive pathogen internalization is characterized by cell invasion and phagocytosis is associated with the depletion of infectious processes [1,2]. During infectious inflammatory processes, the major molecules produced by the phagocytes of the immune system are free radicals, this event is known as "oxidative burst". These molecules act unspecifically by de-structuring the pathogen or even by unbalancing metabolic pathways [1-3]. Invasivity and evasion systems are virulence factors presented by different pathogens, such as the *S. aureus*. This pathogen, in addition to produce toxins, is capable of modulating autophagic vacuoles and surviving intracellularly [2,3].

Gram-positive microorganisms may develop resistance to antibiotics used in clinical practice. Resistance to antibiotics is a public health problem and can be found in different microbial species, such as methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) [4-5]. Therefore, the search for different therapeutic alternatives is important and PACT might be considered as a therapeutic possibility [6-9].

PACT is a potential treatment for infectious diseases [10]. This therapy combines a photosensitizer and a visible light. The light is used at a wavelength capable of exciting the photosensitizer into a triplet reactive state. This reaction will produce singlet oxygen and / or superoxide that are highly toxic to target cells damaging the cellular ultra-structure (DNA and cell membranes) and causing irreversible cell lesions and cell death. This therapeutic modality causes the production of free radicals in the targets such as the cells of the innate immune system [11-16].

Thus, it is hypothesized that the use of PACT could potentiate the action of leukocytes such as macrophages. Therefore, the objective of this study was to evaluate the lethal potential of macrophages infected by *S. aureus* after photodynamic therapy.

2. Material and Methods

2.1 Bacterial Strain and Culture Condition

Bacterial strain used in this study was *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923, a+ Diagnostic Medicine, Fleury's Group, Salvador, BA, Brazil). Cells were aerobically cultured in blood agar (Merck® Darmstadt, Hessen, Germany) at 37 °C and grown for 24-h. For the experiments, colonies were collected with the aid of a calibrated loop of 100 µL and inoculated into 5 mL of tryptic soy broth (TSB) (Merck®, Darmstadt, Hessen, Germany).

For the quantification of colony-forming units (CFU), the suspension was standardized by measuring absorbance with a Microplate Spectrophotometer (SpectraMax®, Medical Device Corporation, Sunnyvale, CA, USA) at 625 nm. The initial inoculum was 3×10^8 CFU/mL, it was plated in a 24-well culture plate (Falcon®, BD Lab., Franklin Lakes, NJ, USA). After this inoculation, each

concentration of the photosensitizer was added and irradiated following the experimental protocol. Subsequently, samples were diluted 10^{-5} and 100 μL of this suspension were inoculated in Petri dishes [16].

2.2 Macrophage culture

J774 macrophages were cultured at 37 °C for 72-h in RPMI 1640 medium (Angus Buffers & Biochemicals, Niagara Falls, NY, USA) supplemented with 10 % Foetal Bovine Serum (Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA), Enrofloxacin 10 mg/ml and Fluconazole® 5 μM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

2.3 Photosensitizer and light source

A 1:1 solution of toluidine blue O and methylene blue (A Fórmula Laboratory, Salvador, BA, Brazil) was used for photosensitization of the *S. aureus* strain. To determine the concentrations used on the study the half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) was determined (19.10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). The stock solution had 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ concentration. A dye solution at 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ concentration was prepared by dissolving in sterile phosphate – buffered saline, pH 7.4 and filtering it through a 0.22 μm membrane (Millipore®, São Paulo, SP, Brazil). After filtration, the dye solution was stored in the dark for a maximum of two weeks at 4 °C before use. A red-orange light emitting diode (Prototype, MMOptics, São Carlos, SP, Brazil, $\lambda 632 \pm 2 \text{ nm}$) was used as the light source (Tab. 1). A diode laser ($\lambda 660 \text{ nm}$, Twin Flex®, MMOptics, São Carlos, SP, Brazil) was used as the light source (Tab. 1).

Table 1: Summary of the parameters used on the study.

Parameters	Laser	LED
Wavelength (nm)	660	632 ± 2
Mode	CW	CW
Spot of the probe (cm^2)	0.04	0.5
Irradiated area (cm^2)	1	0.5
Power Output (mW)	40	145 ± 5
Exposure Time (s, per session)	300	40
Energy density (J/cm^2)	12	12

2.4 Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy (PACT)

Samples were distributed into the following groups: 1. Negative control group - untreated by either laser and photosensitizer; 2. Laser group - bacterial suspensions irradiated with laser (12 J/cm²) in the absence of photosensitizer; 3. Photosensitizer group - bacterial suspensions in the presence of phenothiazine at concentration of 12.5 µg/mL; and 4. Laser PACT group – bacterial suspensions irradiated with laser and photosensitizer; 5. LED group - bacterial suspensions irradiated with LED (12 J/cm²) in the absence of photosensitizer; 6. LED PACT group – bacterial suspensions irradiated with LED and photosensitizer (table 2).

Table 2: Summary of the experimental groups

	Negative control	Laser group	LED group	Photossensitizer group	Laser PACT	LED PACT
Photosensitiser				X	X	X
Laser		X			X	
LED			X			X

The bacterial suspensions were plated into the 24-well culture plates (Falcon®, BD Lab., Franklin Lakes, New Jersey, USA) and the conditions mentioned above and incubated in the dark and at room temperature. After pre-irradiation time (5 minutes) the bacterial suspensions, with and without photosensitizer, were or not irradiated. Immediately after the irradiation, the contents of the wells were mixed before sampling and were seeded in triplicate onto Petri plates containing TSA medium (Merck® Darmstadt, Hessen, Germany) and incubated at 37 °C for 24-h. After incubation (24-h), the number of CFU was determined by counting.

2.5 Interaction between macrophages and S. aureus Assay

For interaction tests, 2 x 10⁵ macrophages were plated on round glass coverslips placed in 24-well plates (Falcon®, BD Lab., Franklin Lakes, New Jersey, USA). After 1-h incubation in RPMI 1640 medium (Angus Buffers & Biochemicals, Niagara Falls, NY, USA) supplemented with 10% Foetal Bovine Serum (Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA), Enrofloxacin 10 mg/ml and Fluconazole 5 µM (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA), 3×10⁸ CFU/mL were added to cultured bacteria which, in turn, were incubated for 1-h. Then the wells were washed with

PBS buffer and new medium was added. Subsequently, the different therapeutic protocols seen on *Table 2* were carried out.

2.6 Phagocytosis assay

After the interaction step and application of therapeutic protocols, the samples were fixed and stained for Gram assay. The number of *S. aureus* phagocytosed by 100 macrophages was assessed by light microscopy (Olympus BX51). Five Microscopic fields distributed throughout the slide were randomly selected and all macrophages in each field were examined [14].

2.7 Evaluation of the oxidative burst

To evaluate the oxidative burst an assay was performed to detect Reactive Oxygen Species (ROS) by using the 2',7'-Dichlorofluorescein diacetate probe (H₂DCFDA, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). This probe reacts with free radicals in general and emits green fluorescence. For assays, aliquots of a stock solution were applied to the wells, reaching a final concentration of 0.4 µM and incubated for 15 minutes at 37 °C in the absence of light. Subsequently, the experimental groups were observed, and micrographs were obtained on a fluorescence microscope (Olympus BX51).

2.8 Equation of percent of inhibition

The percent of inhibition were calculated using the equation above:

$$\text{Percent of inhibition} = (1 - (\text{test}/\text{sampler})) * 100$$

2.9 Statistical analysis

Statistical analysis was carried on by One-Way ANOVA and Tukey's Multiple Comparison tests (Graphic Prism Software 4.0) $p < 0.05$ was considered statistically significant.

3. Results

Microbial growth significantly differed ($p < 0.0001$) when comparing Control and PACT groups which showed the lowest microbial growth. Comparison between PACT groups with the group treated only with the photosensitizer also showed significantly reduction ($p < 0.0001$) on the microbial growth in those treated with PACT (Fig. 1).

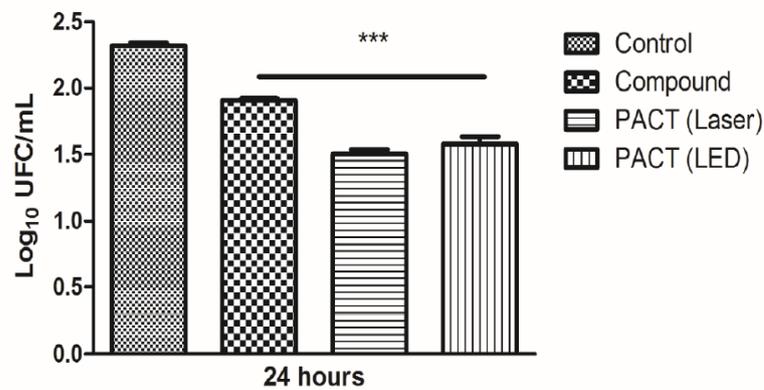


Figure 1: microbial growth in the different experimental groups (***) $p < 0.0001$). Groups PACT (Laser) and PACT (LED) showed smaller cell proliferation.

The Laser PACT and LED PACT groups showed, respectively, reductions of 84.2 % and 81.5 % in microbial growth when compared to the control group. Inhibitions of 55.3 % and 46 %, respectively, when compared to the phenothiazine group (Tab. 3).

Table 3: Percentage of inhibition of the different experimental groups. A) Percentage of inhibition considering the control as standard. B) Percentage of inhibition considering the photosensitizer as standard.

A) Percentage of inhibition in relation to the control group			B) Percentage of inhibition in relation to the photosensitiser group	
Photossensitizer	Laser PACT	LED PACT	Laser PACT	LED PACT
59.5	84.2	81.5	55.3	46

Despite the phagocytic activity on both Laser and LED PACT groups increased (21 % and 47 %, respectively) in relation to the Control group this was not

significant. It has been found that phenothiazines alone can reduce the phagocytic capacity of macrophages in vitro by about 42 % (Fig. 2).

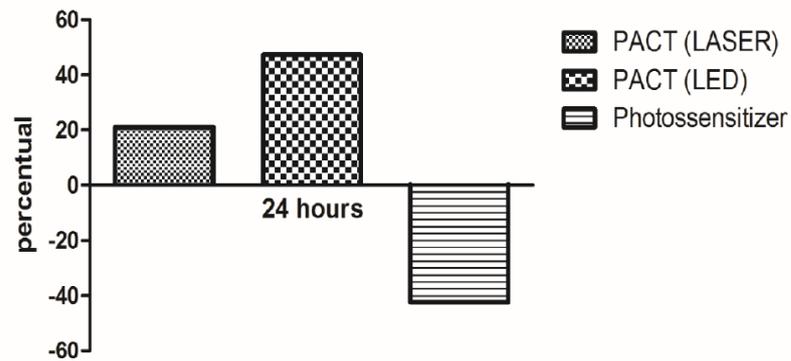


Figure 2: Assessment of the percentage of phagocytosis of different experimental groups in relation to the control. Phagocytic activity was increased in the groups PACT (Laser) 21% and PACT (LED) 47%, while the photosensitizer group reduced phagocytic activity in the macrophages by 42%. Para a obtenção destes dados foi utilizada a equação de percentual de inibição multiplicada por -1.

Following the phagocytosis test, the *S. aureus* survival test was performed on cytoplasmic vacuoles and showed reduction in the survival capacity of the microorganism in the cytoplasmic vacuoles when compared to both Control and both PACT groups, whose percentage inhibition was respectively 50.2 % and 32.4 %. However, only the Laser PACT showed statistically significant difference in relation to the Control ($p < 0.0128$) (Fig. 3).

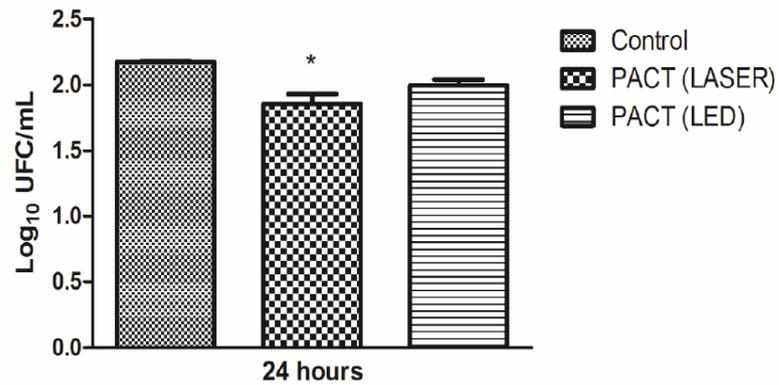


Figure 3: Microbial growth after phagocytosis and PACT in infected macrophages. After PACT (Laser) the macrophages showed a greater capacity to eliminate intracellular pathogens. This increase was statistically significant in relation to the control ($p < 0.0128$).

The production of the "oxidative burst" in the infected macrophages started earlier in the irradiated groups which, in turn, showed a response in about 4-h after the accomplishment of the therapeutic protocols. Meanwhile, the control group obtained a response after 12-h (Fig. 4).

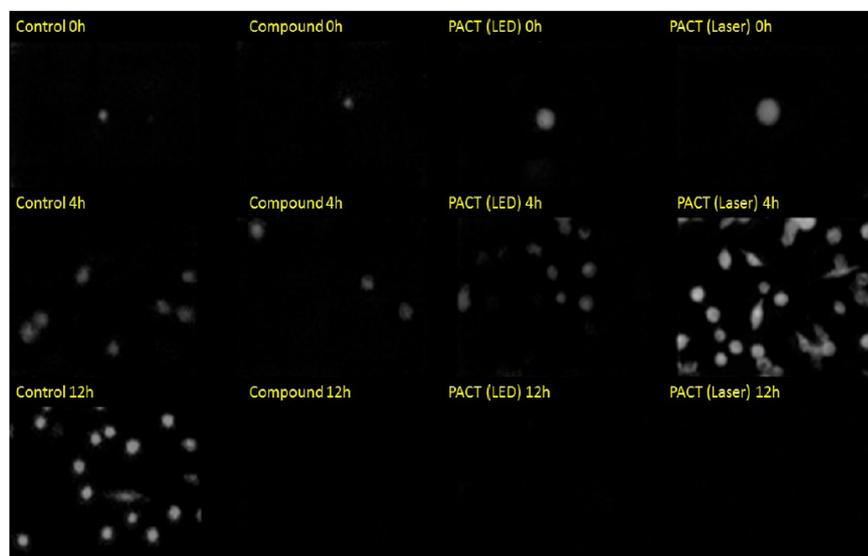


Figure 4: detection of ROS using H_2DCFDA in the different experimental groups over time. In the groups treated with PACT the oxidative burst occurs in the time of 4-h after treatment, whereas the control group is only observed with 12-h.

The results of demonstrated quick increase on the response of the phagocytes on the PACT groups, being higher when the Laser was used. However, when observing the general production, it was evident that LED irradiation caused a radical production like the Control. On the other hand, this production was approximately 5 times greater than the production of the control when using laser irradiation (Fig.5).

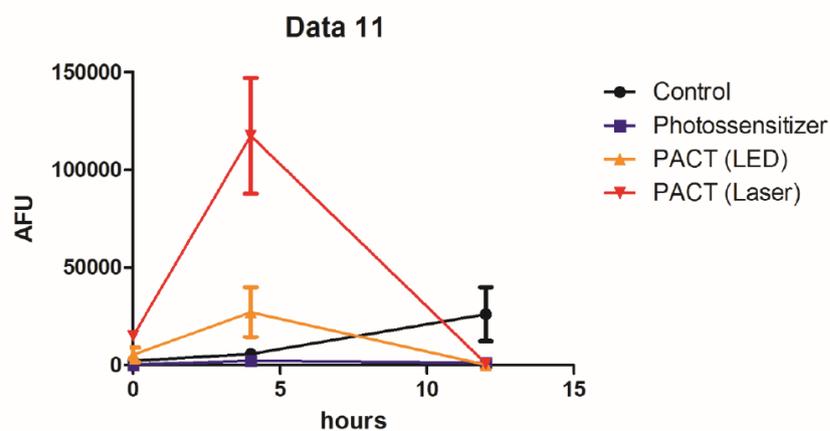


Fig. 5: Evaluation of ROS production in the different experimental conditions. In the PACT (Laser) group, the production of ROS had a 5-fold increase in relation to the control.

The production of free radicals after the application of PACT in uninfected macrophages showed no differences in relation to macrophages of the control group. This data suggests that PACT was unable to alter cellular physiology for the parameters adopted in this study.

4. Discussion

In this study it was evident that, after PACT, infected macrophages showed greater lethal capacity against endocytosed microorganisms [18] as well as increased the oxidative burst. Resistant strains of *S. aureus* are present in the community and generate pathologies, however, therapeutic protocols such as the

PACT using either Laser or LED can reduce these microorganisms in vitro as shown in the present study [6-8,19]. PACT could inhibit the growth of *S. aureus* by at least 80% in vitro using either laser or LED, as demonstrated previously [20,21].

The literature shows no differences between the use of either Laser or LED irradiation in PACT tests performed in plankton cultures of microorganisms on regards inhibition or growth, corroborating the data demonstrated by this study. However, in the present study, when assessing the interface of the interaction, it was possible to observe the existence of differences in the cellular mechanisms, such as on the phagocytosis and ROS production [20-22].

In this study, the phagocytic activity of either Laser PACT or LED PACT groups showed an increase in relation to the control reaching 21 % and 47 %, respectively. Regarding ROS production, the LED PACT group showed free radical production similar to the control. However, the Laser PACT group generated 5 times more the release of free radicals when compared to the control group [23].

In general, it has been shown that PACT is capable, even if secondary, of inducing ATP synthesis in macrophages and consequently increasing their phagocytic capacity, as demonstrated in this study. The synthesis of ATP in eukaryotes can also aid in the oxidative burst, which results in the production of free radicals used in the depletion of the infectious process [23,24].

The highest production of ROS observed on this study is revealed by the intensity of the fluorescence observed in infected macrophages and treated by PACT. In addition, these molecules are contained in the antimicrobial arsenal of phagocytes, so it is possible to establish a relationship between the fluorescence intensity and the antimicrobial capacity of phagocytes [20,21,23,24].

The protocol described in this study corroborates the inability to increase ROS production in uninfected macrophages. Therefore, PACT probably acted in, at least, two distinct pathways: the first altering cellular structures and / or pathogen

metabolism thus reducing its survival capacity; and the second by potentiating the biochemical pathways capable of improving the response of host cells to infection [18].

5. Conclusion

The therapeutic protocols presented in this study increased the phagocytic capacity, the response rate of the phagocytes and the consequent reduction of the numbers of *S. aureus* for both PACT protocols, however the increase in ROS production was only observed in the group irradiated with Laser light.

References

- [1] Cole J, Aberdein J, Jubrail J, Dockrell DH (2014) The Role of Macrophages in the Innate Immune Response to *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus*: Mechanisms and Contrasts. *Adv. Microb. Phys.* 65:125-202. doi: [10.1016/bs.ampbs.2014.08.004](https://doi.org/10.1016/bs.ampbs.2014.08.004)
- [2] Benenson AS (1995) Control of Communicable Diseases Manual. American Public Health Association. 16:184-187.
- [3] Sharma M, Visai L, Bragheri F, Cristiani I, Gupta PK, Speziale P (2008) Toluidine Blue-Mediated Photodynamic Effects on Staphylococcal Biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52: 299–305. doi: [10.1128/AAC.00988-07](https://doi.org/10.1128/AAC.00988-07)
- [4] Ayliffe GAJ, Casewell MSC, Cookson BD (1998) Revised guidelines for the control of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in hospitals, British Society for Antimicrobial Chemotherapy, Hospital Infection Society and the Infection Control Nurses Association. *J Hosp Infect.* 39:253-290. doi: [10.1016/S0195-6701\(98\)90293-6](https://doi.org/10.1016/S0195-6701(98)90293-6)
- [5] Gould IM (2006) Community-acquired MRSA: can we control it? *Lancet* 368(9538),824-826. doi: [10.1016/S0140-6736\(06\)69303-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)69303-3)
- [6] Souza LBG, Figueiredo BB (2008) Prevalência de Infecções Nosocomiais Provocadas por *Staphylococcus aureus* Resistente à Meticilina (M.R.S.A.) no Hospital Universitário Regional de Maringá. *RBAC.* 40: 31-34.
- [7] Marques PB, Ferreira AP, Carneiro FMC (2011) Perfil bacteriano de cultura de ponta de cateter venoso central. *Rev. Pan-Amaz. Saude.* 2:53-58. doi: [10.5123/S2176-62232011000100006](https://doi.org/10.5123/S2176-62232011000100006)
- [8] Quesada RMB, Ross C, Calixto LA, Giardello R, Rogeri, LMS, Pelayo, JS (2006) Análise microbiológica de pontas de cateteres venosos centrais provenientes de pacientes internados no Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina. *Semina. Cienc. Biol. Saude.* 27:117-23. doi: [10.5433/1679-0367.2006v27n2p117](https://doi.org/10.5433/1679-0367.2006v27n2p117)
- [9] Nishijima S, Namura S, Mitsuya K, Asada Y (1993) The incidence of isolation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains from skin

- infections during the past three years (1989–1991). *J. Dermatol.* 20:193-197. doi: [10.1111/j.1346-8138.1993.tb03860.x](https://doi.org/10.1111/j.1346-8138.1993.tb03860.x)
- [10] Castano AP, Demidova TN, Hamblin MR (2004) Mechanisms in photodynamic therapy. Part one. Photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiag Photodyn Ther.* 1:79-93. doi: [10.1016/S1572-1000\(05\)00007-4](https://doi.org/10.1016/S1572-1000(05)00007-4)
- [11] Jori G (2006) Photodynamic therapy of microbial infections: state of the art and perspectives. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 25:505-520. doi: [10.1615/JEnvironPatholToxicolOncol.v25.i1-2.320](https://doi.org/10.1615/JEnvironPatholToxicolOncol.v25.i1-2.320)
- [12] Castano AP, Demidova TN, Hamblin MR (2004) Mechanisms in photodynamic therapy: Part one-Photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiag. Photodyn. Ther.* 1:279-293. doi: [10.1016/S1572-1000\(05\)00007-4](https://doi.org/10.1016/S1572-1000(05)00007-4)
- [13] Wainwright M (1998) Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *J. Antimicrob. Chemother.* 42:13-28. doi: [10.1093/jac/42.1.13](https://doi.org/10.1093/jac/42.1.13)
- [14] Hamblin MR, Hasan T (2004) Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease?. *Photochem. Photobiol. Sci.* 3:436-450. doi: [10.1039/B311900A](https://doi.org/10.1039/B311900A)
- [15] Wainwright M, Phoenix DA, Laycock SL, Wareing DR, Wright PA (1998) Photobactericidal activity of phenothiazinium dyes against methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 160:177–81. doi: [10.1111/j.1574-6968.1998.tb12908.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1998.tb12908.x)
- [16] Lauro FM, Pretto P, Covolo L, Jori G, Bertoloni G (2002) Photoinactivation of bacterial strains involved in periodontal diseases sensitized by porphycene–polylysine conjugates. *Photochem. Photobiol. Sci.* 1:468-470. doi: [10.1039/B200977C](https://doi.org/10.1039/B200977C)
- [17] Carneiro VMA, Bezerra ACB, Guimarães MCM, Muniz-Junqueira MI (2012) Decreased phagocytic function in neutrophils and monocytes from peripheral blood in periodontal disease. *J Appl Oral Sci.* 20:503-9. doi: [10.1590/S1678-77572012000500002](https://doi.org/10.1590/S1678-77572012000500002)
- [18] De Oliveira S, Trahamane EJO, Monteiro J, Santos GP, Crugeira P, Sampaio F, Oliveira C, Barral M, Pinheiro A (2017) Leishmanicidal effect of antiparasitic photodynamic therapy—ApPDT on infected macrophages. *Lasers Med Sci.* doi: [10.1007/s10103-017-2292-9](https://doi.org/10.1007/s10103-017-2292-9)
- [19] Calin MA, Parasca SV (2009) Light sources for photodynamic inactivation of bacteria. *Lasers Med. Sci.* 24:453-460. doi: [10.1007/s10103-008-0588-5](https://doi.org/10.1007/s10103-008-0588-5)
- [20] Monteiro JSC, Oliveira SCPS, Santos GMP, Sampaio FJP, Soares LGP, Pinheiro ALB (2017) Effectiveness of antimicrobial photodynamic therapy (AmPDT) on *Staphylococcus aureus* using phenothiazine compound with red laser. *Lasers Med Sci.* 32:29-34. doi: [10.1007/s10103-016-2079-4](https://doi.org/10.1007/s10103-016-2079-4)
- [21] Oliveira SCPS, Monteiro JSC, Pires-Santos GM, Sampaio FJP, Soares AP, Soares LGP, Pinheiro ALB (2017) LED antimicrobial photodynamic therapy with phenothiazinium dye against *Staphylococcus aureus*: An in vitro study. *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology* 175:46–50. doi: [10.1016/j.jphotobiol.2017.08.029](https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.08.029)
- [22] Karu TI, Tiphlova OA, Letokhov VS, Lobko VV (1983) Stimulation of *E. coli* growth by laser and incoherent red light. *Il Nuovo Cimento.* 2:1138-1144.
- [23] Young S, Bolton P, Dyson M, Harvey W, Diamantopoulos C. (1989) Macrophage Responsiveness to Light Therapy. *Lasers in Surgery and Medicine.* 9:497-505. doi: [10.1002/lsm.1900090513](https://doi.org/10.1002/lsm.1900090513)

- [24] Karu TI, Afanasyeva NI, Kolyakov SF, Pyatibrat LV, Welser L (2001) Changes in Absorbance of Monolayer of Living Cells Induced by Laser Radiation at 633, 670, and 820 nm. IEEE J. Sel. Topics in Quant. Elect.7:982-98. doi: [10.1109/2944.983303](https://doi.org/10.1109/2944.983303)

Conflict of Interest: The authors of the present investigation declare that they have no conflict of interest.

Funding: This work has been funded by the FAPESB (Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado da Bahia) grant 04282014

5 CONCLUSÃO

A prospecção tecnológica revelou que a maioria dos fotofármacos patenteados fazem parte da família das porfirinas, que os maiores depositantes são os EUA com cerca de dez vezes mais patentes que o Japão, o segundo colocado.

Foi demonstrado, também, neste estudo que é possível inibir a proliferação de melanoma *in vitro* utilizando a terapia fotodinâmica associada a uma solução fenotiazínica como fotossensibilizador. Os dados sugerem que o efeito antitumoral observado está intimamente ligado à intensa autofagia. Além disso, foi possível associar os eventos anteriormente citados à produção de ROS pela terapia fotodinâmica.

Outro ponto importante foi a seletividade da terapia fotodinâmica, utilizando esta solução fenotiazínica, uma vez que mesma não promoveu a formação de ROS em macrófagos não infectados. Além disso a terapia possibilitou um aumento na capacidade letal de macrófagos contra patógenos intracelulares.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-KADER, M. H. **Photodynamic therapy**: from theory to application. New Cairo. Springer, 2014.
- ACS – American Cancer Society; Cancer Facts & Figures 2012; Atlanta: **American Cancer Society**, 2012.
- ALGAZI, A. P.; SOON, C. W.; DAUD, A. I. Treatment of cutaneous melanoma: current approaches and future prospects; **Cancer Manag and Res**, 2: 197-211, 2010
- ALMEIDA, F.A., ALMEIDA, G.O., MICHALANY, N.S. **Melanoma cutâneo - Aspectos Clínicos**. In: NEVES RG, LUPI O, TALHARI S. Câncer da Pele. 1. ed. Rio de Janeiro: Medsi; 2001.
- ALMEIDA, R. D., *et al.*, Intracellular signaling mechanisms in photodynamic therapy. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1704 (2): 59-86, 2004.
- ANGER, M. *et al.*, Primary Cutaneous Melanoma: An 18-year Study. **CLINICS**, 65(3): 257-63, 2010.
- ARMSTRONG, B. K.; HOLMAN, C. D. J. Malignant melanoma of the skin; **Bulletin of the World Health Organization**, 65(2): 245-52, 1987.
- ASHKENAZI, A.; DIXIT, V. M. Death receptors: signaling and modulation. **Science**, 281: 1305–1308, 1998.
- BAKOS, R. M.; **Efeitos Agudos da Radiação Ultravioleta B na Expressão Imunoistoquímica das Metaloproteinases –2 e –9 em Nevos Melanocíticos**, Dissertação de Mestrado; Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina – Programa de Pós-graduação em Medicina: Ciências Médicas, 2005.
- BALDEA, I.; FILIP, A.G., Photodynamic therapy in melanoma - an update. **Journal of Physiology and Pharmacology**, 63(2): 109-118, 2012.
- BEI, D.; ZHANG, T.; MUROWCHICK, J. B.; YOUAN, B.B. C.; Formulation of Dacarbazine-loaded Cubosomes. Part III. Physicochemical Characterization. **American Association of Pharmaceutical Scientists – PharmSciTech**, 11(3): 1243-1249, 2010.
- BENCHIMOL, M., **PROGRAMMED CELL DEATH IN PROTOZOA**. Cell Death in Trichomonads. Ed. Landes Bioscience and Springer Science. 2008.
- BERGAMI, P. L., BHOUMIK, A.; RONAI, Z. Altered Signal Transduction in Melanoma. In VINCENT J. HEARING & STANLEY P. L. LEONG. **FROM MELANOCYTES TO MELANOMA: THE PROGRESSION TO MALIGNANCY**. Editora Humana Press Inc. Totowa, New Jersey. 119-147, 2006.
- BERNS, A. *et al.*, Câncer. In Alberts B *et al.*, **Biologia molecular da célula**. Editora Artmed. 6°ed. Porto Alegre. 2017.
- BHATIA, S.; TYKODI, S. S.; THOMPSON, J. A.; Treatment of Metastatic Melanoma: An Overview. **Oncology (Williston Park)**, 23(6): 488–496, 2009.

BORST, P., EVERS, R., KOOL, M., WIJNHOLDS, J. The multidrug resistance protein family. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes**, 1461:(2), 347–357, 1999.

BOYA, P. *et al.*, Inhibition of Macroautophagy Triggers Apoptosis. **Molecular And Cellular Biology**. 1: 1025–1040, 2005.

BRESLOW, A.; Thickness, Cross-Sectional Areas and Depth of Invasion in the Prognosis of Cutaneous Melanoma. **Annals of Surgery**, 172(5): 902-908, 1970.

BURSCH, W. *et al.*, **When cells die: a comprehensive evaluation of apoptosis and programmed cell death. CASPASE-INDEPENDENT AND AUTOPHAGIC PROGRAMMED CELL DEATH.** Ed. Wiley-Liss. 2004.

BÜTTNER, P. *et al.*, Primary Cutaneous Melanoma – Optimized Cutoff Points of Tumor Thickness and Importance of Clark's Level for Prognostic Classification; **CANCER** 75(10): 2499-2506, 1995.

CAHILL, D. P. *et al.*, Genetic instability and darwinian selection in tumours. **Trends in cell biology**, 9(12): M57-M60, 1999.

CALABRICH, A. F. C.; KATZ, A. Iron deficiency in cancer patients. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter**, 32(2): 95-98, 2010.

CALLAGHAN S, SENGE M.O. The Good, the Bad, and the Ugly – Controlling Singlet Oxygen through Design of Photosensitizers and Delivery Systems for Photodynamic Therapy. **Photochem. Photobiol. Sci.** 17: 1-24, 2018.

CANTO, A. C. M.; OLIVEIRA, J. Melanoma cutâneo: Doença curável? Revisão de literatura e apresentação de um organograma de investigação e tratamento. **Revista da AMRINGS**. 51(4): 312-16, 2007.

CARVALHO, C. A. *et al.*, Hereditary melanoma: prevalence of risk factors in a group of patients in Southern Brazil. **An bras Dermatol**, Rio de Janeiro, 79(1):53-60, 2004.

CASTANO, A. P.; DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: part one—photosensitizers, photochemistry and cellular localization. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**. 1(4): 279-293, 2004.

CASTANO, A. P.; DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: part two— cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**. 2(1): 1-23, 2005.

CASTANO, A. P.; DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: part three— Photosensitizer pharmacokinetics, biodistribution, tumor localization and modes of tumor destruction. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**. 2(2): 91-106, 2005.

CHAVANTES M. A. *et al.*, **Laser em Biomedicina Princípios e Práticas**, São Paulo, 2009.

CLARK, W. H. Jr. *et al.*, The Histogenesis and Biologic Behavior of Primary Human Malignant Melanomas of the Skin. **Cancer Research**, 29(3): 705-27, 1969.

CRAWFORD, E. D. *et al.*, Morte celular. In Alberts B *et al.*, **Biologia molecular da célula**. Editora Artmed. 6ªed. Porto Alegre. 2017.

- DABROWSKI J. M. *et al.*, Tissue uptake study and photodynamic therapy of melanomabearing mice with a nontoxic, effective chlorin. **ChemMedChem**, 6: 1715-1726, 2011.
- DAVIDS, L. M., KLEEMANN, B. Combating melanoma: The use of photodynamic therapy as a novel, adjuvant therapeutic tool. **Cancer Treatment Reviews**. 37(6): 465-75, 2011.
- DOBSON J., QUEIROZ G.F., GOLDING J.P. Photodynamic therapy and diagnosis: Principles and comparative aspects. **Vet J**, 233: 8-18, 2018
- EL-OSTA, H. *et al.*, BRAF Mutations in Advanced Cancers: Clinical Characteristics and Outcomes, **PlosOne**, 6(10): e25806, 2011.
- FANG, J., NAKAMURA, H.; IYER, A.K. Tumor-targeted induction of oxystress for cancer therapy. **J Drug Target**, 15(7-8):475-86, 2007.
- FELDMAN, M. *et al.*, Detection of a Tumor Suppressor Gene Variant Predisposing to Colorectal Cancer in an 18th Century Hungarian Mummy. **PLoS ONE**, 11(2): e0147217. 1-13, 2016
- FERNANDES, N.C. *et al.*, Cutaneous melanoma: prospective study of 65 cases, **An Bras Dermatol**. 80(1): 25-34, 2005.
- FERREIRA, F. O.; CASTRO, R. M. R. P. S. Biologia da célula tumoral. In LOPES A, IYAYASU & CASTRO R M P S. **Oncologia para graduação**. Editora Tecmedd. 2º edição. São Paulo, SP. 2008
- FERREIRA, J.; MENEZES, P. F. C.; Terapia Fotodinâmica para tumores. In: BAGNATO, V. S.; **Novas Técnicas Ópticas Para as Áreas da Saúde**. São Paulo, Editroa Livraria da Física, p. 97-122, 2008.
- FINK, S. L.; COOKSON; B. T. Apoptosis, Pyroptosis, and Necrosis: Mechanistic Description of Dead and Dying Eukaryotic Cells. **INFECTION AND IMMUNITY**. 73(4): 1907–1916, 2005
- FINN, L.; MARKOVIC, S.N.; JOSEPH R.W.; Therapy for metastatic melanoma: the past, present, and future. **BMC Medicine**. 10(23): 1-10, 2012.
- GABER A.S.A., MÜLLER P., ZIMMERMANN W., HÜTTENBERGER D., WITTIG R., ABDEL KADER M.H., PASSO H. ABCG2-mediated suppression of chlorin e6 accumulation and photodynamic therapy efficiency in glioblastoma cell lines can be reversed by KO143. **J Photochem Photobiol B**. 178: 182-191. 2018
- GAD, F. *et al.*, Effects of Growth Phase and Extracellular Slime on Photodynamic Inactivation of Gram-Positive Pathogenic Bacteria. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 48(6): 2173-8, 2004.
- GARG, A. D.; AGOSTINIS, P. Autophagy Induced by Photodynamic Therapy (PDT): Shaping Resistance Against Cell Death and Anti-Tumor Immunity. In Rapozzi V & Jori G. **Resistance to Photodynamic Therapy in Cancer**. Editora SPRINGER, 99-116, 2015.
- GOLDMAN, M. **Terapia Fotodinâmica: Série Procedimentos em Dermatologia Cosmética**. Elsevier. 2007

GONZALES, F. P.; **Triagem, Identificação e Determinação de Parâmetros Funcionais de fotossensibilizadores com Ação Antifúngica**; Monografia (Mestrado em Biociências Aplicadas à Farmácia) – Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia – USP, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto. 2007.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A. B. Apoptosis: Programmed Cell Death. **Revista Brasileira de Cancerologia**, 53(3): 335-343, 2007.

HOCKER, T. L.; SINGH, M.K.; TSAO, H.; Melanoma Genetics and Therapeutic Approaches in the 21st Century: Moving from the Benchside to the Bedside. **Journal of Investigative Dermatology**. 128(11): 2575-95, 2008.

INCA. **Estimativas 2008: Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2007. < Disponível em: www.inca.gov.br>

INCA. **Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil**; Coordenação Geral de Ações Estratégicas, Coordenação de Prevenção e Vigilância. – Rio de Janeiro: Inca, 2011.

JIN, Z.; EL-DEIRY, W. S. Overview of Cell Death Signaling Pathways. **Cancer Biology & Therapy**. 4(2): 139-63, 2005.

KRIEG, C. *et al.*, O. Improved IL-2 immunotherapy by selective stimulation of IL-2 receptors on lymphocytes and endothelial cells. **PNAS**. 107(26): 11906-11, 2010.

KROEMER, G.; GALLUZZI, L.; BRENNER, C. Mitochondrial Membrane Permeabilization in Cell Death. **Physiol Rev**. 87: 99–163, 2007.

KROEMER, G.; MARTIN, S. J. Caspase-independent cell death. **Nature Medicine**, 11(7) 725-730, 2005.

KYRGIDIS, A.; TZELLOS, T. G.; TRIARIDIS, S. Melanoma: Stem cells, sun exposure and hallmarks for carcinogenesis, molecular concepts and future clinical implications. **Journal of Carcinogenesis**. 9(3), 2010.

LAKHTAKIA, R. A Brief History of Breast Cancer Part I: Surgical domination reinvented. **MEDICAL HISTORY. Sultan Qaboos University Med J**. 14(2): e166-169, 2014.

LAMKANFI, M. *et al.*, The Caspase Family. In Los, M.; Walczak, H. **Caspases—Their Role in Cell Death and Cell Survival**. Ed. Landes Bioscience / Eureka.com and Kluwer Academic / Plenum Publishers. GeorgeTown, Texas, USA. 2002.

LEBLANC, H. N.; ASHKENAZI, A. Apo2L/TRAIL and its death and decoy receptors. **Cell Death Differ**, 10: 66–75, 2003.

LEE, H.Y. *et al.*, Melanoma: Differences between Asian and Caucasian Patients. **Ann Acad Med Singapore**. 41(1): 17-20, 2012.

LIN, L.; BAEHRECKE, E. H. Autophagy, cell death, and cancer. **Molecular & Cellular Oncology**. 2(3): e985913-1- e985913-8, 2015.

LINKERMANN, A; GREEN, D. R. Necroptosis. **N Engl J Med**. 370 (5):455-465, 2014.

LIZARD, G. *et al.*, Characterization and Comparison of the Mode of Cell Death, Apoptosis Versus Necrosis, Induced by 7 β -Hydroxycholesterol and 7-Ketocholesterol in the Cells of the Vascular Wall. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 19: 1190-1200, 1999.

LOCKSHIN, R. A.; ZAKERI, Z.; **When cells die: a comprehensive evaluation of apoptosis and programmed cell death**; INTRODUCTION Ed. Wiley-Liss. 2004.

MACHADO, A. E. H. Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. **Química Nova**. 23(2): 237-43, 2000.

MARTIN, J. P.; LOGSDON, N. Oxygen Radicals Are Generated by Dye-Mediated Intracellular Photooxidations: A Role for Superoxide in Photodynamic Effects. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. 256(1): 39-49, 1987.

MARTINEZ, J. D. *et al.*, **Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery: Chemotherapeutic agents, Chapter One – Molecular Biology of Cancer**, 6^a ed., vol. 5, Wiley; 2003.

MENNA-BARRETO, R. F. *et al.*, Different cell death pathways induced by drugs in *Trypanosoma cruzi*: an ultrastructural study. **Micron**. 40(2): 157-68, 2009.

MONTEIRO J.S.C. *et al.*, Effectiveness of antimicrobial photodynamic therapy (AmPDT) on *Staphylococcus aureus* using phenothiazine compound with red laser, **Lasers Med. Sci.**, 32: 29–34, 2016.

NANJI, A. A.; HILLER-STURMHÖFEL, S. APOPTOSIS AND NECROSIS *Two Types of Cell Death in Alcoholic Liver Disease*. **ALCOHOL HEALTH & RESEARCH WORLD**. 21(4): 325-30, 1997.

NIH. NACIONAL CANCER INSTITUTE. **Cell Biology and Cancer**. USA. 1999.

NIH. NACIONAL CANCER INSTITUTE. **What You Need To Know About: Melanoma and Other Skin Cancers**. USA. 2010.

NIH. NACIONAL CANCER INSTITUTE. **Photodynamic Therapy for Cancer**; Fact Sheet 09.06.2011. 2011.

NÚÑEZ, S. C.; **Estudo da Dinâmica de Fotodegradação e Agregação das Fenotiazinas Azul de Metileno e Azul de Orto-Toluidina Com Relação à Eficiência Fotodinâmica**; (Doutorado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – USP, São Paulo. 2007.

OLSSON, M.; ZHIVOTOVSKY B. Caspases and cancer. **Cell Death and Differentiation**. 18: 1441–1449, 2011.

OMS. **Cancer**; Fact sheet N°297, 2012; Disponível em <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>>

OMS. **CAUSES OF DEATH 2008 SUMMARY TABLES**; Health statistics and informatics Department, World Health Organization, Geneva, Switzerland, 2011; Disponível em: <http://www.google.com.br/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&ved=0CCQQFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.who.int%2Fentity%2Fgho%2Fmortality_burden_disease%2Fglobal_burden_disease_DTH6_2008.xls&ei=Kw-EUJ_mIb49QTssoDoDg&usg=AFQjCNF7PIHQNWUv8jairWoXmt7SFte_Ow>

OMS. **Global Burden of Disease Report**. 2004

OMS. **World cancer factsheet. World cancer burden**. 2008

OTTER, W. D. *et al.*, Local therapy of cancer with free IL-2; **Cancer Immunol Immunother**, vol. 57, 2008.

PASPARAKIS, M.; VANDENABEELE, P. Necroptosis and its role in inflammation. **NATURE** 517: 311-320, 2015.

PATTINGRE, S. *et al.*, Bcl-2 Antiapoptotic Proteins Inhibit Beclin-1-Dependent Autophagy. **Cell**. 122(6): 927-39, 2005.

PEREZ-MORENO, M. *et al.* Loss of p120 catenin and links to mitotic alterations, inflammation, and skin cancer. **PNAS**. 105(40): 15399-404, 2008.

PICAZARRI, K.; NAKADA-TSUKUI, K. & NOZAKI, T. Autophagy during Proliferation and Encystation in the Protozoan Parasite *Entamoeba invadens*. **INFECTION AND IMMUNITY**. 76(1): 278–288, 2008.

PIMENTA, L. H. M. **Laser em Medicina e Biologia: Generalidades**. ROCA. 1990.

PIRES-SANTOS, G. M. *et al.*, Prospective study of luminous radiation associated technology photosensitive compounds for treatment of diseases. Mechanisms for Low-Light Therapy X, **Proc. of SPIE**, 9309: 93090Y-1-7, 2015.

RASPER, D. M. *et al.*, Cell death attenuation by 'Usurpin', a mammalian DEDcaspase homologue that precludes caspase-8 recruitment and activation by the CD-95 (Fas, APO-1) receptor complex. **Cell Death and Differentiation**. 5: 271 – 288, 1998.

RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K.; **Mutagênese Ambiental**, Canoas, Ed. ULBRA, 1^a ed. 2003

ROBERTSON, C. A., EVANS, D. H., ABRAHAMSE, H. Photodynamic therapy (PDT): A short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT. **Journal of Photochemistry and Photobiology**. Biology. 2009

RODRIGUES, J.C.; DE SOUZA, W. Ultrastructural alterations in organelles of parasitic protozoa induced by different classes of metabolic inhibitors. *Curr Pharm Des.*; 14(9): 925-38, 2008.

SACZKO, J. *et al.*, The influence of photodynamic therapy on apoptosis in human melanoma cell line. **Folia Histochem Cytobiol**, 43: 129-132, 2005.

SEETHARAMU, N.; OTT, P. A.; PAVLICK, A. C. Mucosal Melanomas: A Case-Based Review of the Literature. **The Oncologist**. 15(7): 772-81, 2010.

SHARMA, S. K.; HUANG, Y. Y.; HAMBLIN, M. R. Melanoma resistance to photodynamic therapy. In Rapozzi V & Jori G. **Resistance to Photodynamic Therapy in Cancer**. Editora SPRINGER. 229-246, 2015.

SHARMA, S.; KELLY, T. K.; JONES, P. A. Epigenetics in cancer. **Carcinogenesis**. 31(1): 27–36, 2010.

SOUZA, S. R. P.; FISCHER, F. M. e SOUZA, J. M. P. Bronzeamento e risco de melanoma cutâneo: revisão da literatura. **Revista de Saúde Pública**. 2004.

SRINIVASA, M. *et al.*, FLAME-1, a Novel FADD-like Anti-apoptotic Molecule That Regulates Fas/TNFR1-induced Apoptosis. **THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY**. 272(30): 18542–18545, 1997

TAABAZUING, C. Y.; OKONDO, M. C.; BACHOVCHIN, D. A. Pyroptosis and Apoptosis Pathways Engage in Bidirectional Crosstalk in Monocytes and Macrophages. **Cell Chemical Biology**. 24(4): 507-514, 2017.

TSUJIMOTO Y. Multiple ways to die: Non-apoptotic forms of cell death. **Acta Oncologica**, 51: 293–300, 2012.

VAKIFAHMETOGLU, H.; OLSSON, M.; ZHIVOTOVSKY, B. Death through a tragedy: mitotic catastrophe. **Cell Death and Differentiation**. 15: 1153–1162, 2008.

VAN STRATEN D., MASHAYEKHI V., DE BRUIJIN H.S., OLIVEIRA S. e ROBINSON D.J. Oncologic Photodynamic Therapy: Basic Principles, Current Clinical Status and Future Directions. **Cancers**, 9(19): 1-54, 2017.

VANNIER-SANTOS MA, DE CASTRO SL. Electron microscopy in antiparasitic chemotherapy: a (close) view to a kill. **Curr Drug Targets**, 10(3): 246-60. 2009

VIDWANS, S. J. *et al.*, A Melanoma Molecular Disease Model. **PlosOne**. 6(3): e18257, 2011.

VO-DINH, T. (2° Ed.). Biomedical photonics handbook. Boca Raton: CRC Press. 3(48), pp. 187-217. 2015.

WAINWRIGHT, M. **Photosensitisers in Biomedicine**. Oxford: Wiley-Blackwell, 2009.

WEINLICH, R. *et al.*, Necroptosis in development, inflammation and disease. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**. 18: 127-136, 2017.

XIA, Q. *et al.*, Differentiation between Malignant and Benign Solitary Lesions in the Liver with ¹⁸FDG PET/CT: Accuracy of Age-related Diagnostic Standard. **Journal of Cancer**. 6(1): 40-47, 2015.

XIE, Z.; KLIONSKY, D. J. Autophagosome formation: core machinery and adaptations. **Nature Cell Biology**. 9(10): 1102-09, 2007.

ZAIDI, M. R.; DAY, C.P.; MERLINO, G. From UVs to Metastases: Modeling Melanoma Initiation and Progression in the Mouse. **Journal of Investigative Dermatology**. 128(10): 2381-91, 2008.

ANEXO I – OUTROS ARTIGOS EM TERAPIA FOTODINÂMICA

Lasers Med Sci
DOI 10.1007/s10103-016-2079-4



ORIGINAL ARTICLE

Effectiveness of antimicrobial photodynamic therapy (AmPDT) on *Staphylococcus aureus* using phenothiazine compound with red laser

Juliana S. C. Monteiro^{1,2} · Susana C. P. S. de Oliveira¹ · Gustavo M. Pires Santos¹ · Fernando José Pires Sampaio¹ · Luiz Guilherme Pinheiro Soares^{1,3} · Antônio L. B. Pinheiro^{1,3}

Received: 6 February 2016 / Accepted: 12 September 2016
© Springer-Verlag London 2016

Abstract The aim of this study was to evaluate, in vitro, the bactericidal effect of antimicrobial photodynamic therapy (AmPDT) using phenothiazinium dyes (Toluidine Blue O and methylene blue, 1:1) using different concentrations (100, 50, 25, 12.5, and 6.25 µg/mL) associated to red laser with different energy densities (2.4, 4.8, 7.2, 9.6, and 12 J/cm²) on a strain of *Staphylococcus aureus* (ATCC 23529). On this study, tests were performed in triplicate and the samples were distributed into 36 test groups: Control and bacterial suspensions were irradiated with the different energy densities, respectively, in the absence of photosensitizer, bacterial suspensions were irradiated with the laser in the different concentrations of the photosensitizer, and finally bacterial suspensions only in the presence of phenothiazinium dye. The pre-irradiation time was 5 min. Therefore, we analyzed the potential of the AmPDT by counting colony-forming units. The logarithm of CFU/mL (log₁₀ CFU/mL) was calculated and the data was analyzed statistically (ANOVA, Tukey's test, $p < 0.05$). The results showed that the association 50 and 100 µg/mL with 12 J/cm² showed the highest percentage of inhibition (100 %). Based upon the present results, it may be concluded that the AmPDT was able to enhance the antimicrobial effect of phenothiazines and both concentration of the

compound and energy density are important factors for greater effectiveness of therapy.

Keywords Antimicrobial photodynamic therapy · *Staphylococcus aureus* · Lasers · Phenothiazine

Introduction

Resistance to antibiotics is a serious public health problem and different alternative treatments have been tested, including the use of AmPDT [1]. AmPDT is a procedure that may be carried out on both sensitive and antibiotic-resistant bacteria causing inactivation of the strains. This procedure has shown itself advantageous, as it does not induce bacterial selection (resistance observed during the treatment with antibiotics) [2, 3]. *Staphylococcus* spp. are capable of developing resistance to antibiotics and are opportunistic microorganisms. Resistant strains, such as methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), are a major public health challenge. MRSA is a major concern in nosocomial infections worldwide and is also currently prevalent in residential homes [4, 5]. *Staphylococcus* is one of the most important causes of nosocomial infections and is often disseminated by medical devices. These microorganisms are protected by a biofilm that causes resistance to phagocytosis, hindering immune system functions and antibiotics activity. Therefore, their virulence is closely related to the biofilm [6].

AmPDT combines the use of a nontoxic photosensitizer combined with a non-ionizing visible light, in which wavelength has to be effective to excite the photosensitizer to a reactive triplet state. This reaction will generate singlet oxygen and superoxide that are highly toxic to the cells reactive oxygen species (ROS). AmPDT has been suggested as a

✉ Antônio L. B. Pinheiro
albp@ufba.br

¹ Center of Biophotonics, Federal University of Bahia, Salvador, BA 40110-150, Brazil

² Department of Biology, Estate University of Feira de Santana, Feira de Santana, BA 44036-900, Brazil

³ National Institute of Optics and Photonics, São Carlos, SP 13560-970, Brazil



Leishmanicidal effect of antiparasitic photodynamic therapy—ApPDT on infected macrophages

Susana de Oliveira¹ · Evaristo João da Ordem Trahamane¹ · Juliana Monteiro^{1,2} · Gustavo Pires Santos¹ · Pedro Crugeira¹ · Fernando Sampaio¹ · Camila Oliveira³ · Manoel Barral Neto³ · Antônio Pinheiro^{1,4}

Received: 30 March 2017 / Accepted: 21 July 2017
© Springer-Verlag London Ltd. 2017

Abstract The aim of this study is to evaluate the effects of ApPDT (antiparasitic photodynamic therapy) on the interaction of *Leishmania braziliensis* with J774 macrophages, used as a photosensitizer, methylene blue associated with red laser. The tests are in triplicate and the samples divided into four groups: control, photosensitizer, laser, and ApPDT. The photosensitizer used was the methylene blue at concentration of 12.5 µg/mL. The parameters of the laser were $\lambda = 660$ nm, 40 mW, and 8.4 J/cm². Samples are analyzed by optical microscopy through the identification and counting of infected and uninfected macrophages, parasite load, infectivity, and infection index. Statistical analysis used ANOVA test with Tukey post-test, being considered statistically significant $p < 0.05$. The analysis of the interaction tests shows that the infection rate in the ApPDT group in relation to the control group presents a statistically significant reduction ($p < 0.0001$) of 71% at both 24 and 48 h ($p < 0.0001$) of 62%. ApPDT reduces the number of macrophages infected by *Leishmania braziliensis*, as well as the number of intracellular parasites, being a possible alternative therapy in the treatment of cutaneous leishmaniasis.

Keywords Leishmaniasis · PDT · Laser · Macrophage

Introduction

The earliest forms of treatment for cutaneous leishmaniasis were based on oral, topical, or systemic administration of antimonial drugs. For decades, sodium stibogluconate was considered the gold standard for treatment of cutaneous leishmaniasis. However, this drug was reported to be quite toxic to humans, expensive and inefficient to the various species of *Leishmania* [1]. Therapy with meglumine and allopurinol antimoniate promotes not only a clinical improvement but also a marked decrease in parasitic load on blood, skin, and lymph nodes [2]. The treatment usually lasts for more than 6 months in cases of large lesions and lesions located in the joints or face [3].

Among the problems reported in the treatment of cutaneous leishmaniasis are difficulty in determining clinical diagnosis due to lack of access to microscopy on many basic health services [3]; the serious side effects of pentavalent antimonial drugs, for example: bone and muscle pain, renal failure, hepatotoxicity, and cardiotoxicity [4]; and the variability of the efficacy against the different forms of *Leishmania* [5], making drugs and medical attention an expensive treatment because of the side effects [6]; besides, there have also been reports of patients not responding to drugs due to drug resistance or increased immunosuppression [7].

In this context, ApPDT appears to be a promising technique in the treatment of cutaneous leishmaniasis due to its low toxicity, lower costs and adherence of patients to the treatment. Unlike conventional drugs that act only on a target, the photosensitizers act via production of singlet oxygen or reactive oxygen species [8], inducing damage to biomolecules that will lead to loss of appropriate biological functionality, leading to inactivation of the parasite cell [9]. The evident advantages of ApPDT over conventional treatments such as chemotherapy are target

✉ Antônio Pinheiro
albp@ufba.br

¹ Center of Biophotonics, Federal University of Bahia, Salvador, BA 40110-150, Brazil

² Department of Biology, Estate University of Feira de Santana, Feira de Santana, BA 44036-900, Brazil

³ Gonçalo Muniz Research Center, Oswaldo Cruz Foundation – FIOCRUZ-BA, Salvador, BA 40296-710, Brazil

⁴ National Institute of Basic Optics and Applied to Life Sciences, São Carlos, SP 13560-970, Brazil



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jphotobiol

LED antimicrobial photodynamic therapy with phenothiazinium dye against *Staphylococcus aureus*: An in vitro study



Susana C.P.S. de Oliveira^a, Juliana S.C. Monteiro^{a,d}, Gustavo M. Pires-Santos^a,
Fernando José Pires Sampaio^a, Amanda P. Soares^a, Luiz Guilherme P. Soares^{a,b},
Antônio L.B. Pinheiro^{a,b,c,*}

^a Center of Biophotonics, School of Dentistry, Federal University of Bahia, Salvador 40110-150, BA, Brazil

^b National Institute Basic Optics and Applied to Life Science, São Carlos 13560-970, SP, Brazil

^c Biomedical Engineering Institute, Universidade Brasil, São Paulo 08230-030, SP, Brazil

^d Department of Biology, Estate University of Feira de Santana, Feira de Santana 44036-900, BA, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
AmPDT
Bacteria
Light emitting diode
Methylene blue
Toluidine blue

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate, in vitro, the bactericidal effect of AmPDT on *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) using different concentrations (100, 50, 25, 12.5 and 6.25 µg/mL) of phenothiazine compound combined with LED light ($\lambda_{632} \pm 2$ nm) using varied energy densities (12, 9.6, 7.2, 4.8 and 2.4 J/cm²). The experiments were carried out in triplicate and the samples were divided into groups: Control, Irradiated (treated only with light at different energy densities), Photosensitizer (treated only in the presence of the dye), AmPDT (treatment with light associated with dye). Counts of the colony forming units and the data obtained were statistically analyzed (ANOVA, Tukey's test, $p < 0.05$). The results showed no difference between irradiated and Control groups. However, using the photosensitizer alone caused significant increased cytotoxicity and consequent reduction on the CFU counts (12.5 µg/mL ($p < 0.001$), 25 µg/mL, 50 µg/mL and 100 µg/mL ($p < 0.0001$)). When AmPDT was used significant inhibition above 70% were detected for all concentrations of the photosensitizer ($p < 0.0001$) except for 6.25 µg/mL. The results indicate a dose-response dependent when the photosensitizer is used alone but not for the sole use of the light is used. It is concluded that, a single application of AmPDT, using energy density of 12 J/cm² associated either to 12.5 (81.52%) or 25 µg/mL (91.57%) resulted in higher in vitro inhibition of *S. aureus*.

1. Introduction

A wide variety of strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* have spread throughout the world causing serious and often fatal infections. Antibiotics are the most common medications currently used in clinical settings to treat such infections. These strains represent a problem for the health system [1–3].

Previous data found on the literature showed that antimicrobial photodynamic therapy (AmPDT) is effective against *S. aureus*, being considered bactericidal. In AmPDT, a non-ionizing light associated with a photosensitizer is used to produce reactive species of singlet oxygen, which induce damage to target cells [4–7].

The photosensitizers used in photodynamic therapy functions as an optical absorption agent being essential to use a type suitable for the wavelength used. Among the properties of an ideal photosensitizer, it must have a high coefficient of excitation in the range of 600–800 nm

[8] within the biological window as wavelengths below 600 nm are highly absorbed by haemoglobin and above 800 nm the photons are not energetic enough to activate the photosensitizer being the light highly absorbed by water. Within the biological optical window (600–800 nm) light penetration on tissues is at its maximum and the wavelength is energetic enough to cause singlet oxygen production during the PDT [9,10]. This maximum absorption band is known as *Soret band*. Both methylene and toluidine blue stains show wide absorption bands being at 664 e 631 nm their maximum absorption peak, respectively [11].

For AmPDT Lasers at varied wavelengths are used as light source. However, novel studies using LEDs are currently on focus due to the lower cost of this technology. Data from studies using LEDs alone or in the AmPDT indicate promising results in the control of microorganisms [12].

The hypothesis of this study was that LED AmPDT could be able to inhibit the proliferation of *S. aureus*. Therefore, the objective of the

* Corresponding author.
E-mail address: albp@ufba.br (A.L.B. Pinheiro).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.08.029>

Received 9 June 2017; Received in revised form 16 August 2017; Accepted 21 August 2017

Available online 24 August 2017

1011-1344/ © 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

APENDICE I

5.1 MORTE CELULAR

Em organismos multicelulares os processos de morte celular podem ser considerados fisiológicos ou não. Existem fatores que podem levar uma célula à morte, tais como: desnutrição; sinais intra e extracelulares; fármacos e toxinas. Cada um destes eventos, portanto, pode ser caracterizado morfológica e bioquimicamente (LIZARD *et al.*, 1999).

Desta forma, existem alguns tipos de morte celular, sendo os mais bem descritos a apoptose e a necrose. O primeiro destes processos representa de um modo geral processos de morte celular programada. Por isso, pode ser dividido em apoptose clássica, que cursa com a ativação de caspases e processos de morte programada independente de caspases. De um modo geral, nas mortes programadas as células gastam ATP e mantêm a integridade da membrana plasmática, por exemplo (NANJI & HILLER-STURMHÖFEL, 1997; GRIVICICH, REGNER & ROCHA, 2007).

A necrose, por outro lado, está relacionado a quadros de morte celular não programada. Nestes casos as células durante o processo apresentam tumefação, esta alteração de morfologia está associada ao aumento da permeabilidade membranar (NANJI & HILLER-STURMHÖFEL, 1997; KROEMER, GALLUZZI & BRENNER, 2007).

5.1.1 Necrose

Segundo Robbins *et al.* 1986, necrose é a soma de alterações morfológicas que induzem à morte de uma célula. Nesse tipo de morte celular ocorre a ativação enzimática e a liberação dessas enzimas, agora ativadas, do lisossomo causando autólise.

Para uma célula que sofreu algum dano agudo e irreversível, que a impede de executar as vias de morte programada, esta seguirá o caminho para necrose. São exemplos destes danos: mudança rápida de concentração iônica entre a célula e o meio ou pH do meio extracelular; redução drástica dos recursos energéticos; mudança de temperatura; ruptura física de membrana. As células que passam por este processo de morte celular apresentam núcleo e citoplasma desorganizados com presença de precipitado proteico (LOCKSHIN & ZAKERI, 2004; CRAWFORD *et al.*, 2017) (figura 5).

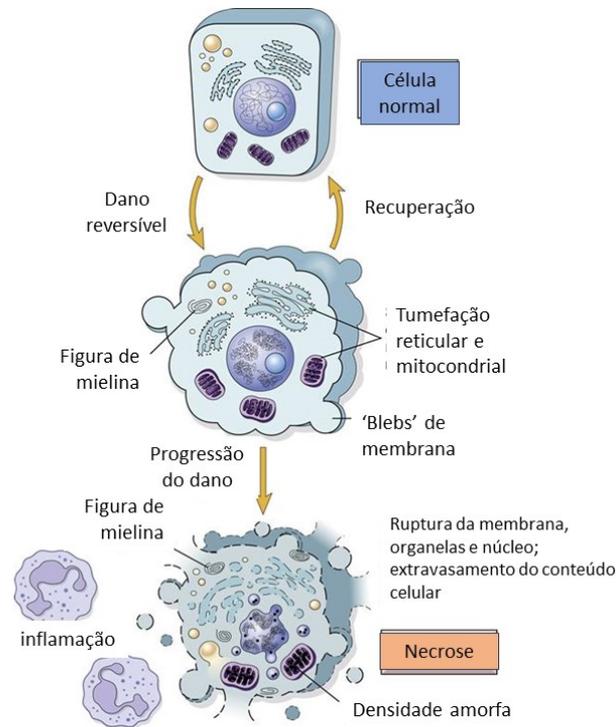


Figura 5: Processo esquemático da necrose celular. Fonte: <https://basicmedicalkey.com/cell-injury-aging-and-death/>. Adaptado para português.

Os ambientes mais propensos para a ocorrência de necroses são os quadros de isquemia, como em infarto agudos, ou demasiada instabilidade genética, como no interior de tumores sólidos. No primeiro caso, há a redução do aporte energético e de oxigênio. Enquanto no segundo caso, a demasiada instabilidade genética promove uma desorganização celular (BERNS *et al.*, 2017).

Durante a necrose é comum a perda da integridade de membrana, turgidez e ruptura da célula, lançando para o meio extracelular o conteúdo intracelular, resultando em uma resposta inflamatória do tecido, gerando danos às células vizinhas. (JIN & EL-DEIRY, 2005) (figura 6).

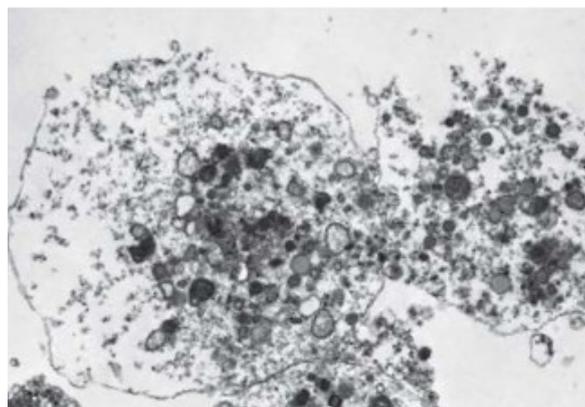


Figura 6: Micrografia eletrônica de necrose celular. Fonte: CRAWFORD *et al.*, 2017.

5.1.2 Apoptose

A apoptose é um tipo de morte celular que é considerado, em muitos casos, fisiológico por estar presente durante toda a vida de diversos organismos multicelulares, promovendo uma importante etapa no desenvolvimento e homeostase do tecido (JIN & EL-DEIRY, 2005).

A apoptose classicamente é uma via de morte celular mediada por caspases. Estas moléculas podem ser divididas em caspases iniciadoras (caspase 8 e 9) e caspases efetoras (caspase 3, 6 e 7). Assim o papel do primeiro grupo de caspases é ativar o segundo grupo (figura 3). Enquanto as caspases efetoras são responsáveis por atuar em sítios celulares proteicos (LAMKANFI *et al.*, 2002).

As caspases são proteinases que provocam alterações celulares como: condensação e vacuolização citoplasmática, condensação e marginalização de cromatina e degradação de DNA. A ativação das caspases pode acontecer desde estímulos extracelulares a alterações de organelas. Com a ligação de Fator de Necrose Tumoral (TNF- α) ao receptor específico, conduzindo a sinalização para ativação da caspase 8 que é uma caspase iniciadora das caspases 3 e 7 que são efetoras e induzem à apoptose. A alteração de membrana mitocondrial a partir da inativação da proteína Bcl-2 promove uma despolarização, permitindo a mitocôndria perder o Citocromo C para o citoplasma. Este evento promove a clivagem da pró-caspase 9 em caspase 9, outra caspase iniciadora, ativando posteriormente as caspases 3 e 7 (JIN & EL-DEIRY, 2005; LOCKSHIN & ZAKERI, 2004) (figura 7).

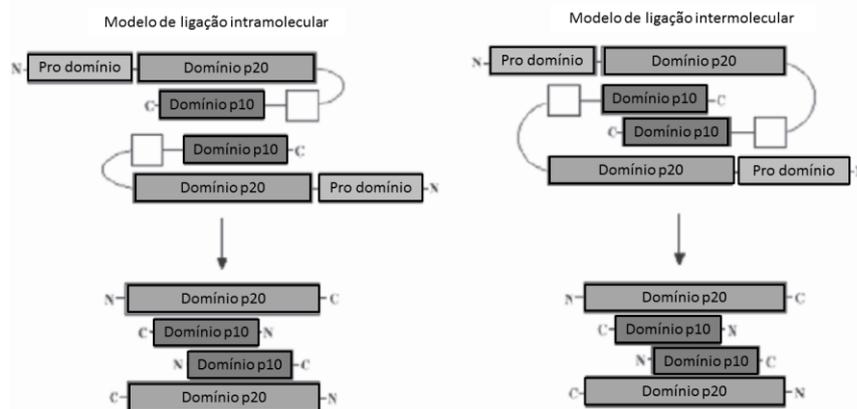


Figura 7: Dois modelos para a montagem de caspases maduras. No modelo de montagem intramolecular, as duas subunidades do heterodímero maduro são derivadas da mesma molécula precursora. Alternativamente, no modelo de montagem intermolecular as subunidades p20 e p10 do heterodímero originam-se de dois precursores diferentes. Fonte: LAMKANFI *et al.*, 2002. Adaptado para português.

Existem ao menos duas vias de ativação de caspases e de consequente ativação da apoptose. Estas vias são: via extrínseca e via intrínseca. A via extrínseca de sinalização

celular para a ativação de caspases é realizada através de proteínas transmembrana, tais como FAS e TRAIL. Estes receptores de membrana ativam a caspase 8 que, por sua vez, ativarão as caspases efetoras 3, 6 e 7 (ASHKENAZI & DIXIT, 2003).

A via intrínseca pode ser ativada por diferentes sinais, tais como dano no DNA, dano mitocrodrial, estresse oxidativo, dentre outros. Nesta via de morte os diferentes sinais conduzem para a ativação da caspase 9 e consequente formação do apoptossomo. O apoptossomo é um complexo proteico que tem como função a ativação das caspases 3, 6 e 7 (LE BLANC & ASHKENAZI, 1998).

Subdividindo a via intrínseca é possível afirmar que os sinais apoptóticos são produzidos na mitocôndria ou que eles passarão pela mitocôndria. No primeiro caso, os danos mitocondriais reduzem a integridade membranar desta organela fazendo com que o citocromo C seja liberado no citoplasma. Uma vez liberada da mitocôndria esta molécula ativa a caspase 9, que se encontra inativa no citoplasma (OLSSON & ZHIVOTOVSKY, 2011) (figura 8).

No segundo, em caso de danos fora da mitocôndria, tal como no DNA, a cascata de morte inicia-se com a liberação de p53. A p53 é uma proteína pro-apoptótica liberada em casos de danos ao DNA, que atua sobre moléculas citoplasmáticas (caspase 2, Puma e Noxa) que aumentam a permeabilidade da membrana mitocondrial e como *supra* citado, liberando o citocromo C, ativando a caspase 9 e iniciando a apoptose (LOCKSHIN & ZAKERI, 2004, KROEMER & MARTIN, 2005) (figura 8).

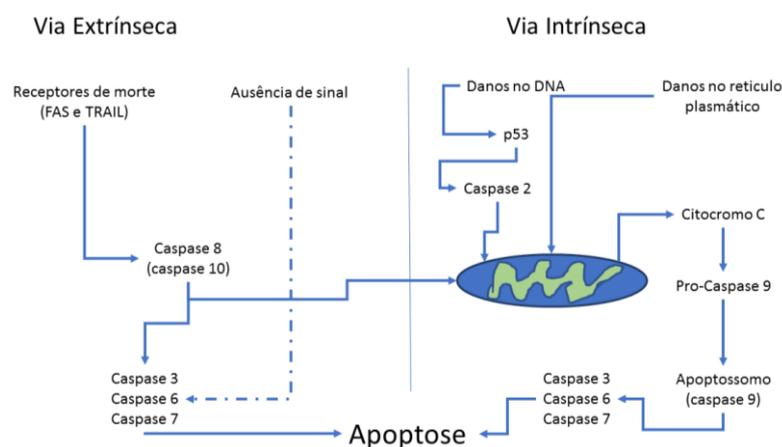


Figura 8: Esquema resumido da apoptose evidenciando as vias extrínseca e intrínseca. Setas azuis => ativação da via; setas azuis com "X" vermelho => via bloqueada; setas azuis pontilhadas => sequência da via em caso de ativação; setas vermelhas => vias de controle/inibição. Adaptado de KROEMER, GALLUZZI & BRENNER, 2007.

Nem sempre os processos de morte celular programada que iniciados serão concluídos, pois existem mecanismos de controle das vias de morte celular programada. cFLAME 1, Usurpina, Bcl 2 e Bcl X são exemplos de moléculas que atuam no controle negativo da apoptose. As duas primeiras moléculas estão envolvidas no bloqueio da via extrínseca, enquanto as duas últimas controlam negativamente a via intrínseca (RASPER *et*

al.,1998; SRINIVASA, *et al.*,1997; KROEMER, GALLUZZI & BRENNER, 2007) (figura 9).

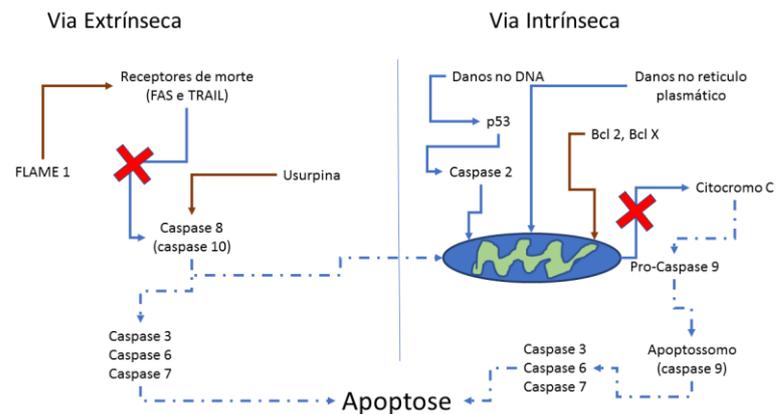


Figura 9: Esquema resumido do controle negativo da apoptose evidenciando as vias extrínseca e intrínseca. Setas azuis => ativação da via; setas azuis com "X" vermelho => via bloqueada; setas azuis pontilhadas => sequência da via em caso de ativação; setas vermelhas => vias de controle/inibição. Adaptado de KROEMER, GALLUZZI & BRENNER, 2007.

5.1.3 Mortes celulares programadas não apoptóticas

Já foram descritos ao menos quatro tipos de morte celular programada não apoptótica: "catástrofe mitótica" (células truncadas); necroptose; piroptose; morte autofágica. Estes processos de morte celular derivam da apoptose clássica, pois nestes casos a ação das caspases efetoras é inexistente (BURSCH *et al.*,2004; KROEMER & MARTIN, 2005).

A catástrofe mitótica não é um consenso na literatura. Alguns autores relatam que este tipo de morte ocorre quando tem-se células que apresentam alterações no arranjo de microtubulos associadas aos danos no DNA, por exemplo. Deste modo, o processo de morte ocorreria durante a divisão celular diferenciando-se, portanto, da apoptose clássica (CASTEDO *et al.*,2004) (figura 10).

Este tipo de morte celular seria importante para reduzir a possibilidade de alterações cromossômicas, como os casos de aneuploidia, que poderiam resultar em câncer (KROEMER, GALLUZZI & BRENNER, 2007). Entretanto, existem autores que defendem que a morte celular por "catástrofe mitótica", representa não uma via de morte, mas apenas um quadro inicial que culminaria com vias de morte como a necrose ou apoptose (VAKIFAHMETOGLU, OLSSON & ZHIVOTOVSKY, 2008).

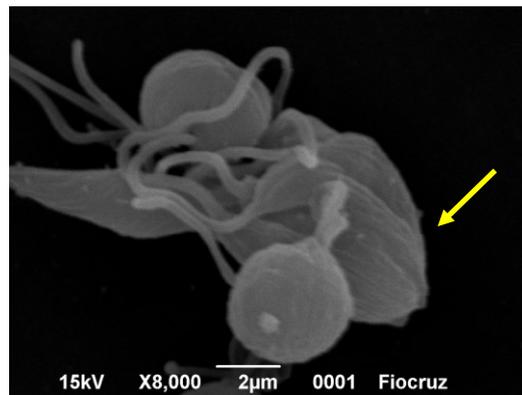


Figura 10: Micrografia eletrônica de *Leishmania* após tratamento. seta amarela mostra uma célula truncada (catástrofe mitótica). Fonte: acervo do autor.

A necrose programada ou necroptose é um tipo de morte celular que se diferencia da necrose clássica por apresentar padrões moleculares que a caracterizam como uma via de morte programada (LINKERMANN & GREEN, 2014). A necroptose apresenta morfologia característica, assim podem ser citadas a contração nuclear, a tumefação celular e de organelas e a ruptura da membrana (WEINLICH *et al.*, 2017).

Deste modo podem ser citadas como moléculas ativadas presentes neste processo a RIP 1 e RIP 3, quinases que formam um complexo enzimático chamado de necrossomo. Estas moléculas são ativadas quando na ativação de receptores de morte, tais como o TNFR 1 e FAS, a caspase 8 é inibida (TSUJIMOTO, 2012; NAJAFOV, CHEN & YUAN, 2017).

Durante a necroptose o necrossomo ativa um complexo enzimático caracterizado como pseudoquinase, o MLKL (mixed-lineage kinase domain-like protein). Este complexo é responsável por interagir com fosfatidoinositol presente na membrana plasmática induzindo, assim, a permeabilidade membranar e consequente destruição celular (WEINLICH *et al.*, 2017) (figura 11).

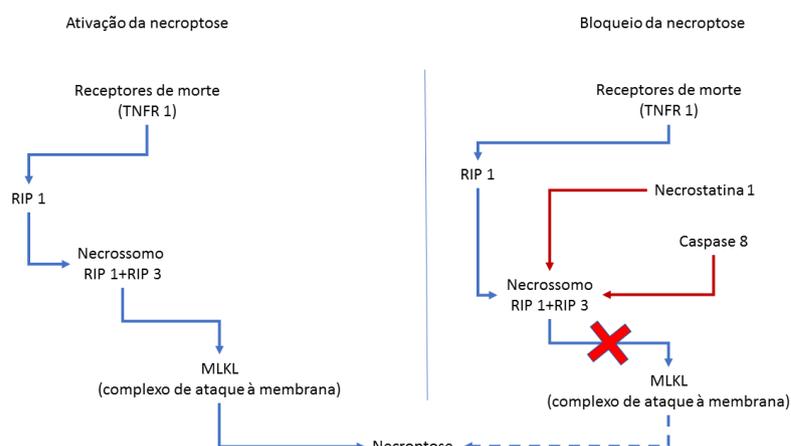


Figura 11: Esquema resumido da necroptose evidenciando as vias de ativação e bloqueio. Setas azuis => ativação da via; setas azuis com "X" vermelho => via bloqueada; setas azuis pontilhadas => sequência da via em

caso de ativação; setas vermelhas => vias de controle/inibição. Adaptado de NAJAFOV, CHEN & YUAN, 2017.

A necroptose parece ser uma importante via na inflamação e é um evento auxiliar do sistema imune inato contra infecções virais. Este efeito está ligado a ativação de RIP 3. Enquanto RIP 1 parece relacionar-se com a ativação de IL-1 α e a efeito pro-inflamatórios (TSUJIMOTO, 2012).

A RIP 1 e a RIP 3 são moléculas associadas à morte programada, quando expressas juntas ou isoladas. Na presença da caspase 8 e quanto expressas isoladamente, entretanto, ambas podem ser relacionadas à casos de apoptose (WEINLICH *et al.*, 2017).

A necroptose como todo evento programado é passível de inativação e seus reguladores moleculares são a necrostatina 1 e a caspase 8. Neste caso o bloqueio da via de morte está na formação do necrossomo, provavelmente na ativação de RIP 3 pela RIP 1 ativa. Com este bloqueio o complexo MLKL não é formado, a membrana continua íntegra e o processo de necroptose é inibido (PASPARAKIS & VANDENABEELE, 2015; NAJAFOV, CHEN & YUAN, 2017) (figura 12).

Diferente dos dois tipos de morte celular *supra* citados, a piroptose está relacionada processos inflamatórios e tem como principal marcador molecular a caspase 1. Esta molécula não está presente no processo de apoptose clássica, portanto, a apoptose ocorre normalmente em indivíduos 'Knockout' para esta caspase (FINK & COOKSON, 2005). Outro ponto que diferencia a piroptose da apoptose é a ausência de citocromo C citoplasmático nesta via de morte.

Morfologicamente a piroptose apresenta uma tumefação com exposição do conteúdo citoplasmático devido a ruptura na membrana plasmática, além disso são encontradas vesículas perinucleares, condensação do núcleo e fragmentação do DNA (LABBÉ & SALEH, 2011).

A piroptose é desencadeada pela formação de inflamossomos, complexos proteicos citoplasmáticos ativados por diferentes sinais, mas que atuam na ativação de caspases inflamatórias, tal como a caspase 1. Dentre os estímulos que ativam os inflamossomos estão: aumento de ROS; presença de PAMPs; ativação de receptores citoplasmáticos (BERGSBAKEN, FINK & COOKSON, 2009).

Após o processo de ativação da caspase 1, ela pode atuar sobre dois substratos: a gasdermina D e um grupo de caspases, tais como as caspases 3 e 7. Quando a ativação da caspase 1 culmina na clivagem de gasdermina D, no sítio D275, gerando a gasdermina D p30, ocorre a piroptose. Por outro lado, quando as caspases 3 e 7 são ativadas elas clivam a gasdermina D, no sítio D87, gerando a gasdermina D p45, inibindo a piroptose (TAABAZUING, OKONDO & BACHOVCHIN, 2017) (figura 12).

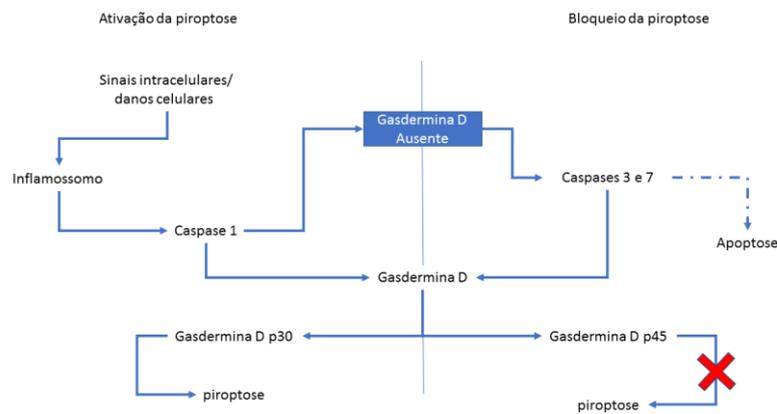


Figura 12: Esquema resumido da piroptose evidenciando as vias de ativação e bloqueio. Setas azuis => ativação da via; setas azuis com “X” vermelho => via bloqueada; setas azuis pontilhadas => sequência da via em caso de ativação. Adaptado de TAABAZUING, OKONDO & BACHOVCHIN, 2017.

A última das vias de morte programadas não apoptóticas é conhecida como morte autofágica, esta via de morte já foi descrita em diferentes tipos celulares e ocorre independente da ação das caspases efetoras (BENCHIMOL, 2008).

A autofagia, que deriva do grego *auto* = próprio, a si mesmo, e *fagos* = digestão, é a capacidade da célula digerir seus próprios componentes, é um processo fisiológico, que ocorre em taxas basais em diferentes tipos celulares, sendo mediado pelo produto de um conjunto de genes, como os genes *Atg*, bem caracterizados em leveduras. Este evento está presente em diferentes momentos e com finalidades distintas, tais como o desenvolvimento celular, contenção de processos invasivos e manutenção de organelas, dentre outras (PICAZARRI *et al.*, 2008) (figura 13).

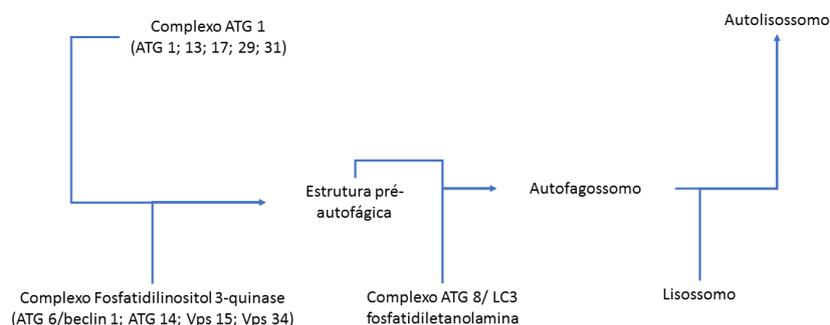


Figura 13: Esquema resumido de ativação da autofagia. O complexo ATG 1 atua sobre a membrana do retículo endoplasmático (RE) recrutando o complexo fosfatidilinositol 3-quinase, formando assim uma estrutura pré-autofágica (PAS). A maturação de PAS em autofagossomo ocorre após a ação do complexo ATG 8. O fim do processo acontece após o fusão do autofagossomo com o lisossomo e consequente digestão do conteúdo vesicular. Setas azuis => ativação da via. Adaptado de LIN & BAEHRECKE, 2015

Este mecanismo, entretanto, também pode estar ligado à processos imunitários e até mesmo à morte programada, sendo chamada de morte autofágica ou apoptose tipo II. Durante o processo autofágico, vesículas caracterizadas por 2 (duas) unidades de membranas são formadas no citoplasma celular, envolvendo o conteúdo citoplasmático, incluindo organelas e formando o autofagossomo. Tal evento é caracterizado pela fusão, por exemplo, do vacúolo autofágico com o lisossomo, criando assim um autofagolisossomo (XIE & KLIONSKY, 2007).

Este processo pode também ser encontrado em células onde estejam ocorrendo desequilíbrios metabólicos, onde, através deste recurso procura-se preservar a viabilidade celular, reciclando nutrientes intracelulares. Em eucariotos, a presença de espécies reativas de oxigênio (ROS) pode induzir autofagia na tentativa de reparar danos ocasionados pelo estresse oxidativo que pode levar a célula à morte (SCHERZ-SHOVAL & ELAZAR, 2007).

Como supracitado a autofagia é um processo que pode induzir morte programada independente de caspase, onde a degradação citoplasmática precede a degradação nuclear, e é necessário a formação de vacúolos autofágicos que contém os conteúdos citoplasmáticos. Estes vacúolos (autofagossomos) são separados do citoplasma por uma dupla membrana, seguido pela perda da membrana interna do autofagossomo. Restos de membrana e organelas são gradativamente englobadas por estas vesículas, sendo em seguida degradadas (BURSCH *et al.*, 2004).

Durante este processo de morte a via autofágica é intensamente ativada. Esta ativação pode ser observada pela formação massiva de vacúolos autofágicos ou mesmo pela formação de figuras de mielina. Esta última estrutura é caracterizada pela formação de membranas citoplasmáticas concêntricas. In vitro o processo autofágico pode ser avaliado em microscopia de fluorescência ou microscopia eletrônica de transmissão (BOYA *et al.*, 2005) (Figura 14).

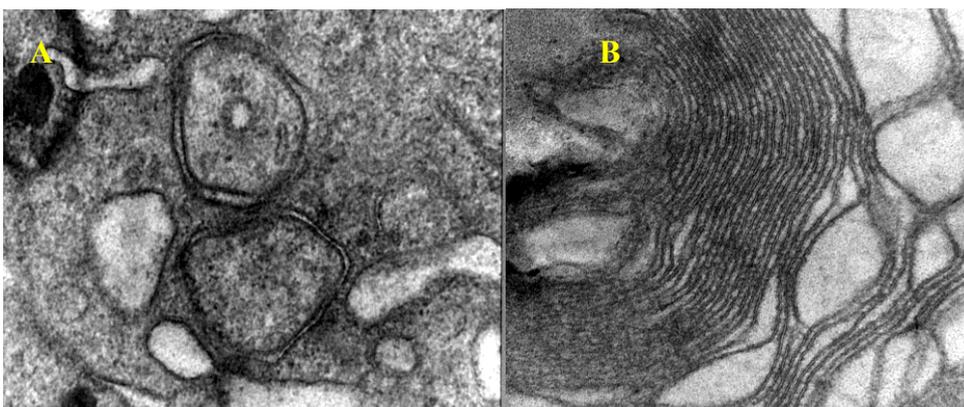


Figura 14: Processo autofágico em diferentes estágios de ativação em eucariotos. A) células não tratadas exibindo pequenas vesículas citoplasmáticas. B) células tratadas apresentando estrutura com membranas concêntricas (figura de mielina) caracterizando processo autofágico mais intenso. Fonte: acervo pessoal do autor.

Para este tipo de morte celular a deterioração nuclear é uma ação que ocorre muito tardiamente, priorizando a degradação citoplasmática (LOCKSHIN & ZAKERI, 2004). A degradação nuclear quando acontece segue o padrão descrito para apoptose: condensação de cromatina e fragmentação de DNA. Estes vacúolos quando exteriorizados, são fagocitados evitando uma resposta inflamatória exacerbada (BURSCH *et al.*,2004) (figura 15).

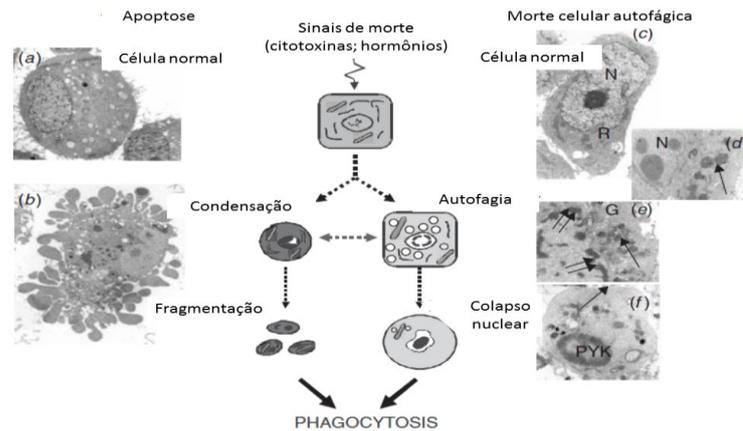


Figura 15: Esquema de morte programada diferenciando apoptose e autofagia. Fonte: BURSCH *et al.*,2004. Adaptado para português.

5.2 CÂNCER

5.2.1 UM BREVE HISTORICO SOBRE O CÂNCER

O câncer é um grupo de patologias caracterizado pela proliferação anormal de células. Este quadro é multifatorial que afeta milhões de pessoas e por tratar-se de uma doença cujos métodos diagnósticos são relativamente novos e com baixos índices de cura espontânea, esta enfermidade acabar debilitar o indivíduo acometido física e mentalmente (CALABRICH & KATZ, 2010).

Diferentemente do que muitos indivíduos pensam o câncer não é o mal do século, trata-se de um quadro clínico de difícil diagnóstico que passou a ser identificado, com maior precisão, devido o avanço tecnológico. Este grupo de patologias, entretanto, já era descrito em períodos históricos 2500 anos antes de Cristo como incurável. Neste período, entretanto, o termo câncer ainda não era utilizado (LAKHTAKIA, 2014).

Cerca de 400 anos depois de Cristo, Hipócrates utilizou o termo câncer para descrever tumores, que no geral, eram malignos. Após Hipócrates muitas teóricas sugeriram para tentar explicar a carcinogênese. Após 2500 anos de registros sobre tumores os mesmos continuavam sem cura definitiva (LAKHTAKIA, 2014).

A paleontologia oncológica apresentava algumas dificuldades na identificação de tumores. No geral as maiores dificuldades estão em identificar tumores em tecidos moles e casos de metástase. Nestes casos requerem mais cuidado e experiência do paleontologista, em função dos artefatos gerados durante o processo de mumificação ou mesmo da exposição ao

tempo, para realizar corretamente o diagnóstico. Apesar da dificuldade inerente aos processos de análise de tumores em amostras seculares existem relatos de tumores em múmias do século 18, bem como outros casos (FELDMAN *et al.*,2016; NERLICH *et al.*,2006).

Ao longo dos quase 5000 anos de registros e teorias sobre o câncer foram descritos tumores em tecidos humanos e em raros casos existe cura espontânea. Cada uma destas patologias produz quadros clínicos diferenciados que evoluem de modos distintos. Assim os protocolos terapêuticos para cada tipo de câncer devem ser personalizados, levando em consideração pelo menos o tipo de câncer, anamnese e o quadro clínico do paciente (LAKHTAKIA, 2014).

O tempo de diagnóstico é um fator preponderante no prognóstico do paciente, pois quanto mais rápido é o diagnóstico maiores são as chances de um protocolo terapêutico de sucesso. Apesar da grande inovação tecnológica na área da saúde e da maior capacidade de detecção e diagnóstico de câncer muito destes quadros patológicos permanecem sem cura definitiva (INCA, 2018).

5.2.2 CARCINOGENESE

Uma célula normal possui muitas maneiras de controlar sua respectiva proliferação, como descrito anteriormente. Entretanto, células cancerosas não apresentam o mesmo padrão de controle, estas células passam por um processo chamado imortalização. Este processo está relacionado a capacidade de uma célula proliferar indefinidamente (FERREIRA & CASTRO, 2008).

As neoplasias, portanto, são enfermidades onde a unidade funcional e estrutural dos organismos vivos – a célula – prolifera de forma desordenada. Esta condição pode acontecer em diversos tecidos em todo o corpo, podendo ser considerada benigna ou não invasiva, quando delimitada e restrita ao seu tecido de origem, e maligna (invasiva ou metastática), quando esta proliferação ultrapassa os limites teciduais e passa a ocorrer em tecidos adjacentes e, nos casos mais graves, em tecidos mais distantes (XIA *et al.*,2015) (figura 16).

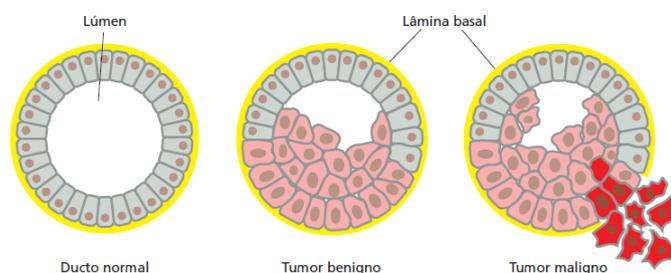


Figura 16: Diferentes condições uma glândula: glândula normal; tumor glandular não invasivo (células rosa); tumor glandular invasivo (maligno – células vermelhas). Fonte: BERNS *et al.*,2017

As neoplasias malignas são conhecidas como câncer, esta nomenclatura se dá devido à estrutura das células metastáticas que se assemelha a um caranguejo, onde a cabeça do animal representa a origem da proliferação anormal das células e os “tentáculos” representam a invasão nos tecidos adjacentes (OMS, 2012).

A formação do câncer pode ser dividida em três etapas: Iniciação, Promoção e Progressão. A primeira etapa, a iniciação, é irreversível onde os danos causados pelos agentes carcinogênicos ao DNA (ácido desoxirribonucleico), como: mutações pontuais, deleções, inserções, translocação de cromossomos e ampliações foram conservadas nas células (FERREIRA & CASTRO, 2008).

O processo da carcinogênese depende de vários fatores, desde alterações genéticas à ação de agentes físicos, químicos e/ou biológicos. Tais alterações podem ocorrer devido a muitos fatores dentre eles podem ser citados as exposições a agentes ambientais como a radiação ionizante, tal como a radiação ultravioleta (UV), que pode formar dímeros de ciclobutano pirimidina (CPD) entre as bases nitrogenadas das células, sobre tudo das células epiteliais, uma vez que são as mais expostas à radiação ultravioleta oriunda do sol, por exemplo (RIBEIRO *et al.*, 2003; PEREZ-MORENO *et al.*, 2008) (figura 17).

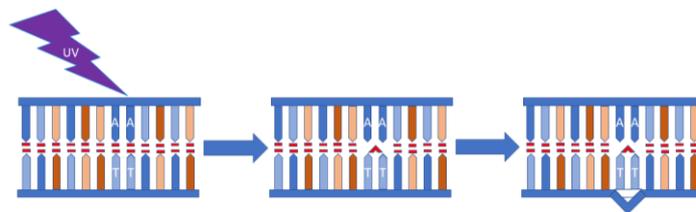


Figura 17: Esquema de formação de dímeros de pirimidina no DNA após a irradiação com UV.

A ocorrência alterações em genes que controlam o ciclo celular ou a ativação de morte programada podem transformar uma célula normal em uma célula tumoral. No entanto, mutações únicas são incapazes de produzir este efeito, assim é necessário um acúmulo de mutações independentes para alcançar as alterações presentes em células cancerosas. Vale a pena ressaltar que a ocorrência casos de câncer é proporcional à idade (BERNS *et al.*, 2017).

A promoção é um processo dependente de um agente promotor, onde este atuará estimulando a proliferação celular, esta ação é reversível e não é tóxica à célula ou causa qualquer dano no DNA. Portanto, este processo é caracterizado pela ação de fatores epigenéticos, tais como posicionamento de nucleossomas, ação de histonas e metilação do DNA. A exposição aos agentes promotores auxilia na formação de um tumor não invasivo pela proliferação das células que passaram pela iniciação (SHARMA, KELLY & JONES, 2010).

A progressão refere-se ao processo onde mutações são produzidas em células iniciadas e que as conduzem para a malignidade e metástase, esta última é uma condição onde as células neoplásicas comprometem os tecidos distantes do seu órgão de origem. Durante este processo ocorrem, basicamente, quatro eventos em cascata: 1) aumento da taxa de mutação; 2) número de clones; 3) instabilidade genética e 4) seleção natural de clones (CAHILL *et al.*,1999; MARTINEZ *et al.*,2003) (figura 18).

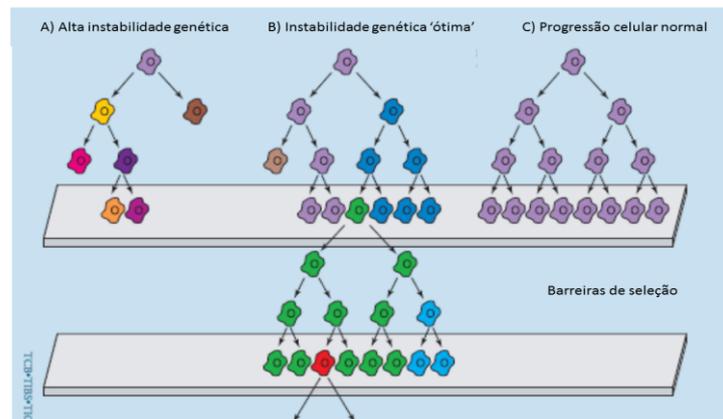


Figura 18: Esquema de progressão tumoral baseada na instabilidade genética e seleção natural de clones. A) Multiplicação de células sem quaisquer alterações genéticas. B) Multiplicação de células com alterações genéticas e formação de novas linhagens mais ‘adaptadas’ favorecendo a progressão tumoral. C) Multiplicação de células com alterações genéticas e demasiada instabilidade genética e regressão tumoral em função da seleção natural. Fonte CAHILL *et al.*, 1999. Adaptado para português.

De acordo com as etapas da cascata de eventos citados anteriormente as células iniciadas, as que possuem poucas mutações, mas já possuem algumas ‘vantagens’ na proliferação, podem multiplicar-se e produzir células com mais mutações que as células iniciadas. Assim haverá diferentes populações em um tumor, contudo todas elas apresentarão as mutações das células iniciadas que ‘produziram’ o tumor invasivo. Esta etapa da carcinogênese, por sua vez, é considerada irreversível (BERNS *et al.*,2017).

Tendo estes aspectos em vista os processos de restauração do DNA são essenciais para evitar a manutenção de danos nesta molécula. Após a etapa de restauração de uma molécula lesada tem-se três possibilidades: o reparo do DNA; a ativação das vias de morte; manutenção da alteração e consequente perpetuação do erro. O acúmulo dessas alterações, por uma falha no mecanismo de reparo do DNA, que permitem a conversão de proto-oncogenes em oncogenes (MARTINEZ *et al.*,2003).

Uma via alternativa aos oncogenes nos processos de carcinogênese é a inibição ou depleção dos genes supressores de tumor, que, como o próprio nome sugere, induz a morte celular evitando a formação de um tumor. Estes genes, quando expressos, são responsáveis por ativar os mecanismos de morte celular programada. Dois dos genes mais citados no processo de morte programada são *tp53* e *tp21* (MARTINEZ *et al.*,2003).

5.2.3 MELANOMA

Os órgãos/sítios anatômicos mais afetados, em 2016, por câncer são: próstata; cólon e reto; pulmão; mama; estômago e pele. Este último, pode ser subdividido, basicamente, em dois tipos: câncer de pele tipo não melanoma e o tipo melanoma. O primeiro subtipo é responsável por mais de 90% dos casos de cânceres de pele, contudo o melanoma pode gerar um quadro grave conhecido como metástase. O melanoma é responsável por mais de 75% dos casos de óbito por câncer de pele (FINN *et al.*,2012).

Apesar do risco de desenvolver melanoma esteja associado aos menores fototipos é equivocado pensar que a produção melanina induz imunidade às neoplasias de pele. As pessoas de fototipos mais elevados são mais resistentes a outros infortúnios oriundos da exposição à luz solar, tal como a insolação (CARVALHO *et al.*,2004).

Melanoma pode ser considerado como todo câncer que apresenta-se como tumores hiperocrômicos, originados das células da neuroectoderme, os melanócitos, geralmente, ocasiona manchas escuras e irregulares na pele. A cor escura deve-se à hiperprodução de melanina, proteína negra que pigmenta a pele e é importante nos processos de fotoproteção dos indivíduos, atuando com um filtro da radiação, absorvendo parte da radiação UV (ARMSTRONG & HOLMANN, 1987; SOUZA *et al.*,2004; ANGER *et al.*,2010).

Atualmente sabe-se que esta enfermidade é multifatorial, levando em consideração maior incidência decorrente de alguns hábitos, tal como a exposição inadequada ao sol, particularmente nos horários de maior incidência de raios UV, que podem aumentar, consideravelmente, o risco de desenvolvimento de neoplasias cutâneas. (ARMSTRONG & HOLMANN, 1987; BAKOS, 2005) A ação da UV ocasiona sintomas que incluem eritema, irritação local, bronzeamento e imunossupressão local e sistêmica. O Espectro da UV pode ser dividido em três intervalos de comprimentos de onda: UV-A (320–400 nm) e UV-B (280–320 nm) UV-C (200–280 nm).

A UV-B é considerada mais carcinogênica que a UV-A, uma vez que as mutações decorrentes da ação da UV-A ocorrem pela ação de espécies reativas de oxigênio (ROS), produzidas a partir da fotoconversão de sensibilizadores não endógenos. Em contrapartida, a UV-B promove a lesão direta ao DNA ao adicionar entre os resíduos de timina e citosina, CPD –dímeros de ciclobutano pirimidina, sendo que estas mutações são consideradas marcadores de alterações causadas pela exposição à UV-B. A UV-C é biologicamente irrelevante, sendo quase que completamente absorvida pela atmosfera, contudo existem relatos de que esta radiação pode ser produzida em ambientes laboratoriais. (ZAIDI *et al.*,2008; KYRGIDIS *et al.*,2010).

Neoplasias melanocíticas podem acometer diferentes regiões do corpo que contêm melanócitos, tais como leptomeninges, úvea (região que compreende a íris, corpos ciliares e coróide) e regiões mucosas como trato respiratório, urinário, ocular e gastrointestinal. (ALGAZI *et al.*,2010; LEE *et al.*,2012; SEETHARAMU *et al.*,2010). Assim, é possível subclassificar os melanomas cutâneos em: mucosos, ocorrendo principalmente na oro e nasofaringe, região anal-genital e reto e os melanomas acrais que afetam pele, palma das mãos, planta dos pés e regiões ungueais (ALGAZI *et al.*,2010).

Os melanomas cutâneos ainda podem ser subdivididos em: expansivo superficial, nodular, lentiginoso e lentigo maligno, onde: expansivo superficial, é mais frequente nos membros inferiores e tronco, apresenta hipopigmentação central e expansão periférica, várias colorações e, em casos mais graves, pode ocorrer sangramento indicando crescimento vertical; o nodular, apresenta-se como uma lesão papular, elevado de cor castanha, negra ou azulada, indica crescimento vertical sem expansão radial; lentiginoso, por sua vez, acomete regiões palmoplantares, extremidades digitais, lesão subungueal, sendo mais frequentes em indivíduos não brancos; por último tem-se o lentigo maligno, apresentando-se, geralmente, como uma mancha bem delimitada com margens irregulares podendo alcançar vários centímetros de diâmetro, mais frequentemente localizada na face (FERNANDES *et al.*,2005).

Em células de melanoma a transdução dos sinais estão alteradas em pelo menos sete vias diferentes. As alterações destas vias conferem ao melanoma ‘vantagens’, tais como maior capacidade proliferativa, redução da supressão e promoção de metástase. Dentre estas mutações podem ser citadas WNT1 e 5, MAPK- β RAF, JAK-STAT (BERGAMI, BHOUMIK & RONAI, 2006).

Uma mutação no gene *BRAF* afeta as vias de sinalização celular aumentando a proliferação celular, promovendo uma atividade oncogênicas. A mutação é mais frequente nestes genes é a substituição da glutamina por valina no códon 600 (V600E) (EL-OSTA *et al.*,2011). Outro gene envolvido na fisiopatologia do melanoma é o gene *NRAS* considerado também como um importante oncogene no desenvolvimento desta neoplasia. Estes dois genes estão relacionados com a expressão de proteínas que interferem no ciclo celular – como as proteínas RAS que quando ativas regulam e estimulam a diferenciação e proliferação celular, além de possuírem um papel importante nas sinalizações com adenosina monofosfato cíclico (AMP-c) e fosfatidilinositol 3 cinase (PI3K) que são efetores centrais nas cascatas de sinalização celular. Na ocorrência de mutações estas cascatas de sinalização não são reguladas por um gene importante no controle do ciclo celular a p16, que age como gene supressor tumoral (HOCKER *et al.*,2008; VIDWANS *et al.*,2011) (figura 19).

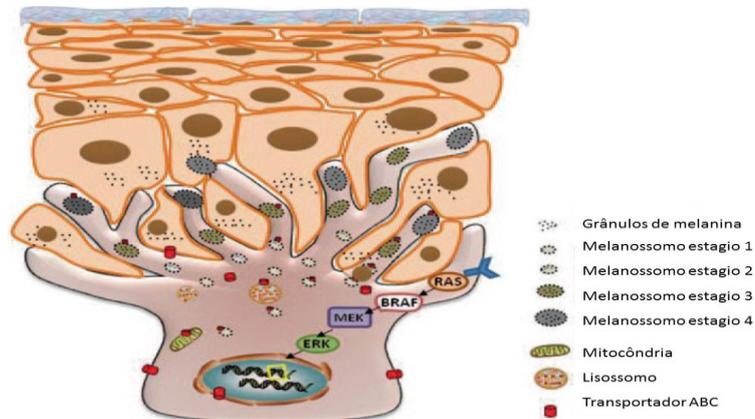


Figura 19: Esquema de ativação genética para a progressão tumoral pela via RAS-BRAF. Fonte: SHARMA, HUANG & HAMBLIN, 2005. Adaptado para português.

5.2.3.1 Prognóstico

O prognóstico do melanoma foi dividido em níveis, considerando: Nível I, toda célula de tumor que está contida pela membrana basal, sendo por definição um melanoma *in situ*; Nível II, quando as células neoplásicas invadem a membrana basal e se estende até a derme papilar, mas não atinge a derme reticular; Nível III, invasão neoplásica na região entre a derme papilar e a derme reticular; Nível IV, extensão das células neoplásicas para a derme reticular; Nível V, invasão das células no tecido subcutâneo (CLARK *et al.*, 1969).

Outro índice que deve ser avaliado no prognóstico desta neoplasia é o índice de Breslow que determina a espessura tumoral, a partir do ponto mais profundo de invasão ao topo da camada granulosa ou à célula mais superficial em caso de ulceração (FERNANDES *et al.*, 2005). Nesta escala uma espessura de 0,75 mm indica uma lesão de Nível II da escala de Clark, (BRESLOW, 1970), entretanto para melhorar a avaliação da espessura tumoral, Büttner e colaboradores (1995), aperfeiçoaram esta leitura e propuseram os intervalos de < 1,0 mm para um bom prognóstico, entre 2 e 4 mm para um prognóstico ruim (figura 20).

Níveis de Clark	I	II	III	IV	V	
Epiderme						> 1 mm
Derme papilar						> 2 mm
Derme reticular						> 3 mm
Hipoderme						> 4 mm
						> 5 mm
						Espessura de Breslow

Figura 20: Progressão do melanoma considerando os níveis de Clark e a espessura de Breslow. Fonte: Canto & Oliveira (2007).

5.2.3.2 Epidemiologia

Em países tropicais, como o Brasil, onde a incidência da radiação solar é alta e contínua ao longo do ano, hábitos culturais de exaltação ao corpo bronzeado, exposição laboral ou não e uso de vestimentas que expõem o corpo à luz solar podem ser pontos-chave nos índices de indivíduos acometidos por melanoma e outros tipos de câncer de pele, destes países, o Brasil já ocupa a 15^a colocação no ranking dos casos de melanoma. Possuindo uma população pouco informada ou desinformada, o aumento do número de casos pode ser inevitável, lembrando que em 1935 era de 1:1500 passando para 1:75 em 2000. Nos EUA os adultos são os mais acometidos por esta neoplasia (ARMSTRONG & HOLMANN, 1987; SOUZA *et al.*, 2004).

A Organização Mundial de Saúde divulgou os dados referentes às mortes por melanoma e outros tipos de câncer de pele e com base nos dados publicados, foi possível observar que os homens (43.798) morreram mais que as mulheres (33.697), no mundo inteiro, estes dados se confirmam em quase todas as regiões do globo, com exceção apenas da região africana onde cerca de 2.701 mulheres e cerca de 2.542 dos homens morreram (OMS, 2011). Nos Estados Unidos da América (EUA) estimou-se que, para 2012, seriam registrados 76.250 novos casos, dos quais 9.180 seriam letais, sendo que a população masculina estimada de sucumbir de melanoma é quase o dobro da feminina, apontando os homens como grupo de maior mortalidade estimada por este tipo de neoplasia maligna neste ano (ACS, 2012). No Brasil em 2009, foram constatados mais de mil e trezentos indivíduos mortos pelo câncer de pele tipo melanoma (INCA, 2011). O Instituto Nacional de Câncer (INCA), em 2012, estimou 6.230 novos casos no Brasil (3.170 em homens e 3.060 em mulheres), na Bahia esta estimativa apontou que 120 indivíduos poderão desenvolver o melanoma. Segundo as estimativas nos anos entre 2013 e 2017 ocorreram cerca 31.000 casos de melanoma no Brasil. Segundo o INCA, em 2018, estima-se 170.000 novos casos de melanoma no mundo e no Brasil serão mais 6.260 novos casos sendo que 150 destes poderão ocorrer na Bahia.

Nos últimos anos houve um aumento de novos casos ou ao menos a detecção da patologia (câncer de pele) na Bahia e no Brasil, entretanto os processos de notificação ineficazes e as subnotificações acabam por camuflar a realidade de algumas patologias no Brasil (INCA, 2011).

5.2.3.3 Tratamento

Os principais protocolos terapêuticos envolvidos no tratamento de melanoma são: procedimentos cirúrgicos; imunoterapia; quimioterapia e radioterapia. A terapia fotodinâmica tem como principal mecanismo de ação a indução de morte celular por estresse oxidativo, este

modelo de terapia já é utilizado para alguns tipos de câncer de pele, contudo ainda não é utilizado em casos de melanoma (DAVIDS & KLEEMANN, 2011).

Basicamente existem três tipos de tratamento para os casos de melanoma: cirurgia; quimioterapia e radioterapia. As escolhas dos protocolos terapêuticos podem variar de acordo com as severidades de cada caso, contudo a utilização de mais de uma metodologia de tratamento é comum (DRABOWSHI *et al.*,2011).

O tratamento cirúrgico é utilizado em fases iniciais da doença, com diagnóstico precoce, podendo ainda ser associado aos outros dois tipos de tratamento. A radioterapia, por sua vez, se utiliza de radiação para destruir as células tumorais, sendo empregada apenas em casos de metástase que afetam o Sistema Nervoso Central (SNC), além disso, este método também apresenta efeitos adversos presentes nos tratamentos quimioterápicos e a possibilidade de queimaduras (BHATIA *et al.*,2009).

A quimioterapia busca a inativação das células cancerosas agindo no citoesqueleto, bloqueando a divisão celular (BHATIA *et al.*,2009). Nos EUA, até 2011, o tratamento quimioterápico deste tipo de câncer de pele era composto por apenas duas terapias: altas doses de Interleucina-2 (IL-2) e Dacarbazina (FINN *et al.*,2012). As altas doses de IL-2 são muito tóxicas para o paciente podendo levar o indivíduo ao uma síndrome de extravasamento vascular (Vascular Leakage Syndrome – VLS) generalizada levando os indivíduos a quadros de edema pulmonar e lesões hepáticas (FINN *et al.*,2012; KRIEG *et al.*,2010; OTTER *et al.*,2008). A Dacarbazina tem uma baixa taxa de resposta (FINN *et al.*,2012) tornando seu uso insatisfatório, em primeira instância e outro obstáculo é o fato deste composto ser mielossupressor, administrado por via intravenosa, causando dor e muitas vezes o paciente não é condescendente. Outro ponto é a absorção irregular, lenta e incompleta do medicamento, um terceiro fator é sua fotossensibilidade e instabilidade, além de ter uma meia-vida curta dificultando seu uso em terapias com combinação de medicamentos (BEI *et al.*,2010). Ambos os medicamentos citados acima não modificam o tempo de sobrevida global do câncer (FINN *et al.*,2012), mas apenas melhoram a qualidade de vida do indivíduo.

Outros medicamentos foram recentemente propostos para o tratamento do melanoma: os inibidores de *BRAF* e bloqueadores de CTLA-4. A mutação no gene *BRAF* está relacionada aproximadamente com 40% a 60% dos casos de melanoma. CTLA-4, são Linfócitos T citotóxicos associados ao antígeno 4, estas células atuam fisiologicamente inibindo a ação das células T, o bloqueio da CTLA-4 removeria as barreiras de ação das células T deixando-as hiperresponsivas as células tumorais, sendo comum no melanoma a presença de infiltrado linfocitário (FINN, *et al.*,2012).