

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**INSTITUTO DE QUÍMICA**

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

**ANCÉLY FERREIRA DOS SANTOS**

**Estudo das vias de sinalização mediadoras**  
**dos efeitos citotóxicos da terapia**  
**fotodinâmica em células de tumores**  
**mamários humanos**

**Versão corrigida da Tese defendida**

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

**05/05/2016**



ANCÉLY FERREIRA DOS SANTOS

**Estudo das vias de sinalização mediadoras dos  
efeitos citotóxicos da terapia fotodinâmica em  
células de tumores mamários humanos**

*Tese apresentada ao Instituto de  
Química da Universidade de São Paulo  
para obtenção do Título de Doutor em  
Ciências (Bioquímica)*

*Orientadora: Profa. Dra. Leticia Labriola*

*Coorientador: Prof. Dr. Maurício da Silva Baptista*

São Paulo

2016

**Ficha Catalográfica**

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e  
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

S237e Santos, Ancély Ferreira dos  
Estudo das vias de sinalização mediadoras dos efeitos citotóxicos da terapia fotodinâmica em células de tumores mamários humanos / Ancély Ferreira dos Santos. -- São Paulo, 2016. 144p.

Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Bioquímica  
Orientador: Labriola, Leticia  
Co-orientador: Baptista, Maurício da Silva

1. Biologia celular 2. Terapia fotodinâmica 3. Neoplasias mamárias I. T. II. Labriola, Leticia, orientador III. Baptista, Maurício da Silva, co-orientador.

574.87 CDD



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE QUÍMICA

---

**“Estudo das vias de sinalização mediadoras dos efeitos citotóxicos da terapia fotodinâmica em células de tumores mamários humanos”**

## **ANCÉLY FERREIRA DOS SANTOS**

Tese de doutorado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutora em Ciências no Programa de Ciências Biológicas (Bioquímica) – Área de Concentração: Bioquímica

Aprovado (a) por:

---

**Profa. Dra. Leticia Labriola  
(Orientadora e Presidente)**

---

**Prof. Dr. Eduardo Morais Rego Reis  
IQ - USP**

---

**Profa. Dra. Sayuri Miyamoto  
IQ - USP**

---

**Profa. Dra. Ana Paula Lepique  
ICB - USP**

---

**Prof. Dr. Hernandes Faustino de Carvalho  
IB - Unicamp**

**São Paulo  
01 de julho de 2016**



***Aos meus pais, exemplos de vida***

***Ao meu irmão, por tudo***



## **Agradecimentos**

À minha orientadora, professora Leticia Labriola, por ter me aceito como parte do seu grupo e assim me dado a oportunidade de aprender a fazer ciência e de uma forma sempre muito agradável. Pelos ensinamentos, pela presença e assistência constante em todos os passos, pelas discussões, pela paciência, por compreender que cada aluno tem seu tempo e pelos inúmeros incentivos, que muito me motivaram e que foram fundamentais nos momentos mais complicados. Terminando essa etapa feliz, com o trabalho e com a orientação.

Ao meu coorientador, professor Maurício da Silva Baptista, por ter me aberto as portas do seu laboratório, pela orientação, pelas discussões muito produtivas ao longo deste trabalho e pelo suporte.

À todas as pessoas do Laboratório de Mecanismos Moleculares de Citoproteção: Sandra Regina, pela amizade, conversas e ajuda na parte técnica; Letícia Terra, pela grande amiga que é, pela paciência em me ensinar (e como ensinou), pela ajuda nos experimentos, pelas discussões tão fundamentais para este trabalho, pelas horas de cafés, horas de desabafos e suporte, que tanto foram importantes; Rosângela, pela grande amizade, pelo carinho, paciência, dedicação, ajuda nos experimentos, pela alegria e paixão em tudo o que faz, que contagia todos em sua volta; Talita, pela amizade, pelas horas de estudo, pela ajuda importante na adaptação à essa cidade louca; Vinícius, pela amizade e pelo tempo de convivência sempre agradável; e aos "calouros" Raquel e Fábio, a quem espero poder contribuir com o conhecimento gerado neste trabalho. Este foi um lugar muito agradável de se trabalhar e aprender. À Tatiana Comporte Stabelini, pela ajuda durante o seu período de iniciação científica, paciência e dedicação em aprender e pelo meu treinamento na arte de ensinar.

À Luciana Rodrigues Gomes, pelos ensinamentos com a técnica de 3D, por todas as dicas e pelo agradável convívio.

Aos professores Flávia Carla Meotti, Alexandre Bruni Cardoso e Walter Terra, pela colaboração, pelos ensinamentos e fundamentais discussões do trabalho e à professora Bettina Malnic por disponibilizar o uso do microscópio de fluorescência, fundamental nas nossas análises de viabilidade.

Aos colegas do Laboratório de Processos Fotoinduzidos.

Aos amigos de pós-graduação que aqui conheci, em especial à Darlene Pena, Juliane Campos e Nayra Fernandes, que foram minhas irmãs aqui em São Paulo. À Marcela Mineiro e André Pimentel, pelas ajudas nos experimentos de GSH e catepsinas e pelo agradável convívio.

Aos professores Flávia Carla Meotti, Daniela Basseres e Guilherme Menegon, pelas discussões produtivas no exame de qualificação.

Aos demais professores e técnicos pelos ensinamentos.

Por último, mas com certeza não menos importante à minha família, minha mãezinha linda Célia, ao meu pai Antônio, meu irmão Clayton, exemplos de pessoas e profissionais, pelo apoio, paciência e suporte não só durante esta fase, mas em toda minha vida, minha cunhada Ruth e ao meu anjinho Dohn, que me fazem muito bem!

Ao Gabriel, pelo carinho, paciência e apoio sempre! Você já é uma pessoa muito importante e que me faz muito bem!

À agência de fomento FAPESP pelo financiamento da pesquisa e bolsa concedida (2012/16785-4).

Às agências de fomento Capes e CNPq, pelo financiamento da pesquisa.

e enfim...*"as dificuldades do caminho não me roubaram a capacidade do encanto..."*

*(Adaptado de Ana Jácomo)*

## RESUMO

ANCÉLY F.S. **Estudo das vias de sinalização mediadoras dos efeitos citotóxicos da terapia fotodinâmica em células de tumores mamários humanos.** 2016. 144p. Tese de doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo.

O câncer de mama apresenta-se como um dos maiores problemas de saúde pública no mundo por ser, entre as mulheres, o primeiro em incidência e o segundo em número de óbitos. Este tipo de câncer apresenta alto grau de recorrência devido a falha no tratamento do tumor primário e o aparecimento de metástases da doença é a principal causa de mortalidade. As estratégias de tratamento nesse estágio não são específicas e comprometem a qualidade de vida das pacientes. A terapia fotodinâmica (PDT) aparece como uma alternativa terapêutica promissora. No entanto, a eficácia da PDT para o tratamento de tumores da mama, bem como os mecanismos que conduzem à morte celular permanecem obscuros. Para este propósito, neste estudo, nos propusemos a investigar mais profundamente os mecanismos moleculares envolvidos na morte celular induzida MB-PDT.

Observou-se que a MB-PDT induz massiva morte celular em células tumorais preferencialmente. As células não-tumorigênicas foram significativamente mais resistentes à terapia em comparação com as células

malignas. Análises morfológicas e bioquímicas das células em processo de morte apontou para mecanismos alternativos à apoptose clássica. A autofagia induzida por MB-PDT resultou em citoproteção ou citotoxicidade, dependendo do modelo de célula utilizado. No entanto, o comprometimento de uma destas vias não impediu o destino fatal das células tratadas com MB-PDT. Ao analisar os mecanismos de necrose regulada, observamos que a necroptose desempenhou um papel importante na morte celular induzida por MB-PDT. Adicionalmente, nossos resultados mostraram uma localização preferencial do MB nos lisossomos, o que nos levou a analisar o comprometimento destas organelas. Nós demonstramos por meio da atividade de catepsinas no citosol das células tratadas com MB-PDT, evidências de que a permeabilização da membrana lisossomal é outro mecanismo de necrose regulada responsável pelos efeitos citotóxicos da MB-PDT.

Além de resistência à morte celular, as células tumorais também desenvolvem mecanismos de evasão do sistema imune. Neste estudo, também demonstramos que a MB-PDT tem o potencial de aumentar o número de células de linfócitos T CD4<sup>+</sup>. Por fim, também mostramos a eficácia da terapia em induzir morte celular seletiva às células tumorais em um modelo que recapitula a morfologia do epitélio glandular.

Em resumo, demonstramos que vários mecanismos de morte celular são ativados por MB-PDT, uma vez que o comprometimento de uma via de morte celular não impediu o destino fatal das células tratadas com MB-PDT. No geral, os resultados obtidos nesta tese apontam a MB-PDT como uma

terapia alternativa e eficaz para o tratamento do câncer de mama, exibindo uma ação de amplo espectro em células com diferentes mecanismos de resistência a vias de morte celular clássica, uma propriedade fundamental para uma terapia contra o câncer.

Finalmente, as nossas observações destacam o potencial de MB-PDT como uma estratégia altamente eficaz para tratar o câncer de mama com segurança e possivelmente outros tipos de tumores.

**Palavras-chave:** câncer de mama, terapia fotodinâmica, azul de metileno

## ABSTRACT

ANCÉLY F.S. **Unveiling the signaling pathways involved in the cytotoxic effects of photodynamic therapy in human breast cancer cells.** 2016. 144p. PhD Thesis - Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo.

Breast cancer is the main cause of mortality among women presenting high recurrence due to primary treatment failure. Photodynamic therapy (PDT) appears as a promising therapeutic alternative. However, the efficacy of PDT to treat breast tumors as well as the mechanisms that lead to tumorigenic cell death remain unclear. For this purpose, in this study, we set out to deeper investigate the molecular mechanisms involved in MB-PDT induced cell death.

We observed that MB-PDT differentially induces massive cell death of tumor cells. Non-malignant cells were significantly more resistant to the therapy compared to malignant cells. Morphological and biochemical analysis of dying cells pointed to alternative mechanisms rather than classical apoptosis. MB-PDT-induced autophagy resulted in either cytoprotection or cytotoxicity depending on the cell model used. However, impairment of one of these pathways did not prevent the fatal destination of MB-PDT treated cells. When analyzing regulated necrosis mechanisms, we observed that necroptosis played an important role in MB-PDT-induced cell death. Additionally, our results have shown preferential lysosomal MB

localization. Furthermore, we have also presented evidences that the lysosome membrane permeabilization is another regulated necrosis mechanism responsible for MB-PDT cytotoxic effects. It is known that in addition to resistance to tumor cell killing therapies, malignant cells develop molecular mechanisms in order to evade the immune system. In this study, we have also been able to show that the MB-PDT has the potential to increase the number of T lymphocytes CD4<sup>+</sup>. Additionally, when using a physiological 3D culture model that recapitulates relevant features of normal and tumor breast tissue morphology, we found that MB-PDT differential action in killing tumor cell was even higher than what was detected in 2D cultures.

In summary, we demonstrated that different cell death mechanisms are being activated upon MB-PDT induction, since impairment of only one cell death pathway did not prevent the fatal destination of MB-PDT treated cells. Overall, our observations point MB-PDT as an alternative and effective therapy for breast cancer treatment, displaying a broad-spectrum action on tumors with different resistance mechanisms to classic cell death pathways, a desired property for improving an anticancer therapy.

Finally, our observations underscore the potential of MB-PDT as a highly efficient strategy to safely treat breast cancer and possibly other types of tumors.

**Keywords:** Breast cancer, photodynamic therapy, methylene blue

## Lista de abreviaturas e siglas

µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromolar
µm	Micrometro
%	porcentagem
°C	graus Celsius
3-MA	3-metiladenina
Ac-DEVD-AMC	<i>Acetyl- L-aspartyl- L-glutamyl- L-valyl- L-aspartic acid α-(4-methyl- coumaryl- 7- amide)</i>
Ac-IETD-AFC	<i>Acetyl-L-isooleucyl-L-glutamyl-L-threoninyl-L-aspartyl- 7-amino-4-trifluoromethylcoumarin</i>
Ac-LEHD-AFC	<i>Acetyl-L-leucyl-L-glutamyl-L-Histidyl-L-aspartyl-7- Amino-4-trifluoromethylcoumarin</i>
ATG	<i>Autophagy Related Gene</i>
Baf	Bafilomicina
BAK	<i>BCL2 homologous antagonist/killer</i>
BAX	<i>BCL2 associated X protein</i>
BCL2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BCLXL	<i>BCL extra large</i>
BECN1	<i>Beclin 1</i>
BH3	<i>BCL2 Homology Domains 3</i>
BID	<i>BH3 interacting domain death agonist</i>
BiP	<i>Binding Immunoglobulin Protein</i>
BP	<i>Band Pass</i>
BRCA	<i>Breast Cancer</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumine</i>
Caspase	<i>Cysteine-dependent aspartate-specific proteases</i>
CD4	<i>Cluster of Differentation 4</i>
CHAPS	<i>3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate</i>
cIAP	cellular IAP
cm <sup>2</sup>	Centímetros quadrados
COX2	<i>cytochrome c oxidase subunit II</i>
CQ	Cloroquina
Ctrl	Controle
DC	<i>Dendritic cell</i>
DIABLO	<i>Direct IAP-Binding Protein with Low pI</i>
DISC	<i>Death-Inducing Signaling Complex</i>
DME	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>

dL	Decilitro
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DTT	Ditiotreitol
ECM	<i>Extracellular Matrix</i>
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EGTA	<i>Ethylene glycol tetraacetic acid</i>
EMT	<i>Epithelial-mesenchymal transition</i>
EPM	Erro Padrão da Média
ER	<i>Estrogen Receptor</i>
FADD	<i>Fas-Associated Death Domain</i>
H	Hora
HEPES	<i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i>
HER2	<i>human epidermal growth factor receptor 2</i>
HIF-1	<i>hypoxia-inducible factor 1</i>
HO	<i>Hoescht</i>
HPLC	<i>High-performance liquid chromatography</i>
HSF-1	<i>Heat shock factor protein 1</i>
IAP	<i>Inhibitor of Apoptosis</i>
IFN	Interferon
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
kDa	quiloDalton
L	Litro
LC3	<i>Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3</i>
LMP	<i>Lisossomal membrane permeabilization</i>
LP	<i>Long Pass</i>
LY	LY294002
mA	Miliampere
MB	<i>Methylene Blue</i>
MB-PDT	<i>Methylene Blue-Photodynamic Therapy</i>
MEM	<i>Eagle's Minimum Essential Medium</i>
MET	<i>Mesenchymal-epithelial transition</i>
Mg	Miligrama
Min	Minuto
mL	Mililitro
MLKL	<i>Mixed Lineage Kinase Domain-like</i>
mM	Milimolar
MOMP	<i>Mitochondrial outer membrane permeabilization</i>
mTOR	<i>Mammalian Target of Rapamycin</i>
Nec-1	Necrostatina 1

NF-kB	<i>Factor Nuclear kappa B</i>
Ng	<i>Nanograma</i>
nM	<i>Nanomolar</i>
NSA	<i>Necrossulfonamida</i>
NSAIDS	<i>Nonsteroidal anti-inflammatory drugs</i>
OPG	<i>osteoprotegerin</i>
PARP	<i>poly (ADP-ribose) polymerase</i>
PBSA	<i>Phosphate buffered saline</i>
PDT	<i>Photodynamic Therapy</i>
PE	<i>Phosphatidylethanolamine</i>
PI	<i>Propidium Iodide</i>
PI3K	<i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i>
PI3KC3	<i>Class III Phosphatidylinositol 3-kinase</i>
PR	<i>Progesterone Receptor</i>
Ps	<i>Photosensitizer</i>
PVDF	<i>Polyvinylidene difluoride</i>
RANK-Fc	<i>receptor activator of NF-kappa B: fragment crystal 2a</i>
RAPA	<i>Rapamicina</i>
RIPK	<i>Receptor Interacting Protein</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
s	<i>Segundo</i>
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SFB	<i>Soro Fetal Bovino</i>
siRNA	<i>short interference RNA</i>
SMAC	<i>Second Mitochondria-derived Activator of Caspase</i>
tBID	<i>truncated BID</i>
TCR	<i>T-Cell Receptor</i>
TGFβ	<i>Transforming growth factor beta</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNBC	<i>Triple Negative Breast Cancer</i>
TNFα	<i>Tumor Necrosis Factor α</i>
TNFR	<i>TNF Receptor</i>
TRADD	<i>TNFR-Associated Death Domain</i>
TRAF2	<i>TNF receptor-associated factor 2</i>
UA	<i>Unidades Arbitrárias</i>
UVA	<i>Ultraviolet A</i>
UVRAG	<i>UV Radiation Resistance Associated</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
WB	<i>Western Blot</i>

## Lista de figuras

Figura 1: Resumo das características adquiridas pelas células tumorais .....	24
Figura 2: Estrutura da glândula mamária.....	27
Figura 3: O processo de metástase, descrevendo as fases e potenciais intervenções terapêuticas. ....	31
Figura 4: Representação esquemática da sinalização apoptótica extrínseca e intrínseca. ....	35
Figura 5: Vias de sinalização a partir de TNFR1. ....	38
Figura 6: Mecanismo de necroptose. ....	39
Figura 7: Representação esquemática do mecanismo de autofagia.....	42
Figura 8: Processos fotossensibilização ilustradas por um diagrama de Jablonski modificado. ....	45
Figura 9: Propagação da luz através dos tecidos e janela terapêutica da PDT. ..	47
Figura 10: Estrutura molecular do azul de metileno (MB).....	49
Figura 11: MB-PDT induz massiva morte em células tumorais e menos efeito nas células "normais" derivadas de epitélio de mama.....	72
Figura 12: A quantidade de MB incorporado entre as diferentes linhagens estudadas é similar até 8 horas de incubação.....	73
Figura 13: A quantidade de MB incorporada nas células gera níveis similares de $^1\text{O}_2$ intracelular. ....	74
Figura 14: Células do tipo TNBC possuem níveis menores de GSH do que as células "normais" derivadas de epitélio de mama. ....	75
Figura 15: MB-PDT induz morte celular em células tumorais de mama sem apresentar toxicidade no escuro. ....	76
Figura 16: O mecanismo de apoptose clássica não é o principal mecanismo envolvido na citotoxicidade induzida por MB-PDT.....	79
Figura 17: Mecanismo de morte celular induzida por MB-PDT é independente da ativação de caspases. ....	81
Figura 18: O mecanismo de apoptose independente de caspases não influencia no destino fatal das células tratadas com MB-PDT. ....	83
Figura 19: A inibição da formação do poro mitocondrial com a participação de BAX torna as células mais sensíveis à MB-PDT. ....	84

Figura 20: MB-PDT não induz apoptose clássica nem mesmo em concentrações baixas de MB em nenhuma das linhagens estudadas. ....	85
Figura 21: MB se localiza nos lisossomos das células MCF-10A, MCF-7 e MDA-MB-231. ....	87
Figura 22: Localização preferencial do MB nos lisossomos das células MCF-10A, MCF-7 e MDA-MB-231. ....	88
Figura 23: O tratamento com MB-PDT induz aumento da acidificação citoplasmática. ....	91
Figura 24: MB-PDT causa aumento da relação LC3-II/LC3-I, indicativo formação de autofagossomos. ....	92
Figura 25: As células "normais" derivadas de epitélio da mama apresentam mecanismo de autofagia mais funcional do que as tumorais. ....	93
Figura 26: A autofagia tem papel citoprotetor nas células MCF-10A e MDA-MB-231. ....	94
Figura 27: A autofagia tem papel citoprotetor nas células MCF-10A e MDA-MB-231, mas não na MCF-7. ....	95
Figura 28: A autofagia tem papel citoprotetor nas células MCF-10A e MDA-MB-231, mas não na MCF-7. ....	96
Figura 29: Necroptose é um mecanismo induzido após MB-PDT. ....	97
Figura 30: MB-PDT induz permeabilização da membrana dos lisossomos. ....	98
Figura 31: Tratamento com MB-PDT induz proliferação de células T-CD4 <sup>+</sup> sendo indicativo do potencial imunogênico da terapia. ....	100
Figura 32: Comparação das morfologias entre células "normais" e tumorais cultivadas em monocamada e esferóides. ....	102
Figura 33: Cultura em esferóides de células derivadas do epitélio mamário aumenta a sensibilidade diferencial entre as células tumorigênicas e "normais". ....	103
Figura 34: Resumo dos efeitos da MB-PDT nas células derivadas do tecido mamário humano. ....	128

## **Lista de Tabelas**

Tabela 1: Identificação dos subtipos de câncer de mama e os diferentes níveis de risco de metástase.....	28
Tabela 2: Fotossensibilizadores com aplicação em testes clínicos reconhecidos mundialmente .....	48

## Sumário

<b>1. Introdução</b> .....	21
<b>1.1. Câncer</b> .....	22
1.1.1. Câncer de mama .....	24
1.1.2. O processo de metástase.....	28
<b>1.2. Mecanismos de morte celular</b> .....	32
1.2.1. Apoptose .....	33
1.2.2. Necrose.....	36
1.2.3. Autofagia.....	40
<b>1.3. Tratamentos para o câncer de mama</b> .....	43
<b>1.4. Terapia Fotodinâmica</b> .....	44
<b>2. Objetivo</b> .....	50
<b>3. Material e Métodos</b> .....	53
3.1. Linhagens celulares e condições de cultura bidimensional .....	53
3.2. Preparo e quantificação da solução de azul de metileno .....	55
3.3. Fotossensibilização e irradiação .....	55
3.4. Tratamento com ativadores ou inibidores de autofagia, apoptose e necroptose .....	56
3.5. Silenciamento de ATG5.....	57
3.6. Viabilidade celular .....	58
3.7. Western Blotting .....	59
3.8. Localização intracelular do MB. ....	61
3.9. Detecção de vesículas ácidas em células vivas.....	62
3.10. Ensaio de atividade de caspases-8, -9 e -3.....	63
3.11. Ensaio de atividade de catepsinas-B/L .....	64
3.12. Detecção da geração de oxigênio singlete intracelular.....	64
3.13. Quantificação de glutathiona reduzida (GSH).....	65
3.14. Isolamento dos esplenócitos murinos .....	67
3.15. Cultivo 3D.....	67
3.16. Análises estatísticas .....	68
<b>4. Resultados</b> .....	69
<b>4.1. MB-PDT induz morte celular massiva em células tumorais de mama, não afetando significativamente as células não tumorais.</b> 70	
<b>4.2. Relevância da apoptose como mecanismo de morte celular acionado por MB-PDT.</b> .....	77
4.1.1. Avaliação do mecanismo de apoptose dependente de caspases. 77	

4.2.2. Avaliação do mecanismo de apoptose independente de caspases .....	82
<b>4.3. A fluorescência do MB é diferencialmente concentrada nos lisossomos das células tumorais e "normal" derivadas de epitélio de mama. ....</b>	<b>86</b>
<b>4.4. Autofagia induzida por MB-PDT resulta em citoproteção nas linhagens MDA-MB-231 e MCF-10A e favorece a morte celular na MCF-7. ....</b>	<b>90</b>
<b>4.5. Análise do papel da necroptose na morte celular induzida após o tratamento com MB-PDT .....</b>	<b>96</b>
<b>4.6. Avaliação de dano lisossomal .....</b>	<b>97</b>
<b>4.7. Avaliação do potencial imunogênico da MB-PDT .....</b>	<b>98</b>
<b>4.8. O cultivo de células em esferoides aumenta a diferença de sensibilidade à MB-PDT entre células tumorais e "normais" .....</b>	<b>100</b>
<b>5. Discussão .....</b>	<b>104</b>
<b>6. Conclusões .....</b>	<b>129</b>
<b>Conclusões .....</b>	<b>130</b>
<b>7. Perspectivas .....</b>	<b>132</b>
<b>8. Referências.....</b>	<b>135</b>
<b>Súmula curricular .....</b>	<b>145</b>
<b>Artigos submetidos.....</b>	<b>150</b>

# **1. Introdução**

### **1.1. Câncer**

Câncer é o nome dado a um conjunto de doenças que envolve uma dinâmica de modificações no genoma de uma célula, levando a um crescimento desordenado. Dividindo-se rapidamente, estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores malignos, que podem espalhar-se para outras regiões do corpo. Se a propagação não for controlada pode resultar em falência do órgão e consequentemente a morte do paciente. (GREAVES; MALEY, 2012). O câncer é causado por fatores externos, tais como o tabagismo, organismos infecciosos e dietas pouco saudáveis, e os fatores internos, tais como mutações genéticas herdadas, alterações hormonais e condições imunes. Esses fatores podem agir em conjunto ou em sequência para causar o câncer. Os tratamentos incluem a cirurgia, radiação, quimioterapia, terapia hormonal, terapia imune e terapia-alvo (medicamentos que, especificamente interferem com o crescimento das células tumorais) (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2015).

Os tumores, uma vez estabelecidos, representam mais do que massas insulares de proliferação de células, eles são tecidos complexos constituídos por vários tipos de células diferentes que participam em interações heterotípicas umas com a outras. Essa complexidade gera desafios consideráveis para a descrição da biologia do câncer e seu tratamento, inspirando estudos nos contextos celular, molecular e fisiológico (MASOUDI-NEJAD; ASGARI, 2015).

Para o desenvolvimento do câncer são necessários um conjunto de modificações moleculares e bioquímicas nas células normais que se resumem a uma instabilidade genômica que afetam os circuitos que regem a proliferação celular normal, com consequências na homeostase tecidual como um todo (BOZIC et al., 2010). Nos diferentes tipos de tumores essas características foram identificadas e classificadas como uma manifestação de oito alterações essenciais na fisiologia da célula que, em conjunto ditam o crescimento maligno. Tais características compreendem: a autossuficiência em sinais de crescimento, a insensibilidade a inibidores de crescimento, a evasão da morte celular programada (apoptose), o potencial replicativo ilimitado, a indução de angiogênese, capacidade de invasão de tecidos e metástases, reprogramação do metabolismo energético e evasão da destruição pelo sistema imune. Estas oito marcas que distinguem células tumorais das normais tornam-se possíveis por duas características finais que permitem que as alterações necessárias para a transformação maligna, que são a instabilidade genômica e o quadro de inflamação crônica (**Figura 1**) (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Os desafios para combater o câncer residem, portanto nessas propriedades intrínsecas ao tumor (KREUZALER; WATSON, 2012).

## Introdução



**Figura 1: Resumo das características adquiridas pelas células tumorais.** Embora por diferentes mecanismos, os diferentes tipos de câncer apresentam o mesmo conjunto de capacidades funcionais durante o seu desenvolvimento. Adaptado de HANAHAN & WEINBERG, 2011.

### 1.1.1. Câncer de mama

O câncer de mama, depois do de pele não melanoma, é o tipo de câncer mais comum entre as mulheres no mundo e no Brasil. Cerca de 1,67 milhões de casos novos dessa neoplasia foram esperados para o ano de 2012 em todo o mundo, o que representa 25% de todos os tipos de câncer diagnosticados nas mulheres. No Brasil, segundo dados do Instituto Nacional do Câncer, esperavam-se 57.960 novos casos de câncer da mama para o ano de 2016, com um risco estimado de mais de 56 casos a cada 100 mil mulheres. (INCA, 2016).

Esta é uma doença multifatorial e existe suficiente informação epidemiológica que sustenta a associação de vários fatores com o risco de seu desenvolvimento. A idade, assim como em vários outros tipos de

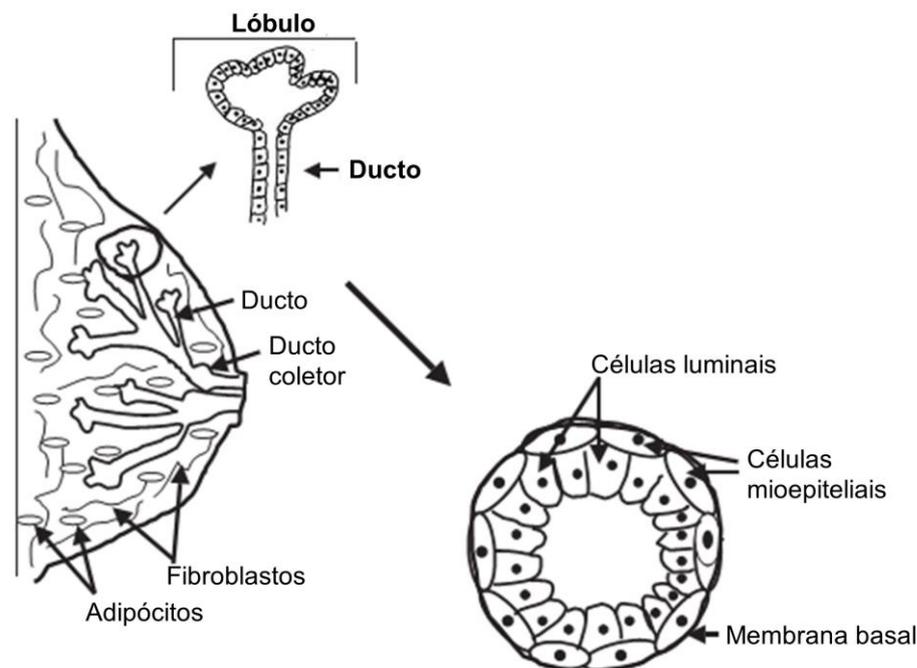
câncer, é um dos principais fatores que aumentam o risco de se desenvolver o câncer de mama. As taxas de incidência aumentam rapidamente até os 50 anos e, posteriormente, esse aumento ocorre de forma mais lenta. Contudo, outros fatores de risco já estão bem estabelecidos, como, por exemplo, os fatores genéticos, hormonais e aqueles relacionados à vida reprodutiva da mulher (CANCER; ATLAS, 2012). Os fatores genéticos ou hereditários estão relacionados à presença de mutações em determinados genes transmitidos, especialmente BRCA1 e BRCA2 (*Breast cancer 1 e 2*, respectivamente). Mulheres com histórico de casos de câncer em familiares consanguíneos, sobretudo em idade jovem, de câncer de ovário ou de câncer de mama, podem ter predisposição genética e são consideradas de risco elevado para a doença. Além desses também são considerados fatores de risco, a o sedentarismo, obesidade, alcoolismo e fatores ambientais como a exposição à radiação ionizante, particularmente durante a puberdade, segundo mostram alguns estudos (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2015).

Além de ser o mais frequente, o câncer de mama é também a maior causa de morte por câncer nas mulheres em todo o mundo, com cerca de 520 mil mortes estimadas por ano (INCA 2016). É a segunda causa de morte por câncer nos países desenvolvidos, atrás somente do câncer de pulmão, e a maior causa de morte por câncer nos países em desenvolvimento. Os tumores de mama, quando diagnosticados e tratados quando ainda permanecem confinados no tecido mamário, apresentam elevadas taxas de cura, porém, após sua extensão e colonização de sítios

## Introdução

secundários as taxas de sobrevida decaem significativamente. Sendo assim, o desenvolvimento de metástase apresenta-se como o principal fator associado à morte de pacientes com esse tipo de tumor (AHMAD, 2013).

O tumor mamário mais detectado entre as mulheres é o carcinoma originado do epitélio dos lóbulos e ductos da glândula mamária (DIMRI; BAND; BAND, 2005) (**Figura 2**). Clinicamente, este tipo de câncer pode se apresentar de três formas distintas de carcinoma: carcinoma *in situ*, no qual o tumor permanece confinado ao tecido mamário; carcinoma invasivo, no qual as células tumorais podem atravessar os limites teciduais; e carcinoma metastático, no qual as células tumorais migram para órgãos distantes (BACAC; STAMENKOVIC, 2008). A taxa de sobrevivência de 5 anos para o tumor primário é de 99%. No entanto, cerca de um terço do total de pacientes com câncer apresenta metástases distantes, e a taxa de sobrevida em 5 anos nestes casos diminui para 23% (MA et al., 2015).



**Figura 2: Estrutura da glândula mamária.** A glândula mamária é composta por uma rede de ductos e lóbulos envoltos pelo estroma. As células das extremidades dos lóbulos e ductos são a origem da maioria dos tumores de mama. O estroma é composto de tecido adiposo (adipócitos) e fibroblastos. São também mostrados os dois tipos principais de células em condições normais nos dutos: a mioepiteliais e células luminais. Adaptado de DIMRI et al, 2005.

Os fatores preditivos e prognósticos moleculares tradicionais para os estágios iniciais do câncer de mama incluem o padrão de receptores hormonais e do fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2). Sendo assim, o câncer de mama é tradicionalmente subdividido em: positivos para receptores de hormônios estrógeno (ER) ou progesterona (PR), positivos para HER2 e os triplo negativos (TNBC: *Triple Negative Breast Cancer*), que não expressam ER, PR ou HER2. Essas características são parte essencial da avaliação diagnóstica e orientação nas intervenções terapêuticas (RAKHA; ELLIS, 2011). Uma subdivisão levando em consideração as recentes classificações moleculares e os diferentes níveis de risco de recorrência estão resumidos na **Tabela 1** (ECKHARDT et al., 2012).

**Tabela 1:** Identificação dos subtipos de câncer de mama e os diferentes níveis de risco de metástase

<b>Subtipo</b>	<b>Classificação</b>	<b>Risco de recorrência</b>
Luminal A	ER+/PR+/HER2-/baixa proliferação	Baixo
Luminal B	ER+/HER2-/alta proliferação ER+/HER2+	Intermediário
TNBC (tipo basal)	ER-/PR-/HER2-	Alto
HER2	ER-/PR-/HER2+	Alto
<i>Claudin-low</i>	ER-/PR-/HER2- baixa expressão de proteínas de junção (claudinas e E-caderinas)	Alto
Tipo normal		Baixo
Regulado por IFN		Intermediário

(Adaptado de ECKHARDT et al, 2012)

### 1.1.2. O processo de metástase

A metástase é um processo complexo de múltiplos passos que consiste de uma série de interações dinâmicas entre as células tumorais e as células hospedeiras que permitem que as células tumorais sejam capazes de deixar o local primário e estabelecer uma lesão distante (ECKHARDT et al., 2012). Um resumo do mecanismo está apresentado na **Figura 3**. Uma vez iniciado, o crescimento de um tumor é comparável a uma ferida crônica com perturbação da homeostase local, levando a acidose, hipóxia e alteração da pressão sistêmica dos tecidos. Em uma tentativa de compensação, o organismo ativa mecanismos de reparação, incluindo vascularização, favorecendo a neoplasia com o fornecimento de nutrientes, remoção de resíduos e uma rota de fuga para as células propensas à metástase (LIU; SEMENZA; ZHANG, 2015). Simultaneamente, inicia-se

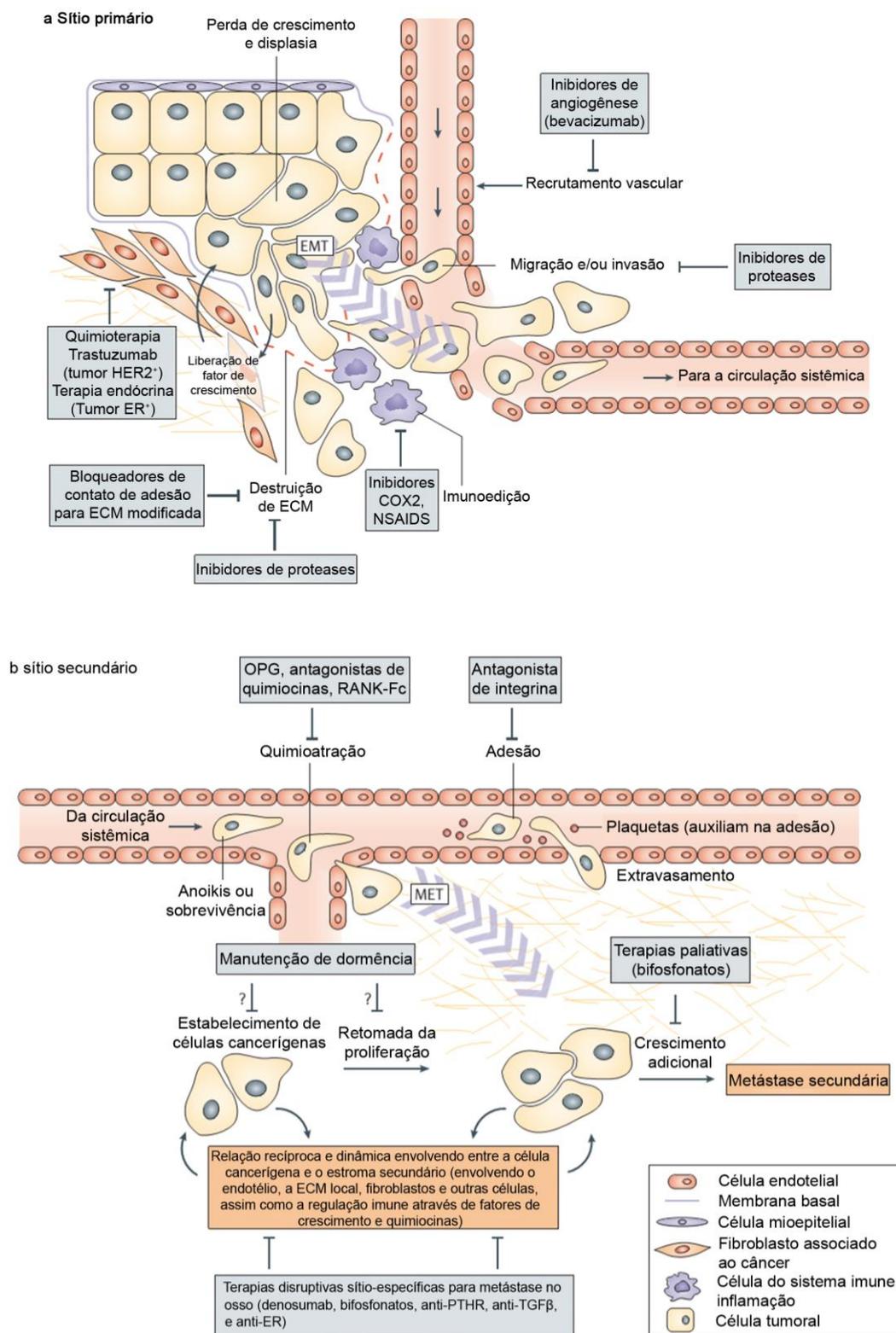
uma resposta inflamatória que mobiliza as células derivadas da medula óssea e outros leucócitos ao local primário. É então estabelecido um microambiente reativo, criado artificialmente, no qual encontra-se uma mistura de células e fatores como fatores de crescimento e citocinas, onde são depositadas proteínas da matriz extracelular (ECM) (MA et al., 2015). O processo de inflamação neste ambiente tumoral não é bem resolvido, e como consequência temos a estimulação contínua de células imunoreguladoras que amortecem a resposta imune antitumoral (ECKHARDT et al., 2012).

A remodelação de proteínas da ECM dentro do espaço intersticial é uma característica de cânceres altamente invasivos. A ativação de proteases e enzimas oxidorreduzidas, entre outras, altera a topologia da ECM e ajuda na invasão de células tumorais através da liberação de peptídeos pró-migratórios. A ligação desses peptídeos a receptores de adesão de células tumorais ativa vias de sinalização intracelular que induzem a invasão por meio do estroma, vasos linfáticos ou pela corrente sanguínea (KOBILINSKI; AHRAM; SLOANE, 2000). Uma vez em circulação, a célula tumoral pode resistir ao estresse físico causado pela perda de aderência e pela turbulência vascular, formando agregados com plaquetas, o que também aumenta a sua sensibilidade a quimiocinas. Através da combinação de obstrução física, contatos de adesão e gradientes quimioatraentes, os agregados do tumor são atraídos e ficam presos em capilares do sítio secundário (MASON; JOYCE, 2011). A partir deste evento, as células tumorais podem tanto crescer como uma metástase intravascular

## Introdução

(um tumor metastático que se inicia na vasculatura dentro de um tecido secundário) ou podem reativar a cascata proteolítica e os mecanismos de migração para extravasar para o tecido secundário (ECKHARDT et al., 2012; CHAN et al., 2015). Tem sido relatado que os subtipos principais de câncer de mama têm diferentes habilidades para metástase em órgãos distantes. Os pacientes com recidivas ósseas apresentam com mais frequência os subtipos luminal A ou B. O HER2 também pode gerar metástase no osso através de processos que diferem dos subtipos luminais. Já o subtipo triplo negativo preferencialmente causa metástase no cérebro e nos pulmões (MA et al., 2015).

Essas células circulantes podem ainda adquirir um estado de dormência e existir como células individuais, paradas nas fases G0 ou G1 do ciclo celular, ou podem estar em divisão ativa, mas o tamanho da colônia é limitado pela falta de angiogênese ou pela imunovigilância. O câncer de mama metastático é difícil de tratar, porque, uma vez que as células tumorais se tornam circulantes elas são relativamente indetectáveis e podem permanecer dormentes por muitos anos depois da remoção do tumor primário (CHAN et al., 2015).



**Figura 3: O processo de metástase, descrevendo as fases e potenciais intervenções terapêuticas.** Adaptado de ECKHARDT et al, 2012.

### **1.2. Mecanismos de morte celular**

A morte celular é um processo que é essencial não só ao normal desenvolvimento fisiológico e homeostase do tecido, mas também como um mecanismo de defesa contra diversas formas de doenças. Por isso, não é surpreendente que os defeitos em vias de sinalização que medeiam a morte celular possam resultar em doenças hiperproliferativas, tais como o câncer. A morte celular programada é um mecanismo de supressão de tumor que é acionado em células normais, como um mecanismo de defesa para remover células saudáveis danificadas (LONG; RYAN, 2012).

Durante o desenvolvimento do tumor ocorre uma sequência de exposições a mecanismos de morte que acaba gerando um subconjunto de células defeituosas que transportam aberrações genéticas e desenvolvem meios para inativar ou desacoplar vias de morte celular e evadir à sua erradicação (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Da mesma forma, por acúmulo de desregulações epigenéticas, as células tumorais adquirem resistência à quimioterapia e continuam a progredir de forma agressiva (BOZIC et al., 2010). Como os problemas de mau prognóstico e resistência são prevalentes entre pacientes com câncer, a necessidade de novas estratégias para eliminar esse tipo de células é fundamental. Para este fim é preciso uma maior compreensão das principais vias e componentes que controlam a morte celular. Um melhor entendimento da biologia da morte celular no contexto do câncer ajudará a concepção de terapias que possam ser mais eficazes (LONG; RYAN, 2012).

Diferentes tipos de morte celular são definidos por critérios morfológicos, tais como apoptose, necrose e autofagia. Adicionalmente a morte celular pode ser definida baseando-se em critérios bioquímicos, que consideram o envolvimento de diferentes proteases (como por exemplo caspases e catepsinas) e nucleases. Também pode-se definir morte celular como sendo de caráter imunogênico ou não (GALLUZZI et al., 2012).

### *1.2.1. Apoptose*

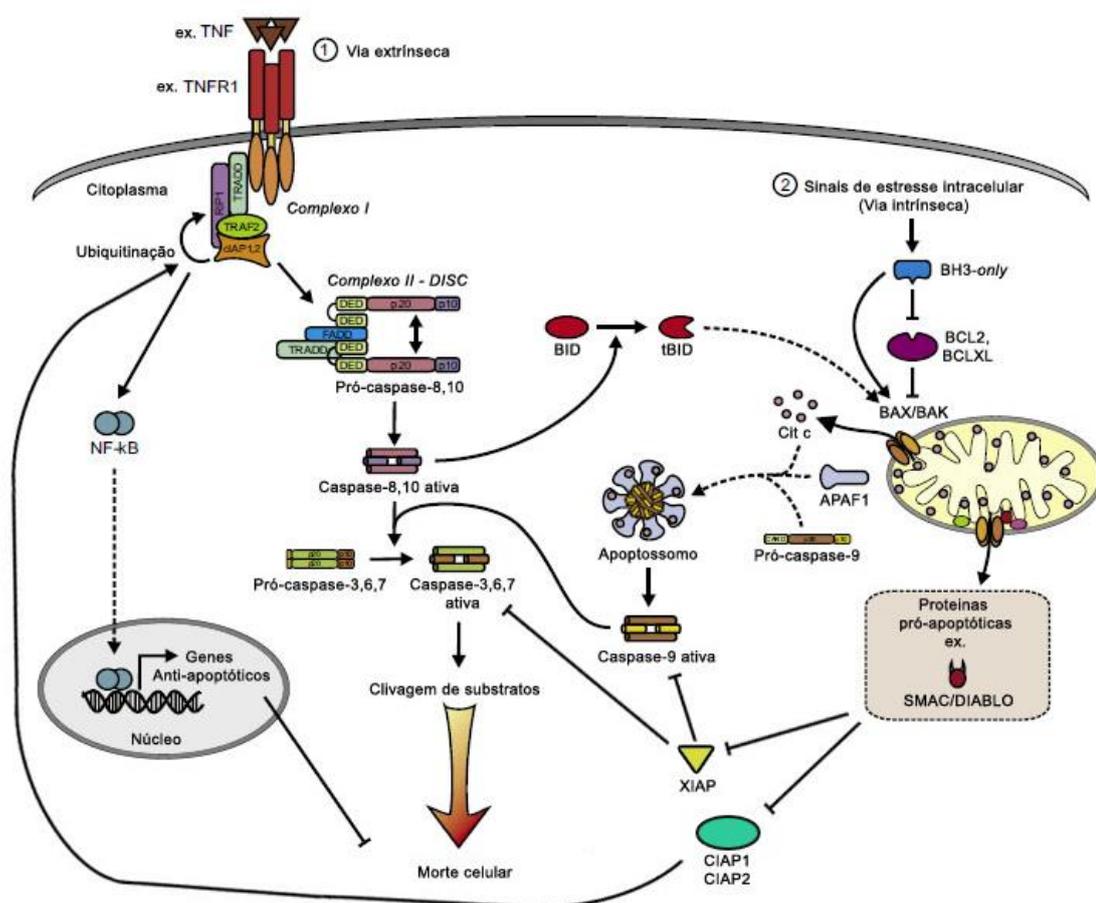
A apoptose é a mais conhecida forma de morte celular programada. Caracteriza-se por um processo fisiológico que envolve uma série de perturbações na arquitetura da célula e contribui não somente para a morte celular, mas também prepara as células para serem reconhecidas e removidas por fagócitos, prevenindo respostas imunes não desejadas (VANDENABEELE et al., 2010). O processo de apoptose pode ser ativado extrinsecamente, através de ligação de moléculas indutoras em receptores de morte extracelulares, ou intrinsecamente, pela liberação de proteínas pro-apoptóticas da mitocôndria. É um mecanismo que envolve duas famílias de proteínas conservadas evolutivamente: a família de proteínas *B-cell lymphoma 2* (BCL2), que regulam o processo; e a família das caspases, que são as efetoras da apoptose. São conhecidas catorze caspases humanas, sendo que seis participam da apoptose (caspases -3, -6, -7, -8, -9 e -10) (DUPREZ et al., 2009).

## Introdução

Uma célula morrendo por apoptose apresenta as seguintes características morfológicas: encolhimento celular, condensação e fragmentação nuclear e finalmente formação de bolhas de membrana, separando os componentes celulares nos chamados corpos apoptóticos (KERR; WYLLIE; CURRIE, 1972). A apoptose ocorre através de dois mecanismos clássicos: a via intrínseca, em que o sinal para a morte surge de dentro da célula e a via extrínseca, que envolve a ativação de receptores de morte na superfície celular. Ambos eventualmente convergem na ativação de caspases (**Figura 4**) (FULDA; DEBATIN, 2006; DUPREZ et al., 2009; GALLUZZI et al., 2012).

A ligação em receptores de morte promove a formação de trímeros do receptor e agrupamento de domínios de morte citoplasmático, que recruta diferentes moléculas adaptadoras para formar o complexo de sinalização indutor de morte (DISC). A este complexo são recrutados o domínio de morte associado a FAS (FADD), pró-caspase-8 e moléculas adicionais, tais como o domínio de morte associado a TNFR (TRADD) e o fator associado TNFR-2 (TRAF2). A clivagem e ativação de pró-caspase-8 transmite o sinal de morte por indução da permeabilização da membrana externa da mitocôndria (MOMP) ou por uma cascata das caspases efetoras 3, -6 e/ou -7. A via apoptótica intrínseca pode ser desencadeada por vários estímulos intracelulares, incluindo danos no DNA, falta de fatores de crescimento e estresse oxidativo. Estes eventos irão estimular a MOMP, promovendo o extravasamento de proteínas mitocondriais que desencadeiam a maquinaria da apoptose. A MOMP é um processo

estritamente regulado, governada por interações complexas entre proteínas pró e anti-apoptóticas, membros da família BCL2. Os efetores pró-apoptóticos contêm domínios BH1–BH3, como BAX (*BCL2-associated X protein*) e BAK (*Bcl-2 homologous antagonist/killer*), que executam diretamente o processo de MOMP, já os membros anti-apoptóticos, como BCL2 e BCL-XL (*Bcl-2-associated X protein*), se ligam e inibem BAK e BAX.



**Figura 4: Representação esquemática da sinalização apoptótica extrínseca e intrínseca.**

Pela estimulação de TNF inicia-se a via extrínseca da apoptose (1). O complexo I é formado, resultando na ativação de NF- $\kappa$ B e subsequente transcrição de genes anti-apoptóticos. Após endocitose de TNFR1, forma-se o complexo II, para o qual a caspase-8 é recrutada e ativada. A subsequente ativação das caspases efetoras conduz à clivagem dos seus substratos e à morte celular. A via intrínseca da apoptose (2) é ativada por sinais de estresse intracelulares. A ativação de BAX e BAK induz a liberação de vários mediadores de apoptose mitocondrial, dentre eles o citocromo c (cit c) e outras proteínas pró-apoptóticas, como as SMACs, que antagonizam os efeitos de inibidores da apoptose (IAPs – XIAP e cIAP1 e 2). A formação subsequente do apoptossomo ativa a caspase-9. Além disso, a caspase-8 pode mediar a clivagem de BID e amplificar a via extrínseca através da ativação da via mitocondrial. Adaptado de DUPREZ et al, 2009.

## Introdução

### 1.2.2. *Necrose*

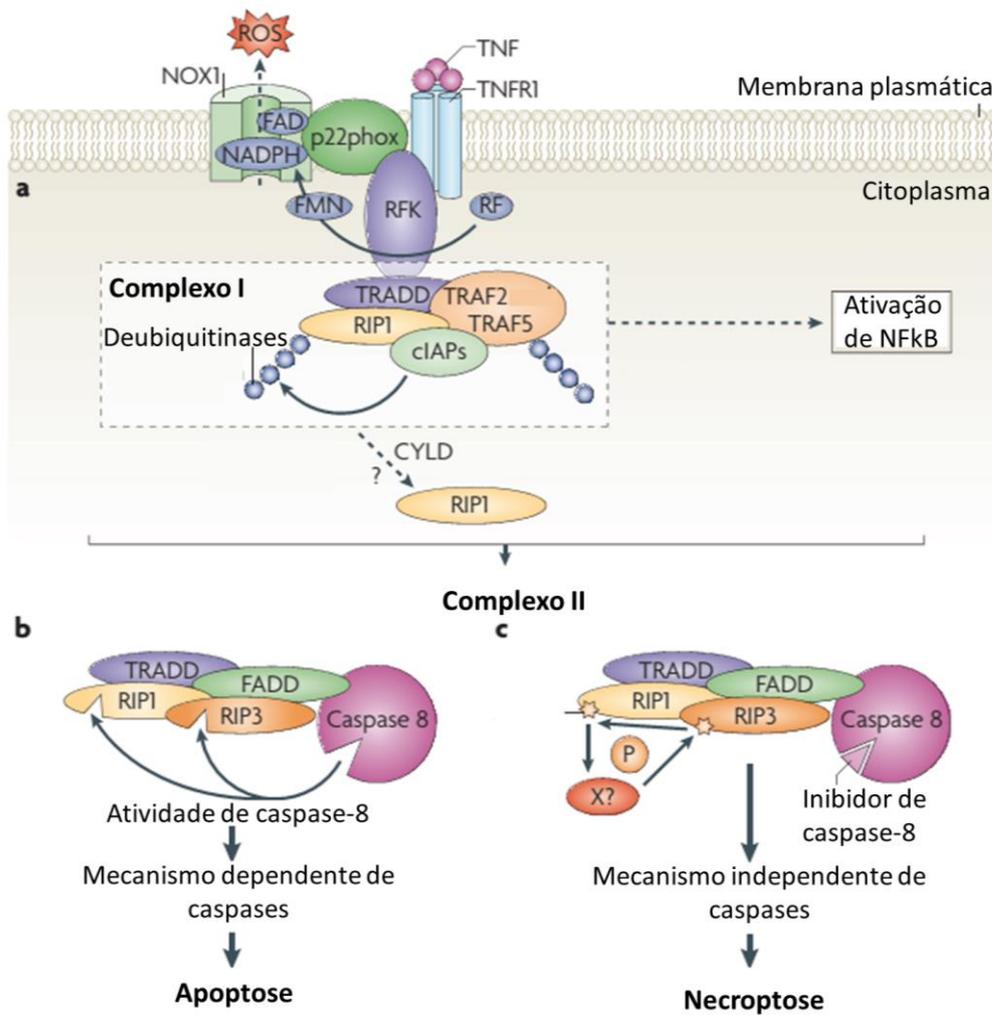
Outros mecanismos de morte independente de caspases estão sendo cada vez mais observados sob diferentes circunstâncias, como as mortes celulares por necroptose e autofagia. A necrose é um tipo de morte na qual as células sofrem aumento de volume, agregação da cromatina, desorganização do citoplasma, perda da integridade da membrana plasmática e consequente ruptura celular, causando danos às células vizinhas e disparando uma reação inflamatória (FESTJENS; VANDEN BERGHE; VANDENABEELE, 2006).

Embora o fator de necrose tumoral (TNF) seja responsável pela indução de morte por necrose, este mecanismo tem sido estudado desde o final dos anos 1980 e um interesse sobre o mecanismo de necrose regulada surgiu com a descoberta dos receptores do tipo serina/treonina cinases (RIPK1 e RIPK3) (HITOMI et al., 2008; ZHANG et al., 2009). Desde então, uma variedade de efetores da necroptose foram identificados. Esta revelação molecular de que a necrose pode ser um mecanismo regulado, levou ao termo necroptose, ao referir-se a necrose regulada que é dependente da atividade de RIPK1 e / ou RIPK3. O inibidor Necrostatina 1 (Nec-1) foi identificado como um potente inibidor de necroptose devido a sua capacidade para bloquear a atividade de cinase de RIPK1 (VANDENABEELE et al., 2010).

A indução da necroptose pode ser exemplificada pela via de sinalização de TNF. Após a estimulação de TNFR1 (receptor de TNF 1) pelo TNF, um complexo é formado contendo RIPK1 e TRADD, o que é

fundamental para a ativação de NF- $\kappa$ B (fator nuclear  $\kappa$ B) e regulação positiva de genes anti-apoptóticos (TING; PIMENTEL-MUIFFIOS, 1996). Porém pode ocorrer o recrutamento de deubiquitinases que removem a cadeia de poliubiquitinas de RIPK1, resultando na dissociação de RIPK1 de TNFR1 e formação de um complexo (complexo I) (BERTRAND et al., 2008). TNFR1 é então internalizado, levando a uma mudança na composição molecular de seus ligantes para a formação de um complexo citosólico (DISC), melhor conhecido como complexo II, ao qual são recrutadas a caspase-8 e RIPK3. Neste ponto, o consequente estado de ativação da caspase-8 ou das cinases RIPK1 e RIPK3 vai determinar se ocorrerá apoptose ou necrose, respectivamente (**Figura 5**) (VANDENABEELE et al., 2010) .

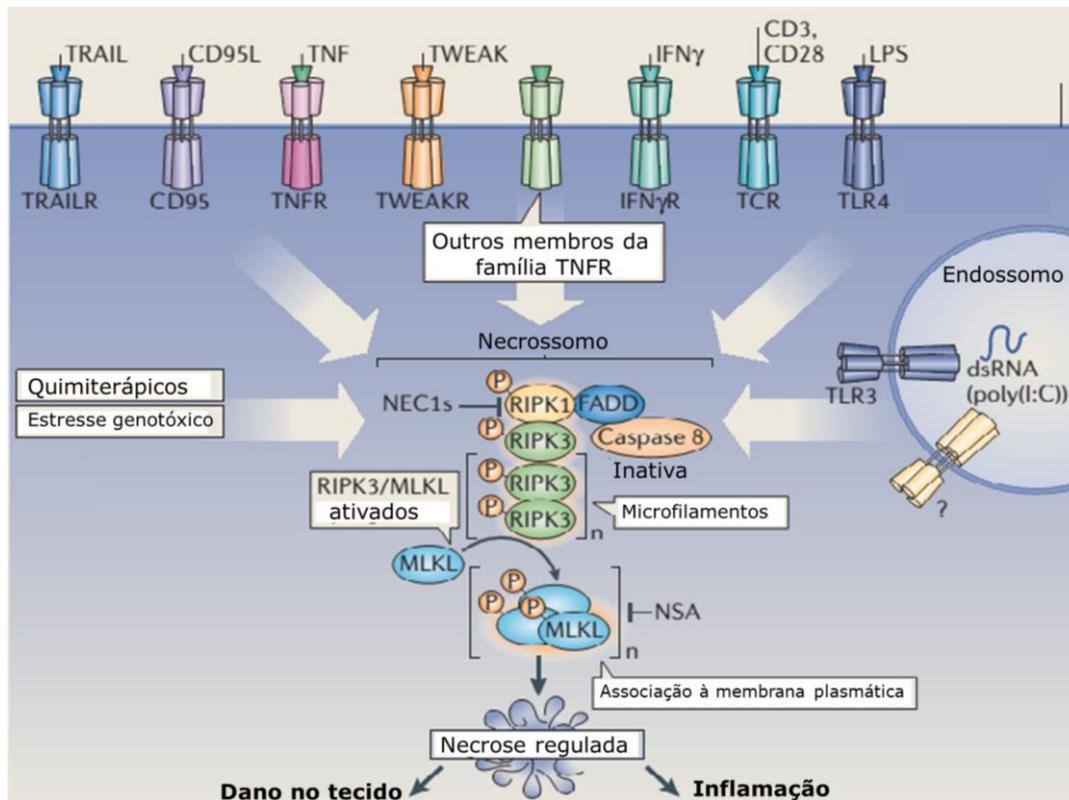
## Introdução



**Figura 5: Vias de sinalização a partir de TNFR1.** (a) A ativação de TNFR promove a formação de um complexo associado à membrana (Complexo I). Neste ponto ocorre o recrutamento de ligantes como TRADD, TRAF, RIPK1 (RIP1) e de inibidores da apoptose (cIAPs), que podem promover a ubiquitinação de RIPK1. Este complexo pode levar à ativação de NFKB e estimular vias de sobrevivência. A ubiquitinação de RIPK1 promove a dissociação desta e formação do complexo citosólico II, ao qual podem ser recrutados FADD, RIPK3 e caspase-8. (b) Uma vez ativada, a caspase-8 inativa as cinases RIPK culminando em apoptose. (c) Se caspase-8 encontra-se inibida, ocorre a autofosforilação de RIPK1 e RIPK3 e ativação do mecanismo independente de caspases. Adaptado de VANDENABEELE et al, 2010.

Com a caspase 8 inibida RIPK1 e RIPK3 associados se autofosforilam, e agregam-se em complexos formando microfilamentos, que são chamados de necrossomos (GREEN et al., 2011). A fosforilação de RIPK3 é essencial para recrutar a proteína MLKL (*mixed lineage kinase domain-like*). MLKL é subsequentemente fosforilada por RIPK3. Isto resulta em ativação

de JNK, produção de ROS e a indução de necroptose (**Figura 6**) (BERGHE; LINKERMANN; JOUAN-LANHOUE, 2014).



**Figura 6: Mecanismo de necroptose.** Vários estímulos podem ativar a necroptose: ligação a receptores como TNFR, CD95L (também conhecido como FASL), TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*), TWEAK (*TNF-related weak inducer of apoptosis*), estresse genotóxico, estimulação policlonal de TCR (receptor de células T), ativação mediada por vírus de e fármacos anti-cancerígenos. Após estimulação de TNFR1, TRADD, RIPK1, os inibidores de apoptose (cIAP1 e cIAP2), que deubiquitinam RIPK1 e, estando a caspase-8 inibida, tem início a autofosforilação de RIPK1 e RIPK3 e recrutamento e fosforilação de MLKL. Necrostatina 1 (NEC1) inibe a atividade de cinase de RIPK1 e a necrossulfonamida (NSA) inibe MLKL. Adaptado de BERGHE et al, 2014.

O painel de morte celular regulada não-apoptótica tem se expandido. Além da necroptose, para a qual já são melhor descritos os mecanismos, temos também outros eventos como a morte por permeabilização da membrana do lisossomo (LMP), partanatos, a oxitose, ferroptose, etose, netose, pironecrose e piroptose. Para todos esses já foi caracterizado pelo menos um aspecto particular no processo de morte celular. No que diz

## Introdução

respeito às características morfológicas da necrose, múltiplas formas podem compartilhar as mesmas características, sendo necessário o exame das vias de sinalização subjacentes comuns ou distintas para melhor descrever o tipo de morte que está sendo desencadeado (BERGHE; LINKERMANN; JOUAN-LANHOUE, 2014).

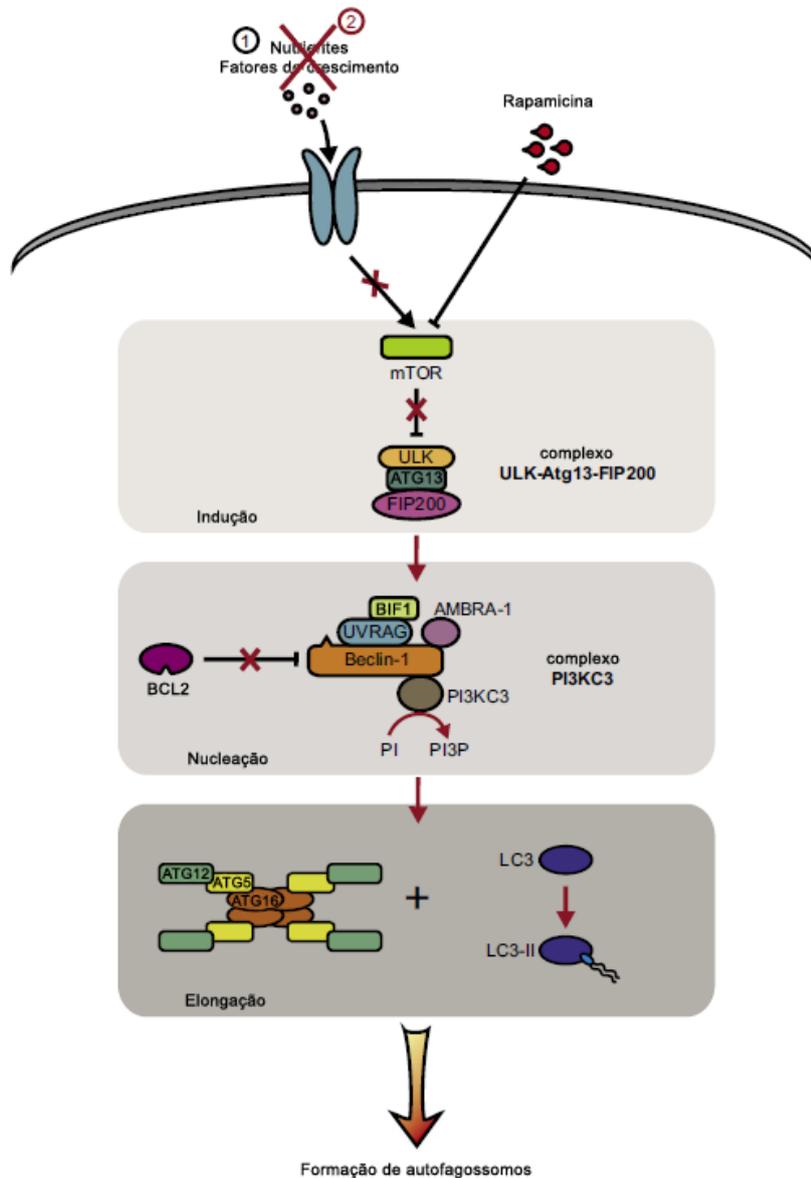
### *1.2.3. Autofagia*

A autofagia é um processo adaptativo conservado evolutivamente e que permite aos eucariotos degradar e reciclar componentes celulares. Apesar de níveis basais de autofagia contribuírem para a homeostase intracelular, esse processo tem sido apontado também como sendo um mecanismo de morte celular (DUPREZ et al., 2009). Esta via é altamente regulada e fundamental para a manutenção da homeostase tecidual e proliferação celular, onde ajuda a manter o balanço favorável da relação de síntese, degradação e reciclagem de componentes celulares. Porém, além do papel fisiológico, é sugerido que a desregulação da maquinaria autofágica é responsável por uma variedade de doenças, principalmente as relacionadas com o aumento de estresse celular, incluindo o câncer (LONG; RYAN, 2012). A manifestação de características da autofagia em células em processo de morte, como o aumento de vesículas ácidas e características distintas da apoptose, levaram os cientistas a sugerirem um papel de promoção da morte por esta via e este papel tem sido tema de debates (DUPREZ et al., 2009; LIU; LEVINE, 2014).

A sinalização clássica da autofagia envolve a inativação da proteína cinase mTOR (*mammalian target of rapamycin*) e pode ser ativada por privação de nutrientes (**Figura 7**). A via é regulada por um subconjunto de genes chamados genes relacionados com a autofagia (Atg). A inibição de mTOR permite a formação do complexo ULK-ATG13-FIP200, iniciando a autofagia pela formação de uma vesícula isolada com uma dupla membrana, denominado de autofagossomo (LAPLANTE; SABATINI, 2012). A nucleação dessas vesículas é realizada pela formação do complexo da fosfatidilinositol cinase-3 de classe III (PI3KC3), no qual a proteína beclina-1 (BECN1), também conhecida como ATG6, serve de arcabouço para o recrutamento de outros membros (KONDO et al., 2005). No processo de alongação, outras proteínas ATG são recrutadas e é formado o complexo ATG12-ATG5-ATG16. Várias proteínas envolvidas na montagem dos autofagossomos têm sido identificadas e caracterizadas funcionalmente (MIZUSHIMA et al., 2003). Durante a formação do autofagossomos, uma proteína citoplasmática, a LC3 (*Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3*, ou ATG8 [proteína relacionada com autofagia 8]), denominada LC3-I neste contexto, sofre clivagem e lipidação, resultando na formação de uma LC3 associada a uma molécula de fosfoetanolamina (PE), sendo então denominada como LC3-II (TANIDA; UENO; KOMINAMI, 2008). A acumulação de LC3-II nos autofagossomos é utilizado como marcador do processo de autofagia. Em alguns casos, os componentes celulares danificados são entregues aos autofagossomos por proteínas adaptadoras específicas que interagem com LC3-II, tais como a p62 (KOMATSU;

## Introdução

KAGEYAMA; ICHIMURA, 2012). Posteriormente os autofagossomos se fundem aos lisossomos, formando autolisossomos, onde os conteúdos são degradados por hidrolases lisossomais (catepsinas) (LONG; RYAN, 2012).



**Figura 7: Representação esquemática do mecanismo de autofagia.** Na presença de nutrientes e fatores de crescimento (1) mTOR é ativado, o que leva à inibição da autofagia. Diante da privação de nutriente ou fator de crescimento (2), ou o tratamento com rapamicina, mTOR é inibido e ativa-se a formação do complexo ULK-Atg13-FIP200, o que induz a formação do autofagossomo. O primeiro passo é a nucleação da vesícula, o que exige a montagem do complexo PI3KC3. A geração subsequente de PI3P leva ao recrutamento de outras proteínas ATG e alongamento membrana da vesícula. Durante este processo, um complexo Atg12-Atg5-Atg16 é formado e LC3 é conjugada a PE (LC3-II). Bcl-2 é capaz de inibir a autofagia através da ligação direta na beclina-1. Adaptado de DUPREZ et al, 2009.

### 1.3. Tratamentos para o câncer de mama

Para o tratamento do câncer de mama existem vários procedimentos médicos como cirurgia, quimioterapia, terapia hormonal e radioterapia, ou uma combinação desses. As estratégias são direcionadas para diferentes fases do crescimento e progressão do tumor. Os tratamentos atuais são baseados na ressecção do tumor, para o controle local, e aplicação de quimioterapia sistêmica, terapia endócrina ou terapias direcionadas (dependendo da presença de ER, PR ou HER2), tais como o Herceptin, que é um anticorpo contra o receptor HER2, e a radiação, como terapia paliativa (MA et al., 2015). As terapias de largo espectro de ação (por exemplo, quimioterapia) são projetados para evitar que o tumor retorne, matando de forma ativa as células em divisão, e são a única opção de tratamento sistêmico atualmente disponível para o subtipo triplo negativo (ECKHARDT et al., 2012).

Os compostos que têm como alvo ER e HER2 estão entre as terapias mais bem-sucedidas (RAKHA; ELLIS, 2011). Alvos potenciais para a terapias direcionadas são mostrados na **Figura 3**. Outras terapias estão em desenvolvimento. Algumas como o bevacizumab (que se liga aos fatores de crescimento endotelial vascular, VEGF) já estão em uso clínico e outras como o denosumab (Prolia / Xgeva; Amgen) (que se liga ao receptor do ativador do ligante NF-κB) encontram-se nos primeiros ensaios clínicos. A inibição de poli (ADP-ribose) polimerase (PARP) tem demonstrado eficácia em alguns pacientes com mutações em BRCA1 ou BRCA2. Contudo, em

## Introdução

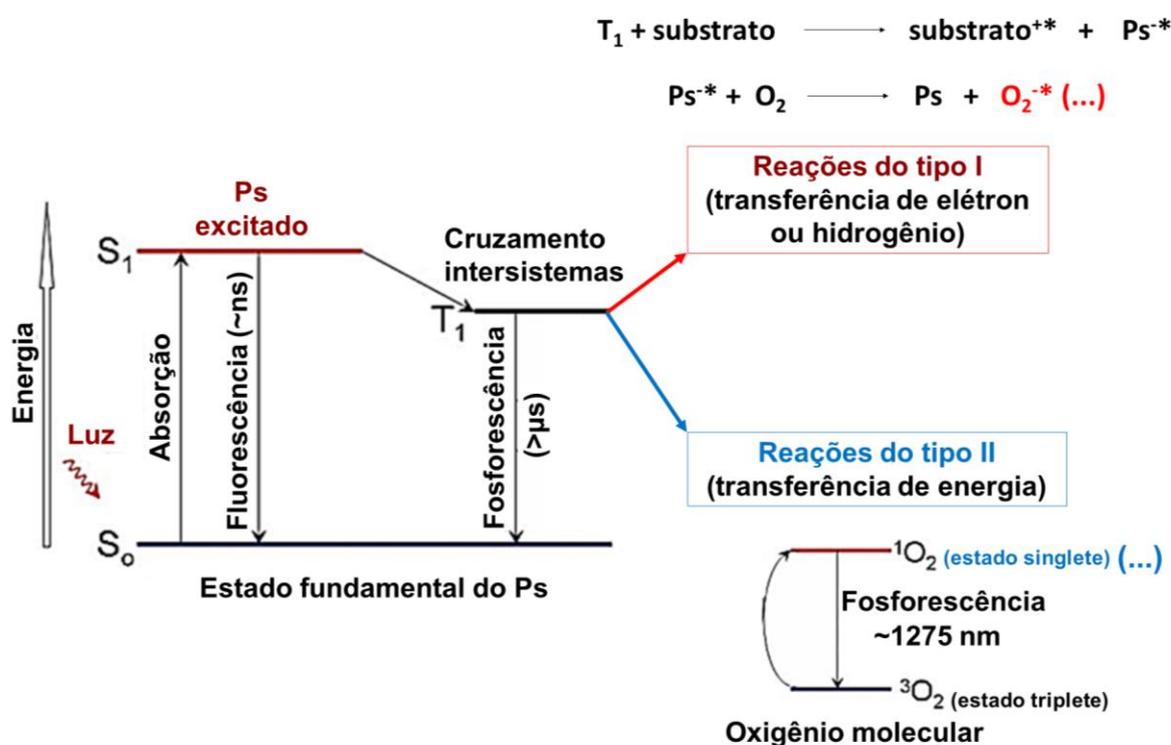
pacientes com câncer triplo-negativo que não têm as mutações BRCA, a eficácia de inibidores de PARP é questionável (ECKHARDT et al., 2012).

Os estágios avançados de tumores de mama são amplamente caracterizados por mecanismos de metástase e de resistência a drogas. Metástases para órgãos como pulmões, ossos, cérebro e fígado, como é o caso das células tumorais de mama, limitam severamente a possibilidade de intervenção cirúrgica e também não apresentam terapias direcionadas. A resistência é outro desafio que é clinicamente muito relevante. Muitos pacientes de câncer de mama não respondem a terapias direcionadas desde o início do tratamento. Já outros pacientes, no entanto, respondem a terapias específicas, tais como tamoxifeno e trastuzumab e mostram sinais de melhora apenas inicialmente, passando com tempo para um estágio refratário da doença, apresentando a chamada resistência adquirida. Quadros de metástases e de resistência aos medicamentos quase sempre resultam em mau prognóstico e levam a uma doença progressivamente agressiva (AHMAD, 2013).

### **1.4. Terapia Fotodinâmica**

A terapia fotodinâmica (PDT - do inglês *Photodynamic Therapy*) é um tratamento alternativo para lesões ou tumores pré-malignos e malignos. Ela é baseada na fotooxidação do material biológico que envolve a administração de uma substância, chamada de fotossensibilizador (Ps), e sua subsequente ativação pela luz em comprimento de onda de máxima absorção de acordo com o composto Ps utilizado (CELLI et al., 2010;

PANZARINI; INGUSCIO; DINI, 2011). A energia luminosa é absorvida pelo Ps, levando-o a um estado singlete excitado de curta duração que pode fazer a transição para um estado triplete excitado, mas de longa duração, capaz de transferir esta energia para o oxigênio presente no tecido, gerando espécies reativas de oxigênio (ROS), incluindo oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ), e radicais livres, em quantidade suficiente para promover a morte do tecido (PLAETZER et al., 2009; AGOSTINIS et al., 2011) (**Figura 8**).

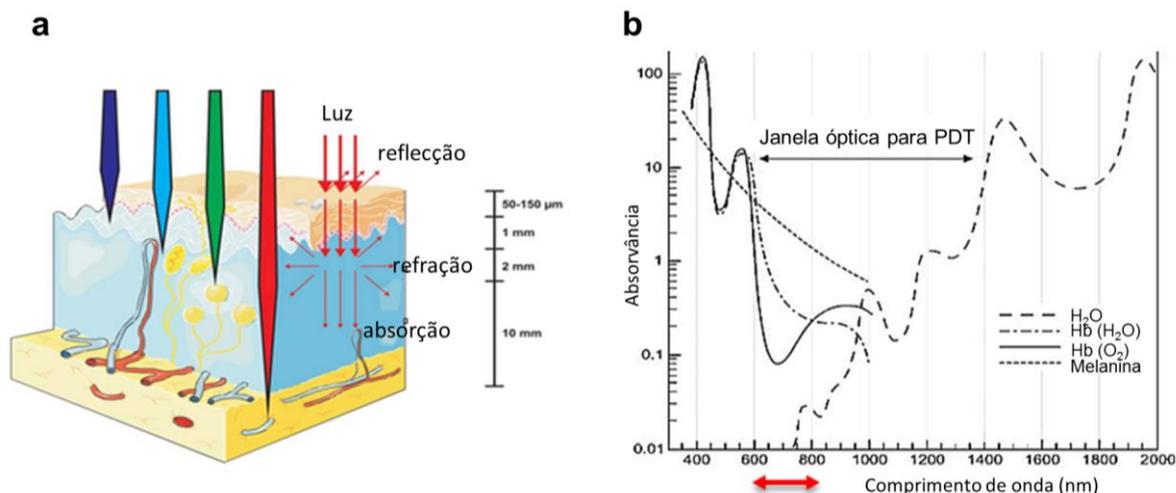


**Figura 8: Processos fotossensibilização ilustradas por um diagrama de Jablonski modificado.** A molécula de fotossensibilizador (Ps) exposta à luz absorve energia e passa de seu estado fundamental ( $S_0$ ) para um estado singlete excitado ( $S_1$ ). Neste ponto a molécula em  $S_1$  pode perder energia por fluorescência ou ser levada a um estado triplete excitado ( $T_1$ ). A partir deste estado, a molécula pode perder energia por fosforescência ou desencadear reações fotoquímicas do tipo I, formando radicais, ou reações do tipo II, transferindo energia diretamente para o oxigênio molecular  $^3\text{O}_2$ , formando o oxigênio singlete  $^1\text{O}_2$ , que é o principal agente citotóxico da PDT. ns indica nanossegundos;  $\mu\text{s}$ , microssegundos; nm, nanômetros; (...) indica efeitos oxidativo gerados a partir da molécula formada. Adaptado de AGOSTINIS et al, 2011.

O protocolo clínico do tratamento consiste na administração do Ps por via tópica, sistêmica ou local e posterior irradiação do tecido ou lesão

## Introdução

utilizando um sistema de iluminação compatível anatomicamente com o local a ser tratado. O Ps ideal deve ser uma substância sensível à luz, mas que por si só não apresente citotoxicidade. Além disso, a molécula para ser utilizada em PDT deve apresentar comprimento de onda máximo de absorção compreendido dentro da faixa de luz visível e em uma região espectral com maior penetração no tecido vivo, compreendida entre 600 e 800nm. Esta faixa é denominada de janela terapêutica da PDT e exclui a interferência de cromóforos endógenos do meio intracelular, mas ainda com uma quantidade de energia necessária para a geração de espécies citotóxicas a partir da ativação do Ps (PLAETZER et al., 2009; CELLI et al., 2010). A luz vermelha e infravermelha, compreendida entre 600 e 1200 nm, são as que penetram mais nos tecidos, considerada a janela óptica do tecido. Porém, foi demonstrado que só até 800 nm pode-se gerar  $^1\text{O}_2$ , porque acima deste comprimento de onda a energia é insuficiente para iniciar as reações fotoquímicas (**Figura 9**).



**Figura 9: Propagação da luz através dos tecidos e janela terapêutica da PDT.** (a) A propagação da luz através dos tecidos implica os processos de reflexão e refração antes de ser absorvidas e os comprimentos de onda do vermelho e infravermelho são os de maior penetração nos tecidos. (b) A janela óptica para PDT compreende a faixa entre 600 e 1200 nm, dentro da janela de maior absorção dos tecidos, mas fora das faixas de absorção dos cromóforos endógenos, aqui citados a água (H<sub>2</sub>O), a oxihemoglobina (HbO<sub>2</sub>), a deoxihemoglobina (HbH<sub>2</sub>O) e a melanina. A região de maior eficiência fotodinâmica está indicado em vermelho: faixa ente 600 e 800 nm. Adaptado de (PLAETZER et al., 2009; AGOSTINIS et al., 2011).

Muitos tipos diferentes de moléculas Ps tem sido sintetizadas e testadas como possíveis agentes na PDT. Porém não são muitos os Ps os aprovados para uso clínico atualmente, sendo que também não existe consenso entre diferentes países devido à escassez de estudos esclarecedores sobre os efeitos da PDT e a não toxicidade a longo prazo, tanto da terapia como do Ps utilizado. Na **Tabela 2** temos uma visão geral dos agentes utilizados como Ps em aplicações clínicas (AGOSTINIS et al., 2011).

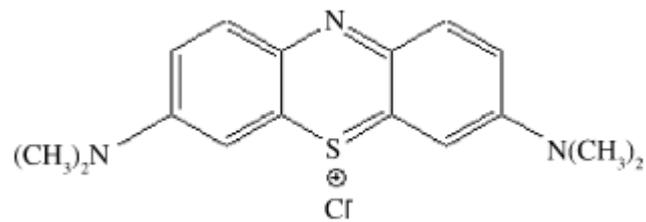
## Introdução

**Tabela 2: Fotossensibilizadores com aplicação em testes clínicos reconhecidos mundialmente**

<b>Composto</b>	<b>Química</b>	<b>Aprovação</b>	<b>Aplicações em câncer</b>
Photofrin	Porfirina	Sim	Pulmão, esôfago, ducto biliar, bexiga, cérebro, ovário
Levulan (ALA)	Porfirina	Sim	Pele, bexiga, cérebro, esôfago
Foscan (mTHPC)	Clorina	Sim	Cabeça e pescoço, pulmão, cérebro, pele, ducto biliar
Verteporfin	Clorina	Sim	Oftálmico, pâncreas, pele
Photochlor (Feoforbida)	Clorina	Não	Cabeça e pescoço, esôfago, pulmão
Laserphyrin	Clorina	Não	Fígado, cabeça e pescoço
Tookad	Clorina	Não	Próstata
Visudyne	Porfirina	Não	Pele
Silicon (Pc4)	Fitalocianina	Não	Pele, mama e pulmão

Adaptado de AGOSTINIS et al, 2011.

O azul de metileno (MB – do inglês *Methylene Blue*) é um corante que vem sendo utilizado por muitos anos. Ele é um composto aromático heterocíclico, pertencente à classe dos fenotiazínicos (**Figura 10**). Ele absorve luz com máximo de absorção em 664 nm em água, na região do visível, dentro da janela terapêutica da PDT. Trabalhos na literatura já demonstraram boa eficiência fotodinâmica do MB utilizado como Ps na PDT (MB-PDT) em trabalhos com leishmaniose cutânea, sarcoma de Kaposi associado à AIDS, melanoma e como agente antimicrobiano (TARDIVO et al., 2006, 2014; SONG et al., 2011; WAGNER et al., 2012).



**Figura 10: Estrutura molecular do azul de metileno (MB).**

Os efeitos antitumorais da PDT resultam da combinação de três diferentes mecanismos *in vivo*, a citotoxicidade para as células tumorais, que leva a ativação de mecanismos de morte celular causando a destruição do tumor e da microvasculatura e a uma possível indução de resposta inflamatória local, levando à ativação do sistema imune do hospedeiro. Porém, essas características dependem do composto Ps utilizado e do tipo de célula tratada (CELLI et al., 2010; SILVA et al., 2015).

## **2. Objetivo**

## 2. Objetivo

O objetivo deste trabalho foi estudar as vias de sinalização mediadoras dos efeitos citotóxicos da terapia fotodinâmica utilizando azul de metileno como fotossensibilizador (MB-PDT) em células de tumores mamários humanos.

### 2.1. Metas específicas:

2.1.1. Avaliar o potencial citotóxico da MB-PDT em linhagens de células derivadas de tumor de mama humano com diferentes propriedades invasivas e em células normais derivadas do tecido mamário humano;

2.1.2. Investigar o papel das diferentes vias de morte celular como responsáveis do efeito da MB-PDT nas diferentes linhagens de células;

2.1.3. Analisar o potencial citotóxico da terapia em um modelo que mimetiza as propriedades do ambiente tumoral *in vivo* utilizando cultivo celular em três dimensões.

## **3. Material e Métodos**

### **3. Material e Métodos**

#### 3.1. Linhagens celulares e condições de cultura bidimensional

As linhagens de células MDA-MB-231, MFC-7 e MCF-10A foram cultivadas à temperatura de 37°C em frascos plásticos descartáveis em atmosfera com 5% CO<sub>2</sub>. Os meios de cultura foram suplementados com 100 mg/mL de ampicilina e estreptomicina e com complementos específicos (MDA-MB-231: meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino [SFB; Vitrocell Embriolife, Campinas, Brasil]; MCF-7: meio DME-F12 suplementado com 10% de SFB; MCF-10A: meio DME-F12 suplementado com 5% de soro de cavalo, fator de crescimento epidermal [EGF] 20 ng/mL; hidrocortisona 500 ng/mL, insulina 10 µg/mL e toxina colérica 100 ng/mL, todos da Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Ao atingirem aproximadamente 80% da densidade de saturação as culturas celulares foram destacadas com 0,025% de tripsina e 1mM de EDTA, lavadas, suspensas em meio fresco e subcultivadas e/ou plaqueadas para o tratamento experimental. Quando necessário também foram feitos estoques celulares em meio de cultura contendo 90% de soro fetal bovino e 10% de DMSO (dimetilsulfóxido) em reservatório contendo nitrogênio líquido. O cultivo das células em monocamada para o tratamento experimental foi realizado plaqueando-se 1x10<sup>4</sup> células por poço de uma placa de 24 poços (ensaios de viabilidade) ou 1x10<sup>5</sup> células por poço de uma placa de 6 poços (extração proteínas), em meio suplementado com 2,5% SFB e incubação em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C.

## Material e Métodos

A linhagem celular epitelial MDA-MB-231 é originada de efusão pleural derivada de um sítio de metástase de uma paciente caucasiana de 51 anos com adenocarcinoma de mama. Estas células não expressam receptores de estrógeno, progesterona e E-caderina, mas expressam receptores para EGF e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e são capazes de promover adenocarcinoma de grau III em ratos imunossuprimidos (*Product Information Sheet for ATCC HTB-26™*).

A linhagem celular MCF-7 é originada de efusão pleural derivada de um sítio de metástase de uma paciente caucasiana de 69 anos com adenocarcinoma de mama. Estas células expressam receptores de estrógeno e progesterona, E-caderina, são consideradas luminais, com baixo grau de invasão em matrigel e tumorigênica em camundongos imunossuprimidos (*Product Information Sheet for ATCC HTB-22™*; Sommer et al, 1990).

A linhagem celular MCF-10A é originada de tecido de glândula mamária de uma paciente de 36 anos com fibrose cística. Estas células têm morfologia epitelial, apresentam características de células do ducto luminal e são responsivas à insulina, glicocorticoides, enterotoxina colérica e receptor de EGF. Elas também expressam marcadores específicos de tecido mamário e não são tumorigênicas em camundongos imunossuprimidos (*Product Information Sheet for ATCC CRL-10317™*; Soule et al, 1990).

### 3.2. Preparo e quantificação da solução de azul de metileno

O azul de metileno (MB; Synth, Diadema, Brasil) purificado, fornecido pelo Professor Dr. Maurício da Silva Baptista do Laboratório de Processos Fotoinduzidos e Interfaces do Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da USP (IQ-USP), foi utilizado como Ps. Ele foi diluído em água purificada via sistema Milli-Q (Millipore, Billerica, MA, EUA) para uma concentração de aproximadamente 8 mM. A solução foi diluída em etanol e o espectro de absorbância obtido em espectrofluorímetro (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, Estados Unidos) na faixa de 450-700 nm. A quantificação mais precisa do Ps na solução foi obtida, pela média de três medidas independentes, com a relação:

$$A=cM\varepsilon$$

em que:  $A$  = absorbância em 655 nm;  $c$  = caminho óptico (cm);  $M$  = concentração (M);  $\varepsilon$  = coeficiente de extinção molar do MB em etanol ( $85000 \mu^{-1}\text{cm}^{-1}$ ).

### 3.3. Fotossensibilização e irradiação

Após 96 horas de plaqueamento as células foram submetidas à incubação com o Ps. O meio das células foi substituído por um meio fresco (RPMI ou DME-F12 com 2,5% SFB) contendo o Ps na concentração final desejada (0,2, 2 ou 20  $\mu\text{M}$ ). As células foram incubadas durante 2 horas a 37°C com o MB e posteriormente irradiadas a uma altura de 10 cm das placas com um laser vermelho ( $\lambda=640$  nm), por 6 ou 16 minutos contabilizando 1,5 J/cm<sup>2</sup> ou 4,5 J/cm<sup>2</sup> de energia respectivamente. Em

## Material e Métodos

todos os casos, foram usados como controles de citotoxicidade do composto e de fototoxicidade da irradiação as condições de cultura em ausência do fotossensibilizador ou de irradiação. Os resultados foram analisados 1, 3 ou 24 horas após irradiação.

### 3.4. Tratamento com ativadores ou inibidores de autofagia, apoptose e necroptose

A via de mTOR, inibidora da autofagia, foi inibida por rapamicina (RAPA, Cell Signaling, Danvers, MA, EUA; #9904) na concentração de 20 nM com incubação por 24 horas antes do tratamento MB-PDT.

Os tratamentos seguintes foram realizados junto à incubação do azul de metileno 2 horas antes da irradiação e mantidos durante todo o tempo de tratamento (1, 3 ou 24 horas).

A cloroquina (CQ) (C6628; Sigma) ou bafilomicina (Baf) (196000; Calbiochem, La Jolla, CA, EUA), inibidores de fusão do autofagossomos com lisossomo, foram utilizados como inibidor do processo autofágico nas concentrações de 5  $\mu$ M e 50 nM, respectivamente.

O inibidor de fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K), LY294002 (LY) (1130; Tocris, Ellisville, MO, EUA), e o inibidor de PI3K da classe III, 3-metiladenina (3-MA) (189490; Calbiochem) foram utilizados como inibidores do processo autofágico na concentração de 50  $\mu$ M e 5 mM, respectivamente.

O indutor de apoptose estaurosporina (S4400; Sigma) foi utilizado na concentração de 1  $\mu$ M por 16 horas.

O inibidor de pan-caspases, Z-VAD-FMK (219007; Calbiochem) foi utilizado na concentração de 20  $\mu$ M.

O inibidor de caspase-3, *Caspase-3 Inhibitor VI* (219012; Calbiochem), foi utilizado na concentração de 100 nM.

O inibidor de caspase-8, *Caspase-8 Inhibitor I* (218773; Calbiochem), foi utilizado na concentração de 10  $\mu$ M ou 20  $\mu$ M.

O inibidor de BAX, *BAX Inhibitor* (2160; Tocris), foi utilizado na concentração de 10  $\mu$ M.

O inibidor de RIPK1, necrostatina-1 (N9037; Sigma), foi utilizado como inibidor de necroptose na concentração de 10  $\mu$ M.

### 3.5. Silenciamento de ATG5

O siRNA utilizado neste trabalho foi o Stealth siRNA (Invitrogen) para ATG5 (SiATG5), sequência: 5'GCUCUGCCUUGGAACAUCAtt 3'. 5x10<sup>3</sup> células foram plaqueadas por poço em placas de 24 poços e transfectadas por 16 horas com 30 nM do SiATG5 ou siRNA de sequência aleatória como controle negativo (*SiControle, AllStars Negative Control siRNA*, Qiagen, Venlo, Netherlands) com Lipofectamina RNAiMAX (Invitrogen, Paisley, Reino Unido) diluídos em meio Opti-MEM, uma modificação do Eagle's Minimum Essential Medium (MEM), tamponado com HEPES e bicarbonato de sódio, e suplementado com hipoxantina, timidina, piruvato de sódio, L-glutamina, oligo-elementos, e fatores de crescimento, ideal para uso durante transfecção lipídica catiônica, conforme indicações do fabricante (Invitrogen). Após este período o meio de transfecção foi trocado por meio

## Material e Métodos

regular para a recuperação das células. Após 24 horas foram realizados os tratamentos desejados.

### 3.6. Viabilidade celular

Para determinação da faixa de concentração não tóxica de azul de metileno (MB) que leva à indução de morte celular somente após irradiação, analisamos os tratamentos MB-PDT, conforme o item 3.3. A porcentagem de células mortas foi determinada pela relação entre o número de células total, determinado pela contagem dos núcleos corados com o fluoróforo Hoechst 33342 (HO; Sigma), e o número de células mortas, determinado pelo número de núcleos corados por Iodeto de Propídeo (PI; Invitrogen). Alíquotas de estoque desses compostos fluorescentes foram preparadas em água purificada via sistema Milli-Q na concentração de 1 mg/ml. A partir dessas soluções concentradas foi preparada solução de uso, em meio de cultura, na concentração final de 5 µg/ml para cada fluoróforo. O meio de cultura das células foi então removido e o mesmo volume de solução contendo os fluoróforos foi adicionado às células por um período de 15 minutos a 37°C. Após este tempo, as culturas em monocamada foram visualizadas diretamente no microscópio de fluorescência invertido (TE 300, Nikon, Tokyo, Japão), com aumento de 200x, e avaliadas segundo: o número de células total, determinado pela contagem dos núcleos corados com HO; e o número de células mortas, determinado pelo número de núcleos corados por PI. A fluorescência das células marcadas foi detectada

utilizando-se filtros de 364/461 nm e 545/630 nm para excitação/emissão do HO e do PI, respectivamente.

Para cada condição (concentração de MB e tempo pós irradiação) foram realizados pelo menos 3 experimentos independentes, sendo analisadas no mínimo 500 células em cada experimento independente. Os gráficos e as análises estatísticas foram gerados no programa *GraphPad Prism 5* e representam a média dos valores obtidos  $\pm$  erro padrão (SEM).

### 3.7. Western Blotting

Para obtenção do extrato proteico total, as culturas foram lavadas com PBSA gelado e, mantendo-se no gelo, adicionou-se tampão de lise (10 mM HEPES; 1% SDS; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O; 10 mM KCl; 1 mM dithiothreitol [DTT]; 0,1% NP-40) contendo inibidor de protease (GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido) e inibidor de fosfatase (Cocktail II; Sigma). Após incubação de 20 minutos, sob agitação, o extrato foi coletado por raspagem da monocamada com policial. Ao final do processo foi adicionado tampão de amostra (60 mM Tris-HCl [pH 6,8]; 10% SDS; 50% glicerol; 0,5% azul de bromofenol; 2,5% 2-mercaptoetanol) e o extrato foi aquecido (99°C) por 10 minutos, sendo posteriormente armazenado em freezer (-20°C). Quantidades iguais em volume, deste extrato proteico, foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 16%, para a quantificação dos níveis de expressão das proteínas BCL2, BAX, LC3-I e LC3-II ou RIPK1.

## Material e Métodos

As proteínas foram transferidas para membranas de Fluoreto Polivinilideno (PVDF), por transferência úmida, em tampão de transferência (0,3% Tris; 1,44% Glicina, 0,1% SDS; 20% metanol) a 4°C, 300 mA por 2 horas. As membranas foram então bloqueadas incubando-as em uma solução de bloqueio contendo Superblock (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, EUA) e albumina bovina sérica (BSA) 5% 1:1, a 4°C por 18 horas.

Após o bloqueio, as membranas foram incubadas com os anticorpos primários: policlonal de coelho anti-BAX (2772; Cell Signaling), policlonal de coelho anti-BCL2 (2876; Cell Signaling), policlonal de coelho anti-LC3 (L8918; Sigma), monoclonal de coelho anti-p62 (7695; Cell Signaling) ou monoclonal de camundongo anti-RIPK1 (610458; BD Biosciences, San Jose, CA, EUA). Após este período de incubação, as membranas foram lavadas 3 vezes de 10 minutos cada com uma solução de lavagem (PBSA contendo 0,1% de Tween 20) e então incubadas com anticorpo secundário apropriado, conjugado a peroxidase (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA). Em seguida, as membranas foram lavadas 2 vezes de 10 minutos cada com solução de lavagem e 1 vez de 10 minutos com PBSA e reveladas com sistema quimioluminescente (Immobilon, Millipore). Como controle, as membranas foram incubadas com anticorpo monoclonal de camundongo anti- $\alpha$ -tubulina Clone B-5-1-2 (T5168; Sigma). Após a revelação, a intensidade das bandas obtidas foi analisada por densitometria quantitativa, utilizando-se um scanner (HP 1500) e o software Image J (*National Institute of Health* [NIH]). Para as proteínas p62 e RIP1 a expressão diferencial foi analisada dividindo-se os valores das densitometrias das bandas da

60

proteína de interesse pelos valores obtidos para o controle endógeno (tubulina). No caso da quantificação de LC3, os valores das densitometrias de LC3-II foram divididas pelos valores de LC3-I. No caso de BCL2 e BAX, o valor de nível proteico obtido foi expressado como a razão dos valores obtidos para cada uma (BCL2:BAX), em ambos os casos o controle  $\alpha$ -tubulina foi usado como indicativo da quantidade de proteína aplicada no gel.

### 3.8. Localização intracelular do MB.

Utilizou-se microscopia confocal para caracterizar a localização subcelular de MB. Para tanto, comparou-se a emissão resultante de uma cultura de células vivas simultaneamente incubadas com o fotossensibilizador e um marcador fluorescente padrão das organelas núcleo e mitocôndria ou lisossomo. MitoTracker Green (Invitrogen) foi utilizado como um marcador mitocondrial, LysoTracker Green (Invitrogen) como um marcador lisossomo, ambos utilizados na concentração de 300 nM, e HO como um marcador para o núcleo da célula, na concentração de 5  $\mu$ g/ml. Imagens confocais foram obtidas no microscópio LSM-510 (Zeiss, Göttingen, Germany), utilizando uma objetiva de imersão em água 1,2 N.A. 40x ou uma objetiva de imersão em óleo 63x. As configurações de laser e filtro foram: para MB = 633 nm, Lyso/Mito = 488 nm e HO = 364 nm; divisor de feixe = HFT UV / 488/543/633; filtros de emissão para MB: 651-704, Lyso/Mito = 501-554 e HO = 435-485. As configurações de imagem foram: zoom = 1, dimensões = 512x512 pixels, a imagem de profundidade

## Material e Métodos

= 16 bits, com uma média de sinal = 2 e espessura de corte óptico = 2  $\mu\text{m}$ . As imagens tiveram seu brilho e contraste ajustado para as figuras e foram analisados com o software Image J.

### 3.9. Detecção de vesículas ácidas em células vivas.

A detecção de vesículas ácidas foi realizada em cultura de células vivas utilizando o marcador laranja de acridina (AO), que é uma base fraca que pode se acumular em organelas ácidas emitindo fluorescência vermelha brilhante. A intensidade da fluorescência vermelha é proporcional ao grau de acidez e/ou volume dos compartimentos acídicos celulares (PAGLIN et al., 2001). A fim de detectar e quantificar a formação de vesículas ácidas durante o processo de autofagia,  $2 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> foram plaqueadas e em seguida, submetidas ou não a MB-PDT. As células foram então lavadas com PBS e coradas com AO (Sigma) a uma concentração final de 5  $\mu\text{g/mL}$  durante 10 min a 37 ° C no escuro. Após dois passos de lavagem com PBS, as células vivas foram visualizadas utilizando um microscópio invertido de epifluorescência (Axiovert 200, Zeiss), equipado com uma objetiva C-APOCHROMAT 40 $\times$ /1.20 M27 (Zeiss). A fluorescência de vesículas marcadas com AO foi detectada utilizando o conjunto de filtros 09 (Zeiss) que proporciona uma passagem de banda de excitação de 450-490 nm (BP) com emissão de 515 nm (LP).

### 3.10. Ensaio de atividade de caspases-8, -9 e -3

Para obtenção do extrato proteico total, as culturas foram lavadas com PBSA gelado e coletadas por raspagem da monocamada com um policial em 1 mL de PBSA. As amostras foram centrifugadas a 4°C e 4000 x g por 5 minutos para obtenção de um *pellet* de células. Adicionou-se então tampão de lise (10 mM HEPES; 50 mM NaCl; 2 mM EDTA; 5 mM DTT; 0,1% 3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate [CHAPS]; 1 mM *protease inhibitor mix* - GE Healthcare). O lisado celular foi centrifugado a 4°C e 12.000 x g por 30 minutos. As concentrações de proteína foram determinadas nas frações de sobrenadante através do ensaio colorimétrico de Bradford (BioRad, Hercules, CA, Estados Unidos).

A atividade de caspase foi quantificada através de um ensaio fluorimétrico utilizando-se substratos específicos (BioVision Research Products, Mountain View, CA, Estados Unidos). As reações foram iniciadas a 37°C, incubando-se, de acordo com instruções do fabricante, 50 µg de proteína total com substratos específicos de cada caspase: Ac-IETD-AFC (Acetil- L- isoleucil -L- threoninil- L- aspartil- 7- amino- 4-trifluorometil coumarina) para caspase-8; Ac-LEHD-AFC (Acetil-L-leucil-L-glutamil-L-treoninil-L-aspartil-7-amino-4-trifluorometil coumarina) para caspase-9; e Ac-DEVD-AFC (Acetil - L - aspartil - L - isoleucil - L - valil - L - aspartil-7-amino-4-trifluorometil coumarina) para caspase-3. A atividade de protease foi avaliada em um comprimento de onda de excitação de 400 nm e um comprimento de onda de emissão de 505 nm, utilizando-se um

## Material e Métodos

espectrofluorômetro de placas de 96 poços (Spectra MAX M2, Molecular Devices).

### 3.11. Ensaio de atividade de catepsinas-B/L

Para obtenção do extrato proteico total, as células foram lavadas com PBSA e removidas da placa com tripsina. A cultura foi centrifugada 800 x g por 2 minutos para obtenção de um *pellet* de células. Este *pellet* foi lavado com PBSA, o sobrenadante foi removido e foi adicionado 2 mL de PBSA. As amostras foram então homogeneizadas com agulha de insulina por 15 vezes e centrifugadas a 4°C e 700 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e centrifugado a 4°C e 25000 x g por 2 horas para fracionamento de citosol e organelas. O sobrenadante (fração citosólica) foi utilizado nos ensaios de cinética de catepsina-L com o substrato Z-FR-MCA (1 mM) em tampão citrato-fosfato 100 mM e pH 6. Os valores de atividade foram coletados em intervalos de 15 minutos durante 1 hora. A atividade de protease foi avaliada em um comprimento de onda de excitação de 380 nm e um comprimento de onda de emissão de 460 nm, utilizando-se um espectrofluorômetro de placas de 96 poços (Spectra MAX M2). Os resultados estão apresentados relativos à atividade de catepsina-L citosólica das células não tratadas (considerado como 1).

### 3.12. Detecção da geração de oxigênio singlete intracelular

As medidas de oxigênio singlete foram realizadas no instrumento F900 Edimburgo, especialmente concebidos para esta finalidade

(Edimburgo, Reino Unido), que consiste de uma fonte de luz Rainbow OPO (Quantel Laser, Les Ulis, França) com pulsos de 2mJ, bombeados com laser Brilliant Nd-YAG (Quantel Laser), equipado com um suporte para cubetas, filtros de silício, monocromador e um *cooler* resfriado com nitrogênio líquido NIR PMT (R5509) da Hamamatsu (Hamamatsu Co., Bridgewater, NJ, EUA) e um analisador multi-escala rápido de 5 ns/canal (MSA-300; Becker & Hickl, Berlim, Alemanha). As células foram semeadas em placas de seis poços ( $4 \times 10^5$  células/poço) e após 24 horas foram incubadas com MB durante 2 horas. Após este período de incubação, as células foram lavadas em PBSA, removidas das placas utilizando uma solução de tripsina, centrifugadas e suspensas em solução salina em D<sub>2</sub>O e diretamente excitadas em 664 nm dentro de uma cubeta de quartzo para fluorescência. Os espectros de emissão do <sup>1</sup>O<sub>2</sub> foram obtidos medindo intensidades de emissão entre 1200-1348 nm com passos de 1 a 5 nm. As intensidades de pico de emissão no infravermelho próximo (NIR) (centrada em 1275 nm) estão correlacionadas com a quantidade de <sup>1</sup>O<sub>2</sub> gerado (OLIVEIRA et al., 2011).

### 3.13. Quantificação de glutathiona reduzida (GSH)

A glutathiona reduzida (GSH) foi quantificada tal como descrito anteriormente por Kand'ár et al (KAND'ÁR et al., 2007) com pequenas modificações. As células foram semeadas em placas de Petri (100 mm) a uma densidade inicial de  $2,6 \times 10^6$  células/placa de Petri. Após 48 horas, foram lavadas em PBSA, removidas das placas usando 0,025% de tripsina

## Material e Métodos

e 1mM de EDTA, centrifugadas e suspensas em água deionizada. Uma alíquota foi separada para a contagem de células antes da lise com 0,15% de polidocanol (Sigma-Aldrich). Para a precipitação de proteínas, as amostras foram incubadas com ácido metafosfórico a 10% frio (10 minutos, 4°C), centrifugou-se (22.000 X g, 15 minutos, 4°C) e os sobrenadantes foram recolhidos. O sobrenadante foi diluído 20 vezes em tampão fosfato 100 mM pH 8,9 contendo 0,1 mM de ácido dietileno triamina penta-acético (DTPA, Sigma-Aldrich). 20 µL da amostra foram diluídos para 320 µL em 100 mM de tampão fosfato de pH 8, contendo 0,1 mM de DTPA. A derivatização foi realizada por adição de 20 µL de ortoftaldeído 148 mM (OPA, Sigma-Aldrich) a esta solução. A reação foi incubada a 25°C durante 15 minutos no escuro. As amostras foram logo filtradas usando um filtro de 0,22 µm e injetadas na coluna de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). O produto GSH-OPA foi separado com uma coluna de ODS-VP / C8 / fenilo (250 mm x 4,6 mm x 4,6 mm, da Shimadzu, Quioto, Japão). O HPLC foi equipado com dois sistemas de administração de solvente LC-20AT, SIL-20AC HT amostrador automático, forno de coluna CTO-20HC, detector fluorescente RF-20A e controlador de sistema CBM-20A (Shimadzu). A separação foi conseguida utilizando uma eluição isocrática de 15% de metanol em 85% de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 25 mM (Merck, Darmstadt, Alemanha), pH 6. O fluxo foi constante a 0,5 mL/min 37°C. A fluorescência do GSH-OPA foi monitorada com um detetor de fluorescência em um  $\lambda_{ex}$  de 350 nm e  $\lambda_{em}$  de 420 nm. A área do pico foi representada graficamente contra uma curva

padrão GSH-OPA externa previamente derivatizados com GSH pura (Sigma-Aldrich). Os resultados foram apresentados como pmol/célula.

#### 3.14. Isolamento dos esplenócitos murinos

Camundongos machos BALB/c saudáveis foram eutanasiados e seus baços removidos e embebidos em solução PBS gelada. Em uma placa de petri foram feitas injeções de meio de cultura DMEM e o órgão posteriormente macerado em filtro para cultura (BD Cell Strainer – 100 µM, BD Biosciences). As células foram centrifugadas e suspensas em tampão de lise (150 mM NH<sub>4</sub>Cl; 10 mM KHCO<sub>3</sub>; 0,1 mM EDTA) gelado e novamente separadas e suspensas em meio de cultura. Uma quantidade de 5x10<sup>5</sup> células foram plaqueadas em placas de 96 poços de fundo em U e receberam o sobrenadante das células tumorais submetidas à MB-PDT. Após 72 horas os esplenócitos foram coletados e lavados com PBS e com tampão de citometria (2% SFB, 1% BSA em PBS). Após marcação com anticorpo anti-CD4 (100515; BioLegend, CA, EUA) as células foram lavadas e suspensas em PBS e analisadas no citômetro FACSCalibur (BD Biosciences). Os animais foram mantidos e manipulados de acordo com aprovação pelo Comitê de Ética local (18/2012).

#### 3.15. Cultivo 3D

O cultivo em forma de esferoides foi realizado em placas de 24 poços sobre uma lamínula de vidro. Foi adicionado, no momento do plaqueamento, a proporção de 50µl de Matrigel™/cm<sup>2</sup>, para uma

## Material e Métodos

quantidade de  $1 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> (LEE et al., 2007). As placas foram incubadas a 37°C para gelificação da membrana basal reconstituível por 20 minutos, posteriormente as células foram plaqueadas em meio suplementado com 2,5% SFB e posteriormente foi adicionado o mesmo meio de cultivo (com 2,5% SFB) suplementado com 10% de Matrigel™ (BD, código 356231). As células foram mantidas com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C por 96 horas para formação dos esferoides e posteriormente tratadas com MB-PDT, como descrito em 3.3 acima.

### 3.16. Análises estatísticas

Os dados obtidos foram submetidos a análise estatística com o *software GraphPad Prism 5*, estabelecendo o mínimo de  $p < 0,05$  (nível de significância) e grau de confiança de 95%. Todos os resultados foram analisados para distribuição gaussiana e passaram o teste de normalidade. A análise foi realizada por ANOVA empregando o *Tukey's Multiple Comparison Test* (Teste de comparação múltipla de Tukey). Os valores das médias e dos erros associados às medidas foram estabelecidos empregando *Column Statistics* (análise estatística de colunas).

## **4. Resultados**

### **4.1. MB-PDT induz morte celular massiva em células tumorais de mama, não afetando significativamente as células não tumorais.**

Levando em consideração a heterogeneidade dos tipos mais comuns de câncer de mama e para testar os possíveis efeitos citotóxicos da MB-PDT em células não tumorais, neste trabalho nós utilizamos as seguintes linhagens de células: MCF-7, que é uma linhagem celular do tipo luminal A, positiva para receptores ER, PR e HER2; MDA-MB-231, tipo TNBC, invasiva e metastática; e a linhagem MCF-10A, que não é tumorigênica.

Para demonstrar o efeito citotóxico da MB-PDT foram realizados ensaios de viabilidade, utilizando marcação das células com o corante vital HO, que é permeável à membrana plasmática, e o corante de exclusão PI, não permeável à membrana plasmática intacta, discriminando, portanto, células vivas e mortas. A porcentagem de células mortas foi determinada por contagem dos núcleos marcados com PI (células com a membrana plasmática danificada) ou HO-azul intenso (núcleos picnóticos) em relação ao número total de núcleos (marcados com HO).

A porcentagem de morte celular obtida após a terapia MB-PDT nestas linhagens está demonstrada nos gráficos da **Figura 11 (a e b)**. As células foram pré-incubadas com 2  $\mu\text{M}$  de MB (**Figura 11a**) ou 20  $\mu\text{M}$  de MB (**Figura 11b**) por 2 horas, seguido de irradiação com 4,5 J/cm<sup>2</sup> de energia; os resultados apresentados foram obtidos após 1, 3 e 24 horas de MB-PDT. Os resultados demonstram que o tratamento possui efeito máximo com a concentração de 20  $\mu\text{M}$  de MB e um impacto significativo maior sobre as

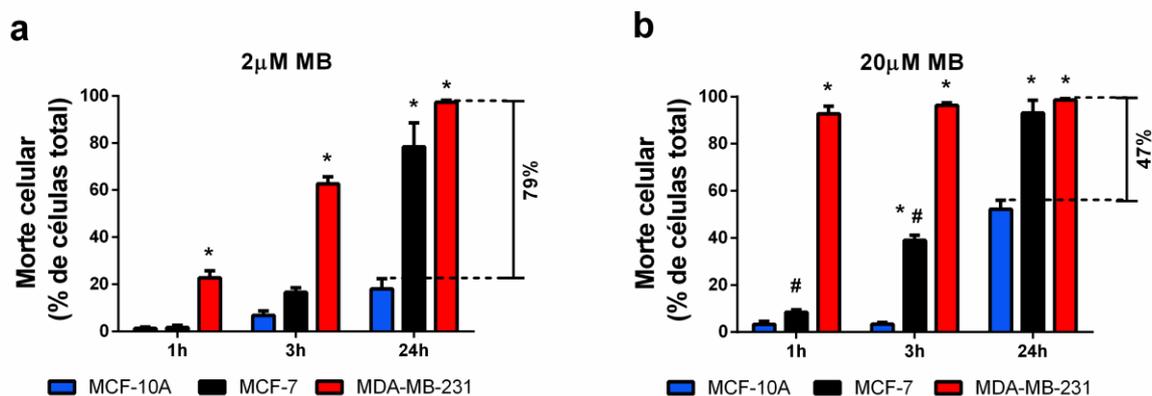
células malignas, em quaisquer doses de MB ou tempo após o tratamento. As células MDA-MB-231 apresentaram a maior porcentagem de células mortas no tempo de 24 horas após a irradiação ( $98.8\% \pm 0.5\%$ ), seguida da MCF-7 ( $93.0 \pm 5.2\%$ ) e do tipo "normal" ( $52.2\% \pm 3.8\%$ ), sendo observada uma diferença de até 47% entre células tumorais e "normais".

Foi possível mostrar também que, diferentemente do aumento exponencial de morte celular em função do tempo de tratamento apresentado pelas linhagens MCF-7 e MCF-10A, as células MDA-MB-231 atingem valores próximos à máxima porcentagem de destruição celular, na presença da maior concentração de MB ( $20 \mu\text{M}$ ), em tempos menores (1h:  $92,8\% \pm 1,6\%$ ; 3h:  $96,3\% \pm 1,4\%$ ). Este é um dado importante porque indica que as células do tipo TNBC, para as quais não existe um tratamento específico, são mais sensíveis à MB-PDT, demonstrando aqui um diferencial desta terapia em relação às convencionalmente adotadas para o tratamento de câncer.

Ao ser utilizada uma concentração menor de MB ( $2 \mu\text{M}$ ), foi observado que as células não-tumorigênicas se mostraram ainda menos sensíveis à morte induzida pela MB-PDT (24h:  $18.0\% \pm 4.3\%$ ). É importante notar que esta dose de MB ainda é capaz de induzir morte massiva nas células tumorais (24h: MDA-MB-231:  $97.3\% \pm 0.7\%$  e MCF-7:  $78.3\% \pm 7.1\%$ ), com uma especificidade para as células tumorais de até 79% (diferença entre o efeito da MB-PDT em células tumorais e "normais"). Este dado demonstra que é possível obter maior especificidade com a MB-PDT utilizando-se artifícios de fácil manipulação, como a variação na concentração de MB no

## Resultados

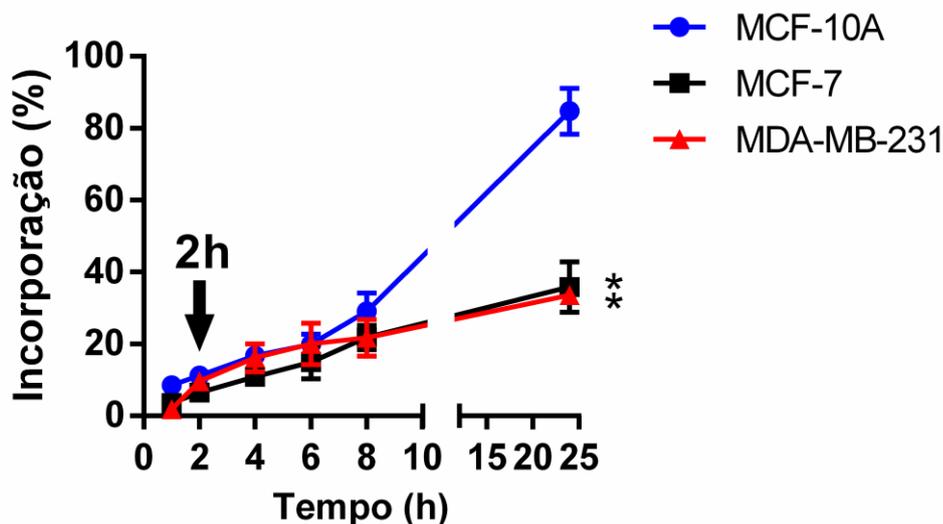
tratamento, tornando a terapia menos tóxica para o tecido saudável. Além disso, esta variação de concentração também foi importante para dar continuidade ao estudo dos mecanismos moleculares, uma vez que foi estabelecida uma janela de tempo de efeito crescente fundamental para permitir analisar o comportamento da linhagem MDA-MB-231.



**Figura 11: MB-PDT induz massiva morte em células tumorais e menos efeito nas células "normais" derivadas de epitélio de mama.** Gráficos de porcentagem de morte celular após MB-PDT com 2 µM de MB (a) ou 20 µM de MB (b) e irradiação com 4,5 J/cm<sup>2</sup> de energia, após 1, 3 e 24 horas do tratamento (n=3 experimentos independentes) \* p<0.05 versus MCF-10A; # p<0.05 versus MDA-MB-231. A maior diferença entre o efeito da MB-PDT entre células "normais" e tumorais está indicado na lateral, também expresso em % de morte. Os resultados são representados como médias±EPM.

A fim de avaliar se a diferença de susceptibilidade à MB-PDT pelas linhagens seria causada por variações na capacidade de incorporação do fotossensibilizador, foi quantificado o MB incorporado nas diferentes células, extraído o conteúdo intracelular e o analisando por espectrofotometria. Foi observado que até 8 horas de incubação não houve diferença estatística na quantidade de MB incorporado entre os três tipos celulares. Portanto, no tempo de incubação de 2 horas, adotado em todos os experimentos, a concentração de MB intracelular é significativamente semelhante entre as linhagens (MCF-10A: 11,2% ±1,1%; MCF-7: 5,8% ±0,3%; MDA-MB-231: 9,3% ±1,5%). Pode-se então concluir que o menor efeito da MB-PDT nas

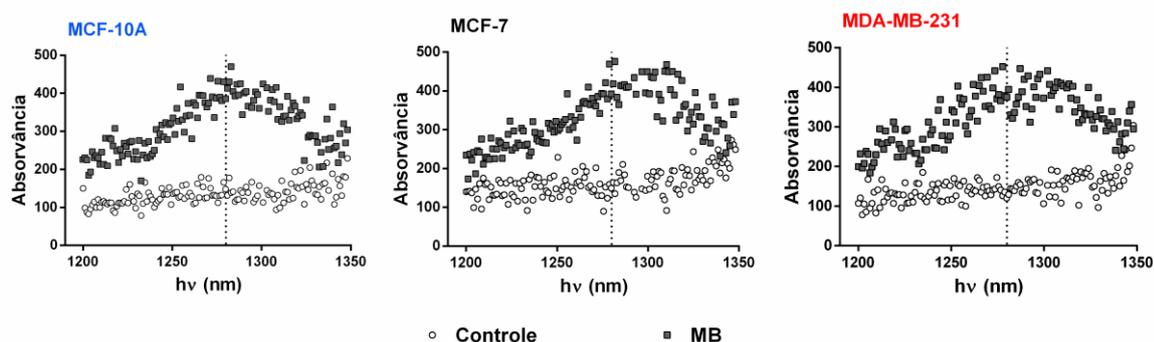
células “normais” não estaria relacionado a uma menor concentração intracelular do fotossensibilizador (**Figura 12**).



**Figura 12:** A quantidade de MB incorporado entre as diferentes linhagens estudadas é similar até 8 horas de incubação. Curvas de incorporação de MB em MCF-10A, MCF-7 e MDA-MB-231 após, 1, 2, 4, 6, 8 e 24 horas de incubação (n=4 experimentos independentes). \*  $p < 0.05$  versus MCF-10A. Está indicado na figura o tempo de incubação utilizado nos experimentos, que foi de 2 horas.

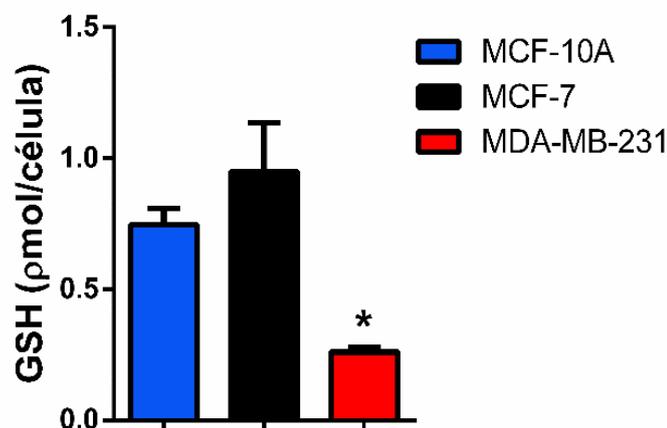
Foi também avaliado se a geração de  $^1O_2$  era diferente entre os tipos celulares, apesar da mesma capacidade de incorporação de MB. Os resultados obtidos por espectrofotometria no infravermelho mostraram que são gerados níveis similares desta molécula oxidante em todas as linhagens estudadas (**Figura 13**).

## Resultados



**Figura 13: A quantidade de MB incorporada nas células gera níveis similares de  $^1\text{O}_2$  intracelular.** Espectros de emissão no infravermelho (de 1200 a 1348nm) de células sem MB (controle, círculos brancos) e de células incubadas com MB por 2 horas (MB, quadrados cinzas). (n=3 experimentos independentes). A linha tracejada representa o comprimento de onda de 1275 nm.

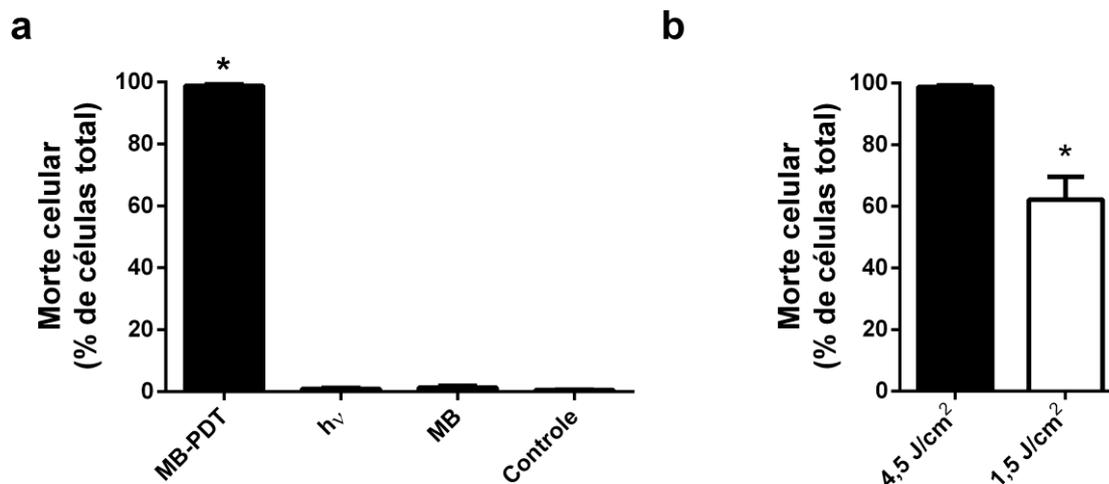
Este conjunto de resultados permite concluir que a maior sensibilidade à MB-PDT pelas células tumorais não é devido à menor quantidade de  $^1\text{O}_2$  gerada. Como forma de avaliar se a diferença de sensibilidade estaria relacionada à capacidade de resposta adaptativa ao estresse, foi dosado o nível basal de glutathiona reduzida (GSH) intracelular. Os resultados da quantificação de GSH representados na **Figura 14**, permitem observar que a célula MDA-MB-231, que é a mais sensível à MB-PDT, possui menor concentração de GSH. Este dado indica que o mecanismo de controle intracelular de estresse dependente de glutathiona poderia ser fundamental para a determinação da sensibilidade da célula ao repertório de compostos pró-oxidantes gerados pela MB-PDT.



**Figura 14: Células do tipo TNBC possuem níveis menores de GSH do que as células "normais" derivadas de epitélio de mama.** Quantificação intracelular de GSH nas diferentes linhagens (n=4 experimentos independentes) \*  $p < 0.05$  versus MCF-10A. Os resultados são representados como médias  $\pm$  EPM.

Para demonstrar que o efeito de morte observado após o tratamento seria resultado da ação citotóxica da terapia MB-PDT e não de um efeito isolado da concentração de MB ou da irradiação, testes de controles de toxicidade do composto (toxicidade no escuro) e da quantidade de energia utilizada (fototoxicidade) foram realizados em todos os ensaios de viabilidade. Na **Figura 15** são mostrados os gráficos de porcentagem de células mortas, evidenciando os controles de toxicidade no escuro (apenas tratado com MB), com 20  $\mu$ M (**Figura 15a**), e da quantidade de energia utilizada na irradiação (hv) com as doses de 4,5  $\text{J}/\text{cm}^2$  e 1,5  $\text{J}/\text{cm}^2$  (**Figura 15b**). Os resultados mostram que o efeito citotóxico é causado pela terapia MB-PDT e não pelos seus componentes isolados, não demonstrando fototoxicidade ou toxicidade no escuro, e que a dose de 4,5  $\text{J}/\text{cm}^2$  de energia gera o efeito citotóxico máximo na MB-PDT.

## Resultados



**Figura 15: MB-PDT induz morte celular em células tumorais de mama sem apresentar toxicidade no escuro. (a)** Gráfico representativo do efeito da MB-PDT nas células MDA-MB-231, com 20  $\mu$ M de MB e irradiação com 4,5 J/cm<sup>2</sup> de energia, assim como os efeitos de irradiação ( $\lambda$ ) e incubação com MB (MB) isoladamente, comparado às células não tratadas (controle), após 48 horas (n=3 experimentos independentes) \* p<0.05 *versus* controle. **(b)** Gráfico representando o número de células mortas após MB-PDT com 20  $\mu$ M de MB, após 48 horas, comparando as irradiações com 4,5 J/cm<sup>2</sup> e 1,5 J/cm<sup>2</sup> de energia. Os resultados são representados como médias $\pm$ EPM.

Este primeiro conjunto de resultados comprovam o efeito citotóxico da MB-PDT em mais de um modelo de células tumorais de mama humano, demonstrando ainda a sua seletividade. Estes são indicadores importantes para a eficácia e especificidade da terapia, apontando para um efeito promissor para o controle deste tipo de tumor, especialmente os mais agressivos, para os quais se tem menos alternativas terapêuticas e ainda mostrando menor efeito secundário para as células de tecido saudável.

## **4.2. Relevância da apoptose como mecanismo de morte celular acionado por MB-PDT.**

### *4.1.1. Avaliação do mecanismo de apoptose dependente de caspases*

A fim de investigar o papel das vias clássicas de morte celular como responsáveis do efeito da MB-PDT, o primeiro tipo de análise sobre mecanismos de morte celular induzido por MB-PDT foi a observação da morfologia dos núcleos das células após o tratamento. Os núcleos apresentados na **Figura 16a** mostram uma imagem representativa dos núcleos de células mortas, marcados com PI, das diferentes células submetidas à MB-PDT. Nesta figura também pode ser observada uma imagem dos núcleos da MDA-MB-231 após o tratamento com 1  $\mu$ M de estaurosporina por 16 horas, como controle de um agente indutor de morte por apoptose. As diferenças entre a morfologia típica de um núcleo de uma célula sofrendo apoptose, neste caso induzida por estaurosporina, que são condensação da cromatina e núcleos picnóticos ou fragmentados, não foram observados no padrão dos núcleos das células que receberam MB-PDT. Este resultado nos levou a formular a hipótese de que a apoptose clássica não seria um mecanismo induzido pela MB-PDT.

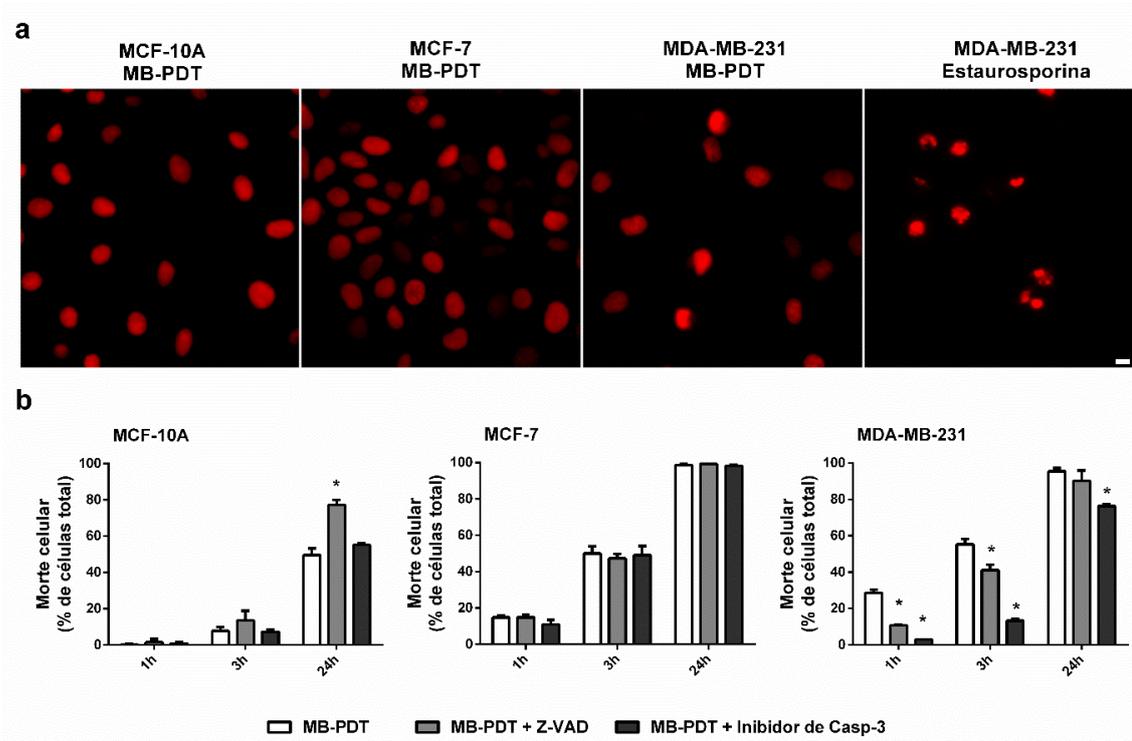
Porém, seguindo a atual orientação para nomenclatura e classificação de vias de morte celular, apenas a observação da presença ou não de uma característica morfológica específica não é mais suficiente para se determinar que um mecanismo celular de morte esteja ou não ocorrendo. Para tal é preciso associar a esta análise aspectos bioquímicos relacionados

## Resultados

a mecanismos moleculares específicos de cada via de morte, uma vez que tem sido demonstrado que características que até então se acreditava ser de uma via específica podem ser observadas em outras sob determinadas condições de tratamento e tipo celular (GALLUZZI et al., 2012, 2014).

Seguindo esta premissa, mesmo diante da observação morfológica também investigamos aspectos bioquímicos da apoptose. Os dados apresentados na **Figura 16b** apresentam os gráficos de porcentagem de morte após MB-PDT e após tratamento combinado de MB-PDT com os inibidores de pan-caspases Z-VAD-FMK e de um inibidor específico de caspase-3 (*caspase-3 inhibitor VII* – Calbiochem). Os resultados mostram que nas linhagens MDA-MB-231 e MCF-10A, a utilização do inibidor específico de caspase-3 exerce papel de citoproteção nas primeiras horas após a MB-PDT. Porém, quando foram inibidas todas as caspases, o efeito citoprotetor só é observado nas células MDA-MB-231 submetidas à MB-PDT. Isto sugere que nestas duas linhagens, MDA-MB-231 e MCF-10A, o mecanismo de morte envolve a participação de caspases. Já na MCF-7 não observamos efeito aparente na porcentagem de morte induzida pela MB-PDT mediante cotratamento com estes dois inibidores, indicando que a morte celular mediada por MB-PDT não envolve necessariamente a participação de caspases nesta linhagem. Estes resultados estão de acordo com o comportamento esperado para a MCF-7, devido ao fato de que esta linhagem expressa uma caspase-3 inativa e portanto, não sofreria apoptose clássica (JÄNICKE, 2009).

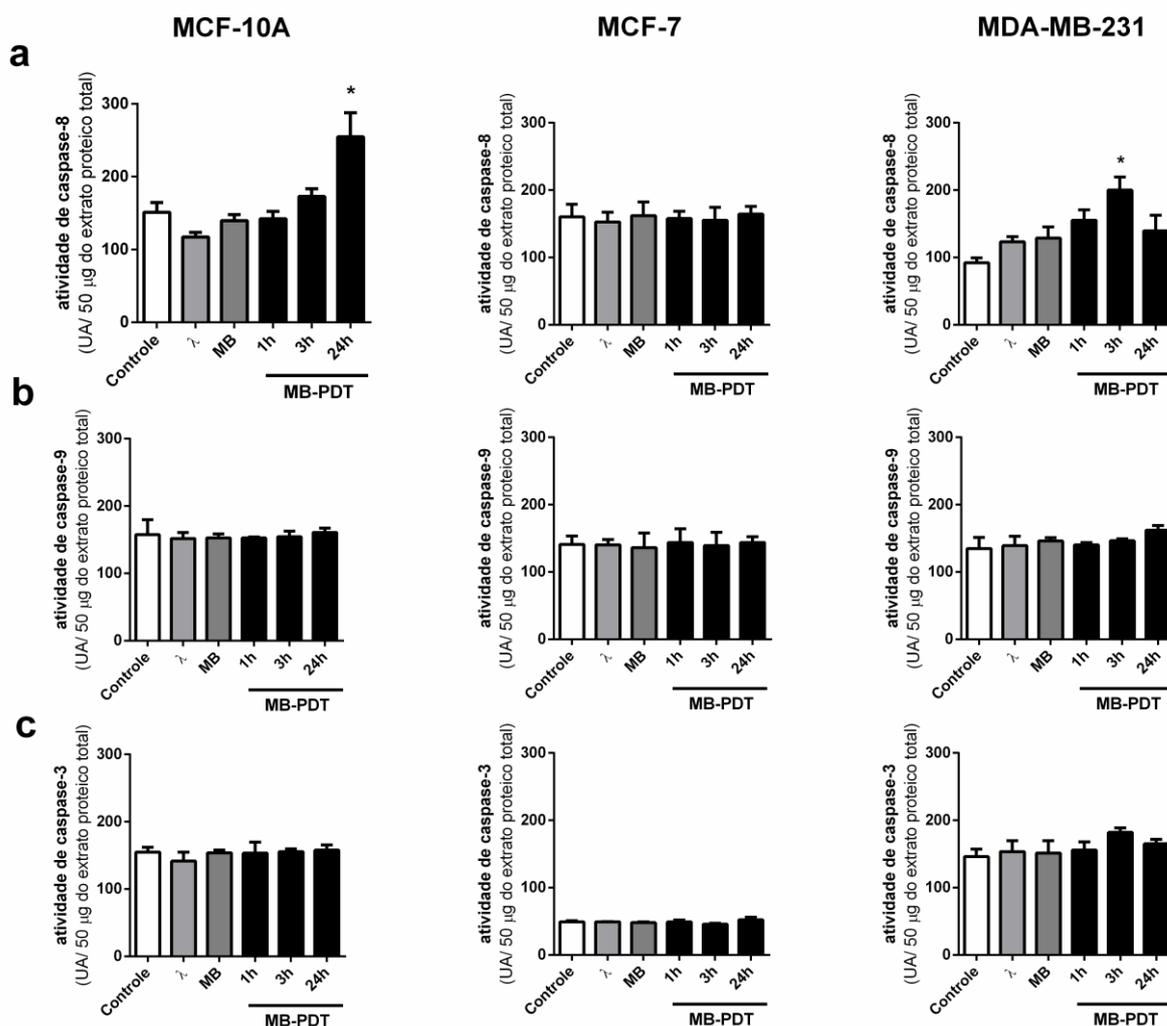
Estes dados indicam que dependendo do tipo celular envolvido os mecanismos acionados podem ser diferentes, mas que o mecanismo de apoptose não seja o mecanismo principal da morte induzida por MB-PDT, uma vez que mesmo quando inibida o efeito protetor só permanece nas primeiras horas do cotratamento com MB-PDT.



**Figura 16: O mecanismo de apoptose clássica não é o principal mecanismo envolvido na citotoxicidade induzida por MB-PDT. (a)** Núcleos representativos marcados com PI de células mortas tratadas com MB-PDT ou com estaurosporina. Barra de tamanho: 20  $\mu$ M. **(b)** Gráficos de porcentagem de morte obtidos após 1, 3 e 24 horas de MB-PDT na presença e ausência dos inibidores de caspases Z-VAD-FMK (Z-VAD) e de caspase-3, como indicado na legenda (n=3 experimentos independentes) \*  $p < 0.05$  versus MB-PDT. Os resultados são representados como médias  $\pm$  EPM.

## Resultados

Avaliamos também a ativação das caspases-8 e -9, iniciadoras das vias extrínseca e intrínseca da apoptose, respectivamente, e da caspase-3 efetora e do processo de apoptose como um todo. Nos tempos analisados após MB-PDT foi detectada apenas atividade de caspase-8, após 3 horas na linhagem MDA-MB-231 e em 24 horas na linhagem MCF-10A (**Figura 17**). A ativação de caspase-8 precede a ativação de caspase-3, apesar disso não foi detectada atividade da caspase efetora nos tempos analisados. Contudo, o dado de ativação de caspase-8 corrobora a análise da inibição de caspase-3, na célula MDA-MB-231, mostrando uma possível ativação da via extrínseca da apoptose nesta linhagem.



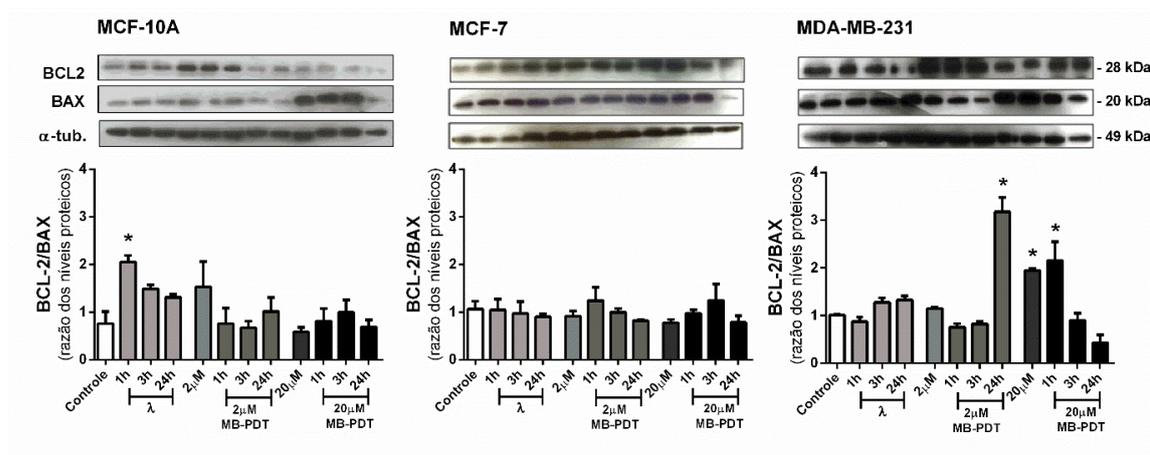
**Figura 17: Mecanismo de morte celular induzida por MB-PDT é independente da ativação de caspases.** Células não tratadas (controle), apenas irradiadas ( $\lambda$ ), apenas incubadas com MB (MB) ou que foram submetidas à MB-PDT após 1, 3 e 24h de tratamento (MB-PDT) foram coletadas e lisadas em tampão apropriado. As atividades de caspase-8 (**a**) caspase-9 (**b**) e caspase-3 (**c**) foram medidas por um ensaio fluorimétrico utilizando 50  $\mu$ g de extrato proteico total e substratos específicos para cada enzima. Os resultados estão expressos na forma de unidades arbitrárias (UA). (n=3 experimentos independentes) \*  $p < 0.05$  versus controle. Os resultados são representados como médias  $\pm$  EPM.

Este conjunto de resultados de inibição e avaliação de atividade de caspases levam à conclusão de que, apesar de ter alguma participação em uma das linhagens estudada, o principal mecanismo de morte induzido pela MB-PDT é independente da ativação destas proteases.

## Resultados

### 4.2.2. *Avaliação do mecanismo de apoptose independente de caspases*

Nos resultados anteriores foi demonstrado que não há uma participação expressiva da ação das caspases no mecanismo de morte acionado por MB-PDT. Porém, para uma análise completa do mecanismo de apoptose, foi também avaliada a possibilidade da ocorrência de um mecanismo independente de ativação de caspases. Portanto, foi estudado o balanço entre os níveis de proteínas anti- e pró-apoptóticas da família BCL2. Como mostrado na **Figura 18**, nenhuma das condições de tratamento testadas diminuiu os níveis de BCL2 em relação aos níveis de BAX. Ao contrário, para as células MCF-10A e MDA-MB-231 em algumas condições observou-se o aumento de BCL2 em relação à BAX.

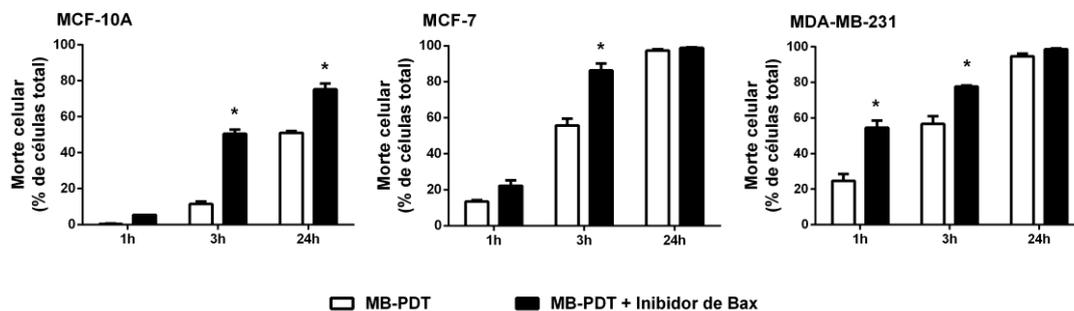


**Figura 18: O mecanismo de apoptose independente de caspases não influencia no destino fatal das células tratadas com MB-PDT. (a)** Análise de WB da relação entre os níveis proteicos de BCL e BAX de células submetidas ou não à MB-PDT com 2 ou 20  $\mu$ M de MB. Os extratos das células não tratadas (controle) e apenas incubadas com MB nas duas concentrações indicadas (2 ou 20  $\mu$ M) foram obtidos após 24 horas. Os extratos das células apenas irradiadas ( $\lambda$ ) e das células submetidas à MB-PDT foram obtidos após 1, 3 e 24 horas de irradiação, como indicado na figura. Os imunoblots mostrados são resultados representativos. Os gráficos de barras correspondentes são resultantes da densitometria de 3 experimentos independentes. \*  $p < 0.05$  versus controle. Os resultados são representados como médias  $\pm$  EPM.

Para completar a análise deste mecanismo de morte dependente da ativação das proteínas pró-apoptóticas, foi utilizado um inibidor da oligomerização da proteína BAX. Resulta possível detectar um aumento na morte induzida por MB-PDT no co-tratamento com inibidor de BAX para todas as linhagens estudadas (**Figura 19**).

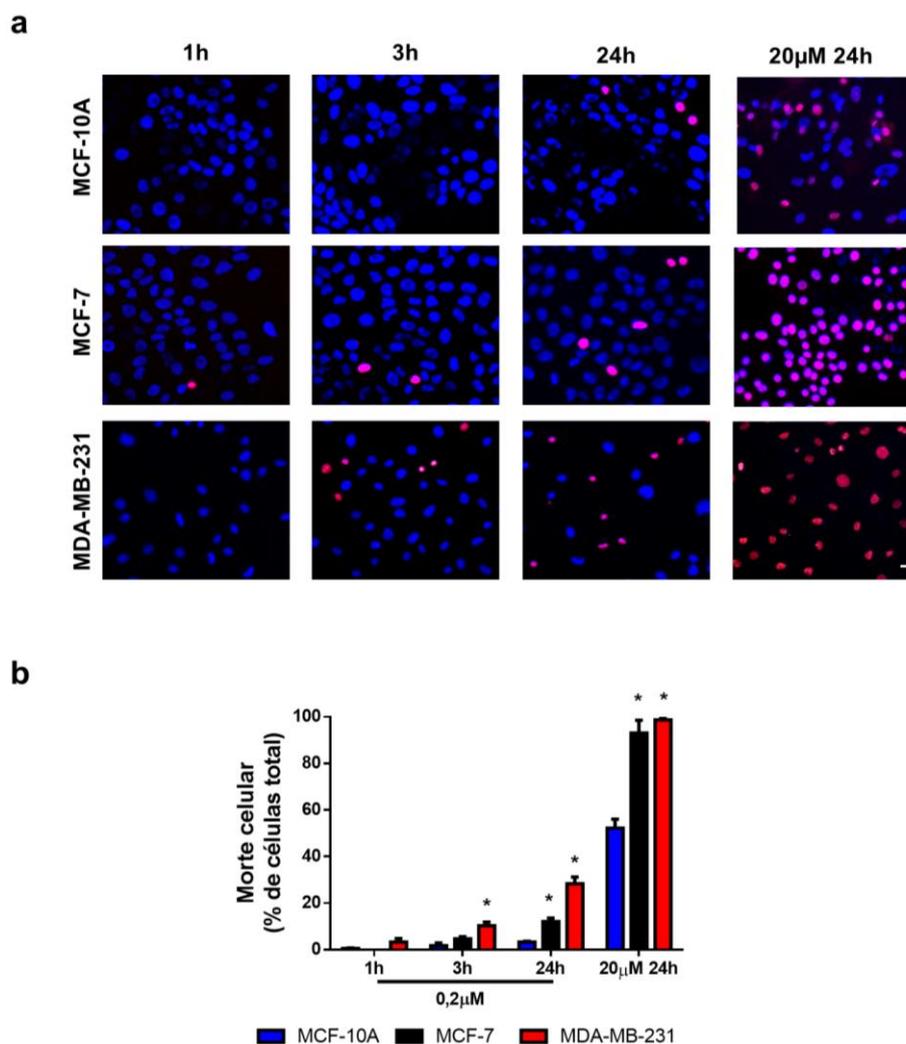
Estes dados permitem afirmar que não há indução de apoptose independente de caspases após tratamento com MB-PDT, em nenhuma dose ou tipo celular, não sendo, portanto, a apoptose o mecanismo principal de morte induzida por MB-PDT.

## Resultados



**Figura 19: A inibição da formação do poro mitocondrial com a participação de BAX torna as células mais sensíveis à MB-PDT.** Gráficos de porcentagem de morte obtidos após 1, 3 e 24 horas de MB-PDT na presença e ausência do inibidor de BAX, como indicado na legenda (n=3 experimentos independentes) \*  $p < 0.05$  versus MB-PDT. Os resultados são representados como médias  $\pm$  EPM.

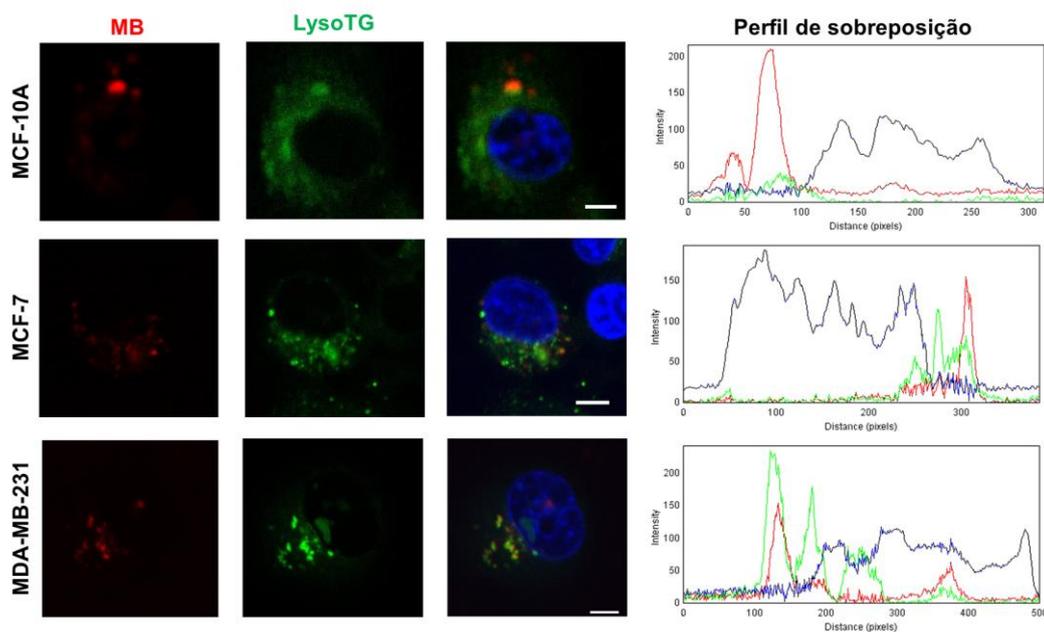
Como na literatura já foi mencionado que o mecanismo de apoptose induzida por PDT depende da concentração e do tipo de Ps utilizado, foi avaliada por fim se uma concentração ainda menor de MB levaria à indução de morte por apoptose clássica. Os resultados da **Figura 20a** mostram imagens representativas dos núcleos de células mortas, marcados com HO e PI, das diferentes células submetidas à MB-PDT com  $0,2 \mu\text{M}$  de MB, após os tempos de tratamento indicados, ou com  $20 \mu\text{M}$  de MB após 24h. O gráfico correspondente representa a porcentagem de morte induzida com cada tratamento (**Figura 20b**). Fica evidente nesta figura que mesmo em concentrações baixas de MB, em que temos menor indução de morte, a morfologia dos núcleos não difere da morfologia dos núcleos de células tratadas em condições de máxima indução de morte. Desse resultado concluímos que o MB, nestes modelos de células, não induz apoptose clássica, distinguível pela morfologia nuclear.



**Figura 20: MB-PDT não induz apoptose clássica nem mesmo em concentrações baixas de MB em nenhuma das linhagens estudadas. (a)** Núcleos representativos marcados com HO (azul) e PI (vermelho) de células tratadas com MB-PDT com 0,2 μM ou 20 μM de MB, como indicado. Barra de tamanho: 20 μM. **(b)** Gráficos de porcentagem de morte celular após MB-PDT com 0,2 μM de MB e irradiação com 4,5 J/cm<sup>2</sup> de energia, após 1, 3 e 24 horas do tratamento, ou com 20 μM de MB e irradiação com 4,5 J/cm<sup>2</sup> de energia, após 24 horas do tratamento (n=3 experimentos independentes) \*  $p < 0.05$  versus MCF-10A correspondente a cada tempo de tratamento. Os resultados são representados como médias±EPM.

### **4.3. A fluorescência do MB é diferencialmente concentrada nos lisossomos das células tumorais e “normal” derivadas de epitélio de mama.**

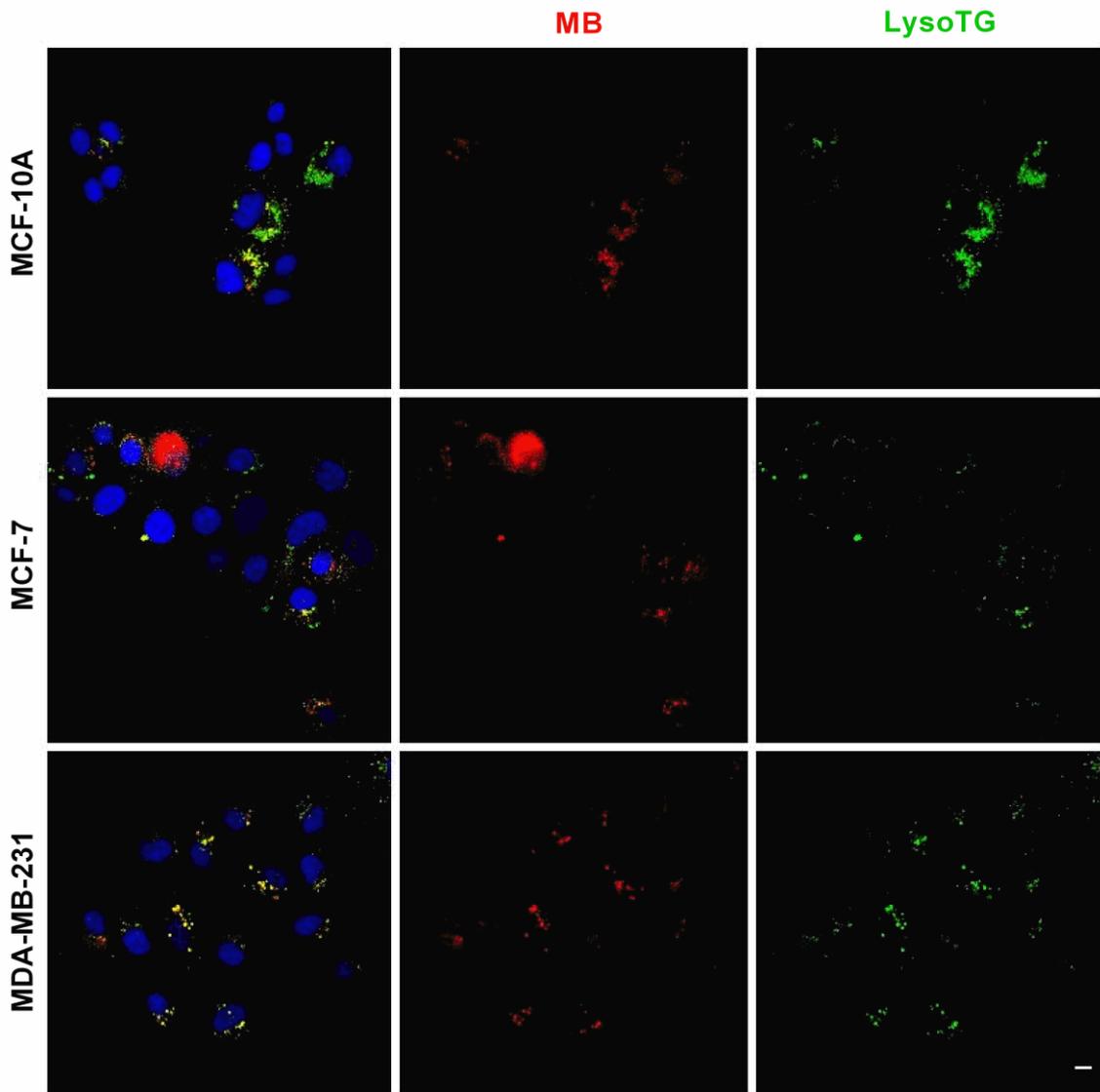
A incorporação do MB já foi confirmada anteriormente pela extração e quantificação do conteúdo intracelular. Porém a determinação da localização do MB dentro das células é fundamental para a elucidação do mecanismo molecular de morte acionado pela PDT, uma vez que o primeiro alvo das reações fotoquímicas resultantes da ativação do Ps são as moléculas mais próximas a ele fisicamente (GALLUZZI; BRAVO-SAN PEDRO; KROEMER, 2014). Para determinar a localização intracelular do MB em organelas envolvidas em mecanismos de morte celular, as células foram incubadas com MB e marcador de núcleo (HO) em combinação com as sondas LysoTracker, para lisossomos (LysoTG) e Mitotracker, para mitocôndrias (MitoTG). Todas as linhagens mostraram alguma colocalização dos sinais de fluorescência do MB e do LysoTG. Entretanto, nas células MDA-MB-231 especificamente, observamos uma alta concentração de MB na forma de vesículas que se sobrepõem quase perfeitamente à marcação de LysoTG nos lisossomos **(Figura 21 e Figura 22a)**.



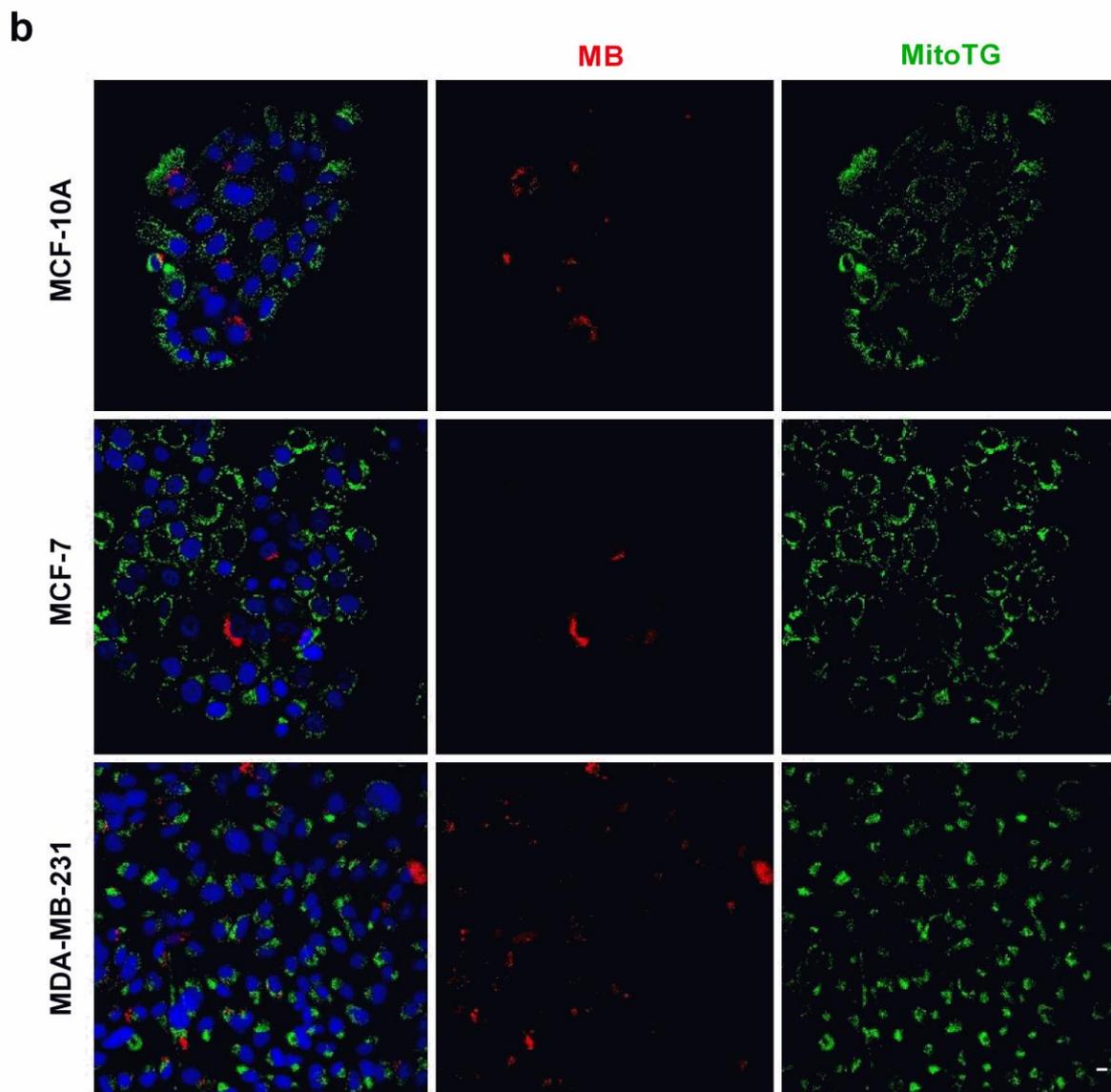
**Figura 21: MB se localiza nos lisossomos das células MCF-10A, MCF-7 e MDA-MB-231.** Imagens de microscopia confocal da fluorescência do MB (vermelho) e do marcador de lisossomos LysoTG (verde), sobreposição das duas fluorescências anteriores (coluna da direita; cor em amarelo) e do marcador de núcleo Hoechst 33342 (HO - azul) e um gráfico representativo desta sobreposição. [MB]=20  $\mu$ M; [HO], [LysoTG] e [MitoTG]=300 nM. Barra de tamanho: 10  $\mu$ m.

Este padrão de colocalização não foi observado para MB e o MitoTG (**Figura 22b**). Esta constatação representa uma demonstração da localização lisossomal preferencial de MB, o que faz com que este compartimento subcelular esteja mais propenso aos danos fotoquímicos induzidos pela MB-PDT do que a mitocôndria ou o núcleo.

**a**



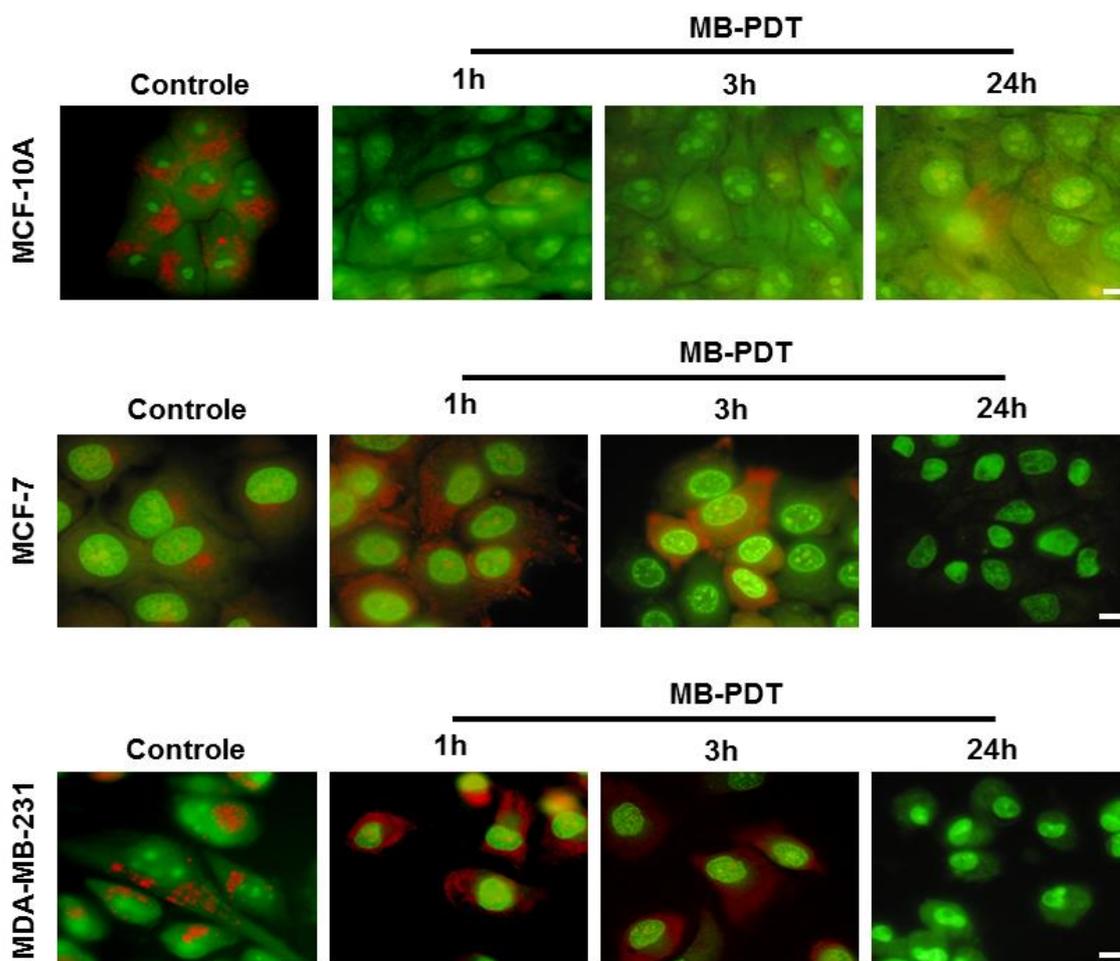
**Figura 22: *continua na página seguinte***



**Figura 22: Localização preferencial do MB nos lisossomos das células MCF-10A, MCF-7 e MDA-MB-231.** Imagens de microscopia confocal da fluorescência do MB (vermelho) e do marcador de lisossomos LysoTG (verde), sobreposição das duas fluorescências anteriores (coluna da esquerda; cor amarela) e do marcador de núcleo Hoechst 33342 (HO - azul). [MB]=20  $\mu$ M; [HO], [LysoTG] e [MitoTG]=300 nM. Barra de tamanho: 10  $\mu$ m.

#### **4.4. Autofagia induzida por MB-PDT resulta em citoproteção nas linhagens MDA-MB-231 e MCF-10A e favorece a morte celular na MCF-7.**

Já é conhecido na literatura que em diferentes tipos celulares a autofagia é induzida pela fotoirradiação (REINERS et al., 2010). Neste trabalho foi avaliado se a MB-PDT é capaz de induzir este mecanismo celular e qual o papel desta via frente ao dano oxidativo gerado pela terapia. Em primeiro lugar foi realizado um rastreamento de aumento do número de vacúolos ácidos, que são indicativos de autofagia. Este procedimento foi realizado utilizando-se o marcador laranja de acridina (AO - do inglês *Acridine Orange*). AO é um agente lisossomotrópico fracamente básico que consegue difundir através das membranas biológicas. As moléculas de AO que se encontram no citosol ou no núcleo estão na sua forma não-ionizada emitindo uma fluorescência verde. Em compartimentos ácidos, o agente encontra-se na sua forma protonada se acumulando em forma de agregados que fluorescem vermelho intenso (PAGLIN et al., 2001). As análises foram realizadas por marcação das células com AO após tratamento MB-PDT. Os resultados da Figura 23 mostram que, nas células “normais” há uma diminuição da marcação pontual vermelha após MB-PDT, por outro lado, nas tumorais houve aumento da fluorescência vermelha nos tempos iniciais após a MB-PDT, 1 e 3 horas, não sendo mais observado esse fenômeno após 24 horas de tratamento. Cabe salientar que neste tempo a maioria destas células já estão mortas.

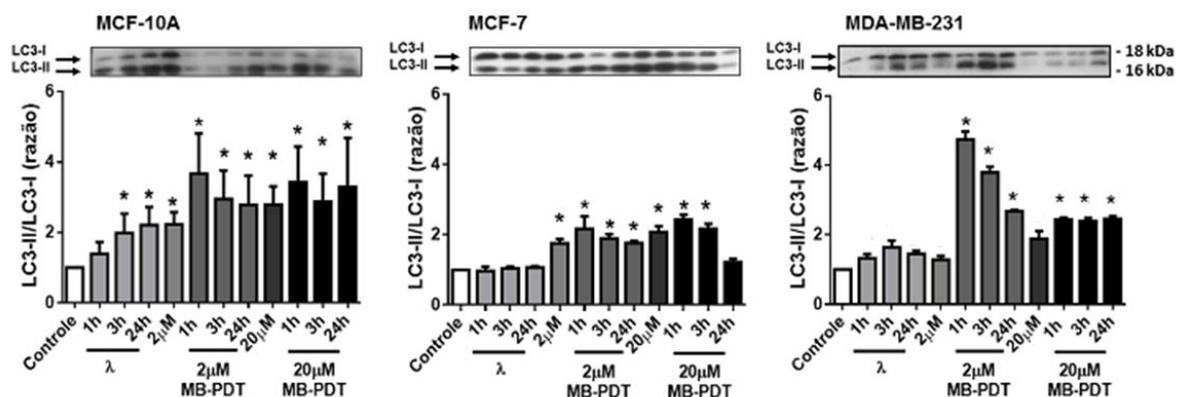


**Figura 23: O tratamento com MB-PDT induz aumento da acidificação citoplasmática.** Detecção de vacúolos ácidos com o marcador lisossomotrópico AO em células não tratadas (controle) e em células tratadas após 1, 3 e 24 horas de MB-PDT. Barra de tamanho: 20  $\mu$ M.

Para investigar se a acidificação citoplasmática observada após MB-PDT estaria realmente relacionada com aumento de autofagia, partiu-se para análise da formação de autofagossomos. Para tanto, rastreou-se a presença da proteína LC3 que está presente em duas formas dentro da célula, LC3-I e LC3-II. LC3-I está presente de forma difusa nas células; quando constituinte da membrana dos autofagossomos, ela sofre clivagem e ligação a uma molécula fosfatidiletanolamina, convertendo-se em LC3-II, (LEVINE; YUAN, 2005). Portanto, a relação LC3-II/LC3-I mais alta é indicativo de aumento do número de autofagossomos e, portanto, de que a

## Resultados

via autofágica está estimulada.. Os resultados apresentados na **Figura 24** mostraram que não só a MB-PDT, mas também a irradiação ou só a incubação com o MB, levaram a um aumento da razão LC3-II/LC3-I quando comparadas com células não tratadas (controle).

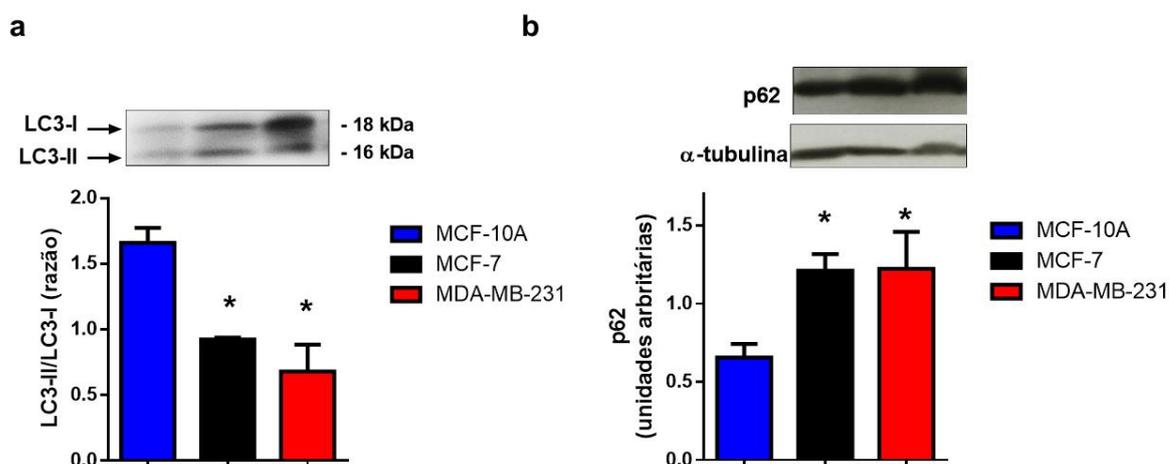


**Figura 24: MB-PDT causa aumento da relação LC3-II/LC3-I, indicativo formação de autofagossomos.** Análise de WB da relação entre os níveis proteicos de LC3-II e LC3-I de células submetidas ou não à MB-PDT com 2 ou 20 μM de MB. Os extratos das células não tratadas (controle) e apenas incubadas com MB nas duas concentrações indicadas (2 ou 20 μM) foram obtidos após 24 horas. Os extratos das células apenas irradiadas (λ) e das células submetidas à MB-PDT foram obtidos após 1, 3 e 24 horas de irradiação, como indicado na figura. Os imunoblots mostrados são resultados representativos. Os gráficos de barras correspondentes são resultantes da densitometria de 3 experimentos independentes. \*  $p < 0.05$  versus controle. Os resultados são representados como médias ± EPM.

Se compararmos o nível de estimulação de autofagia entre as diferentes células, a linhagem MCF-7 apresentou o menor aumento. No caso da linhagem não tumorigênica, MCF-10A, foi observado que até mesmo a irradiação provocou aumento da relação LC3-II/LC3-I. Para o caso das células MDA-MB-231, o tratamento MB-PDT com 2 μM induziu ainda maior conversão de LC3-I em LC3-II no tempo de 1h após o tratamento. Esses dados corroboraram os de vesículas ácidas e confirmaram que há aumento

do fluxo autofágico em tempos iniciais após o tratamento, mas que ele decai à medida que a viabilidade das células diminui.

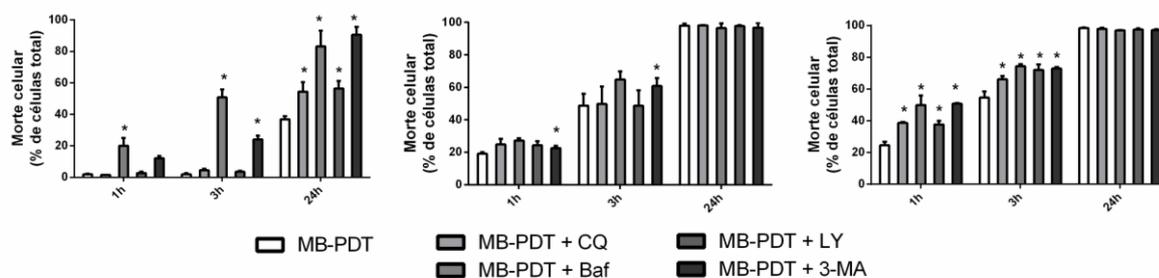
Nesse sentido, os níveis basais de LC3-II/LC3-I e da proteína p62 (também conhecida como Sequestroma-1 [SQSTM1]), que sofre degradação nos estágios precoces da autofagia, em cada linhagem estudada, mostraram que nas células “normais” a autofagia está mais ativa devido a maiores níveis proteicos de LC3-II e menores de p62 (**Figura 25**). Este resultado permite propor que o papel da autofagia nestas células estaria relacionado com uma tentativa de resgatá-las do dano associado à MB-PDT e, portanto, contribui para entender o motivo da MCF-10A ser mais resistente do que as células tumorais ao estresse gerado pela MB-PDT.



**Figura 25: As células “normais” derivadas de epitélio da mama apresentam mecanismo de autofagia mais funcional do que as tumorais. (a)** Análise de WB da relação entre os níveis proteicos de LC3-II e LC3-I de células não tratadas. **(b)** Análise de WB dos níveis proteicos de p62 em células não tratadas. Os imunoblots mostrados são resultados representativos. Os gráficos de barras correspondentes são resultantes da densitometria de 3 experimentos independentes. \*  $p < 0.05$  versus MCF-10A. Os resultados são representados como médias  $\pm$  EPM.

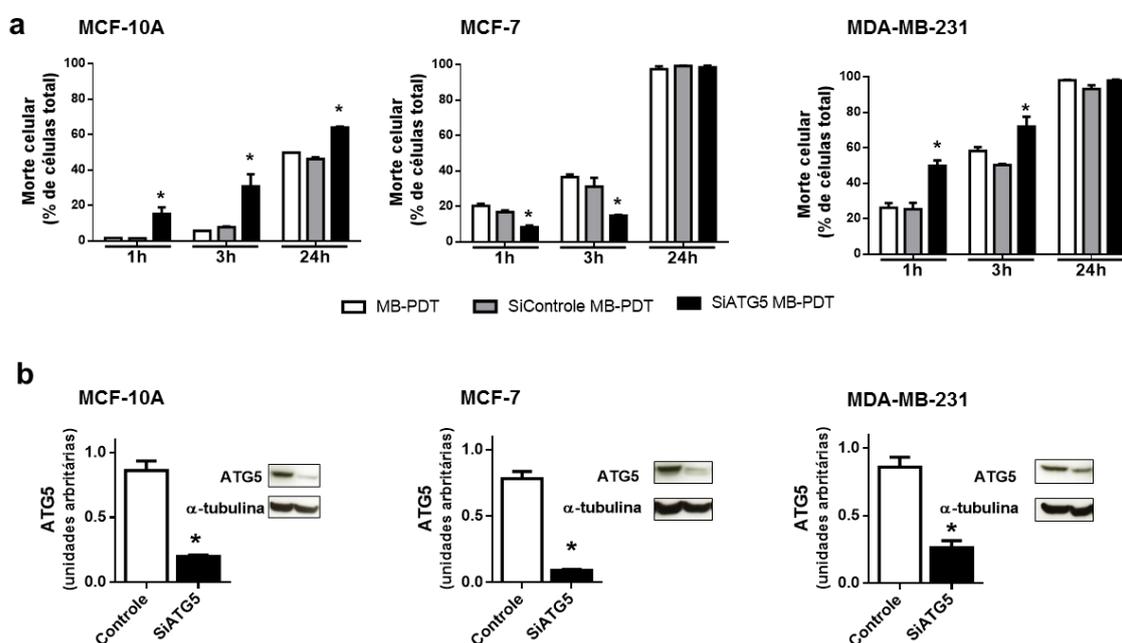
## Resultados

A fim de esclarecer se o papel da autofagia induzida após a MB-PDT configuraria um mecanismo de morte ou uma tentativa de resgatar as células do dano gerado pelas reações fotoquímicas, foi avaliada a viabilidade das células tratadas com MB-PDT após inibição ou indução do processo autofágico. Antes de serem submetidas à MB-PDT, as células foram tratadas com os inibidores de autofagia cloroquina (CQ), bafilomicina (Baf), LY294002 (LY) e 3-MA ou com o indutor rapamicina (RAPA). Os dados apresentados na **Figura 26** mostram os gráficos de porcentagem de morte após MB-PDT e após tratamento combinado de MB-PDT e os inibidores CQ, Baf, LY e 3-MA. Os resultados mostraram um aumento significativo na morte induzida por MB-PDT quando a autofagia é inibida apenas nas células MCF-10A e MDA-MB-231.



**Figura 26: A autofagia tem papel citoprotetor nas células MCF-10A e MDA-MB-231.** Efeito da MB-PDT em induzir morte celular nas MDA-MB-231 na presença e na ausência dos inibidores de autofagia cloroquina (CQ), bafilomicina (Baf), LY294002 (LY) e 3-MA. (n=3 experimentos independentes) \*  $p < 0.05$  versus MB-PDT. Os resultados são representados como médias  $\pm$  EPM.

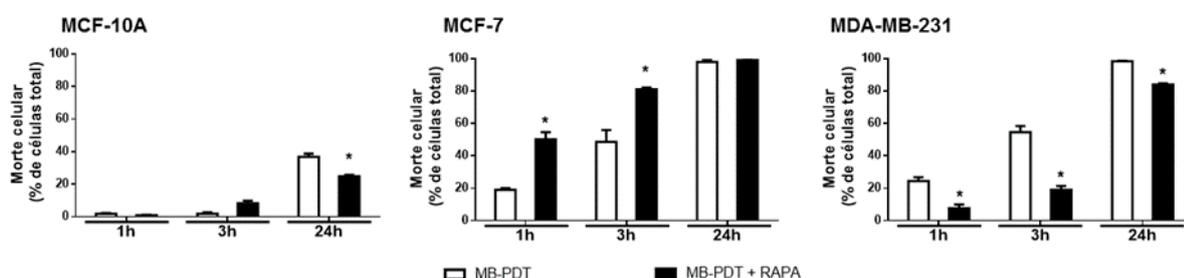
A fim de confirmar esses dados em MCF-10A e MDA-MB-231 foi realizado o silenciamento de ATG5. Os resultados apresentados na **Figura 27** mostram tanto a porcentagem de morte após MB-PDT de células não silenciadas (MB-PDT e SiControle MB-PDT) e de células silenciadas de ATG5 (SiATG5 MB-PDT) (**Figura 27a**) quanto a eficiência do silenciamento (**Figura 27b**). Em resumo, foi observado um aumento significativo na morte induzida por MB-PDT quando a autofagia foi inibida nas células MCF-10A e MDA-MB-231. No caso das células MCF-7, embora as inibições farmacológicas não mostraram efeito, o silenciamento mostrou que a inibição da autofagia resultou em uma ação citoprotetora.



**Figura 27: A autofagia tem papel citoprotetor nas células MCF-10A e MDA-MB-231, mas não na MCF-7. (a)** Efeito da MB-PDT em induzir morte celular na presença (MB-PDT e SiControle MB-PDT) e na ausência da proteína ATG5 (SiATG5 MB-PDT). (n=3 experimentos independentes) \*  $p < 0.05$  versus MB-PDT. Os resultados são representados como médias  $\pm$  EPM **(b)** Níveis proteicos de ATG5 em extrato de células não silenciadas (Controle) e silenciadas de ATG5 (SiATG5). (n=3 experimentos independentes) \*  $p < 0.05$  versus Controle. Os resultados são representados como médias  $\pm$  EPM

## Resultados

Os resultados apresentados na **Figura 28** mostraram que a autofagia tem uma função citoprotetora frente à MB-PDT nas células MCF-10A e MDA-MB-231. Além disso, a indução do fluxo autofágico com RAPA levou a um aumento da susceptibilidade à MB-PDT apenas na MCF-7. Este resultado aparentemente contraditório poderia ser explicado pelo fato de que esta linhagem celular apresenta deficiências na maquinaria da autofagia, ao apresentar apenas uma cópia do gene BECN1. Este conjunto de dados indicam que a autofagia, no contexto da MB-PDT estaria mais envolvida no mecanismo de resgate das células ao dano gerado, porém quando esta maquinaria está comprometida, as células são mais suscetíveis à MB-PDT.

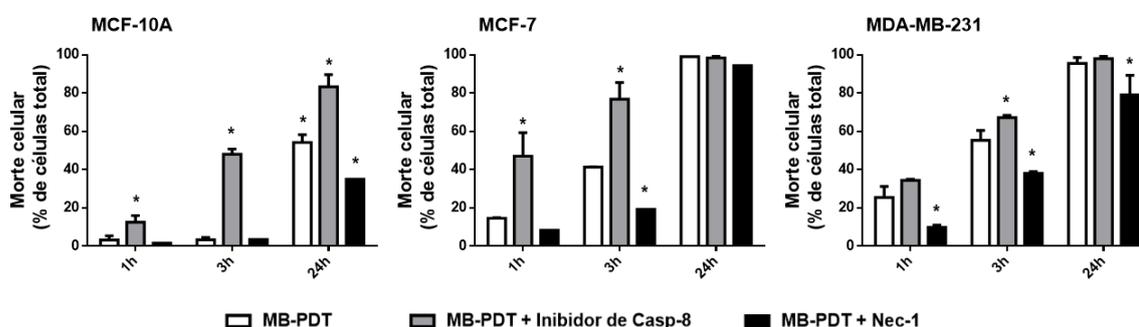


**Figura 28: A autofagia tem papel citoprotetor nas células MCF-10A e MDA-MB-231, mas não na MCF-7.** Efeito da MB-PDT em induzir morte celular na ausência (MB-PDT) e na presença (MB-PDT + RAPA) do indutor de autofagia rapamicina. (n=3 experimentos independentes) \*  $p < 0.05$  versus MB-PDT. Os resultados são representados como médias  $\pm$  EPM.

### 4.5. Análise do papel da necroptose na morte celular induzida após o tratamento com MB-PDT

Os resultados até agora demonstraram que a autofagia seria ativada após MB-PDT como uma tentativa de resgate das células do dano oxidativo gerado e que a apoptose não seria o mecanismo responsável pela morte

celular. Portanto, o mecanismo principal envolvido na citotoxicidade da MB-PDT poderia ser a morte por necrose. A necroptose é uma via celular especializada de necrose programada e seu mecanismo molecular envolve a participação das cinases RIPK1 e RIPK3. As estratégias utilizadas para avaliação deste tipo de morte celular foram a inibição da via por meio de tratamento com necrostatina-1 (Nec-1, inibidor de RIPK1) e ativação da via de necroptose por meio da inibição de caspase-8. Os resultados obtidos mostraram que a inibição da necroptose aumentou a viabilidade das células e que a ativação deste mecanismo tornou as células mais sensíveis aos efeitos danosos da MB-PDT. Portanto, essa via de morte é ativada pela MB-PDT nas três linhagens estudadas (**Figura 29**).



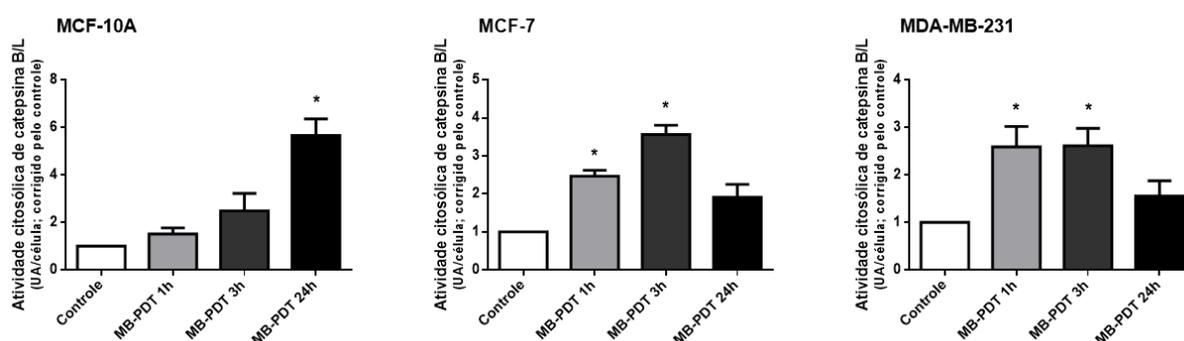
**Figura 29: Necroptose é um mecanismo induzido após MB-PDT.** Gráficos de porcentagem de morte obtidos após 1, 3 e 24 horas de MB-PDT na ausência e presença do inibidor necrostatina-1 (MB-PDT e MB-PDT + Nec-1, respectivamente), ou na ausência e presença do inibidor de caspase-8 (MB-PDT e MB-PDT + Inibidor de Casp-8, respectivamente), como indicado na legenda (n=3 experimentos independentes) \*  $p < 0.05$  versus MB-PDT. Os resultados são representados como médias  $\pm$  EPM.

#### 4.6. Avaliação de dano lisossomal

Como observamos anteriormente, o lisossomo é um dos alvos do MB, o que indica um provável comprometimento desta organela nas reações fotoquímicas induzidas pela MB-PDT. O comprometimento da integridade

## Resultados

do lisossomo é a primeira evidência de outro tipo de morte celular, a morte celular induzida por permeabilização da membrana do lisossomo (um tipo de necrose regulada independente de RIPK1). A importância desta abordagem é que um dos eventos resultantes desta permeabilização é o extravasamento das proteases lisossomais para o citoplasma, evento este que pode levar à morte celular. Nesse sentido, dados preliminares evidenciaram um aumento significativo da atividade citosólica de catepsina-B/L após MB-PDT, o que seria um indicativo de dano lisossomal (**Figura 30**).



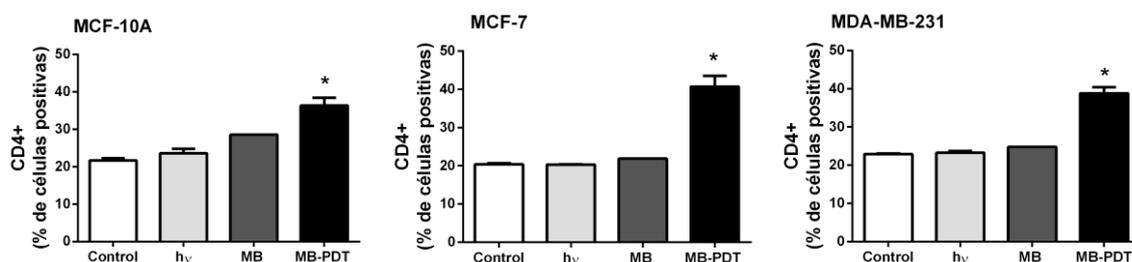
**Figura 30: MB-PDT induz permeabilização da membrana dos lisossomos.** Atividade citosólica de catepsina B/L em células não tratadas (controle) e após MB-PDT. As atividades foram medidas por um ensaio fluorimétrico utilizando substratos específicos para cada enzima. Os resultados estão expressos na forma de % da atividade total (citosólica + lisossomal) corrigido pelo número de células em cada amostra utilizada no ensaio. (n=3 experimentos independentes) \*  $p < 0.05$  versus controle. Os resultados são representados como médias  $\pm$  EPM.

### 4.7. Avaliação do potencial imunogênico da MB-PDT

Outra característica das células tumorais, além da resistência a mecanismos de morte celular programada, mas que é igualmente importante para a manutenção do tumor, é a capacidade de evasão do sistema imune (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Neste sentido, outro ponto

a ser explorado a fim de propor a MB-PDT como tratamento alternativo para o câncer, seria o de avaliar a sua capacidade de indução da ativação do sistema imune do hospedeiro para eliminação completa do tumor. O caráter imunogênico da terapia fotodinâmica está sendo recentemente explorado e tem sido observado que nem todos os compostos que são utilizados como fotossensibilizador são capazes de induzir este efeito. Nada ainda havia sido demonstrado sobre a indução de resposta imune mediada por azul de metileno em terapia fotodinâmica (MB-PDT). Os resultados apresentados na **Figura 31** mostraram, pela primeira vez, que o tratamento MB-PDT em células derivadas do epitélio mamário humano seria capaz de ativar a proliferação de linfócitos T auxiliares CD4<sup>+</sup> provenientes de culturas primárias de esplenócitos murinos tratadas com o sobrenadante das células submetidas à MB-PDT.

## Resultados



**Figura 31: Tratamento com MB-PDT induz proliferação de células T-CD4<sup>+</sup> sendo indicativo do potencial imunogênico da terapia.** Análise por citometria de fluxo da proliferação de células marcadas com anticorpo anti-CD4<sup>+</sup> de uma cultura de esplenócitos murinos que foram tratados com o sobrenadante de células derivadas do epitélio mamário humano “normal” (células MCF-10A) e tumoral (células MCF-7 e MDA-MB-231) tratadas ou não com MB-PDT. *Controle*: esplenócitos não estimulados; *hv*: esplenócitos tratados com o sobrenadante de células que foram apenas irradiadas; *MB*: esplenócitos tratados com o sobrenadante de células que foram apenas incubadas com azul de metileno; *MB-PDT*: esplenócitos tratados com o sobrenadante de células que foram tratadas com a terapia fotodinâmica com o azul de metileno. Os resultados estão apresentados como médias±EPM; n=2 experimentos independentes.  $p < 0,05$ .

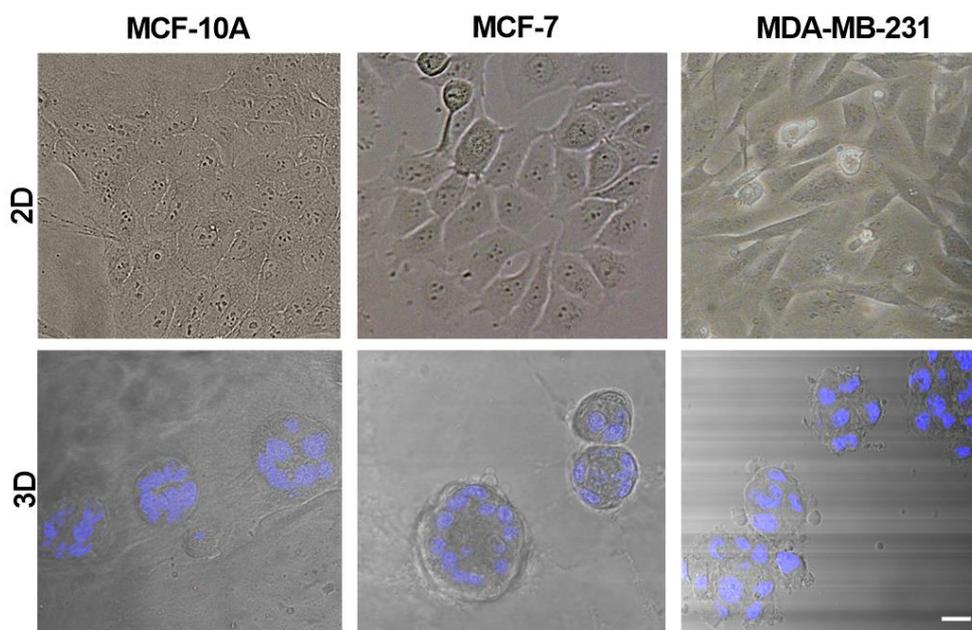
### 4.8. O cultivo de células em esferoides aumenta a diferença de sensibilidade à MB-PDT entre células tumorais e “normais”

As células epiteliais de mama não malignas, quando cultivadas em matriz extracelular rica em laminina, formam mamosferas *in vitro* com estruturas acinares que se assemelham tanto morfológica e estruturalmente a lóbulos e glândulas mamárias *in vivo* (MCKEEN POLIZZOTTI et al., 2012). A avaliação do efeito de drogas com este tipo de estratégia de cultivo constitui um sistema adequado para pesquisa em câncer de mama porque além de servir para diferenciar células não malignas de tumorais, permite o restabelecimento de características bioquímicas e morfológicas que se assemelham às condições das células em seu equivalente ambiente tumoral *in vivo* e que, portanto, poderia alterar os resultados obtidos com as mesmas células quando cultivadas em monocamada (LEE et al., 2007). Desta forma, a fim de validar os nossos resultados de efetividade da MB-

PDT, foi também utilizado este modelo de cultivo que recapitula a morfologia do epitélio glandular.

Ao estabelecer o cultivo em esferoides, o primeiro passo foi fazer uma comparação das três linhagens estudadas, com imagens do crescimento em monocamada (2D) e em esferoides (3D) (**Figura 32**). No crescimento em monocamada, observamos que as células MCF-10A apresentam melhor a característica de morfologia epitelial, mantendo maior contato célula-célula. Também ficou evidente que seus esferoides formam estruturas mais organizadas com maior polarização celular, se comparado ao modelo tumoral mais agressivo. As células MDA-MB-231 formam estruturas irregulares, com ausência de polaridade e com pouca adesão aparente entre as células, diferente dos esferóides de MCF-7 que formam uma massa celular menos dispersa e de MCF-10A que é ainda mais organizada. As observações realizadas confirmam as características já descritas na literatura para estas células, tanto quando cultivadas em 2D como em 3D (KENNY et al., 2008; HOLLIDAY; SPEIRS, 2011), validando dessa forma o modelo de estudo. Além disso, a importância de se ter estabelecido o cultivo 3D no laboratório foi a de poder estudar os efeitos da PDT em modelos que mais se aproximam ao ambiente tumoral *in vivo*.

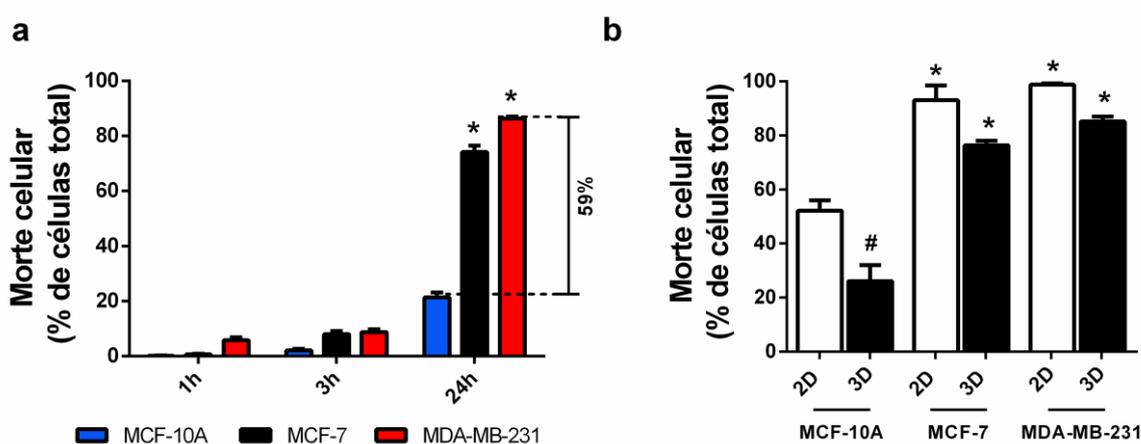
## Resultados



**Figura 32: Comparação das morfologias entre células "normais" e tumorais cultivadas em monocamada e esferoides.** Micrografia de células MDA-MB 231, MCF-7 e MCF-10A em cultivo em monocamada (2D), painéis superiores, ou na forma de esferoides (3D), painéis inferiores. Núcleos marcados em azul com HO. Barra de tamanho: 20  $\mu$ m.

O mesmo tipo de avaliação de citotoxicidade da MB-PDT foi realizada no modelo 3D. As curvas de resposta de dose, utilizando 20  $\mu$ M MB seguida por irradiação com 4.5J /  $\text{cm}^2$  mostraram que não houve diminuição evidente da viabilidade celular, tanto a 1 e 3 h após o tratamento MB-PDT. No entanto, a morte celular foi significativamente aumentada após 24 horas de PDT para ambas as linhas celulares de câncer da mama (MDA-MB-231: 87,1%  $\pm$  1,8%; MCF-7: 74,4%  $\pm$  1,5%) e com menor efeito nas células "normais" (26,0%  $\pm$  6,0%) (**Figura 33a**). Foi importante notar que o resultado de morte nos esferoides não se limitou à periferia dessas estruturas, mostrando que a luz e o MB alcançaram eficientemente as células no centro da esfera. Também foram comparados os efeitos da MB-PDT entre as células cultivadas em monocamadas (2D) ou em uma

membrana basal comercial (3D). É importante notar que o efeito da MB-PDT em células tumorais cultivadas em 3D após 24 horas não diferiu significativamente do efeito observado em 2D. Porém as células "normais" cultivadas em 3D exibiram uma sensibilidade significativamente menor para o tratamento do que o observado no cultivo 2D (**Figura 33b**).



**Figura 33: Cultura em esferóides de células derivadas do epitélio mamário aumenta a sensibilidade diferencial entre as células tumorigênicas e "normais".** (a) Gráficos de porcentagem de morte celular das células mantidas em 3D após MB-PDT com 20 µM de MB e irradiação com 4,5 J/cm<sup>2</sup> de energia, após 1, 3 e 24 horas do tratamento (n=3 experimentos independentes) \* p<0.05 versus MCF-10A. A maior diferença entre o efeito da MB-PDT entre células "normais" e tumorais está indicado na lateral, também expresso em % de morte. (b) Comparação do efeito citotóxico MB-PDT entre culturas de células em 2D e 3D após 24 h de irradiação \* p<0.05 versus MCF-10A; # p<0.05 versus MDA-MB-231. Os resultados são representados como médias±EPM.

## **5. Discussão**

## 5. Discussão

Disfunções nos mecanismos de controle da morte celular são uma característica comum dos tumores. Essas alterações fazem com que as células não respondam mais aos sinais de controle de proliferação, morte e diferenciação responsáveis pela homeostase do tecido. Outra consequência dessas transformações, além de possibilitar o crescimento desordenado do tumor, é a adaptação de células tumorais a um microambiente diferente do local do tumor primário, que configura o processo de metástase. No câncer metastático as células requerem propriedades que lhes permitem não só se adaptarem a um microambiente diferente, mas também de alterá-lo e subvertê-lo de uma forma que se torne propícia sua sobrevivência e proliferação contínua (BACAC; STAMENKOVIC, 2008). Com este trabalho foi demonstrado que a MB-PDT (terapia fotodinâmica utilizando MB como Ps) foi capaz de contornar esta característica de resistência em mais de uma linhagem de células tumorais derivadas do tecido mamário humano, e também apresentou propriedades de seletividade, características que são importantes e fundamentais para uma terapia contra o câncer.

Mesmo com todos os avanços tecnológicos recentes, as pacientes de câncer de mama ainda sofrem com a reincidência da doença, sendo o surgimento de metástases o principal fator associado à morte por este tipo de tumor (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2015). Para o câncer de mama, o problema da reincidência do tumor é maior no caso dos tumores do tipo triplo negativos (TNBC), que são aqueles que não expressam receptores para hormônios esteroides (ER ou PR) ou para fator de crescimento

## Discussão

epidermal (HER2), sendo classificados como o subtipo mais agressivo por não apresentarem terapias direcionadas. Portanto, o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, elaborando que visam acionar mecanismos que resultem na seletiva e eficiente morte da célula tumoral, apresentando resultados clínicos efetivos e que propiciem menos efeitos colaterais é de fundamental interesse clínico (ECKHARDT et al., 2012).

Os tratamentos convencionais para o câncer de mama incluem cirurgia, quimioterapia, radioterapia e/ou terapia hormonal. No entanto, estes são frequentemente associados com alta morbidade e muitas vezes são malsucedidos. As causas para tanto são justamente o baixo poder citotóxico sobre os diferentes tipos de células que constituem o tumor e a falta de especificidade do tratamento (AHMAD, 2013). Nesse sentido, a terapia fotodinâmica poderia ser considerada uma modalidade promissora para o tratamento, se comprovada sua eficácia em eliminar células tumorais de mama com diferentes mecanismos de resistência.

A PDT configura-se como uma modalidade terapêutica minimamente invasiva, baseada na administração de um agente fotossensibilizador que pode ser ativado por irradiação local com luz visível (AGOSTINIS et al., 2011). Na presença de oxigênio molecular, o fotossensibilizador ativado desencadeia uma sequência de reações fotoquímicas e processos fotobiológicos, gerando espécies reativas de oxigênio (ROS) e principalmente a molécula de oxigênio singlete ( $^1O_2$ ), que são altamente citotóxicas e danificam as organelas intracelulares podendo, portanto, provocar a morte das células (YOO; HA, 2012). As vantagens da

PDT em comparação com os tratamentos convencionais, são a morbidade reduzida a longo prazo e o fato da PDT não comprometer outras opções de tratamento (ACEDO et al., 2014), podendo ser utilizada também como uma prática combinada com outras terapias, contornando as possíveis deficiências dos tratamentos convencionais (SPRING et al., 2015). A PDT já vem sendo utilizada como modalidade terapêutica alternativa em vários países para o tratamento experimental de uma variedade de cânceres, como câncer de pele, pulmão, bexiga, esôfago entre outros (AGOSTINIS et al., 2011). Em contrapartida, devido à dificuldade de acesso e disponibilidade de Ps eficientes comercialmente disponíveis e mediante a falta de padronização da técnica e de estudos sobre sua eficácia e segurança que levem em consideração a complexidade dos sistemas biológicos, esta modalidade terapêutica ainda não é uma opção de tratamento clínico (ALLISON; SIBATA, 2010; CELLI et al., 2010). O presente estudo foi focado justamente em avaliar a eficácia da MB-PDT e estudar os mecanismos moleculares envolvidos em sua citotoxicidade, contribuindo para o conhecimento básico com relação ao seu modo de ação e abrangência da terapia.

No presente trabalho foi demonstrado que a MB-PDT induziu de forma massiva a morte celular em células derivadas de duas linhagens de células de câncer de mama humano com propriedades invasivas distintas. Além disso, os resultados aqui apresentados, mostraram uma maior sensibilidade à MB-PDT pelas células MDA-MB-231, utilizada como um modelo de tumores triplo-negativos (TNBC). Este efeito é muito relevante

## Discussão

porque, pelas razões já mencionadas de falta de especificidade e eficácia, as pacientes que apresentam o tipo TNBC são um grande desafio no tratamento do câncer de mama (ECKHARDT et al., 2012). A MB-PDT se apresenta, portanto, como uma opção de tratamento para os casos mais complexos.

Nossos resultados são significativamente melhores do que os obtidos em outros trabalhos utilizando PDT para o tratamento de células tumorais de mama com outros Ps. Utilizando-se ftalocianina (Pc-PDT) como Ps, Stuchinskaya e colaboradores obtiveram apenas 25% de queda na viabilidade celular da linhagem MDA-MB-231 (STUCHINSKAYA et al., 2011). Também com Pc-PDT, Hoi e colaboradores conseguiram 80% de morte nas MCF-7 (HOI et al., 2012). Já após MX-PDT (Mitoxantrone) foi obtido 96% de morte nas mesmas células, porém o controle não irradiado também apresentou considerável diminuição da viabilidade celular (60%), demonstrando que o fotossensibilizador apresenta toxicidade no escuro, o que não é desejável para a prática da PDT (ALLISON; SIBATA, 2010; AGOSTINIS et al., 2011; MONTAZERABADI et al., 2012). Com a MB-PDT, obtivemos quase 100% de morte nas células malignas MDA-MB-231 e MCF-7, sem toxicidade no escuro.

A possibilidade de gerar menos efeitos secundários já foi descrita como sendo uma das vantagens da PDT sobre os outros tipos de tratamento para o câncer (RIZVI et al., 2010; AHN et al., 2012). Porém, entre os poucos relatos encontrados na literatura, apenas Shemesh e colaboradores demonstraram recentemente uma pequena diferença de 20% na morte

celular entre células derivadas de epitélio normal de mama, MFC-10A, e as do tipo TNBC, MDA-MB-231, submetidas à PDT com indocianina verde (SHEMESH et al., 2014). Os resultados aqui apresentados mostraram uma diferença de até 79% na morte celular induzida por MB-PDT entre as mesmas linhagens de células "normais" e malignas. O uso de Pc-PDT não mostrou nenhuma seletividade do tratamento para a célula tumoral (HOI et al., 2012), pontuando aqui mais uma vantagem da utilização do MB em comparação a outros tipos de Ps em PDT.

O insucesso terapêutico da PDT em alguns tipos de câncer decorre da utilização de Ps com propriedades ópticas, bioquímicas e farmacocinéticas inferiores e / ou variações do genótipo e fenótipo tumoral, o que pode influenciar positivamente a sobrevivência da célula tumoral após o dano oxidativo induzido pela PDT (BROEKGAARDEN, 2015). Este não foi o caso observado com a MB-PDT, uma vez que o dano maior foi causado nas células malignas. Também já foi relatado na literatura que a eficiência desta terapia pode estar diretamente associada à concentração de Ps incorporado pelas células. Os resultados do nosso grupo demonstraram não haver diferenças na quantidade de MB internalizada nas diferentes linhagens estudadas após o tempo de incubação de até 8 horas, comprovando a seletividade do tratamento pelas células malignas. Este dado também chamou a atenção para o fato de que o efeito diferencial entre células "normais" e tumorais não era devido à falta de MB para ser ativado e sim a uma característica inerente ao tipo celular e aos mecanismos biológicos acionados. Portanto, como foi demonstrada a eficácia da MB-PDT

## Discussão

em eliminar seletivamente as células que são tumorais, o que é uma característica desejável para uma terapia contra o câncer, uma vez que se diminui a chance de causar uma recidiva do tumor. Ainda discorrendo sobre os benefícios da MB-PDT, a utilização do MB como fotossensibilizador é interessante também por ter uso clínico já conhecido por décadas em outras aplicações e pela sua fácil disponibilidade e baixo custo de obtenção (OZ et al., 2010; SCHIRMER et al., 2011), o que faz com que a terapia, além de eficiente, também seja acessível.

Para contornar a deficiência de algumas estratégias de PDT já utilizadas e que falharam no seu objetivo final de induzir morte celular, muitos grupos de pesquisa visam melhorar ou desenvolver novas estratégias de PDT utilizando abordagens químicas para o aprimoramento dos Ps ou de engenharia para melhorar o acesso de luz ou entrega do Ps em regiões específicas das células. Porém, relativamente pouca pesquisa tem sido realizada sobre a biologia por trás da resistência terapêutica, incluindo os mecanismos de sobrevivência que são acionados em consequências da PDT (BROEKGAARDEN, 2015). Com a finalidade de entender a propriedade seletiva da MB-PDT pelas células tumorais e o porquê da resistência nas células MCF-10A, neste trabalho foi avaliada a capacidade de formação intracelular de  $^1\text{O}_2$ , uma das espécies comprovadamente gerada pelo MB como Ps, (OLIVEIRA et al., 2011), e a potencialidade das células para lidar com o dano oxidativo induzido pela PDT.

Ao comparar a formação de  $^1\text{O}_2$  nas três linhagens estudadas, foi possível demonstrar que a ação fotodinâmica do MB conduz à produção de níveis semelhantes de  $^1\text{O}_2$  no microambiente intracelular. Este resultado demonstrou que o potencial de formação de moléculas oxidantes a partir do  $^1\text{O}_2$  é o mesmo, não sendo este um fator limitante para a eficiência da MB-PDT. Em contrapartida, como o efeito final causado foi diferente e sabendo-se que o tempo de reatividade desta molécula é pequeno e dependente do microambiente onde foi gerado (OLIVEIRA et al., 2011), é discutível se as células apresentam capacidades diferentes de lidar com o dano oxidativo gerado, se o tipo de mecanismo de morte acionado favoreceria uma linhagem em detrimento das outras ou se no tipo celular mais resistente às espécies reativas estariam sendo formadas em um microambiente que não favorece a sua reatividade.

O estresse oxidativo tem sido implicado no desenvolvimento e progressão do câncer, o que sugere que um tratamento antioxidante possa ser uma forma de proteção para os tumores (LIU et al., 2016). Por outro lado, terapias pró-oxidantes, incluindo a radiação ionizante e agentes quimioterápicos, são amplamente utilizados em clínicas, baseando-se no princípio de que um grande estímulo oxidativo pode provocar o colapso dos sistemas antioxidantes, levando a morte celular. No entanto, esta última abordagem fornece resultados insatisfatórios em tumores primários que expressam enzimas antioxidantes em níveis muito elevados, levando a uma resistência dessas células à terapia (TRAVERSO et al., 2013). Sabendo-se que a PDT é uma terapia pró-oxidante e, portanto, capaz de causar o

## Discussão

colapso dos sistemas antioxidantes, avaliamos se a diferença na capacidade de lidar com o dano oxidativo seria a razão que explicaria a diferença de sensibilidade à MB-PDT entre as linhagens estudadas neste trabalho.

Dentre os sistemas envolvidos na manutenção do equilíbrio redox intracelular, a glutathiona desempenha um papel principal (TRAVERSO et al., 2013; LIU et al., 2014). A glutathiona é um tripeptídeo linear, constituído por ácido glutâmico, cisteína e glicina, contendo um grupo tiol na cisteína, que participa em inúmeras funções celulares em mamíferos. Ela é predominantemente encontrada no seu estado reduzido (GSH) ou como seu mais comumente produto de oxidação observado, GSSG, que é formado a partir de duas moléculas de glutathiona ligada por uma ligação dissulfeto, e é convertido em seu estado reduzido pela enzima glutathiona redutase utilizando o NADPH gerado principalmente pela via das pentoses fosfato. O sistema redox GSH / GSSG mantém um ambiente redutor global na célula, sendo a desintoxicação celular uma das funções principais da glutathiona (LIU et al., 2014). Já foi demonstrado que células TNBC apresentam uma diminuição nos níveis de GSH em comparação com os outros tipos celulares (PELICANO et al., 2014). Sabendo-se que linhagens que contêm baixos níveis de GSH tendem a ser mais sensíveis a terapias que envolvem a ativação desta maquinaria redox (TRAVERSO et al., 2013), foi avaliado se no nosso modelo os níveis basais de GSH eram diferentes entre as linhagens estudadas. Os resultados obtidos confirmaram que as células TNBC apresentam níveis mais baixos de GSH intracelular e que, portanto, este fato pode estar relacionado com a menor capacidade destas em responder

ao estresse oxidativo induzido pela MB-PDT. Este resultado ajuda a explicar as diferenças observadas entre os modelos estudados e reforça a MB-PDT como uma estratégia terapêutica com grande potencial para efetivamente matar as células tumorais para as quais não existem alvos terapêuticos específicos, pelo simples fato de impactar propriedades metabólicas diferentes daquelas encontradas em tecidos normais.

A quantificação da morte celular é o fator crítico para se determinar o potencial de um composto ou de uma terapia em eliminar as células do tumor. Os nossos resultados comprovaram o potencial da MB-PDT para este fim. Porém, um melhor entendimento sobre os diferentes efetores e as vias ativadas responsáveis por modular a citotoxicidade é fundamental para se aprimorar o tratamento (Hoi et al, 2012). Existem poucos estudos *in vitro* detalhando sistematicamente os mecanismos moleculares induzidos por PDT que comparam os efeitos tanto em células tumorais como em “normais”. Inicialmente, acreditava-se que a PDT matava as células apenas por apoptose ou necrose acidental, porém, através de relatos mais recentes acredita-se que o mecanismo de morte celular provocado pela PDT é na verdade dependente das condições de tratamento empregadas, da natureza, concentração e localização intracelular do Ps, além do tipo celular (Garg et al, 2011; Castano et al, 2005). Neste trabalho foram avaliadas diferentes vias de morte celular que poderiam ser responsáveis pelo efeito da MB-PDT, levando em consideração parâmetros de quantidade de energia empregada e concentração e localização intracelular do Ps em mais de um tipo celular.

## Discussão

Em células MCF-7 expressando caspase-3 de forma induzida, após Pc-PDT foram observadas características típicas de apoptose só após 24 horas de tratamento (XUE; CHIU; OLEINICK, 2001). Hoi e colaboradores demonstraram que a apoptose é o mecanismo principal responsável pela morte tumoral em MCF-7 após Pa-PDT (PDT com feoforbida). Em células de melanoma foi revelado que a ativação de apoptose após MB-PDT é dose-dependente, mas que este mecanismo é apenas parcialmente responsável pela eficácia da terapia (WAGNER et al., 2012). Já em células de carcinoma de ovário A2780, a marcação de núcleos com Hoechst 33342 suportam a ideia de que não ocorre apoptose após tratamento com cisplatina e ativação com UVA (WESTENDORF et al., 2012). No presente trabalho foram apresentados resultados mostrando que, para as três linhagens, a morfologia dos núcleos não apresentou a clássica aparência dos núcleos apoptóticos, característico de morte celular por apoptose, indicando não ser este o mecanismo principal responsável pela morte celular.

Outros autores também afirmam que o tipo predominante de morte celular depende do protocolo de PDT adotado, e que pode haver variações de apoptose à necrose, dependendo, por exemplo, da dose de Ps ou de luz utilizada (AGOSTINIS et al., 2011). No presente estudo não foi observada presença de traços apoptóticos após qualquer dose de MB, tempo de tratamento ou irradiação utilizados. Também não houve atividade significativa da caspase-3 efetora em nenhum tempo analisado após MB-PDT. Além disso, a viabilidade celular não foi completamente restaurada com a utilização de inibidores de caspases. Outro fator que suporta a

possível participação de outras via de morte é o fato de que a ação da MB-PDT não poderia ser exercida exclusivamente por apoptose, uma vez que as células MCF-7, que expressam uma forma inativa da caspase-3 (XUE; CHIU; OLEINICK, 2001; DEVARAJAN et al., 2002), morrem após MB-PDT.

Outro dado que comprova que a apoptose não é o principal mecanismo de morte ativado pela MB-PDT nessas células, foi o fato de nenhuma das condições de tratamento testadas ter levado a uma diminuição nos níveis de BCL2 em relação aos níveis de BAX. Inclusive, para as células MCF-10A e MDA-MB-231, em algumas condições observou-se o aumento da proteína anti-apoptótica em relação à pró-apoptótica. Isso poderia, ao menos em parte, ser explicado pelo crescimento do tumor frequentemente levar à hipóxia, uma vez que o tecido tumoral em crescimento passa por um quadro de baixo suprimento de sangue e oxigênio. As células tumorais em resposta a condições suaves de hipóxia têm ativação constitutiva do fator de transcrição HIF-1, que, por sua vez, conduz a transcrição de genes envolvidos no metabolismo anaeróbico, inflamação e mecanismos antioxidantes. Como resultado, dispara-se um processo inflamatório, estímulo da angiogênese e aumento do processo de metástase (SEMENZA, 2007), que é uma característica das células do tipo TNBC. Quando em condições agudas de hipóxia ou anóxia, as células tumorais apresentam uma hiperativação de HIF-1 e, conseqüentemente aumento das respostas para fins de sobrevivência (BROEKGAARDEN, 2015). A ativação de HIF-1 tem sido observada em vários estudos de PDT (GOMER, 2012). No contexto de morte celular, HIF-1 tem influência ao

## Discussão

regular proteínas da família BCL2 (como BCL2, BCL-XL), por meio da ativação da transcrição de seus genes (BROEKGAARDEN, 2015). Neste trabalho foi observado o aumento expressivo de BCL2 nas células do tipo TNBC submetidas à MB-PDT. Diante do exposto, este aumento pode ser uma resposta deste tipo de células como tentativa de adaptação ao dano sofrido pela MB-PDT. No presente estudo, não foi avaliado se os danos provocados pela MB-PDT modulariam os níveis de HIF-1 e se isso ocorreria de forma diferencial entre as linhagens estudadas. Caberia, portanto, uma avaliação dos níveis de HIF-1, basais e após o tratamento, para estudar se existe associação entre a ativação diferencial deste fator e a sobrevivência das células mais resistentes à MB-PDT.

As espécies reativas do oxigênio (ROS) estão envolvidas numa série de processos, podendo desencadear a oxidação do citocromo-c presente na mitocôndria. O citocromo-c oxidado, se liberado para o citosol, é capaz de ativação da cascata de caspases, responsáveis pela morte por apoptose. A liberação de citocromo-c para o citosol ocorre através de um processo conhecido como permeabilização da membrana mitocondrial externa (MOMP) e este processo envolve a ativação dos membros pro-apoptóticos da família BCL2, BAX e BAK (ANDERSEN; KORNBLUTH, 2013). Neste contexto, a inibição de formação da MOMP deveria citoprotoger a célula de um dano oxidativo induzido. Porém, ao invés de citoprotoger, essa estratégia aumentou a sensibilidade das células ao tratamento com MB-PDT. Este dado reafirma que o mecanismo inicial de morte ativado pela MB-PDT não seria o processo de apoptose clássica e configura-se como sendo

um processo independente da mitocôndria. Por outro lado, a inibição da formação da MOMP também impede a liberação para o citosol dos inibidores de apoptose (IAPs) após a MOMP (DUPREZ et al., 2009). Sem a presença de IAPs o processo de apoptose estaria facilitado nas células tratadas com MB-PDT, o que explicaria o aumento da morte celular observado na condição de cotratamento com o inibidor de BAX. Mesmo quando a morfologia nuclear das células submetidas a PDT na presença do inibidor de Bax não apresentassem evidências de apoptose, estudos bioquímicos mais aprofundados deveriam ser levados a cabo a fim de poder chegar a uma conclusão mais definitiva sobre este tópico.

A independência da mitocôndria para a morte após MB-PDT foi confirmada após demonstrarmos que o MB não está presente na sua forma ativa para reagir com o oxigênio e a luz na mitocôndria e, portanto, sem possibilidade de que esta organela esteja sendo danificada pela MB-PDT. Também já foi relatado na literatura que o MB quando presente nas mitocôndrias pode se encontrar em estado reduzido e portanto, sem potencial para ser fotoativado (OLIVEIRA et al., 2011). Esta é uma outra explicação para não poder ser esta organela o alvo principal para o dano oxidativo causado pela MB-PDT. Apesar de não termos avaliado se a mitocôndria está funcional nas células após o tratamento com MB-PDT, pelas evidências acima expostas descartamos ser a apoptose o mecanismo principal responsável pela morte das células após MB-PDT.

As células podem responder diferencialmente a um mesmo estímulo de morte, dependendo da rede de sinais gerados em locais específicos, já

## Discussão

que, como mencionado anteriormente, o primeiro alvo das reações fotoquímicas resultantes da ativação do Ps são as moléculas mais próximas fisicamente a ele (GALLUZZI; BRAVO-SAN PEDRO; KROEMER, 2014). Estudos anteriores que exploraram a localização subcelular do MB indicaram que este Ps apresenta maior tendência em se acumular nos lisossomos das células vivas (OLIVEIRA et al., 2011). No presente estudo foram confirmamos estes dados. Além disso, pela primeira vez, foram geradas provas de padrões diferenciais de concentração do MB nos lisossomos em diferentes linhagens de células epiteliais derivadas do mesmo tecido. Um fato interessante observado foi que nas células do tipo TNBC, que se mostraram mais sensíveis à MB-PDT, a localização lisossomal do MB foi mais evidente. Uma vez que a localização do Ps está diretamente relacionada com o tipo e extensão do dano causado (BACELLAR et al., 2015), este dado também contribui para explicar a sensibilidade diferencial observada entre as três células analisadas. Uma forma de comprovar que a localização diferencial do MB influencia no efeito final da MB-PDT é considerar que o microambiente intracelular influencia na reatividade do  $^1O_2$  gerado pela PDT e analisar o tempo de meia vida intracelular desta molécula após a fotoativação do MB. Outra abordagem seria a avaliação da participação de outras organelas importantes para a morte celular induzida por estresse oxidativo, como é o caso do retículo endoplasmático (RE). Uma vez o MB localizado no RE poderia se avaliar se as vias de resposta ao estresse mediadas por esta organela teriam participação no processo de morte ativado pela MB-PDT.

No que diz respeito a localização lisossomal de MB, foi explorado o papel da autofagia basal nas linhagens de células estudadas e a ativação desta via no contexto de MB-PDT. A autofagia parece ter diferentes funções nos tumores, desempenhando um papel complexo na sua iniciação e progressão, mas também protegendo contra os efeitos deletérios das ROS. Durante as etapas iniciais da formação de tumores *in vivo*, antes que ocorra a vascularização, a autofagia é necessária para a sobrevivência das células sob as condições de hipóxia. No tumor totalmente estabelecido, a autofagia parece funcionar como um supressor de tumor, uma vez que deficiências nesta via estão associados com a transformação maligna e carcinogênese. Estudos têm demonstrado que as células cancerosas expressam níveis menores das proteínas relacionadas com a autofagia LC3-II e Beclina-1 (BECN1) do que as células epiteliais normais (ZARZYNSKA, 2014). Nossos resultados, comparando o nível basal de autofagia entre as linhagens, comprovam que a linhagem "normal" MCF-10A apresenta maiores níveis de LC3-II em relação às linhagens tumorais MCF-7 e MDA-MB-231. Além disso, observamos o inverso com os níveis da proteína p62, que são maiores nas linhagens malignas. Também conhecida como sequestossoma 1 (SQSTM1), a p62 é uma proteína citoplasmática multifuncional, capaz de se ligar não covalentemente à ubiquitina e várias proteínas de sinalização, sugerindo um papel regulador conectado à via da ubiquitina-proteassoma e agindo como um substrato seletivo do processo de autofagia. Quando essa via encontra-se interrompida, p62 se acumula e forma agregados contendo ubiquitina (RUSTEN; STENMARK, 2010). Uma função importante na

## Discussão

promoção de sinais de sobrevivência tem sido associada à p62, incluindo proliferação, diferenciação e indução de genes anti-apoptóticos. A expressão anormal de p62 tem sido documentada em vários tipos de câncer, incluindo o da mama, e o grau de expressão de p62 já foi significativamente correlacionado com a formação de metástases distantes. Assim sendo, existem relatos de que a superexpressão de p62 estaria associada a tumores do tipo TNBC, que exibem um comportamento clínico agressivo (LUO et al., 2013). Os resultados obtidos pelo nosso grupo corroboram esta correlação e, junto à análise de expressão de LC3-II, estes dados indicariam uma maior eficiência do processo autofágico nas células "normais" MCF-10A. Com um processo de degradação e reciclagem mais eficiente, a célula "normal" tenderia a ser mais capaz de se recuperar dos danos oxidativos causados pela MB-PDT, sendo, também por este fato, mais resistente à terapia.

A autofagia modula a viabilidade das células. No entanto, o papel da autofagia como mecanismo de morte celular é controverso. A presença de vacúolos autofágicos em células que estão em processo de morte pode ser interpretada de duas maneiras: ou a autofagia foi ativada em uma tentativa de sobrevivência, ou é uma parte do processo de morte celular (O'REILLY et al., 2015). A relação entre autofagia e morte celular em PDT tem sido constantemente discutida na literatura. Alguns estudos apontaram esta via como responsável pelos danos às células geradas por diferentes Ps (PANZARINI; INGUSCIO; DINI, 2011; XU et al., 2013). Outros mostraram que este tipo de morte celular ocorre apenas se a célula é

resistente à apoptose clássica, tal como um resultado de mutações em genes essenciais relacionadas com a apoptose, como membros da família BCL2 ou das caspases (XUE et al., 2007; REINERS et al., 2010). Os dados aqui apresentados mostraram que a intensificação da via autofágica pela MB-PDT resulta em citoproteção, no caso das linhagens que não apresentam mutações para proteínas das vias apoptótica ou autofágica, ou citotoxicidade, para o caso das células que são resistentes à morte por ativação de caspase-3 e tem menor capacidade autofágica por deleção monoalélica de BECN1.

Dados na literatura suportam ainda que BECN1 pode agir alterando a expressão de várias outras proteínas relacionadas com o processo de autofagia, tais como ATG5 e UVRAG (JIANG; MIZUSHIMA, 2014). Uma prova mais importante que liga disfunções na autofagia com câncer vem de estudos que demonstram que a inibição da autofagia em camundongos, pela deleção de BECN1, aumenta a proliferação celular e a frequência de neoplasias espontâneas (câncer de pulmão, fígado e linfomas), bem como hiperplasia mamária, e acelera o desenvolvimento de lesões pré-malignas induzida por carcinogênicos. Deleções monoalélicas de BECN1 tem sido detectada em 40-75% dos casos de câncer da mama, do ovário, e tumores de próstata humanos e essa expressão anormal de BECN1 em vários tipos de biopsias de tumores se correlaciona com mau prognóstico da doença. A MCF-7 e outras muitas linhagens celulares de carcinoma da mama, embora poliploides para o cromossomo 17 (onde o gene BECN1 é alocado), apresentam deleções de BECN1 em um ou mais alelos (DALBY et al., 2010;

## Discussão

ZARZYNSKA, 2014). Esse fato explica a menor estimulação da autofagia nas células MCF-7 tratadas com MB-PDT, bem como os resultados de menor efeito da MB-PDT quando do silenciamento de ATG5 e a maior sensibilidade à terapia quando a autofagia foi estimulada.

Diferentes vias de sinalização para sobrevivência são constitutivamente ativadas em células tumorais. Esta característica aliada ao fato dos tumores serem resistentes a mecanismos clássicos de morte é um ponto relevante na escolha e na concepção de terapias anticâncer, que para serem eficientes, deveriam ser capazes de ativar a morte das células por diferentes vias (PANZARINI; INGUSCIO; DINI, 2011). No presente estudo foi mostrado que apoptose e autofagia estão relacionadas, mas não são o principal mecanismo responsável pela morte das células tratadas com MB-PDT, e foram proporcionadas fortes evidências de que existe a indução de mecanismos de necrose regulada. O mecanismo de necroptose, dependente da proteína RIPK1, participa de forma expressiva, independente da célula analisada. Junto à permeabilização da membrana do lisossomo, da qual forma mostrados indícios de estar acontecendo nas células tratadas com MB-PDT, pode-se afirmar que as vias de necrose regulada são ativadas pela MB-PDT e que estas são as principais responsáveis pelo seu efeito final. Com o conjunto de dados apresentados neste trabalho, foi mostrado pela primeira vez que a MB-PDT é capaz de ativar múltiplas vias de morte, dependendo do tipo celular. Seria interessante explorar mais os diferentes mecanismos de necrose regulada que estão sendo descritos recentemente na literatura. A partir dos nossos

resultados é muito pertinente avaliar mais profundamente o mecanismo de necroptose, avaliando a expressão e o efeito da inibição de proteínas *downstream* a RIPK1. Também seria inédito demonstrar mais detalhadamente o mecanismo de LMP induzida por MB-PDT, uma vez que dados preliminares nossos interessadamente mostram uma atividade citosólica de catepsina-B/L após MB-PDT, o que é indicativo de dano lisossomal.

Outra característica das células tumorais, além da resistência a mecanismos de morte celular programada, mas que é igualmente importante para a manutenção do tumor, é a capacidade de evasão do sistema imune (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Dessa forma, a capacidade de estimulação do sistema imune por uma terapia pode torna-la ainda mais efetiva no tratamento do câncer. Neste sentido, outro ponto a ser explorado a fim de promover a MB-PDT como tratamento alternativo para o câncer foi o de avaliar a sua capacidade de ativar o sistema imune do hospedeiro para eliminação completa do tumor.

A ativação do sistema imune neste contexto depende essencialmente da interação sinérgica entre células imunes e as células tumorais mortas. Por conseguinte, o tratamento deve envolver a ação citotóxica direta sobre células tumorais com potencial para estimular o sistema imunológico com base no reconhecimento de sinais emitidos pelas células danificadas, os chamados DAMPs (do inglês - *Damage Associated Molecular Patterns*) (PANZARINI; INGUSCIO; DINI, 2011). Na nomenclatura recente sobre morte celular, o processo de morte que envolve a exposição destes sinais

## Discussão

citotóxicos que são depois reconhecidos por células apresentadoras de antígenos tem sido classificado como morte celular imunogênica (ICD – do inglês *Immunogenic Cell Death*) (GARG; DUDEK; AGOSTINIS, 2013; ADKINS et al., 2014).

Apesar de ser uma estratégia ideal, poucas terapias convencionais são capazes de ativar a ICD e, portanto, serem realmente eficientes na eliminação do tumor (INOUE; TANI, 2014). Recentemente tem sido demonstrado que a PDT utilizando alguns tipos de Ps, como a hipericina e a fotofrina, é capaz de ativar ICD, mas este fenômeno não ocorre para todos os compostos Ps (GARG; DUDEK; AGOSTINIS, 2013; PANZARINI et al., 2014) e pouco se sabe sobre o impacto da PDT no sistema imune humano (ADKINS et al., 2014). Este aspecto ainda não tinha sido explorado com o MB até este trabalho, onde foi demonstrado que a MB-PDT tem potencial de ativar uma resposta pró-inflamatória do sistema imune, por estimular a proliferação de linfócitos T CD4+, o que na prática resultaria em uma eliminação completa do tumor, sem deixar possibilidade de recorrência da doença. Contudo, identificar os tipos de DAMPs liberadas pelas células após MB-PDT e determinar qual o tipo de resposta imune é ativada ainda seria muito importante para uma melhor caracterização dos efeitos sistêmicos da MB-PDT mediados pelo sistema imune.

Além da eliminação completa do tumor, uma grande vantagem das vias oncoimunológicas ativadas por PDT, considerando-se a ação localizada na região primária do tumor, é que estas podem desencadear uma resposta imune antitumoral mediada por Células T específicas para o antígeno das

células tumorais, sendo desta forma capaz de agir em células tumorais distantes que não foram primariamente atingidas pela PDT (efeito abscopal) (BROEKGAARDEN, 2015). Esta observação é um fato muito importante para promoção da PDT como tratamento antitumoral, uma vez que vem combater a maior crítica associada à utilização desta terapia na clínica, que seria a sua limitação para o tratamento de tumores em estágios mais avançados.

De um ponto de vista oncológico, é de fundamental importância a terapia ser capaz de atingir o objetivo final de eliminar completamente as células tumorais (KREUZALER; WATSON, 2012). Nesse sentido, no presente estudo foi demonstrado que a MB-PDT tem este potencial, tanto pela ativação de diferentes vias de morte celular, como pela estimulação do sistema imune. Porém, apesar de análises funcionais de terapias para controle do câncer e da sua proliferação ser facilitado pela disponibilidade de linhagens imortalizadas, isoladas de tumores humanos e que são caracterizadas e adaptadas para cultivo em monocamada em laboratório, é fundamental levar em consideração as interações entre células e o microambiente tecidual para se comprovar a eficácia de um determinado tratamento. Uma cultura de células 3D é um ambiente criado artificialmente no qual as células podem crescer em uma citoarquitetura mais parecida com a real e interagindo com uma matriz extracelular. Como o cultivo de células em 3D apresenta uma heterogeneidade, pela formação de microambientes e exposição diferencial a diversos fatores como nutrientes e oxigênio, este representa um modelo importante para estudo de

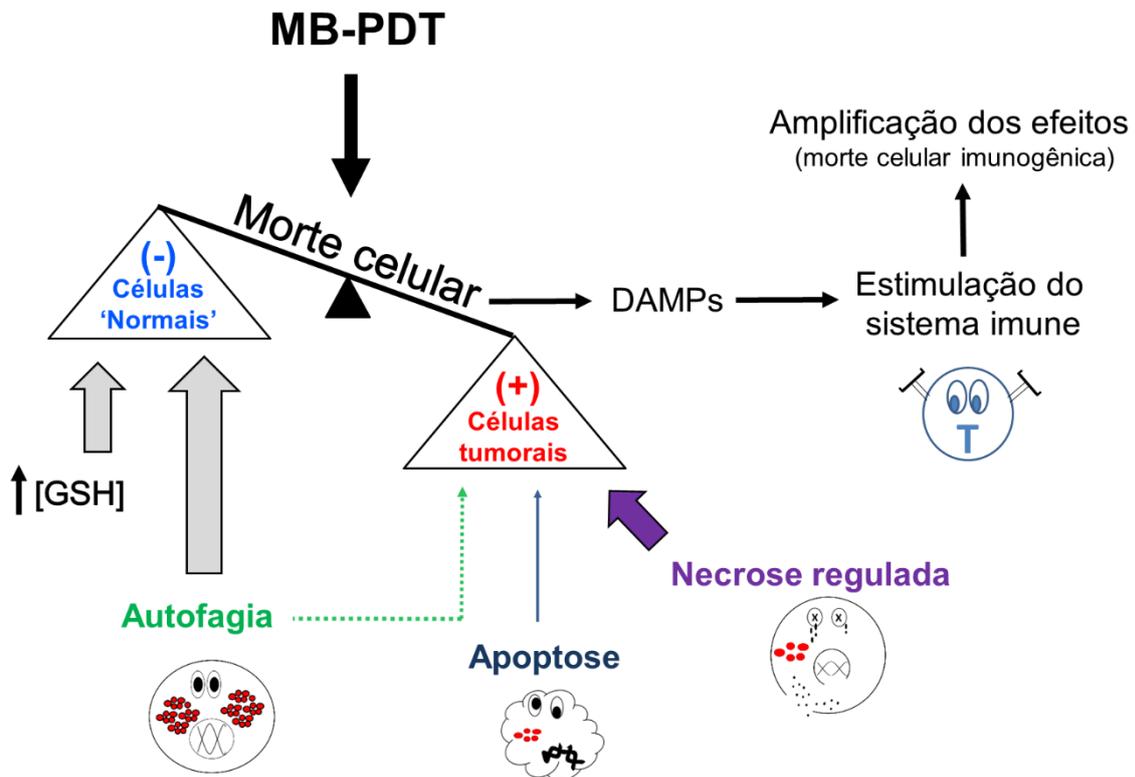
## Discussão

localização, incorporação e bioatividade de drogas (Nandakumar et al, 2012). Neste trabalho foi também levado em consideração a complexidade do microambiente do tumor, realizando testes da MB-PDT em células cultivadas em esferoides (cultivo 3D), como descrito por Lee e colaboradores (2007).

Poucos trabalhos lançaram mão desta estratégia para demonstração do efeito da PDT. Wright e colaboradores conseguiram 60% de morte celular em esferoides de MCF-7 utilizando mTHPC-PDT, sendo também observado toxicidade no escuro superior aos resultados aqui apresentados utilizando MB como Ps (WRIGHT et al., 2009). O nosso grupo demonstrou que quando é permitido o restabelecimento de características bioquímicas e morfológicas que se assemelham às condições das células no seu ambiente *in vivo* a MB-PDT também é eficiente e é ainda mais seletiva. Esta resposta preferencial da MB-PDT em células tumorais pode ser devido ao efeito protetor exercido pela organização da membrana basal do tecido não tumoral (KENNY et al., 2008; BISSELL; GHAJAR; LEE, 2012). Este dado enriquece ainda mais este trabalho no sentido de reforçar a seletividade da MB-PDT utilizando células tumorais de mama. Seria válido avaliar se os mecanismos de morte ativados são diferentes da condição em monocamada, o que ajudaria também a explicar a maior seletividade da MB-PDT em esferoides. Diante de dados tão promissores, torna-se também fundamental a avaliação da eficácia da MB-PDT *in vivo*, aplicando o tratamento em modelo animal para tumor de mama ou em massas de tumores primários, isoladas de pacientes para se avaliar a citotoxicidade e

a seletividade neste contexto. Ainda assim, a melhor análise da eficácia da MB-PDT seria a sua aplicação junto a pacientes que já se encontram em tratamento, para avaliar se a terapia ajuda na remoção total do tumor, atuando nas células resistentes às terapias convencionais, diminuindo o risco de metástases. Ou ainda ajudando na melhora do quadro clínico de pacientes em estágios avançados. Existem muitas formas de aplicação da PDT, que incluem a aplicação local ou sistêmica, por via endovenosa, do Ps e irradiação utilizando um sistema de entrega de luz localizada na região a ser tratada (CELLI et al., 2010). Para melhor efeito do tratamento em tumores na mama nós propomos um tratamento localizado, no momento da cirurgia de remoção do tumor, para que seja acessível tanto ao MB como à fonte de luz, não sendo o acesso ao tumor uma limitação para utilização desta prática. Desse modo a MB-PDT estaria atuando como uma forma de garantir que caso alguma célula maligna tenha restado no local de ablação do tumor, ela sucumba por MB-PDT sem danificar o tecido adjacente, diminuindo as chances de recidiva.

Como resumo dos resultados obtidos nesta tese, na **Figura 34** elaboramos um esquema dos mecanismos mais importantes acionados pela MB-PDT. O conjunto de resultados obtidos neste projeto contribuem para esclarecer mecanismos moleculares desconhecidos e demonstram a eficácia da MB-PDT *in vitro* e apontam para o seu potencial como terapia alternativa para este tipo de tumor, principalmente para os casos mais agressivos, deixando em aberto a necessidade dos testes *in vivo* fundamentais para o desenvolvimento e viabilização dessa estratégia na clínica.



**Figura 34: Resumo dos efeitos da MB-PDT nas células derivadas do tecido mamário humano.** MB-PDT induz expressiva morte celular em linhagens tumorais, mas não em células normais derivadas do mesmo tecido. O aumento dos níveis de GSH são importantes para a resistência da célula ao estresse oxidativo induzido por MB-PDT. A autofagia é ativada por MB-PDT como mecanismo de resposta citoprotetor, exceto quando as células são deficientes na execução deste mecanismo de resposta ou é resistente a algum mecanismo clássico de morte (por exemplo, as células MCF-7). A apoptose é induzida, mas não é o mecanismo de morte predominante e, a partir da comprovação da ativação do mecanismo de necroptose e da observação de permeabilização da membrana lisossomal, propõe-se que os principais mecanismos responsáveis pela morte de células submetidas à MB-PDT sejam vias de necrose regulada. A morte das células tratadas com MB-PDT libera fatores imunogênicos que são capazes de estimular o mecanismo de morte celular imunogênica no tecido tratado.

## **6. Conclusões**

### **Conclusões**

Quando comparado com outros estudos de PDT com câncer de mama, a MB-PDT tem grande potencial de ação em eliminar células tumorais de mama com diferentes propriedades invasivas, mas sendo de ação mais expressiva em tumores do tipo mais agressivo, sem apresentar citotoxicidade do MB no escuro. Estes resultados superam uma ressalva importante em muitos estudos sobre PDT que utilizam Ps que apresentam toxicidade no escuro e que abordam o efeito da terapia em apenas uma linhagem de células ou em linhagens originadas de tecidos diferentes.

Neste trabalho nos preocupamos em manter um enfoque mais terapêutico, visando desvendar os mecanismos envolvidos, mas mantendo a intenção inicial da importância da eficácia, toxicidade, factibilidade e seletividade. Foi demonstrado, pela primeira vez, que as células "normais" de epitélio mamário são mais resistentes à MB-PDT do que as células tumorais derivadas do mesmo tecido. Estas são características fundamentais para a utilização segura da terapia, reforçando o fato de que uma das vantagens da PDT sobre outros tipos de tratamentos para o câncer é a possibilidade de gerar menos efeitos colaterais para os pacientes.

Sobre os mecanismos envolvidos foi revelado que a MB-PDT é capaz de ativar diferentes vias de morte celular, sendo, portanto, capaz de contornar diferentes mecanismos de resistência inerentes às células tumorais. Além disso foi possível demonstrar o potencial imunogênico da MB-PDT, pontuando mais uma vantagem desta terapia para o tratamento do câncer.

Com relação à efetividade desta terapia em modelos mais complexos, utilizando o cultivo de células em esferoides, que retomam as características do tumor em seu ambiente tumoral *in vivo*, foi reconfirmado o potencial da MB-PDT em eliminar seletivamente as células malignas. Esse resultado é de extrema importância para suportar a hipótese de que a MB-PDT pode ser eficaz no tratamento do câncer de mama *in vivo*.

Finalmente, com o conjunto de dados obtidos neste estudo, propomos que MB-PDT poderia ser uma alternativa terapêutica eficaz e segura para o controle de proliferação de células tumorais de mama, com possibilidade minimizar de forma drástica os efeitos colaterais.

## **7. Perspectivas**

## Perspectivas

Os resultados obtidos neste trabalho proporcionaram novas perguntas que nos permitem propor as seguintes perspectivas para continuação deste estudo:

- Avaliar a presença do MB no retículo endoplasmático e se o efeito de morte induzido pela MB-PDT está associado à ativação do estresse de retículo.
- Calcular o tempo de meia vida da molécula de  $^1\text{O}_2$  e avaliar se este fator seria também responsável pelo efeito diferencial na morte entre as linhagens estudadas.
- Avaliar a expressão de HIF-1, basal e após o tratamento, para avaliar se existe uma associação entre a ativação diferencial deste fator e a sobrevivência das células mais resistentes à MB-PDT.
- Realizar mais experimentos explorando a via da necroptose, como a avaliação da expressão de RIPK3, inibição desta proteína e avaliação da resposta da célula à MB-PDT, avaliação da fosforilação de MLKL e silenciamento desta proteína e avaliação da resposta da célula à MB-PDT.
- Confirmar os resultados de LMP nas células tratadas com MB-PDT com experimentos de imunofluorescência, utilizando anticorpos contra catepsinas, e utilizar inibidores destas enzimas para avaliar a resposta das células à MB-PDT.

## Perspectivas

- Verificar se a função mitocondrial estaria prejudicada após MB-PDT para confirmação dos dados de independência da mitocôndria para o processo de morte.
- Identificar os tipos de DAMPs liberadas pelas células após MB-PDT e determinar qual o tipo de resposta imune é ativado.
- Avaliar se as vias de morte ativadas nos esferoides tratados com MB-PDT são as mesmas observadas nas células em monocamada.
- Realizar testes da MB-PDT *in vivo* em modelos animais para o câncer de mama.
- Avaliar a eficácia desta terapia para o tratamento de outros tipos de tumores.

## **8. Referências**

## Referências

ACEDO, P.; STOCKERT, J. C.; CAÑETE, M.; VILLANUEVA, A. Two combined photosensitizers: a goal for more effective photodynamic therapy of cancer. **Cell death & disease**, v. 5, p. e1122, 2014.

ADKINS, I.; FUCIKOVA, J.; GARG, A. D.; AGOSTINIS, P.; ŠPÍŠEK, R. Physical modalities inducing immunogenic tumor cell death for cancer immunotherapy. **Oncoimmunology**, v. 3, n. 12, p. e968434, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25964865>>.

AGOSTINIS, P.; BERG, K.; CENGEL, K. a; FOSTER, T. H.; GIROTTI, A. W.; GOLLNICK, S. O.; HAHN, S. M.; HAMBLIN, M. R.; JUZENIENE, A.; KESSEL, D.; KORBELIK, M.; MOAN, J.; MROZ, P.; NOWIZ, D.; PIETTE, J.; WILLSON, B. C.; GOLAB, J. Photodynamic Therapy of Cancer: An Update. **American Cancer Society**, v. 61, p. 250–281, 2011.

AHMAD, A. Pathways to breast cancer recurrence. **ISRN oncology**, v. 2013, p. 290568, 2013. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3603357&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

AHN, T.-G.; LEE, B.-R.; CHOI, E.-Y.; KIM, D. W.; HAN, S.-J. **Photodynamic therapy for breast cancer in a BALB/c mouse model** *Journal of Gynecologic Oncology*, 2012. .

ALLISON, R. R.; SIBATA, C. H. Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: A clinical review. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 7, n. 2, p. 61–75, 2010.

AMERICAN CANCER SOCIETY. Cancer Facts & Figures 2015. **Cancer Facts & Figures 2015**, p. 1–9, 2015.

ANDERSEN, J. L.; KORNBLUTH, S. The Tangled Circuitry of Metabolism and Apoptosis. **Molecular Cell**, v. 49, n. 3, p. 399–410, fev. 2013. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1097276513000518>>.

BACAC, M.; STAMENKOVIC, I. Metastatic Cancer Cell. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 3, n. 1, p. 221–247, fev. 2008. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.pathmechdis.3.121806.151523>>.

BACELLAR, I. O. L.; TSUBONE, T. M.; PAVANI, C.; BAPTISTA, M. S. Photodynamic Efficiency: From Molecular Photochemistry to Cell Death. p. 20523–20559, 2015.

BERGHE, T. Vanden; LINKERMANN, A.; JOUAN-LANHOUE, S. pathways. v. 15, n. February, p. 135–147, 2014.

BERTRAND, M. J. M.; MILUTINOVIC, S.; DICKSON, K. M.; HO, W. C.; BOUDREAU, A.; DURKIN, J.; GILLARD, J. W.; JAQUITH, J. B.; MORRIS, S. J.; BARKER, P. A. cIAP1 and cIAP2 Facilitate Cancer Cell Survival by Functioning as E3 Ligases that Promote RIP1 Ubiquitination. **Molecular Cell**, v. 30, n. 6, p. 689–700, 2008.

BISSELL, M. J.; GHAJAR, C. M.; LEE, L. P. From single cells to biology. **Integrative Biology**, v. 4, n. 4, p. 357, 2012.

BOZIC, I.; ANTAL, T.; OHTSUKI, H.; CARTER, H.; KIM, D.; CHEN, S.; KARCHIN,

- R.; KINZLER, K. W.; VOGELSTEIN, B.; NOWAK, M. A. Accumulation of driver and passenger mutations during tumor progression. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 43, p. 18545–50, 2010. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2972991&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.
- BROEKGAARDEN, M. Tumor cell survival pathways activated by photodynamic therapy: a molecular framework for inhibition strategies. **Cancer metastasis reviews**, p. 1–78, 2015. Disponível em: <<https://webmail.amc.nl/owa/\npapers2://publication/uuid/4C248BB0-A12C-4846-B9D3-622C4B470577>>.
- CANCER, T.; ATLAS, G. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. p. 1–10, 2012.
- CELLI, J. P.; SPRING, B. Q.; RIZVI, I.; EVANS, C. L.; SAMKOE, K. S.; VERMA, S.; POGUE, B. W.; HASAN, T. Imaging and Photodynamic Therapy: Mechanisms, Monitoring, and Optimization. p. 2795–2838, 2010.
- CHAN, K. K.; MATCHETT, K. B.; MCENHILL, P. M.; DAKIR, E. H.; MCMULLIN, M. F.; EL-TANANI, Y.; PATTERSON, L.; FAHEEM, A.; RUDLAND, P. S.; MCCARRON, P. A.; EL-TANANI, M. Protein deregulation associated with breast cancer metastasis. **Cytokine & growth factor reviews**, v. 26, n. 4, p. 415–423, 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359610115000453>>.
- DALBY, K. N.; TEKEDERELI, I.; LOPEZ-BERESTEIN, G.; OZPOLAT, B. Targeting the prodeath and prosurvival functions of autophagy as novel therapeutic strategies in cancer. **Autophagy**, v. 6, n. 3, p. 322–9, abr. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20224296>>.
- DEVARAJAN, E.; SAHIN, A. a; CHEN, J. S.; KRISHNAMURTHY, R. R.; AGGARWAL, N.; BRUN, A.-M.; SAPINO, A.; ZHANG, F.; SHARMA, D.; YANG, X.-H.; TORA, A. D.; MEHTA, K. Down-regulation of caspase 3 in breast cancer: a possible mechanism for chemoresistance. **Oncogene**, v. 21, n. 57, p. 8843–8851, 2002.
- DIMRI, G.; BAND, H.; BAND, V. Mammary epithelial cell transformation: insights from cell culture and mouse models. **Breast cancer research: BCR**, v. 7, n. 4, p. 171–179, 2005.
- DUPREZ, L.; WIRAWAN, E.; BERGHE, T. Vanden; VANDENABEELE, P. Major cell death pathways at a glance. **Microbes and Infection**, v. 11, n. 13, p. 1050–1062, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.micinf.2009.08.013>>.
- ECKHARDT, B. L.; FRANCIS, P. a.; PARKER, B. S.; ANDERSON, R. L. Strategies for the discovery and development of therapies for metastatic breast cancer. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 11, n. 6, p. 479–497, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrd2372>>.
- FESTJENS, N.; VANDEN BERGHE, T.; VANDENABEELE, P. Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: Signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, v. 1757, n. 9-10, p. 1371–1387, 2006.
- FULDA, S.; DEBATIN, K.-M. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. **Oncogene**, v. 25, p. 4798–4811, 2006.

## Referências

GALLUZZI, L.; BRAVO-SAN PEDRO, J. M.; KROEMER, G. Organelle-specific initiation of cell death. **Nature Cell Biology**, v. 16, n. 8, p. 728–736, 1 ago. 2014. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/ncb3005>>. Acesso em: 1 ago. 2014.

GALLUZZI, L.; BRAVO-SAN PEDRO, J. M.; VITALE, I.; AARONSON, S. a; ABRAMS, J. M.; ADAM, D.; ALNEMRI, E. S.; ALTUCCI, L.; ANDREWS, D.; ANNICCHIARICO-PETRUZZELLI, M.; BAEHRECKE, E. H.; BAZAN, N. G.; BERTRAND, M. J.; BIANCHI, K.; BLAGOSKLONNY, M. V; BLOMGREN, K.; BORNER, C.; BREDESEN, D. E.; BRENNER, C.; CAMPANELLA, M.; CANDI, E.; CECCONI, F.; CHAN, F. K.; CHANDEL, N. S.; CHENG, E. H.; CHIPUK, J. E.; CIDLOWSKI, J. a; CIECHANOVER, a; DAWSON, T. M.; DAWSON, V. L.; DE LAURENZI, V.; DE MARIA, R.; DEBATIN, K.-M.; DI DANIELE, N.; DIXIT, V. M.; DYNLACHT, B. D.; EL-DEIRY, W. S.; FIMIA, G. M.; FLAVELL, R. a; FULDA, S.; GARRIDO, C.; GOUGEON, M.-L.; GREEN, D. R.; GRONEMEYER, H.; HAJNOCZKY, G.; HARDWICK, J. M.; HENGARTNER, M. O.; ICHIJO, H.; JOSEPH, B.; JOST, P. J.; KAUFMANN, T.; KEPP, O.; KLIONSKY, D. J.; KNIGHT, R. a; KUMAR, S.; LEMASTERS, J. J.; LEVINE, B.; LINKERMANN, a; LIPTON, S. a; LOCKSHIN, R. a; LÓPEZ-OTÍN, C.; LUGLI, E.; MADEO, F.; MALORNI, W.; MARINE, J.-C.; MARTIN, S. J.; MARTINOU, J.-C.; MEDEMA, J. P.; MEIER, P.; MELINO, S.; MIZUSHIMA, N.; MOLL, U.; MUÑOZ-PINEDO, C.; NUÑEZ, G.; OBERST, a; PANARETAKIS, T.; PENNINGER, J. M.; PETER, M. E.; PIACENTINI, M.; PINTON, P.; PREHN, J. H.; PUTHALAKATH, H.; RABINOVICH, G. a; RAVICHANDRAN, K. S.; RIZZUTO, R.; RODRIGUES, C. M.; RUBINSZTEIN, D. C.; RUDEL, T.; SHI, Y.; SIMON, H.-U.; STOCKWELL, B. R.; SZABADKAI, G.; TAIT, S. W.; TANG, H. L.; TAVERNARAKIS, N.; TSUJIMOTO, Y.; VANDEN BERGHE, T.; VANDENABEELE, P.; VILLUNGER, a; WAGNER, E. F.; WALCZAK, H.; WHITE, E.; WOOD, W. G.; YUAN, J.; ZAKERI, Z.; ZHIVOTOVSKY, B.; MELINO, G.; KROEMER, G. Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015. **Cell death and differentiation**, n. 2014, p. 1–16, 19 set. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25236395>>. Acesso em: 23 set. 2014.

GALLUZZI, L.; VITALE, I.; ABRAMS, J. M.; ALNEMRI, E. S.; BAEHRECKE, E. H.; BLAGOSKLONNY, M. V; DAWSON, T. M.; DAWSON, V. L.; EL-DEIRY, W. S.; FULDA, S.; GOTTLIEB, E.; GREEN, D. R.; HENGARTNER, M. O.; KEPP, O.; KNIGHT, R. a; KUMAR, S.; LIPTON, S. a; LU, X.; MADEO, F.; MALORNI, W.; MEHLEN, P.; NUÑEZ, G.; PETER, M. E.; PIACENTINI, M.; RUBINSZTEIN, D. C.; SHI, Y.; SIMON, H.-U.; VANDENABEELE, P.; WHITE, E.; YUAN, J.; ZHIVOTOVSKY, B.; MELINO, G.; KROEMER, G. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. **Cell Death and Differentiation**, v. 19, n. 1, p. 107–120, 2012.

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

GOMER, C. J. Induction of prosurvival molecules during treatment: Rethinking therapy options for photodynamic therapy. **JNCCN Journal of the National Comprehensive Cancer Network**, v. 10, n. SUPP.2, p. 35–39, 2012.

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

GREEN, D. R.; OBERST, A.; DILLON, C. P.; WEINLICH, R.; SALVESEN, G. S. RIPK-dependent necrosis and its regulation by caspases: A mystery in five acts.

**Molecular Cell**, v. 44, n. 1, p. 9–16, 2011.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. a. Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>>.

HITOMI, J.; CHRISTOFFERSON, D. E.; NG, A.; YAO, J.; DEGTEREV, A.; XAVIER, R. J.; YUAN, J. **Identification of a molecular signaling network that regulates a cellular necrotic cell death pathway****Cell**, 2008. Disponível em: <[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=19109899](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19109899)>.

HOI, S. W.-H.; WONG, H. M.; CHAN, J. Y.-W.; YUE, G. G. L.; TSE, G. M.-K.; LAW, B. K.-B.; FONG, W. P.; FUNG, K. P. Photodynamic therapy of Pheophorbide a inhibits the proliferation of human breast tumour via both caspase-dependent and -independent apoptotic pathways in in vitro and in vivo models. **Phytotherapy research: PTR**, v. 26, n. 5, p. 734–42, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22072524>>.

HOLLIDAY, D. L.; SPEIRS, V. Choosing the right cell line for breast cancer research. **Breast cancer research: BCR**, v. 13, p. 215, 2011. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3236329&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

INOUE, H.; TANI, K. Multimodal immunogenic cancer cell death as a consequence of anticancer cytotoxic treatments. **Cell death and differentiation**, v. 21, n. 1, p. 39–49, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/cdd.2013.84>>.

JÄNICKE, R. U. MCF-7 breast carcinoma cells do not express caspase-3. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 117, n. 1, p. 219–221, 14 set. 2009. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10549-008-0217-9>>.

JIANG, P.; MIZUSHIMA, N. Autophagy and human diseases. **Cell Research**, v. 24, n. 1, p. 69–79, 10 jan. 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/cr.2013.161>>.

KAND'ÁR, R.; ŽÁKOVÁ, P.; LOTKOVÁ, H.; KUČERA, O.; ČERVINKOVÁ, Z. Determination of reduced and oxidized glutathione in biological samples using liquid chromatography with fluorimetric detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 43, n. 4, p. 1382–1387, 2007.

KENNY, P. A.; LEE, G. Y.; MYERS, C. A.; NEVE, R. M.; SEMEIKS, J. R.; SPELLMAN, P. T.; LORENZ, K.; LEE, E. H.; BARCELLOS-HOFF, M. H.; PETERSEN, O. W.; GRAY, J. W.; BISSELL, M. J. NIH Public Access. v. 1, n. 1, p. 84–96, 2008.

KERR, J. F.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **British journal of cancer**, v. 26, n. 4, p. 239–57, ago. 1972. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4561027>>.

KOBLINSKI, J. E.; AHRAM, M.; SLOANE, B. F. Unraveling the role of proteases in cancer. **Clinica Chimica Acta**, v. 291, n. 2, p. 113–135, 2000.

KOMATSU, M.; KAGEYAMA, S.; ICHIMURA, Y. P62/SQSTM1/A170: Physiology and pathology. **Pharmacological Research**, v. 66, n. 6, p. 457–462, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2012.07.004>>.

## Referências

KONDO, Y.; KANZAWA, T.; SAWAYA, R.; KONDO, S. The role of autophagy in cancer development and response to therapy. **Nat Rev Cancer**, v. 5, n. 9, p. 726–734, 2005. Disponível em: <[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16148885](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16148885)\n<http://www.nature.com/nrc/journal/v5/n9/pdf/nrc1692.pdf>>.

KREUZALER, P.; WATSON, C. J. Killing a cancer: what are the alternatives? **Nature Reviews Cancer**, v. 12, n. 6, p. 411–424, 2012.

LAPLANTE, M.; SABATINI, D. M. MTOR signaling in growth control and disease. **Cell**, v. 149, n. 2, p. 274–293, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.017>>.

LEE, G. Y.; KENNY, P. a; LEE, E. H.; BISSELL, M. J. Three-dimensional culture models of normal and malignant breast epithelial cells. **Nature methods**, v. 4, n. 4, p. 359–365, 2007.

LEVINE, B.; YUAN, J. Autophagy in cell death: an innocent convict? **The Journal of clinical investigation**, v. 115, n. 10, p. 2679–88, out. 2005.

LIU, Y.; HYDE, A. S.; SIMPSON, M. A.; BARYCKI, J. J. **Emerging regulatory paradigms in glutathione metabolism**. [s.l: s.n.]v. 122

LIU, Y.; LEVINE, B. Autosis and autophagic cell death: the dark side of autophagy. **Cell death and differentiation**, p. 1–10, 26 set. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25257169>>. Acesso em: 5 nov. 2014.

LIU, Y.; LI, Q.; ZHOU, L.; XIE, N.; NICE, E. C.; ZHANG, H. Cancer drug resistance: redox resetting renders a way. n. Table 1, 2016.

LIU, Z.; SEMENZA, G. L.; ZHANG, H. Hypoxia-inducible factor 1 and breast cancer metastasis. **Journal of Zhejiang University. Science. B**, v. 16, n. 1, p. 32–43, 2015. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1631/jzus.B1400221>\n<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25559953>\n<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4288942>>.

LONG, J.; RYAN, K. New frontiers in promoting tumour cell death: targeting apoptosis, necroptosis and autophagy. **Oncogene**, v. 31, p. 5045–5060, 2012.

LUO, R.-Z.; YUAN, Z.; LI, M.; XI, S.; FU, J.; HE, J. Accumulation of p62 is associated with poor prognosis in patients with triple-negative breast cancer. **OncoTargets and therapy**, v. 6, p. 883–8, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23888115>>.

MA, R.; FENG, Y.; LIN, S.; CHEN, J.; LIN, H.; LIANG, X.; ZHENG, H.; CAI, X. Mechanisms involved in breast cancer liver metastasis. **Journal of Translational Medicine**, v. 13, n. 1, p. 1–10, 2015. Disponível em: <<http://www.translational-medicine.com/content/13/1/64>>.

MASON, S. D.; JOYCE, J. A. Proteolytic networks in cancer. **Trends in Cell Biology**, v. 21, n. 4, p. 228–237, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tcb.2010.12.002>>.

MASOUDI-NEJAD, A.; ASGARI, Y. Metabolic Cancer Biology: Structural-based analysis of cancer as a metabolic disease, new sights and opportunities for disease

treatment. **Seminars in Cancer Biology**, v. 30, p. 21–29, 2015.

MCKEEN POLIZZOTTI, L.; OZTAN, B.; BJORNSSON, C. S.; SHUBERT, K. R.; YENER, B.; PLOPPER, G. E. Novel image analysis approach quantifies morphological characteristics of 3D breast culture acini with varying metastatic potentials. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, 2012.

MIZUSHIMA, N.; KUMA, A.; KOBAYASHI, Y.; YAMAMOTO, A.; MATSUBAE, M.; TAKAO, T.; NATSUME, T.; OHSUMI, Y.; YOSHIMORI, T. Mouse Apg16L, a novel WD-repeat protein, targets to the autophagic isolation membrane with the Apg12-Apg5 conjugate. **Journal of Cell Science**, v. 116, n. 9, p. 1679–1688, 1 maio 2003. Disponível em: <<http://jcs.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jcs.00381>>.

MONTAZERABADI, A. R.; SAZGARNIA, A.; BAHREYNI-TOOSI, M. H.; AHMADI, A.; SHAKERI-ZADEH, A.; ALEDAVOOD, A. Mitoxantrone as a prospective photosensitizer for photodynamic therapy of breast cancer. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 9, n. 1, p. 46–51, 2012.

O'REILLY, E. a.; GUBBINS, L.; SHARMA, S.; TULLY, R.; GUANG, M. H. Z.; WEINER-GORZEL, K.; MCCAFFREY, J.; HARRISON, M.; FURLONG, F.; KELL, M.; MCCANN, A. The fate of chemoresistance in triple negative breast cancer (TNBC). **BBA Clinical**, v. 3, p. 257–275, 2015. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2214647415000173>>.

OLIVEIRA, C. S.; TURCHIELLO, R.; KOWALTOWSKI, A. J.; INDIG, G. L.; BAPTISTA, M. S. Free Radical Biology & Medicine Major determinants of photoinduced cell death : Subcellular localization versus photosensitization efficiency. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 51, n. 4, p. 824–833, 2011.

OZ, M.; LORKE, D. E.; HASAN, M.; PETROIANU, G. A. Cellular and Molecular Actions of Methylene Blue in the Nervous System. **Medicinal Research Reviews**, n. 31, p. 93–117, 2010.

PAGLIN, S.; HOLLISTER, T.; DELOHERY, T.; HACKETT, N.; MCMAHILL, M.; SPHICAS, E.; DOMINGO, D.; YAHALOM, J. A Novel Response of Cancer Cells to Radiation Involves Autophagy and Formation of Acidic Vesicles Advances in Brief A Novel Response of Cancer Cells to Radiation Involves Autophagy and Formation of Acidic Vesicles 1. p. 439–444, 2001.

PANZARINI, E.; INGUSCIO, V.; DINI, L. Timing the multiple cell death pathways initiated by Rose Bengal acetate photodynamic therapy. **Cell Death and Disease**, v. 2, n. 6, p. e169–11, 2011.

PANZARINI, E.; INGUSCIO, V.; FIMIA, G. M.; DINI, L. Rose Bengal Acetate PhotoDynamic Therapy (RBAC-PDT) Induces Exposure and Release of Damage-Associated Molecular Patterns (DAMPs) in Human HeLa Cells. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, p. e105778, 2014. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0105778>>.

PELICANO, H.; ZHANG, W.; LIU, J.; HAMMOUDI, N.; DAI, J.; XU, R.-H.; PUSZTAI, L.; HUANG, P. Mitochondrial dysfunction in some triple-negative breast cancer cell lines: role of mTOR pathway and therapeutic potential. **Breast Cancer Research**, v. 16, n. 5, p. 434, 2014. Disponível em: <<http://breast-cancer-research.com/content/16/5/434>>.

PLAETZER, K.; KRAMMER, B.; BERLANDA, J.; BERR, F. Photophysics and

## Referências

photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects. p. 259–268, 2009.

RAKHA, E. A.; ELLIS, I. O. Modern classification of breast cancer: should we stick with morphology or convert to molecular profile characteristics. **Advances in anatomic pathology**, v. 18, n. 4, p. 255–267, 2011. Disponível em: <<http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=21654357&retmode=ref&cmd=prlinks\papers3://publication/doi/10.1097/PAP.0b013e318220f5d1>>.

REINERS, J. J.; AGOSTINIS, P.; BERG, K.; OLEINICK, N. L.; KESSEL, D. Assessing autophagy in the context of photodynamic therapy. **Autophagy**, v. 6, n. 1, p. 7–18, 2010.

RIZVI, I.; CELLI, J. P.; EVANS, C. L.; ABU-YOUSIF, A. O.; MUZIKANSKY, A.; POGUE, B. W.; FINKELSTEIN, D.; HASAN, T. Synergistic enhancement of carboplatin efficacy with photodynamic therapy in a three-dimensional model for micrometastatic ovarian cancer. **Cancer Research**, v. 70, n. 22, p. 9319–9328, 2010.

RUSTEN, T. E.; STENMARK, H. P62, an Autophagy Hero or Culprit? **Nature cell biology**, v. 12, n. 3, p. 207–209, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/ncb0310-207>>.

SCHIRMER, R. H.; ADLER, H.; PICKHARDT, M.; MANDELKOW, E. “Lest we forget you — methylene blue...”. **NBA**, 2011.

SEMENZA, G. L. Evaluation of HIF-1 inhibitors as anticancer agents. **Drug Discovery Today**, v. 12, n. 19-20, p. 853–859, 2007.

SHEMESH, C. S.; HARDY, C. W.; YU, D. S.; FERNANDEZ, B.; ZHANG, H. Indocyanine green loaded liposome nanocarriers for photodynamic therapy using human triple negative breast cancer cells. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, v. 11, n. 2, p. 193–203, 2014. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1572100014000088>>.

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

SILVA, Z. S. J.; BUSSADORI, S. K.; FERNANDES, K. P. S.; HUANG, Y.-Y.; HAMBLIN, M. R. Animal models for photodynamic therapy (PDT). **Bioscience Reports**, v. 35, n. SEPTEMBER, p. 1–14, 2015.

SONG, D.; LINDOSO, A. L.; PH, D.; OYAFUSO, L. K.; PH, D.; CARDOSO, L.; UCHOA, A. F.; PH, D. Photodynamic Therapy Using Methylene Blue to Treat Cutaneous Leishmaniasis 1. v. 29, n. 10, p. 711–715, 2011.

SPRING, B. Q.; RIZVI, I.; XU, N.; HASAN, T. The role of photodynamic therapy in overcoming cancer drug resistance. **Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology**, v. 14, p. 1476–1491, 2015. Disponível em: <<http://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2015/pp/c4pp00495g>>.

STUCHINSKAYA, T.; MORENO, M.; COOK, M. J.; EDWARDS, D. R.; RUSSELL, D. a. Targeted photodynamic therapy of breast cancer cells using antibody-phthalocyanine-gold nanoparticle conjugates. **Photochemical &**

**photobiological sciences: Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology**, v. 10, n. 5, p. 822–831, 2011.

TANIDA, I.; UENO, T.; KOMINAMI, E. LC3 and Autophagy. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 445, p. 77–88, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18425443>>.

TARDIVO, J. P.; ADAMI, F.; CORREA, J. A.; PINHAL, M. A. S.; BAPTISTA, M. S. A clinical trial testing the efficacy of PDT in preventing amputation in diabetic patients. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, v. 11, n. 3, p. 342–50, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24814697>>.

TARDIVO, J. P.; DEL GIGLIO, A.; PASCHOAL, L. H.; BAPTISTA, M. S. New photodynamic therapy protocol to treat AIDS-related Kaposi's sarcoma. **Photomedicine and laser surgery**, v. 24, n. 4, p. 528–31, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16942436>>.

TING, A. T.; PIMENTEL-MUIFFIOS, F. X. RIP activation apoptosis. **EMBO Journal**, v. 15, n. 22, p. 6189–6196, 1996.

TRAVERSO, N.; RICCIARELLI, R.; NITTI, M.; MARENGO, B.; FURFARO, A. L.; PRONZATO, M. A.; MARINARI, U. M.; DOMENICOTTI, C. Role of Glutathione in Cancer Progression and Chemoresistance. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2013, n. 1-2, p. 1–10, 2013. Disponível em: <<http://iupac.org/publications/pac/2004/pdf/7610x1825.pdf>\n<http://doi.wiley.com/10.1002/chin.200517261>\n<http://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2014/tb/c4tb01141d>\n<http://dx.doi.org/10.1039/C4CS00341A>\n<http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.01.030>\nht>.

VANDENABEELE, P.; GALLUZZI, L.; VANDEN BERGHE, T.; KROEMER, G. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 11, n. 10, p. 700–14, 2010. Disponível em: <[http://www.researchgate.net/publication/46170621\\_Vandenabeele\\_P\\_Galluzzi\\_L\\_Vanden\\_Berghe\\_T\\_Kroemer\\_G\\_Molecular\\_mechanisms\\_of\\_necroptosis\\_a\\_n\\_ordered\\_cellular\\_explosion\\_Nat\\_Rev\\_Mol\\_Cell\\_Biol\\_11\\_700-714](http://www.researchgate.net/publication/46170621_Vandenabeele_P_Galluzzi_L_Vanden_Berghe_T_Kroemer_G_Molecular_mechanisms_of_necroptosis_a_n_ordered_cellular_explosion_Nat_Rev_Mol_Cell_Biol_11_700-714)>.

WAGNER, M.; SUAREZ, E. R.; THEODORO, T. R.; MACHADO FILHO, C. D. A. S.; GAMA, M. F. M.; TARDIVO, J. P.; PASCHOAL, F. M.; PINHAL, M. A. D. S. Methylene blue photodynamic therapy in malignant melanoma decreases expression of proliferating cell nuclear antigen and heparanases. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 37, n. 5, p. 527–533, 2012.

WESTENDORF, A. F.; WOODS, J. A.; KORPIS, K.; FARRER, N. J.; SALASSA, L.; ROBINSON, K.; APPELYARD, V.; MURRAY, K.; GRUNERT, R.; THOMPSON, A. M.; SADLER, P. J.; BEDNARSKI, P. J. Trans,trans,trans-[PtIV(N3)2(OH)2(py)(NH3)]: a light-activated antitumor platinum complex that kills human cancer cells by an apoptosis-independent mechanism. **Mol Cancer Ther**, v. 11, n. 9, p. 1894–1904, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22710878>>.

WRIGHT, K. E.; LINIKER, E.; LOIZIDOU, M.; MOORE, C.; MACROBERT, A. J.; PHILLIPS, J. B. Peripheral neural cell sensitivity to mTHPC-mediated photodynamic therapy in a 3D in vitro model. **British journal of cancer**, v. 101, n. 4, p. 658–665, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjc.6605197>>.

## Referências

XU, D. D.; LAM, H. M.; HOEVEN, R.; XU, C. B.; LEUNG, A. W.; CHO, W. C. S. **Photodynamic therapy induced cell death of hormone insensitive prostate cancer PC-3 cells with autophagic characteristics**, 2013. .

XUE, L.; CHIU, S.; AZIZUDDIN, K.; JOSEPH, S.; OLEINICK, N. L. The Death of Human Cancer Cells Following Photodynamic Therapy : Apoptosis Competence is Necessary for Bcl-2 Protection but not for Induction of Autophagy †. n. 19, p. 1016–1023, 2007.

XUE, L. Y.; CHIU, S. M.; OLEINICK, N. L. Photodynamic therapy-induced death of MCF-7 human breast cancer cells: a role for caspase-3 in the late steps of apoptosis but not for the critical lethal event. **Experimental cell research**, v. 263, n. 1, p. 145–155, 2001.

YOO, J.-O.; HA, K.-S. **New insights into the mechanisms for photodynamic therapy-induced cancer cell death**. [s.l: s.n.]v. 295

ZARZYNSKA, J. M. The Importance of Autophagy Regulation in Breast Cancer Development and Treatment. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 9, 2014. Disponível em: <<http://abbs.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1093/abbs/gmv119>>.

ZHANG, D.-W.; SHAO, J.; LIN, J.; ZHANG, N.; LU, B.-J.; LIN, S.-C.; DONG, M.-Q.; HAN, J. RIP3, an Energy Metabolism Regulator That Switches TNF-Induced Cell Death from Apoptosis to Necrosis. **Science**, v. 325, n. 5938, p. 332–336, 17 jul. 2009. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1172308>>.

## **Súmula curricular**

**Nome:** Ancély Ferreira dos Santos

## 1) Formação

<b>Ano</b>	<b>Título ou atividade</b>	<b>Instituição</b>
2005-2010	Graduação <b>Bach. Bioquímica</b>	Departamento de Bioquímica – Universidade Federal de Viçosa
2010-2012	Mestrado <b>Bioquímica Agrícola – Área: Biologia Molecular</b>	Departamento de Bioquímica – Universidade Federal de Viçosa
2012-2016	Doutorado <b>Ciências Biológicas (Bioquímica)</b>	Instituto de Química, Departamento de Bioquímica – Universidade de São Paulo

## 2) Histórico profissional, serviços e distinções acadêmicas e prêmios.

. **2012-2016:** Universidade de São Paulo - Vínculo: Estudante de doutorado Programa de Pós-graduação em Bioquímica. Bolsista FAPESP.

1. **2015:** *Scholarship*, European Cell Death Organization (ECDO), “23rd Conference of the European Cell Death Organization Death pathways and beyond”, Genève, Suíça.

2. **2015:** Prêmio Viagem, Comissão Coordenadora de Programa Bioquímica - IQUSP / CAPES.

3. **2015:** Seleção e *Travel Grant* para o curso “EMBO Practical Course: Single molecule and single cell fluorescence Å/nm/µm/mm-scopy”. European Molecular Biology Organization, EMBO/EMBL, Heidelberg, Alemanha. (Carga horária: 60h)

4. **2014:** Keystone Symposia Global Health *Travel Award*, Keystone

Symposia meeting on Cell Death Signaling in Cancer and the Immune System, Guarujá, São Paulo.

5. **2014:** *Scholarship*, European Cell Death Organization (ECDO), "22nd Euroconference on Cell Death and Rejuvenation", Hersonissos, Crete.

. **2010-2012:** Universidade Federal de Viçosa – Vínculo: Estudante de mestrado Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola. Bolsista CNPq.

. **2005-2010:** Universidade Federal de Viçosa – Vínculo: Estudante de graduação. Bolsista FAPEMIG.

6. **2010:** Melhor pôster na área de Biotecnologia apresentado durante a XXXIX Annual Meeting of the Brazilian Biochemistry and Molecular Biology (SBBq), Sociedade Brasileira de Bioquímica.

### 3) Lista de até 10 resultados de pesquisa mais relevantes

#### Artigos

1. **ANCÉLY F. DOS SANTOS**, LETÍCIA F. TERRA, ROSANGELA A.M. WAILEMANN, TALITA C. DE OLIVEIRA, VINÍCIUS M. GOMES, MARCELA F. MINEIRO, FLÁVIA C. MEOTTI, ALEXANDRE BRUNICARDOSO, MAURÍCIO S. BAPTISTA AND LETICIA LABRIOLA. Methylene blue photodynamic therapy induces selective and massive cell death in human breast cancer cells. **Artigo submetido na revista BMC Cancer. 2016.**

2. LILIAN FEDRA CASTILLO, ROCÍO TASCÓN, JORGE SHORTREDE, MARÍA AMPARO LAGO HUVELLE, **ANCELY FERREIRA DOS SANTOS**, MARI CLEIDE SOGAYAR, ELISA BAL DE KIER JOFFÉ, LETICIA LABRIOLA, MARÍA GISELLE PETERS. Glypican-3 induces a mesenchymal to epithelial transition in a pre-clinical human breast cancer model. **Artigo em fase de resposta aos pontos levantados pelos assessores científicos da revista Oncotarget. 2016.**

3. COSTA, DANIELA A., SOUZA, CARLOS J. A., COSTA, PATRÍCIA S., RODRIGUES, MARINA Q. R. B., **SANTOS, ANCÉLY F.**, LOPES, MARIANA R., GENIER, HUGO L. A., SILVEIRA, WENDEL B., FIETTO, LUCIANO G. Physiological characterization of thermotolerant yeast for cellulosic ethanol production. **Applied Microbiology and Biotechnology. 2014.** (Citações: SCOPUS 5)

4. LOPES, MARIANA R., SOUZA, CARLOS J. A., RODRIGUES, MARINA Q. R. B., COSTA, DANIELA A., **SANTOS, ANCÉLY F.**, OLIVEIRA, LEANDRO L., RAMOS, HUMBERTO J. O., GUIMARÃES, VALÉRIA M., SILVEIRA, WENDEL B., PASSOS, FLÁVIA M. L., FIETTO, LUCIANO G. Production and Characterization of beta-Glucanase Secreted by the Yeast *Kluyveromyces marxianus*. **Applied Biochemistry and Biotechnology. 2014.**

5. SOUZA, C. J. A., COSTA, D. A., RODRIGUES, M. Q. R. B., **SANTOS, A. F.**, LOPES, M. R., ABRANTES, A. B. P., Costa, P. S., SILVEIRA, W. B., PASSOS, F. M. L., FIETTO, L. G. The influence of presaccharification, fermentation temperature and yeast strain on ethanol production from sugarcane bagasse. **Bioresource Technology. 109, p.63 – 69. 2012.** (Citações: SCOPUS 28)

6. CARDOSO, L. M., OLIVEIRA, T. T., PINTO, A. S., CHAVES, A. R. M., Leão, M. A, Costa, M. R, FONSECA, M. K. A., **SANTOS, A. F.**, ZATTI, R. A., NAGEM, T. J. Efeito das tinturas de café torrado e moído nos níveis séricos de colesterol, triglicerídeos e glicose em ratos diabéticos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada. 32, p.77 – 81. 2011.** (Citações: SCOPUS 1)

7. DORNAS W. C. A., OLIVEIRA, T. T., DORES, R. G. R., SANTOS, A. F., NAGEM, T. J. Flavonóides: potencial terapêutico no estresse oxidativo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada. 28, p.241 - 249, 2009.** (Citações: SCOPUS 8)

**4) Indicadores quantitativos.**

1. Publicações em periódicos: 5 (+ 2 submetidos)
2. Quantidade de citações recebidas na literatura científica internacional, segundo o ISI, Scopus ou Google Scholar: 80 citações (Google Scholar)
3. Resumos publicados em anais de congressos: 35 (16 em congressos internacionais)
4. Apresentações de trabalho: 17
5. Participação em eventos: 19
6. Organização de cursos e monitoria: 12 (4 cursos de pós-graduação, 3 de graduação, 2 tutorias para graduação e 3 monitorias para graduação)
7. Supervisão de iniciação científica:

**. 2013 e 2014:** Tatiana Comporte Stabelini. (Aluna do curso de Química Com Ênfase em Bioquímica e Biologia Molecular) - Universidade de São Paulo. Projeto: **Efeitos citotóxicos da terapia fotodinâmica em células de tumor mamário humano e estudo dos mecanismos mediadores desses efeitos.** Bolsista CNPq.

**5) Link para a página MyResearcherID (ISI) ou MyCitations (Google Scholar).** <http://www.researcherid.com/rid/G-5410-2013>

## **Artigos submetidos**

## BMC Cancer

### Methylene blue photodynamic therapy induces selective and massive cell death in human breast cancer cells

--Manuscript Draft--

<b>Manuscript Number:</b>	BCAN-D-16-00432	
<b>Full Title:</b>	Methylene blue photodynamic therapy induces selective and massive cell death in human breast cancer cells	
<b>Article Type:</b>	Research article	
<b>Section/Category:</b>	Cell and molecular biology	
<b>Funding Information:</b>	FAPESP (2103/07029-4)	Dr. LETICIA LABRIOLA
	FAPESP (2012/16785-4)	Ms Ancély F dos Santos
	FAPESP (2012/50680-5)	M Maurício S Baptista
	FAPESP (2013/07937-8)	M Maurício S Baptista
	CNPq (141529/2012-1)	Ms Ancély F dos Santos
	USP (NAP-PhotoTech-USP)	M Maurício S Baptista
<b>Abstract:</b>	<p>Background: Breast cancer is the main cause of mortality among women presenting high recurrence due to primary treatment failure. Photodynamic therapy (PDT), which causes tissue destruction by visible light in the presence of a photosensitizer (Ps) and oxygen, is a promising alternative to cure cancer. However, the efficacy of PDT to treat breast tumors as well as the mechanisms that lead to tumorigenic cell death remain unclear.</p> <p>Methods: In this study, we assessed the cytotoxic potential of PDT using methylene blue (MB-PDT) in three breast epithelial cell lines that represent non-malignant conditions and different molecular subtypes of breast tumors. Cells were incubated in the absence or presence of MB and irradiated or not at 640 nm with 4,5J/cm<sup>2</sup>. We used a combination of imaging and biochemistry approaches to assess the involvement of classical autophagic and apoptotic pathways in mediating the cell-deletion action of MB-PDT. The role of these pathways was investigated using specific inhibitors, activators and gene silencing.</p> <p>Results: We observed that MB-PDT differentially induces massive cell death of tumor cells. Non-malignant cells were significantly more resistant to the therapy compared to malignant cells. Morphological and biochemical analysis of dying cells pointed to alternative mechanisms rather than classical apoptosis. MB-PDT-induced autophagy resulted in either cytoprotection or cytotoxicity depending on the cell model used. However, impairment of one of these pathways did not prevent the fatal destination of MB-PDT treated cells. Additionally, when using a physiological 3D culture model that recapitulates relevant features of normal and tumor breast tissue morphology, we found that MB-PDT differential action in killing tumor cell was even higher than what was detected in 2D cultures.</p> <p>Conclusions: Finally, our observations underscore the potential of MB-PDT as a highly efficient strategy to safely treat breast cancer and possibly other types of tumors.</p>	
<b>Corresponding Author:</b>	LETICIA LABRIOLA Universidade de Sao Paulo SAO PAULO, SP BRAZIL	
<b>Corresponding Author Secondary Information:</b>		
<b>Corresponding Author's Institution:</b>	Universidade de Sao Paulo	
<b>Corresponding Author's Secondary Institution:</b>		

<b>First Author:</b>	Ancély F dos Santos, Ms.Sc.
<b>First Author Secondary Information:</b>	
<b>Order of Authors:</b>	Ancély F dos Santos, Ms.Sc.
	Leticia F Terra, PhD
	Rosangela A.M. Wailemann, Ms.Sc.
	Talita C Oliveira, Bachelor in Sciences
	Vinícius M Gomes
	Marcela F Mineiro
	Flávia C Meotti, PhD
	Alexandre Bruni-Cardoso, PhD
	Maurício S Baptista, PhD
	LETICIA LABRIOLA

# Oncotarget

[MANUSCRIPT HOME](#)
[AUTHOR INSTRUCTIONS](#)
[REVIEWER INSTRUCTIONS](#)
[LOGOUT](#)
[JOURNAL HOME](#)

<b>Manuscript #</b>	008236
<b>Current Revision #</b>	0
<b>Submission Date</b>	2015-09-18 08:39:57
<b>Current Stage</b>	Waiting for Revision
<b>Title</b>	Glypican-3 induces a mesenchymal to epithelial transition in a pre-clinical human breast cancer model
<b>Manuscript Type</b>	Research Paper
<b>Corresponding Author</b>	Maria Peters (Institute of Oncology Angel H. Roffo)
<b>Contributing Authors</b>	Lilian Castillo , Rocío Tascón , Jorge Shortrede , María Lago Huvelle , Ancely Ferreira dos Santos , Mari Sogayar , Elisa Bal de Kier Joffé , Leticia Labriola
<b>Abstract</b>	<p>Breast cancer is the disease with the highest impact on global health, remaining metastasis the main cause of death. To metastasize, carcinoma cells must reactivate a latent embryonic program called epithelial-mesenchymal transition (EMT), through which epithelial cancer cells acquire mesenchymal-like traits.</p> <p>Glypican-3 (GPC3), a proteoglycan involved in the regulation of proliferation and survival, has been associated with cancer. In this study we found that the expression of GPC3 is inversely proportional to the invasive/metastatic ability of Hs578T, MDA-MB231, ZR-75-1 and MCF-7 human breast cancer cell lines. The silencing of GPC3 activated growth, apoptosis resistance, migration, tumor incidence and invasive/metastatic capacity of MCF-7 breast cancer cells, while GPC3 overexpression inhibited these properties acquired by MDA-MB231 tumor cells. Moreover, silencing of GPC3 deepened MCF-7 breast cancer cells mesenchymal characteristics, decreasing the expression of the epithelial marker E-Cadherin. On the other side, GPC3 overexpression induced the mesenchymal-epithelial transition (MET) of MDA-MB231 breast cancer cells, which reexpressed E-Cadherin and withdrawn the expression of vimentin and N-Cadherin. Although we showed that GPC3 inhibited the canonical Wnt/<math>\beta</math>-Catenin signaling pathway in breast cancer cells, this inhibition did not have effect on E-Cadherin expression. We demonstrated that the transcriptional repressor of E-Cadherin - ZEB1 - is upregulated in GPC3 silenced MCF-7 cells, while it is downregulated when GPC3 is overexpressed in MDA-MB231 cells. Taken together, our data indicate that GPC3 is an important regulator of EMT in breast cancer, and a potential therapeutic target for procedures against breast cancer invasion and metastasis.</p>
<b>Keywords</b>	breast cancer, glypican-3, epithelial-mesenchymal transition, invasion, metastasis
<b>Conflict of Interest Decision</b>	<b>No</b> , there is no conflict of interest that I should disclose, having read the above statement.
	<a href="#">Major Revisions</a> / 2015-11-11

## Manuscript Items

1. Author Cover Letter [PDF \(133KB\)](#) [Source File \(DOC\) 466KB](#)
2. Merged File containing manuscript text, 13 Figure files and 3 Table files. [PDF \(24986KB\)](#)
  - a. Article File [PDF \(266KB\)](#) [Source File \(DOC\) 401KB](#)
  - b. Table 1 [PDF \(70KB\)](#) [Source File \(DOC\) 29KB](#)
  - c. Table 2 [PDF \(68KB\)](#) [Source File \(DOC\) 29KB](#)
  - d. Table 3 [PDF \(57KB\)](#) [Source File \(DOC\) 31KB](#)
  - e. Figure 1 [PDF \(181KB\)](#) [Source File \(TIF\) 6459KB](#)
  - f. Figure 2 [PDF \(249KB\)](#) [Source File \(TIF\) 8483KB](#)
  - g. Figure 3 [PDF \(239KB\)](#) [Source File \(TIF\) 8509KB](#)
  - h. Figure 4 [PDF \(4667KB\)](#) [Source File \(TIF\) 9648KB](#)
  - i. Figure 5 [PDF \(670KB\)](#) [Source File \(TIF\) 7741KB](#)
  - j. Figure 6 [PDF \(229KB\)](#) [Source File \(TIF\) 12136KB](#)
  - k. Figure 7 [PDF \(1396KB\)](#) [Source File \(TIF\) 11814KB](#)
  - l. Figure 8 [PDF \(11760KB\)](#) [Source File \(TIF\) 12013KB](#)
  - m. Figure 9 [PDF \(2492KB\)](#) [Source File \(TIF\) 8750KB](#)
  - n. Figure 10 [PDF \(888KB\)](#) [Source File \(TIF\) 1527KB](#)
  - o. Figure 11 [PDF \(159KB\)](#) [Source File \(TIF\) 1485KB](#)
  - p. Figure 12 [PDF \(89KB\)](#) [Source File \(TIF\) 5384KB](#)
  - q. Figure 13 [PDF \(1517KB\)](#) [Source File \(TIF\) 16848KB](#)

There are action items pending. Please click on the links next to the arrows ➔.

## Manuscript Workflow Tasks

➔ [Revise Manuscript](#)

## More Manuscript Info and Tools

[Send Manuscript Correspondence](#)

[Decision Summary](#)

[Check Status](#)

[MANUSCRIPT HOME](#)
[CITATION FORMATTING](#)
[REVIEWER INSTRUCTIONS](#)
[HELP FOR AUTHORS](#)
[LOGOUT](#)


Licensed under Patent #US 7,620,555B1