

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO – USP
INSTITUTO DE QUÍMICA – IQ
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOQUÍMICA)**

DARIA RAQUEL QUEIROZ DE ALMEIDA

**Terapia fotodinâmica em células de tumores
pancreáticos humanos: eficiência e análise das vias
mediadoras de citotoxicidade**

Versão corrigida da Dissertação

São Paulo

Data de depósito na SPG:

02/03/2018

DARIA RAQUEL QUEIROZ DE ALMEIDA

**Terapia fotodinâmica em células de tumores
pancreáticos humanos: eficiência e análise das vias
mediadoras de citotoxicidade**

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

Orientadora: Profa. Dra. Leticia Labriola

São Paulo

2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica

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

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

Almeida, Daria Raquel Queiroz de
A447t Terapia fotodinâmica em células de tumores pancreáticos humanos: eficiência e análise das vias mediadoras de citotoxicidade / Daria Raquel Queiroz de Almeida. -- São Paulo, 2018.
126p.

Dissertação (mestrado) – Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Bioquímica.
Orientador: Labriola, Leticia

1. Biologia celular II. Pâncreas : doenças I. T. II. Labriola, Leticia, orientador.

574.87 CDD

À minha “mainha”, Maria Nogueira, e ao meu “painho”, José Reinaldo, os dois maiores entusiastas nas minhas vitórias e os mais sólidos suportes nos momentos de adversidades. Nós continuamos firmes na caminhada, meus Amores!!

Agradecimentos

Parafrazeando Isaac Newton, se eu concluí mais uma etapa da caminhada, foi porque não me faltaram Bons guias. A principal riqueza do meu trabalho vem do conteúdo humano que o alicerçou e se manifesta no teor humano para o qual ele foi pensado e executado. Dos prazeres que a realização desse sonho pode me oferecer, o mais nobre deles talvez seja o fato de que ele é compartilhado e que eu posso estender a minha gratidão aos que caminharam comigo. Por tudo isso, sou grata à Deus, primeiramente! Por Ele estar em mim e ser a minha luz e vida em todo o sempre! À Ele sou grata por cada um dos que estiveram comigo:

À minha orientadora, Profa. Leticia Labriola, por ter me acolhido como parte do seu grupo de pesquisa e confiado no meu trabalho, mesmo eu ainda sendo tão cientificamente crua e inexperiente. Por ser tão humana, ter sido paciente na medida exata e me proporcionado a melhor relação aluno/orientador que eu poderia esperar, sou grata! Agradeço por ter me feito sair de cada uma das nossas reuniões/conversas cheia de ânimo (principalmente nos momentos em que eu achei que nada parecia estar certo!), renovada de possibilidades e um pouco mais apaixonada pela ciência. Sua orientação e amizade durante esta etapa ajudaram a habituar os meus olhos à calma e à paciência necessárias ao crescimento profissional e também pessoal. Sorte a minha de ter encontrado uma #RainhaLabriola na vida científica. Obrigada!

Aos meus queridos companheiros do Laboratório de Mecanismos Moleculares de Citoproteção (LMMC): Ancély, Rô, Vinícius, Letícia, Talita, Augusto, Sandra e Fábio. Obrigada por terem me acolhido e me ajudado durante estes dois anos. É uma honra para mim trabalhar com vocês!! A saber:

À Dra. Ancély F. Santos por ter sido como uma “co-orientadora” (se não de direito, mas, com certeza, de fato) e me ensinado toda a parte prática necessária ao desenvolvimento desse projeto. Por ter sido paciente (eu imagino como deve ter sido difícil!! rs) para me auxiliar e por ter sido tão solícita sempre que eu precisei. Agradeço por teres compartilhado comigo um pouco de toda essa enorme bagagem e conhecimento que os bons, como você, trazem consigo.

As doutorandas Rosângela A. W. Mansano (pelo exemplo de mulher forte e cheia de felicidade e pelos abraços que sempre me encheram de boas energias, antes de qualquer coisa) e Talita C. Oliveira e a Dra. Letícia F. Terra (que Inspiração você é!) por toda a ajuda e pela agradável companhia durante esses dois anos. Agradeço pelas conversas e por terem me ensinado tanto sobre tanta coisa: das discussões científicas/políticas/sociais/profissionais às informações sobre SP e a agitada vida paulista (bem distante da realidade “capim-grossense” à qual estava habituada), eu só aprendi/aprendo com vocês.

Ao doutorando mangabeirenses Vinícius de Moraes Gomes por ter aplicado sua infalível “metodologia do chicote” para me fazer aprender western blot na velocidade da luz (e ter sido bem sucedido!). Por ser, “segundo Mascena, (2018)”(rs), o meu “oposto complementar” em tantos aspectos e pela companhia, quase que diária, nos almoços no ru seguidos por momentos de plenitude nas caminhadas sempre regadas a “jundiá” com paçoquita e boas risadas. Elas me ajudaram a aliviar, no meio da correria, os momentos de estresse. Obrigada pela amizade (e por não me deixar perder o sotaque! “Good job”, visse?! rsrs)!

Ao prof. Dr. Maurício Baptista e ao pessoal do laboratório de processos fotoinduzidos e interfaces, do IQ-USP, pelo uso de equipamentos e outros materiais e parceria durante esse tempo.

À profa. Dra. Bettina Malnic e ao pessoal do Laboratório de Neurociência Molecular pela disponibilidade e por me permitirem utilizar o microscópio de fluorescência, equipamento que foi fundamental para o desenvolvimento desse projeto.

Ao meu melhor amigo e namorado, Marcelo Victor, por todo o apoio, incentivo, por vibrar comigo nas vitórias e, principalmente, por ser amor e conforto nos momentos de dificuldade. Por entender essa distância temporária, por torcer pelos meus sonhos tanto quanto eu mesma e pelas horas de conversas ao fim de cada dia nos últimos dois anos. Por todos os “Calma”, “Vai dar certo”, “Já tá quase lá”, “Você vai se sair bem”, “Você vai conseguir”,

“Comprei minha passagem”(rsrs) e “Eu te amo!” que me deram força, eu te sou muito grata! Seu amor me faz melhor e mais forte!

Aos meus queridos Fábio Mesquita e Daniel Veras pela amizade sincera (presentes da UERN pra minha vida), paciência e disponibilidade para me ajudarem (e como ajudaram/ajudam, meu Deus!!) desde sempre. Nestes últimos dois anos, mesmo distantes, vocês estiveram presentes me ajudando a construir esse sonho.

À Nayane Queiroz, Wigna Almeida e Idilvância Queiroz, minhas tão amadas amigas/irmãs por todo o amor que me fazem sentir mesmo à distância! Pelas conversas (algumas vezes fofocas! rs) pelo whats durante esse tempo que me ajudaram a relaxar e aliviaram um pouco a tensão que é estar “sozinha” e longe da nossa casa e dos nossos. Obrigada pelas orações, amor e amizade!

Aos meus amados pais por todo o apoio, torcida e infinito amor. Por em embarcarem nesse sonho junto comigo estarem inabalavelmente ao meu lado em toda a caminhada. Vocês são força e amor na minha vida! É por nós que Eu estou na firme na caminhada. Eu amo vocês infinitamente!

Ao meu lindo e tão amado irmão, Dassinho <3, e a minha irmã Fátima pela torcida, incentivo e por todos amor. Vocês são Deus vivo na minha vida e essa vitória é nossa!

À toda a minha família por todo o amor, orações e torcida para que eu siga forte e crescendo sempre. Obrigada por serem a melhor família do mundo e uma fonte incessante de amor para na minha vida. Amo vocês!

Ao Instituto de Química e à USP. Que sonho ter a oportunidade de estar vivenciando esta universidade e crescendo como profissional e como pessoa todos os dias aqui dentro.

À professora Dra. Carla Columbano por ter me proporcionado uma experiência profissional tão enriquecedora durante sua supervisão no PAE. Que Exemplo de profissional! Obrigada pelas aulas de didática e de profissionalismo! Honrada por ter tido esse presente na minha vida acadêmica.

Enfim, à todos os que direta ou indiretamente estiveram comigo durante essa caminhada. Obrigada de coração à todos!

À CAPES, CNPq e FAPESP pelo apoio financeiro concedido.

“Para ser grande, sê inteiro: nada teu exagera ou exclui. Sê todo em cada coisa. Põe quanto és no mínimo que fazes. Assim em cada lago a lua toda brilha, porque alta vive.”

(Fernando Pessoa)

Resumo

ALMEIDA, D.R.Q. **Terapia fotodinâmica em tumores pancreáticos humanos: eficiência e análise das vias mediadoras de citotoxicidade**. 2018. 126p. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo.

O adenocarcinoma de ducto pancreático (PDAC) é a quarta causa de morte em decorrência de neoplasias nos países ocidentais. Atualmente, a cirurgia ressectiva é a única possibilidade de cura para a doença, porém, a recidiva tumoral acontece em menos de um ano após a intervenção cirúrgica, mesmo com a quimioterapia adjuvante. A terapia fotodinâmica (PDT) é uma alternativa promissora no tratamento do câncer. No entanto, pouco se sabe sobre o uso da PDT em tumores pancreáticos. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência da PDT com o azul de metileno (MB) como fotossensibilizador (MB-PDT) em induzir a morte de linhagens de PDAC humanas (AsPC-1, Panc-1, MIAPaCa-2 e BxPC-3) e estudar a contribuição de vias de necrose regulada nos efeitos citotóxicos da terapia sobre estes modelos. Os resultados obtidos mostraram que a MB-PDT foi capaz de induzir a morte massiva das células de PDAC. Além disso, eles indicaram que há dois perfis de susceptibilidade entre as quatro linhagens estudadas quando submetidas a MB-PDT com $4,5 \text{ J/cm}^2$ de energia e 6min de irradiação. De acordo com os dados apresentados, a diferença nas sensibilidades das linhagens à terapia não está associada à diferenças na capacidade de incorporação do MB ou na localização sub-celular do fotossensibilizador nas diferentes células, uma vez que a localização é, predominantemente, lisossomal em todas elas. Adicionalmente, mostrou-se que as linhagens menos susceptíveis ao tratamento, MIAPaCa-2 e Panc-1, apresentam níveis significativamente menores de RIPK3 e MLKL, dois dos componentes do necrossomo, essenciais para a execução da necroptose. Além disso, foi visto que a MB-PDT induz um aumento de fosforilação de MLKL em AsPC-1, demonstrando a ativação da necroptose após a terapia nestas células, mas não em MIAPaCa-2 (menos responsiva à terapia com $4,5 \text{ J/cm}^2$ de

energia e 6min de tempo de irradiação). Ainda, a inibição da via de sinalização necroptótica diminuiu significativamente as porcentagens de morte das células mais susceptíveis (BxPC-3 e AsPC-1), não alterando a resposta de Panc-1 e MIAPaCa-2, corroborando a ativação e importância da necroptose para a citotoxicidade da MB-PDT. Finalmente, neste trabalho foi mostrado que o aumento do tempo de irradiação, mantendo-se a quantidade total de energia aplicada no tratamento, melhora a eficiência da MB-PDT em induzir a morte das células que apresentam limitações para executar a necroptose, sugerindo que mais de uma via de morte esteja sendo ativada após a terapia e que o tempo de irradiação atuaria modulando esta ativação. Complementarmente, foi mostrado que os tempos maiores de irradiação aumentam o estresse oxidativo intracelular que é acompanhado por uma diminuição significativa do conteúdo intracelular de glutathiona reduzida (GSH), indicando, preliminarmente, que a ferroptose pode estar sendo acionada após os protocolos mais longos de irradiação. Coletivamente, os resultados apresentados neste trabalho confirmam a eficiência da MB-PDT no tratamento de diferentes linhagens de PDAC, indicando que a necroptose está sendo ativada e contribuindo para a citotoxicidade da terapia sobre as células que não apresentam resistência à esta via de morte. Ainda, eles demonstram que o aumento do tempo de irradiação pode transpor a barreira de resistência de algumas linhagens à terapia, provavelmente por induzir a ativação de outras vias de necrose regulada, mostrando a importância da otimização do protocolo de tratamento no aumento da eficiência da MB-PDT sobre os tumores de pâncreas.

Finalmente, os resultados confirmam a MB-PDT como alternativa eficaz no tratamento do PDAC, apresentando um amplo espectro de atuação sobre subtipos tumorais resistentes à vias clássicas de morte celular, uma característica importante no contexto de uma terapia anti-cancer.

Palavras chaves: Câncer de Pâncreas; Terapia Fotodinâmica; Azul de Metileno, Necrose regulada.

ABSTRACT

ALMEIDA, D.R.Q. **Photodynamic therapy in human pancreatic tumors: efficiency and analysis of cytotoxicity mediator pathways**. 2018. 126p. Masters Thesis - Graduate Program in Biochemistry - Instituto de Química, Universidade de São Paulo.

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is the fourth leading cause of death due to neoplasms in western countries. Currently, resective surgery is the only therapeutical approach to cure this disease, but tumor's recurrence occurs less than one year after the surgery, even with adjuvant chemotherapy. Photodynamic therapy (PDT) is a promising alternative for the cancer treatment. However, the efficacy of PDT to treat pancreatic tumors as well as the mechanisms involved in the induction of tumorigenic cell death remain unclear. For this purpose, in this study, we set out to evaluate the efficacy of PDT using methylene blue (MB) as a photosensitizer (MB-PDT), in inducing death of human PDAC derived cell lines (AsPC-1, Panc-1, MIAPaCa-2 and BxPC-3) and to deeper investigate the contribution of necroptosis to the cytotoxic effects of the therapy. We observed that MB-PDT was able to induce massive death of PDAC cells. Moreover, our results indicated that upon MB-PDT (4.5 J/cm² energy and 6min of irradiation time), there were two susceptibility profiles among the four cell lines studied. Data also showed that this differential profile of cell response was neither associated with the differences in the MB incorporation capacity nor with the subcellular location of the photosensitizer, since the localization was predominantly lysosomal in all of tested cell lines. In addition, less susceptible cells, MIAPaCa-2 and Panc-1, showed significantly lower levels of RIPK3 and MLKL, two of the necrosome components, essential for triggering necroptosis. Furthermore, while MB-PDT (4.5 J/cm² and 6min of irradiation) has been able to increase MLKL's phosphorylation levels, an essential step in necroptosis induction, in AsPC-1 cells, less responsive MIAPaCa-2 cells presented no variations on the phosphorylation state of this pseudokinase. Moreover, pharmacological inhibition of the necroptotic signaling pathway significantly decreased cell death percentages of the most susceptible cells (BxPC-3 and

AsPC-1), without altering the response of Panc-1 and MIAPaCa-2, corroborating that activation of necroptosis was strongly involved in the cytotoxicity of MB-PDT. Finally, this work showed that increasing the irradiation time improved the efficacy of MB-PDT in killing cells which display limitations to perform necroptosis, suggesting that the irradiation time would be modulating the degree of oxidative stress generated and this stimuli would in turn, be responsible for triggering other regulated cell death pathways in a RIKP3 and MLKL independent way. Indeed, this increase in oxidative stress was accompanied by a significant decrease in GSH, a global indicator of less antioxidant cell capacity, preliminarily pointing at the induction of ferroptosis by longer irradiation protocols. In summary, we demonstrated that MB-PDT is able to induce cell death in different PDAC cell lines and that different regulated cell death mechanisms are being activated upon MB-PDT induction. Furthermore, it was demonstrated that increased irradiation time may overcome the resistance barrier of some cell lines, probably inducing the activation of other regulated cell death pathways, showing the importance of optimizing the irradiation protocol in order to maximize the efficacy of the therapy.

Finally, our observations point MB-PDT as an alternative and effective therapy for pancreatic cancer treatment, displaying a broad-spectrum action on tumors displaying different resistance mechanisms to classic cell death pathways, a desired property for improving an anticancer therapy.

Keywords: Pancreatic cancer; Photodynamic therapy; Methylene blue; Regulated necrosis.

Lista de abreviaturas e siglas

µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromolar
µm	Micrometro
%	porcentagem
°C	graus Celsius
Ac-IETD-AFC	<i>Acetyl-L-isoIeucyl-L-glutamyl-L-threoninyl-L-aspartyl-7-amino-4-trifluoromethylcoumarin</i>
Ac-LEHD-AFC	<i>Acetyl-L-Ieucyl-L-glutamyl-L-Histidyl-L-aspartyl-7-Amino-4-trifluoromethylcoumarin</i>
ATG	<i>Autophagy Related Gene</i>
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>
BSA	<i>Bovine Serum Albumine</i>
Caspase	<i>Cysteine-dependent aspartate-specific proteases</i>
clAP	cellular IAP
cm ²	Centímetros quadrados
CP	Câncer de Pâncreas
Ctrl	Controle
CDKN2A	<i>Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A</i>
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>Endoplasmic reticulum</i>
FADD	<i>Fas-Associated Death Domain</i>

GEF	<i>guanine nucleotide exchange factor</i>
H	Hora
hCNT	<i>human concentrative nucleoside transporters</i>
HEPES	<i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i>
HER2	<i>Human epidermal growth factor receptor 2</i>
hENT	<i>Human equilibrative nucleoside transporters</i>
HIF-1	<i>Hypoxia-inducible factor 1</i>
HO	<i>Hoescht</i>
HPLC	<i>High-performance liquid chromatography</i>
IAP	<i>Inhibitor of Apoptosis</i>
IFN	Interferon
INCA	Instituto Nacional de Câncer
IPMN	<i>Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm</i>
kDa	quiloDalton
L	Litro
LMP	<i>Lisossomal membrane permeabilization</i>
mA	Miliampere
MB	<i>Methylene Blue</i>
MB-PDT	<i>Methylene Blue-Photodynamic Therapy</i>
MCN	<i>Mucinous Cystic Neoplasm</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- κ B	<i>Factor Nuclear kappa B</i>
ng	Nanograma
nM	Nanomolar
NSA	Necrossulfonamida
PaIN	<i>Pancreatic Intraepithelial Neoplasia</i>
PBSA	<i>Phosphate buffered saline</i>
PDT	<i>Photodynamic Therapy</i>
PDAC	<i>Pancreatic Ductal Adenocarcinoma</i>
PI	<i>Propidium Iodide</i>
Ps	Photosensitizer

PSCs	<i>Pancreatic Stellate Cells</i>
PVDF	<i>Polyvinylidene difluoride</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>
SMAC	<i>Second Mitochondria-derived Activator of Caspase</i>
TCR	<i>T-Cell Receptor</i>
TGF β	<i>Transforming growth factor beta</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF α	<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>
WB	<i>Western Blot</i>

Lista de Figuras

Figura 1: Representação esquemática da anatomia e divisão geral do pâncreas.....	22
Figura 2: Principais alterações no microambiente tumoral durante o desenvolvimento do PDAC.....	25
Figura 3: Esquema representativo dos mecanismos envolvidos na ativação constitutiva de Kras no PDAC.....	26
Figura 4: Mecanismo de ação da gencitabina com destaque para as principais enzimas que apresentam expressão alterada no processo de quimioresistência do PDAC.....	31
Figura 5: Resumo esquematizado da sinalização apoptótica extrínseca e intrínseca.....	35
Figura 6: Formação dos complexos desencadeadores da apoptose ou necroptose desencadeada pela sinalização induzida por TNF.....	38
Figura 7: Mecanismos moleculares de necroptose.....	39
Figura 8: Diagrama de Jablonski modificado, esquematizando o processo de fotossensibilização na PDT.....	42
Figura 9: Estrutura química do azul de metileno.....	45
Figura 10: Ensaio de viabilidade celular das linhagens de PDAC humanas após o tratamento com a MB-PDT utilizando a microscopia de fluorescência.....	61
Figura 11: Diferenças nas susceptibilidades à MB-PDT entre as linhagens de PDAC.....	62
Figura 12: A concentração intracelular do MB não se relaciona à susceptibilidade das células à MB-PDT.....	64
Figura 13: Localização intracelular do MB nos lisossomos nas células PANC-1, MIAPaCa-2, AsPC-1 e BxPC-3.....	74
Figura 14: Diferenças nos níveis proteicos basais de RIPK3 e MLKL entre as linhagens de PDAC humanas.....	76
Figura 15: A inibição da via de necroptose reduz a efetividade da MB-PDT sobre as linhagens de PDAC humanas que não apresentam limitações na expressão de componentes da via.....	82

Figura 16: MB-PDT induz o aumento da fosforilação de MLKL nas linhagens que não apresentam deficiência para execução da via de necroptose.....	84
Figura 17: Cinética de viabilidade das células de PDAC humanas submetidas ao tratamento com a MB-PDT com 16 minutos de irradiação.....	86
Figura 18: O aumento do tempo de irradiação melhora a eficiência da MB-PDT em induzir a morte das linhagens de PDAC humanas que apresentam limitações para execução da via de necroptose.....	87
Figura 19: Perfil de fosforilação de MLKL em linhagens de PDAC humanas após a MB-PDT com 16 minutos de irradiação.....	90
Figura 20: Estresse oxidativo e citotoxicidade após MB-PDT podem variar de acordo com o protocolo de irradiação.....	91
Figura 21: O aumento no tempo de irradiação diminui os níveis de GSH intracelular em linhagens de PDAC.....	94

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	21
1.1. O adenocarcinoma de ducto pancreático (PDAC).....	21
1.1.1. Alternativas terapêuticas para o tratamento do PDAC e suas limitações.....	27
1.2. Aspectos gerais de morte celular.....	32
1.2.1. Apoptose.....	33
1.2.2. Necroses reguladas: necroptose e ferroptose.....	36
1.3. Terapia fotodinâmica.....	40
1.3.1. O azul de metileno.....	44
2. HIPÓTESE DE TRABALHO.....	47
3. OBJETIVO GERAL.....	47
3.1. Objetivos específicos.....	47
3.1.1. Avaliar a eficiência da MB-PDT sobre diferentes subtipos de linhagens tumorais de PDAC humanos.....	47
3.1.2. Estudar a participação da via de necroptose nos efeitos citotóxicos da MB-PDT sobre quatro linhagens de PDAC humanos.....	47
3.1.3. Otimizar o protocolo de MB-PDT em diferentes linhagens de PDAC.....	47
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	48
4.1. Linhagens celulares.....	48
4.2. Condições de cultivo.....	48
4.3. Preparo e quantificação do azul de metileno (MB).....	49
4.4. Fotossensibilização e Irradiação.....	50
4.5. Ensaio de viabilidade celular.....	50
4.6. Ensaio de localização sub-celular do fotossensibilizador.....	51
4.7. Ensaio de incorporação do fotossensibilizador.....	52
4.8. Avaliação dos níveis de fosforilação de MLKL, expressão de RIPK1 e RIPK3 por western-blotting.....	53
4.9. Ensaio para determinação da geração de estresse oxidativo.....	55
4.10. Quantificação de glutathiona reduzida (GSH).....	56
4.11. Análises estatísticas.....	57
5. RESULTADOS.....	58
5.1. Análise da eficiência da MB-PDT (4,5J/cm ² por 6 minutos) sobre linhagens de PDAC humanas.....	58
5.2. Estudo da contribuição da intensidade de incorporação do azul de metileno para a eficiência da MB-PDT sobre linhagens de PDAC humanas.....	63
5.3. Determinação da localização sub-celular do azul de metileno nas linhagens de PDAC humanas.....	65
5.4. Análise da expressão basal de proteínas chaves da via de necroptose em linhagens de PDAC humanas.....	75
5.5. Contribuição da via de necroptose para a citotoxicidade da MB-PDT sobre linhagens de PDAC humanas.....	78

5.6. Influência do protocolo de irradiação na eficiência da MB-PDT sobre células de PDAC humanas.....	84
5.7. Variação nos níveis de estresse oxidativo gerado após a MB-PDT com diferentes protocolos de irradiação sobre linhagens de PDAC humanas.....	91
5.8. Avaliação da capacidade antioxidante das linhagens de PDAC após o tratamento com a MB-PDT com diferentes protocolos de irradiação.....	92
6. DISCUSSÃO.....	95
7. CONCLUSÃO.....	111
8. REFERÊNCIAS.....	112

1. INTRODUÇÃO

1.1. O adenocarcinoma de ducto pancreático (PDAC)

O câncer de pâncreas (CP) é um tipo de câncer largamente reconhecido por sua extrema agressividade, apresentando-se como a quarta causa de morte relacionada à progressão de câncer nos países ocidentais (GARRIDO-LAGUNA; HIDALGO, 2015; SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2017). Os tumores pancreáticos detêm uma das maiores taxas de mortalidade, associada ao menor índice de sobrevida global de cinco anos pós-diagnóstico (inferior à 5%) (STRIMPAKOS; SAIF; SYRIGOS, 2008). Em 2015, a estimativa da *American Cancer Society* era de 46.960 novos casos e de 40.560 mortes decorrentes da doença nos Estados Unidos (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2017). Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), no Brasil o câncer de pâncreas corresponde a 2% de todos os diagnósticos de câncer e a 4% do total de mortes decorrentes desta doença (SILVA et al., 2011; ZENI et al., 2014).

Dentre todos os tipos de cânceres que acometem o tecido pancreático, o adenocarcinoma originário do ducto, PDAC (do Inglês, *pancreatic ductal adenocarcinoma*), é o mais prevalente, representando 90% das neoplasias pancreáticas, das quais dois terços estão dispostos na cabeça, enquanto os restantes distribuem-se entre o corpo e a cauda do órgão (BOSETTI, 2014).

A localização do tumor no órgão pode servir como um fator prognóstico para a sobrevida dos pacientes. Indivíduos com tumores localizados no corpo ou cauda do pâncreas apresentam uma menor sobrevida global e uma frequência aumentada de metástase em relação àqueles com tumores posicionados na

cabeça do mesmo (ARTINYAN et al., 2008). Uma vez que a região da cabeça do pâncreas está intimamente associada com órgãos e estruturas importantes (**figura 1**), como o duodeno e a extremidade distal do ducto colédoco (responsável por despejar a bile no duodeno) (LONGNECKER, 2014), o crescimento de massa tumoral nessa região pode desencadear o aparecimento de sintomatologia em estágios menos avançados da doença, o que pode ser um fator que contribui para melhorar a prognose dos pacientes com tumores localizados nesta região do órgão (ARTINYAN et al., 2008).

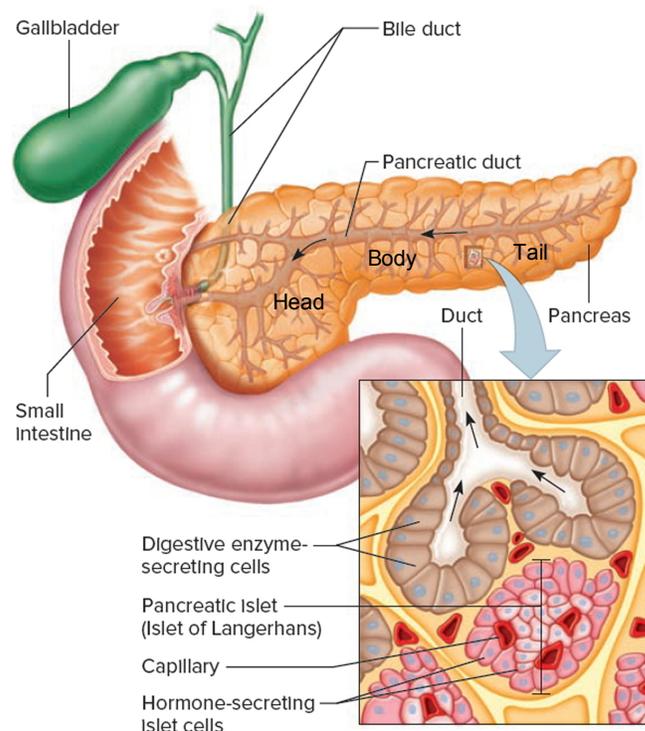


Figura 1: Representação esquemática da anatomia e divisão geral do pâncreas.

Em termos gerais, o pâncreas apresenta três regiões: cabeça, corpo e cauda. O ducto pancreático, responsável por recolher o suco digestivo produzido pela porção exócrina (células secretoras de enzimas digestivas) do órgão, percorre todo o pâncreas e apresenta ramificações menores que atingem suas várias regiões. Este ducto, na sua porção extrema proximal, se comunica com a porção distal do ducto biliar e desemboca no duodeno, onde é despejado o suco pancreático. Na porção endócrina, as ilhotas pancreáticas, são sintetizados hormônios, como a insulina e o glucagon, que são secretados diretamente na corrente sanguínea e vão atuar em tecidos e órgãos distantes. Adaptado de: <https://healthjade.com/pancreas/> . Acesso em 27/02/2018.

As causas precisas para o desenvolvimento do PDAC ainda são controversas, porém, há um conjunto de fatores de risco que estão intimamente associados ao aparecimento da doença, dentre os quais destaca-se: o consumo excessivo de álcool, tabagismo, obesidade, histórico familiar de diabetes mellitus, pancreatites e o aumento da idade (menos de 10% dos casos de CP ocorrem em indivíduos com idade inferior a 55 anos) (DHIRAJ, YADAV, ALBERT B., 2014). Além disso, há estudos que correlacionam a ingestão de carnes vermelhas com o aumento do risco de desenvolvimento deste tipo de câncer (STOLZENBERG-SOLOMON et al., 2007).

Um parâmetro bem caracterizado no contexto do desenvolvimento do PDAC é o seu processo de evolução a partir de lesões pré-invasivas que são definidas segundo seus perfis histológicos, sendo as mais comuns: PanIN (do Inglês, *pancreatic intraepithelial neoplasia*), que é um tipo de lesão microscópica, seguidas por cistos macroscópicos, IPMN (*intraductal papillary mucinous neoplasm*) e MCN (*mucinous cystic neoplasm*) (YING et al., 2016). A mais comum destas lesões é a do tipo PanIN. Com base no grau de atipia arquitetônica e citológica, esta lesão pode ser subdividida em PanIN1A (lesão plana) e PanIN1B (micropapilar), ambas apresentam um baixo grau de displasia, com núcleos arredondados e basalmente orientados; O PanIN2 exibe uma série de mudanças nucleares, dentre as quais estão a perda na polaridade, aglomeração nuclear, aumento da célula e hiper cromasia com frequente formação papilar; PanIN3, por sua vez, é uma lesão bem mais avançada,

portando graves alterações e anormalidades nucleares, com núcleos aumentados e pouco orientados, chegando a apresentar aglomerados celulares que culmina com a formação de protuberâncias partindo do epitélio, com invasão luminal (HRUBAN; MAITRA; GOGGINS, 2008).

Uma característica marcante do PDAC é o seu elevado grau de desmoplasia, sendo de 80 a 90% da massa tumoral composta por estroma. Dentre as alterações que contribuem para o perfil desmoplásico aumentado nesses tumores estão a elevada produção e deposição de componentes da matriz extracelular (ECM - *extracellular matrix*) e a intensa proliferação de células semelhantes a miofibroblastos que são denominadas células estreladas pancreáticas (PSCs - *pancreatic stellate cells*). Juntas, essas alterações contribuem para aumentar o estresse no ambiente tumoral sólido, diminuindo o aporte de nutrientes e outras substâncias, influenciando positivamente para o desenvolvimento de um perfil de resistência à quimio e/ou radioterapia (FOKAS et al., 2014).

A **figura 2** mostra um panorama da progressão do PDAC desde as lesões pré-invasivas, contemplando as principais alterações teciduais e morfológicas no microambiente tumoral e os eventos de modificações genéticas que contribuem para o desenvolvimento destes tumores, além de apresentar uma estimativa temporal dos acontecimentos em cada fase da doença.

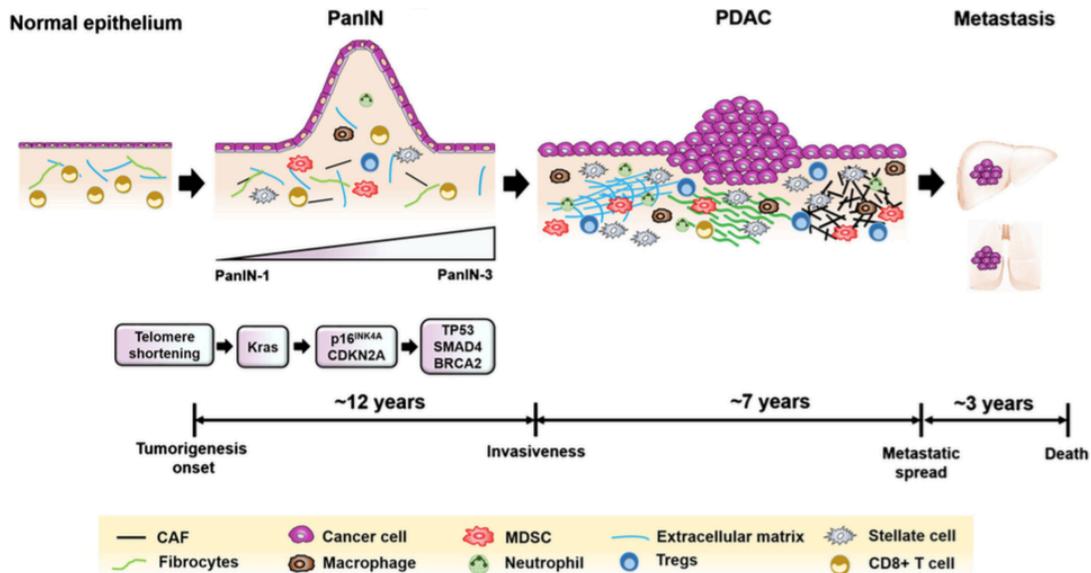


Figura 2: Principais alterações no microambiente tumoral durante o desenvolvimento do PDAC. O acúmulo de alterações genéticas como o encurtamento dos telômeros e a mutação em KRAS em estágios iniciais durante a tumorigênese (PanIN-1), a inativação de CDKN2A (PanIN-2) e a mutação em genes como TP53, SMAD4 e BRCA2 (PanIN-3) em estágios mais avançados do tumor são eventos comuns no desenvolvimento do PDAC. Além das alterações genéticas, a evolução do PDAC é acompanhada por alterações biológicas que processam-se cumulativa e gradativamente das lesões pré-invasivas (PanIN) até o PDAC, com o aumento do estroma desmoplásico que contribui para eventos críticos pró-tumorais como o estabelecimento de um microambiente imunossupressivo, crescimento, invasibilidade e a metástase do tumor para órgãos distantes como o fígado e o pulmão, por exemplo, que culminam com a morte do paciente. Uma estimativa temporal com base em estudos genéticos mostra uma média de 22 anos da tumorigênese ao espalhamento metastático do PDAC. Treg (*regulatory-T cell*); CAF (*cancer-associated fibroblast*); MDSC (*myeloid-derived suppressor cell*). Adaptado de (FOKAS et al., 2014).

Durante a progressão do PDAC é comum a ocorrência de mutações em genes que codificam proteínas supressoras de tumores ou reguladores de processos relacionados à transcrição. CDKN2A (cyclin-dependent kinase inibitor 2A - CDKN2A/ p16/ INK4A) e p53 (TP53 – *tumour protein*) são dois genes que encontram-se mutados em 98% e 70%, respectivamente, dos cânceres de pâncreas (HEZEL et al., 2006).

Um dos eventos iniciais no contexto do desenvolvimento do PDAC é a mutação no oncogene KRAS (*v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene*

homolog), que ocorre em mais de 95% dos pacientes com este tipo de tumor pancreático (MALUMBRES; BARBACID, 2003). A mutação em KRAS é um evento decisivo para impulsionar o crescimento, proliferação e diferenciação celular. Este oncogene codifica para a síntese de uma pequena GTPase (~21kDa), K-Ras, que, quando ligada à GTP encontra-se no seu estado ativo e desencadeia uma cascata de sinalização conhecida como RAS/MAPK que é decisiva para os eventos de multiplicação das células (CAMPBELL et al., 1998; MALUMBRES; BARBACID, 2003).

As principais alterações genéticas no oncogene KRAS no PDAC são mutações pontuais nos códons G12, G13 e Q61 que culminam com o comprometimento da atividade GTPásica da proteína por ele codificada e determina a manutenção desta em um estado de ativação constitutiva que desencadeia uma sinalização de crescimento e proliferação constante (**figura 3**) (MOSKALUK; HRUBAN; KERN, 1997).

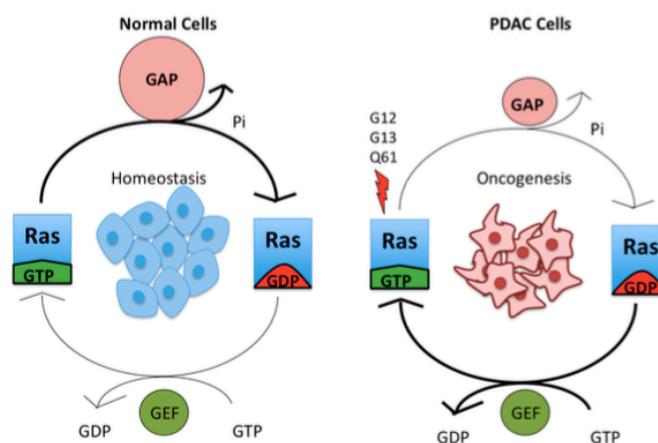


Figura 3: Esquema representativo dos mecanismos envolvidos na ativação constitutiva de K-ras no PDAC. Nas células normais (à esquerda), K-ras alterna entre um estado ativo, ligado à GTP, e inativo, associado à GDP. Em células que não estão se dividindo, K-ras permanece majoritariamente no seu estado inativo.

Em resposta à ação de fatores de crescimento, K-ras é ativada pela ação de GEF (*guanine nucleotide exchange factor*), que facilita a ligação de GTP à essa GTPase. Ras-GTP se liga à uma série de efetores e desencadeia uma sinalização de crescimento e proliferação. Esta sinalização é contrabalanceada pela ação de GAP (*GTPase-activating proteins*) que induz a hidrólise do GTP e o retorno à forma Ras-GDP inativa. As mutações nos resíduos G12, G13 e Q61 interferem nas interações não covalentes entre K-ras e GAP e prejudicam o processo de hidrólise do GTP, mantendo K-ras constitutivamente ativa. A espessura das setas e o tamanho dos símbolos estão indicando a intensidade dos fenômenos de ativação ou desativação. (ZEITOUNI et al., 2016)

1.1.1. Alternativas terapêuticas para o tratamento do PDAC e suas limitações

Para os pacientes considerados inoperáveis, seja pelo posicionamento do tumor em regiões que comprometem o funcionamento de ductos, tecidos ou órgãos circunvizinhos importantes, ou devido ao estágio avançado da doença, os tratamentos viáveis restringem-se a quimioterapia, radioterapia ou a combinação das duas (BOWN et al., 2002).

O PDAC apresenta uma série de características inerentes a sua biologia que contribuem para limitar a eficiência dos atuais tratamentos disponíveis para a doença. Dentre os fatores limitantes está a complexa rede de alterações genéticas observadas nesses tumores que podem afetar, por mecanismos variados, as vias envolvidas na ação de fármacos ou agentes terapêuticos, já tendo sido reportado um número total de 63 alterações genéticas que implicam em mudanças em 12 vias de sinalização e diferentes processos nessas células (JONES et al., 2008). Além de recursos celulares como a baixa estabilidade fenotípica e alta flexibilidade adaptativa destes tumores frente à mudanças ambientais induzidas pelo uso de quimioterápicos, por exemplo, há a contribuição de características do microambiente tumoral como a baixa

densidade vascular, típica de tumores sólidos e fibrosos, que limitam fisicamente a entrega dos quimioterápicos e influenciam na forte imunossupressão desencadeada pelos componentes tumorais para a quimioresistência observada nesses tumores (OBERSTEIN; OLIVE, 2013).

Adicionalmente, as alterações em genes como KRAS, CDKN2A, p53 e SMAD4 apresentam forte influência no caráter invasivo e na capacidade metastática desses tumores, já tendo sido mostrado que, contrariamente ao paradigma que por vezes permeia a dinâmica das pesquisas com o câncer de que o processo de metástase é um evento de início mais tardio no curso evolutivo da doença, nos tumores pancreáticos já tem sido reportada a ocorrência de micro-metástases, com a detecção de células portando marcadores da transição epitélio-mesenquimal (EMT, do inglês, *epithelial mesenchymal transition*) ainda nos estágios de PanIN-2 e PanIN-3, lesões que precedem o aparecimento do PDAC, além da presença de células pancreáticas circulantes (CPCs) no sangue de camundongos com modelos de PanIN, mas com ausência de PDAC histologicamente detectável, o que é um fator que contribui para limitar também as terapias locais (RHIM et al., 2012).

Em decorrência da heterogeneidade e peculiaridades de combinações nas alterações genéticas e biológicas do PDAC em cada indivíduo, as abordagens terapêuticas quimioterápicas são sempre desenhadas com base nas características de cada paciente. De forma geral, a monoterapia com o 5-fluoroacil, um análogo de pirimidina que, uma vez ativado, na forma de 5-fluorouridina trifosfato, desempenha suas funções anti-neoplásicas ao se

incorporar ao RNA, substituindo a uracila, e agir interrompendo o processamento da síntese desse ribonucleotídeo, e que inibe o crescimento celular, foi a primeira abordagem quimioterápica utilizada na clínica para o tratamento do adenocarcinoma de pâncreas (LONGLEY; HARKIN; JOHNSTON, 2003). No final da década de 90, porém, após extensos estudos comparando os efeitos do tratamento com 5-fluoracil e a gencitabina, observou-se uma melhora na sobrevida global (OS, do Inglês, *overall survival*) dos pacientes e passou-se a utilizar a monoterapia com este novo quimioterápico como primeira linha de tratamento para o PDAC localmente avançado e metastático (BURRIS et al., 1997).

A gencitabina, um composto sintético análogo de deoxicidina, é a principal terapia utilizada atualmente na clínica, de forma individual ou, mais recentemente, em combinação com outros fármacos como o nab-paclitaxel (*nanoparticle albumin bound (nab)-paclitaxel*), para o tratamento do PDAC (AMRUTKAR; CLAUDHAUG, 2017). Esta pró-droga inativa é transportada para o interior das células por transportadores de nucleosídeos que podem ser de dois tipos: transportadores nucleosídeos equilibrativos (hENT1 e hENT2) e transportadores nucleosídeos concentrativos (hCNT1, hCNT2 e hCNT3). Uma vez no ambiente intracelular, a gencitabina precisa ser fosforilada por kinases específicas para desempenhar sua ação de inibição da síntese de DNA. Na sua forma difosforilada (dFdCDP, do inglês, *diffourodeoxycytidine diphosphate*), ela inibe a enzima ribonucleotídeo redutase que é essencial para a síntese de desoxinucleosídeos necessários para síntese do DNA. Adicionalmente, na sua

forma trifosforilada (dFdCTP, do inglês, *diflourodeoxycytidine triphosphate*) a gencitabina compete com a citosina e é incorporada no DNA. Dessa forma, o alongamento da fita é prejudicado, o que leva à interrupção da replicação do DNA, impede a progressão do ciclo celular e induz a ativação da via de morte apoptótica (AMRUTKAR; CLAUDHAUG, 2017).

Embora a utilização da gencitabina confira uma discreta melhora na sobrevida global e uma melhor relação custo/benefício aos pacientes em relação aos outros quimioterápicos, a maior parte dos indivíduos submetidos ao tratamento apresenta resistência intrínseca ou adquirida após exposição a este composto (AMRUTKAR; CLAUDHAUG, 2017). Adicionalmente a todas essas limitações funcionais, observa-se uma alta taxa de recidiva tumoral em curto espaço de tempo (em média de 3.7 meses) após a cirurgia ressectiva mesmo em pacientes submetidos à quimioterapia adjunta com a gencitabina (FISCHER et al., 2012).

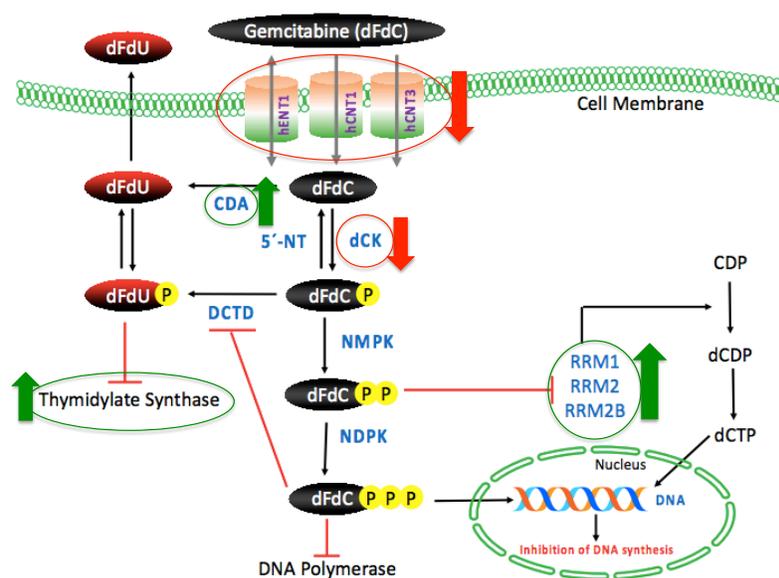


Figura 4: Mecanismo de ação da gencitabina com destaque para as principais enzimas que apresentam expressão alterada no processo de quimioresistência do PDAC. No seu mecanismo de ação anti-tumoral: os transportadores nucleosídicos medeiam a entrada da gencitabina para o meio intracelular, onde ela sofre uma fosforilação pela deoxicitidina quinase (dCK) e, em seguida, passa por duas outras fosforilações sequenciais promovidas pelas enzimas nucleosídeo monofosfato quinase (NMPK) e nucleosídeo difosfato quinase (NDPK), até chegar ao seu estado trifosforilado ativo. Assim modificado, o composto é capaz de se incorporar ao DNA que está sendo sintetizado e inibir o alongamento da fita, interrompendo a síntese dessa molécula, o que desencadeia a ativação da via de morte celular apoptótica. Nos pacientes com resistência à gencitabina os transportadores de nucleosídeos equilibrativos e concentrativos (hENT1, hCNT1 e hCNT3) e a deoxicitidina quinase (dCK) estão menos expressos (aros e setas vermelhas), enquanto ribonucleotídeo redutase (RRM1, RRM2 e RRM2B – subunidades), citidina deaminase (CDA) e timidilato sintase (*thymidylate synthase*) estão com sua expressão aumentada (aros e setas verdes). Adaptado de Amrutkar & Gladhaug, 2017.1

Os principais eventos determinantes para a quimioresistência ao tratamento com a gencitabina no PDAC são a redução no transporte desta molécula para o espaço intracelular, por meio da diminuição da expressão dos transportadores de nucleosídeos no tecido tumoral e a reduzida expressão da deoxicitidina quinase, enzima responsável pelo primeiro evento de fosforilação que permite a posterior ativação do fármaco. Além disso, a expressão aumentada das enzimas citidina deaminase, timidilato sintase e ribonucleotídeo redutase promovem, respectivamente, a deaminação da deoxicitidina, convertendo-a em deoxiuridina, a conversão de deoxiuridina monofosfato a deoxicitidina monofosfato e a formação de deoxinucleosídeos monofosfatos a partir de ribonucleotídeos (AMRUTKAR; CLAUDHAUG, 2017). Esses eventos levam à inativação da ação citotóxica da gencitabina (**figura 4**).

1.2. Aspectos Gerais de Morte Celular

A morte celular é um evento relacionado a biologia do desenvolvimento e a homeostase tecidual em organismos multicelulares e desempenha funções

importantes nos contextos fisiológicos e patológicos da vida. Conceitualmente, a definição de morte celular tem sido uma tarefa complexa e controversa, uma vez que os vários mecanismos de morte ou de indução de morte estão interconectado em diferentes níveis (GALLUZZI et al., 2018).

De acordo com o *Nomenclature Committee on Cell Death*, a morte celular é um processo que envolve alterações irreversíveis nas funções básicas das células, especialmente nos processos de homeostase redox e de síntese de ATP, capaz de induzir a perda da integridade arquitetônica e da função celular, como a fragmentação dos seus componentes e permeabilização irreversível da membrana plasmática (GALLUZZI et al., 2018).

As vias de morte celular são divididas em duas categorias: morte celular “acidental” (ACD, do inglês, *accidental cell death*), um processo descontrolado e instantâneo geralmente decorrente da exposição à condições extremas de estresse mecânico, físico ou químico; e, a morte celular “regulada” ou “programada” (RCD, do inglês, *regulated cell death*), um processo que envolve uma complexa rede de sinalização e transdução de sinais e que é passível de modulação genética e/ou farmacológica. Em qualquer um dos casos, existe uma série de características morfológicas e marcadores bioquímicos e moleculares característicos e importantes na determinação e no estudo dos mecanismos de morte celular (GALLUZZI et al., 2018).

Dentre as vias de morte reguladas destacam-se a apoptose e alguns mecanismos de necrose. Em células tumorais, esses tipos distintos de morte

podem ser induzidos pela PDT (BUYTAERT; DEWAELE; AGOSTINIS, 2007; BACELLAR et al., 2015; CHEN et al., 2019).

1.2.1. Apoptose

A apoptose é uma via de morte celular programada que desempenha um importante papel nos processos fisiológicos normais e cruciais para o desenvolvimento dos organismos multicelulares e está diretamente envolvida, por meio de sua desregulação, no contexto de algumas condições patológicas (ELMORE, 2007; KRISTIANSEN; HAM, 2014; WANG, 2014).

O termo apoptose foi primeiro empregado por Kerr e colaboradores em um clássico paper de 1972 para descrever uma via de morte celular com características morfológicas distintas do que se conhecia até então (KERR; WYLLIE; CURRIE, 1972). A morte apoptótica pode ser desencadeada por estímulos extracelulares (via extrínseca) ou intracelulares (via intrínseca), que variam desde o estresse de retículo endoplasmático, acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS), estresse ou problemas na replicação do DNA, alterações funcionais dos microtúbulos, dano no DNA, até a ausência de fatores de crescimento ou a ativação de receptores de morte presentes na membrana plasmática pela interação de moléculas específicas com seus ligantes cognatos na face externa da bicamada lipídica, sendo que ambos culminam com a ativação de um grupo de enzimas cisteína-aspártico proteases, as caspases (GALLUZZI et al., 2018). Estas enzimas são capazes de clivar outras proteínas

em resíduos próximos a resíduos de ácido aspártico e assim degradar essas biomoléculas.

Um evento crítico para a determinação da apoptose intrínseca é a permeabilização irreversível da membrana externa mitocondrial (MOMP, *mitochondrial outer membrane permeabilization*), onde atua um outro importante grupo de proteínas no contexto da sinalização celular da via de apoptose: a família Bcl-2 de proteínas, que é composta por proteínas anti-apoptóticas, como a Bcl-2 e BCL- xL (*Bcl extra large*) e pró-apoptóticas, BAX (*Bcl-2 associated X protein*) e BAK (*Bcl-2 Homologous antagonist/killer*). O desbalanço entre essas proteínas anti e pró-apoptóticas, com aumento das pró-apoptóticas, é determinante na regulação deste processo de morte celular (FULDA; DEBATIN, 2006; GALLUZZI et al., 2018). A apoptose extrínseca, por sua vez, decorre de perturbações extracelulares que são transduzidas para o interior das células por meio de receptores de membrana, especialmente receptores de morte, como o TNFR, TRAILR e FASR, por exemplo. De forma geral, a associação das respectivas moléculas com seus receptores cognatos leva a formação de complexos multiprotéicos intracelulares que induzem a ativação de caspase-8 (ou caspase-10, em alguns contextos) que, por sua vez, cliva e ativa as caspases efetoras, 3, 6 e 7. A ativação dessas caspases efetoras culmina com a morte celular (**figura 5**) (GALLUZZI et al., 2018).

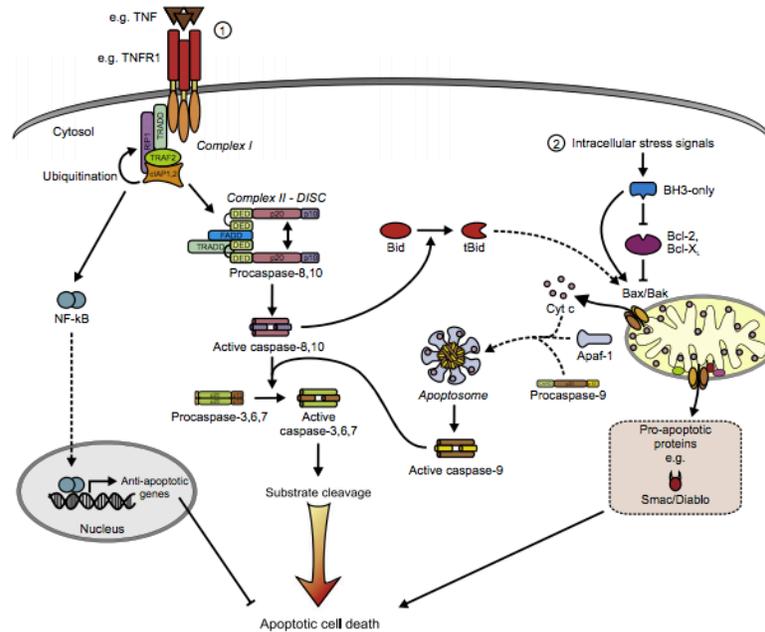


Figura 5: Resumo esquematizado da sinalização apoptótica extrínseca e intrínseca.

A ativação de TNFR pelo TNF inicia a via extrínseca da apoptose (1). A formação do complexo I, resulta na ativação de NF-κB que leva à transcrição de genes anti-apoptóticos. O TNFR1 é endocitado e dá-se a formação do complexo II, para o qual a caspase-8 é recrutada e ativada. Após este evento, ocorre a ativação das caspases efetoras que culmina com a clivagem dos seus substratos e com a morte celular. A via intrínseca da apoptose (2) é ativada por sinais de estresse intracelulares. Nela, BAX e BAK são ativados e induzem a liberação de vários mediadores de apoptose mitocondrial, dentre os quais estão 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 do apoptossomo ativa a caspase-9. Adicionalmente, a caspase-8 pode mediar a clivagem de BID e potencializar a via extrínseca através da ativação da via mitocondrial. Adaptado de Duprez et al., 2009.

Os mecanismos pelos quais a apoptose se ativa estão alterados e/ou inibidos no câncer, o que confere resistência a esta via de morte pelas células cancerígenas. Dentre os mecanismos de resistência à apoptose no PDAC, destaca-se a ocorrência de uma super-expressão de proteínas anti-apoptóticas, como a Bcl-xL, um evento que inibe os processos de senescência e morte, promovendo a carcinogênese (IKEZAWA et al., 2017). Além disso, nos tumores de pâncreas observa-se a resistência à sinalização desencadeada por

receptores de morte, o que limita a ação de indutores como TNF α , FasL and TRAIL nessas células (HAMACHER et al., 2008).

1.2.2. Necroses reguladas: necroptose e ferroptose

A necrose foi, por muito tempo, considerada como um tipo de morte celular exclusivamente acidental. Porém, um crescente número de robustas evidências têm mostrado que a necrose pode decorrer de uma intrincada rede de mecanismos genética e bioquimicamente bem regulados (GALLUZZI et al., 2018). Fatores como a ocorrência de morte celular por necrose durante o desenvolvimento de organismos (a morte de condrócitos como um evento de controle do crescimento longitudinal de ossos, por exemplo) (ROACH; CLARKE, 2000) e na homeostase de tecidos adultos, como em células epiteliais intestinais (BARKLA; GIBSON, 1999), além do fato de que a inibição de determinadas processos celulares, como a autofagia e apoptose, podem induzir a morte necrótica em algumas células (VERCAMMEN et al., 1998; DEGENHARDT et al., 2006) estão entre as evidências de que a necrose pode ocorrer de forma ordenada e bem regulada. Duas das vias de morte celular necróticas reguladas atualmente estudadas são a necroptose e a ferroptose. A necroptose é a mais explorada e melhor entendida até o presente.

A necroptose é uma via de RCD que pode ser desencadeada por perturbações nos ambientes extracelular ou intracelular. Estas alterações extracelulares são detectadas por receptores específicos, capazes de induzir a formação intracelular de complexos moleculares multi-proteicos, que variam de

acordo com a intensidade do sinal e das condições celulares internas, e podem, entre outros eventos, desencadear a via de morte necroptótica (LINKERMANN; GREEN, 2014) (**figura 6**).

A necroptose pode ser desencadeada após a estimulação de receptores de morte, como o TNFR1, CD95 (ou FAS) e TRAILR, entre outros. A via de sinalização necroptótica mais estudada atualmente é a desencadeada pelo TNF. Este ligante de morte se associa ao TNFR, ativando-o. Uma vez ativo, o TNFR recruta as proteínas TRADD (*TNFR-associated death domain*), TRAF2 (*TNFR receptor associated factor 2*) e TRAF5, cIAPs (*cellular inhibitor of apoptosis 1*) e RIPK1, e induz a formação de um complexo denominado complexo I. Neste, cIAPs promovem a poliubiquitinação de RIPK1, o que estabiliza o complexo e desencadeia uma série de eventos que culmina com a ativação da via canônica do NF- κ B (*nuclear factor- κ B*) e consequente regulação positiva de uma série de genes envolvidos em sinalização de sobrevivência e proliferação. Caso o estímulo de TNF seja realizado por um período de tempo maior e dependendo do contexto celular, pode ocorrer a formação de um segundo complexo denominado DISC (do inglês, *death-inducing signalling complex*), ou complexo II (algumas vezes referido como complexo IIa). Para a formação do complexo II, é necessária a deubiquitinação de RIPK1 pela ação de deubiquitinases como a CYLD e A20, ou a inibição de cIAPs por Smac, uma vez que esses eventos contribuem para promover a dissociação de RIPK1 e TRADD do complexo I e sua liberação para o citosol, onde elas se associam à FADD, molécula que desempenha uma função adaptadora para o recrutamento de pró-

caspase-8. Caspase-8 ativa, no complexo II, desencadeia uma cascata de sinalização para a ativação de caspases efetoras que culmina com a morte celular por apoptose. Em situações onde caspase-8 esteja inibida, forma-se o necrossomo (ou complexo IIb), contendo RIPK1, RIPK3 e MLKL e a morte celular por necroptose é observada (VANDENABEELE et al., 2010; HAN; ZHONG; ZHANG, 2011; BERGHE et al., 2014; GALLUZZI et al., 2017).

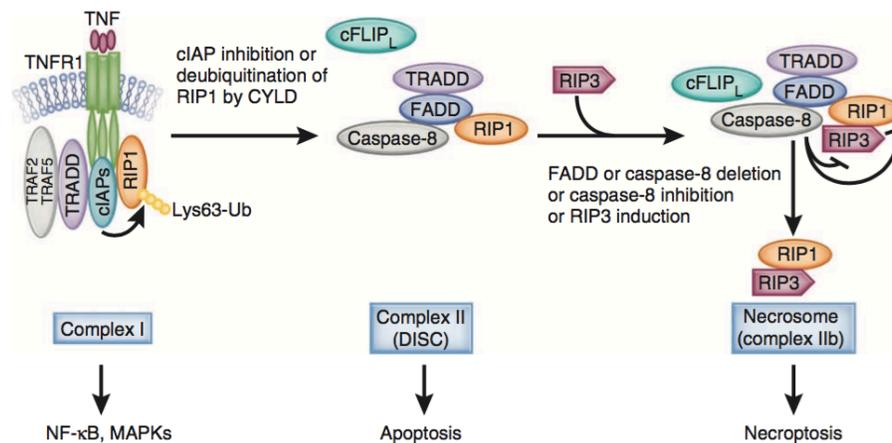


Figura 6: Formação dos complexos desencadeadores da apoptose ou necroptose desencadeadas pela sinalização induzida por TNF. Após a ativação do receptor de TNF (TNFR1) pela ligação extracelular de seu ligante cognato, ocorre a formação de um complexo multi-proteico associado à membrana plasmática (Complexo I). A poliubiquitinação de RIP1 por cIAPs neste complexo é essencial para a ativação de NF-κB e MAPK. A deubiquitinação de RIP1 por CYLD (*cylindromatosis*) ou a inativação de cIAPs converte o complexo I em complexo II (ou DISC) que desencadeia a via de apoptose. A deleção de FADD, uma proteína adaptadora envolvida na interação de TRADD e RIP1 com caspase-8, ou a inibição de caspase-8 ou quando RIP3 está com sua expressão aumentada, ocorre a formação do necrossomo, passo essencial para a indução da necroptose. Adaptado de Han et al., 2011.

A interação entre RIPK1 e RIPK3 é mediada por um domínio característico dessa família de quinases, denominado RHIM (do inglês, *RIP-homotypic interaction motif*) (SUN et al., 2002). Esta interação induz a auto e transfosforilação dessas quinases. Após sua ativação, RIPK3 recruta e promove

a fosforilação de MLKL, uma pseudoquinase. Sequencialmente a este evento, embora não sejam conhecidos em detalhes os mecanismos exatos, sabe-se que MLKL passa por mudanças conformacionais e expõe um domínio na sua porção N-terminal que parece estar envolvido na sua oligomemização, sua associação a fosfolípídeos específicos e consequente translocação para a face interna da membrana plasmática, onde induz a formação de poros, com consequente extravasamento do conteúdo celular para o meio (**figura 7**), incluindo os chamados DAMPs (*damage-associated molecular patterns*), um dos eventos estratégicos para a imunogenicidade da necroptose (SUN et al., 2002; ZHAO et al., 2012; QUARATO et al., 2016; PETRIE et al., 2017).

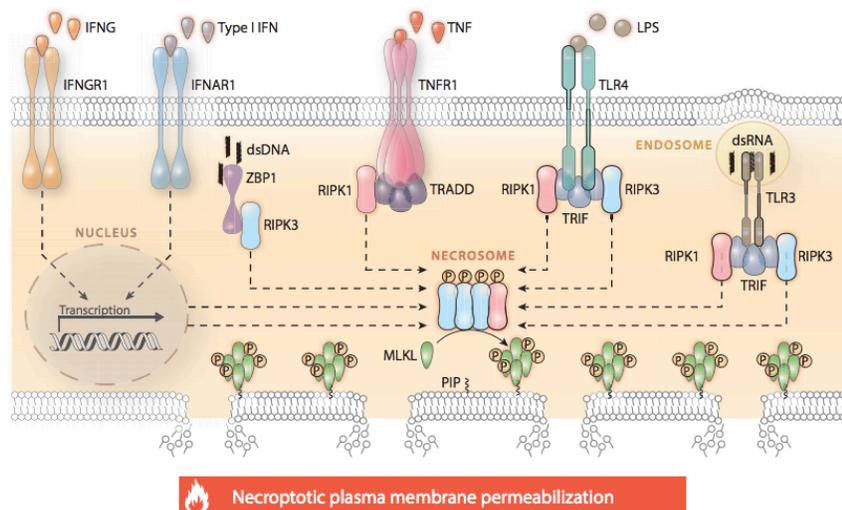


Figura 7: Mecanismos moleculares da necroptose. A via de necroptose depende da formação de complexos de interação entre RIPK3-MLKL (necrossomo) para promover a translocação dos oligômeros de MLKL para a face interna da membrana plasmática, promovendo sua consequente permeabilização. A formação do necrossomo pode ser desencadeada por ativação de receptores de morte ou por alterações internas, como a presença de ácidos nucleicos virais. A sinalização desencadeada pela ligação de TNF ao seu receptor TNFR1 é uma das vias melhor exploradas. Após a ligação do respectivo ativador cognato, é disparada uma cascata de sinalização que pode levar à formação do necrossomo, quando caspase-8 está inativa (pela ação de inibidores de caspases como o zVAD-fmk, por exemplo). A formação do necrossomo induz a fosforilação da pseudoquinase MLKL, induzindo a

sua oligomerização e translocação para a membrana plasmática que culminam na morte celular por necroptose. A formação do necrossomo é fortemente dependente de uma série de interações físicas e da formação de complexos supramoleculares que estão suprimidos na figura para fins didáticos. Abreviações: dsDNA, *double-stranded DNA*; dsRNA, *double-stranded RNA*; IFN, *interferon*; IFNAR1, *interferon (alpha and beta) receptor 1*; IFNG, *interferon gamma*; IFNGR1, *interferon gamma receptor 1*; LPS, *lipopolysaccharide*; P, *phosphate*; PIP, *phosphatidylinositol phosphate*; TLR, *Toll-like receptor*; TNF, *tumor necrosis factor*; TRADD, *TNFRSF1A associated via death domain*; TRIF (*TICAM1*), *toll-like receptor adaptor molecule 1*; ZBP1, *Z-DNA binding protein 1*. Fonte: (GALLUZZI et al., 2017).

Por ser uma via de morte recentemente explorada, o estudo da necroptose apresenta um caráter altamente dinâmico, o que tem levado à descoberta de outros mecanismos de atuação dos componentes já descritos na via de sinalização, a depender das condições e modelos considerados. Um exemplo disso são os recentes estudos que mostram que RIPK1 desempenha outras funções além de participar na ativação de RIPK3 induzida pelo estímulo de TNFR1. Ela pode atuar, de forma contrária, inclusive, inibindo a ativação espontânea de RIPK3 em alguns contextos específicos, como na atuação de TLR3 (*Toll-like receptor 3*) (DILLON et al., 2014; OROZCO et al., 2014). Além disso, tem sido mostrado que a deficiência de RIPK1 induz a morte de camundongos após o seu nascimento, mas que a concomitante deficiência de RIPK3 e caspase-8 é capaz de reverter o quadro de letalidade nesses animais, o que demonstra que RIPK1 apresenta um complexo papel de regulação de vias de morte que pode variar de acordo com o contexto bioquímico, molecular e celular (DILLON et al., 2014).

Além da necroptose, trabalhos recentes na literatura de morte celular têm mostrado que algumas células tumorais com mutação em KRAS podem ser seletivamente mortas por ativadores químicos (erastina e RSL3, por exemplo) de

uma via de morte alternativa, dependente de ferro, denominada ferroptose (STOCKWELL et al., 2017). A ferroptose é uma via de morte regulada que é induzida a partir de alterações no metabolismo do ferro e de uma diminuição das defesas antioxidantes celulares dependentes de glutathione (GSH, a sua forma reduzida). Uma vez depletados os níveis de GSH, há um comprometimento na atividade da GPX4 que culmina com um acúmulo exacerbado da peroxidação de lipídeos que leva à morte das células (DIXON et al., 2012; XIE et al., 2016).

1.3. Terapia Fotodinâmica

Diante do cenário de limitações nos atuais tratamentos disponíveis para o PDAC, a Terapia Fotodinâmica (PDT, do Inglês *Photodynamic Therapy*) se apresenta como uma opção promissora para o tratamento desta doença, uma vez que, entre outras vantagens, tem sido mostrado que ela apresenta seletividade citotóxica para células tumorais, danificando minimamente os tecidos normais (AGOSTINIS et al., 2011; SANTOS et al., 2017). Outra vantagem da PDT é o fato de ela apresentar efeitos colaterais mínimos e de não atuar imunossuprimindo os pacientes em tratamento (LI; MA; WU, 2012).

A PDT se baseia na utilização de uma substância fotossensibilizadora (Ps, do Inglês, *Photosensitizer*) que, após ser incidida por um comprimento de luz específico na região do visível, torna-se ativa. Uma vez ativado, o Ps passa do seu estado fundamental para um estado singlete excitado e, na presença do oxigênio molecular dos tecidos, pode transferir esta energia diretamente para o O₂ (reação do tipo II), como é o caso do azul de metileno (MB, *methylene blue*,

destacado na **figura 8**), levando-o a migrar do seu estado fundamental (menos energético) para o estado excitado, $^1\text{O}_2$ (oxigênio singlete). Além disso, o Ps excitado pode, ainda, reagir com moléculas orgânicas no microambiente celular (reações do tipo I) e desencadear a formação de radicais livres capazes de causar a fotoxidação de biomoléculas como proteínas, lipídeos de membrana e ácidos nucleicos, levando à degradação de organelas e à morte celular (TARDIVO et al., 2005; AGOSTINIS et al., 2011; SANTOS et al., 2017). Numa situação *in vivo*, além da destruição tumoral, a PDT pode causar danos na microvasculatura local e apresentar propriedades imunoestimulatórias que potencializam os efeitos seus anti-tumorais (GARG; AGOSTINIS, 2014; REGINATO; WOLF; HAMBLIN, 2014).

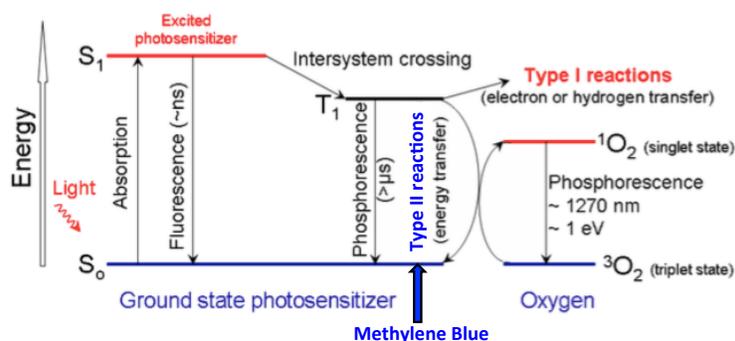


Figura 8: Diagrama de Jablonski modificado, esquematizando o processo de fotossensibilização na PDT. Após a exposição à um comprimento de luz apropriado, o fotossensibilizador (Ps) passa do estado fundamental singleto (S_0) para um estado singleto excitado (S_1). De S_1 , o Ps pode retornar ao seu estado S_0 , emitindo energia na forma de fluorescência ou passar pelo cruzamento intersistemas, atingindo um estado excitado tripleto (T_1) e, então, induzir a formação de radicais por uma das duas vias: reações do tipo I (Ps interage com moléculas orgânicas por meio de transferência de prótons (H^+) ou e^- (elétrons), induzindo a formação de radicais; ou reações do tipo II, onde o PS no estado T_1 transfere energia diretamente para o oxigênio molecular no seu estado tripleto fundamental ($^3\text{O}_2$) que passa para um estado excitado singlete ($^1\text{O}_2$) que é altamente reativo e oxidante para as biomoléculas. Após excitação, o azul de metileno desencadeia a formação de oxigênio singlete pelas reações do tipo II (seta azul). Adaptado de Agostinis et al., 2011.

A eficiência da PDT no tratamento de neoplasias depende de fatores como a dose de luz utilizada, o tipo e a concentração do Ps, bem como, sua localização no espaço intracelular e a disponibilidade de oxigênio no tecido (GABRIELLI et al., 2004; TRIESSCHEIJN et al., 2006; PRATES et al., 2009; GROSSMAN et al., 2016). A eficiência do Ps é, nesse contexto, um ponto crucial para o sucesso da terapia. Assim, diversos compostos de diferentes famílias de fotossensibilizadores estão sendo estudados e muitos deles já são aprovados para uso clínico no tratamento de diferentes tipos de tumores (**tabela 1**). Porfirinas, clorinas, feoforbidas, ftalocianinas e fenotiazínicos são algumas das famílias de Ps que já têm compostos utilizados na clínica atualmente (HUANG et al., 2008; AGOSTINIS et al., 2011).

Tabela 1: Relação de fotossensibilizadores clinicamente aprovados ao redor do mundo.

Fotossensibilizador	Classe Química	Aplicação
Photofrin®	Porfirina	Câncer de pulmão e esôfago
5-ALA/ Ameluz®/ Levulan®	Porfirina	Queratose actínica leve a moderada
Metvix® / Metvixia®	Porfirina	Queratose actínica e carcinoma basocelular
Temoporfin/ mTHPC/ Foscan®	Clorina	Câncer de pescoço e cabeça em estágios avançados
Talaporfin/ NPe6/ Laserphyrin®	Clorina	Câncer de pulmão
Verteporfin /Visudyne®	Clorina	Degeneração macular relacionada à idade, pâncreas
Redaporfin® /LUZ11	Clorina	Câncer do trato biliar

Adaptado de (STRATEN et al., 2017).

Como já mencionado, uma das principais vantagens da PDT está no seu caráter minimamente invasivo, visto que sua ação decorre de forma local, o que contribui para minimizar os efeitos debilitantes do paciente como se observa no pós-tratamento com a quimio e/ou a radioterapia e a possibilidade de sua utilização como adjuvante à cirurgia e/ou outras terapias (ACEDO et al., 2014; BROEKGAARDEN et al., 2015; SANTOS et al., 2017).

Alguns tumores apresentam uma baixa taxa de resposta a esse tratamento, o que representa uma limitação da terapia. Porém, as limitações terapêuticas da PDT geralmente estão relacionadas à fatores ligados a má execução dos protocolos, escolha de fotossensibilizadores com padrões bioquímicos, farmacocinéticos e ópticos inadequados e, até, de variações genótípicas e fenotípicas dos tumores tratados (BROEKGAARDEN et al., 2015), o que reforça a necessidade de estudos que levem ao estabelecimento dos protocolos adequados e ao entendimento dos mecanismos envolvidos na ação da PDT sobre cada tipo de tumor especificamente.

1.3.1. O azul de Metileno

O azul de metileno é um corante da família dos compostos fenotiazínicos de fotossensibilizadores (**figura 9**). Ele é amplamente utilizado como corante histológico, além de ser um PS com características fotoquímicas adequadas para o uso no tratamento com a PDT (TARDIVO et al., 2005; PINTO et al.,

2017). Este Ps pode permanecer na sua forma monomérica ou dimerizar, de acordo com a sua concentração e o solvente onde se encontra. Essas duas formas apresentam espectro de absorção distintos. Na sua forma dimérica, o MB apresenta absorção máxima a 590nm, enquanto os monômeros apresentam pico de absorção máxima em 664nm (TARDIVO et al., 2005).

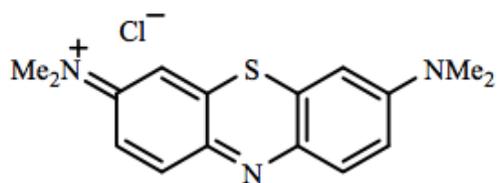


Figura 9: Estrutura química do azul de metileno. Fonte: (ORMOND; FREEMAN, 2013)

Dentre outros aspectos, a estrutura química do MB lhe confere a habilidade de atravessar a membrana das células, sendo capaz de ancorar-se na mitocôndria e lisossomos, locais estratégicos e com potencial de perturbação da homeostase celular, que é uma característica importante no contexto da PDT (LU et al., 2008). Embora a mitocôndria seja uma organela importante na indução de morte desencadeada pela PDT, já tem sido reportado que quando o MB se encontra nesta organela, ele é reduzido à uma forma fotoquimicamente inativa (leuco-MB) pela reação com o NADH mitocôndrial, o que limitaria seus efeitos nesta organela (GABRIELLI et al., 2004).

Um bom Ps deve apresentar características que melhorem a performance e viabilidade de aplicação da PDT, tais como: pureza química, baixo custo e disponibilidade comercial, seletividade pelo tecido tumoral, baixa toxicidade no

escuro, vias rápidas de eliminação pelo organismo, rotas de administração variáveis e excitação por comprimento de onda maior, dentro da janela óptica da PDT, que é uma faixa de comprimento de onda compreendida entre 600 e 800nm, região que permite maior penetrabilidade nos tecidos vivos (HUANG et al., 2008; AGOSTINIS et al., 2011) e que apresenta energia suficiente para levar a excitação do O₂ e conseqüente formação do oxigênio singlete (HUANG et al., 2008). O MB apresenta todas estas vantagens, o que o torna um fotossensibilizador com propriedades adequadas para utilização na terapia fotodinâmica (TARDIVO et al., 2005; LU et al., 2008; SANTOS et al., 2017). Em relação à sua ação fotoquímica, destaca-se a sua efetiva capacidade de desencadear as reações do tipo II, com um elevado rendimento quântico de ¹O₂ (LU et al., 2008b).

A geração de estresse oxidativo promove alterações celulares críticas e de grande impacto na homeostase das células, como a permeabilização da membrana lisossomal e conseqüente extravasamento de seu conteúdo enzimático proteolítico para o citosol após a MB-PDT, conforme reportado anteriormente (SANTUS et al., 1983).

O dano oxidativo causado pela MB-PDT pode induzir a ativação de diferentes tipos de morte, a depender do contexto do tratamento e do modelo celular ou tecido. Lu et al. (2008) observaram que, em células HeLa, o tratamento com a MB-PDT induz a morte celular pela via apoptótica intrínseca. Por outro lado, resultados prévios do nosso laboratório sugerem que

mecanismos de necrose regulada estariam sendo ativados em células de tumores mamários humanos após a MB-PDT.

Diante do cenário até aqui considerado, fica evidenciada a necessidade da realização de estudos mais aprofundados que viabilizem o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas que contribuam para melhorar as possibilidades de cura no âmbito do tratamento do PDAC.

2. HIPÓTESE DE TRABALHO

A terapia fotodinâmica, com o azul de metileno como fotossensibilizador, é capaz de induzir a morte das células de tumores de pâncreas, podendo servir como adjuvante para o tratamento desse tipo tumoral.

3. OBJETIVO GERAL

Avaliar a eficiência da terapia fotodinâmica com o azul de metileno (MB-PDT) em induzir a morte de linhagens de tumores pancreáticos humanos e explorar a participação de mecanismos de morte celular regulada nesse processo.

3.1. Objetivos Específicos

- 3.1.1. Avaliar a eficiência da MB-PDT sobre diferentes subtipos de linhagens tumorais de PDAC humanos;
- 3.1.2. Estudar a participação da via de necroptose nos efeitos citotóxicos da MB-PDT sobre quatro linhagens de PDAC humanos;
- 3.1.3. Otimizar o protocolo de MB-PDT em diferentes linhagens de PDAC.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Linhagens celulares

As linhagens utilizadas neste trabalho são derivadas de adenocarcinomas de ducto pancreático (PDAC) humanos: Panc-1 (ATCC® CRL-1469™), MIAPaCa-2 (ATCC® CRL-1420™), AsPC-1 (ATCC® CRL-1682™) e BxPC-3 (ATCC® CRL-1687™).

4.2. Condições de cultivo das células

Todas as linhagens celulares foram cultivadas em frascos plásticos descartáveis e mantidas em estufa com atmosfera de 5% CO₂ e a uma temperatura de 37°C. O meio de cultura específico para cada linhagem foi suplementado com 100mg/ml de ampicilina e estreptomicina. As especificações das condições de cultura para cada uma das células foram as seguintes: A linhagem Panc-1 foi mantida em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), suplementado com 10% de soro

fetal bovino (SFB) (Vitrocell, Campinas, Brasil); a MIAPaCa-2, foi cultivada em meio DMEM adicionado de soro fetal bovino numa concentração final de 10% e soro de cavalo 2,5% (Life technologies, CA, USA) ; As células BxPC-3 e AsPC-1 foram cultivadas em meio RPMI ((Sigma-Aldrich) implementado com 10% de soro fetal bovino. Os estoques celulares foram mantidos em meio de cultura contendo 90% de soro fetal bovino e 10% DMSO (dimetilsulfóxido) (Synth, Diadema, Brasil) à -80°C e em reservatório contendo nitrogênio líquido. Ao atingirem aproximadamente 80% de confluência, as culturas celulares foram destacadas do plástico com uma solução contendo 0,025% de tripsina (Life technologies) e 1mM de EDTA, (Vetec Bio-Brás, Brasil) lavadas, suspendidas em meio fresco e subcultivadas e/ou plaqueadas para o tratamento experimental. O cultivo das células em monocamada para o tratamento experimental foi realizado plaqueando-se $5 \times 10^4/\text{cm}^2$ células em placas de 24 poços, em meio suplementado com 2,5% SFB e incubação em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ a 37°C.

4.3. Preparo e quantificação do azul de metileno (MB)

O azul de metileno (MB) (Synth) purificado (Junqueira et al., 2002), 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 fotossensibilizador. O MB foi diluído em água purificada via sistema Milli-Q (Millipore, Billerica, MA, EUA) para uma concentração de aproximadamente 8mM. A solução foi diluída

em etanol e o espectro de absorvância realizado em espectrofluorímetro (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, Estados Unidos) na faixa de 450-700nm. A quantificação mais precisa da solução foi obtida, pela média de três medidas independentes, com a relação:

$$A=cM\varepsilon$$

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

4.4. Fotossensibilização e irradiação

As células foram sub-cultivadas em placas de 24 poços e, após 24h, submetidas ao tratamento com o azul de metileno (MB) como fotossensibilizador (Ps) nas concentrações de 2 ou 20 μ M. Nesta etapa, o meio das células foi substituído por um meio novo (RPMI ou DME-F12, de acordo com a especificidade de cada linhagem, com 2,5% SFB) contendo o Ps na concentração final desejada. As células foram incubadas a 37°C durante 2 horas com o Ps e, posteriormente, foram irradiadas com 4,5 J/cm² por 6 ou 16 minutos com um LED vermelho (λ =633nm). Para obter essa quantidade de energia nos dois casos, a altura do LED até as placas foi de 10 cm para o tempo de 6 minutos de irradiação, ou 20 cm para o tempo de 16 minutos de irradiação .

Todos os experimentos foram realizados com amostras tratadas ou não com MB e irradiadas ou não, como controles de citotoxicidade do composto e de fototoxicidade da irradiação.

4.5. Ensaio de viabilidade celular

Os experimentos de viabilidade executados nesse trabalho foram conduzidos utilizando-se duas concentrações do MB, 2 μ M ou 20 μ M, e dois tempos de irradiação: 6 ou 16 minutos. Os experimentos foram realizados nas condições de células tratadas ou não com MB e irradiadas ou não, como controles experimentais. Os tempos analisados foram de 1, 3 e 24 horas após a irradiação. Após estes tempos, 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; Sigma). Alíquotas de estoque desses compostos fluorescentes foram preparadas em água purificada via sistema Milli-Q (Millipore) na concentração de 1mg/ml. A partir dessas soluções concentradas foi preparada solução de uso, em meio de cultura, na concentração final de 5 μ g/ml para cada fluoróforo. O meio de cultura das células foi então removido e 200 μ L 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 fotografadas para posterior contagem e determinação da porcentagem de morte obtida. A fluorescência das células marcadas foi detectada utilizando-se filtros de 461nm e 545nm para excitação do Hoescht e do Iodeto de Propídeo, respectivamente.

Para cada condição (concentração de MB e tempo pós irradiação) foram realizados pelo menos 4 experimentos independentes, sendo analisadas no mínimo 500 células em cada experimento independente. Os gráficos e as análises estatísticas foram gerados no programa *GraphPad Prism 6*.

4.6. Ensaio de localização sub-celular do MB

Para esta etapa dos experimentos, foi utilizada a microscopia confocal para caracterizar a localização sub-celular do MB. Para este fim, comparou-se a fluorescência resultante de culturas de células simultaneamente incubadas na presença de MB e marcadores fluorescentes padrão de organelas: LysoTracker Green (Invitrogen, Paisley, Reino Unido) como um marcador de lisossomos, HO como um marcador para o núcleo e ERTracker Green (Invitrogen) para marcar retículo endoplasmático das célula. As imagens confocais foram obtidas utilizando-se um microscópio de varredura a laser (LSM) - 510 da Zeiss (Göttingen, Germany) pertencente à Central Analítica do IQ-USP, usando lentes objetivas de imersão em água de 1,2 N em 40x. As configurações de laser e filtro foram: linhas de laser para MB = 633, Lyso = 488 e Hoechst 33342 = 364; Divisor de feixe = HFT UV / 488/543/633; Filtros de emissão para MB: 651-704, Lyso e ER = 501-554 e Hoechst 33342 = 435-485. As configurações de imagem foram: zoom = 1, dimensões = 512x512 pixels, profundidade da imagem = 16 bits, sinal de média = 2 e espessura da seção ótica = 2 μ m. As imagens tiveram seu brilho e contraste ajustados para a figuras e foram analisados com ImageJ Software (National Institutes of Health).

4.7. Ensaio de incorporação do fotossensibilizador

Para a dosagem dos níveis de incorporação de MB pelas células, 3×10^5 células/cm² foram plaqueadas em placas de P6, incubadas com 2mL de meio contendo MB (20µM) e mantidas durante 1, 2, 4, 6, 8 e 24 horas em estufa à 37°C. Após cada um desses períodos de tempo, o sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas duas vezes com PBS e depois adicionou-se 1mL de SDS 50mM para promover a lise das membranas celulares. O sobrenadante foi recolhido e a absorbância foi medida no comprimento de onda de absorção máxima da solução de MB utilizada (655nm). A incorporação de MB foi determinada corrigindo a absorbância do MB pelo número de células remanescentes em cada poço após o período de incubação. A equação a seguir foi utilizada para o cálculo da porcentagem de MB incorporado:

$$\% \text{Incorporação de MB} = X * 100 / Y$$

Onde: X = Absorbância lida corrigida pelo vol. total de MB incubado em cada poço (mL)/n^o de células no poço; Y= Absorbância de uma solução contendo 20µM de MB/ n^o total de células plaqueadas por poço.

4.8. Avaliação dos níveis de fosforilação de MLKL, expressão de RIPK1 e RIPK3 por 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 (10mM

HEPES; 1% SDS; 1,5mM MgCl₂.6H₂O; 10mM KCl; 1mM DTT; 0,1% NP-40) contendo inibidor de protease (#14928300, GE, Little Chalfont, Reino Unido) e inibidor de fosfatase (Cocktail 2 P5726, Sigma). Após incubação de 20 minutos, sob agitação, o extrato foi coletado por raspagem da monocamada. Ao final do processo foi adicionado tampão de amostra (60mM 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) 12%, para a quantificação dos níveis de expressão das proteínas fosfo-MLKL, MLKL, RIPK1 ou RIPK3.

As proteínas foram transferidas para membranas de Fluoreto Polivinilideno (PVDF, 0,2 µm; GE; Germany), por transferência úmida, em tampão de transferência (0,3% Tris; 1,44% Glicina, 0,1% SDS; 20% metanol) a 4°C, 300mA por 2h. As membranas foram então bloqueadas incubando-as em uma solução de bloqueio Superblock (#37515, Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, EUA) e BSA 5% 1:1, a 4°C por 18 horas.

Após o bloqueio, as membranas foram incubadas com o anticorpo policlonal de coelho anti-fosfo-MLKL (ab18701, abcam), monoclonal de coelho anti-MLKL (ab184418, abcam), monoclonal de camundongo anti-RIPK1 (ab72139, abcam) ou monoclonal de camundongo anti-RIPK3 (#13526, Cell Signaling). 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, a outra parte das membranas foi incubada com anticorpo monoclonal de camundongo anti- α -tubulina Clone B-5-1-2 (T5168; Sigma).

Após a imunorreacção, as membranas inicialmente incubadas com anticorpos para a detecção da proteína na forma fosforilada (Anti-Phospho-MLKL) foram submetidas ao processo de *stripping* para a retirada dos anticorpos anti-phospho e, posteriormente, bloqueadas e re-incubadas com o respectivo anticorpo anti-MLKL (ab184418, abcam). O *stripping* foi executado da seguinte forma: as membranas foram submetidas à duas lavagens com água por 10min, uma lavagem com a solução de stripping (Tris-Glicina 25mM, SDS 1%; pH= 2,0) por 20min e posteriormente 4 lavagens com PBSA contendo 0,1% Tween 20 por 10min.

Em todos os casos, a detecção da intensidade das bandas obtidas foi realizada utilizando-se um fotodocumentador com um sistema de Imagens Nine Alliance 9.7.17.00b, 2015; Câmera HD 9 megapixels refrigerada -35°C; Software Alliance 1D, 2015 (Cambridge - UK). Posteriormente, foi realizada a densitometria quantitativa de cada banda de interesse, utilizando-se o software ImageJ (*National Institute of Health* [NIH]). Para avaliação de fosfo-MLKL, os valores de densitometria de fosfo-MLKL foram divididos pelos valores de MLKL e

o controle α -tubulina foi usado como o normalizador da quantidade de proteínas aplicadas no gel. Os valores das densitometrias de RIPK1, RIPK3 e MLKL foram divididos pela α -tubulina.

4.9. Ensaio para determinação da geração de estresse oxidativo

Para a detecção do estresse oxidativo global, $1,5 \times 10^5$ células foram semeadas em placas pretas de 96 poços e cultivadas durante 24 h. Em seguida, as células foram tratadas com a MB-PDT e após 24 horas de tratamento as células foram incubadas com $10\mu\text{M}$ de diacetato de diclorodihidrofluoresceína (DCFDA-H2; #D399, Life Technologies). Os valores de intensidade de fluorescência foram coletados durante 1h a 480/520nm de excitação / emissão, a 37°C , usando o leitor de microplacas SpectraMAX M2 (*Molecular Devices*). A detecção de ROS pelo uso de DCFDA-H2 é dependente de sua oxidação para a diclorofluoresceína (DCF), derivado fluorescente estável, e sua subsequente acumulação na célula. Cada experimento foi realizado em doze replicatas. Os dados foram expressos como a inclinação da reta obtida da regressão linear dada pelos valores de fluorescência de DCF (520nm) normalizadas pela marcação com cristal violeta (CV) (Synth) como uma correção de número de células vivas.

A marcação com CV foi feita após à leitura de fluorescência de DCF. O sobrenadante contendo a solução de DCFDA-H2 foi removido, as células foram lavadas 2 vezes com PBSA e posteriormente incubadas com uma solução de CV 0,02% p/v em água MilliQ por 5 minutos. Após este tempo, retirou-se a solução e as células foram lavadas 2 vezes com água destilada. O corante

incorporado foi então eluído com uma solução de citrato de sódio 0,1M (preparada em etanol 50% v/v), incubado as células por 5 minutos. A absorbância do sobrenadante foi lida em 585nm e calculada a concentração de CV incorporada.

4.10. Quantificação de glutathiona reduzida (GSH)

A glutathiona reduzida (GSH) foi quantificada tal como descrito anteriormente por Yilmaz et al (YILMAZ et al., 2009) com pequenas modificações. As células foram semeadas em placas de Petri (100mm) a uma densidade inicial de $2,6 \times 10^6$ células/placa. Após 48 horas, as células foram lavadas com PBSA, removidas da placa usando tripsina a 0,1%; centrifugadas 800x g por 2 minutos e os pellets lavados com PBS. Após o pellet de células ser congelado a -80°C , ele foi suspenso em 100 μl de PBSA e lisado utilizando-se seringa com agulha de insulina por 10 vezes. Uma alíquota foi separada para a quantificação de proteínas totais. 80 μl da amostra foram utilizados para precipitação de proteínas com 250 μl de tampão (KClO_4 50mM, EDTA 10mM e H_3PO_4 0,1%) e ácido metafosfórico 5% frio, agitando em vortex por 2 minutos. As amostras foram centrifugadas (8.000 x g, 10 min, 4°C) e os sobrenadantes foram recolhidos e filtrados. A análise foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) equipado com Coluna Synergi 4mm Hydro-RP-RP 80 Å, 150 x 4.60 mm (Phenomenex, USA).

4.11. Análises estatísticas

Os dados obtidos foram submetidos a análise estatística com o software GraphPad Prism 5, estabelecendo-se o mínimo de $p < 0,05$ (nível de significância) e grau de confiança de 95%. Os resultados foram analisados para distribuição gaussiana. Aqueles que passaram o teste de normalidade foram submetidos a uma análise por ANOVA, empregando o Tukey's Multiple Comparison Test (Teste de comparação múltipla de Tukey). A análise não paramétrica de Kruskal–Wallis seguida do post-test Dunns para comparações múltiplas foi utilizada para analisar os conjuntos de dados que não apresentaram uma distribuição normal.

5. RESULTADOS

5.1. Análise da eficiência da MB-PDT (4,5J/cm² por 6 minutos) sobre linhagens de PDAC humanas.

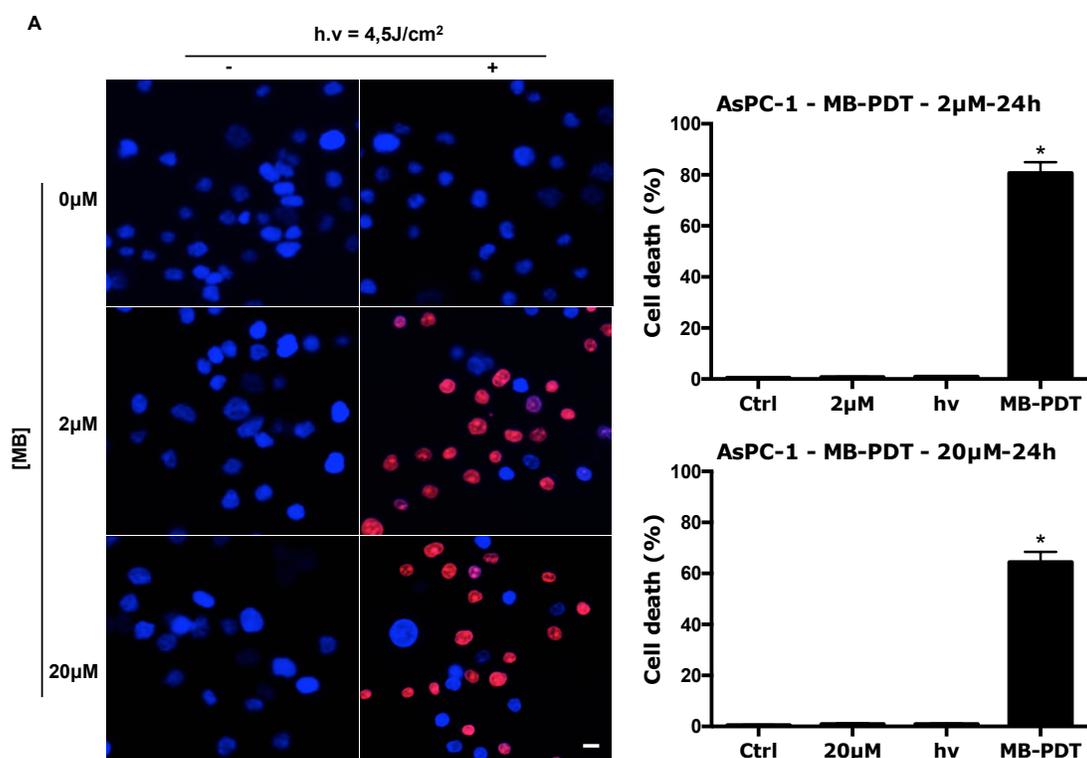
Os tumores de pâncreas estão entre os tipos mais mortais de câncer, apresentando um dos maiores índices de mortalidade associada. O presente trabalho centrou-se no estudo da eficiência da terapia fotodinâmica com o azul de metileno como fotossensibilizador (MB-PDT) em induzir a morte de diferentes linhagens tumorais de pâncreas humanos. Para tal fim, realizou-se um ensaio de viabilidade celular, consistindo, basicamente, no tratamento de quatro diferentes linhagens de adenocarcinoma de ducto pancreático (PDAC), MIAPaCa-2, Panc-1, AsPC-1 e BxPC-3, com duas concentrações de azul de metileno (MB), 2 μ M ou 20 μ M, incubado por duas horas, seguindo-se de irradiação, utilizando-se um total de 4,5J/cm² de energia, inicialmente distribuídos por um período de 6min.

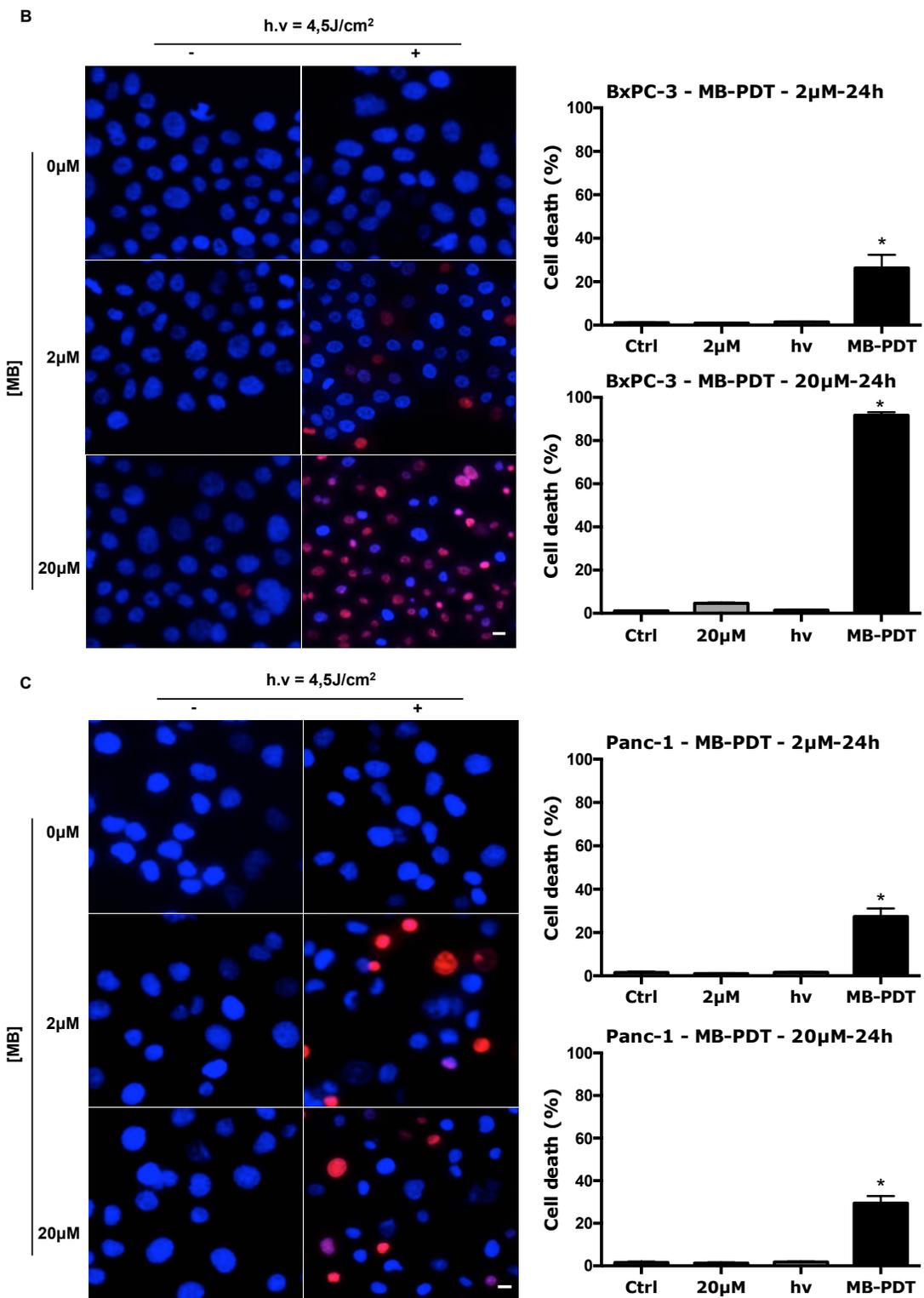
Após o tratamento com cada uma das condições de interesse, incluindo-se todas as abordagens de controles experimental (amostras tratadas ou não com o Ps e irradiadas ou não, como controles de citotoxicidade do composto e de fototoxicidade da irradiação), as culturas em monocamada foram avaliadas segundo: 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.

Os resultado apresentados na **figura 10** mostraram que a MB-PDT induziu a morte celular nas quatro linhagens de PDAC humanas estudadas, não tendo sido observada citotoxicidade por parte de nenhum dos seus componentes isoladamente. Interessantemente, observaram-se dois padrões distintos de intensidade de resposta à terapia entre essas quatro linhagens celulares. Sobre as células AsPC-1 e BxPC-3, o tratamento com a MB-PDT foi capaz de induzir uma morte com valores acima de 80% e 90%, respectivamente, em relação as condições controles, enquanto que para as linhagens Panc-1 e MIAPaCa-2, com o protocolo experimental utilizado, a porcentagem máxima de morte obtida ficou em torno de 30%.

Em termos numéricos, como mostrado na **figura 11**, onde se comparam as porcentagens máximas de morte obtidas entre os pares de células, observou-se uma diferença de aproximadamente 56% entre a linhagem MIAPaCa-2 *versus* AsPC-1 (**fig. 11A**) e, de aproximadamente 62% entre Panc-1 *versus* BxPC-3 (**fig. 11B**) em relação a susceptibilidade à terapia. Assim, as linhagens AsPC-1 e BxPC-3 foram as mais susceptíveis ao tratamento. Além das porcentagens de

morte obtidas 24h após o tratamento com a MB-PDT para cada uma das quatro linhagens, à esquerda dos histogramas apresentados para cada célula em **A**, **B**, **C** e **D** da **figura 10**, estão dispostas as fotos representativas da sobreposição das imagens dos núcleos corados com HO e/ou PI. Nas imagens pode-se observar que além do aumento do número de núcleos PI positivos (células mortas), após o tratamento com a MB-PDT, também há a ausência de indícios morfológicos de morte





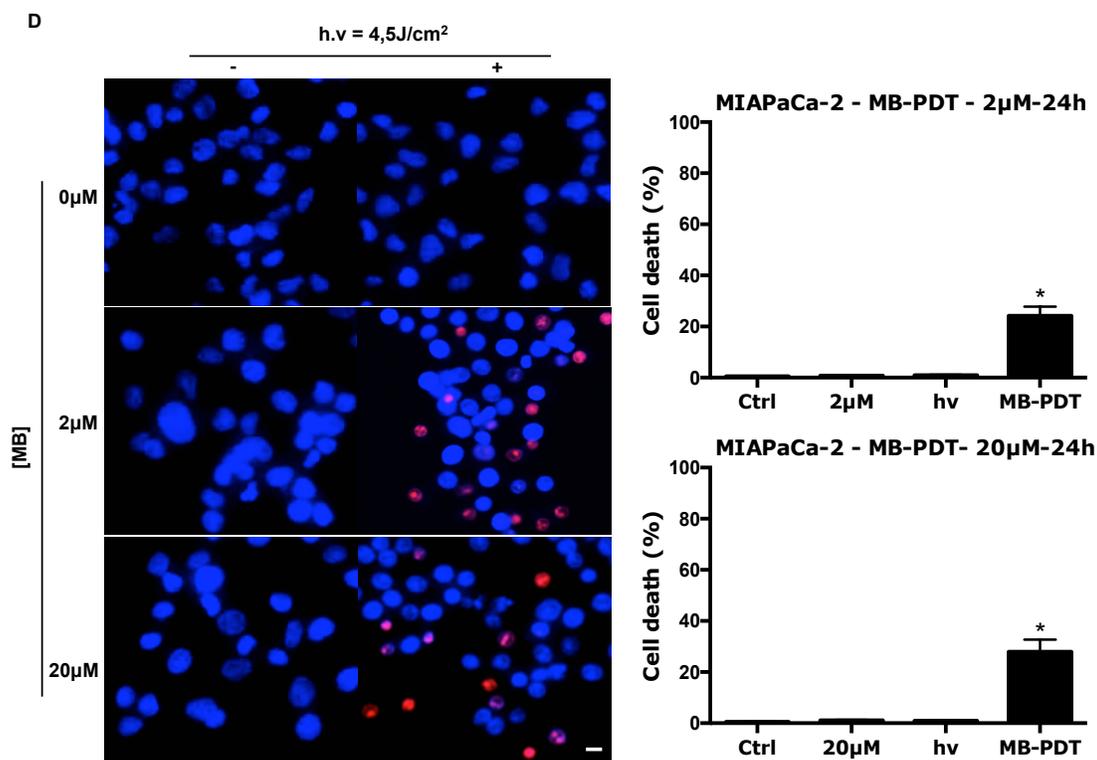


Figura 10: Ensaio de viabilidade celular das linhagens de PDAC humanas após o tratamento com a MB-PDT utilizando a microscopia de fluorescência. À esquerda de cada item, estão apresentadas imagens representativas dos núcleos das células corados com os fluoróforos Hoescht (azul) e iodeto de propídeo (vermelho) em todas as condições de tratamento ou controle experimental e, à direita, estão mostrados os histogramas com as porcentagens de morte obtida 24 horas após o tratamento com a MB-PDT com 2 ou 20µM (“MB-PDT”) de MB para AsPC-1 (A), BxPC-3 (B), Panc-1 (C) e MIAPaCa-2 (D) com os respectivos controles: “ctrl” (condições normais de crescimento e ausência de irradiação); “2µM” (solução de 2µM de azul de metileno e ausência de irradiação); “20µM” (solução de 20µM de azul de metileno e ausência de irradiação); “hv” (irradiação utilizada, totalizando 4,5 J/cm² de energia); “MB-PDT” (tratamento com o azul de metileno seguido de irradiação) de todos os experimentos realizados. As porcentagens de morte foram calculadas a partir das razões entre o número de núcleos PI positivas (células mortas) dividido pelo número de células marcadas com Hoescht (células totais). Para cada condição foram contadas, no mínimo, 500 núcleos em cada experimento independente. * p < 0.05 versus Controle. n ≥4 experimentos independentes. Resultados são representados como média ± EPM.

celular por apoptose, como a condensação da cromatina e consequente picnose nuclear. Em contrapartida, foi possível observar o aumento de volume, ou inchaço, dos núcleos das células submetidas à MB-PDT, que é um aspecto morfológico classicamente associado à morte celular necrótica.

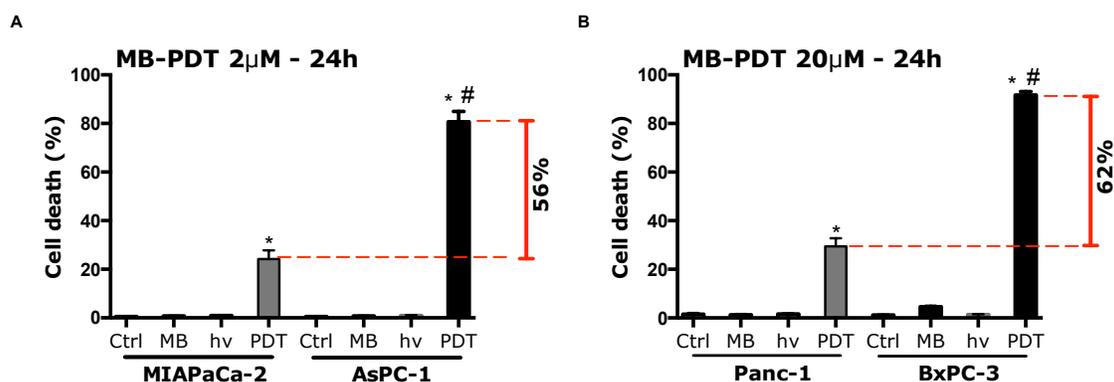


Figura 11: Diferenças nas susceptibilidades à MB-PDT entre as linhagens de PDAC. A: Percentagens de morte das células MIAPaCa-2 e AsPC-1, 24h após o tratamento com 2µM de MB em relação aos controles de toxicidade do fotossensibilizador e da irradiação isoladamente. **B:** Análise comparativa de percentagens de morte entre Panc-1 e BxPC-3, 24h após o tratamento com 20µM de MB. * $p < 0,05$ versus os controles; # $p < 0,05$ versus “PDT MIAPaCa-2”(em **A**) ou “PDT Panc-1” (em **B**); A demarcação em vermelho indica a diferença na porcentagem de morte para cada par de células comparado. “ctrl” (meio de cultura e ausência de irradiação); “2µM” (solução de 2µM de azul de metileno e ausência de irradiação); “20µM” (solução de 20µM de azul de metileno e ausência de irradiação); “hv” (irradiação utilizada, correspondente a 4,5 J/cm² de energia); “MB-PDT” (tratamento com o azul de metileno seguido de irradiação). $n \geq 4$ experimentos independentes). As concentrações do MB escolhidas para a comparação foi escolhida para evidenciar as máximas diferenças entre as células em cada par. Os resultados são representados com médias±EPM.

Este conjunto inicial de resultados mostrou, portanto, que a MB-PDT é eficiente em induzir a morte de linhagens tumorais de pâncreas humanos e que a susceptibilidade à terapia varia de acordo com os subtipos tumorais considerados, o que abriu espaço para a necessidade de uma investigação mais detalhada acerca de quais fatores estariam contribuindo para determinar as diferenças nas respostas à MB-PDT observadas inicialmente entre as linhagens.

5.2. Estudo da contribuição da intensidade de incorporação do azul de metileno para a eficiência da MB-PDT sobre linhagens de PDAC humanas

A fim de determinar se os níveis de incorporação do fotossensibilizador pelas linhagens estariam relacionados direta ou determinantemente com as diferenças nas respostas das células frente à terapia que foram observadas inicialmente, foram dosados, por espectrofotometria, os níveis intracelulares do azul de metileno das quatro linhagens quando submetidas à diferentes tempos de incubação com o fotossensibilizador. Para tal, 24h após o plaqueamento, as células foram submetidas à incubação com uma solução de 20 μ M de MB por diferentes tempos: 1h, 2h, 4h, 6h, 8h e 24h. Ao final de cada um dos tempos de incubação, as células foram lavadas, posteriormente lisadas e o conteúdo intracelular foi quantificado espectrofotometricamente.

Os resultados apresentados na **figura 12** indicam que, quando submetidas à períodos maiores de incubação com o fotossensibilizador (24h), as células MIAPaCa-2 e Panc-1 (menos sensíveis à terapia) apresentam níveis intracelulares de azul de metileno significativamente maiores do que as linhagens BxPC-3 e AsPC-1 (mais susceptíveis à MB-PDT). Porém, no contexto estudado, o ponto de maior interesse é o de 2h, uma vez que corresponde ao tempo de tratamento com o fotossensibilizador utilizado para as investigações nesse trabalho. Neste ponto, todas as linhagens apresentam níveis estatisticamente iguais de internalização do fotossensibilizador, excetuando-se a célula MIAPaCa-2 que apresenta uma concentração de MB significativamente maior. Entretanto, esta linhagem que apresenta a maior incorporação neste tempo de tratamento não é a mais sensível à MB-PDT.

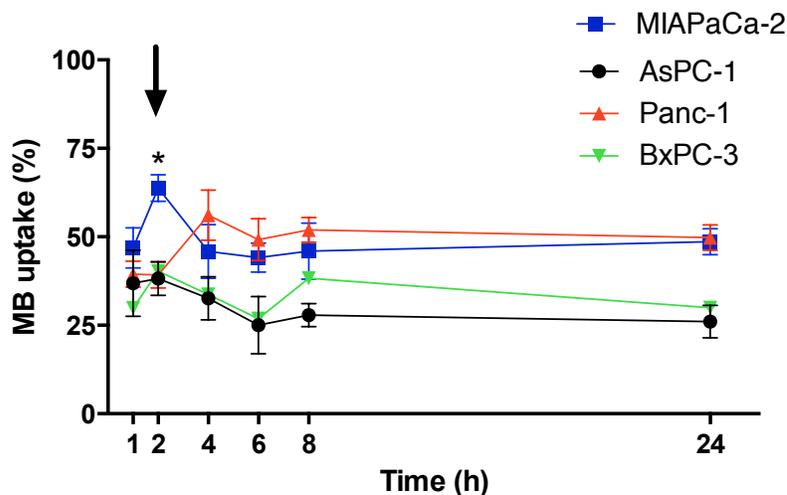


Figura 12: A concentração intracelular do MB não se relaciona à susceptibilidade das células à MB-PDT. Porcentagem de incorporação de MB pelas células MIAPaCa-2 (azul), AsPC-1 (preto), Panc-1 (vermelho) e BxPC-3 (verde) após diferentes tempos de incubação com o fotossensibilizador. As células foram incubadas com 20 μ M de MB por diferentes tempos e as porcentagens de incorporação foram medidas, por espectrofotometria, após 1, 2, 4, 6, 8 e 24 horas. Valores normalizados para o número de células remanescentes na placa após cada tempo de incubação. A seta preta indica o ponto que representa o tempo no qual se procederia a irradiação das células (2h). * $p < 0.05$ versus AsPC-1, Panc-1 e BxPC-3 no tempo de 2h (análise referente ao tempo de incubação utilizado em todos os demais experimentos conduzidos nesse trabalho). $n \geq 3$ experimentos independentes. Os resultados são representados como médias \pm EPM.

Pelo perfil de incorporação do azul de metileno pelas quatro linhagens e considerando os resultados de viabilidade acima descritos, podemos inferir que a concentração intracelular do fotossensibilizador não está atuando significativamente para determinar as diferenças nos perfis de susceptibilidades à MB-PDT observados. Dessa forma, a hipótese inicial de que a taxa de incorporação do MB seria um parâmetro decisivo para as diferentes susceptibilidades das células à terapia foi descartada.

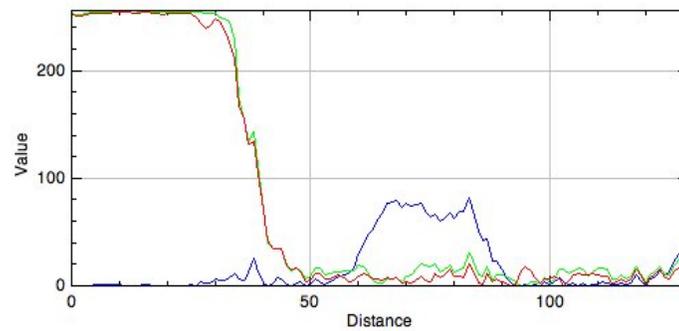
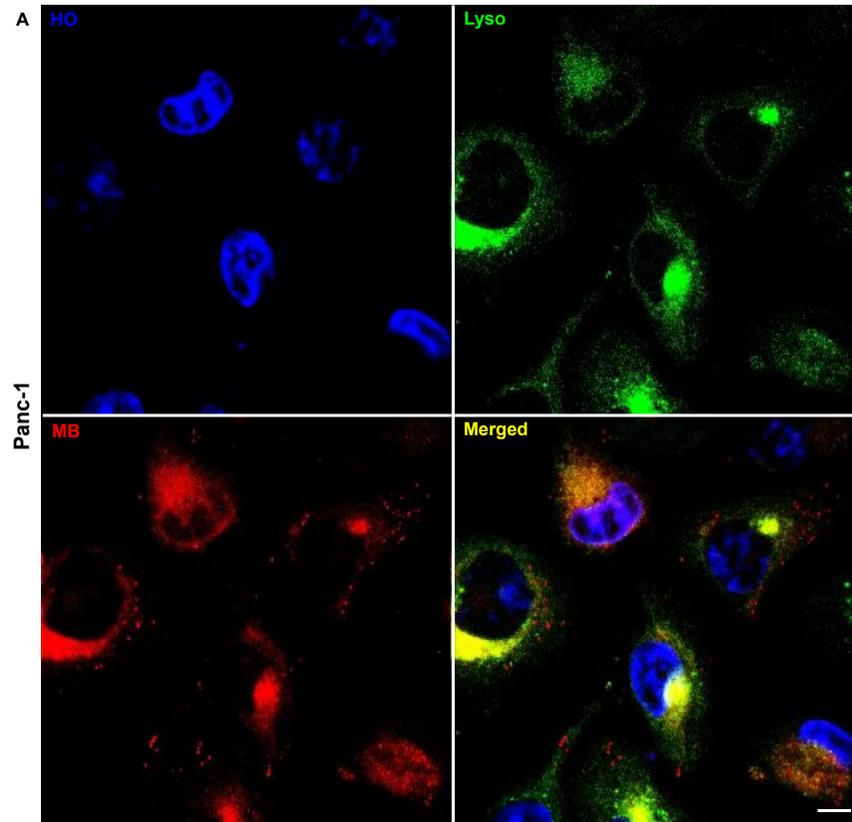
5.3. Determinação da localização sub-celular do azul de metileno nas linhagens de PDAC humanas

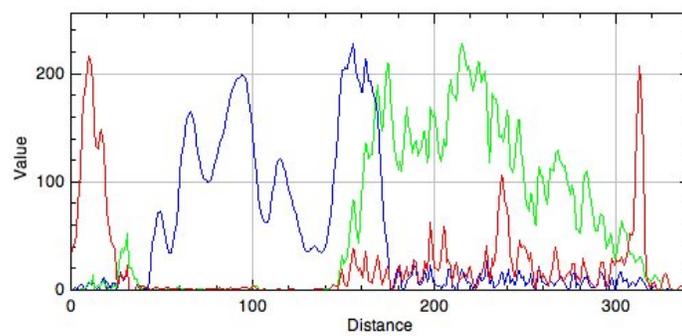
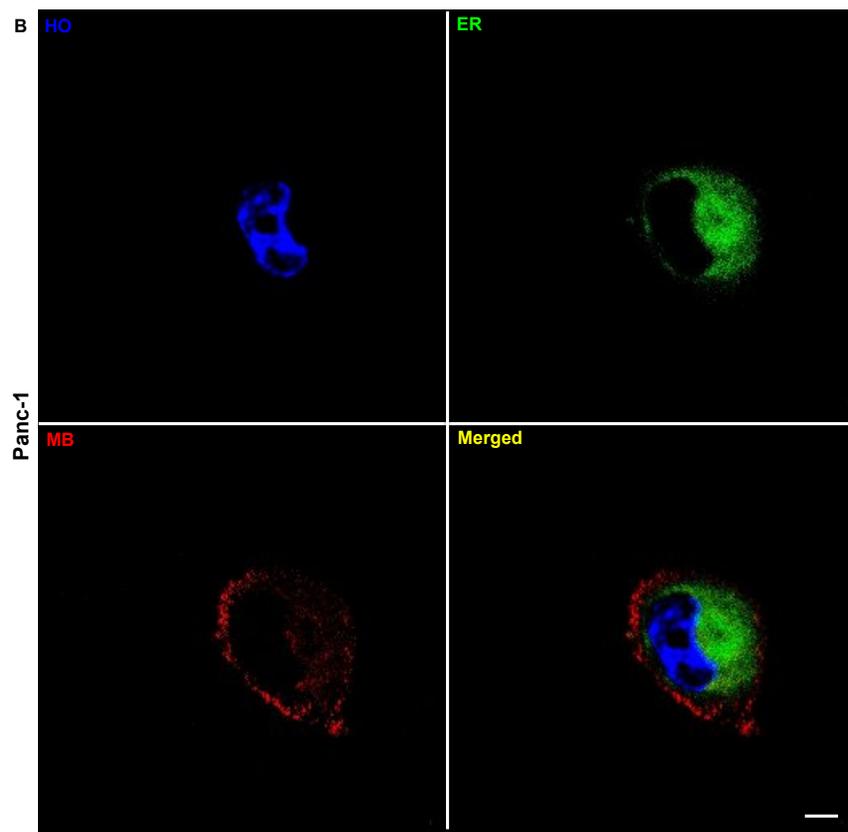
A localização intracelular do fotossensibilizador é um parâmetro extremamente importante e determinante nos processos celulares desencadeados pela terapia fotodinâmica, especialmente no contexto do tratamento de células de câncer. Assim, considerando-se a importância desse fator e sua influência na determinação da efetividade da PDT para indução de morte de células ou tecidos, levantou-se a hipótese de que um padrão diferenciado de distribuição do MB pelos compartimentos celulares entre as quatro linhagens estudadas poderia estar influenciando no perfil distinto de resposta à terapia observados nos ensaios de viabilidade celular.

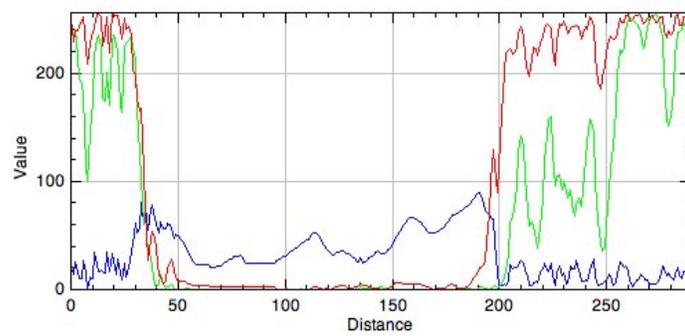
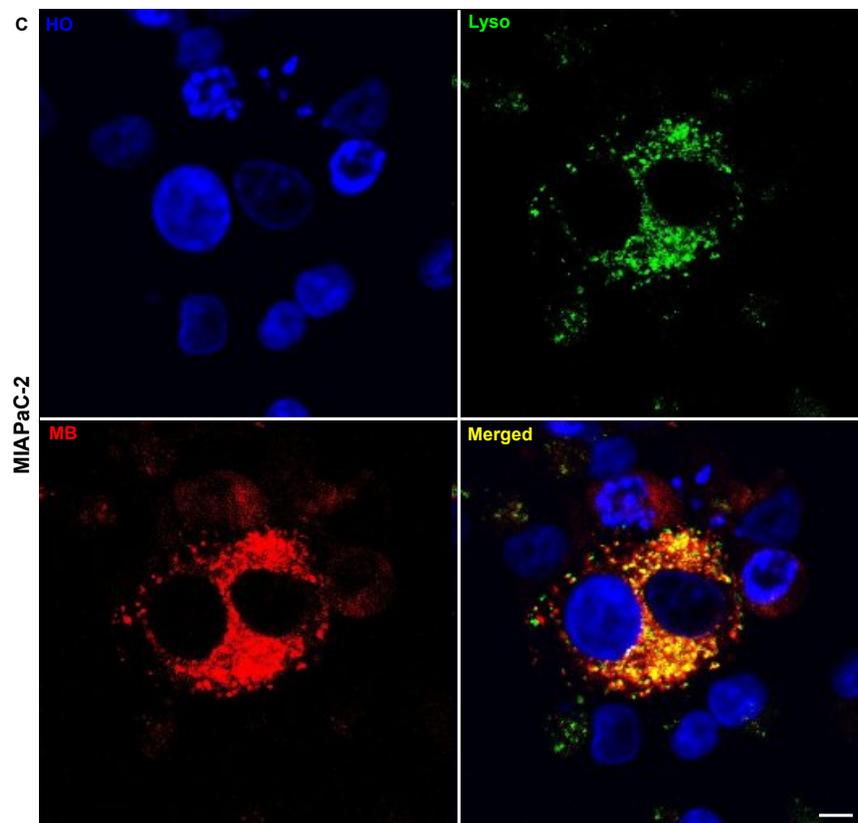
Para determinar se a localização intracelular do azul de metileno é diferente entre as células, realizou-se um ensaio no qual as quatro linhagens foram incubadas, por duas horas, com uma solução de 20 μ M de MB e, em seguida, foram incubadas com sondas fluorescentes específicas para marcação de núcleos, lisossomos e retículo endoplasmático (ER) para posterior análise da distribuição intracelular do fotossensibilizador, por microscopia confocal.

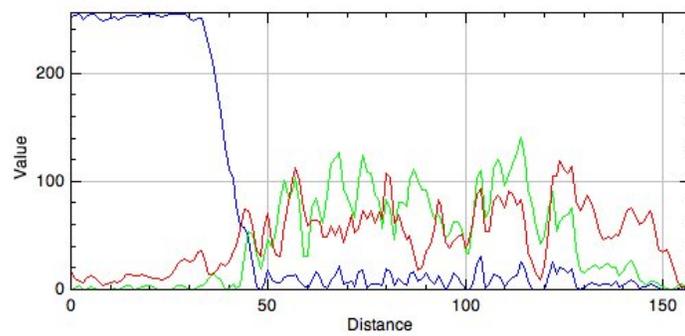
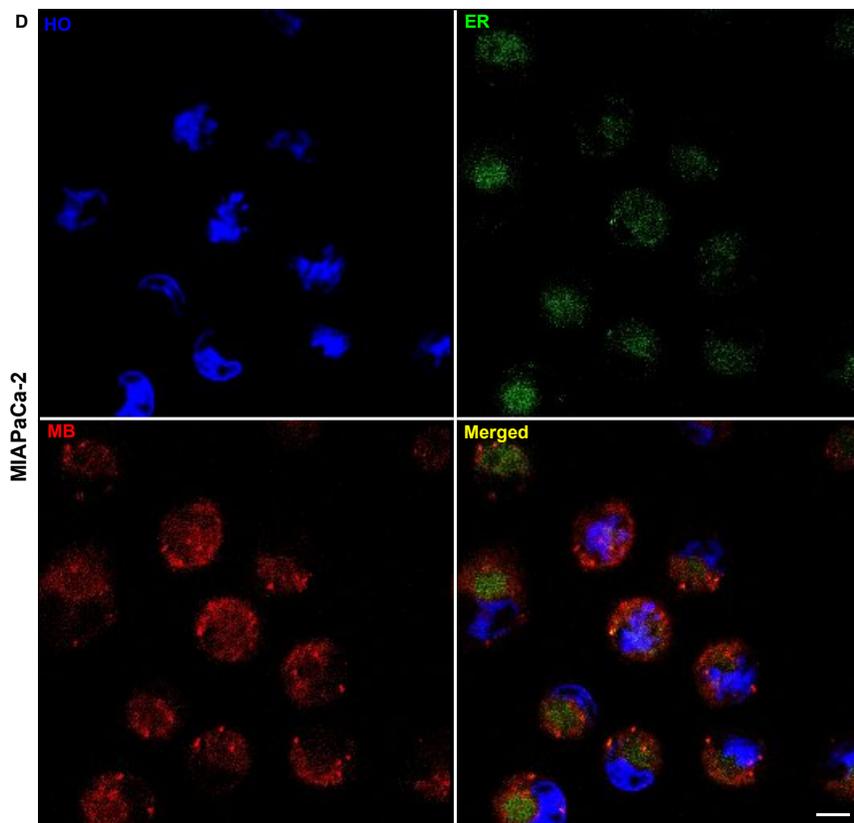
Na **figura 13** estão apresentadas as imagens obtidas para cada uma das sondas utilizadas, juntamente com a sobreposição dessas imagens e os respectivos gráficos com os perfis de emissão no vermelho (MB), verde (sondas para retículo ou lisossomos) e azul (HO, para marcação dos núcleos) para cada linhagem. Os resultados evidenciam que a fluorescência do azul de metileno co-localiza com a fluorescência da marcação dos lisossomos para todas as linhagens celulares analisadas, o que se confirma pelo padrão das curvas nos gráficos dos perfis de emissão de cada uma das sondas. Além disso, nas

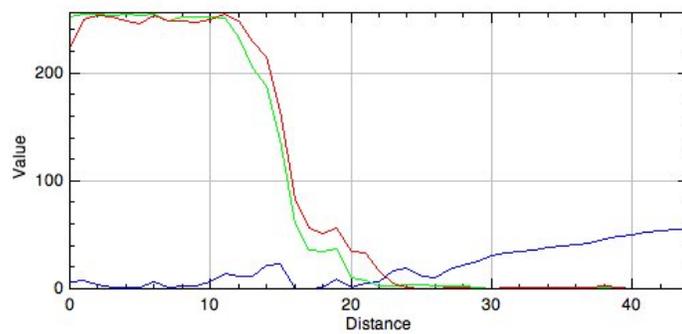
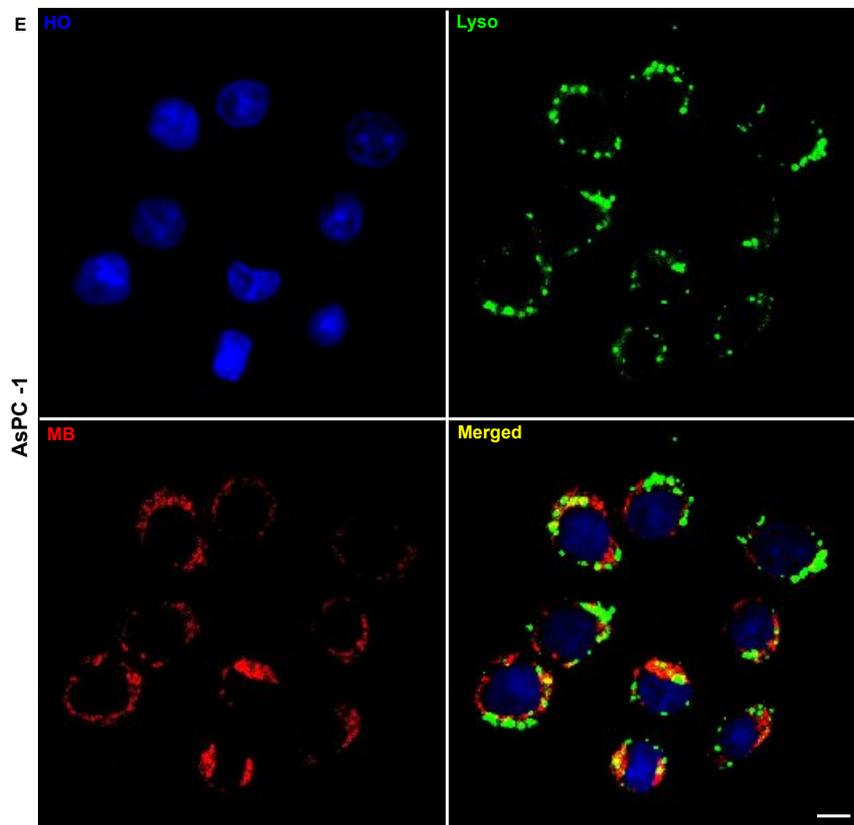
linhagens BxPC-3, AsPC-1 e MIAPaCa-2 foi observado baixo grau de co-localização do MB com o retículo endoplasmático, embora em uma proporção muito inferior à intensa co-localização detectada nos lisossomos. Por outro lado, não observou-se co-localização do MB com o núcleo de nenhuma das células.

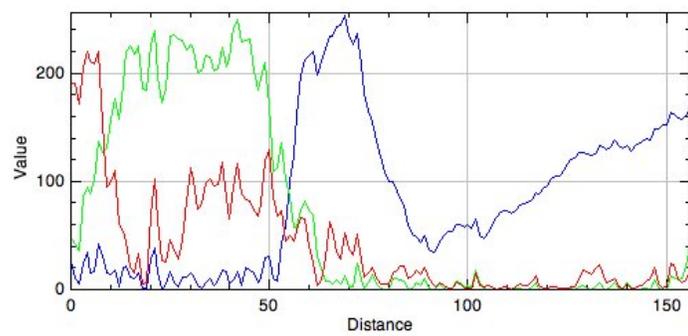
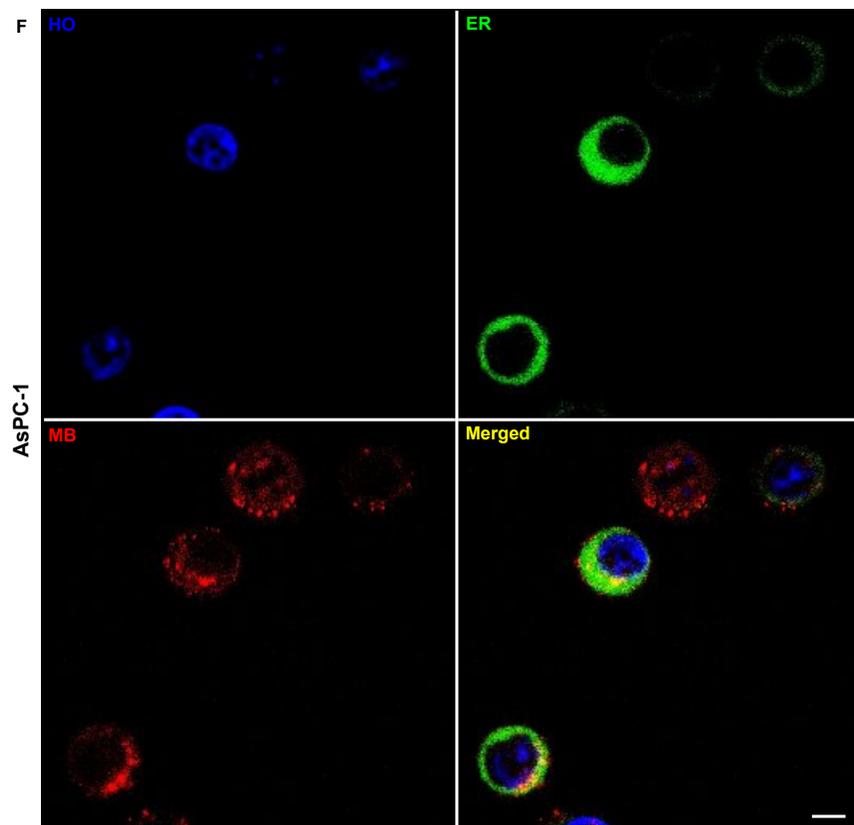


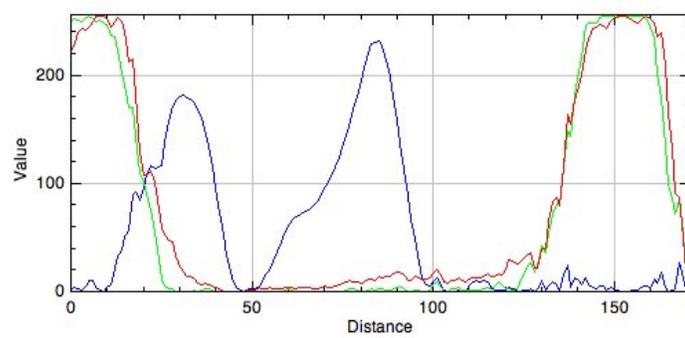
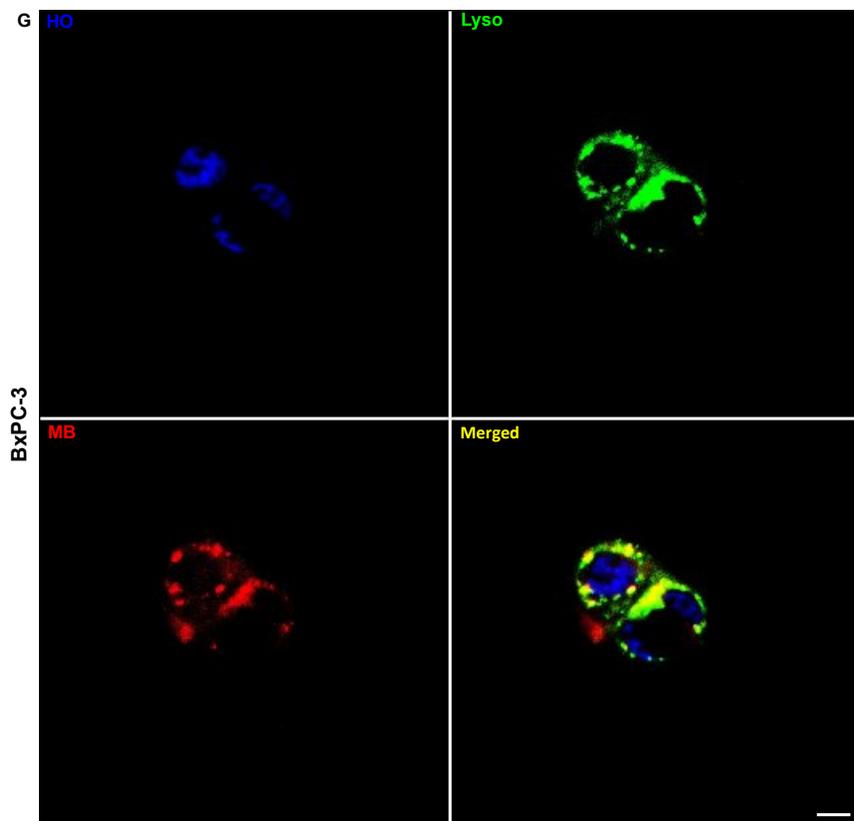












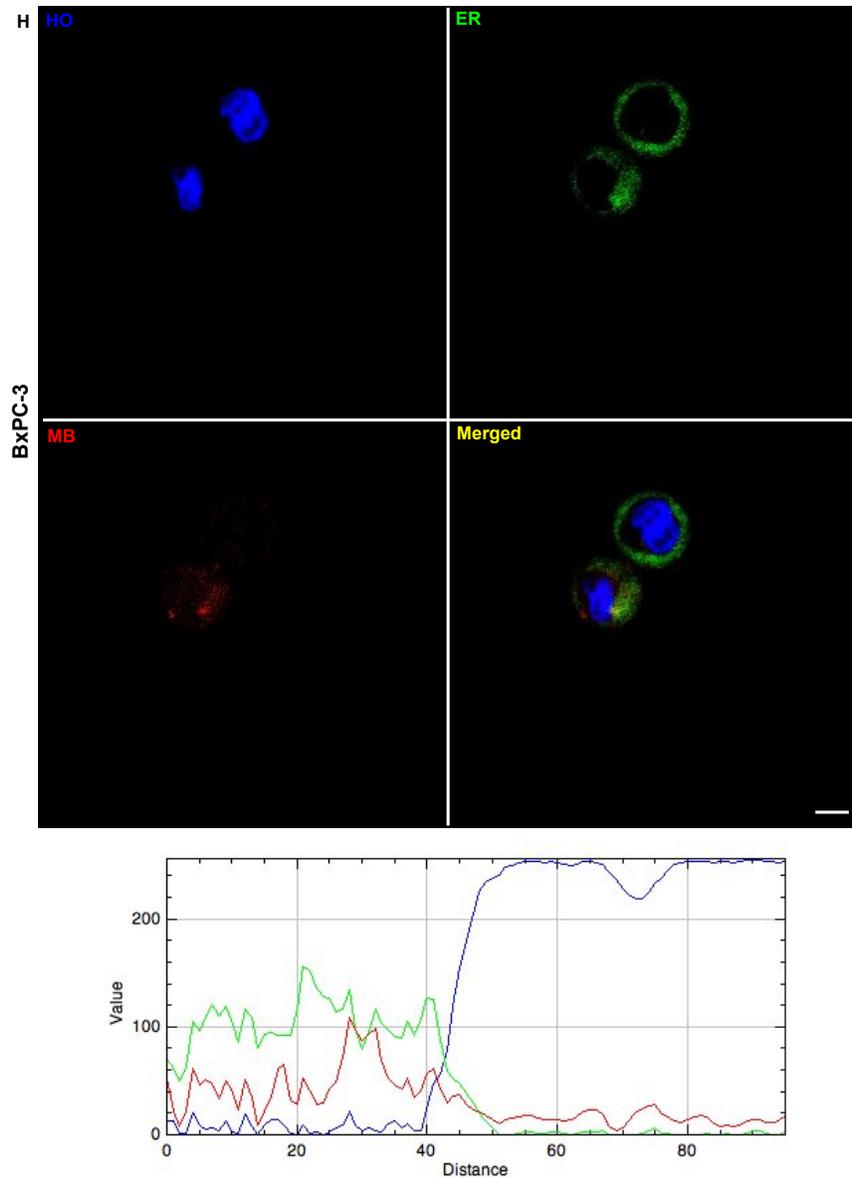


Figura 13: Localização intracelular do MB nos lisossomos nas células PANC-1, MIAPaCa-2, AsPC-1 e BxPC-3. A: Fotos da microscopia confocal com a emissão do MB (vermelho), dos marcadores de lisossomos, LysoTracker (verde), ou retículo endoplasmático, ER-tracker (verde) e do marcador de núcleo, Hoescht (azul), além da sobreposição das imagens (regiões amarelas) e perfis dos gráficos de emissão da fluorescência verde, vermelho e azul de uma um corte reto no meio da célula para as células Panc-1 (A e B), MIAPaCa-2 (C e D), AsPC-1 (E e F) e BxPC-3 (G e H); Escala = 20 μ m

A partir desses resultados, ficou comprovada a localização intracelular majoritariamente lisossomal do azul de metileno para as células MIAPaCa-2,

Panc-1, BxPC-3 e AsPC-1. Dessa forma, foi descartada a hipótese de que a localização sub-celular do fotossensibilizador estaria ocorrendo em diferentes organelas entre as linhagens, não sendo este, portanto, um fator decisivo para as diferenças nas susceptibilidade destas linhagens à MB-PDT.

5.4. Análise da expressão basal de proteínas chaves da via de necroptose em linhagens de PDAC humanas

Os mecanismos moleculares envolvidos na determinação dos eventos celulares desencadeados após um determinado tratamento dependem, entre outros fatores, das características moleculares e/ou do estado de expressão basal de determinadas proteínas pelas células as quais serão submetidas ao tratamento. Em estudos prévios conduzidos por nosso grupo de pesquisa acerca da ação da MB-PDT em tumores mamários humanos, mostrou-se que a apoptose não é o mecanismo de morte determinante da citotoxicidade comprovada da terapia sobre esses modelos (SANTOS et al., 2017). Além disso, resultados preliminares do mesmo estudo apontaram a necroptose como uma via envolvida nos efeitos citotóxicos da MB-PDT sobre tais células.

Com base no exposto e considerando-se que há uma controvérsia, na literatura recente, sobre a capacidade dos modelos de pâncreas aqui estudados em adentrarem pelo processo de morte necroptótica, devido à ausência ou baixa expressão de algum dos componentes do complexo molecular denominado necrossomo, RIPK1, RIPK3 e MLKL, que é fundamental para a completa execução desta via (HANNES; AHANGARIAN; FULDA, 2016), foram avaliados,

por *western blotting*, os níveis de expressão basais destas proteínas, utilizando-se extratos proteicos totais obtidos de lisados de células cultivadas em condições ótimas de crescimento para as quatro linhagens.

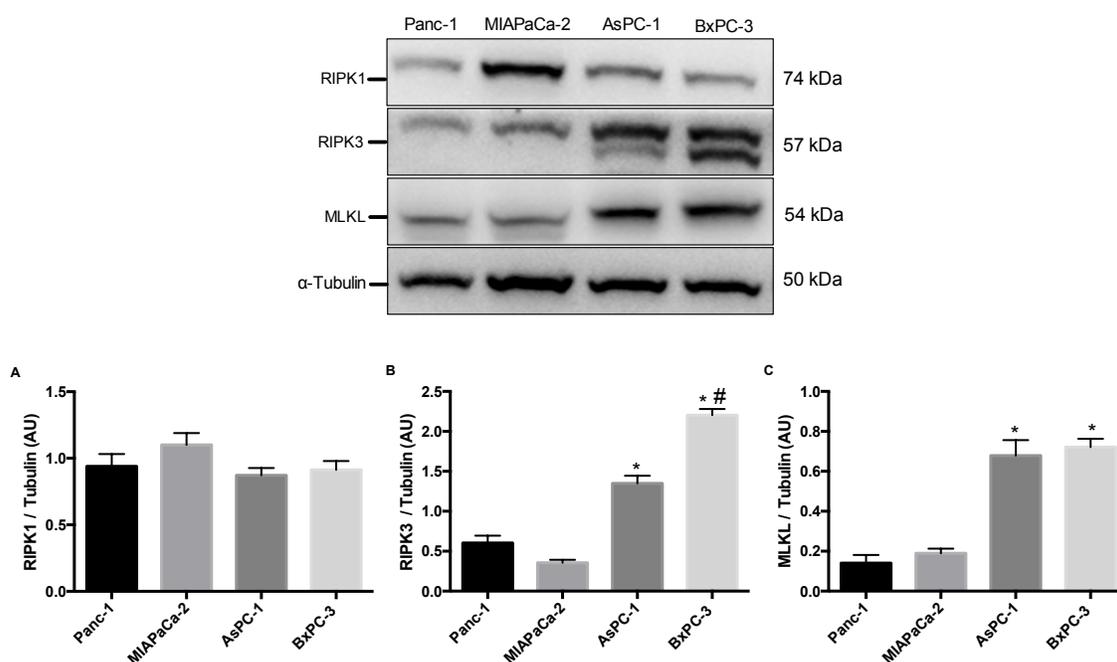


Figura 14: Diferenças nos níveis proteicos basais de RIPK3 e MLKL entre as linhagens de PDAC humanas. Análise, por WB, dos níveis basais de expressão dos componentes da via de necroptose, RIPK1 (A), RIPK3 (B) e MLKL (C), entre as linhagens MIAPaCa-2, Panc-1, AsPC-1 e BxPC-3. Acima dos histogramas estão apresentados os *immunoblots* representativos para cada proteína. Os extratos proteicos foram obtidos 48h após o plaqueamento de 5×10^4 células de cada uma das linhagens, que foram mantidas em condições ótimas de crescimento. * $p < 0.05$ versus Panc-1; # $p < 0.05$ versus AsPC-1. $n \geq 3$ experimentos independentes. Os resultados são representados como médias \pm EPM.

Na **figura 14** estão apresentados os *immunoblots* representativos para os ensaios realizados para todas as linhagens, juntamente com os respectivos histogramas obtidos pelas razões entre os valores das densitometrias das bandas de RIPK1, RIPK3 ou MLKL por α -tubulina (RIPK1/ α -tubulina, RIPK3/ α -tubulina e MLKL/ α -tubulina, respectivamente). Os resultados obtidos mostram que os níveis de RIPK1 não são estatisticamente diferentes entre as quatro

linhagens avaliadas. Por outro lado, a análise para a expressão de RIPK3 mostrou que as células AsPC-1 e BxPC-3 apresentam valores de expressão dessa quinase duas e três vezes maiores, respectivamente, que as linhagens MIAPaCa-2 e Panc-1. Esses resultados mostram, a princípio, que a necroptose seria uma via envolvida na citotoxicidade promovida pela MB-PDT, uma vez que as duas linhagens mais resistentes ao tratamento são exatamente aquelas que apresentam, de partida, níveis significativamente menores dessa quinase que é de fundamental importância para a execução da via de morte necroptótica. Neste ponto, vale ressaltar que a maquinaria molecular disponibilizada pelas linhagens no momento em que os efeitos fototóxicos são mais significativos (correspondendo ao tempo de irradiação) é decisiva na determinação da intensidade dos danos celulares a serem gerados intracelularmente e, conseqüentemente, nos eventos de morte desencadeados pelo processo.

Um segundo resultado interessante dessa parte do estudo e que também reforça a hipótese de que a necroptose é um mecanismo de morte importante para os efeitos citotóxicos da MB-PDT sobre linhagens de PDAC humanas é a acentuada diferença na expressão basal de MLKL (último componente desta via de morte e imprescindível para o processo de permeabilização da membrana plasmática que é desencadeada pela sinalização necroptótica) que foi observada. Neste caso, os resultados indicaram que os níveis basais de MLKL são 4 vezes maiores em AsPC-1 em relação à MIAPaCa-2 e Panc-1 e, 5 vezes maiores em BxPC-3 em relação a essas duas linhagens menos susceptíveis à terapia.

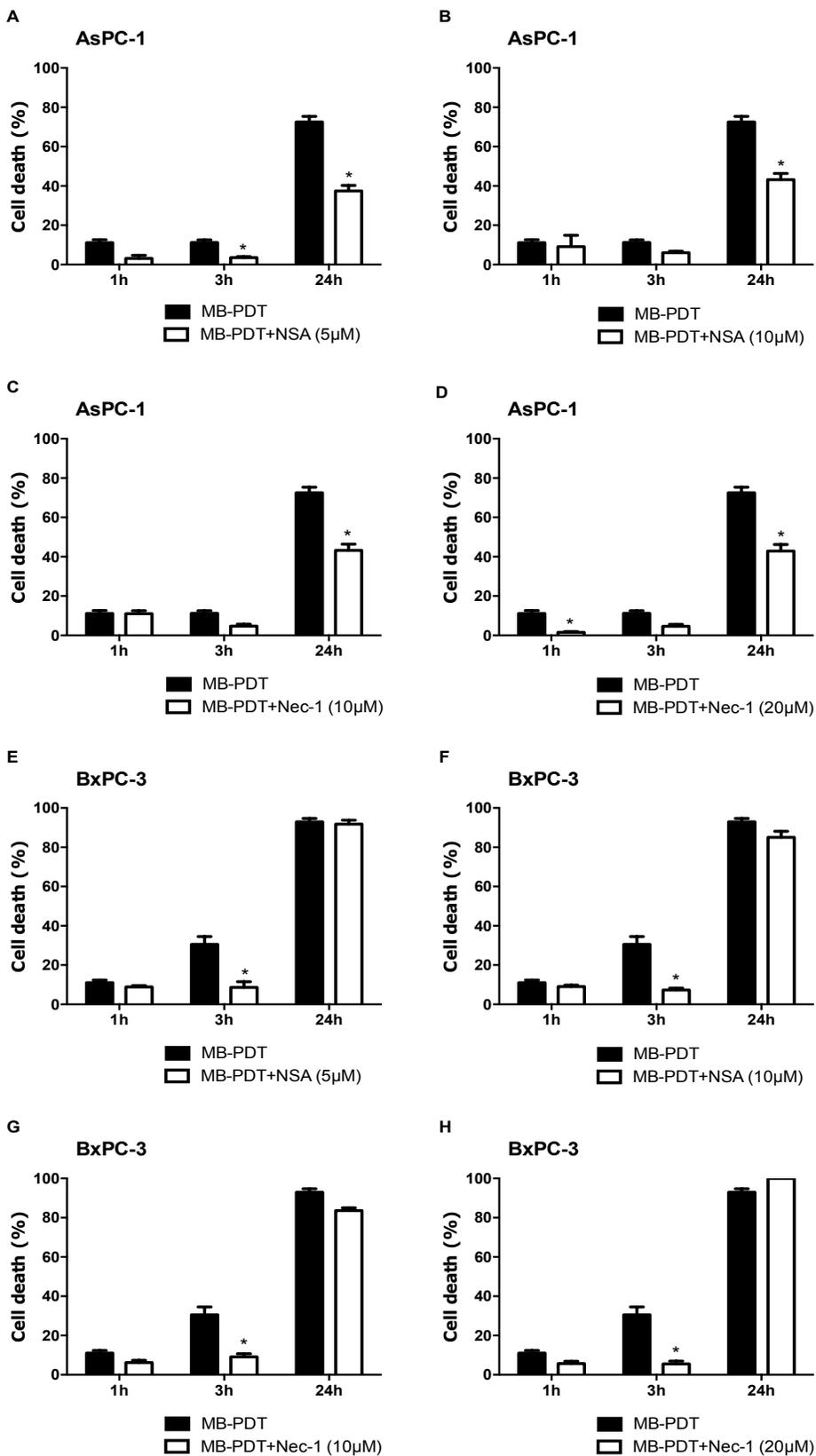
Este conjunto de resultados mostra, portanto, que para as duas linhagens de PDAC menos sensíveis aos efeitos citotóxicos da terapia fotodinâmica com o azul de metileno, MIAPaCa-2 e Panc-1, os níveis proteicos de dois dos três componentes do necrossomo, RIPK3 e MLKL, são significativamente menores que os detectados nas linhagens mais responsivas à terapia, AsPC-1 e BxPC-3. Este resultado permite estabelecer uma relação entre capacidade de executar a via de necroptose e os efeitos de morte observados após o tratamentos dessas células com a MB-PDT. De posse dessas informações, observou-se a necessidade de uma investigação mais aprofundada, onde fosse possível avaliar, de forma mais direta, o peso dessa via de morte celular para os efeitos da terapia sobre esses modelos. Dessa forma, o passo seguinte foi avaliar a contribuição da via de necroptose para a citotoxicidade da MB-PDT sobre as linhagens de PDAC.

5.5. Contribuição da via de necroptose para a citotoxicidade da MB-PDT sobre linhagens de PDAC humanas

Após a constatação de que os níveis proteicos basais de MLKL e RIK3 estão diminuídos nas linhagens menos sensíveis a MB-PDT, foi conduzida uma série de experimentos a fim de identificar, de forma mais direta, a participação da necroptose nos efeitos citotóxicos observados após o tratamento com a fototerapia. Para isso, utilizamos duas abordagens: identificar se o tratamento com a MB-PDT induz o aumento da fosforilação de MLKL, que é um importante parâmetro indicativo de ativação da sinalização de morte necroptótica

(resultados que serão apresentados mais adiante neste item), e avaliar os efeitos de um pré-tratamento das células com inibidores farmacológicos desta via, necrostatina-1 (Nec-1, inibidor da RIPK1) ou necrossulfonamida (NSA, inibidor da fosforilação de MLKL), na resposta das células frente ao tratamento com MB-PDT. Assim, foi conduzida uma cinética, na qual avaliaram-se os efeitos da MB-PDT 1, 3 e 24h após um pré-tratamento, ou não, das células com duas concentrações de cada um dos inibidores (5 ou 10 μ M de NSA; 10 ou 20 μ M de Nec-1).

Como indicado na **figura 15 (A, B, C e D)**, o pré-tratamento das células AsPC-1 com os inibidores da necroptose, em todas as concentrações utilizadas, levou à uma diminuição significativa da porcentagem de morte obtida 24h após a terapia. Interessantemente, essa porcentagem de morte observada às 24h pós-MB-PDT precedida pela inibição da necroptose está numericamente próxima aos valores máximos de morte que foram anteriormente mostradas nesse trabalho para as células que apresentam baixa expressão de RIPK3 e MLKL, Panc-1 e MIAPaCa-2, quando submetidas ao protocolo padrão da terapia (sem inibição). Este fenômeno poderia ser um indicativo de que outras vias de morte estão sendo ativadas após a PDT e que, uma vez estando a necroptose inibida, nas linhagens competentes para executá-la, seriam as responsáveis pela morte remanescente após o tratamento das células.



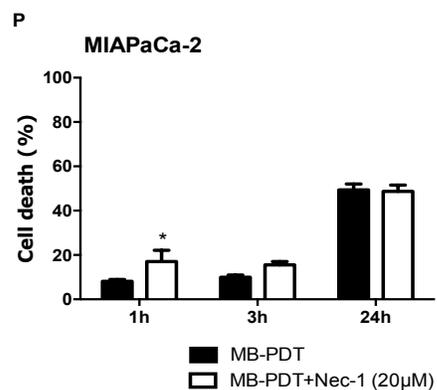
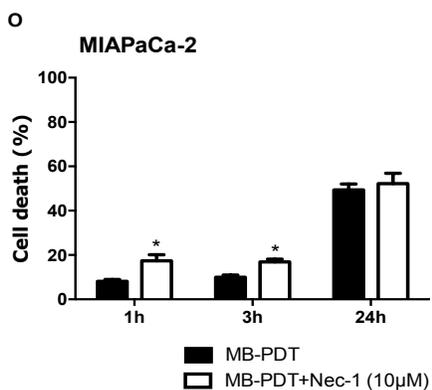
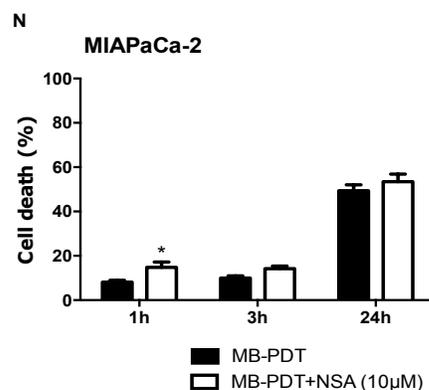
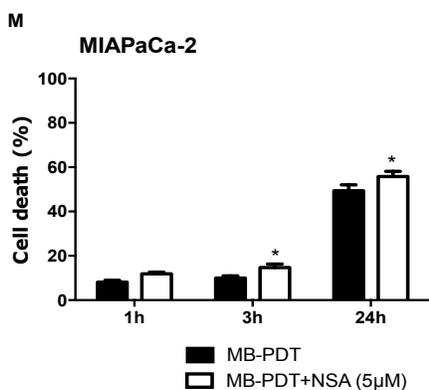
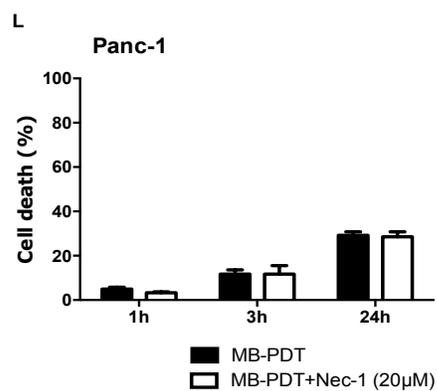
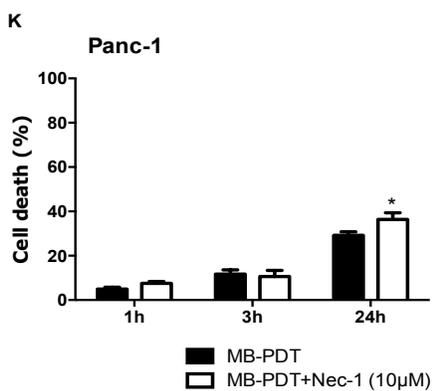
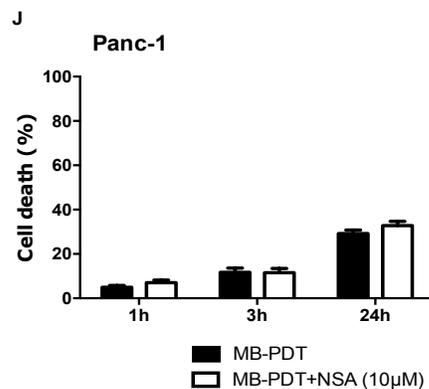
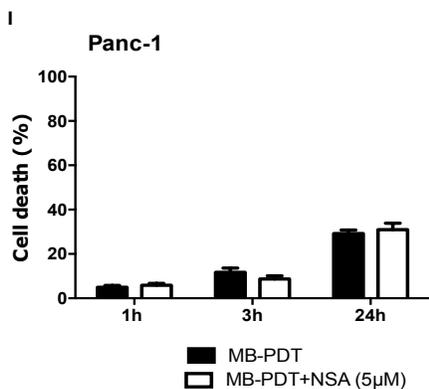


Figura 15: A inibição da via de Necroptose reduz a efetividade da MB-PDT sobre as linhagens de PDAC humanas que não apresentam limitações na expressão de componentes da via. Gráficos das porcentagens de morte obtidas 1, 3 e 24h após o tratamento das células AsPC-1 (A - D), BxPC-3 (E - H), Panc-1 (I - L) e MIAPaCa-2 (M - P) com a PDT com 20 μ M de MB e co-tratamento, ou não, com inibidores farmacológicos da via de necroptose, NSA (5 ou 10 μ M) ou Nec-1 (10 ou 20 μ M) em relação aos controles de máxima viabilidade ("Ctrl") ou de citotoxicidade do azul de metileno no escuro ("MB"). Colunas marcadas com * $p < 0,05$ versus MB-PDT no respectivo tempo de tratamento. $n = 3$ experimentos independentes. Os resultados são representados como médias \pm EPM.

Para a linhagem BxPC-3 (E, F G e H, figura 15), a comparação entre as cinéticas de morte obtida pós-MB-PDT ou pós-MB-PDT precedida pelo tratamento com os inibidores indica que a inibição da via de necroptose, nos dois pontos distintos (Nec-1 inibindo RIPK1, no início da via, e NSA atuando na inibição de MLKL, na etapa final), diminuiu os efeitos de indução de morte desencadeados pela terapia, como fica evidenciado pela diferença na porcentagem de morte observada 3h após o tratamento, onde as células pré-tratadas com os inibidores ficam mais resistentes aos efeitos da fototerapia. Entretanto, num período de tempo maior, os efeitos citotóxicos da terapia são iguais independentemente da presença dos inibidores. Estes resultados mostram que a inibição da necroptose foi capaz de retardar os efeitos citotóxicos globais da MB-PDT sobre essa linhagem, o que também é uma confirmação da importante contribuição desta via de morte para a eficiência da terapia.

Por meio da abordagem de inibição da via de morte necroptótica, não se esperava, hipoteticamente, que houvesse uma mudança significativa no comportamento de resposta à terapia pelas células MIAPaCa-2 e Panc-1, visto que essas linhagens apresentam uma limitação molecular para a execução dessa via. De fato, não foram observadas mudanças estatisticamente

significativas na sensibilidade das células entre os tratamentos com a MB-PDT com e sem a inibição da via, como mostrado na **figura 15 (I a P)**.

A fim de fornecer maior robustez à essas constatações iniciais de que a necroptose é importante para a efetividade da MB-PDT, foi avaliado, por *western blotting*, se a terapia estaria induzindo o aumento da fosforilação de MLKL, um parâmetro importante na determinação da ativação dessa via. Para esse conjunto de experimentos, utilizaram-se duas das quatro linhagens aqui estudadas: MIPaCa-2 e AsPC-1. Vale ressaltar que esse conjunto de células contempla os dois perfis de resposta à terapia que vêm sendo observados ao longo desse estudo: MIAPaCa-2 apresentando baixa susceptibilidade à MB-PDT e sem mudança no perfil de resposta frente à inibição da necroptose e, AsPC-1, com alta susceptibilidade ao tratamento, mas passiva de uma mudança para um perfil mais resistente à terapia após o uso dos inibidores Nec-1 e NSA.

Como mostrado na **figura 16 (A)**, para a célula MIAPaCa-2 os níveis de fosforilação de MLKL não se alteram após a MB-PDT em nenhum dos três pontos da cinética considerada, 1, 3 ou 24h pós-irradiação, o que está de acordo com os resultados anteriormente apresentados. Além disso, também corroborando os resultados obtidos nos itens anteriores, especialmente quando se considera a cinética de morte observada nesses tempos, a fosforilação de MLKL está aumentada 24h após o tratamento com a MB-PDT sobre a linhagem AsPC-1 (**figura 16B**).

O conjunto de dados apresentados nesse item, em concordância com o que foi observado nas etapas anteriores deste trabalho, confirma a participação

da necroptose nos efeitos citotóxicos desencadeados após o tratamento com a MB-PDT sobre linhagens de PDAC humanas, sendo esta uma via decisiva para a eficiência da terapia, sobretudo sobre as células que não apresentam deficiência na expressão de proteínas componentes dessa via de sinalização de morte celular.

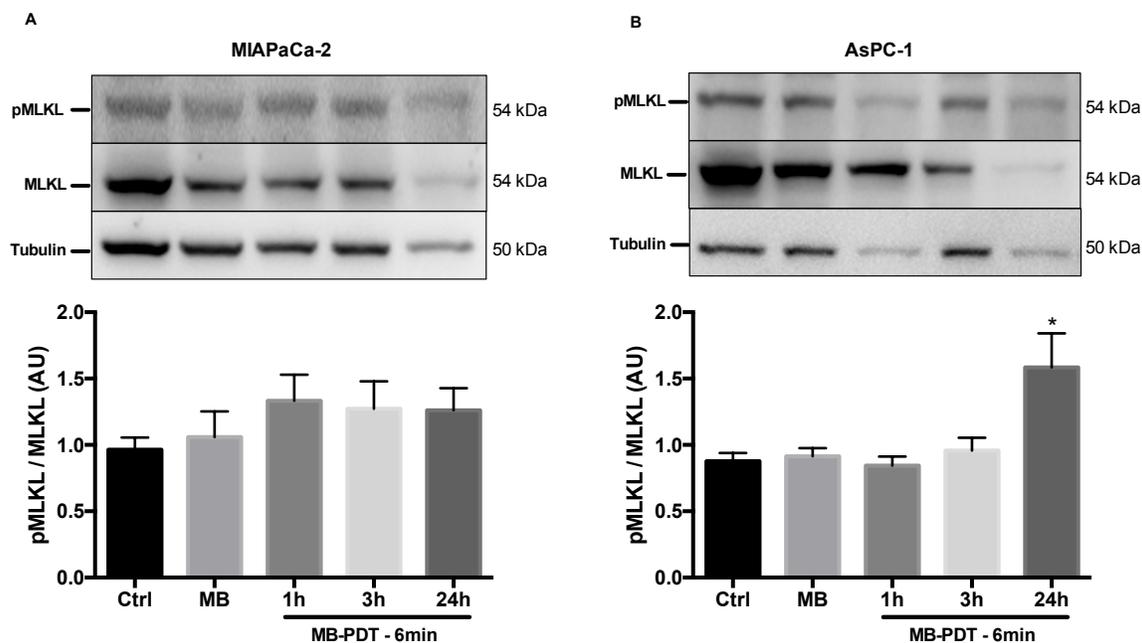


Figura 16: MB-PDT induz o aumento da fosforilação de MLKL nas linhagens que não apresentam deficiência para execução da via de necroptose. Análise, por WB, dos níveis de fosforilação de MLKL após a MB-PDT. WB representativos para pMLKL, MLKL e tubulina e os histogramas obtidos pela razão entre os valores densitometrados de pMLKL e MLKL após a MB-PDT para as células MIAPaCa-2 (A) e AsPC-1 (B). Os extratos proteicos foram obtidos 1, 3 ou 24h após a PDT. * $p < 0.05$ versus Ctrl. $n \geq 3$ experimentos independentes. Os resultados são representados como médias \pm EPM. “Ctrl” (meio e condições normais de crescimento); “MB” (20 μ M de azul de metileno e ausência de irradiação); “MB-PDT” (20 μ M de MB e irradiação com 4,5 J/cm² de energia, tempo de irradiação: 6 min).

5.6. Influência do protocolo de irradiação na eficiência da MB-PDT sobre células de PDAC humanas

A eficiência da terapia fotodinâmica depende de fatores que variam desde o tipo celular tratado e os parâmetros relacionados com o fotossensibilizador, até o protocolo de irradiação adotado (SEGUCHI et al., 2002; BORLE et al., 2003). Considerando-se essa dinâmica de fatores que podem influenciar na viabilidade das células submetidas ao tratamento com a PDT, na etapa seguinte deste trabalho foi realizada uma cinética para determinar a viabilidade das células de tumores de pâncreas humanos 1, 3 e 24h após a MB-PDT, utilizando-se a concentração de 20 μ M do azul de metileno e alterando-se o tempo de irradiação de 6 para 16min. É importante ressaltar que a dose de energia de 4,5J/cm², no entanto, não foi alterada, ou seja, as células foram irradiadas com a mesma quantidade de energia, apenas distribuída por um período de tempo mais prolongado. Os resultados da cinética de morte obtida para as quatro linhagens estão apresentados na **figura 17**.

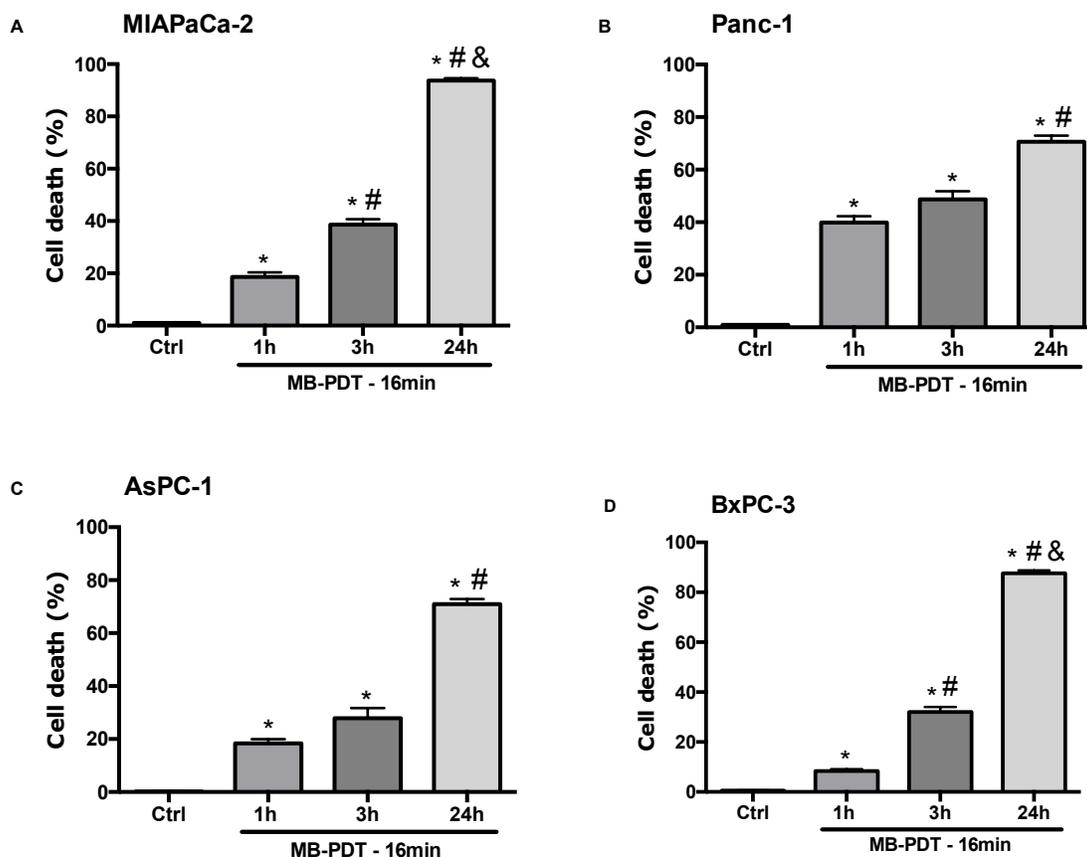


Figura 17: Cinética de viabilidade das células de PDAC humanas submetidas ao tratamento com a MB-PDT com 16 minutos de irradiação. Gráficos da cinética de viabilidade obtidos 1, 3 e 24h pós-tratamento com a MB-PDT (20 μ M) utilizando um protocolo de 16 minutos (16') de irradiação (totalizando 4,5 J/cm² de energia) sobre as linhagens MIAPaCa-2 (A), Panc-1 (B), AsPC-1 (C) e BxPC-3 (D); * $p < 0,05$ versus "ctrl"; # $p < 0,05$ versus "1h"; & $p < 0,05$ versus "3h". $n \geq 3$ experimentos independentes. Os resultados são representados como médias \pm EPM.

A cinética representada nos histogramas da **figura 17 (A, B, C e D)** mostra que há um aumento na porcentagem de morte das quatro linhagens após a MB-PDT, que é gradualmente aumentada com o passar do tempo. É importante destacar que a principal e promissora diferença observada com a mudança no protocolo de irradiação está bem evidenciada para aquelas células que apresentaram menor expressão de RIPK3 e MLKL e são menos sensíveis à terapia nos termos do protocolo inicial aqui utilizado, MIAPaCa-2 e Panc-1, que

tornaram-se mais vulneráveis aos efeitos citotóxicos da terapia com o aumento do tempo de irradiação.

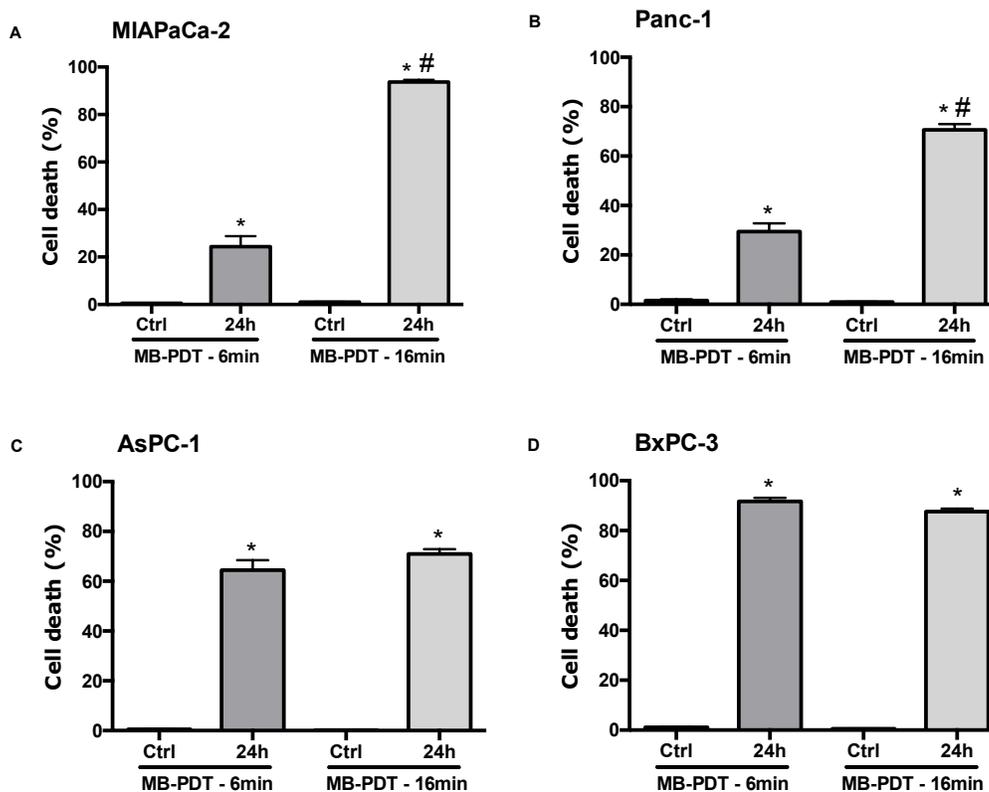


Figura 18: O aumento do tempo de irradiação melhora a eficiência da MB-PDT em induzir a morte das linhagens de PDAC humanas que apresentam limitações para execução da via de necroptose. Gráficos comparativos entre as porcentagens de morte obtidas 24h pós-tratamento com a MB-PDT (20 μ M), seguindo dois protocolos distintos: 4,5 J/cm² de energia distribuídos em 6min ou 16min de irradiação com os respectivos controles, sobre as linhagens MIAPaCa-2 (A), Panc-1 (B), AsPC-1 (C) e BxPC-3 (D). n \geq 3 experimentos independentes. A demarcação em vermelho indica a diferença na porcentagem de morte para cada par de células comparado. Os resultados são representados como médias \pm EPM. *: p<0.05 versus controle; # p<0.05 versus PDT 6min.

O aumento da eficiência da MB-PDT em induzir a morte das células mais resistentes fica ainda mais evidente quando se comparam as porcentagens máximas de morte obtidas às 24h pós-terapia com os dois protocolos de irradiação. Os índices de morte para as linhagens MIAPaCa-2 (Figura 18A) e

Panc-1 (**Figura 18B**) aumentaram em 384% e 240%, respectivamente, com o protocolo de 16min de irradiação em relação ao tratamento com 6min. Para as células AsPC-1 e BxPC-3, linhagens mais sensíveis ao tratamento já com 6min de irradiação, entretanto, não foram observadas diferenças significativas nas susceptibilidade à terapia com o aumento do tempo de exposição das células à luz (**Figura 18C e D**, respectivamente).

Após a constatação de que o aumento do tempo de irradiação não altera a morte das linhagens mais sensíveis, AsPC-1 e BxPC-3, mas induz um aumento na sensibilidade, elevando significativamente a morte de MIAPaCa-2 e Panc-1, à patamares semelhantes aos das duas linhagens mais sensíveis à MB-PDT com 6min de irradiação, e considerando-se que com o protocolo de irradiação de 6min houve um aumento da fosforilação de MLKL, apenas em AsPC-1, mas não em MIAPaCa-2, foram executados novos experimentos de WB. Dessa forma, estaríamos avaliando se a morte desencadeada pelo aumento do tempo de irradiação sobre as células MIAPaCa-2 estaria sendo acompanhada pelo aumento da forma fosforilada de MLKL e, portanto, devida à ativação da necroptose.

Resultados preliminares indicam que os níveis de fosforilação de MLKL, após a PDT com 16min de irradiação, seguem um padrão semelhante ao que foi visto com o protocolo de 6min para as linhagens MIAPaCa-2 e AsPC-1. Ou seja, enquanto há um aumento da forma fosforilada da proteína após a MB-PDT nas células AsPC-1 (**Figura 19B**), para a linhagem MIAPaCa-2 não são detectados aumento nos níveis dessa proteína (**Figura 19A**). Portanto, embora tenham sido

observados altos índices de morte dessas células, acima de 90%, após o tratamento na condição de maior tempo de irradiação, não houve aumento de fosforilação de MLKL, o que indica que, provavelmente, a necroptose não é a via responsável por esta alta citotoxicidade nesta linhagem, e que outras vias de sinalização de morte celular estão sendo ativadas pela MB-PDT nesta nova condição.

É importante ressaltar que após 24h de tratamento, a porcentagem de células mortas foi significativamente alto e, portanto, o número de células remanescente nos poços de tratamento estava muito abaixo das quantidades dos controles ou tempos menores (1 e 3h pós tratamento), o que se refletiu na diferença da quantidade de proteínas aplicada. Porém, as comparações foram feitas em relação aos valores totais de MLKL em cada tratamento.

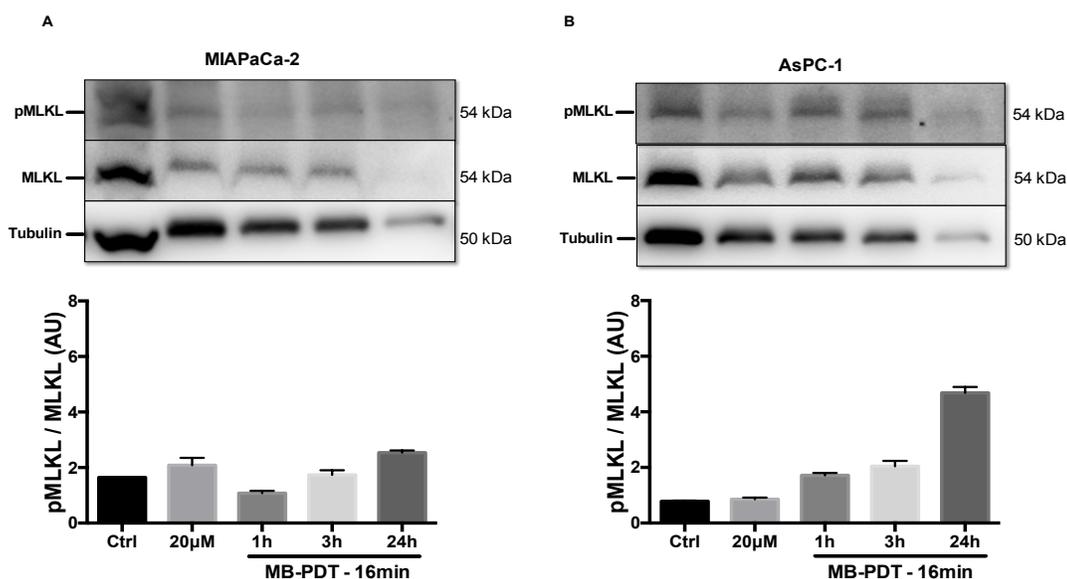


Figura 19: Perfil de fosforilação de MLKL em linhagens de PDAC humanas após a MB-PDT com 16 minutos de irradiação. Resultados preliminares da análise, por WB,

dos níveis de fosforilação de MLKL após a MB-PDT. Immunoblots representativos para pMLKL, MLKL e tubulina e os histogramas obtidos pela razão entre os valores densitometrados de pMLKL e MLKL para as células MIAPaCa-2 (**A**) e AsPC-1 (**B**) submetidas ao tratamento com a MB-PDT (16' de irradiação). Os extratos proteicos foram obtidos 1, 3 ou 24h após a PDT. n= 1 experimento. "Ctrl" (meio e condições normais de crescimento); "MB" (20µM de azul de metileno e ausência de irradiação); "MB-PDT" (20µM de MB e irradiação com 4,5 J/cm² de energia, distribuídos em 16 min).

Esse conjunto de dados permite concluir que pequenas variações no protocolo de irradiação podem induzir mudanças significativas no grau de citotoxicidade gerado nas células, podendo transpor a barreira de resistência que as linhagens menos sensíveis oferecem à terapia nos tempos mais curtos de irradiação. Este aumento no potencial de indução de morte da MB-PDT resultante do aumento do tempo de exposição das células à luz durante o tratamento pode estar relacionado à ativação de vias de morte celular alternativas àquelas para as quais as linhagens mais resistentes apresentem deficiência na expressão de proteínas envolvidas na via de sinalização.

Considerando-se esta hipótese, iniciou-se uma investigação acerca do potencial de geração de estresse oxidativo nas células pela MB-PDT a partir de cada um dos protocolos de irradiação, além de um estudo para a determinação dos níveis celulares de glutathiona reduzida (GSH) após o tratamento utilizando-se os dois protocolos, como parâmetro indicativo da habilidade das células em lidar com um eventual aumento nos níveis de espécies oxidantes. Estes dois fatores são determinantes para desencadear um outro tipo de morte celular necrótica regulada recentemente descrita e que difere mecanisticamente da necroptose, denominado ferroptose (DIXON et al., 2012).

5.7. Variação nos níveis de estresse oxidativo gerado após a MB-PDT com diferentes protocolos de irradiação sobre linhagens de PDAC humanas

Uma vez constatadas as diferenças no comportamento de morte que uma mesma célula pode apresentar em resposta aos diferentes protocolos de irradiação, avaliou-se se haveria alguma diferença entre os níveis de espécies reativas gerados após os dois tempos de irradiação que pudesse explicar, ao menos em parte, as diferenças nas susceptibilidades observadas. Para o conjunto de experimentos dessa etapa utilizou-se a linhagem MIAPaCa-2, uma vez que ela apresentou a maior discrepância nas porcentagens de morte 24h pós-terapia entre os dois protocolos. Na **figura 20**, estão apresentados os dados de fluorescência de DCF (**A**), que se relaciona ao nível de estresse oxidativo intracelular, e a viabilidade (**B**) após o tratamento da célula avaliada.

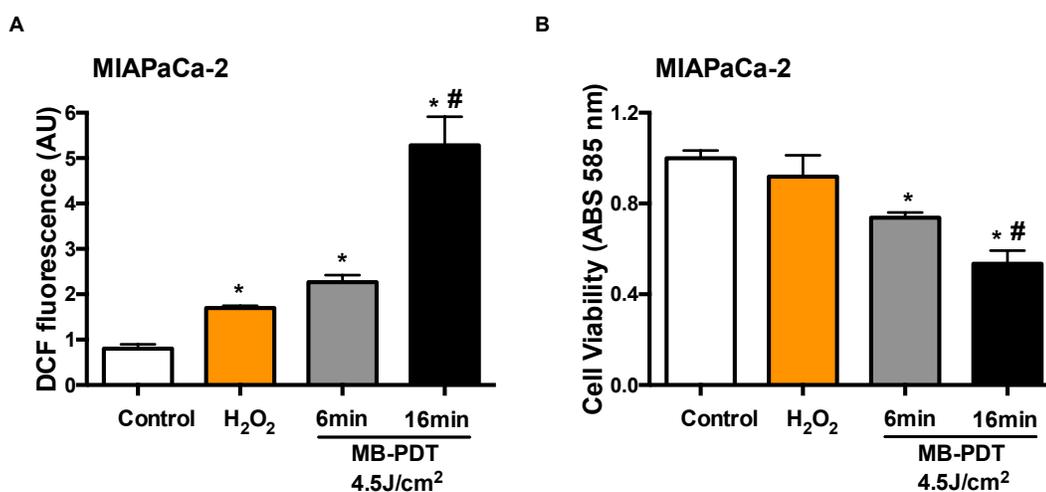


Figura 20: Estresse oxidativo e citotoxicidade após MB-PDT podem variar de acordo com o protocolo de irradiação. Gráficos de intensidade de fluorescência de DCF obtidos após 24 horas de MB-PDT sobre a célula MIAPaCa-2 com os protocolos de 6 minutos (6') ou 16 minutos (16') de irradiação (**A**). Viabilidade celular após o tratamento de MB-PDT com os protocolos de 6 minutos (6') ou 16 minutos (16') de irradiação (**B**). (n=2 experimentos independentes contendo 12 replicatas experimentais) * p<0.05 versus controle; # p<0.05 versus "MB-PDT 6". Os resultados são representados como médias±EPM. As viabilidades foram realizadas pelo método do cristal violeta imediatamente após as medidas de fluorescência do DCF. H₂O₂ foi usado como controle positivo para detecção de DCF.

Em concordância com os perfis de diminuição na viabilidade celular gerados pelos dois protocolos para a célula MIAPaCa-2 (menor viabilidade celular com 16 minutos de irradiação), verificou-se que os níveis de estresse oxidativo intracelular gerados com o protocolo de 16 minutos são significativamente maiores que o estresse oxidativo resultante da PDT com 6 minutos de irradiação sobre este modelo.

Com base nesses resultados, conclui-se que o aumento no tempo de irradiação, de 6 para 16 minutos, induz uma maior geração de espécies reativas que culmina numa menor viabilidade das células tratadas. Interessantemente, a MB-PDT com o protocolo de 16min de irradiação foi capaz de gerar um estresse oxidativo significativamente maior do que o tratamento das células com peróxido de hidrogênio (usado como controle positivo para indução de desbalanço oxidativo), o que evidencia o potencial da terapia nessas condições em interferir na homeostase redox celular e, conseqüentemente, aumenta sua eficiência em disparar vias de morte celular.

5.8. Avaliação da capacidade antioxidante das linhagens de PDAC após o tratamento com a MB-PDT com diferentes protocolos de irradiação

Após a comprovação de que os diferentes protocolos de irradiação induzem a geração de níveis diferentes de estresse oxidativo sobre a linhagem MIAPaCa-2, correlacionando-se com os índices de morte dessa célula quando submetida à terapia com as duas abordagens de irradiação, o passo seguinte,

para finalizar as investigações propostas nesse trabalho, foi avaliar os níveis de glutathiona reduzida (GSH) nas linhagens MIAPaCa-2 e Panc-1 após a MB-PDT com 6 ou 16 minutos de tratamento com a luz, visto que elas foram as duas linhagens que apresentaram susceptibilidades variáveis dependendo do protocolo de irradiação.

Após o tratamento com a MB-PDT com 6 minutos de irradiação, os níveis de GSH nas células MIAPaCa-2 tratadas não diferenciaram-se dos valores obtidos para as condições controle (**Figura 20A**). Em contrapartida, após a terapia com 16 minutos, os níveis da forma reduzida da glutathiona diminuíram significativamente em relação aos controles nessa linhagem. Estes dados mostram que o aumento do tempo de irradiação gera um quadro de diminuição da GSH disponível, provavelmente devido ao seu consumo pelos mecanismos de neutralização do estresse oxidativo aumentado por essa condição de irradiação prolongada.

De forma semelhante, os níveis de GSH diminuíram gradualmente com o aumento do tempo de irradiação também nas células Panc-1 (**Figura 20B**). Este conjunto de dados está de acordo com os comportamentos de sensibilidade à terapia que vêm sendo observados desde as etapas iniciais desse estudo. A partir deles pode-se elaborar a hipótese de que a via de ferroptose poderia estar envolvida na citotoxicidade da MB-PDT, especialmente sobre esses modelos resistentes à necroptose. Cabe salientar que este mecanismo de necrose regulada está associada à diminuição dos níveis de GSH, que implica em

diminuição da atividade da enzima GPX4 (*glutathione peroxidase 4*)(DIXON et al., 2012).

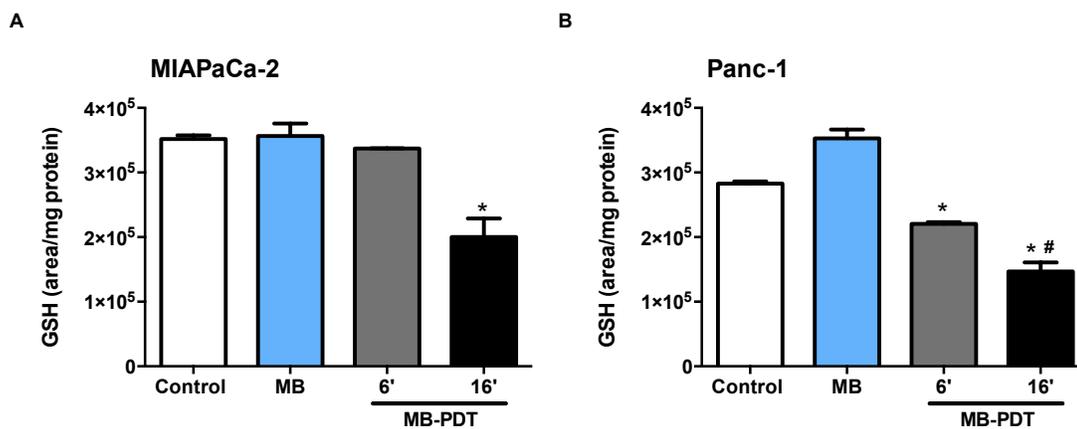


Figura 21: O aumento no tempo de irradiação diminui os níveis de GSH intracelular em linhagens de PDAC. Quantificação intracelular de glutathione reduzida, GSH, em MIAPaCa-2 (A) e Panc-1 (B); n=4 experimentos independentes para MIAPaCa-2 e n=2 para Panc-1; * p<0.05 versus Ctrl' # p<0.05 versus MB-PDT 6' no histograma para a linhagem Panc-1. Os resultados são representados como médias±EPM.

6. DISCUSSÃO

O conjunto de resultados obtidos no presente trabalho mostrou que a terapia fotodinâmica com o azul de metileno como fotossensibilizador é eficiente em induzir a morte de diferentes linhagens de PDAC humanas, sendo a necroptose uma importante via, embora não a única, responsável pelos efeitos citotóxicos da terapia. Mostrou-se ainda que a eficiência do tratamento com a MB-PDT depende do protocolo de irradiação utilizado, sendo aqueles com tempos maiores de irradiação associados à maior eficácia do tratamento sobre as células mais resistentes.

Os resultados de alta citotoxicidade da MB-PDT sobre as quatro linhagens aqui estudadas são altamente promissores. A relevância destes resultados evidencia-se, por exemplo, quando se considera o atual cenário de tratamentos disponíveis para o PDAC. Atualmente, o tratamento do câncer de pâncreas varia de acordo com o quadro clínico do paciente, sendo que a principal abordagem utilizada é o uso da gencitabina como adjuvante à cirurgia ressectiva para os pacientes operáveis. Para os tumores localmente avançados ou metastáticos, a estratégia terapêutica utilizada inclui o regime de tratamento com leucovorino/fluoroacil/irinotecano/oxaliplatina (FOLFIRINOX) ou, mais recentemente, a combinação de gencitabina com o paclitaxel nanoparticulado albuminado (nab-paclitaxel) (VITA et al., 2016; KIM, 2017). O uso de qualquer uma dessas combinações de fármacos, entretanto, apresenta inúmeras desvantagens e limitações terapêuticas. Por exemplo, o uso adjuvante da gencitabina oferece um incremento muito modesto na taxa de sobrevida global dos pacientes inferior à 7 meses (UENO et al., 2009; HOFF et al.,

2013). Além disso, tem sido reportado que o uso desses fármacos desencadeia uma série de efeitos adversos, como neutropenia, trombocitopenia, anemia, vômito, e diarreia (VITA et al., 2016), que contribuem para limitar ainda mais a qualidade de vida dos pacientes (CONROY et al., 2011). O mesmo se observa para o tratamento com a combinação da gencitabina e nab-paclitaxel que, embora indique um aumento um pouco mais relevante na sobrevida global dos pacientes, para aproximadamente 9 meses, pode acarretar o aparecimento de efeitos colaterais como neutropenia, astenia e neuropatias (HOFF et al., 2013).

Uma questão central e que merece consideração no contexto da discussão aqui levantada, diz respeito a efetividade *in vitro* observada durante a utilização dos fármacos atualmente empregados no tratamento do PDAC, sobre as quatro linhagens utilizadas na presente investigação. Esta é uma importante observação a ser feita uma vez que os testes *in vitro* representam uma etapa fundamental e que precede os estudos *in vivo* e posterior implementação clínica de qualquer terapia. Awasthi et al (2013) mostraram, por exemplo, que uma concentração de 10 μ M de gencitabina tem um efeito de inibição na proliferação de AsPC-1, BxPC-3, MIAPaCa-2 e Panc-1 de apenas 32, 74, 80 e 46%, respectivamente. Neste mesmo estudo, os pesquisadores mostraram que a combinação de gencitabina e nab-paclitaxel inibe a proliferação em 56, 80, 79 e 63% para AsPC-1, BxPC-3, MIAPaCa-2 e Panc-1, respectivamente (AWASTHI et al., 2013), sendo todos estes valores inferiores as porcentagens máximas de morte obtidas com a MB-PDT no presente trabalho (a lembrar: acima de 70% para AsPC-1; 91% para BxPC-3; 93% para MIAPaCa-2; e

70% para Panc-1). Esta comparação já evidencia, por si só, o potencial da MB-PDT como tratamento para este tipo de tumor.

Além disso, tem sido reportado que a contínua exposição à gencitabina acaba selecionando, por meio de mecanismos epigenéticos, uma subpopulação de células MIAPaCa-2 resistentes ao tratamento, adquirindo um fenótipo mais invasivo. Este fenômeno sugere, portanto, que a pressão de seleção mediada pelo uso da gencitabina sobre essas células resistentes pode aumentar o potencial metastático dos tumores (SAMULITIS et al., 2015). Em outro estudo conduzido por Arumugam et al. (2009) foi mostrado que apenas BxPC-3 apresentou sensibilidade ao tratamento com os fármacos gencitabina, 5-fluorocil ou cisplatina, enquanto AsPC-1, Panc-1 e MIAPaCa-2 apresentaram resistência aos três quimioterápicos. Os autores mostraram, ainda, que essa resistência está relacionada à um perfil de EMT (*epithelial-mesenchymal transition*) bem caracterizado das células resistentes, uma vez que foi observada uma expressão diferencial de genes envolvidos neste processo, especialmente uma correlação inversa entre E-caderina e Zeb-1 (supressor transcricional de E-caderina) nessas linhagens (ARUMUGAM et al., 2009). Dessa forma, os resultados de indução massiva de morte *in vitro* pela MB-PDT que apresentamos neste trabalho tornam evidentes a importância da terapia fotodinâmica no campo das investigações para o desenvolvimento de novas alternativas de tratamentos mais eficazes para os tumores de pâncreas, uma vez que os atuais fármacos utilizados na clínica apresentam desempenho inferior a MB-PDT sobre vários modelos de PDAC.

A alta citotoxicidade da terapia sobre as linhagens tumorais de pâncreas destaca-se positivamente também quando comparada à ação citotóxica da PDT com outros fotossensibilizadores. À título de exemplificação, em estudo conduzido por Atchison et al (2017) não foi observada redução na viabilidade das células MIAPaCa-2 e BxPC-3 utilizando a indocianina verde (ICG) como Ps. No mesmo estudo, os autores avaliaram também a eficiência fotodinâmica de mais dois compostos derivados do IR-783 (um composto da família das cianinas), denominados “6a” e “6b”. Eles obtiveram uma redução máxima de 90% na viabilidade de MIAPaCa-2 com 50µM de Ps (ATCHISON et al., 2017). Embora esses resultados indiquem um valor de queda na viabilidade dessas células que se assemelham à porcentagem máxima de morte obtida no presente estudo (93%) para esta linhagem, cabe ressaltar que a concentração de Ps utilizada pelos autores para obter o máximo de eficiência é quase duas vezes mais elevada que a concentração de MB aqui utilizada (20µM). Nossos resultados mostram que a PDT com o MB é mais eficiente do que os fotossensibilizadores testados no estudo citado e que a estratégia aqui apresentada, em termos de concentração do Ps, diminuiria também a probabilidade de toxicidade ao tecido normal. No que se refere à célula BxPC-3, os autores observaram uma redução de apenas 60% em sua viabilidade (com a mesma concentração: 50µM dos Ps) (ATCHISON et al., 2017), valor bastante inferior aos 91% de morte aqui obtidos com 20µM de MB na MB-PDT para a mesma linhagem. Em conjunto, essas análises comparativas reforçam a ideia de que a MB-PDT é mais efetiva em induzir a morte de linhagens de PDAC tanto comparando-se seus efeitos com outros fotossensibilizadores, como em relação a performances *in vitro* de

quimioterápicos já utilizados na clínica, sendo uma promissora linha de investigação que pode apresentar-se como uma alternativa para o tratamento dessa doença.

Adicionalmente, cabe ressaltar que a metodologia utilizada na maioria dos trabalhos para avaliar a efetividade dos fármacos ou tratamentos sobre células tumorais, baseia-se em ensaios colorimétricos, que exploram mudanças metabólicas celulares obtidas em um determinado tempo após o tratamento. Estes ensaios permitem apenas inferir eventos de queda na viabilidade celular (MENYHÁRT et al., 2016), mas não oferecem informações que confirmem a morte das células, uma vez que para isso é necessário correlacionar diferenças nos marcadores de citotoxicidade (alterações funcionais), parâmetros de alterações morfológicas das células ao longo do tempo e variações de marcadores de sinalização de morte (aspectos bioquímicos) (CUMMINGS; WILLS; SCHNEELLMANN, 2004; GALLUZZI et al., 2018). Especialmente no contexto da plasticidade de uma doença de complexa biologia, como é o câncer (HANAHAN; WEINBERG, 2011), garantir que uma terapia é eficiente em induzir morte e não apenas alterar temporariamente a atividade metabólica das células tumorais é de vital importância para potencializar as possibilidades de sucesso no tratamento.

Ainda no âmbito da citotoxicidade da MB-PDT, inicialmente neste trabalho foram observados dois perfis de susceptibilidade à terapia entre as quatro linhagens celulares. Variações nos resultados da PDT podem ser consequências de fatores associados com as propriedades químicas e farmacocinéticas do Ps, sua incorporação, concentração e localização intracelular, além de diferenças genóticas e fenotípicas dos tumores (BROEKGAARDEN et al., 2015). Como já

estabelecido na literatura, dependendo da concentração e das propriedades do solvente onde se encontra, o azul de metileno pode agregar-se, formando dímeros. Nesta configuração dimérica, este composto não absorve luz eficientemente no comprimento de onda do vermelho, o que implica em diminuição do rendimento quântico de formação de oxigênio singlete, que é a principal espécie reativa resultante da excitação do MB na sua forma monomérica (TARDIVO et al., 2005; FRANCISCO et al., 2017). Além disso, já foi demonstrado que injeções de 2% (63mM) de MB induz a formação de dímeros em células de tumores de pele *in vivo*. Já em solução aquosa, numa concentração de até 20 μ M, apenas a forma monomérica do MB é detectada (TARDIVO et al., 2005). Atentos à esta propriedade do MB, neste trabalho utilizamos valores de até 20 μ M para garantir uma boa eficiência fotodinâmica.

Uma vez que a quantidade de Ps incorporada pelas células está diretamente associada ao dano gerado pela PDT, neste trabalho foi avaliada a capacidade de incorporação do MB pelas quatro linhagens, a fim de determinar uma possível associação entre este parâmetro e as diferenças nas susceptibilidades. Os resultados apresentados, entretanto, mostraram que a quantidade de MB incorporada não é o fator que determina a diferença de morte induzida pela MB-PDT nas diferentes linhagens. Isto fica comprovado, uma vez que a célula que se mostrou menos sensível ao tratamento (MIAPaCa-2 no protocolo de 6 minutos de irradiação) apresentou a maior taxa de incorporação do MB.

Um outro fator importante na determinação da efetividade e da extensão dos danos desencadeados pela PDT é o desbalanço no estado redox das células para

um caráter mais oxidativo, que leva a oxidação de biomoléculas. Este evento danifica as membranas biológicas e compromete o funcionamento de organelas, ativando vias específicas de morte celular (CHERNYAK et al., 2006; BACELLAR et al., 2015; ITO; MATSUI, 2016). Uma vez que a meia-vida das espécies reativas formadas é muito curta, o compartimento sub-celular de concentração do fotossensibilizador é um importante indicativo sobre quais vias de morte podem estar sendo desencadeada após a terapia (BACELLAR et al., 2015). Neste sentido, muitos trabalhos na literatura associam a localização sub-celular do PS com a ativação de vias específicas de morte. Por exemplo, Hsieh et al (2003) reportaram que a PDT com a *Photofrin*® como fotossensibilizador ativou vias de morte com fenótipos e marcadores moleculares apoptóticos ou necróticos dependendo da localização intracelular do Ps. Os autores demonstraram que dependendo do protocolo de incubação, o composto pode estar associado à membrana plasmática ou ser transportado para compartimentos internos, como o complexo de golgi (HSIEH et al., 2003). Além disso, tem sido reportado que o *Foscan*® se concentra no ER de células de carcinoma mamário, MCF-7, após 24h de incubação, e que a PDT nessas condições induz uma destruição fotoquímica da proteína anti-apoptótica Bcl-2 presente nesta organela e culmina com a morte celular por apoptose, por meio da ativação das caspases 6 e 7 (MARCHAL et al., 2007). Dessa forma, determinar a localização intracelular do MB nas linhagens de PDAC poderia fornecer informações relevantes tanto para o entendimento dos efeitos da terapia sobre esses modelos quanto para explicar as diferenças nas suas susceptibilidades.

Os dados da microscopia confocal apresentados neste trabalho mostram que após duas horas de incubação, o azul de metileno se concentra preferencialmente nos lisossomos das quatro linhagens. Porém, apesar de uma clara localização nos lisossomos, não podemos descartar a co-localização desse fotossensibilizador com o retículo endoplasmático das linhagens de PDAC, possivelmente em menores proporções. A integridade das membranas celulares é outro ponto crítico na manutenção da homeostase e vida das células. De uma maneira organelo-dependente, os danos a estas estruturas que delimitam compartimentos específicos encarregados de executar funções bem definidas no interior das células podem disparar diferentes vias de morte celular. A localização intracelular lisossomal do MB também foi reportada em outros modelos e tem sido relacionada à indução de vias de necrose regulada (OLIVEIRA et al., 2011; SANTOS et al., 2017). De uma forma geral, com os dados que temos até o momento podemos concluir que existe um padrão semelhante de localização do Ps nas diferentes células, o que é um forte indicativo de que o dano oxidativo está sendo gerado em locais semelhantes nas células e que, provavelmente, as vias de morte ativadas podem ser as mesmas.

Dois dos processos bem definidos durante a transformação maligna das células de câncer são a aquisição de mecanismos de resistência a vias de morte e a ativação constitutiva de sinalização pró-sobrevivência (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Assim, o desenvolvimento de terapias anti-câncer precisa contemplar o estudo sobre quais processos estão envolvidos na ação terapêutica e quais as vias de morte responsáveis pela citotoxicidade do tratamento. Assim sendo, é de fundamental importância considerar a influência das variações bioquímicas e

moleculares entre os diferentes modelos celulares quando se estudam os efeitos da PDT. Hannes et al (2016) mostraram, em um estudo sobre a regulação da via de necroptose em tumores pancreáticos, que as linhagens AsPC-1, Panc-1, BxPC-3 e MIAPaCa-2 expressam, nas suas respectivas condições normais de crescimento, quase todos os componentes proteicos já descritos na via da necroptose. A exceção está na proteína RIPK3, não identificada por estes autores nas linhagens MIAPaCa-2 e Panc-1 (HANNES; AHANGARIAN; FULDA, 2016). Interessantemente, estas duas linhagens deficientes na expressão de RIPK3 apresentaram maior resistência à morte celular induzida pela MB-PDT com o protocolo de 6 minutos de irradiação.

Nossos resultados comprovaram que as quatro linhagens expressam níveis semelhantes de RIPK1 e confirmaram a expressão deficiente de RIPK3 em MIAPaCa-2 e Panc-1. Adicionalmente, além de RIPK3, os níveis de MLKL também estão significativamente menores nas células Panc-1 e MIAPaCa-2 em relação às BxPC-3 e AsPC-1. Com base na revisão de literatura conduzida durante o presente trabalho, este é o primeiro relato de diferença significativa na expressão de MLKL nesses modelos e de sua associação com os efeitos da PDT. Em conjunto com os resultados iniciais de viabilidade celular, que mostraram menor susceptibilidade de Panc-1 e MIAPaCa-2, ficou evidenciado que a baixa expressão de componentes centrais do necrossomo parece conferir resistência às células de PDAC quando submetidas ao tratamento com a MB-PDT.

Para explorar a contribuição do mecanismo de necroptose para os efeitos da MB-PDT nestes modelos, partimos para a modulação desta via e avaliação de seus efeitos. Inicialmente, identificamos se efetivamente a necroptose estava sendo

ativada nestas células com a MB-PDT. A MLKL é a última proteína da via necroptótica e, uma vez no seu estado fosforilado, se oligomeriza e é translocada para a membrana plasmática, induzindo a formação de nanoporos que culminam com a permeabilização irreversível e extravasamento do conteúdo celular e consequente morte da célula (ROS et al., 2017). No presente trabalho demonstramos a participação da necroptose nos efeitos citotóxicos da MB-PDT quando avaliamos o estado de fosforilação de MLKL. Porém, a inibição da necroptose não alterou significativamente os valores de porcentagem de morte das células Panc-1 e MIAPaCa-2 submetidas à MB-PDT. Estes resultados estão de acordo com os baixos níveis das proteínas RIPK3 e MLKL nestas células. Este conjunto de dados mostra que a necroptose é ativada e parece estar atuando decisivamente para a alta mortalidade de linhagens que expressam os componentes do necrossomo.

Uma das vantagens que a indução da morte necroptótica pode oferecer no contexto do tratamento do câncer é a ativação do sistema imune. Um estudo recente mostrou que células TC-1 (derivadas de câncer de pulmão) tratadas com uma combinação de indutores clássicos de necroptose (TNF, z-VAD-fmk, um inibidor de pan-caspase, e um mimético de Smac) injetadas em camundongos C57BL/6 (imunocompetentes) induzem uma resposta imune capaz de proteger esses animais do desenvolvimento de tumores ao serem desafiados novamente com a injeção de células tumorais vivas (YANG et al., 2016). O papel de estimulação do sistema imune desempenhado pelas células de câncer em processo de morte necroptótica está relacionado com a liberação de DAMPs (*Damage-associated molecular patterns*). Nesta classe de moléculas incluem-se o ATP (adenosina-trifosfato) e o

HMGB1 (do inglês, *high-mobility group box 1*) para o meio extracelular e a exposição de CRT (do inglês, *calreticulin*) na membrana dessas células durante o processo de morte (YANG et al., 2016). A liberação ou a exposição destas moléculas pelas células danificadas e consequente indução de morte em células vizinhas por ação do sistema imune deu origem a um nova via de morte, denominada *Immunogenic Cell Death* (ICD) (OBEID et al., 2007). Tem sido mostrado que alguns protocolos de PDT usando outros Ps que ativam este tipo de morte celular promovem uma resposta anti-tumoral de memória que poderia estar envolvida na eliminação de metástases ou, pelo menos, na diminuição da recorrência dos tumores (GARG; AGOSTINIS, 2014). Diante do exposto, avaliar a participação de ICD no contexto da MB-PDT parece ser de fundamental interesse no que diz respeito ao PDAC e representa uma das perspectivas deste trabalho.

Os tumores de PDAC podem apresentar quimioresistência intrínseca ou adquirida ao tratamento com a gencitabina, o principal quimioterápico utilizado no tratamento dessa doença. A resistência intrínseca é decorrente de fatores genéticos e a adquirida deve-se ao desenvolvimento de alterações genéticas e epigenéticas após a exposição contínua à droga (AMRUTKAR; CLAUDHAUG, 2017). Em todos os casos, esses mecanismos de resistência limitam os efeitos da quimioterapia e diminuem as possibilidades de cura, evidenciando a necessidade de desenvolvimento de novas terapias alternativas para o tratamento da doença. Neste contexto, o presente trabalho mostrou que a MB-DPT leva à indução bem caracterizada da necroptose, uma via de morte com um potencial imunogênico recentemente explorado.

Uma das etapas críticas para a implementação da PDT consiste na necessidade de padronização metodológica considerando-se fatores como a quantidade e o tipo de fotossensibilizador administrado e a dose de energia necessária para ativação do composto no tecido (BACELLAR et al., 2015; SILVA et al., 2015; DAVANZO et al., 2017). Interessantemente, no contexto citado, especialmente para ampliar as possibilidades de uma abordagem mecânica mais detalhada e estabelecimento de um protocolo de PDT mais eficiente, o nosso trabalho mostrou que o tempo de irradiação é um parâmetro decisivo para melhorar a eficiência da MB-PDT sobre as linhagens MIAPaCa-2 e Panc-1, mais resistentes à terapia. Estes resultados sugerem que, dependendo do tipo de tumor, um protocolo de PDT com uma carga de energia intensa distribuída em curto espaço de tempo pode não ser eficaz para ativar vias que sejam capazes de esgotar os recursos de defesa inerentes de cada célula. No caso da PDT com azul de metileno foi mostrado que o tempo de exposição das células de tumores de pâncreas pode ser crucial para o sucesso da terapia.

Como considerado anteriormente, diferentes parâmetros químicos, físicos e ambientais contribuem para determinar a eficácia da PDT. Seshadri et al (2008) reportaram, em modelos pré-clínicos, que os tempos mais prolongados de irradiação, independentemente do regime da PDT (determinado pelo produto [PS]-Luz), aumentam a eficiência da terapia em induzir a necrose de tumores. Os autores apontaram o comprometimento da capacidade da microvasculatura no ambiente tumoral em repor o aporte de O_2 durante os protocolos de irradiações mais curtas, onde a pO_2 é reduzida rapidamente naquele microambiente, provavelmente devido

ao consumo fotooxidativo abrupto do oxigênio que ocorre nessas condições, como fator decisivo para esses resultados (SESHADRI et al., 2008).

Em outro trabalho, utilizando-se condições experimentais mais próximas as do presente estudo, foi mostrado que sob uma mesma fluência, os tempos maiores de irradiação são mais efetivos em induzir a fotoinativação de microorganismos patogênicos, demonstrando-se assim a importância do tempo de irradiação para os efeitos da MB-PDT em modelos não tumorais (PRATES et al., 2009). Adicionalmente, já tem sido reportada, *in vivo*, que o fracionamento da dose de energia melhora a eficiência da PDT no tratamento de algumas doenças de pele, além de causar menos dor ao paciente (ANG et al., 2017; VIGNION-DAWALLE et al., 2017). Assim, os resultados aqui apresentados sugerem que o aumento no tempo de irradiação melhora a eficiência da MB-PDT e induz o aumento da morte das células mais resistentes, transpondo a barreira de “escape” destas linhagens, provavelmente por promover um estímulo capaz de acionar vias de morte diferentes da necroptose.

Como já considerado, a PDT aumenta da geração de ROS intracelular. Além disso, tem sido mostrado recentemente que algumas células tumorais podem ser mortas seletivamente por ativadores químicos de uma via de morte alternativa, dependente de ferro, denominada ferroptose (STOCKWELL et al., 2017). Esta é uma via de morte regulada recém descrita que se inicia a partir da desregulação no metabolismo do ferro e de uma depleção das defesas antioxidantes celulares dependentes de glutathione que, uma vez diminuída, compromete a atividade da GPX4, e culmina com uma exacerbada peroxidação de lipídeos que leva à morte

das células (DIXON et al., 2012; XIE et al., 2016). No presente trabalho observou-se um maior aumento de estresse oxidativo intracelular (indicado pelo aumento da fluorescência da sonda DCF) nas células MIAPaCa-2 com o protocolo de maior tempo de irradiação. Dessa forma, conclui-se que a alta mortalidade observada após o tratamento nas condições de maior exposição à luz está relacionada ao aumento de espécies reativas induzido pela terapia de uma forma tempo-dependente, onde os protocolos mais longos determinam maior dano oxidativo que pode estar sendo decisivo para desencadear as vias de morte.

O maior prejuízo celular numa situação de aumento exacerbado na produção de espécies reativas oxidantes se caracteriza quando há a perda do equilíbrio entre a taxa de geração dessas espécies e a capacidade antioxidante desse microambiente que, obrigatoriamente, precisa ser mantido para que não ocorra a falência sistêmica e conseqüente morte celular (DURACKOVA, 2009). A glutathiona reduzida (GSH) é um tripeptídeo (L-glutamil-L-cisteinil-glicina) que está entre os principais sistemas antioxidantes que ajudam a manter a homeostase redox celular (LUSHCHAK, 2012). Após a constatação de que o tempo maior de irradiação induz a geração de níveis mais altos de espécies reativas e uma maior taxa de mortalidade das células, analisamos os níveis de GSH nas linhagens MIAPaCa-2 e Panc-1, como forma de avaliar a relação entre a capacidade antioxidante desses dois sistemas celulares e sua relação com a susceptibilidade à MB-PDT. De fato, após a MB-PDT com protocolo de maior tempo de irradiação foi vista uma queda acentuada nos níveis de GSH nas duas células. Com estes resultados mostrou-se, portanto, que a MB-PDT com tempos maiores de irradiação desencadeia um aumento dos

níveis de espécies reativas nas células, acompanhado da diminuição de GSH. Juntos, estes dois fenômenos parecem ser determinantes para a maior efetividade da terapia sobre esses modelos e pode estar relacionada ao desencadeamento da ferroptose. Portanto, os resultados sobre as diferenças nos níveis de GSH após os dois protocolos confirmaram também a ideia de que outros mecanismos de morte estão sendo desencadeados após a MB-DPT e que o tempo de irradiação é uma importante modulador do desencadeamento dessas sinalizações de morte.

O desenvolvimento de terapias mais eficientes e menos invasivas para o tratamento do adenocarcinoma de ducto pancreático humano é uma urgência no âmbito das pesquisas com esse tipo de câncer. Os dados de eficiência de ação da MB-PDT que foram apresentadas no presente trabalho se inserem neste cenário como uma importante contribuição para o esclarecimento de pontos fundamentais ao entendimento e desenvolvimento de alternativas mais eficientes ao tratamento da doença. Em termos de aplicabilidade, a MB-PDT poderia ser implementada como uma abordagem perioperatória adjuvante à cirurgia ressectiva, para possibilitar a eliminação de células malignas residuais no tecido de suporte tumoral, na região onde ocorre a intervenção cirúrgica, e prevenir ou diminuir as chances de recorrência local e metastática, afetando minimamente os tecidos normais, como tem sido testado em estudos pré-clínicos (MAAWY et al., 2016).

Assim, os dados aqui apresentados suportam o caráter promissor da continuidade de investigações que possam viabilizar a utilização dessa abordagem terapêutica no tratamento dos pacientes acometidos por esse tipo de tumor.

7. CONCLUSÃO

O conjunto dos dados aqui apresentados mostram que a terapia fotodinâmica com o azul de metileno é efetiva em induzir a morte de linhagens de adenocarcinomas pancreáticos humanos, apontando a necroptose como via fundamental para a maior efetividade dessa citotoxicidade, especialmente sobre as células que não apresentam baixa expressão de RIPK3 e MLKL, dois componentes fundamentais para a execução desta via. Eles indicam, ainda, que mais de uma via de morte está sendo acionada pela terapia, variando também com a linhagem considerada. Nesse sentido, os resultados apontam que é interessante investir no estudo da ferroptose como um processo integrante e importante no contexto da citotoxicidade desencadeado pela MB-PDT nesses modelos. As informações obtidas a partir da investigação conduzida neste trabalho são importantes porque mostram, com uma sólida abordagem no âmbito molecular, que a terapia fotodinâmica com o azul de metileno como fotossensibilizador (uma metodologia de baixo custo financeiro e menos invasiva que as atuais e ainda ineficientes terapias disponíveis) apresenta um forte potencial como alternativa para melhorar o tratamento de um dos tipos mais agressivos de tumores humanos, o adenocarcinoma de ducto pancreático.

8. REFERÊNCIAS

ACEDO, P.; STOCKERT, J.; CANETE, M.; VILLANUEVA, A. Two combined photosensitizers : a goal for more effective photodynamic therapy of cancer. **Cell Death and Disease**, v. 6, p. 1–12, 2014.

AGOSTINIS, P.; BERG, K.; CENGEL, K. A.; FOSTER, T. H.; GIROTTI, A. W.; GOLLNICK, S. O.; HAHN, S. M.; HAMBLIN, M. R.; JUZENIENE, A. Photodynamic therapy of cancer: an update. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 61, n. 4, p. 250–281, 2011.

AMRUTKAR, M.; CLAUDHAUG, I. P. Pancreatic Cancer Chemoresistance to Gemcitabine. **Cancers**, v. 157, n. 9, p. 1–23, 2017.

ANG, J. M.; RIAZ, B. I.; KAMAL, M. U.; PARAGH, G.; ZEITOUNI, N. C. Photodynamic Therapy and Pain: A Systematic Review. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, 2017.

ARTINYAN, A. V. O.; SORIANO, P. A.; PRENDERGAST, C.; LOW, T.; ELLENHORN, J. D. I.; KIM, J. The anatomic location of pancreatic cancer is a prognostic factor for survival. **HPB**, n. April, p. 371–376, 2008.

ARUMUGAM, T.; RAMACHANDRAN, V.; FOURNIER, K. F.; WANG, H.; MARQUIS, L.; ABBRUZZESE, J. L.; GALLICK, G. E.; LOGSDON, C. D.; DAVID, J.; CHOI, W. HHS Public Access. **Cancer Research**, v. 69, n. 14, p. 5820–5828, 2009.

ATCHISON, J.; KAMILA, S.; NESBITT, H.; A. LOGAN, K.; M. NICHOLAS, D.; FOWLEY, C.; DAVIS, J.; CALLAN, B.; P. MCHALE, A.; F. CALLAN, J. Iodinated Cyanine Dyes: A New Class of Sensitisers for use in NIR Activated Photodynamic Therapy (PDT). **ChemComm**, p. 2–6, 2017.

AWASTHI, N.; ZHANG, C.; SCHWARZ, M.; HINZ, S.; WANG, C.; WILLIAMS, S.; SCHWARZ, M. A.; SCHWARZ, E. Comparative benefits of Nab-paclitaxel over gemcitabine or polysorbate-based docetaxel in experimental pancreatic cancer. **Carcinogenesis**, v. 34, n. 10, p. 2361–2369, 2013.

BACELLAR, I. O. L.; TSUBONE, T. M.; PAVANI, C.; BAPTISTA, M. S. Photodynamic efficiency: From molecular photochemistry to cell death. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 9, p. 20523–20559, 2015.

BARKLA, D. H.; GIBSON, P. R. The fate of epithelial cells in the human large intestine. **Pathology**, v. 31, n. 3, p. 230–238, 1999.

BERGHE, T. Vanden; LINKERMANN, A.; JOUAN-LANHOUE, S.; WALCZAK,

H.; VANDENABEELE, P. Regulated necrosis: The expanding network of non-apoptotic cell death pathways. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 15, n. 2, p. 135–147, 2014.

BORLE, F.; RADU, A.; FONTOLLIET, C.; MONNIER, P.; WAGNIE, G. Selectivity of the photosensitizer Tookad s for photodynamic therapy evaluated in the Syrian golden hamster cheek pouch tumour model. **British Journal of Cancer**. p. 2320–2326, 2003.

BOSETTI, C. Epidemiology of Pancreatic Cancer a Global Approach. 2014.
BOWN, S. G.; ROGOWSKA, A. Z.; WHITELAW, D. E.; LEES, W. R.; LOVAT, L. B.; RIPLEY, P.; JONES, L.; WYLD, P.; GILLAMS, A.; HATFIELD, A. W. R. Photodynamic therapy for cancer of the pancreas. **Gut**, v. 50, n. 4, p. 549–57, 2002.

BROEKGAARDEN, M.; WEIJER, R.; GULIK, T. M. van; HAMBLIN, M. R.; HEGER, M. Tumor cell survival pathways activated by photodynamic therapy: a molecular framework for inhibition strategies. **Cancer metastasis reviews**, p. 643–690, 2015.

BURRIS, H. A.; MOORE, M. J.; ANDERSEN, J.; GREEN, M. R.; ROTHENBERG, M. L.; MODIANO, M. R.; CRIPPS, M. C.; PORTENOY, R. K.; STORNILO, A. M.; TARASSOFF, P.; NELSON, R.; DORR, F. A.; STEPHENS, C. D.; HOFF, D. D. Von. Improvements in Survival and Clinical Benefit With Gemcitabine as First-Line Therapy for Patients With Advanced Pancreas Cancer: A Randomized Trial. **Journal of Clinical Oncology**, v. 15, n. 6, p. 2403–2413, 1997.

BUYTAERT, E.; DEWAELE, M.; AGOSTINIS, P. Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1776, p. 86–107, 2007.

CAMPBELL, S. L.; KHOSRAVI-FAR, R.; ROSSMAN, K. L.; CLARK, G. J.; DER, C. J. Increasing complexity of Ras signaling. **Oncogene**. 1998.

CHEN, Y.; ZHENG, W.; LI, Y.; ZHONG, J.; JI, J.; SHEN, P. Apoptosis induced by methylene-blue-mediated photodynamic therapy in melanomas and the involvement of mitochondrial dysfunction revealed by proteomics. **Cancer Science**, v. 99, n. 10, p. 2019–2027, 2019.

CHERNYAK, B. V.; IZYUMOV, D. S.; LYAMZAEV, K. G.; PASHKOVSKAYA, A. A.; PLETJUSHKINA, O. Y.; ANTONENKO, Y. N.; SAKHAROV, D. V.; WIRTZ, K. W. A.; SKULACHEV, V. P. Production of reactive oxygen species in mitochondria of HeLa cells under oxidative stress. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1757, p. 525–534, 2006.

CONROY, THIERRY GOURGOU-BOURGADE, S.; SC, M.; FOUCHARDIÈRE, C. De; ASSENAT, E.; PH, D.; CHAUFFERT, B.; PH, D.; MICHEL, P.; MONTOTO-GRILLOT, C.; CHEM, M.; DUCREUX, M.; FOLFIRINOX versus Gemcitabine for Metastatic Pancreatic Cancer. **The New England Journal of Medicine**. v. 364, p. 1817–1825, 2011.

CUMMINGS, B. S.; WILLS, L. P.; SCHNEELLMANN, R. G. NIH Public Access. **Current Protocols in Pharmacology**, n. Lemasters 1999, p. 1–30, 2004.

DAVANZO, N. N.; PELLOSI, D. S.; FRANCHI, L. P.; TEDESCO, A. C. Light source is critical to induce glioblastoma cell death by photodynamic therapy using chloro-aluminiumphthalocyanine albumin-based nanoparticles. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, 2017.

DEGENHARDT, K.; MATHEW, R.; BEAUDOIN, B.; BRAY, K.; ANDERSON, D.; CHEN, G.; MUKHERJEE, C.; SHI, Y.; FAN, Y.; NELSON, D. a; JIN, S. NIH Public Access. **Cancer Cell**, v. 10, n. 1, p. 51–64, 2006.

DHIRAJ, YADAV, ALBERT B., L. The Epidemiology of Pancreatitis and Pancreatic Cancer. v. 144, n. 6, p. 1252–1261, 2014.

DILLON, C. P.; WEINLICH, R.; RODRIGUEZ, D. A.; CRIPPS, J. G.; GONG, Y.; JANKE, L. J.; KELLIHER, M. A.; KANNEGANTI, T. RIPK1 blocks early postnatal lethality mediated by caspase-8 and RIPK3. **CellReports**, v. 157, n. 5, p. 1189–1202, 2014.

DIXON, S. J.; LEMBERG, K. M.; LAMPRECHT, M. R.; SKOUTA, R.; ELEINA, M.; GLEASON, C. E.; PATEL, D. N.; BAUER, A. J.; CANTLEY, A. M.; YANG, W. S.; III, B. M.; STOCKWELL, B. R. **Cell**. v. 149, n. 5, p. 1060–1072, 2012.

DURACKOVA, Z. Some Current Insights into Oxidative Stress. **Physiological Research**, v. 59, p. 459–469, 2009.

ELMORE, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. **Toxicologic Pathology**, v. 35, n. 4, p. 495–516, 2007.

FISCHER, R.; BREIDERT, M.; KECK, T.; MAKOWIEC, F.; LOHRMANN, C.; HARDER, J. Early recurrence of pancreatic cancer after resection and during adjuvant chemotherapy. **Saudi Journal of Gastroenterology**, v. 18, n. 2, p. 118–122, 2012.

FOKAS, E.; NEILL, E. E. O.; GORDON-WEEKS, A. N.; MCKENNA, W. G.; NEILL, E. O.; GORDON-WEEKS, A.; MUKHERJEE, S.; MCKENNA, W. G.; MUSCHEL, R. J. Pancreatic Ductal Adenocarcinoma : From Genetics to Biology to Radiobiology to Oncoimmunology And All the Way Back to the radiobiology to oncoimmunology and all the way back to the clinic. **Biochimica et Biophysica**

Acta journal, n. July, 2014.

FRANCISCO, C. M. L.; GONÇALVES, M. L. A.; BRUM, B. S.; SANTOS, T. P. C.; LINO-DOS-SANTOS-FRANCO, A.; SILVA, D. F. T.; PAVANI, C. The photodynamic efficiency of phenothiazinium dyes is aggregation dependent. **New Journal of Chemistry**, 2017.

FULDA, S.; DEBATIN, K.-M. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. **Oncogene**, v. 25, p. 4798–4811, 2006.

GABRIELLI, D.; BELISLE, E.; SEVERINO, D.; KOWALTOWSKI, A. J.; BAPTISTA, M. S. Binding, aggregation and photochemical properties of methylene blue in mitochondrial suspensions. **Photochemistry and Photobiology**, v. 79, n. 3, p. 227–232, 2004.

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, set. 2014.

GALLUZZI, L.; KEPP, O.; CHAN, F. K.-M.; KROEKER, G. Necroptosis: Mechanisms and relevance to Disease. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 344, n. 6188, p. 1173–1178, 2017.

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. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. **Cell Death & Differentiation**, 2018.

GARG, A. D.; AGOSTINIS, P. ER stress, autophagy and immunogenic cell death in photodynamic therapy-induced anti-cancer immune responses. **Photochemical & Photobiological Sciences**, n. 3, p. 474–487, 2014.

GARRIDO-LAGUNA, I.; HIDALGO, M. Pancreatic cancer: from state-of-the-art treatments to promising novel therapies. **Nature Reviews. Clinical Oncology**, v. 12, n. 6, p. 319–334, 2015.

GROSSMAN, C. E.; CARTER, S. L.; CZUPRYNA, J.; WANG, L.; PUTT, M. E.; BUSCH, T. M. Fluence Rate Differences in Photodynamic Therapy Efficacy and Activation of Epidermal Growth Factor Receptor after Treatment of the Tumor-Involved Murine Thoracic Cavity. **International Journal of Molecular Sciences**, p. 2–14, 2016.

HAMACHER, R.; SCHMID, R. M.; SAUR, D.; SCHNEIDER, G. Apoptotic pathways in pancreatic ductal adenocarcinoma. **Molecular Cancer**, v. 10, p. 1–10, 2008.

HAN, J.; ZHONG, C.-Q.; ZHANG, D.-W. review Programmed necrosis: backup to and competitor with apoptosis in the immune system. **Nature Immunology**, v. 12, n. 12, p. 1143–1149, 2011.

HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Review Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.

HANNES, S.; AHANGARIAN, B.; FULDA, S. Smac mimetic triggers necroptosis in pancreatic carcinoma cells when caspase activation is blocked. **Cancer Letters**, v. 380, n. 1, p. 31–38, 2016.

HEZEL, A. F.; KIMMELMAN, A. C.; STANGER, B. Z.; HEZEL, A. F.; KIMMELMAN, A. C.; STANGER, B. Z.; BARDEESY, N.; DEPINHO, R. A. Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. **Genes & Development**, p. 1218–1249, 2006.

HOFF, D. D. Von; ERVIN, T.; ARENA, F. P.; CHIOREAN, E. G.; INFANTE, J.; MOORE, M.; SEAY, T.; TJULANDIN, S. A.; MA, W. W.; SALEH, M. N.; HARRIS, M.; RENI, M.; DOWDEN, S.; LAHERU, D.; BAHARY, N.; WEI, X.; PH, D.;

IGLESIAS, J.; RENSCHLER, M. F. Increased Survival in Pancreatic Cancer with nab-Paclitaxel plus Gemcitabine. p. 1691–1703, 2013.

HRUBAN, R. H.; MAITRA, A.; GOGGINS, M. Update on Pancreatic Intraepithelial Neoplasia. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, p. 306–316, 2008.

HSIEH, Y.; WU, C.; CHANG, C.; YU, J. Subcellular Localization of Photofrin 1 Determines the Death Phenotype of Human Epidermoid Carcinoma A431 Cells Triggered by Photodynamic Therapy: When Plasma Membranes Are the Main Targets. **Journal of Cellular Physiology**, v. 375, n. October 2002, p. 363–375, 2003.

HUANG, Z.; XU, H.; MEYERS, A. D.; MUSANI, A. L.; WANG, L.; TAGG, R.; BARQAWI, A. B.; CHEN, Y. K.; BARQAWI, A. B.; CHEN, Y. K. Photodynamic therapy for treatment of solid tumors – potential and technical challenges. **Technology in Cancer Research & Treatment**, v. 7, n. 4, p. 309–320, 2008.

IKEZAWA, K.; HIKITA, H.; SHIGEKAWA, M.; IWAHASHI, K.; EGUCHI, H.; SAKAMORI, R.; TATSUMI, T.; TAKEHARA, T. Increased Bcl-xL Expression in Pancreatic Neoplasia Promotes. **Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology**, v. 4, n. 1, p. 185–200, 2017.

ITO, H.; MATSUI, H. Mitochondrial Reactive Oxygen Species and Photodynamic Therapy. **Laser Therapy**, p. 193–199, 2016.

JONES, S.; ZHANG, X.; PARSONS, D. W.; LIN, J. C.; LEARY, R. J.; ANGENENDT, P.; MANKOO, P.; CARTER, H.; JIMENO, A.; HONG, S.; FU, B.; LIN, M.; ERIC, S.; KAMIYAMA, M.; WALTER, K.; NIKOLSKAYA, T.; NIKOLSKY, Y.; HARTIGAN, J.; SMITH, D. R.; HIDALGO, M.; LEACH, S. D.; ALISON, P.; JAFFEE, E. M.; GOGGINS, M.; MAITRA, A.; IACOBUZIO, C.; ESHLEMAN, J. R.; KERN, S. E.; HRUBAN, R. H.; PAPADOPOULOS, N.; PARMIGIANI, G.; VOGELSTEIN, B.; VICTOR, E.; KINZLER, K. W. Core Signaling Pathways in Human Pancreatic Cancers Revealed by Global Genomic Analyses. **Science**, v. 321, n. 5897, p. 1801–1806, 2008.

KERR, J. F. R.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implication in tissue kinetics. **British Journal of Cancer**, p. 239–257, 1972.

KIM, G. nab -Paclitaxel for the treatment of pancreatic cancer. p. 85–96, 2017.
KRISTIANSEN, M.; HAM, J. Programmed cell death during neuronal development: the sympathetic neuron model. **Cell Death and Differentiation**, v. 21, n. 7, p. 1025–1035, 2014.

LI, W.; MA, Q.; WU, E. Perspectives on the Role of Photodynamic Therapy in the

Treatment of Pancreatic Cancer. **International Journal of Photoenergy**. v. 2012, 2012.

LINKERMANN, A.; GREEN, D. R. Necroptosis. **New England Journal of Medicine**. v. 370, n. 5, p. 455–465, 2014.

LONGLEY, D. B.; HARKIN, D. P.; JOHNSTON, P. G. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. May, p. 330–338, 2003.

LONGNECKER, D. Anatomy and Histology of the Pancreas. **Pancreapedia**, p. 1–26, 2014.

LU, Y.; JIAO, R.; CHEN, X.; ZHONG, J.; JI, A.; SHEN, P. Methylene blue-mediated photodynamic therapy induces mitochondria-dependent apoptosis in HeLa cell. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 105, n. 6, p. 1451–1460, 2008.

LUSHCHAK, V. I. Glutathione Homeostasis and Functions : Potential Targets for Medical Interventions. **Journal of Amino Acids**, p. 1–26, 2012.

MAAWY, A. A.; HIROSHIMA, Y.; ZHANG, Y.; GARCIA-, M.; LUIKEN, G. A.; KOBAYASHI, H.; HOFFMAN, R. M.; BOUVET, M.; DIEGO, S.; DIEGO, S.; CITY, Y.; DIEGO, S.; DIEGO, S.; DIEGO, S. Photoimmunotherapy lowers recurrence after pancreatic cancer surgery in orthotopic nude mouse models. **Journal of Surgery Research**. v. 197, n. 1, p. 5–11, 2016.

MALUMBRES, M.; BARBACID, M. RAS oncogenes : the first 30 years. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. June, 2003.

MARCHAL, S.; FRANC, A.; DUMAS, D.; GUILLEMIN, F.; BEZDETNYA, L. Relationship between subcellular localisation of Foscan s and caspase activation in photosensitised MCF-7 cells. **British Journal of Cancer**, p. 944–951, 2007.

MENYHÁRT, O.; GYOFFY, B.; BARRIOS, O.; MAGNANI, L.; SCHAFER, R.; HARAMI-PAPP, H.; SUKUMAR, S. Guidelines For The Selection of Functional Assays To Evaluate The Hallmarks of Cancer. **BBA - Reviews on Cancer**, 2016.

MOSKALUK, C. A.; HRUBAN, R. H.; KERN, S. E. Advances in Brief p16 and K-ras Gene Mutations Adenocarcinoma ' in the Intraductal Precursors of Human Pancreatic. **Cancer Research**, n. 410, p. 2140–2144, 1997.

OBEID, M.; TESNIERE, A.; FIMIA, G. M.; APETOH, L.; PANARETAKIS, T.; CASARES, N.; PERFETTINI, J.; CASTEDO, M. Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. **Nature Medicine**, v. 13, n. 1, p. 54–61, 2007.

OBERSTEIN, P. E.; OLIVE, K. P. Pancreatic cancer : why is it so hard to treat ? **Therapeutic Advances in Gastroenterology**, p. 321–337, 2013.

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

ORMOND, A. B.; FREEMAN, H. S. Dye Sensitizers for Photodynamic Therapy. **Materials**, p. 817–840, 2013.

OROZCO, S.; YATIM, N.; TRAN, H.; GUNJA, S. Y.; TAIT, S. W. G.; ALBERT, M. L.; OBERST, A. RIPK1 both positively and negatively regulates RIPK3 oligomerization and necroptosis. **Cell Death and Differentiation** v. 21, n. 10, p. 1511–1521, 2014.

PETRIE, E. J.; HILDEBRAND, J. M.; MURPHY, J. M.; PETRIE, E. J.; HILDEBRAND, J. M.; MURPHY, J. M. Insane in the membrane: a structural perspective of MLKL function in necroptosis. **Immunology & Cell Biology**, n. October, p. 1–31, 2017.

PINTO, J. G.; MARTINS, J. F. de S.; PEREIRA, A. H. C.; MITTMANN, J.; RANIERO, L. J.; FERREIRA-STRIXINO, J. Evaluation of methylene blue as photosensitizer in promastigotes of *Leishmania major* and *Leishmania braziliensis*. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 18, p. 325–330, 2017.

PRATES, R. A.; ERIQUES, G.; YAMADA, A. M.; SUZUKI, L. C.; PAULA, C. R.; RIBEIRO, M. S. Light Parameters Influence Cell Viability in Antifungal Photodynamic Therapy in a Fluence and Rate Fluence-Dependent Manner. **Laser Physics**, v. 19, n. 5, p. 1038–1044, 2009.

QUARATO, G.; GUY, C. S.; GRACE, C. R.; FRASE, S.; MOLDOVEANU, T.; GREEN, D. R.; QUARATO, G.; GUY, C. S.; GRACE, C. R.; LLAMBI, F.; NOURSE, A.; RODRIGUEZ, D. A.; WAKEFIELD, R.; FRASE, S.; MOLDOVEANU, T.; GREEN, D. R. Sequential Engagement of Distinct MLKL Phosphatidylinositol-Binding Sites Executes Necroptosis. **Molecular Cell**, v. 61, n. 4, p. 589–601, 2016.

REGINATO, E.; WOLF, P.; HAMBLIN, M. R. Immune response after photodynamic therapy increases anti- cancer and anti-bacterial effects. **World Journal of Immunology**, v. 4, n. 1, p. 1–11, 2014.

RHIM, A. D.; MIREK, E. T.; AIELLO, N. M.; MAITRA, A.; JENNIFER, M.; MCCALLISTER, F.; REICHERT, M.; BEATTY, G. L.; ANIL, K.; VONDERHEIDE,

R. H.; LEACH, S. D.; STANGER, B. Z. EMT and dissemination precede pancreatic tumor formation. **Cell**, v. 148, p. 349–361, 2012.

ROACH, H. I.; CLARKE, N. M. Physiological cell death of chondrocytes in vivo is not confined to apoptosis. New observations on the mammalian growth plate. **The Journal of bone and joint surgery. British volume**, v. 82, n. 4, p. 601–613, 2000.

ROS, U.; PEN, A.; KUNZENDORF, U.; KRAUTWALD, S.; WONG, W. W.; GARCI, A. J.; HA, K. Necroptosis Execution Is Mediated by Plasma Membrane Nanopores Independent of Calcium Article Necroptosis Execution Is Mediated by Plasma Membrane Nanopores Independent of Calcium. **CellReports**, v. 19, p. 175–187, 2017.

SAMULITIS, B. K.; POND, K. W.; POND, E.; CRESS, A. E.; PATEL, H.; WISNER, L.; PATEL, C.; DORR, R. T.; LANDOWSKI, T. H. Gemcitabine resistant pancreatic cancer cell lines acquire an invasive phenotype with collateral hypersensitivity to histone deacetylase inhibitors. **Cancer Biology & Therapy**, v. 16, n. January, p. 43–51, 2015.

SANTOS, A. F.; TERRA, L. F.; WAILEMANN, R. A. M.; OLIVEIRA, T. C.; GOMES, V. D. M.; MINEIRO, M. F.; MEOTTI, F. C.; BRUNI-CARDOSO, A.; BAPTISTA, M. S.; LABRIOLA, L. Methylene blue photodynamic therapy induces selective and massive cell death in human breast cancer cells. **BMC Cancer**, p. 1–15, 2017.

SANTUS, R.; KOHEN, C.; KOHEN, E.; REYFTMANN, J. P.; MORLIERE, P.; DUBERTRET, L.; TOCCI, P. M. Permeation of Lysosomal Membranes in the Course of Photosensitization With Methylene Blue and Hematoporphyrin: Study By Cellular Microspectrofluorometry. **Photochemistry and Photobiology**, v. 38, n. 1, p. 71–77, 1983.

SEGUCHI, K.; KAWAUCHI, S.; MORIMOTO, Y.; ARAI, T.; ASANUMA, H.; HAYAKAWA, M.; KIKUCHI, M. Critical Parameters in the Cytotoxicity of Photodynamic Therapy Using a Pulsed Laser. **Lasers in Medical Science**, p. 265–271, 2002.

SESHADRI, M.; BELLNIER, D. A.; VAUGHAN, L. A.; SPERNYAK, J. A.; FOSTER, T. H.; HENDERSON, B. W. Light Delivery Over Extended Time Periods Enhances the Effectiveness of Photodynamic Therapy. **Clinical Cancer Research**, v. 14, n. 9, p. 2796–2805, 2008.

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

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer Statistics , 2017. **CA: A**

Cancer Journal for Clinicians, v. 67, n. 1, p. 7–30, 2017.

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

SILVA, C. S. H. A. da; LUCAS, S. F. L. M.; NAKATSU, É.; DE MORICZ, A.; SILVA, R. A.; PACHECO JR, A. M.; DE CAMPOS, T. Adenocarcinoma de pâncreas em paciente jovem: relato de caso Young patient with adenocarcinoma of pancreas : case report. v. 56, n. 1, p. 36–39, 2011.

STOCKWELL, B. R.; ANGELI, J. P. F.; BAYIR, H.; BUSH, A. I.; CONRAD, M.; DIXON, S. J.; FULDA, S.; GASCO, S.; HATZIOS, S. K.; KAGAN, V. E.; NOEL, K.; JIANG, X.; PARK, J.; RAN, Q.; ROSENFELD, C. S.; SALNIKOV, K.; TANG, D.; TORTI, F. M.; TORTI, S. V; LINKERMANN, A.; TOYOUKUNY, S.; MURPHY, M. E.; OVERHOLTZER, M.; OYAGI, A.; PAGNUSSAT, G. C.; WOERPEL, K. A.; ZHANG, D. D. Primer Ferroptosis: A Regulated Cell Death Nexus Linking Metabolism , Redox Biology , and Disease. **Cell**, v. 171, p. 273–285, 2017.

STOLZENBERG-SOLOMON, R. Z.; CROSS, A. J.; SILVERMAN, D. T.; SCHAIRER, C.; THOMPSON, F. E.; KIPNIS, V.; SUBAR, A. F.; HOLLENBECK, A.; SCHATZKIN, A.; SINHA, R. Meat and meat-mutagen intake and pancreatic cancer risk in the NIH-AARP cohort. **Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention**, v. 16, n. 12, p. 2664–2675, 2007.

STRIMPAKOS, A.; SAIF, M. W.; SYRIGOS, K. N. Pancreatic cancer: from molecular pathogenesis to targeted therapy. **Cancer metastasis reviews**, v. 27, n. 3, p. 495–522, 2008.

SUN, X.; YIN, J.; STAROVASNIK, M. A.; FAIRBROTHER, W. J.; DIXIT, V. M. Identification of a Novel Homotypic Interaction Motif Required for the Phosphorylation of Receptor-interacting Protein (RIP) by RIP3 *. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 11, p. 9505–9511, 2002.

TARDIVO, J. P.; GIGLIO, A. Del; OLIVEIRA, C. S. de; GABRIELLI, D. S.; JUNQUEIRA, H. C.; TADA, D. B.; SEVERINO, D.; TURCHIELLO, R. de T.; BAPTISTA, M. S. Methylene blue in photodynamic therapy: From basic mechanisms to clinical applications. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 1000, p. 175–191, 2005.

TRIESSCHEIJN, M.; BAAS, P.; SCHELLENS, J. H. M.; STEWART, F. a. Photodynamic therapy in oncology. **Oncologist**, v. 11, n. 9, p. 1034–44, 2006.
UENO, H.; KOSUGE, T.; MATSUYAMA, Y.; YAMAMOTO, J.; NAKAO, A.; EGAWA, S.; DOI, R.; MONDEN, M.; HATORI, T.; TANAKA, M.; SHIMADA, M.; KANEMITSU, K. A randomised phase III trial comparing gemcitabine with surgery-only in patients with resected pancreatic cancer : Japanese Study Group

of Adjuvant Therapy for Pancreatic Cancer. **British Journal of Cancer**, v. 101, n. 6, p. 908–915, 2009.

VANDENABEELE, P.; GALLUZZI, L.; BERGHE, T. Vanden; KROEMER, G. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. **Nature Publishing Group**, v. 11, n. 10, p. 700–715, 2010.

VERCAMMEN, B. D.; BEYAERT, R.; DENECKER, G.; GOOSSENS, V.; LOO, G. Van; DECLERCQ, W.; GROOTEN, J.; FIERS, W.; VANDENABEELE, P. Inhibition of Caspases Increases the Sensitivity of L929 Cells to Necrosis Mediated by Tumor Necrosis Factor. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 187, n. 9, p. 1477–1485, 1998.

VIGNION-DAWALLE, A.-S.; BAERT, G.; THECUA, E.; VICENTINI, C.; MORTIER, L.; MORDON, S. Journal of Photochemistry & Photobiology , B: Biology Photodynamic therapy for actinic keratosis: Is the European consensus protocol for daylight PDT superior to conventional protocol for Aktelite CL 128 PDT? **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**, v. 174, n. July, p. 70–77, 2017.

VITA, F. De; VENTRIGLIA, J.; FEBBRARO, A.; LATERZA, M. M.; FABOZZI, A.; SAVASTANO, B.; PETRILLO, A.; DIANA, A.; GIORDANO, G.; TROIANI, T.; CONZO, G.; GALIZIA, G.; CIARDIELLO, F.; ORDITURA, M. NAB-paclitaxel and gemcitabine in metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC): from clinical trials to clinical practice. **BMC Cancer**, p. 1–8, 2016.

WANG, K. Molecular mechanisms of hepatic apoptosis. **Cell Death and Disease**, v. 5, n. 1, p. e996-10, 2014.

XIE, Y.; HOU, W.; SONG, X.; YU, Y.; HUANG, J.; SUN, X.; KANG, R.; TANG, D. Ferroptosis: process and function. **Cell Death and Differentiation**, v. 23, p. 369–379, 2016.

YANG, H.; MA, Y.; CHEN, G.; ZHOU, H.; YAMAZAKI, T.; KLEIN, C.; PIETROCOLA, F.; VACCHELLI, E.; SOUQUERE, S.; ZITVOGEL, L.; KEPP, O.; KROEMER, G.; KLEIN, C.; PIETROCOLA, F.; VACCHELLI, E.; SOUQUERE, S.; SAUVAT, A.; ZITVOGEL, L.; KEPP, O.; KROEMER, G. Contribution of rip3 and mlkl to immunogenic cell death signaling in cancer chemotherapy. **Oncolmmunology**, n. March, 2016.

YILMAZ, O.; KESER, S.; TUZCU, M.; GUVENC, M.; CETINTAS, B.; IRTEGUN, S.; TASTAN, H.; SAHIN, K. A Practical HPLC Method to Measure Reduced (GSH) and Oxidized (GSSG) Glutathione Concentrations in Animal Tissues. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 8, p. 343–347, 2009.

ZEITOUNI, D.; PYLAYEVA-GUPTA, Y.; DER, C. J.; BRYANT, K. L. KRAS

mutant pancreatic cancer: No lone path to an effective treatment. **Cancers**, v. 8, n. 4, p. 1–22, 2016.

ZENI, L. B.; RUSSI, R. F.; FIALHO, A. F.; LUIZA, A.; FONSECA, P.; SOMBRIO, L. S.; ROCHA, I. C. Morbidade e mortalidade do tratamento cirúrgico dos tumores do pâncreas. v. 27, n. 4, p. 275–279, 2014.

ZHAO, J.; JITKAEW, S.; CAI, Z.; CHOKSI, S.; LI, Q.; LUO, J.; LIU, Z.-G. Mixed lineage kinase domain-like is a key receptor interacting protein 3 downstream component of TNF-induced necrosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 14, p. 5322–5327, 2012. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1200012109>>.

ANEXOS

Nome: Daria Raquel Queiroz de Almeida

1) Formação

Ano	Título ou atividade	Instituição
2005-2008	Graduação Licenciatura em Biologia	Universidade Estadual Vale do Acaraú- UVA
2010-2015	Graduação Bacharelado em Ciências Biológicas	Universidade do Estado do Rio Grande do Norte - UERN

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

2016 - Atual: Universidade de São Paulo - Vínculo: Estudante de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Bioquímica. Bolsista CAPES.

1. **2010-2015:** Universidade do Estado do Rio Grande do Norte – UERN – Vínculo: Estudante de Graduação. Bolsista de Iniciação Científica - CNPq.

2. **2013-2014:** *Scholarship*, University of Alberta (UofA) – Graduação Sanduiche – Programa Ciência Sem Fronteiras – CAPES. Edmonton, Canadá.

3. **2014:** Internship no Departamento de Química da University of Alberta, com o grupo “Molecular Recognition in Confined Environments” (4 meses), Edmonton, Canadá.

4. **2013:** Curso de curta duração em Sistemas Antioxidantes e Sinalização Redox em Plantas. (Carga horária: 12h), Universidade do Estado do Rio Grande do Norte, UERN, Brasil.

5. **2013:** Curso de curta duração em Princípios Cromatografia de Proteínas. (Carga horária: 8h). Universidade do Estado do Rio Grande do Norte, UERN, Brasil.

6. **2012-2013:** Universidade do Estado do Rio Grande do Norte – UERN – Vínculo: Bolsista monitora de Bioquímica Molecular do Programa Institucional de Monitorias.

7. **2012:** Curso de curta duração em Fundamentos da Experimentação em Bioquímica. (Carga horária: 8h). Universidade do Estado do Rio Grande do Norte, UERN, Brasil.

8. **2015-2008:** Universidade Estadual Vale do Acaraú – UVA - Estudante de Graduação.

- 3) **Lista de até 10 resultados de pesquisa mais relevantes, podendo ser artigos científicos, capítulos de livros, patentes (solicitadas ou concedidas), softwares registrados ou outros tipos de publicações que considere estarem entre as 10 mais relevantes de sua carreira.**

3.1. Resumos publicados em anais de congressos:

MOTA, T. R., MIRANDA, C. B. F., OLIVEIRA, F. F. M., ALBUQUERQUE, C. C., VERAS, D. M., **ALMEIDA, D. R. Q.**, ARAÚJO-FILHO, J. H. , MARTINS, T. F.; In Vitro Antibacterial Effect of Essential Oils Against *Staphylococcus aureus*. In: XIII Reunião Regional do Nordeste da SBBq - VI International Symposium in Biochemistry of Macromolecules and Biotechnology, 2016, Fortaleza-CE.

ALMEIDA, D. R. Q; dos Santos, A.F.; WAILEMANN, R. A. M.; TERRA, L. F.; OLIVEIRA, T. C.; GOMES, V. M.; BAPTISTA, M. S.; LABRIOLA, L. Photodynamic Therapy Induces Significant Cell Death of Human Pancreatic Cancer Cells. In: XLVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2017, Águas de Lindóia. XLVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2017.

2. Artigo submetido:

Submission to ChemComm - manuscript (CC-COM-02-2018-001390)

ChemComm <onbehalf@manuscriptcentral.com>
to me

Feb 17 (13 days ago)

17-Feb-2018

Dear Miss Almeida:

Reverse Transcription Lesion-Induced DNA Amplification: An Instrument-Free Isothermal Method to Detect RNA (CC-COM-02-2018-001390)

The above manuscript has recently been submitted to ChemComm, published by the Royal Society of Chemistry. You have been listed as a co-author for this manuscript by the submitting author, Ms B. Safeenaz Alladin-Mustan, and an account has therefore been generated for you in our online submission system.

You can check the status of papers you have authored/co-authored and edit your personal information and contact preferences by logging into your account:

Access your account here: <https://mc.manuscriptcentral.com/chemcomm>
USER ID: queirozd@ualberta.ca
Password: https://mc.manuscriptcentral.com/chemcomm?URL_MASK=51bed59fb4e34c4ea14f419bee1256ea

Please note, your user ID and password are the same for all Royal Society of Chemistry journals.

Please link your ORCID ID to your account. To create a new ORCID ID record or to link your user account to an existing ORCID ID, simply click this link: https://mc.manuscriptcentral.com/chemcomm?URL_MASK=210b966f487247119db703c4e8e309f3

If you already have an account with the Royal Society of Chemistry registered to a different email address, please contact us at chemcomm@rsc.org and we will combine your accounts.

If you have any questions regarding this submission or your account, please contact the editorial office.

Yours sincerely,

ChemComm Editorial Office
chemcomm@rsc.org



ScholarOne Manuscripts™ Daria Almeida ▾ Instructions & Forms Help Log Out

 **ChemComm**

[# Home](#) [Author](#)

[Author Dashboard](#)

Author Dashboard

- 1 Manuscripts I Have Co-Authored** >
- [Start New Submission](#) >
- [5 Most Recent E-mails](#) >

Manuscripts I Have Co-Authored

Manuscript status explanation:

1. **Checking submission and files** - we are checking to see if your submission is complete and we have all the files we need.
2. **Initial assessment** - manuscript is undergoing [initial assessment](#).
3. **With editor** - manuscript is with the editor, either to select new or additional reviewers, or to make a decision following initial assessment or peer review.
4. **In peer review** - manuscript has been sent to reviewers.
5. **Accepted** - manuscript has been accepted for publication.

Please note that manuscripts can move back and forth between status 3 and 4.

STATUS	ID	TITLE	CREATED	SUBMITTED
In peer review	CC-COM-02-2018-001390	Reverse Transcription Lesion-Induced DNA Amplification: An Instrument-Free Isothermal Method to Detect RNA View Submission Submitting Author: Alladin-Mustan, B. Safeenaz	17-Feb-2018	20-Feb-2018