

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA

PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
ÁREA: IMUNOLOGIA E DOENÇAS INFECTO-PARASITÁRIAS

Álvaro Carneiro de Souza

**AVALIAÇÃO ANTITUMORAL DA TERAPIA FOTODINÂMICA
COM AZUL DE METILENO EM CÉLULAS NEOPLÁSICAS
MAMÁRIAS**

Defesa de Dissertação de Mestrado

JUIZ DE FORA
2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA

Álvaro Carneiro de Souza

**AVALIAÇÃO ANTITUMORAL DA TERAPIA FOTODINÂMICA
COM AZUL DE METILENO EM CÉLULAS NEOPLÁSICAS
MAMÁRIAS**

Dissertação de Mestrado do
Curso de Pós-Graduação em
Ciências Biológicas: Área:
Imunologia e Doenças Infecto-
Parasitárias, para obtenção do
Título de Mestre em Ciências
Biológicas: Área: Imunologia e
Doenças Infecto-Parasitárias.

Orientadora: Prof. Dr^a Flávia de
Paoli

JUIZ DE FORA
2022

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Carneiro de Souza, Álvaro.

AVALIAÇÃO ANTITUMORAL DA TERAPIA FOTODINÂMICA COM AZUL DE METILENO EM CÉLULAS NEOPLÁSICAS MAMÁRIAS / Álvaro Carneiro de Souza. -- 2022.

71 p. : il.

Orientadora: Flávia de Paoli

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2022.

1. Terapia fotodinâmica. 2. Laser de baixa potência. 3. Célula neoplásica da mama. 4. Azul de metileno. I. de Paoli, Flávia, orient. II. Título.

ÁLVARO CARNEIRO DE SOUZA

**AVALIAÇÃO ANTITUMORAL DA TERAPIA FOTODINÂMICA COM AZUL DE METILENO EM CÉLULAS
NEOPLÁSICAS MAMÁRIAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Imunologia & DIP/Genética & Biotecnologia - da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas. Área de concentração: Imunologia e Doenças Infectoparasitárias.

Aprovada em 29 de julho de 2022.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Flávia de Paoli - Orientadora

Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof^o Dr. Vinicius Novaes Rocha

Universidade Federal de Juiz de Fora

Dr. Luiz Philippe da Silva Sergio

Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Juiz de Fora, 25/07/2022.



Documento assinado eletronicamente por **Luiz Philippe da Silva Sergio, Usuário Externo**, em 30/07/2022, às 09:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Flavia de Paoli, Professor(a)**, em 01/08/2022, às 08:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Vinicius Novaes Rocha, Professor(a)**, em 02/08/2022, às 07:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-U f (www2.ufjf.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **0881980** e o código CRC **3E2F6B30**.

RESUMO

A terapia fotodinâmica (TFD) é uma alternativa de tratamento para o câncer de mama, demonstrando seletividade e importante citotoxicidade aos tecidos malignos. Este tipo de terapia envolve o uso de dois componentes não tóxicos: uma substância fotossensibilizante e uma fonte de luz (como lasers de baixa potência). Em combinação, eles podem induzir efeitos celulares e teciduais por meio de processos dependentes de oxigênio, levando as células tumorais à morte por necrose, apoptose e autofagia. Assim, o objetivo foi avaliar a atividade antitumoral da terapia fotodinâmica utilizando células tumorais mamárias em modelos experimentais *in vitro*. A linhagem celular de tumor de mama 4T1 foi cultivada em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de antibiótico a 37°C e 5% de CO₂. O azul de metileno (AM) foi dissolvido em meio RPMI nas concentrações 5, 10, 15, 20, 25, 50, 100 e 150 µM, filtrado e as células foram incubadas durante 30 min a 37°C. Logo após esse período de incubação, a solução de AM foi removida, as placas lavadas e um novo meio RPMI adicionado. A irradiação foi realizada com laser vermelho de baixa potência (660nm - AsGaAl), perpendicularmente e pontualmente, nos seguintes parâmetros: potência 100mW, densidade de energia 100 Jcm⁻², energia por ponto 2,8 J, modo de emissão de luz contínua e tempo de exposição 28s. Após a irradiação, viabilidade celular foi testada através de MTT, a migração celular foi realizada pelo método *wound healing* e níveis relativos de mRNA através de *real time* PCR. Os resultados de viabilidade celular indicam que as concentrações de AM de 5 a 50 µM não foram tóxicas para as células 4T1, enquanto as concentrações de 100 e 150 µM apresentaram citotoxicidade. Por outro lado, células 4T1 incubadas com AM e irradiadas com laser de baixa potência apresentaram redução da viabilidade e na migração celular na concentração de 50 µM. Níveis relativos de mRNA para caspase-6 não foram alterados nos tratamentos testados; já os níveis para Bcl-2 foram reduzidos após TFD 25 µM. Em conclusão, concentrações superiores a 100 µM de AM no tempo de incubação de 30 min geram efeitos citotóxicos nas células, reduzindo a viabilidade. Concentração de 50 µM demonstrou diminuição na viabilidade e migração celular após a TFD, indicando uma boa dose-resposta do tratamento para esse tipo de célula.

Palavras-chave: Terapia fotodinâmica. Laser de baixa potência. Célula neoplásica da mama. Azul de metileno.

ABSTRACT

Photodynamic therapy (PDT) is an alternative treatment for breast cancer, demonstrating selectivity and important cytotoxicity to malignant tissues. Such therapy involves the use of two non-toxic components: a photosensitizing substance and a light source (such as low-power lasers). In combination, they can induce cellular and tissue effects through oxygen-dependent processes, leading tumor cells to death by necrosis, apoptosis and autophagy. Thus, the objective was to evaluate the antitumor activity of photodynamic therapy using breast tumor cells in experimental models *in vitro*. 4T1 breast tumor cell line was cultured in RPMI medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 1% antibiotic at 37°C and 5% CO₂. Methylene blue (MB) was dissolved in RPMI medium at concentrations 5, 10, 15, 20, 25, 50, 100 and 150 µM, filtered and the cells were incubated for 30 min at 37°C. Shortly after this incubation period, the MB solution was removed, the plates washed and a new RPMI medium added. Irradiation was performed with a low power red laser (660nm - AsGaAl), perpendicularly and punctually, in the following physical parameters: power 100mW, energy density 100 Jcm⁻², energy per spot 2.8 J, continuous light emission mode and exposure time 28s. After irradiation, cell viability was tested by MTT, cell migration was performed by wound healing method and mRNA relative levels by real time PCR. Cell viability results indicate that MB concentrations from 5 to 50 µM were not toxic to 4T1 cells, while concentrations of 100 and 150 µM showed cytotoxicity. On the other hand, 4T1 cells incubated with MB and irradiated with low power laser showed reduced viability and cell migration at 50 µM concentration. Caspase-6 mRNA relative level was not altered in the treatments tested; Bcl-2 mRNA relative level was reduced after PDT 25 µM. In conclusion, concentrations up to 100 µM and 30 min of incubation time generate cytotoxic effects on cells, reducing viability. Concentration of 50 µM demonstrated a decrease in cell viability and migration after PDT, indicating a good dose-response treatment for this cell type.

Keyword: Photodynamic therapy. Low-power red laser. Breast tumor cell. Methylene blue.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química do Azul de Metileno -----	p. 17
Figura 2 - Espectro eletromagnético -----	p. 20
Figura 3 - Reações do tipo I e II -----	p. 21
Figura 4 - Imunoterapia tumoral da TFD -----	p. 24
Figura 5 - Mecanismo de ação da PDT pelo MB localizado na mitocôndria_____	p. 27
Figura 6 - Mecanismo de ação das vias apoptóticas na morte celular induzida por TFD _____	p. 28
Figura 7 - Viabilidade das células 4T1 após a incubação com o fotossensibilizador (FS) azul de metileno (AM) nos tempos de 10 e 15 min respectivamente _____	p. 40
Figura 8 - Viabilidade das células 4T1 após a incubação com o fotossensibilizador (FS) azul de metileno (AM) no tempo de 30 min seguida de irradiação com laser de baixa potência-----	p. 41
Figura 9 - Imagens representativas do ensaio de migração das células 4T1 nos tempos de 0h, 24h, 48h e 72h -----	p. 42
Figura 10 - Quantificação (média \pm SD) das áreas no ensaio de migração das células 4T1 nos tempos de 0h, 24h e 48h -----	p. 43
Figura 11 - Níveis relativos de mRNA de BCL-2 após a incubação com o fotossensibilizador (FS) azul de metileno (AM) no tempo de 30 min + TFD _____	p. 44
Figura 12 - Níveis relativos de mRNA de caspase-6 após a incubação com o fotossensibilizador (FS) azul de metileno (AM) no tempo de 30 min + TFD _____	p.44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Descoberta e primeiras aplicações da Terapia Fotodinâmica (TFD) _____	p. 13
Tabela 2 - Fotossensibilizadores comumente usados na clínica e em estudos pré-clínicos _____	p. 15
Tabela 3 - Aplicabilidade do uso do Azul de metileno-----	p.18
Tabela 4 - Parâmetros físicos do laser -----	p. 34
Tabela 5 - Primers utilizados para real time PCR -----	p. 38

SIGLAS

AATs-----	Antígenos Associados a Tumor
AM-----	Azul de Metileno
AMPc-----	Adenosina Monofosfato Cíclico
APAF-----	Fator Ativador de Protease Apoptótico
ATP-----	Adenosina Trifosfato
CRT-----	Calreticulina
EROs-----	Espécies Reativas de Oxigênio
EUA-----	Estados Unidos da América
FCE-----	Fator de Crescimento Epidérmico
FDA-----	Food and Drug Administration
FIA-----	Fator Indutor de Apoptose
FS-----	Fotossensibilizador
HpD-----	Hematoporphyrinderivative
IAPs-----	Inibidor de Proteínas de Apoptose
INCA-----	Instituto Nacional do Câncer
MCI-----	Morte Celular Imunogênica
MHC-----	Complexo Principal de Histocompatibilidade
NCCN-----	National Comprehensive Cancer Network
OMS-----	Organização Mundial da Saúde
PMADs-----	Padrões Moleculares Associados a Danos
RB-----	Rosa de Bengala
RE-----	Retículo Endoplasmático
SMAC-----	Segundo Ativador de Caspases Derivado da Mitocôndria
TFD-----	Terapia Fotodinâmica
ZnPc-----	Zinco Ftalocianina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	p. 9
1.1 Terapias para tratamento de câncer de mama	p. 11
1.2 Terapia Fotodinâmica (TFD)	p. 12
1.3 Fotossensibilizadores (FS)	p. 14
1.3.1 Azul de Metileno (AM)	p. 16
1.4 Princípios celulares da terapia fotodinâmica	p. 19
1.5 Principais mecanismos de mortes induzidas pela TFD	p. 25
1.5.1 Apoptose	p. 26
1.5.2 Necrose	p. 29
1.5.3 Autofagia	p. 30
2. JUSTIFICATIVA	p. 32
3. OBJETIVO	p. 33
3.1 Objetivo Geral	p. 33
3.2. Objetivos Específicos	p. 33
4. MATERIAL E MÉTODOS	p. 33
4.1 Laser de baixa potência	p. 33
4.2 Fotossensibilizador	p. 34
4.3 Modelo experimental - 4T1	p. 34
4.4 Cultura celular	p. 35
4.5 Análise de viabilidade celular	p. 36
4.6 Ensaio de migração celular	p. 36
4.7 Extração de RNA total	p. 37
4.8 Real time quantitativo PCR	p. 37
4.9 Análises estatísticas	p. 39
5. RESULTADOS	p. 39
5.1 Viabilidade celular	p. 39
5.2 Migração celular	p. 41
5.3 Expressão de genes envolvidos na apoptose	p. 43
6. DISCUSSÃO	p. 45
7. CONCLUSÃO	p. 49
8. REFERÊNCIAS	p. 49

1. INTRODUÇÃO

De acordo com o último relatório publicado pela Organização Mundial de Saúde (OMS, 2022), no ano de 2020, quase 10 milhões de pessoas morreram de câncer no mundo. Mundialmente, uma em cada seis mortes é relacionada à doença, representando cerca de 30% de todas as mortes prematuras por doenças não transmissíveis entre adultos com idade entre 30-69. Ainda de acordo com esse relatório, os cânceres diagnosticados com mais frequência no mundo foram os cânceres de mama seguido do câncer de pulmão, 2,26 e 2,21 milhões, respectivamente. É esperado que nas próximas décadas, pessoas irão à óbito mais por consequência do câncer do que por consequência de doenças comuns, como diabetes (MATHERS; LONCAR, 2006). O câncer é uma patologia multifatorial, resultante da interação entre fatores genéticos e ambientais (INCA, 2021) e apesar da maioria dos cânceres derivarem de uma célula anormal, uma única mutação não é o suficiente para causar a doença, ou seja, há a necessidade de sucessivas mutações (ALBERTS et al., 2008).

No Brasil, dados divulgados pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA) referentes ao ano de 2020 revelam que o câncer de mama nas mulheres representou 29,7% de todos os casos de cânceres diagnosticados. Esse número foi superior até ao câncer mais comum nos homens, o de próstata. Ainda segundo o INCA, no país, nesse mesmo ano, o câncer de mama representou a doença com maior taxa de mortalidade entre as mulheres, sendo confirmado um total de 17.825 óbitos.

Dentre os fatores de risco para o câncer de mama incluem-se o histórico familiar (como um dos principais), idade, menarca precoce e menopausa tardia, obesidade, tabagismo, primeira gestação a termo após os 30 anos ou nuliparidade, terapia de reposição hormonal, consumo de álcool, dieta inadequada, e o fato de ter apresentado tumor em outra mama (MCPHERSON; STEEL; DIXON, 2000). Há ainda, os fatores fisiológicos celulares, conhecidos como “Hallmarks of cancer”, autossuficiência de fatores de crescimento, insensibilidade a sinais anti-crescimento, invasão tecidual e metástase, evasão à apoptose, potencial replicativo ilimitado, angiogênese sustentada, evasão à resposta imunológica, inflamação induzida pelo tumor, instabilidade genômica,

reprogramação do metabolismo energético, desbloqueio da plasticidade fenotípica, reprogramação epigenética não mutacional, microbiomas polimórficos, e células senescentes (HANAHAN & WEINBERG, 2000; HANAHAN & WEINBERG, 2011; HANAHAN, 2022).

É inegável que os últimos 50 anos foram de grande avanço nas terapias contra o câncer, principalmente devido às terapias sistêmicas, como a quimioterapia e a imunoterapia. Essa última, inclusive, é menos prejudicial para o indivíduo, pois é específica na modulação de diferentes eventos celulares pró-morte (como por exemplo, a apoptose) nas células tumorais. Entretanto, devido às habilidades de proliferação e plasticidade, além do fenômeno conhecido como quimio-adaptação, as células tumorais consideradas "*stemness*" gradualmente se tornam resistentes aos tratamentos utilizando diferentes mecanismos celulares. Devido a isso, faz-se necessário o desenvolvimento contínuo de novas terapias para o combate do câncer (MARTINS et al., 2021).

Assim como ocorre no câncer de mama humano, o modelo biológico de tumor murino utilizando as células 4T1 é altamente tumorigênico e invasivo, podendo metastizar espontaneamente do tumor primário na glândula mamária para vários locais distantes, incluindo linfonodos, sangue, fígado, pulmão, cérebro e osso (PULASKI e OSTRAND-ROSENBERG, 1998; LELEKAKIS et al., 1999). Com isso, esse modelo animal experimental torna-se adequado para estudos comparativos com o câncer de mama humano e, graças à sua resistência à 6-tioguanina, permite a quantificação precisa de células metastáticas, mesmo quando disseminadas e em níveis sub-microscópicos em órgãos distantes (PULASKI e OSTRAND-ROSENBERG, 2001).

Ainda, devido a sua fácil manipulação *in vitro* e *in vivo*, o tumor 4T1 também vem sendo alvo de diversos estudos para testar estratégias de imunoterapia baseadas em células visando a ativação de linfócitos T CD4+ e CD8+ específicos de tumor (PULASKI e OSTRAND-ROSENBERG, 1998; PULASKI et al., 2000 a,b).

1.1 Terapias para tratamento de câncer de mama

Segundo a *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN, 2020), os tratamentos convencionais para o câncer de mama podem ser: local, sistêmico ou a combinação de ambos. A terapia local concentra-se em uma determinada área, incluindo a cirurgia, ablação ou terapia por radiação. Já a terapia sistêmica consiste em uma terapia que afeta todo o corpo, incluindo a terapia endócrina e a quimioterapia.

A cirurgia é o principal ou o primeiro tratamento para o câncer de mama invasivo, podendo antes da cirurgia ser utilizado a terapia sistêmica ou radioterapia para diminuir o tumor ou reduzir o número de células cancerosas, já a radioterapia utiliza a radiação de alta energia a partir de raios-x, raios gama ou prótons para matar células cancerosas e reduzir os tumores, podendo ser administrada isoladamente antes ou após a cirurgia, com a finalidade de retardar o crescimento do câncer (NCCN, 2020).

Ainda segundo a NCCN, (2020), com relação às terapias sistêmicas para o tratamento do câncer de mama, a primeira inclui a terapia endócrina utilizando hormônios, que consiste na redução e/ou bloqueio na produção desses, diminuindo assim o crescimento tumoral. Já o segundo tipo é a quimioterapia, a qual consiste na utilização de fármacos que induzem a morte de células com crescimento rápido, sejam células malignas (câncer) ou células normais do próprio corpo, através da alteração do DNA dessas células. Por isso, são relatados diversos efeitos colaterais em pacientes submetidos a esse tipo de terapia, incluindo perda de cabelos, alterações nas unhas, enteropatias e hipoplasia medular. Já alterações hormonais ou problemas de fertilidade (menopausa precoce ou infertilidade) também são relatados após uso dos outros tipos de terapias como a radioterapia, terapia hormonal ou remoção cirúrgica. Tais efeitos podem ser transitórios ou permanentes.

Muitas vezes esses efeitos colaterais das terapias convencionais podem superar qualquer benefício clínico num paciente com um estado de saúde comprometida. Por isso, novas terapias de combate ao câncer são testadas diariamente no mundo. Dentre elas, a terapia fotodinâmica (TFD) tem se destacado, especialmente nos Estados Unidos da América (EUA) e Europa,

onde já são aprovados diversos fotossensibilizadores utilizados nesse tipo de terapia no tratamento de determinados tipos de câncer (NATH; OBAID; HASAN, 2019).

1.2 Terapia Fotodinâmica (TFD)

Terapias utilizando a irradiação com luz foram descritas em diversas civilizações do antigo Egito, Índia e China contra doenças, como psoríase, vitiligo e câncer de pele (ACKROYD et al., 2001). No século passado, vários cientistas também descobriram que a combinação da luz com certos produtos químicos pode induzir a morte celular (tabela 1), e por isso a TFD passou a ser considerada uma boa opção clínica para o tratamento do câncer. A TFD é uma terapia bem documentada e em evolução. É uma terapia levemente invasiva que combina um fotossensibilizador (FS) e um comprimento de onda específico de irradiação de luz para gerar espécies reativas de oxigênio (EROs) intracelulares capazes de desencadear uma sequência de eventos que culminam na morte das células tumorais (GUNAYDIN; GEDIK; AYAN, 2021). O comprimento de onda da luz irá depender diretamente das características químicas do FS utilizado (ALZEIBAK et al., 2021). As bandas de absorção em comprimentos de onda curtos (inferiores a 600 nm) possui uma menor capacidade de penetração no tecido, sendo mais propensas a causar fotossensibilidade da pele, já as bandas de absorção em comprimentos de onda mais elevados (superiores à 800 nm) não são capazes de gerar oxigênio singlete, uma vez que seus fótons não terão energia suficiente para o estado tripleto do PS transferir energia para a molécula de oxigênio (CASTANO et al., 2004). TFD atualmente também é usada para tratar algumas doenças autoimunes (RKEIN; OZOG, 2014) e doenças infecciosas (CIEPLIK et al., 2018; OLIVEIRA *et al.*, 2019). Além disso, recentemente, uma nova classe de PS foi aprovada pelo governo japonês para o tratamento de células tumorais avançadas ou recorrentes na cabeça e no pescoço. Este é o primeiro FS conjugado a um anticorpo aprovado para uso (GOMES-DA-SILVA et al., 2020).

Essa nova geração de FS conjugados a anticorpos permite uma maior seletividade da TFD no tratamento das células tumorais, já que eles se ligam

especificamente a receptores superexpressos em células tumorais (direcionamento ativo), levando a uma melhor internalização. Com isso, as principais limitações da TFD atualmente, que são a dificuldade de administração sistêmica, pouca especificidade e baixo acúmulo dos FS nas células-alvo, passam a ser superadas (GOMES-DA-SILVA et al., 2020). Além dessas dificuldades, vale ressaltar que graças à proliferação excessiva de células tumorais e, muitas vezes, ao fornecimento insuficiente de sangue aos tumores, o conteúdo de O₂ nos tumores é gravemente insuficiente, em especial em seu interior, resultando em uma redução da eficácia da TFD (HU *et al.*, 2021).

Ano	Fotossensibilizador (FS)	Descoberta
1900-1903	Corante vermelho de acridina	Na Alemanha, Oscar Raab e Hermann von Tappeiner descobriram toxicidade do corante quando exposto a luz em colônias de Protozoários (Infusórios), vinculando esse fenômeno à transferência de energia luminosa para o corante, semelhante à fotossíntese.
1907		Dr. Jodlbauer e o Dr. Tappeiner provaram que o desenvolvimento das reações fotodinâmicas requer a presença de oxigênio em seu meio.
1948	Porfirinas	Figge demonstrou que porfirinas injetadas podem se acumular seletivamente em tumores murinos. Nesses anos, surgiram possibilidades de usar porfirinas para detectar doenças malignas no corpo.
1955	Hematoporfirinas	Schwartz obteve uma mistura purificada de hematoporphyrinderivative (HpD), a primeira geração de fotossensibilizadores.
1978	HpD	Thomas Dougherty (<i>Roswell Park Cancer Institute</i> , Buffalo, New York, EUA) usou o HpD para tratar tumores de várias localizações.
1980	Photofrin®	Dougherty sintetizou a partir do HpD a droga Photofrin®, uma mistura de oligômeros de hematoporfirina conectados uns aos outros por ligações éster e éster complexo. Ao mesmo tempo, substâncias análogas a Photofrin® foram obtidas em diferentes países, incluindo Photosan (Alemanha), Photogem (Rússia), Hiporfin e Deuteporfin.
>1981	Novas gerações de fotossensibilizadores estão surgindo até os dias atuais.	A partir da década de 80 houve um rápido desenvolvimento da TFD, com o surgimento de novos medicamentos e recursos para sua aplicação. FS de diferentes naturezas químicas estão sendo desenvolvidos a cada ano e as áreas de aplicação da TFD estão se expandindo: terapia anticâncer, acne, terapia antimicrobiana, psoríase, aterosclerose, herpes e degeneração macular relacionada à idade.

Tabela 1. Descoberta e primeiras aplicações da Terapia Fotodinâmica (TFD). Adaptado de Alzeibak e col. 2021.

1.3 Fotossensibilizadores (FS)

Idealmente, as características que os FS devem exibir para um bom resultado da TFD é uma forte absorção de luz de comprimento de onda específico e não serem tóxicos quando não expostos à luz, especificidade ao tumor, com uma retenção de longo prazo e, que ao final do tratamento possam ser removidos facilmente do corpo (JORI, 1996). Os FS mais adequados para a TFD são substâncias anfifílicas, possuindo características hidrofílicas e hidrofóbicas, as quais são ajustáveis em ambientes biológicos (HU *et al.*, 2021). A localização intracelular do PS é governada pela sua natureza química como, peso molecular, lipofilicidade, anfifilicidade, carga iônica, capacidade de ligação a proteínas, a concentração do PS, o tempo de incubação, a concentração sérica e o fenótipo da célula alvo (CASTANO, *et al.*, 2004). Os principais locais intracelulares para acúmulo dos FS incluem as mitocôndrias, os lisossomos, o retículo endoplasmático (RE), o aparelho de Golgi, a membrana plasmática ou suas combinações (ALZEIBAK *et al.*, 2021).

Em alguns casos, devido ao baixo índice de depuração de alguns FS, foi observada uma reação de fotossensibilidade na pele dos pacientes meses após a aplicação da TFD, sendo necessária a não exposição solar para esses pacientes, interferindo então em sua qualidade de vida (DETTY *et al.*, 2004; RIBEIRO *et al.*, 2005). Assim, o ideal é que a nova geração de fotossensibilizadores seja muito seletiva às células tumorais, de forma que possa ser administrada em baixas doses, minimizando possíveis efeitos colaterais que possam interferir na vida dos pacientes (DUAN *et al.*, 2016).

Os FS clinicamente aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) para TFD anticâncer são divididos em duas gerações: 1ª geração inclui o porfímero de sódio (Photofrin®), 2- (1-hexiloxietil) -2-devinil pirofeoforbeto-a, verteporfina, temoporfina, silício ftalocianina 4, porfirina, redaporfina, talaporfina, fotolon (clorina e6 (Ce6) sódio-polivinil pirrolidona), hemoporfina, padeliporfina, foto ditazina, fotosens, hiporfina, fotocianina e radaclorina, apesar de sua ampla utilização na prática clínica, demonstram absorção limitada na janela fototerapêutica e, dessa forma, tendo sua eficácia reduzida

no tratamento de lesões profundas (DONOHOE et al., 2019; LI et al., 2020). Já a 2ª geração é composta pelas ftalocianinas (zinco ftalocianina (ZnPc)), bacterioclorinas, hipericina, fenotiazinas (azul de metileno (AM) e azul de toluidina), cianinas (merocianina-540), metaloporfirinas, xantenos (rosa de Bengala (RB)) e porfíricos, porém essa geração também tem seu uso clínico dificultado pelas questões de direcionamento e estabilidade dos fotossensibilizadores. Esses FS, bem como local onde são acumulados no interior das células, estão resumidos na tabela 2.

Fotossensibilizador	Família	Geração	Localização
HpD	Porfirina	1ª	Organelas múltiplas e membrana celular
BPD	Porfirina	2ª	Mitocôndria e RE, ou vasculatura, dependendo do intervalo fotossensibilizador-luz
NPe6	Cloro	2ª	Lisossomos
Tookad	Bacterioclorina	2ª	Vasculatura tumoral
Photofrin	Porfirina	1ª	Membrana plasmática e aparelho de Golgi
Foscan	Cloro	2ª	Aparelho RE e Golgi
ZnPc	Ftalocianina	2ª	Mitocôndrias e lisossomos
ALA	Porfirina	2ª	PpIX produzida na mitocôndria, alguns se realocam para a membrana plasmática e lisossomos.
AM	Fenotiazina	2ª	Mitocôndria, retículo endoplasmático, núcleo e lisossomos.

Tabela 2. Fotossensibilizadores comumente usados na clínica e em estudos pré-clínicos. Adaptado de SORRIN e col., 2020.

Novos FS estão surgindo e uma terceira geração está em estudos (HU *et al.*, 2021), o que inclui o cetuximabe saratolacan, o primeiro FS conjugado a um anticorpo. Ele consiste no derivado de silício-ftalocianina solúvel em água, IRDye700DX (IR700), conjugado com cetuximabe. Cetuximab, que é aprovado pelo FDA, tem como alvo o receptor do fator de crescimento epidérmico (FCE), que é superexpresso em muitos tipos de câncer. Neste tratamento, após o cetuximabe saratolacan ser injetado por via intravenosa, ele se liga às células cancerosas de cabeça e pescoço que expressam altos níveis de FCE. A subsequente irradiação com luz vermelha (690 nm) leva à indução de morte celular imunogênica (MCI) em tumores e uma potente resposta imune anticâncer (GOMES-DA-SILVA *et al.*, 2020).

Entretanto, a maioria desses FS ainda não está disponível para utilização nos tratamentos de câncer no Brasil. Com isso, devido ao seu baixo custo e disponibilidade comercial e de utilização em diferentes práticas clínicas, o azul de metileno (AM) tem sido usado com segurança por décadas (GALVAN *et al.*, 2021), e tem demonstrado não gerar toxicidade no escuro, um recurso que pode aumentar a especificidade local e a segurança do tratamento em comparação com outros FS (SCHIRMER *et al.*, 2011; SANTOS *et al.*, 2017), tornando assim o TFD + AM uma alternativa barata e disponível para testes no tratamento do câncer de mama.

1.3.1 Azul de Metileno (AM)

O azul de metileno (AM) é bem conhecido por ser capaz de gerar oxigênio singlete (TUIITE; KELLY, 1993). É um químico aromático heterocíclico (figura 1) pertencente à classe de medicamentos das fenotiazinas, tem sido utilizado clinicamente há cerca de um século para uma ampla gama de tratamentos principalmente com base em suas propriedades de antissepsia e capacidade de destruir ácidos nucleicos de forma semelhante à nucleases (DUNN; LIN; KOCHEVAR, 1991; ORTH *et al.*, 1995; ATAMNA *et al.*, 2008; CONGDON *et al.*, 2012).

Suas propriedades farmacológicas permitiram que o AM fosse aplicado no tratamento de doenças como (tabela 3), metemoglobinemia, encefalopatia

induzida por ifosfamida, tratamento para malária e condições da tireoide que requerem cirurgia, tratamento de lesões bucais, em práticas odontológicas, além da utilização do MB como um PS seguro na TFD para atividade anticancerígena (TORATANI et al., 2016; LIM et al., 2013; YAMAUCHI et al., 2015; BERNDT-PAETZ et al., 2017; LIM DJ, 2021).

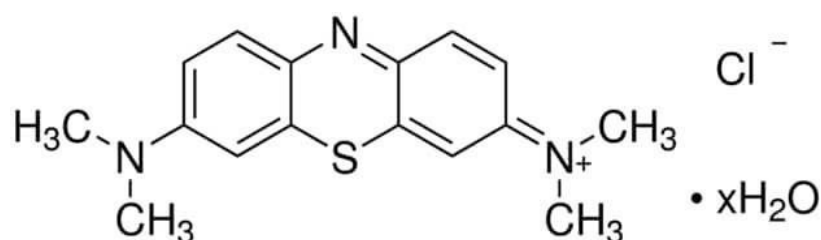


Figura 1. Estrutura química do Azul de Metileno (MERCK, 2022).

É um corante já aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) e pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) aqui no Brasil (ORMOND; FREEMAN, 2013) e cabe destacar ainda que o AM pode ser administrado no paciente por via intravenosa, intraperitoneal ou ainda de forma tópica nas células de interesse (VAN DONGEN GA et al., 2004; MOAN; PENG, 2003).

Com forte absorção na região entre 550 - 700nm e máxima absorvidade molar em 664nm (JUNQUEIRA et al., 2002), o AM promove tanto a reação fotoquímica do tipo I quanto a reação fotoquímica do tipo II (produção de oxigênio singleto) na TFD (TARDIVO et al., 2005). Estudos em humanos tem demonstrado atividade antitumoral em tumores superficiais da bexiga, carcinomas de esôfago e melanoma, sem demonstrar toxicidade para as células normais e têm sido utilizado ainda como FS em estudos clínicos para o tratamento de carcinoma de célula basal e sarcoma de Kaposi, adicionalmente, AM-TFD têm demonstrado ser efetivo no combate a tumores em camundongos e em estudos *in vitro* contra melanoma e tumor cervical de células HeLa (TARDIVO et al., 2005; LOU et al., 2008).

Indicação	Descrição
Doença de Alzheimer	Efeitos positivos são propostos através de múltiplos sistemas neurológicos, como sistemas de neurotransmissores colinérgicos, serotoninérgicos e glutamatérgicos. AM reduz o peptídeo agregado de amiloide- β (A β) enquanto previne a agregação de tau. Uma dose recomendada de 3 x 60 mg/dia para tratamento (LIM DJ, 2021).
Síndrome hepatopulmonar	Dose intravenosa de MB (3 mg por kg) para tratamento (LIM DJ, 2021).
Encefalopatia induzida por ifosfamida	Dose intravenosa de MB (6 x 50 mg/dia) para tratamento (LIM DJ, 2021).
Malária	AM tem alta potência antimalárica (IC ₅₀ = 4 nM) contra <i>Plasmodium falciparum</i> , inibindo a glutatona redutase (PfGR) conhecida como alvo de drogas contra a malária. AM é um medicamento parceiro para terapias combinadas (LIM DJ, 2021).
Metemoglobina	MB é um doador de elétrons para a redução não enzimática da metemoglobina (LIM DJ, 2021).
SARS-CoV-2	Apresenta atividade antiviral contra o COVID-19 causado pela síndrome respiratória aguda grave. Dificulta a interação de ligação entre a proteína spike SARS-CoV-2 e a enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2), conhecida como o ponto de entrada do vírus (SVYATCHENKO et al., 2021).
Odontologia	Atua no controle microbiológico da cavidade oral, diminuindo assim o uso de medicamentos (. PRAȘMO et al., 2016).
Tumores	Estudos mostram a atividade antitumoral em tumores superficiais da bexiga, carcinomas de esôfago, melanoma, tumor cervical de células HeLa e sarcomas de Kaposi (TARDIVO et al., 2005; LOU et al., 2008; LIM et al., 2013; YAMAUCHI et al., 2015; TORATANI et al., 2016; BERNDT-PAETZ et al., 2017).
Vírus, bactérias e fungos	O controle do crescimento microbiano por MB+TFD deriva de uma mistura de processos tipo I e tipo II, e a eficiência relativa de cada um deles depende do tipo de célula e das condições experimentais (TARDIVO et al., 2005; . PRAȘMO et al., 2016; CAMACHO-ALONSO et al., 2017).
Dermatologia de pacientes não cancerosos	A TFD para o tratamento de lesões pré-câncer e câncer cutâneos, bem como de afecções cutâneas benignas revelaram-se eficazes (TARDIVO et al., 2005; RKEIN; OZOG, 2014; ISSA; BOECHAT; FASSINI, 2016).

Tabela 3. Aplicabilidade do uso do Azul de metileno.

1.4 Princípios celulares da terapia fotodinâmica

Dois mecanismos de fotobiomodulação por laser de baixa potência estão envolvidos durante a interação da luz com os tecidos biológicos (sem FS). Um é a aceleração da transferência de elétrons na cadeia respiratória da mitocôndria, o outro é a produção de pequenas quantidades de EROs induzidas pela absorção de luz, principalmente pelo citocromo c oxidase, acelerando a produção de adenosina trifosfato (ATP) e proliferação celular (KARU; KOLYAKOV, 2005; PASSARELLA; KARU, 2014). A energia do fóton emitida pelo laser pode ser absorvida pelos componentes da cadeia respiratória mitocondrial, resultando em níveis aumentados de EROs, ATP e/ou adenosina monofosfato cíclico (AMP). Esse aumento inicia uma cascata de sinalização intracelular através de segundo mensageiro e fatores de transcrição, promovendo assim a proliferação celular, síntese de proteínas e controle da apoptose (KUSHIBIKI et al., 2013).

Atribuem-se os resultados clínicos positivos em terapias baseadas em lasers à uma sequência de eventos em nível molecular e celular, nas quais os fatores determinantes na resposta fotoquímica, fotofísica e/ou fotobiológica são o comprimento de onda, a intensidade, a dose, a concentração de cromóforos ativos e as propriedades ópticas (reflexão, transmissão, absorção, espalhamento e anisotropia) do tecido tratado, bem como o seu estado fisiológico (KARU, 1998; KARU, 2003).

A luz mais comumente utilizada na TFD com azul de metileno possui um comprimento de onda específico que coincide com a banda de absorção de comprimento de onda mais longa do fotossensibilizador, entre 650 e 800 nm (figura 2). Essa faixa de comprimento de onda permite à luz uma maior penetração no tecido, bem como o suficiente para gerar estados excitados capazes de reagir com o oxigênio molecular presente no meio, gerando EROs altamente citotóxicas para as células (MOAN *et al.*, 1998; AGOSTINIS *et al.*, 2011; DONOHOE et al., 2019; NI et al., 2020). A eficiência da TFD depende do coeficiente de transmissão do meio de propagação da radiação, ou seja, quanto maior o comprimento de onda da radiação incidente, maior seu grau de penetração no tecido e maior a possibilidade de tratar tumores maiores e mais profundos (KUSHIBIKI et al., 2013).

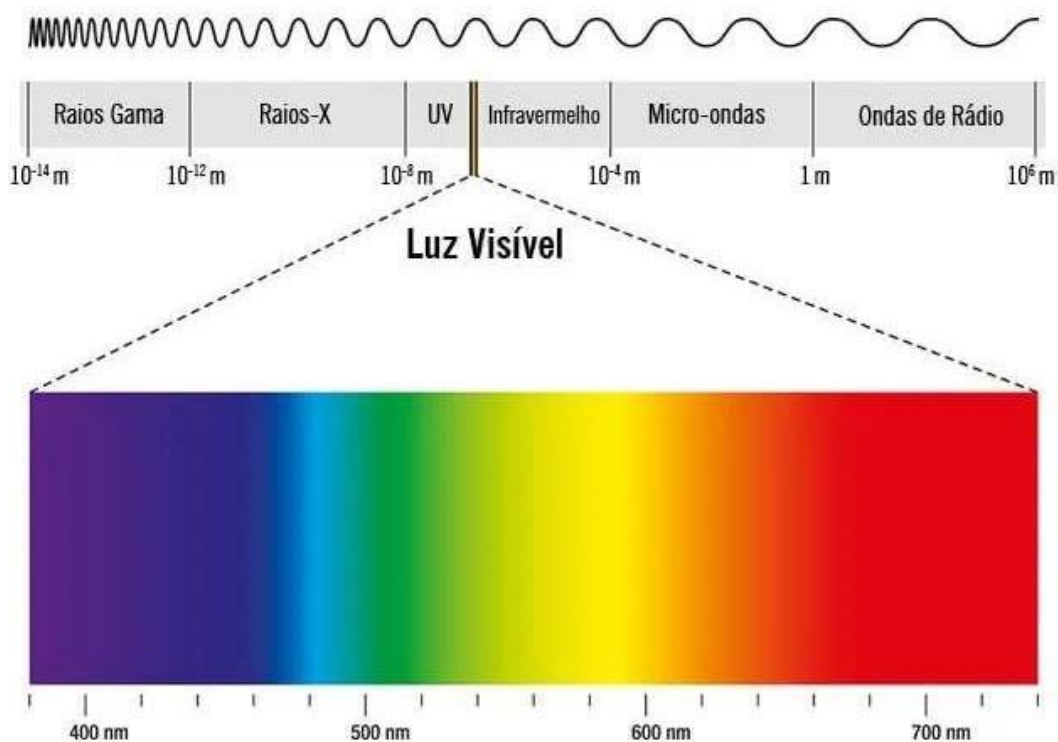


Figura 2 – Espectro eletromagnético. As bandas de absorção em comprimentos de onda curtos (inferiores a 600 nm) possui uma menor capacidade de penetração no tecido. Já as bandas de absorção em comprimentos de onda mais elevados (superiores à 800 nm) não são capazes de gerar oxigênio singleto. Na TFD com azul de metileno, a luz mais utilizada possui um comprimento de onda específico que coincide com a banda de absorção de comprimento de onda mais longa do fotossensibilizador, entre 650 e 800 nm (luz vermelha). Disponível em: <https://www.todamateria.com.br/espectro-eletromagnetico/>. Acesso em: 02 ago. 2022.

Em muitos tratamentos com TFD tem sido observado que ao utilizar agentes fotossensibilizantes, após estes serem excitados pela luz, ocorre um aumento exacerbado de EROs levando à morte das células cancerosas (KARU, 1999; SAUER et al., 2001; GAVISH et al., 2004; HAWKINS e ABRAHAMSE, 2006). Essa terapia consiste na utilização de três importantes elementos, sendo o primeiro a luz irradiada, o segundo consiste em uma substância fotossensibilizante (como o azul de metileno), com boas absorvidades na região vermelha e o terceiro elemento é o oxigênio no meio celular (OLIVEIRA et al., 2015).

A TFD tem como consequência para as células irradiadas duas reações (Figura 3): reações do tipo I, formadas a partir da transferência de elétrons que

pode reagir diretamente com um substrato, como a membrana celular ou outra molécula, e transferir um próton ou um elétron para formar um ânion ou cátion radical ou ainda, interagir diretamente com o oxigênio molecular formando EROS que são as espécies radicais como o íon superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e o radical hidroxila (OH^{\cdot}) e reações do tipo II que é formado a partir da transferência de energia do estado tripo de um fotossensibilizador, podendo transferir sua energia diretamente para o oxigênio molecular para formar o oxigênio singleto (1O_2) no estado excitado (HU *et al.*, 2021).

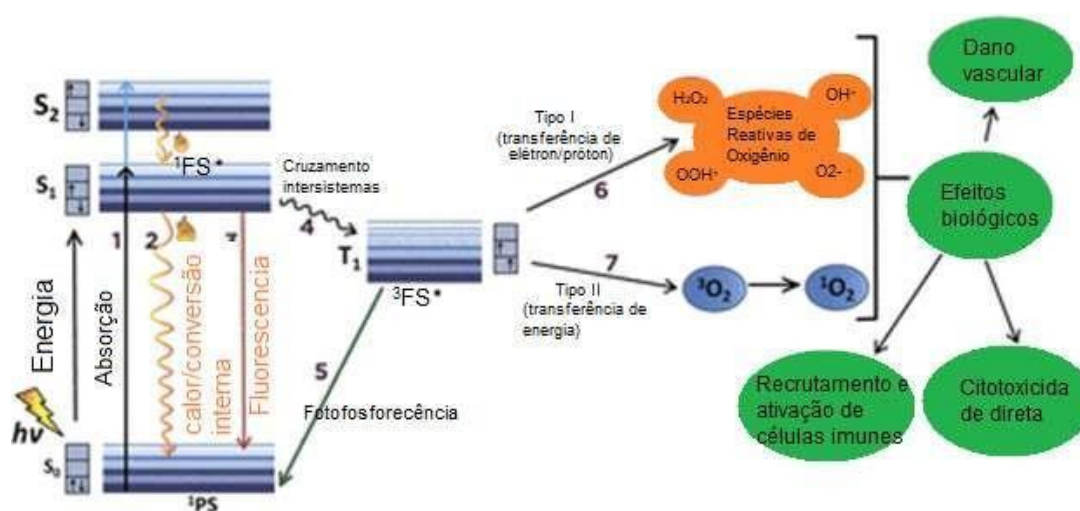


Figura 3- Reações do tipo I e II. Na reação fotoquímica tipo I (6), $^3PS^{\cdot}$ reage diretamente com um substrato (por exemplo, ácidos graxos poli-insaturados em lipídios da membrana celular) e transfere um elétron ou próton, formando radicais orgânicos. Esses radicais podem ainda reagir com o oxigênio celular para produzir espécies reativas de oxigênio (EROs), como ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroperóxido (HOO^{\cdot}), peróxidos (H_2O_2 , $ROOH$) e radical hidroxila (HO^{\cdot}), também podem iniciar reações em cadeia de radicais livres. Na reação fotoquímica tipo II (7), o tripleto $^3PS^{\cdot}$ pode sofrer transferência de energia tripleto-tripeto para o oxigênio molecular para formar o oxigênio singleto no estado excitado (1O_2). As reações fotoquímicas do tipo I e do tipo II podem ser simultâneas, e a relação entre elas depende principalmente do tipo de PS utilizado, das concentrações de substrato e da disponibilidade de oxigênio. Como resultado da reação fotodinâmica, vários mecanismos moleculares são ativados, levando a diferentes modalidades de morte celular, recrutamento e ativação de células imunes e danos vasculares. Adaptado de (ALZEIBAK *et al.*, 2021; MARTINS *et al.*, 2021).

Conforme descrito por Castano e col., 2004, o estado fundamental do FS tem dois elétrons com spins opostos, trata-se de uma grandeza vetorial apresentando módulo, direção e sentido (GOMES e PIETROCOLA; 2011), isto é conhecido como estado singleto, no orbital molecular de menor

energia, após a absorção dos fótons (luz), um desses elétrons é impulsionado para o orbital de maior energia, mas mantém seu spin (primeiro estado singleto excitado), esta é uma espécie de vida curta (nanossegundos) e pode perder sua energia emitindo luz (fluorescência) ou por conversão de calor, retornando pro seu orbital de origem. O estado singleto excitado do FS também pode sofrer o processo conhecido como cruzamento inter-sistema, no qual o spin do elétron excitado se inverte para formar o estado tripleto excitado, nesse momento sua meia vida é relativamente mais longa (durando microssegundos) mantendo os spins dos elétrons paralelos (CASTANO et al., 2004). Muitos pigmentos orgânicos possuem níveis de energia adequados para realizar transferências de energia para o oxigênio molecular (O_2). Assim, o O_2 que ocorre naturalmente no estado tripleto (3O_2) é foto-excitado pelo FS indo para o estado singleto. Ambas as reações podem ocorrer simultaneamente e dependem do tipo de FS, concentração de substrato no meio e oxigênio disponível (HU et al., 2021).

A reação tipo II é a de maior interesse para a TFD, visto que é o mecanismo mais simples e comum (OLIVEIRA et al., 2015; ROSSIN et al., 2020). As EROs geradas nessa terapia são prejudiciais a várias biomoléculas após a oxidação, levando à modificação estrutural e perda de função. É geralmente aceito que a TFD em altas doses, seja pela aplicação de uma alta concentração de FS e/ou uma alta dose de luz irradiada, tende a levar a morte celular. O tropismo do FS pela membrana plasmática também está associado à morte celular, pois curtos períodos de incubação favorecem o acúmulo de fotossensibilizadores na membrana plasmática, enquanto períodos de incubação mais longos permitem o acúmulo de FS nas diferentes organelas (NOODT et al., 1998; DEVI et al., 2008).

O oxigênio singleto é particularmente eletrofílico, podendo oxidar ligações duplas ricas em elétrons em moléculas de macroescala, sendo o principal produto citotóxico da TFD (OCHSNER et al., 1997; VERMA et al., 2018) com uma meia-vida em sistemas biológicos de < 40 ns, tendo um raio de ação na ordem de 20 nm (MOAN; BERG, 1991). O oxigênio singleto nas células tem como alvos primários as ligações duplas que constituem os hidroperóxidos alílicos (SER et al., 2020). Ainda, quando as EROs reagem com

o próprio FS, pode fazer com que sua eficiência seja reduzida ou ocorrer foto-destruição, fenômeno denominado foto-branqueamento (SPIKES, BOMMER; 1993) reduzindo a eficácia da terapia.

A resposta da TFD nas células tumorais gera o que diversos autores denominam de “imunoterapia tumoral” ((figura 4) e conforme citado por Duan et al., (2016) utiliza a premissa de que essas células podem ser reconhecidas e eliminadas pelas células T citotóxicas CD8+ do próprio paciente. É descrita como uma terapia indutora de morte celular imunogênica (MCI) ao gerar EROs, ocorrendo exposição a padrões moleculares associados a danos (PMADs), exposição pré-apoptótica à calreticulina (CRT) e liberação pós-apoptótica de proteína box 1 de alta mobilidade (HMGB1), levando à apoptose de células tumorais e a propagação de antígenos associados a tumor (AATs) (TANAKA et al., 2016). O sistema imunológico é capaz de reconhecer os AATs apresentados por moléculas de complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe I na superfície das células tumorais, permitindo os linfócitos T citotóxicos destruírem essas células cancerosas atacando-as por perforinas e granzimas (OBEID et al., 2006; PANDEY et al., 2012; KROEMER et al., 2013; GALLUZZI et al., 2016; YANG et al., 2018; WEI et al., 2018; LI et al., 2019; TURUBANOVA et al., 2019; YANG et al., 2019; NI et al., 2020). As moléculas de MHC de classe I podem exibir peptídeos derivados de proteínas endógenas que funcionam como auto-antígenos e após a TFD um aumento significativo desta molécula é observado no tecido tumoral (ANZENGRUBER et al., 2015; LI et al., 2019;). A aplicação local de luz não apenas erradica os tumores primários, mas também previne complicações como metástases, levando à inibição completa de tumores metastáticos pré-existentes, gerando imunidade antitumoral sistêmica (DUAN et al., 2016).

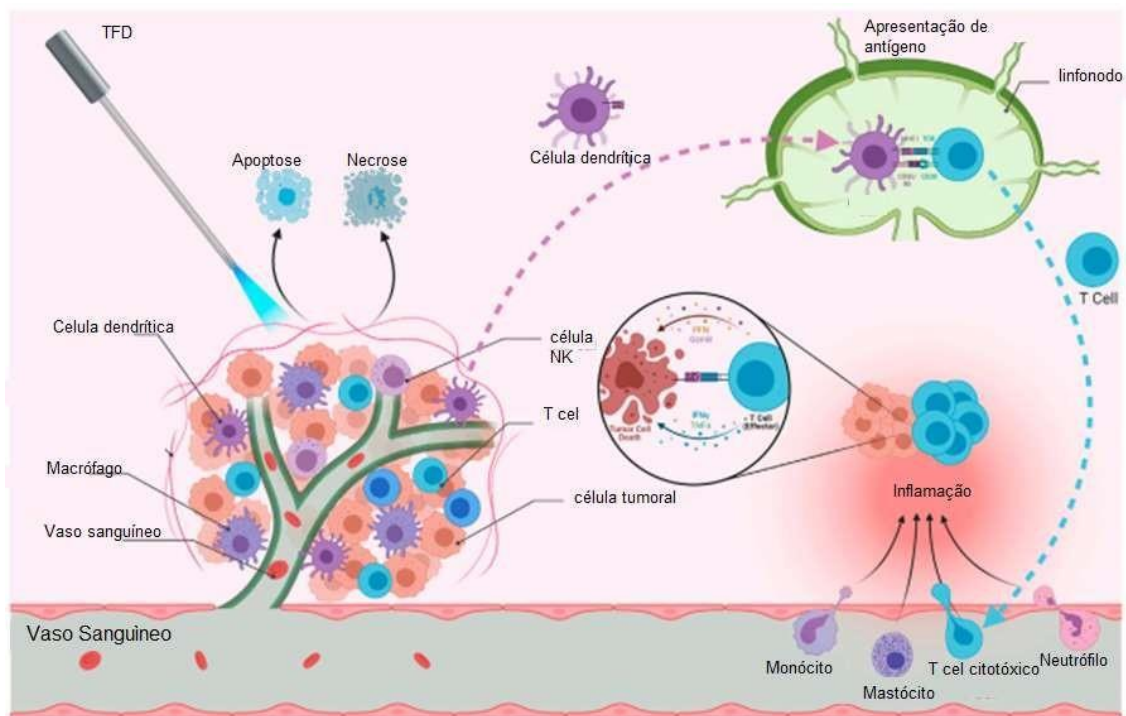


Figura 4 – Imunoterapia tumoral da TFD. Células tumorais podem ser reconhecidas e eliminadas pelas células T citotóxicas CD8+. O sistema imunológico é capaz de reconhecer os AATs apresentados por moléculas MHC-I na superfície das células tumorais, permitindo os linfócitos T citotóxicos destruir essas células. As moléculas de MHC de classe I podem exibir peptídeos derivados de proteínas endógenas que funcionam como auto-antígenos. Adaptado de (GUNAYDIN et al., 2021).

Portanto, o efeito antitumoral da TFD é mediado por uma combinação de três ações principais: efeito citotóxico direto nas células cancerosas, destruição dos vasos sanguíneos do tumor através de privação tecidual de oxigênio e nutrientes e consequente infarto tumoral e, estimulação da imunidade antitumoral. Contribuindo para o controle da doença a longo prazo e constituindo uma grande vantagem sobre as terapias tradicionais, como a cirurgia ou a quimioterapia, que são imunologicamente silenciosas ou mesmo imunossupressoras (CHEN et al., 2006; AGOSTINIS *et al.*, 2011; DąBROWSKI; ARNAUT, 2015). Conforme descrito por Castano et al., 2005, os danos aos vasos sanguíneos associados ao tumor se dão através do colapso microvascular observado após PDT podendo levar a hipóxia tumoral, embora os mecanismos envolvidos nesse processo seja variável conforme o FS

utilizado, os autores descrevem ainda que pode ocorrer constrição do vaso, vazamento macromolecular do vaso, adesão leucocitária e formação de trombos, ambos fenômenos ligados à ativação plaquetária e liberação de tromboxano como causas à esses danos, ainda segundo Castamo et al., 2005, a ativação do sistema imunológico e produção de resposta imune de memória pode ocorrer através dos efeitos provocados por dano fototóxico que nem sempre é letal para todas as células tumorais e criando assim um estímulo inflamatório no qual ainda estimula uma invasão regulada maciça de neutrófilos, mastócitos e monócitos/macrófagos.

Os macrófagos fagocitam um grande número de células cancerosas mortas ou danificadas pelos efeitos citotóxicos da PDT e as células apresentadoras de antígenos processarão os peptídeos específicos do tumor e os apresentarão em suas membranas no contexto das principais moléculas de histocompatibilidade classe II, criando condições para o reconhecimento de antígenos tumorais pelos linfócitos T auxiliares CD4 e, por sua vez, sensibilizando as células T CD8 citotóxicas aos epítomos específicos do tumor, essa atividade dos linfócitos sensibilizados pelo tumor não está limitada ao local original tratado com PDT, podendo ainda incluir lesões disseminadas e metastáticas do mesmo câncer. Assim, embora o tratamento com TFD seja realizado no local do tumor, seu efeito pode ter atributos sistêmicos devido à indução de uma reação imune (CASTAMO et al., 2005).

1.5 Principais mecanismos de mortes induzidas pela TFD

O mecanismo de morte celular na TFD é dependente da localização do FS na célula, além das doses efetivas de TFD administradas à célula tumoral. O tipo de célula também pode determinar o sítio intracelular aonde o FS irá se acumular (NATAL, 2007). Em células tumorais de melanoma, câncer de pulmão e mama foi evidenciado uma maior indução de apoptose quando os FS se acumularam na mitocôndria, já outros estudos indicaram que o FS pode se concentrar nos lisossomos das células tumorais de mama, fazendo dessa organela, outro alvo oxidativo nesta terapia (CHEN et al., 2008; LIM et al.,

2013; MARTINS et al., 2018; MONROE et al., 2019; SANTOS et al., 2020;). É evidenciado ainda que na TFD, múltiplas vias de morte celular podem ocorrer simultaneamente, por exemplo, autofagia e apoptose podem ser iniciadas concomitantemente após dano nos lisossomos e mitocôndrias (respectivamente) (ANDRZEJAK et al., 2011). Conforme citado por Sorrin et al (2020) a TFD também pode causar respostas imunológicas através da estimulação da necrose, permitindo que os leucócitos liberem citocinas, como os fatores de necrose.

A apoptose durante a TFD é deflagrada por um sinal intra ou extracelular que ativa a caspase e inicia a fragmentação do DNA, a célula encolhe, a cromatina nuclear sofre picnose e o núcleo é disperso em corpos apoptóticos, já a necrose, por outro lado, geralmente ocorre por meio de danos na homeostase dos íons celulares, o que causa influxo de água e perda da integridade da membrana (PLAETZER et al., 2005; LEMASTERS, 2005).

Conforme descrito por Lemasters, (2005), cada uma das várias organelas (membrana plasmática, mitocôndria, núcleo, retículo endoplasmático, lisossomo) dá origem a sinais que induzem a morte celular. Na maioria das vezes, esses sinais convergem nas mitocôndrias para iniciar uma via comum para apoptose dependente de caspase ou necrose dependente de depleção de ATP.

1.5.1 Apoptose

A apoptose é um mecanismo auto-limitante da morte celular em que células indesejadas são removidas de forma biológica, para manter a homeostase tecidual. Esse mecanismo e sua regulação são essenciais para a homeostase celular normal e como forma de defesa, como em reações imunológicas para evitar que doenças como o câncer se desenvolvam (ELMORE, 2007). O processo de apoptose envolve a permeabilização da membrana mitocondrial pelas proteínas da família Bcl-2, para liberar citocromo c, que se liga ao fator

ativador de protease apoptótico 1 (APAF1), ativando as caspases que levam à morte celular (ANIOGO; GEORGE; ABRAHAMSE, 2020).

É descrito na literatura que as mitocôndrias são organelas chave para os mecanismos apoptóticos, uma vez que a dano oxidativo permite a liberação do citocromo c ao citoplasma. Isso ativa cascatas de caspases resultando na apoptose (DONOHOE et al., 2019) conforme observado na figura 5. A TFD tem considerável poder para promover um aumento na atividade da caspase-3, indicando um aumento na morte por apoptose (SALVESEN; DIXIT, 1997; NATAL, 2007; DEVI et al., 2008). As células não tumorigênicas são mais propensas a montar uma resposta antioxidante eficiente contra a TFD, tornando essa terapia menos agressiva aos tecidos saudáveis adjacentes visto que eles conseguem efetuar mecanismos de reparo de forma mais eficiente (SANTOS et al., 2020).

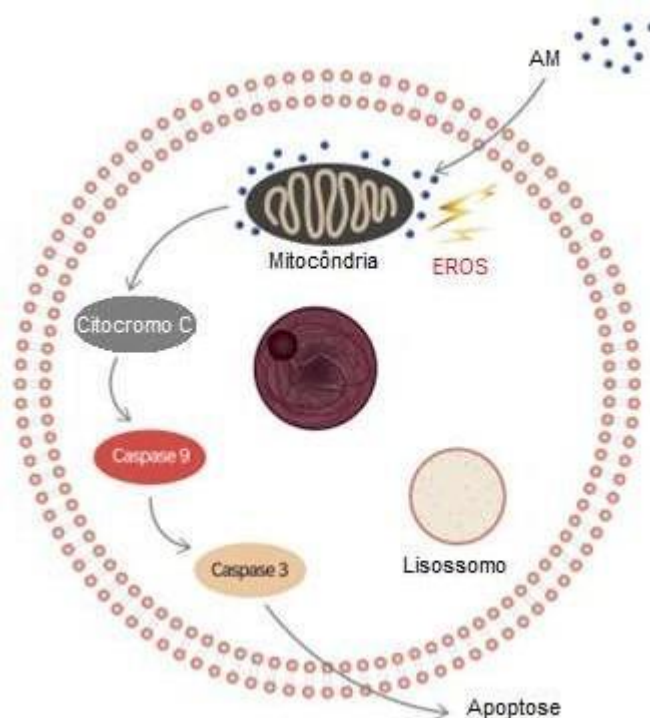


Figura 5. Mecanismo de ação da PDT pelo MB localizado na mitocôndria. AM penetra na mitocôndria liberando citocromo C, desencadeando caspase 9, caspase 3 e algumas proteínas poli (ADP-ribose) polimerase (PARP) para induzir a apoptose celular (SER et al., 2020).

Conforme descrito por Nath, Obaid e Hasan (2019), no mecanismo de apoptose induzida por TFD, os fotossensibilizadores localizados nas mitocôndrias ou lisossomos podem danificar diretamente essas organelas sob irradiação de luz através da fototoxicidade lisossomal (figura 6).

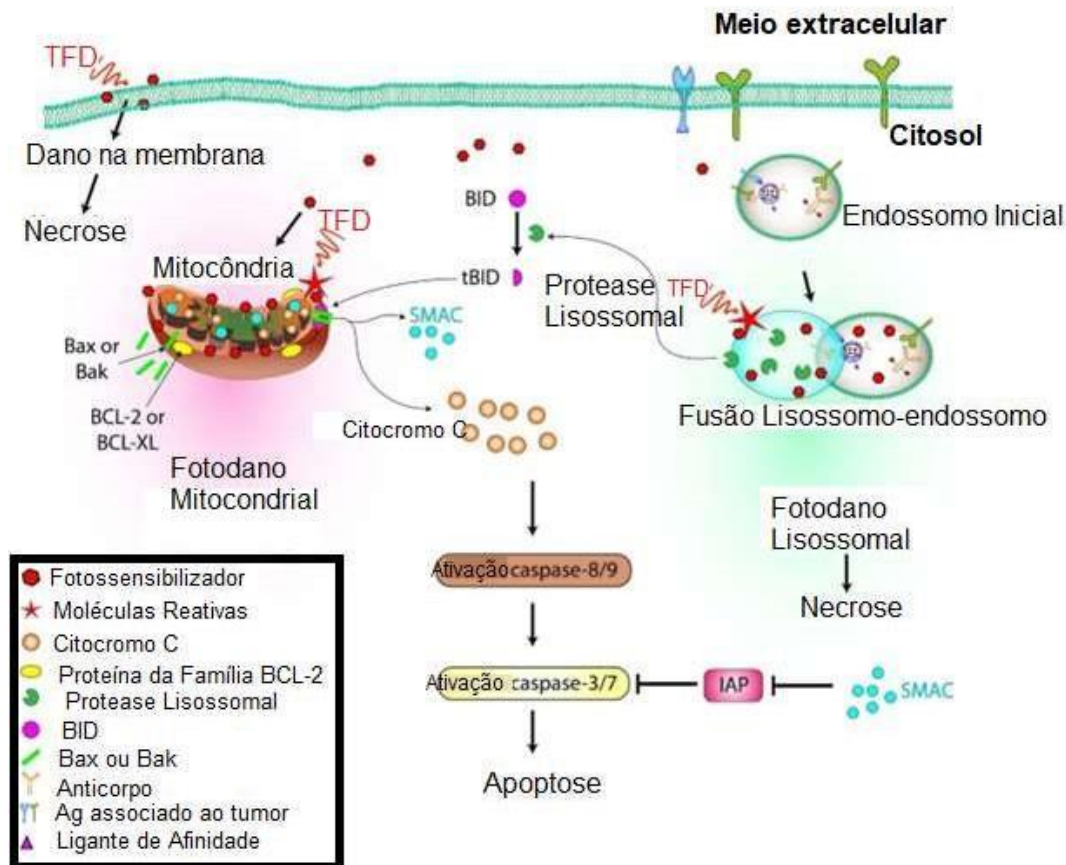


Figura 6. Mecanismo de ação das vias apoptóticas na morte celular induzida por TFD. Fotossensibilizadores localizados nas mitocôndrias ou lisossomos ao serem fotoexcitados promovem a liberação de proteases (catepsinas) do lisossomo para o citosol, clivando a proteína pró apoptótica BID e gerando o BID truncado (tBID). Em seguida, tBID irá ativar BAX e BAK (proteína BH123) formando poros (canais de membrana externa mitocondrial). Como resultado, o citocromo c e o segundo ativador de caspases derivado da mitocôndria (SMAC) são liberados levando à ativação do iniciador caspase-8/9 e caspases executoras (caspase 3/7). A liberação de SMAC leva à inibição de IAPs (inibidor de proteínas de apoptose), impedindo-as de se ligarem e inibindo as caspases ativadas. Por fim, as caspases executoras ativadas iniciam a degradação de componentes celulares e nucleares, incluindo proteínas e ácidos nucleicos, levando à morte celular por apoptose. Adaptado de (NATH et al., 2019).

Quando Bcl-2 e Bcl-x (proteínas anti-apoptóticas) são inibidas, sua função de prevenir a liberação de fatores mitocondriais apoptogênicos como citocromo c e fator indutor de apoptose (FIA) no citoplasma está comprometida. A liberação destes fatores apoptogênicos no citoplasma ativa caspases, promovendo as vias apoptóticas. Entretanto, sabe-se que as células tumorais podem ser resistentes a apoptose (BACELLAR et al., 2015).

O foto-dano mitocondrial pode fornecer não apenas morte celular apoptótica, mas também desencadear necrose ou autofagia, a depender da dose de TFD (incluindo a concentração de FS e parâmetros físicos da luz). Altos níveis de dose de TFD causam permeabilidade mitocondrial drástica e esgotamento dos níveis de ATP, levando à necrose. Níveis leves de dose de TFD desencadeiam apoptose (como já mencionado), e baixos níveis de dose de TFD promovem permeabilidade mitocondrial limitada e induzem a autofagia ("mitofagia") (BACELLAR et al., 2015; ANIOGO et al., 2020). O início da apoptose pelo foto-dano mitocondrial direto é significativo na terapia do câncer porque essa via contorna muitos dos mecanismos de escape e reparo por meio dos quais as células tumorais são capazes de desenvolver resistência aos tratamentos tradicionais (SORRIN et al., 2020).

1.5.2 Necrose

A necrose foi considerada uma morte celular acidental, causada por danos físicos ou químicos e era considerada um processo não programado, caracterizando-se por um núcleo picnótico, inchaço citoplasmático e desintegração progressiva das membranas citoplasmáticas, no qual levam à fragmentação celular e liberação de componentes intracelulares no compartimento extracelular, sendo ainda considerada uma forma violenta e rápida de degeneração (CASTANO et al., 2005). Um estudo anterior de Kroemer e Jaattela, (2005) descobriu que os lisossomos contendo numerosas hidrolases, liberam proteases lisossômicas, levando à necrose celular.

Embora haja um consenso de que na TFD a morte celular pode ocorrer seletivamente em células de câncer de mama sem afetar significativamente as células não malignas, a via apoptótica não é a única via de morte celular, ou

seja, múltiplas vias de morte podem ser ativadas, como por exemplo, as vias de necrose reguladas (necroptose) (SANTOS et al., 2017).

Conforme descrito por Nath, Obaid e Hasan (2019), a via necrótica no geral é considerada a via mais pró-inflamatória, graças à liberação descontrolada de PMADs ativando o sistema imune inato e adaptativo. Estudos sugerem que o foto-dano do retículo endoplasmático (RE) e, conseqüentemente, a liberação de uma explosão de cálcio no citosol afeta a viabilidade celular, induzindo a morte celular necrótica programada através de um efeito inibitório da ciclosporina A no início do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (ZONG, 2006). Entretanto, a ativação de proteases dependentes de cálcio (calpains) demonstrou ser o principal responsável pela morte celular programada por necrose (BACELLAR et al., 2015).

Bacellar e col. (2015), descreveram que altas doses de TFD e/ou foto-danos descontrolados levam à liberação descontrolada de biomoléculas de morte celular não programada para o espaço extracelular, iniciando uma resposta inflamatória no tecido circundante. Por essa razão, a necrose era geralmente vista como um mecanismo indesejável. Alguns estudos tem demonstrado que a terapia fotodinâmica com azul de metileno em diferentes tipos de células tumorais em concentrações baixas do AM (0-25uM), não foram capazes de causar significativa morte celular por necrose (LU et al., (2008); CHEN et al., (2008); LUO et al., (2015); (GOMES, 2021).

1.5.3 Autofagia

Dependendo do tipo de foto-dano e da biologia subjacente das células-alvo, a TFD também pode causar níveis letais de autofagia ou, como foi relatado mais recentemente, pode desencadear a paraptose (SORRIN et al., 2020).

A autofagia é um processo no qual o citosol e organelas danificadas permanecem envoltos em vacúolos denominados autofagossomos, que se fundirão com os lisossomos para digerir esse conteúdo, sob condições

fisiológicas normais, as hidrolases lisossômicas participam da renovação de organelas e macromoléculas por meio da autofagia, desempenhando um papel crucial na proteção da célula após a TFD, reciclando mitocôndrias ou retículo endoplasmático danificados que possam desencadear a apoptose como última tentativa das células para lidar com o estresse oxidativo e sobreviverem (KROEMER, JAATTELA, 2005).

Dependendo da intensidade, a autofagia pode proteger as células contra a morte celular ou mediar a chamada morte celular autofágica (SHINTANI, KLIONSKY., 2004). A conversão de um mecanismo de autofagia citoprotetora para uma via letal se dá através da inibição da formação do autofagossoma no processo da autofagia (KESSEL et al., 2006; MARTINS et al., 2021).

Na via apoptótica previamente resumida, a fototoxicidade na mitocôndria desencadeará uma reação em cascata que leva a célula a morte. No entanto, quando o FS se localiza no lisossomo, a toxicidade da TFD levará à fotodegradação das enzimas lisossômicas e, assim, pode levar à morte gradual da célula. A resposta posterior pode levar à morte ou sobrevivência: quando a produção de EROs não é adequada para causar danos irreversíveis ao lisossomo, especialmente em células que não possuem proteína Bax e enzima procaspase-3, diz-se que a autofagia é ativada em resposta à sobrevivência e proliferação celular (ANIOGO; GEORGE; ABRAHAMSE, 2020), o que pode ser ruim para as respostas desejáveis da TFD no controle e morte das células tumorais.

Essa via desempenha um papel importante na apresentação de antígenos. Antígenos endógenos são processados por meio de proteases citosólicas para então serem apresentados por moléculas MHC I para células T CD8 + (PANDEY et al., 2012; ANZENGRUBER et al., 2015) em contraste aos antígenos exógenos que são endocitados e processados através da via endossomal-lisossomal para apresentar o antígeno no contexto de MHC de classe II para células T CD4 + (NATH; OBAID; HASAN, 2019).

Conforme descrito por GOMES, (2021) a TFD com AM em linhagem de célula tumoral de próstata, induziu um aumento de vacúolos autofágicos, o que

pode indicar um possível aumento da autofagia. Santos e col. (2017) investigaram a relação entre a localização do AM intracelular e o tipo de morte no contexto da TFD em linhagens de células tumorais mamárias e reafirmaram que a mitocôndria não é o alvo primário de localização do AM. Pelo contrário, o AM parece estar envolvido diretamente com os lisossomos, o que leva a uma intensificação da via autofágica nessas células estudadas. Sabe-se que o efeito de proteção ou toxicidade celular está diretamente relacionado com o tipo de FS, sua localização celular, altas ou baixas doses de irradiação da luz e principalmente, o tipo celular analisado (ANIOGO et al., 2020).

2. JUSTIFICATIVA

A crescente utilização da TFD em diferentes práticas clínicas tem despertado grande interesse na comunidade científica sobre seus efeitos moleculares e celulares e, principalmente, sobre a utilização desse tipo de terapia em diversos tipos de neoplasias. Na prática odontológica, onde essa terapia já é frequentemente utilizada, essa terapia atua no controle microbiológico da cavidade oral, diminuindo assim o uso de medicamentos (PRAȘMO et al., 2016; CAMACHO-ALONSO et al., 2017). Além disso, a TFD é considerada uma terapia simples, com baixos custos e que pode ser facilmente aplicada para a população em geral.

Nosso grupo de pesquisa tem trabalhado há mais de uma década testando diferentes protocolos terapêuticos dos lasers de baixa potência, utilizando tanto modelos biológicos procariontes (FONSECA et al., 2010; FONSECA et al., 2011; MARCIANO et al., 2012) quanto eucariontes (FONSECA et al., 2012), seja em testes *in vitro* (CANUTO et al., 2013) ou *in vivo* (CANUTO et al., 2016; ANJOS et al., 2017), para elucidar quais mecanismos biológicos estão envolvidos e que tipos de respostas esses lasers podem gerar. Em nossos estudos já detectamos que as respostas celulares estão diretamente relacionadas às características da luz (dependente do tipo de comprimento de onda, dose e frequência da onda). Dentre essas repostas, podemos citar danos sub letais no DNA, alteração de diversos mecanismos de

reparo de DNA, mecanismos de morte celular e reposta imune (SERGIO et al., 2015; PAOLI et al., 2015).

A TFD já é aprovada para tratamento clínico oncológico nos Estados Unidos, União Europeia, Canadá, Rússia e Japão. Aqui no Brasil, essa terapia é aprovada desde 2006, mas somente para tumores de pele não melanoma (ISSA et al., 2016). Para a difusão desse tipo de terapia no Brasil, fazem-se necessários testes experimentais *in vitro* e *in vivo*, aprofundando os conhecimentos moleculares e descrevendo seus possíveis efeitos adversos e contraindicações. Adicionalmente, faz-se necessário a expansão dessa terapia na aplicação de mais tipos de neoplasias.

3. OBJETIVO

3.1 Objetivo Geral

Avaliar atividade antitumoral da terapia fotodinâmica utilizando células tumorais mamárias em modelo experimental *in vitro*.

3.2. Objetivos Específicos

Investigar a ação do laser vermelho de baixa potência associado ao fotossensibilizador - azul de metileno no (a):

- Citotoxicidade do fotossensibilizador nas células tumorais 4T1, bem como estabelecer uma curva dose-resposta;
- Migração celular;
- Expressão de genes relacionados à apoptose (Bcl-2 e caspase-6).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Laser de baixa potência

Neste projeto foi utilizado um laser de baixa potência (Photon Lase III, AsGaAl - D.M.C. Equipamentos Ltda, São Paulo), no espectro de luz vermelho (comprimento de onda de 660nm), nos seguintes parâmetros descritos na tabela 4.

Comprimento de onda (nm)	660
Diodo laser	AsGaAl
Potência (mW)	100
Modo de emissão da luz	Contínuo
<i>Spot size</i> (cm ²)	0.028
Energia por ponto (mJ)	2.8
Densidade de energia (Jcm ⁻²)	100
Tempo de irradiação por ponto (s)	28
Numero de pontos	1
Tecnica de aplicação	Pontual
Número de sessões de tratamento	Uma

Tabela 4. Parâmetros físicos do laser

4.2 Fotossensibilizador

Soluções de azul de metileno (AM) foram preparadas utilizando meio de cultura sem suplementação com soro fetal bovino nas seguintes concentrações: 5µM, 10µM, 15µM, 20 µM, 25 µM, 50 µM, 100 µM e 150 µM. Após, essas soluções foram filtradas e usadas imediatamente.

4.3 Modelo Experimental – 4T1

Para este trabalho, foi utilizada a linhagem celular de tumor de mama 4T1. O carcinoma mamário 4T1 originalmente é derivada do tumor 410.4, que foi isolado de um único tumor mamário de surgimento espontâneo de um

camundongo MMTV+ BALB/c, foi isolado por Fred Miller e colaboradores, sendo uma linha celular tumoral transplantável e com bom crescimento em camundongos BALB/c e em cultura de tecidos, possuindo resistência à 6-tioguanina, permitindo que a detecção de micro metástases seja precisamente quantificada *in vitro*, após excisão e digestão do órgão selecionado. (DEXTER et al., 1978; ASLAKSON e MILLER, 1992).

Diversas propriedades de crescimento das células 4T1 a fazem de fácil manipulação em camundongos. Por ser altamente tumorigênica, o tumor se desenvolve em 100% dos camundongos naive isogênicos BALB/c, quando 5×10^3 células são inoculadas (LELEKAKIS et al., 1999). As células tumorais expressam adequados níveis de MHC de classe I e indetectáveis níveis de MCH de classe II, tornando-as alvos adequados para os linfócitos T citotóxicos CD8⁺ (PULASKI e OSTRAND-ROSENBERG, 1998).

4.4 Cultura Celular

As células foram cultivadas em placas de 96 poços, em meio de cultura RPMI (do inglês "*Roswell Park Memorial Institute*") suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de antibiótico (100 unidades/mL de penicilina e 100 ug/mL de estreptomicina GIBCO®) a 37°C e 5% de CO₂. Após atingirem cerca de 80 - 90% de confluência, as células foram incubadas em meio RPMI sem SFB e com diferentes doses de AM (conforme descrita anteriormente) em três tempos de incubação distintos: 10 min, 15 min e 30 min. Em seguida as células foram incubadas a 37°C e 5% de CO₂ por mais 24 horas para a análise de viabilidade celular pelo método do MTT (Brometo de [3-(4,5- dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]).

Após a padronização do tempo de incubação pelo AM em 30 min, iniciaram-se as irradiações com o laser de baixa potência. Com isso, após os períodos de incubação de 30 min, as soluções de AM foram removidas, as placas lavadas, novo meio RPMI adicionado e as células irradiadas com o laser nos parâmetros descritos anteriormente.

As placas foram protegidas de outras fontes luminosas durante todo o procedimento. Como controle, células incubadas por 30 min com AM e não irradiadas com laser de baixa potência foram utilizadas.

4.5 Análise de viabilidade celular

A viabilidade por MTT foi realizada 24h após incubação do AM e/ou TFD+AM. Após centrifugação das placas, o sobrenadante foi descartado e o sedimento celular suspenso em 100µL de RPMI completo. Após, foi acrescentado 10µL de MTT/poço. A solução estéril de MTT foi preparada previamente, na concentração de 5mg/mL em água destilada. A incubação com o MTT foi feita em estufa de cultura de células sob uma atmosfera de 5% de CO₂, 37°C durante 4h. Posteriormente, todo o meio foi retirado e adicionado então 100µL de DMSO. As placas foram agitadas suavemente e encaminhado para leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda de 550nm.

4.6 Ensaio de migração celular

A fim de avaliar o efeito da terapia fotodinâmica na capacidade de migração das células, foi realizado o ensaio de migração *wound healing*. Esse ensaio consiste na remoção de parte da monocamada de células através de um risco realizado com o auxílio de uma ponteira de micropipeta. Para tal, 4×10^4 cel/cm² foram cultivadas em placas de 12 poços com 2mL de RPMI 1640 suplementado, a 37 °C em atmosfera de CO₂ a 5 % por 48h. Após atingirem cerca de 80 - 90% de confluência, as células foram incubadas com AM nas concentrações de 25 e 50 µM durante 30 min e posteriormente irradiadas com laser de baixa potência conforme descrito no item 4.1. Logo após os tratamentos, foi feita a remoção longitudinal de parte das células com a ponteira de 200 µl, percorrendo a diagonal do poço, fazendo um risco em forma de cruz. Em seguida, as células foram lavadas com 1 mL de meio RPMI para remoção das células em suspensão e os poços em seguida foram completados com meio de cultivo suplementado com 1 % de soro fetal bovino e 1% de antibiótico. O espaço aberto foi fotografado, usando um microscópio óptico invertido Nikon Eclipse TS 100 (Nikon, Japão), objetiva de 10x, nos

tempos 0, 24h, 48h e 72 h (tempo no qual houve o fechamento de todos os poços). A análise quantitativa da migração celular foi obtida através da redução do espaço aberto em comparação com os seus respectivos controles (somente poços com meio RPMI e tratados com laser), por meio do *software* Image Proplus (Media Cybernetics, China/Japão).

4.7 Extração de RNA total

Setenta e duas horas após incubação com AM nas concentrações de 25 e 50 μm e irradiação com o laser de baixa potência em cultura de células 4T1, foi realizada a extração do RNA total com o reagente TRIzol® (ThermoFisher, USA). Para a extração do RNA, 1×10^6 cel/cm² foram extraídas utilizando um volume de 400 μL de TRIzol®, homogeneizado e a preparação foi incubada a temperatura ambiente por 24h. Foram adicionados, após esse período, 100 μL de clorofórmio (Merck, Alemanha) e mais uma vez as preparações foram incubadas à temperatura ambiente por 5 minutos e centrifugadas a 12.000 rpm a 4 °C por 15 minutos. A fase aquosa foi cuidadosamente transferida para outros microtubos de 1,5 μL e 250 μL de isopropanol (Merck, Alemanha) foram adicionados. Após incubação à temperatura ambiente por 15 minutos, as preparações foram centrifugadas a 12.000 rpm à temperatura de 4°C por 15 minutos. Os sobrenadantes foram descartados e o RNA total foi diluído em solução aquosa de dietilpirocarbonato 0,1% (DEPC) (Merck, Alemanha). A concentração de RNA e pureza foram determinadas através da espectrofotometria, com o auxílio do equipamento Nanodrop1000 (Nanodrop, USA). As amostras de RNA foram armazenadas a -70°C até o uso.

4.8 Real time quantitativo PCR

Nessa análise foram utilizados *primers* dos genes que codificam caspase-6 e Bcl-2 (genes envolvidos com processo de morte celular por apoptose) (Invitrogen, Brasil). A normalização das amostras foi realizada com o *primer* do gene β -actina (Invitrogen, Brasil). Os *primers* foram desenhados em diferentes éxons para evitar a possibilidade de contaminação com DNA

genômico utilizando o programa Primer 3 (UNTERGASSER et al., 2012).
Tabela 5.

Genes alvo	Sequência <i>Foward</i> (5' --> 3')	Sequência <i>Reverse</i> (3' --> 5')
Bcl-2	TGGGTCTAGGAAAGGGGGAA	CGGGCTATTCACAATTCTGCC
Caspase-6	GACGTGGTGGGAAGGGCTAAA	AGTGTACAAAAGGGGAGGC
β-actina	CATCCGTAAAGACCTCTATGCC	GGAGCCAGAGCAGTAATCTC

Tabela 5. *Primers* utilizados para *real time* PCR.

Através dos resultados das curvas padrão para determinação da eficiência dos *primers* (eficiência aceitável superior a 90%), padronizou-se a utilização da diluição de 1:5 de cDNA para todas as amostras. O ensaio de RT-qPCR foi realizado no aparelho StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, EUA) nas seguintes condições: 40 ciclos; em cada ciclo, desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, desnaturação a 95°C por 15 segundos, anelamento dos *primers* e extensão a 60 °C por 1 minuto. Cada amostra foi feita em duplicata, e como controle negativo foram utilizadas reações na ausência do cDNA alvo. As análises das curvas de *melting* e de dissociação foram feitas ao final de cada corrida como controle da qualidade da amplificação gênica.

Para análise dos níveis relativos de mRNA através de RT-qPCR foi utilizado o método Delta-Delta Ct ($\Delta\Delta Ct$) (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Calculou-se inicialmente o ΔCt de cada amostra, subtraindo-se os valores de CT (threshold cycle ou limiar do ciclo) do gene controle (β -actina) dos valores de CT do gene alvo. Para o cálculo do $\Delta\Delta Ct$ utilizou-se a fórmula seguinte: [ΔCt (amostra) – ΔCt (amostra normalizadora)]. Uma vez determinado o $\Delta\Delta Ct$, aplicou-se a fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$, que resultou no valor dos níveis relativos de mRNA.

4.9 Análises estatísticas

Os dados obtidos são apresentados na forma: média±desvio padrão. A comparação entre os grupos foi feita através da análise de variância (ANOVA) com pós-teste Bonferroni. O nível de significância foi considerado com $p < 0,05$. Para as análises estatísticas foi utilizado o software InStat Graphpad (GraphPad InStat for Windows, GraphPad Software, San Diego California, USA).

5 RESULTADOS

5.1 Viabilidade Celular

Com a finalidade de estabelecer uma curva dose-resposta e padronizar o tempo de incubação das células 4T1 com o AM, descartando uma possível toxicidade do FS, três tempos foram testados: 10 min, 15 min e 30 min (figura 7). Embora os tempos de incubação com azul de metileno em 10 e 15 minutos não tenham demonstrado diferença estatística na redução da viabilidade celular comparada ao tempo de incubação de 30 minutos, foi padronizado o maior tempo de incubação, uma vez que conforme descrito anteriormente, o tropismo do FS pelas estruturas celulares varia conforme o tempo de incubação.

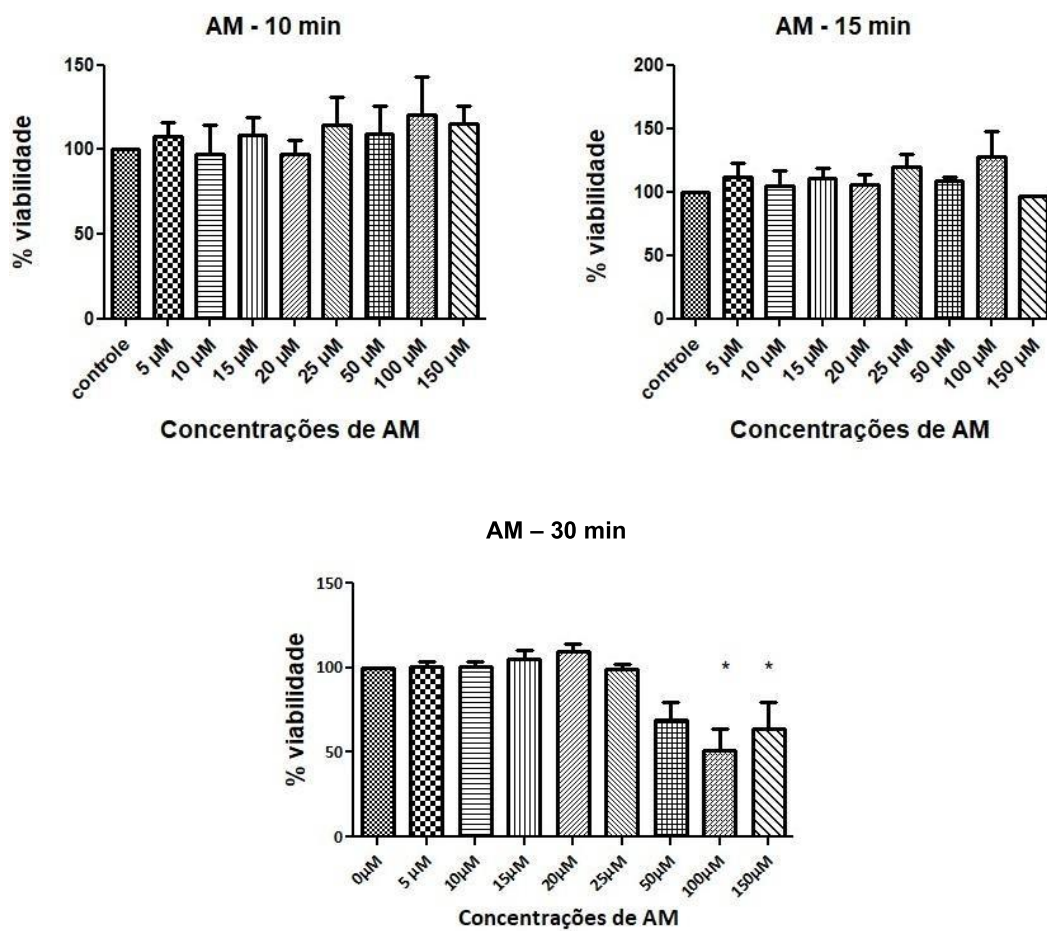


Figura 7. Porcentagem de viabilidade das células 4T1 após a incubação com o fotossensibilizador (FS) azul de metileno (AM) nos tempos de 10, 15 e 30 min. Diferentes concentrações de AM foram testadas para verificar possíveis efeitos citotóxicos desse FS. *indica diferença estatística com relação ao controle ($p < 0,05$).

Após 30 min de incubação com o AM, a viabilidade celular indicou que as concentrações de AM de 5 a 50 µM não foram tóxicas para as células 4T1 quando comparadas com o grupo controle (0µM) ($p > 0,05$). Já as concentrações de AM de 100 e 150 µM demonstraram menor viabilidade celular, o que pode ser um indicativo de toxicidade do FS.

A figura 8 ilustra os resultados da TFD+AM e demonstra uma redução na viabilidade celular a partir da concentração de 50 µM quando comparada com o grupo controle ($p < 0,05$). Com isso, ficou estabelecido que as concentrações de 25 e 50 µM seriam utilizadas para as demais análises em combinação com a irradiação do laser de baixa potência.

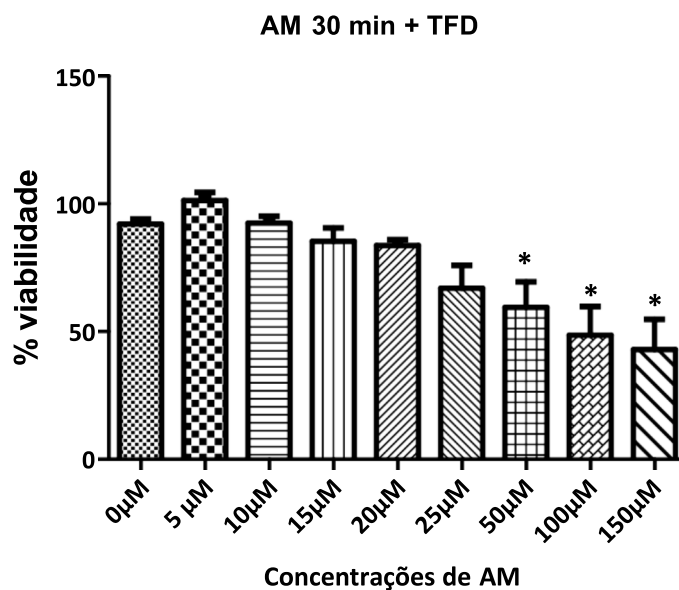


Figura 8. Porcentagem da viabilidade das células 4T1 após a incubação com o fotossensibilizador (FS) azul de metileno (AM) no tempo de 30 min seguida de irradiação com laser vermelho de baixa potência. *indica diferença estatística com relação ao controle ($p < 0,05$).

5.2 Migração Celular

Com a finalidade de avaliar a capacidade migratória das células 4T1, foi realizado o ensaio de migração celular/*wound healing*. A figura 9 demonstra as imagens representativas do ensaio de migração nos 3 tempos observados (0h, 24h e 48h) e a figura 10 demonstra a quantificação das áreas das ranhuras para os grupos controle, laser, TFD 25 µM e TFD 50 µM. Os resultados obtidos indicam que após 24h houve uma redução na área, com o fechamento total da ranhura no grupo controle ($p < 0,05$). Já nos grupos laser e TFD 25 µM e TFD 50 µM uma redução na área foi observada, mas sem o fechamento completo da ranhura. Após 48h, o grupo laser apresentou o completo fechamento enquanto os grupos tratados com TFD ainda apresentaram uma pequena área. Na comparação entre os dois tratamentos testado, o grupo TFD 50 µM apresentou uma capacidade de redução na migração celular melhor do que o grupo TFD 25 µM. Contudo, a terapia fotodinâmica nas duas concentrações testadas foi capaz de reduzir a velocidade de migração das células 4T1 quando comparado com o grupo controle e laser ($p < 0,05$).

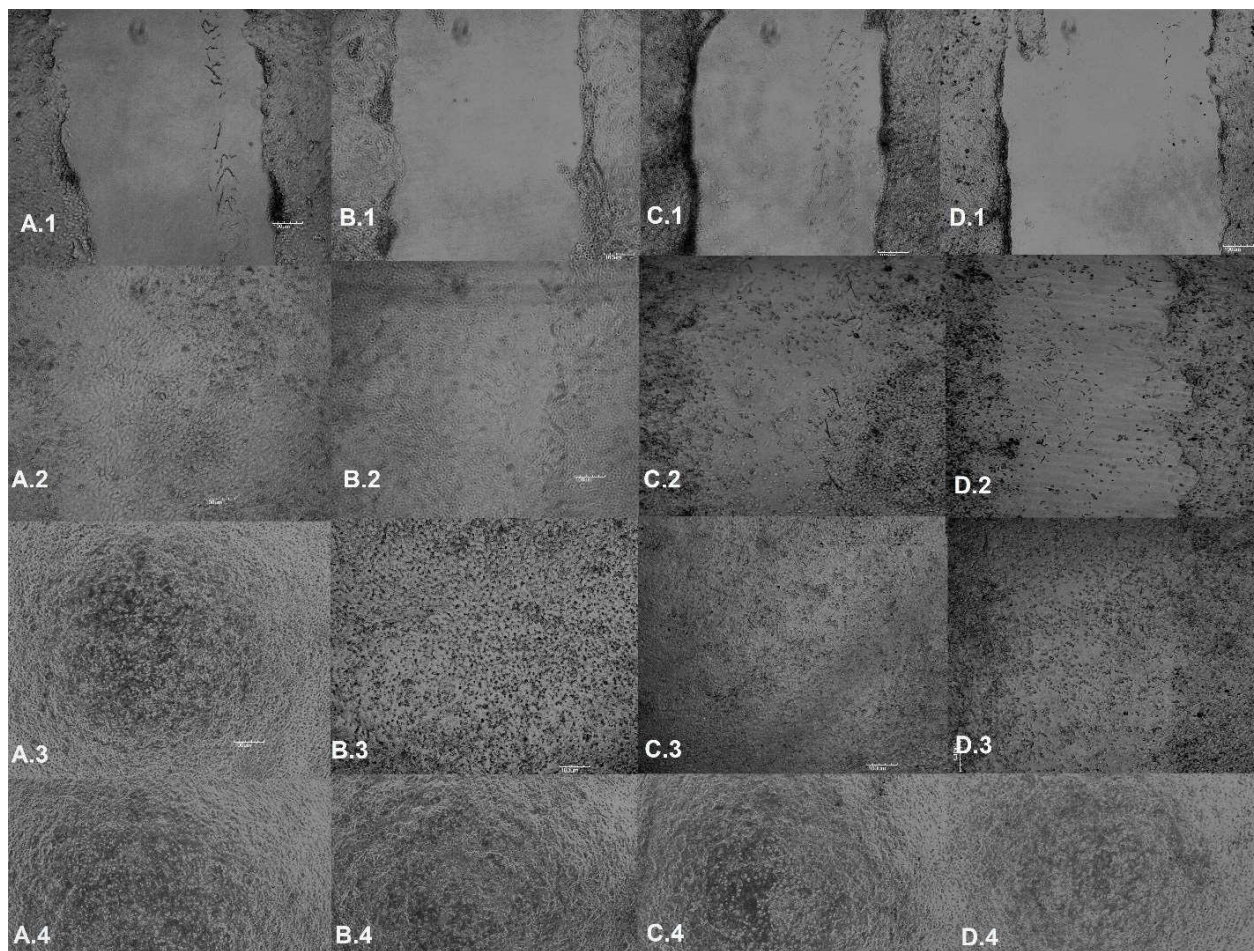


Figura 9. Imagens representativas do ensaio de migração das células 4T1 nos tempos de 0h, 24h, 48h e 72h. Controle – sem tratamento; laser – irradiado com laser vermelho de baixa potência; TFD – terapia fotodinâmica; 25 μM e 50 μM – concentrações de azul de metileno utilizadas. A.1 à A.4 - controle nos tempos 0, 24, 48 e 72 horas; B.1 à B.4 - laser nos tempos 0, 24, 48 e 72 horas respectivamente; C.1 à C.4 - TFD 25 μM nos tempos 0, 24,48 e 72 horas respectivamente; D.1 à D.4 - TFD 50 μM nos tempos 0h, 24,48 e 72 horas, respectivamente.

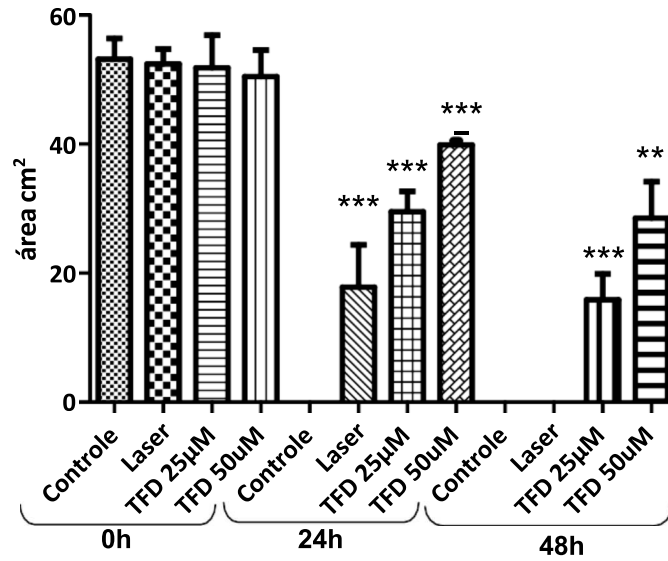


Figura 10. Quantificação (média \pm SD) das áreas no ensaio de migração das células 4T1 nos tempos de 0h, 24h e 48h. Controle - sem tratamento; laser - irradiado com laser vermelho de baixa potência; TFD - terapia fotodinâmica; 25 μ M e 50 μ M - concentrações de azul de metileno utilizadas. ** e *** $p < 0,001$ quando comparados com os grupos 0h.

5.3 Expressão de genes envolvidos na apoptose

A figura 11 demonstra que o grupo TFD 25 μ M foi capaz de reduzir significativamente os níveis relativos de mRNA de Bcl-2 ($p < 0,05$), enquanto a figura 12 demonstra não haver diferenças significativas nos níveis relativos de mRNA de caspase-6 para os grupos tratados quando comparados com o controle ($p > 0,05$).

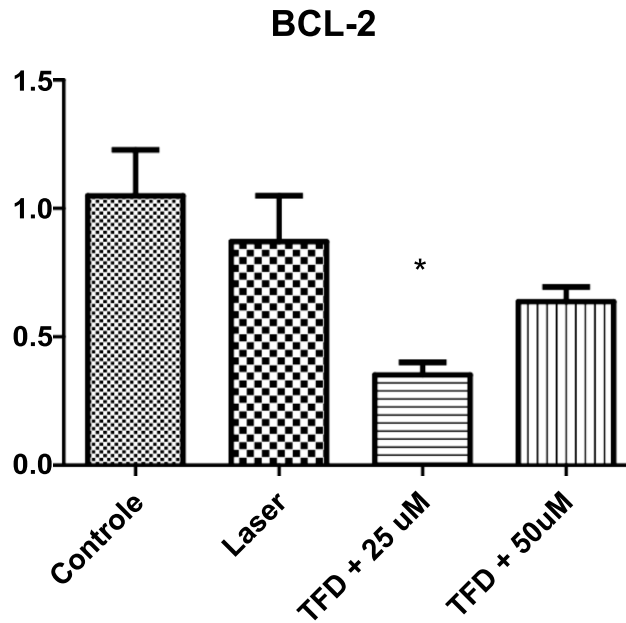


Figura 11. Níveis relativos de mRNA de BCL-2 após a incubação com o fotossensibilizador (FS) azul de metileno (AM) no tempo de 30 min + TFD. Duas concentrações de AM foram testadas (25 e 50 μ M) para verificar o tipo de morte celular induzida. *indica diferença estatística com relação ao controle ($p < 0,05$).

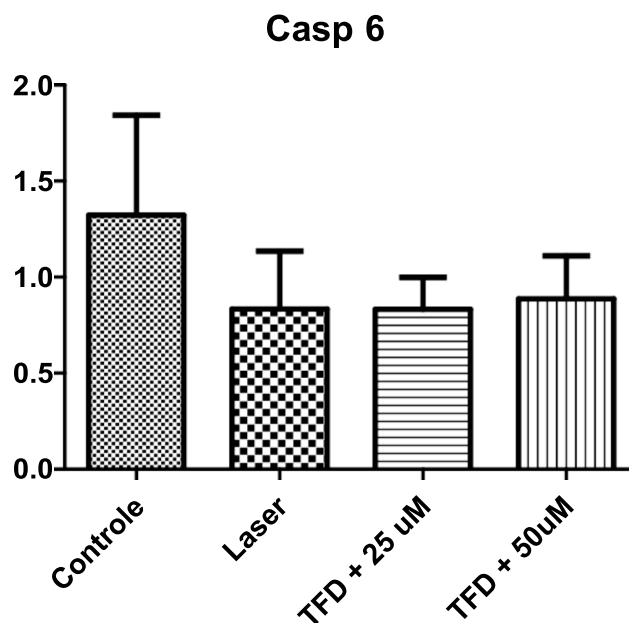


Figura 12. Níveis relativos de mRNA de caspase-6 após a incubação com o fotossensibilizador (FS) azul de metileno (AM) no tempo de 30 min + TFD. Duas concentrações de AM foram testadas (25 e 50 μ M) para verificar o tipo de morte celular induzida.

6 DISCUSSÃO

Estudos pré-clínicos da terapia fotodinâmica foram primeiramente reportados desde o início dos anos 1900, demonstrando a relação direta do comprimento de onda da luz com o tipo de corante utilizado (RAAB, 1900) e posteriormente, o termo “fotodinâmica” passa a ser utilizado por Von Tappeiner (1907) para se referir a essa fotossensibilização. É uma terapia bem documentada e em evolução, que vem sendo utilizada para tratamentos de lesões pré-câncer e afecções cutâneas benignas na dermatologia (ACKROYD et al., 2001; RKEIN; OZOG, 2014; ISSA; BOECHAT; FASSINI, 2016), da cavidade oral (PRAÏMO et al., 2016; TORATANI et al., 2016) e nas terapias microbidas, antiparasitários (CAMACHO-ALONSO et al., 2017; LIM DJ, 2021) e antivirais (SVYATCHENKO et al., 2021). Mais recentemente, estudos vêm relatando os efeitos benéficos da terapia fotodinâmica no combate aos diferentes tipos de câncer (TARDIVO et al., 2005; LOU et al., 2008; LIM et al., 2013; YAMAUCHI et al., 2015; BERNDT-PAETZ et al., 2017). Dessa forma avaliamos a ação antitumoral da terapia fotodinâmica utilizando um laser vermelho de baixa potência em modelo experimental *in vitro* murino.

Geralmente, uma fonte de luz, um fotossensibilizador e oxigênio são os 3 componentes necessários da TFD. Após a ativação do fotossensibilizador pela luz, ocorre a formação de EROs, desencadeando as reações tipo I e II descritas anteriormente (TARDIVO et al., 2005). O azul de metileno como fotossensibilizador é aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) e pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (ORMOND; FREEMAN, 2013) e é barato, de fácil acesso e pode ser administrado por via intravenosa, intraperitoneal ou de forma tópica nas células de interesse (VAN DONGEN GA et al., 2004; MOAN; PENG, 2003). Possui uma forte absorção na região entre 550 - 700nm e máxima absorvidade molar em 664nm (JUNQUEIRA et al., 2002). O AM é capaz de promover tanto a reação fotoquímica do tipo I quanto a reação fotoquímica do tipo II na TFD (TARDIVO et al., 2005) e tem demonstrado não possuir toxicidade em células sadias (TARDIVO et al., 2005; LOU et al., 2008).

Com a finalidade de estabelecer tanto uma concentração de AM que não causasse toxicidade nas células, quanto garantisse uma ativação do FS ao ser

irradiado pela luz, foram realizados testes de viabilidade nas células 4T1. Primeiramente, diferentes concentrações de AM (0-150 μM) foram testadas em três tempos de incubação: 10, 15 e 30 min. Nos dois primeiros tempos de incubação, nossos resultados não demonstraram nenhum efeito citotóxico nas células 4T1 para nenhuma concentração analisada. Por outro lado, quando essas concentrações foram utilizadas para a TFD, não demonstraram diferenças na viabilidade celular (dados não reportados). Com isso, o tempo de 30 min foi testado. Em nosso estudo, após 30 min de incubação, as concentrações superiores a 100 μM demonstraram ser tóxicas para células 4T1. Dessa forma, as concentrações de 25 e 50 μM foram escolhidas para avaliar a viabilidade celular após a TFD. Nossos resultados indicaram que a concentração de AM de 50 μM obteve melhor resposta, levando a uma redução da viabilidade das células e tendo bons efeitos para utilização na TFD em células tumorais da linhagem 4T1.

Diversos trabalhos têm reportado os efeitos do AM-TDF em culturas de células, utilizando diferentes concentrações e tempos de incubação do AM e doses do laser vermelho de baixa potência (Mellish et al., 2002; Jiang et al., 2019; Turchiello et al., 2021), gerando assim uma dificuldade na comparação dos resultados. Mais ainda, os diferentes tipos celulares analisados também apresentam respostas distintas a concentração do AM. Turchiello e col (2021) analisaram dois tipos de células de tumores de retina (Y79 e WERi-Rb) e relataram comportamentos citotóxicos nas concentrações de AM testadas (diferentes concentrações até 50 μM). Já Kofler e col (2018), utilizando uma linhagem de células de carcinoma oral, descreveram efeitos citotóxicos do AM em concentrações entre 40-160 μM mas em tempos de incubações menores (2, 6 e 8 min).

A capacidade de migração das células 4T1 foi testada através do ensaio *wound healing*, demonstrando que ambas as concentrações de AM testadas são capazes de desacelerar a migração das células 4T1. Enquanto os grupos controle e laser apresentaram um fechamento da ranhura entre 24-48h, respectivamente, os grupos TFD 25 μM e TFD 50 μM só demonstraram esse fechamento total após 72h. Dentre esses dois grupos de TFD, a concentração de 50 μM ainda apresentou um melhor resultado, diminuindo mais ainda a

atividade de migração dessas células. Esse é um excelente achado a favor da TFD, já que células tumorais apresentam um grande poder de migração nos processos de metástases.

Com a redução da viabilidade celular, fez-se necessário investigar os tipos de mortes envolvidos. Em consequência da TFD, diferentes tipos de mortes já foram descritos, dentre as mais comuns estão a apoptose, necrose e autofagia (DOI, 2022). Quando se trata de uma massa tumoral *in vivo*, diferentes tipos de mortes podem estar ocorrendo ao mesmo tempo, levando a que diversos autores consideram como morte celular multimodal (KESSEL, 2006; SANTOS, 2016; MOKOENA, et al., 2021). Uma das hipóteses levantadas é devido as células receberem diferentes concentrações do fotossensibilizador e diferentes doses de irradiação da luz, de acordo com suas localizações anatômicas. Entretanto, em cultura de células (especialmente as monocamadas), todas as células recebem mesmas quantidades de fotossensibilizador e irradiação da luz, e quando há morte nessas células, praticamente todas são por uma ou duas vias.

A apoptose foi avaliada nesse trabalho através da expressão de dois genes: um pró-apoptótico (Bcl-2) e um anti-apoptótico (caspase-6). Genes pertencentes a família Bcl-2 são importantes marcadores para a tumorigênese e terapêutica contra o câncer, graças ao papel regulador da apoptose pelas proteínas dessa família. Células tumorais podem adquirir resistência a apoptose pelo aumento da expressão de proteínas anti-apoptóica, como a Bcl-2 ou pela diminuição da expressão de proteínas anti-apoptóticas dessa família, como por exemplo a Bax (Hassan et al., 2014). Usuda e col., (2003) descreveram exatamente o papel dessas duas proteínas em seu trabalho, demonstrando que após a TFD, utilizando um fotossensibilizador de 2ª geração e luz LED, ocorre um aumento na expressão da Bcl-2 e a diminuição da na relação Bax/Bcl-2, o que pode levar a resistência dessas células tumorais a morte. Nossos resultados demonstram uma regulação dos níveis relativos de mRNA para Bcl-2 no grupo TFD 25 μ M, quando comparado com o grupo controle. Apesar de não ser uma quantificação da proteína Bcl-2, essa redução observada na expressão pode indicar uma menor possibilidade de resistência das células 4T1 à morte. Sabe-se que níveis elevados de proteína Bcl-2 estão

relacionados à resistência das células aos diferentes tipos de tratamento, incluindo a TFD (Aniogo et al., 2020).

Uma das vias mais descritas e bem caracterizadas para o início da apoptose é a via caspase-dependente, que inclui a saída do citocromo C da mitocôndria para o citosol, ativação do fator-1 e pró-caspase-9, levando a ativação da caspase-3. A ativação da caspase-3 desencadeando então uma série de eventos nucleares, culminando com a fragmentação de DNA (Carvalho e Recco-Pimentel, 2019). Embora muitos tipos de caspases já tenham sido identificadas, apenas as caspases-3, -6 e -7 são classificadas como executoras, ou seja, são responsáveis pela clivagem de substâncias específicas que causam a morte celular (Alberts, 2008; Carvalho e Recco-Pimentel, 2019). A caspase-6 é responsável pela clivagem das lâminas A/C, que são estruturas fibrilares associadas às proteínas nucleares e que estão envolvidas com a manutenção física do envoltório nuclear, a organização periférica da cromatina e a replicação do DNA (Alberts et al., 2008; Shahzidi et al., 2013). Em nossos estudos, os níveis relativos de mRNA para caspase-6 não foram alterados significativamente após os tratamentos testados (Iasquer, TFD 25 μ M e TFD 50 μ M). Uma das hipóteses para a não alteração da expressão desse gene pode estar relacionada com o tempo de coleta do material, que ocorreu após 72h dos tratamentos. Takahashi e col., (2003) demonstraram que a ativação das caspases-3, -6 e -9 em seu modelo experimental ocorreu em maior quantidade cerca de 6 horas após o tratamento. Adicionalmente, Granville e col., (2001) também descreveram uma melhor observação da caspase-6 após 2 horas da TFD. Com relação à expressão da caspase-6, McIlwain e col., (2013) citam que em algumas amostras de câncer a caspase-6 está diminuída, sugerindo que a diminuição da caspase-6 pode estar envolvida no mecanismo de desenvolvimento do câncer. Já Shahzidi e col., (2013) sugerem que a ativação da caspase-6 é independente da ativação da caspase-3, levando através da destruição de componentes da matriz nuclear, à apoptose. A caspase-6 também está envolvida nos eventos morfológicos nucleares durante a apoptose, como a fragmentação do DNA e matriz nuclear e a formação dos corpos apoptóticos (Ruchaud et al., 2002).

Por outro lado, há diversos estudos que demonstram vias independentes das caspases executoras, ativando outros tipos de caspases, como a -8, o que pode desencadear as demais vias de morte, incluindo a autofagia (dos Santos et al., 2017). Estudos futuros do nosso grupo visam esclarecer melhor quais tipos de mortes podem estar relacionados com a TFD nas concentrações de AM e dose de laser testadas, buscando relacionar a expressão gênica com a suas respectivas proteínas, possíveis formações de autofagossomos, bem como descrever também se há participação da necrose.

7 CONCLUSÃO

A terapia fotodinâmica usando azul de metileno como fotossensibilizador foi capaz de reduzir a viabilidade celular sem toxicidade em linhagem de tumor de mama murino 4T1, em duas concentrações testadas: 25 e 50 μ M, sendo a última com resultados mais satisfatórios, incluindo a redução na migração dessas células. Concentrações de 100 e 150 μ M apresentaram citotoxicidade celular no tempo de incubação de 30 min. Os níveis relativos de mRNA para caspase-6 não foram alterados com os tratamentos testados, enquanto os níveis relativos para Bcl-2 foram regulados na terapia fotodinâmica com a concentração de 25 μ M. Mais experimentos serão realizados futuramente com a finalidade de descrever melhor esses processos de morte envolvidos, bem como análises *in vivo*.

8 REFERÊNCIAS

1. A PULASKI, B; TERMAN, D s; KHAN, S; MULLER, E; OSTRAND-ROSENBERG, S. Cooperativity of Staphylococcal aureus enterotoxin B superantigen, major histocompatibility complex class II, and CD80 for immunotherapy of advanced spontaneous metastases in a clinically relevant postoperative mouse breast cancer model. **Cancer Res.** [S.I.], p. 2710-5. maio 2000.

2. ACKROYD, Roger; KELTY, Clive; BROWN, Nicola; REED, Malcolm. The History of Photodetection and Photodynamic Therapy. **Photochemistry And Photobiology**, [S.L.], v. 74, n. 5, p. 656-669, 1 maio 2007. American Society for Photobiology. [http://dx.doi.org/10.1562/0031-8655\(2001\)0740656thopap2.0.co2](http://dx.doi.org/10.1562/0031-8655(2001)0740656thopap2.0.co2).
3. AGOSTINIS, Patrizia; BERG, Kristian; CENGEL, Keith A.; FOSTER, Thomas H.; GIROTTI, Albert W.; GOLLNICK, Sandra O.; HAHN, Stephen M.; HAMBLIN, Michael R.; JUZENIENE, Asta; KESSEL, David. Photodynamic therapy of cancer: an update. **Ca: A Cancer Journal for Clinicians**, [S.L.], v. 61, n. 4, p. 250-281, 26 maio 2011. Wiley. <http://dx.doi.org/10.3322/caac.20114>.
4. ALBERTS, Bruce; JOHNSON, Alexander; LEWIS, Julian; RAFF, Martin; ROBERTS, Keith; WALTER, Peter. **Molecular Biology of the cell**. 5. ed. Nova Iorque: Garland Science, 2008. 1392 p.
5. ALZEIBAK, Razan; MISHCHENKO, Tatiana A.; SHILYAGINA, Natalia Y.; BALALAEVA, Irina V.; VEDUNOVA, Maria V.; KRYSKO, Dmitri V.. Targeting immunogenic cancer cell death by photodynamic therapy: past, present and future. **Journal For Immunotherapy Of Cancer**, [S.L.], v. 9, n. 1, p. 1926-1927, jan. 2021. BMJ. <http://dx.doi.org/10.1136/jitc-2020-001926>.
6. ANDRZEJAK, Michelle; PRICE, Michael; KESSEL, David H.. Apoptotic and autophagic responses to photodynamic therapy in 1c1c7 murine hepatoma cells. **Autophagy**, [S.L.], v. 7, n. 9, p. 979-984, set. 2011. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.4161/auto.7.9.15865>.
7. ANIOGO, Eric Chekwube; GEORGE, Blassan Plackal Adimuriyil; ABRAHAMSE, Heidi. Role of Bcl-2 Family Proteins in Photodynamic Therapy Mediated Cell Survival and Regulation. **Molecules**, [S.L.], v. 25, n. 22, p. 5308, 13 nov. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules25225308>.
8. ANJOS, Lúcia Mara Januário dos; FONSECA, Adenilson de Souza da; GAMEIRO, Jacy; PAOLI, Flávia de. Apoptosis induced by low-level laser in polymorphonuclear cells of acute joint inflammation: comparative analysis of two energy densities. **Lasers In Medical Science**, [S.L.], v.

- 32, n. 5, p. 975-983, 5 abr. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10103-017-2196-8>.
9. ANZENGRUBER, Florian; AVCI, Pinar; FREITAS, Lucas Freitas de; HAMBLIN, Michael R.. T-cell mediated anti-tumor immunity after photodynamic therapy: why does it not always work and how can we improve it?. **Photochemical & Photobiological Sciences**, [S.L.], v. 14, n. 8, p. 1492-1509, 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1039/c4pp00455h>.
 10. ASLAKSON, CJ; MILLER, FR. Selective events in the metastatic process defined by analysis of the sequential dissemination of subpopulations of a mouse mammary tumor. **Cancer Res.** [S.I.], V.52, N. 6, p. 1399-405. 15 mar. 1992.
 11. ATAMNA, Hani; NGUYEN, Andy; SCHULTZ, Carla; BOYLE, Kathleen; NEWBERRY, Justin; KATO, Hiroyuki; AMES, Bruce N.. Methylene blue delays cellular senescence and enhances key mitochondrial biochemical pathways. **The FASEB Journal**, [S.L.], v. 22, n. 3, p. 703-712, 10 out. 2007. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1096/fj.07-9610com>.
 12. BACELLAR, Isabel; TSUBONE, Tayana; PAVANI, Christiane; BAPTISTA, Mauricio. Photodynamic Efficiency: from molecular photochemistry to cell death. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 16, n. 9, p. 20523-20559, 31 ago. 2015. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms160920523>.
 13. BERNDT-PAETZ, Mandy; WEIMANN, Annett; SIEGER, Nadine; SCHASTAK, Stanislaw; RIYAD, Yasser M.; GRIEBEL, Jan; ARTHANAREESWARAN, Vinodh K.A.; STOLZENBURG, Jens-Uwe; NEUHAUS, Jochen. Tetrahydroporphyrin-tetratosylat (THPTS): a near-infrared photosensitizer for targeted and efficient photodynamic therapy (pdt) of human bladder carcinoma. an in vitro study. **Photodiagnosis And Photodynamic Therapy**, [S.L.], v. 18, p. 244-251, jun. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pdpdt.2017.02.017>.
 14. CAMACHO-ALONSO, Fabio; JULIÁN-BELMONTE, Encarnación; CHIVA-GARCÍA, Fernando; MARTÍNEZ-BENEYTO, Yolanda. Bactericidal Efficacy of Photodynamic Therapy and Chitosan in Root Canals Experimentally Infected with *Enterococcus faecalis*: an in vitro

- study. **Photomedicine And Laser Surgery**, [S.L.], v. 35, n. 4, p. 184-189, abr. 2017. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/pho.2016.4148>.
15. CANUTO, K s; SERGIO, L P s; MARCIANO, R s; GUIMARÃES, O R; POLIGNANO, G A C; GELLER, M; PAOLI, F; FONSECA, A s. DNA repair in bacterial cultures and plasmid DNA exposed to infrared laser for treatment of pain. **Laser Physics Letters**, [S.L.], v. 10, n. 6, p. 065606, 8 maio 2013. IOP Publishing. <http://dx.doi.org/10.1088/1612-2011/10/6/065606>.
 16. CANUTO, K s; SERGIO, L P s; PAOLI, F; MENCALHA, A L; FONSECA, A s. Low-level lasers affect uncoupling protein gene expression in skin and skeletal muscle tissues. **Laser Physics**, [S.L.], v. 26, n. 3, p. 035601, 11 fev. 2016. IOP Publishing. <http://dx.doi.org/10.1088/1054-660x/26/3/035601>.
 17. CARVALHO, Hernandes F.; RECCO-PIMENTEL, Shirlei Maria. **A CÉLULA**. 4. ed. [S.I.]: Manole, 2019. 640 p.
 18. CASTANO, Ana P.; DEMIDOVA, Tatiana N.; HAMBLIN, Michael R.. Mechanisms in photodynamic therapy: part one.: photosensitizers, photochemistry and cellular localization. **Photodiagnosis And Photodynamic Therapy**, [S.L.], v. 1, n. 4, p. 279-293, dez. 2004. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1572-1000\(05\)00007-4](http://dx.doi.org/10.1016/s1572-1000(05)00007-4).
 19. CASTANO, Ana P.; DEMIDOVA, Tatiana N.; HAMBLIN, Michael R.. Mechanisms in photodynamic therapy: part two.: cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death. **Photodiagnosis And Photodynamic Therapy**, [S.L.], v. 2, n. 1, p. 1-23, mar. 2005. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1572-1000\(05\)00030-x](http://dx.doi.org/10.1016/s1572-1000(05)00030-x).
 20. CASTANO, Ana P.; DEMIDOVA, Tatiana N.; HAMBLIN, Michael R.. Mechanisms in photodynamic therapy: part three.: photosensitizer pharmacokinetics, biodistribution, tumor localization and modes of tumor destruction. **Photodiagnosis And Photodynamic Therapy**, [S.L.], v. 2, n. 2, p. 91-106, jun. 2005. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1572-1000\(05\)00060-8](http://dx.doi.org/10.1016/s1572-1000(05)00060-8).

21. CHEN, Bin; POGUE, Brian W.; HOOPEES, P. Jack; HASAN, Tayyaba. Vascular and Cellular Targeting for Photodynamic Therapy. **Critical Reviews™ In Eukaryotic Gene Expression**, [S.L.], v. 16, n. 4, p. 279-306, 2006. Begell House. <http://dx.doi.org/10.1615/critreveukargeneexpr.v16.i4.10>.
22. CHEN, Yongjun; ZHENG, Wei; LI, Yingqian; ZHONG, Jieying; JI, Jianguo; SHEN, Pingping. Apoptosis induced by methylene-blue-mediated photodynamic therapy in melanomas and the involvement of mitochondrial dysfunction revealed by proteomics. **Cancer Science**, [S.L.], v. 10, n. 99, p. 2019-27, out. 2008. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1349-7006.2008.00910.x>.
23. CIEPLIK, Fabian; DENG, Dongmei; CRIELAARD, Wim; BUCHALLA, Wolfgang; HELLWIG, Elmar; AL-AHMAD, Ali; MAISCH, Tim. Antimicrobial photodynamic therapy – what we know and what we don't. **Critical Reviews In Microbiology**, [S.L.], v. 44, n. 5, p. 571-589, 11 maio 2018. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/1040841x.2018.1467876>.
24. CONGDON, Erin E.; WU, Jessica W.; MYEKU, Natura; FIGUEROA, Yvette H.; HERMAN, Mathieu; MARINEC, Paul S.; GESTWICKI, Jason E.; DICKEY, Chad A.; YU, W. Haung; DUFF, Karen E.. Methylthioninium chloride (methylene blue) induces autophagy and attenuates tauopathy in vitro and in vivo. **Autophagy**, [S.L.], v. 8, n. 4, p. 609-622, abr. 2012. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.4161/auto.19048>.
25. DąBROWSKI, Janusz M.; ARNAUT, Luis G.. Photodynamic therapy (PDT) of cancer: from local to systemic treatment. **Photochemical & Photobiological Sciences**, [S.L.], v. 14, n. 10, p. 1765-1780, 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1039/c5pp00132c>.
26. DETTY, Michael R.; GIBSON, Scott L.; WAGNER, Stephen J.. Current Clinical and Preclinical Photosensitizers for Use in Photodynamic Therapy. **Journal Of Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 47, n. 16, p. 3897-3915, 19 jun. 2004. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jm040074b>.

27. DEVI, D. Gayathri; CIBIN, T.R.; RAMAIAH, D.; ABRAHAM, Annie. Bis(3,5-diiodo-2,4,6-trihydroxyphenyl)squaraine: a novel candidate in photodynamic therapy for skin cancer models in vivo. **Journal Of Photochemistry And Photobiology B: Biology**, [S.L.], v. 92, n. 3, p. 153-159, set. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2008.06.002>.
28. DEXTER, D L; KOWALSKI, H M; A BLAZAR, B; FLIGIEL, Z; VOGEL, R; HEPPNER, G H. Heterogeneity of tumor cells from a single mouse mammary tumor. **Cancer Res.** [S.I.], p. 3174-81. out. 1978.
29. DOI, Songila Maria da Silva Rocha; LIMA, Ildercílio Mota de Souza; MASCHIARI, César Arruda; RODRIGUEZ, Anselmo Fortunato Ruiz; FARIA, Fernando Sérgio Escócio Drummond Viana de. Combinação da terapia fotodinâmica e extratos naturais no tratamento de câncer / The combination of photodynamic therapy and natural compounds in cancer treatment. **Brazilian Journal Of Development**, [S.L.], v. 8, n. 1, p. 3844-3874, 14 jan. 2022. South Florida Publishing LLC. <http://dx.doi.org/10.34117/bjdv8n1-253>.
30. DONOHOE, Claire; SENGE, Mathias O.; ARNAUT, Luís G.; GOMES-DA-SILVA, Lígia C.. Cell death in photodynamic therapy: from oxidative stress to anti-tumor immunity. **Biochimica Et Biophysica Acta (Bba) - Reviews On Cancer**, [S.L.], v. 1872, n. 2, p. 188308, dez. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbcan.2019.07.003>.
31. DUAN, Xiaopin; CHAN, Christina; GUO, Nining; HAN, Wenbo; WEICHSELBAUM, Ralph R.; LIN, Wenbin. Photodynamic Therapy Mediated by Nontoxic Core-Shell Nanoparticles Synergizes with Immune Checkpoint Blockade To Elicit Antitumor Immunity and Antimetastatic Effect on Breast Cancer. **Journal Of The American Chemical Society**, [S.L.], v. 138, n. 51, p. 16686-16695, 15 dez. 2016. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jacs.6b09538>.
32. DUNN, David A.; LIN, Vivian H.; KOICHEVAR, Irene E.. THE ROLE OF GROUND STATE COMPLEXATION IN THE ELECTRON TRANSFER QUENCHING OF METHYLENE BLUE FLUORESCENCE BY PURINE NUCLEOTIDES. **Photochemistry And Photobiology**, [S.L.], v. 53, n. 1,

- p. 47-56, jan. 1991. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1751-1097.1991.tb08466.x>.
- 33.ELMORE, Susan. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicologic Pathology**, [S.L.], v. 35, n. 4, p. 495-516, jun. 2007. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1080/01926230701320337>.
- 34.FONSECA, A. S.; PRESTA, G. A.; GELLER, M.; PAOLI, F.. Low intensity infrared laser induces filamentation in Escherichia coli cells. **Laser Physics**, [S.L.], v. 21, n. 10, p. 1829-1837, 3 ago. 2011. Pleiades Publishing Ltd. <http://dx.doi.org/10.1134/s1054660x11170051>.
- 35.FONSECA, A. S.; TEIXEIRA, A. F.; PRESTA, G. A.; GELLER, M.; VALENÇA, S. S.; PAOLI, F.. Low intensity infrared laser effects on Escherichia coli cultures and plasmid DNA. **Laser Physics**, [S.L.], v. 22, n. 10, p. 1635-1641, 3 set. 2012. Pleiades Publishing Ltd. <http://dx.doi.org/10.1134/s1054660x12100076>.
- 36.FONSECA, Adenilson S.; MOREIRA, Thiago O.; PAIXÃO, Deise L.; FARIAS, Fernanda M.; GUIMARÃES, Oscar R.; PAOLI, Severo de; GELLER, Mauro; PAOLI, Flavia de. Effect of laser therapy on DNA damage. **Lasers In Surgery And Medicine**, [S.L.], v. 42, n. 6, p. 481-488, 20 jul. 2010. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/lsm.20921>.
- 37.GALLUZZI, Lorenzo; BUQUÉ, Aitziber; KEPP, Oliver; ZITVOGEL, Laurence; KROEMER, Guido. Immunogenic cell death in cancer and infectious disease. **Nature Reviews Immunology**, [S.L.], v. 17, n. 2, p. 97-111, 17 out. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nri.2016.107>.
- 38.GALVAN, Jessica; BORSOI, Mariana Xavier; JULEK, Luciana; BORDIN, Danielle; CABRAL, Luciane Patrícia Andreani; POMINI, Marcos Cezar; ALVES, Fabiana Bucholdz Teixeira. Methylene Blue for the Treatment of Health Conditions: a scoping review. **Brazilian Archives Of Biology And Technology**, [S.L.], v. 64, p. [S.I.], 2021. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4324-20212002660266>.
- 39.GAVISH, Lilach; ASHER, Yael; BECKER, Yechiel; KLEINMAN, Yosef. Low level laser irradiation stimulates mitochondrial membrane potential and disperses subnuclear promyelocytic leukemia protein. **Lasers In**

- Surgery And Medicine**, [S.L.], v. 35, n. 5, p. 369-376, 2004. Wiley.
<http://dx.doi.org/10.1002/lsm.20108>.
40. GOMES, Gerson G.; PIETROCOLA, Maurício. O experimento de Stern-Gerlach e o spin do elétron: um exemplo de quasi-história. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, [S.L.], v. 33, n. 2, p. [S,I,], jun. 2011. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1806-11172011000200019>.
41. GOMES, Laura Calazans de Melo. **Uso da Terapia Laser Fotodinâmica Associada ao Azul de Metileno (PDT-MB) em Células Tumorais de Próstata Humanas (PC3)**. 2021. 57 f. TCC (Graduação) - Curso de Bacharel em Biotecnologia., Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2021.
42. GOMES-DA-SILVA, Lígia C.; KEPP, Oliver; KROEMER, Guido. Regulatory approval of photoimmunotherapy: photodynamic therapy that induces immunogenic cell death. **Oncoimmunology**, [S.L.], v. 9, n. 1, 1 jan. 2020. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/2162402x.2020.1841393>.
43. GRANVILLE, David J.; CASSIDY, Brigid A.; RUEHLMANN, Dietrich O.; CHOY, Jonathan C.; BRENNER, Catherine; KROEMER, Guido; VAN BREEMEN, Cornelis; MARGARON, Philippe; HUNT, David W.; MCMANUS, Bruce M.. Mitochondrial Release of Apoptosis-Inducing Factor and Cytochrome c During Smooth Muscle Cell Apoptosis. **The American Journal Of Pathology**, [S.L.], v. 159, n. 1, p. 305-311, jul. 2001. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0002-9440\(10\)61696-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0002-9440(10)61696-3).
44. GUNAYDIN, Gurcan; GEDIK, M. Emre; AYAN, Seylan. Photodynamic Therapy—Current Limitations and Novel Approaches. **Frontiers In Chemistry**, [S.L.], v. 9, p. 1-2, 10 jun. 2021. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fchem.2021.691697>.
45. HANAHAN, Douglas. Hallmarks of Cancer: new dimensions. **Cancer Discovery**, [S.L.], v. 12, n. 1, p. 31-46, 1 jan. 2022. American Association for Cancer Research (AACR). <http://dx.doi.org/10.1158/2159-8290.cd-21-1059>.

46. HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert. The Hallmarks of Cancer. **Cell**, [S.L.], v. 100, n. 1, p. 57-70, jan. 2000. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81683-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81683-9).
47. HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A.. Hallmarks of Cancer: the next generation. **Cell**, [S.L.], v. 144, n. 5, p. 646-674, mar. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.
48. HASSAN, Mohamed; WATARI, Hidemichi; ABUALMAATY, Ali; OHBA, Yusuke; SAKURAGI, Noriaki. Apoptosis and Molecular Targeting Therapy in Cancer. **Biomed Research International**, [S.L.], v. 2014, p. 1-23, 12 jun. 2014. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/150845>.
49. HAWKINS, Denise; ABRAHAMSE, Heidi. Effect of Multiple Exposures of Low-Level Laser Therapy on the Cellular Responses of Wounded Human Skin Fibroblasts. **Photomedicine And Laser Surgery**, [S.L.], v. 24, n. 6, p. 705-714, dez. 2006. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/pho.2006.24.705>.
50. HU, Tingting; WANG, Zhengdi; SHEN, Weicheng; LIANG, Ruizheng; YAN, Dan; WEI, Min. Recent advances in innovative strategies for enhanced cancer photodynamic therapy. **Theranostics**, [S.L.], v. 11, n. 7, p. 3278-3300, 2021. Ivyspring International Publisher. <http://dx.doi.org/10.7150/thno.54227>.
51. INCA, Instituto Nacional do Câncer. **Estatística de Câncer**. 2020. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>. Acesso em: 13 jun. 2022.
52. ISSA, Maria Claudia Almeida; BOECHAT, Mariana; FASSINI, Aline Cairo. Photodynamic therapy in Brazil: 10 years of history. **Surgical & Cosmetic Dermatology**, [S.L.], v. 8, n. 4, p. 16-22, 2016. GN1 Genesis Network. <http://dx.doi.org/10.5935/scd1984-8773.201683102>.
53. JORI, Giulio. Tumour photosensitizers: approaches to enhance the selectivity and efficiency of photodynamic therapy. **Journal Of Photochemistry And Photobiology B: Biology**, [S.L.], v. 36, n. 2, p. 87-93, nov. 1996. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1011-1344\(96\)07352-6](http://dx.doi.org/10.1016/s1011-1344(96)07352-6).

54. JUNQUEIRA, Helena C.; SEVERINO, Divinomar; DIAS, Luis G.; GUGLIOTTI, Marcos S.; BAPTISTA, Mauricio S.. **Modulation of methylene blue photochemical properties based on adsorption at aqueous micelle interfaces**. 11. ed. [S.l.]: Physical Chemistry Chemical Physics, 2002.
55. KARU, T. I. Low power laser therapy. In: **Biomedical Photonics Handbook**, Tuan Vo-Dinh, ed., CRC Press, Boca Raton: Ch, 48 2003b.
56. KARU, T.I.; KOLYAKOV, S.F.. Exact Action Spectra for Cellular Responses Relevant to Phototherapy. **Photomedicine And Laser Surgery**, [S.L.], v. 23, n. 4, p. 355-361, ago. 2005. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/pho.2005.23.355>.
57. KARU, Tiina. **The Science of Low-Power Laser Therapy**. [S.l.]: Gordon And Breach Science Publishers, 1998. 299 p.
58. KARU, Tuna. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. **Journal Of Photochemistry And Photobiology B: Biology**, [S.L.], v. 49, n. 1, p. 1-17, mar. 1999. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1011-1344\(98\)00219-x](http://dx.doi.org/10.1016/s1011-1344(98)00219-x).
59. KESSEL, David. Death pathways associated with photodynamic therapy. **Medical Laser Application**, [S.L.], v. 21, n. 4, p. 219-224, nov. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mla.2006.05.006>.
60. KESSEL, David; VICENTE, M. Graça H.; REINERS, John J.. Initiation of apoptosis and autophagy by photodynamic therapy. **Lasers In Surgery And Medicine**, [S.L.], v. 38, n. 5, p. 482-488, 2006. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/lsm.20334>.
61. KOFLER, Barbara; ROMANI, Angela; PRITZ, Christian; STEINBICHLER, Teresa; SCHARTINGER, Volker; RIECHELMANN, Herbert; DUDAS, Jozsef. Photodynamic Effect of Methylene Blue and Low Level Laser Radiation in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Cell Lines. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 19, n. 4, p. 1107, 7 abr. 2018. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms19041107>.
62. KROEMER, Guido; GALLUZZI, Lorenzo; KEPP, Oliver; ZITVOGEL, Laurence. Immunogenic Cell Death in Cancer Therapy. **Annual Review Of Immunology**, [S.L.], v. 31, n. 1, p. 51-72, 21 mar. 2013. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-immunol-032712-100008>.

63. KROEMER, Guido; JÄÄTTELÄ, Marja. Lysosomes and autophagy in cell death control. **Nature Reviews Cancer**, [S.L.], v. 5, n. 11, p. 886-897, 20 out. 2005. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrc1738>.
64. KUSHIBIKI, Toshihiro; HIRASAWA, Takeshi; OKAWA, Shinpei; ISHIHARA, Miya. Blue Laser Irradiation Generates Intracellular Reactive Oxygen Species in Various Types of Cells. **Photomedicine And Laser Surgery**, [S.L.], v. 31, n. 3, p. 95-104, mar. 2013. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/pho.2012.3361>.
65. LELEKAKIS, Maria; MOSELEY, Jane M.; MARTIN, T. John; HARDS, Daphne; WILLIAMS, Elizabeth; HO, Patricia; LOWEN, Darren; JAVNI, Jeannie; MILLER, Fred R.; SLAVIN, John. A novel orthotopic model of breast cancer metastasis to bone. **Clinical & Experimental Metastasis**, [S.L.], v. 17, n. 2, p. 163-170, 1999. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1023/a:1006689719505>.
66. LEMASTERS, John J.. Dying a Thousand Deaths: redundant pathways from different organelles to apoptosis and necrosis. **Gastroenterology**, [S.L.], v. 129, n. 1, p. 351-360, jul. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2005.06.006>.
67. LI, Wei; YANG, Jie; LUO, Lihua; JIANG, Mengshi; QIN, Bing; YIN, Hang; ZHU, Chunqi; YUAN, Xiaoling; ZHANG, Junlei; LUO, Zhenyu. Targeting photodynamic and photothermal therapy to the endoplasmic reticulum enhances immunogenic cancer cell death. **Nature Communications**, [S.L.], v. 10, n. 1, 26 jul. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-019-11269-8>.
68. LI, Xingshu; LOVELL, Jonathan F.; YOON, Juyoung; CHEN, Xiaoyuan. Clinical development and potential of photothermal and photodynamic therapies for cancer. **Nature Reviews Clinical Oncology**, [S.L.], v. 17, n. 11, p. 657-674, 22 jul. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41571-020-0410-2>.
69. LIM, Dong-Jin. Methylene Blue-Based Nano and Microparticles: fabrication and applications in photodynamic therapy. **Polymers**, [S.L.], v. 13, n. 22, p. 3955, 16 nov. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/polym13223955>.

70. LIM, Eun Jin; OAK, Chul-Ho; HEO, Jeonghoon; KIM, Young-Ho. Methylene blue-mediated photodynamic therapy enhances apoptosis in lung cancer cells. **Oncology Reports**, [S.L.], v. 30, n. 2, p. 856-862, 24 maio 2013. Spandidos Publications. <http://dx.doi.org/10.3892/or.2013.2494>.
71. LIVAK, Kenneth J.; SCHMITTGEN, Thomas D.. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. **Methods**, [S.L.], v. 25, n. 4, p. 402-408, dez. 2001. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
72. LOU, Yuanmei; PREOBRAZHENSKA, Olena; KELLER, Ulrich Auf Dem; SUTCLIFFE, Margaret; BARCLAY, Lorena; MCDONALD, Paul C.; ROSKELLEY, Calvin; OVERALL, Christopher M.; DEDHAR, Shoukat. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) is not sufficient for spontaneous murine breast cancer metastasis. **Developmental Dynamics**, [S.L.], v. 237, n. 10, p. 2755-2768, 4 set. 2008. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/dvdy.21658>.
73. LU, Yan; JIAO, Ruiqing; CHEN, Xiaoping; ZHONG, Jieying; JI, Jianguo; SHEN, Pingping. Methylene blue-mediated photodynamic therapy induces mitochondria-dependent apoptosis in HeLa Cell. **Journal Of Cellular Biochemistry**, [S.L.], v. 105, n. 6, p. 1451-1460, 15 dez. 2008. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jcb.21965>.
74. LUO, Wei; LIU, Rong-Sen; ZHU, Jian-Guo; LI, Ying-Chao; LIU, Hong-Chen. Subcellular location and photodynamic therapeutic effect of chlorin e6 in the human tongue squamous cell cancer Tca8113 cell line. **Oncology Letters**, [S.L.], v. 9, n. 2, p. 551-556, 20 nov. 2014. Spandidos Publications. <http://dx.doi.org/10.3892/ol.2014.2720>.
75. MARCIANO, Roberta da Silva; SERGIO, Luiz Philippe da Silva; POLIGNANO, Giovanni Augusto Castanheira; PRESTA, Giuseppe Antonio; GUIMARÃES, Oscar Roberto; GELLER, Mauro; PAOLI, Severo de; PAOLI, Flavia de; FONSECA, Adenilson de Souza da. Laser for treatment of aphthous ulcers on bacteria cultures and DNA. **Photochemical & Photobiological Sciences**, [S.L.], v. 11, n. 9, p. 1476, 2012. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1039/c2pp25027f>.

76. MARTINS, Waleska K.; BELOTTO, Renata; SILVA, Maryana N.; GRASSO, Daniel; SURIANI, Mayne D.; LAVOR, Tayná S.; ITRI, Rosangela; BAPTISTA, Mauricio S.; TSUBONE, Tayana M.. Autophagy Regulation and Photodynamic Therapy: insights to improve outcomes of cancer treatment. **Frontiers In Oncology**, [S.L.], v. 10, p. 1-2, 20 jan. 2021. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fonc.2020.610472>.
77. MARTINS, Waleska K.; SANTOS, Nayra Fernandes; ROCHA, Cleidiane de Sousa; BACELLAR, Isabel O. L.; TSUBONE, Tayana Mazin; VIOTTO, Ana Cláudia; MATSUKUMA, Adriana Yamaguti; ABRANTES, Aline B. de P.; SIANI, Paulo; DIAS, Luís Gustavo. Parallel damage in mitochondria and lysosomes is an efficient way to photoinduce cell death. **Autophagy**, [S.L.], v. 15, n. 2, p. 259-279, 25 set. 2018. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/15548627.2018.1515609>.
78. MATÉRIA, Toda. **Espectro Eletromagnético**. Disponível em: <https://www.todamateria.com.br/espectro-eletromagnetico/>. Acesso em: 02 ago. 2022.
79. MATHERS, Colin D; LONCAR, Dejan. Projections of Global Mortality and Burden of Disease from 2002 to 2030. **Plos Medicine**, [S.L.], v. 3, n. 11, p. 442, 28 nov. 2006. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pmed.0030442>.
80. MCILWAIN, D. R.; BERGER, T.; MAK, T. W.. Caspase Functions in Cell Death and Disease. **Cold Spring Harbor Perspectives In Biology**, [S.L.], v. 5, n. 4, p. 8656-8656, 1 abr. 2013. Cold Spring Harbor Laboratory. <http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a008656>.
81. MCPHERSON, K. ABC of breast diseases: breast cancer--- epidemiology, risk factors, and genetics. **Bmj**, [S.L.], v. 321, n. 7261, p. 624-628, 9 set. 2000. BMJ. <http://dx.doi.org/10.1136/bmj.321.7261.624>.
82. MELLISH, Kirste J.; COX, Russell D.; VERNON, David I.; GRIFFITHS, John; BROWN, Stanley B.. In Vitro Photodynamic Activity of a Series of Methylene Blue Analogues. **Photochemistry And Photobiology**. N.I., p. 392-397. abr. 2002.
83. MELLO JUNIOR, Leônidas João de. **SILENCIAMENTO DOS GENES ANTIAPOPTÓTICOS BCL-2 E BCL-xL POR RNA DE INTERFERÊNCIA CARREADO POR NANOPARTÍCULAS HÍBRIDAS**

- EM CÂNCER DE MAMA.** 2017. 118 f. Tese (Doutorado) - Curso de Bioquímica, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2017.
84. MERCK. **Methylene Blue hydrate.** Disponível em: https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/product/sigma/m4159?gclid=Cj0KCQjw1tGUBhDXARIsAIJx01nIA5hF1h1TMEERBb_UyyNcWAauxOzuYyh4tG7xfgoe-87pRWGSD3kaAmESEALw_wcB. Acesso em: 30 maio 2022.
85. MOAN, J.; PENG, Q.; SORENSEN, R.; IANI, V.; NESLAND, J. M.. The Biophysical Foundations of Photodynamic Therapy. **Endoscopy**, [S.L.], v. 30, n. 04, p. 387-391, maio 1998. Georg Thieme Verlag KG. <http://dx.doi.org/10.1055/s-2007-1001288>.
86. MOAN, Johan; BERG, Kristian. THE PHOTODEGRADATION OF PORPHYRINS IN CELLS CAN BE USED TO ESTIMATE THE LIFETIME OF SINGLET OXYGEN. **Photochemistry And Photobiology**, [S.L.], v. 53, n. 4, p. 549-553, abr. 1991. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1751-1097.1991.tb03669.x>.
87. MOKOENA, Dimakatso R.; GEORGE, Blassan P.; ABRAHAMSE, Heidi. Photodynamic Therapy Induced Cell Death Mechanisms in Breast Cancer. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 22, n. 19, p. 10506, 29 set. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms221910506>.
88. MONROE, Jerry D.; BELEKOV, Ermek; ER, Ali Oguz; SMITH, Michael E.. Anticancer Photodynamic Therapy Properties of Sulfur-Doped Graphene Quantum Dot and Methylene Blue Preparations in MCF -7 Breast Cancer Cell Culture. **Photochemistry And Photobiology**, [S.L.], v. 95, n. 6, p. 1473-1481, 30 ago. 2019. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/php.13136>.
89. NATAL, Aline Martins Duboc. **Influência do pH na interação do Photofrin®, Photogem® e Photosan® com DMPC e lipoproteína de baixa densidade.** 2007. 90 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química Analítica, Instituto de Química de São Carlos, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2007
90. NATH, Shubhankar; OBAID, Girgis; HASAN, Tayyaba. The Course of Immune Stimulation by Photodynamic Therapy: bridging fundamentals of

- photochemically induced immunogenic cell death to the enrichment of t :cell repertoire. **Photochemistry And Photobiology**, [S.L.], v. 95, n. 6, p. 1288-1305, nov. 2019. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/php.13173>.
91. NCCN, National Comprehensive Cancer Network. **Guideline Breast Cancer**. 2020. Disponível em: <https://www.nccn.org/patients/guidelines/content/PDF/breast-invasive-patient.pdf>. Acesso em: 02 ago. 2021.
92. NI, Jiang; SONG, Jinfang; WANG, Bei; HUA, Haiying; ZHU, Huanhuan; GUO, Xiaoqiang; XIONG, Shuming; ZHAO, Yiqing. Dendritic cell vaccine for the effective immunotherapy of breast cancer. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [S.L.], v. 126, p. 110046, jun. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110046>.
93. NOODT, Barbra B.; RODAL, Gry Hege; WAINWRIGHT, Mark; PENG, Qian; HOROBIN, Richard; NESLAND, Jahn M.; BERG, Kristian. Apoptosis induction by different pathways with methylene blue derivative and light from mitochondrial sites in V79 cells. **International Journal Of Cancer**, [S.L.], v. 75, n. 6, p. 941-948, 16 mar. 1998. Wiley. [http://dx.doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0215\(19980316\)75:63.0.co;2-5](http://dx.doi.org/10.1002/(sici)1097-0215(19980316)75:63.0.co;2-5).
94. OBEID, Michel; TESNIERE, Antoine; GHIRINGHELLI, François; FIMIA, Gian Maria; APETOH, Lionel; PERFETTINI, Jean-Luc; CASTEDO, Maria; MIGNOT, Grégoire; PANARETAKIS, Theoharis; CASARES, Noelia. Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. **Nature Medicine**, [S.L.], v. 13, n. 1, p. 54-61, 24 dez. 2006. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nm1523>.
95. OCHSNER, M.. Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours. **Journal Of Photochemistry And Photobiology B: Biology**, [S.L.], v. 39, n. 1, p. 1-18, maio 1997. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1011-1344\(96\)07428-3](http://dx.doi.org/10.1016/s1011-1344(96)07428-3).
96. OLIVEIRA, Analú Barros de; FERRISSE, Túlio Morandin; MARQUES, Raquel Souza; ANNUNZIO, Sarah Raquel de; BRIGHENTI, Fernanda Lourenção; FONTANA, Carla Raquel. Effect of Photodynamic Therapy on Microorganisms Responsible for Dental Caries: a systematic review and meta-analysis. **International Journal Of Molecular Sciences**,

- [S.L.], v. 20, n. 14, p. 3585, 23 jul. 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms20143585>.
97. OLIVEIRA, Kleber Thiago de; SOUZA, Juliana Maria de; GOBO, Nicholas Roberto da Silva; ASSIS, Francisco Fávoro de; BROCKSOM, Timothy John. Basic Concepts and Applications of Porphyrins, Chlorins and Phthalocyanines as Photosensitizers in Photonic Therapies. **Revista Virtual de Química**, [S.L.], v. 7, n. 1, p. 1-2, 2015. Sociedade Brasileira de Quimica (SBQ). <http://dx.doi.org/10.5935/1984-6835.20150016>.
98. OMS, World Health Organization. **WHO report on cancer: setting priorities, investing wisely and providing care for all**. 2020. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>. Acesso em: 13 jun. 2022.
99. ORMOND, Alexandra; FREEMAN, Harold. Dye Sensitizers for Photodynamic Therapy. **Materials**, [S.L.], v. 6, n. 3, p. 817-840, 6 mar. 2013. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ma6030817>.
100. ORTH, K; A RÜCK,.; A STANESCU,.; BEGER, H G. Intraluminal treatment of inoperable oesophageal tumours by intralesional photodynamic therapy with methylene blue. **Lancet**. [S.L.], p. 519-520. 25 fev. 1995.
101. PANDEY, Apurva; KURUP, Abhishek; SHRIVASTAVA, Arpan; RADHI, Saba; NGUYEN, Diane. D.; ARENTZ, Candy; D'CHUNA, Nicholas; HARDWICK, Fred; D'SOUZA, Martin J.; JENKINS, Marjorie. Cancer Testes Antigens in Breast Cancer: biological role, regulation, and therapeutic applicability. **International Reviews Of Immunology**, [S.L.], v. 31, n. 5, p. 302-320, 19 out. 2012. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.3109/08830185.2012.723511>.
102. PAOLI, Flavia de; CERQUEIRA, Larissa Ramos; RAMOS, Mayara Martins; CAMPOS, Vera M.; FERREIRA-MACHADO, Samara Cristina; GELLER, Mauro; FONSECA, Adenilson de Souza da. DNA fragmentation and nuclear phenotype in tendons exposed to low-intensity infrared laser. **Spie Proceedings**, [s. /], v. 9321, 5 mar. 2015.
103. PASSARELLA, Salvatore; KARU, Tiina. Absorption of monochromatic and narrow band radiation in the visible and near IR by both mitochondrial and non-mitochondrial photoacceptors results in

- photobiomodulation. **Journal Of Photochemistry And Photobiology B: Biology**, [S.L.], v. 140, p. 344-358, nov. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2014.07.021>.
- 104.** PLAETZER, Kristjan; KIESSLICH, Tobias; OBERDANNER, Christian Benno; KRAMMER, Barbara. Apoptosis Following Photodynamic Tumor Therapy: Induction, Mechanisms and Detection. **Current Pharmaceutical Design**. [S.I.], p. 1151-1165. nov. 2005.
- 105.** PRAŚMO, Ewa; MIELCZAREK, Agnieszka; KWAŚNY, Mirosław; ŁAPIŃSKI, Mariusz. Photodynamic Therapy As a Promising Method Used in the Treatment of Oral Diseases. **Advances In Clinical And Experimental Medicine**, [S.L.], v. 25, n. 4, p. 799-807, 2016. Wrocław Medical University. <http://dx.doi.org/10.17219/acem/32488>.
- 106.** PULASKI, B. A; OSTRAND-ROSENBERG, S. Reduction of established spontaneous mammary carcinoma metastases following immunotherapy with major histocompatibility complex class II and B7.1 cell-based tumor vaccines. **Cancer Res**. [S.I.], p. 1486-93. abr. 1998.
- 107.** PULASKI, Beth A.; CLEMENTS, Virginia K.; PIPELING, Matthew R.; OSTRAND-ROSENBERG, Suzanne. Immunotherapy with vaccines combining MHC class II/CD80 + tumor cells with interleukin-12 reduces established metastatic disease and stimulates immune effectors and monokine induced by interferon γ . **Cancer Immunology, Immunotherapy**, [S.L.], v. 49, n. 1, p. 34-45, 17 mar. 2000. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s002620050024>.
- 108.** PULASKI, Beth A.; OSTRAND-ROSENBERG, Suzanne. Mouse 4T1 Breast Tumor Model. **Current Protocols In Immunology**, [S.L.], v. 39, n. 1, out. 2000. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/0471142735.im2002s39>.
- 109.** Raab O. Über die Wirkung, fluorescirender Stoe auf infusorien. *Z Biol* 1900;39:524-46.
- 110.** RIBEIRO, Joselito Nardy; FLORES, Araceli Verônica; MESQUITA, Rickson Coelho; NICOLA, Jorge Humberto; NICOLA, Ester Maria D.. Terapia Fotodinâmica: uma luz na luta contra o câncer. **Physicae**, [S.L.],

- v. 5, n. 5, 1 jan. 2005. APGF-IFGW/UNICAMP.
<http://dx.doi.org/10.5196/physicae.5.2>.
111. RKEIN, Ali M.; OZOG, David M.. Photodynamic Therapy. **Dermatologic Clinics**, [S.L.], v. 32, n. 3, p. 415-425, jul. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.det.2014.03.009>.
112. ROSSIN, Ariane; OLIVEIRA, Évelin de; MORAES, Flavia de; S. JÚNIOR, Ranulfo da; SCHEIDT, Desirée; CAETANO, Wilker; HIOKA, Noboru; DRAGUNSKI, Douglas. TERAPIA FOTODINÂMICA EM ELETROFIAÇÃO: revisão de técnicas e aplicações. **Química Nova**, [S.L.], 2020. Sociedade Brasileira de Química (SBQ). <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170524>.
113. RUCHAUD, S.. Caspase-6 gene disruption reveals a requirement for lamin A cleavage in apoptotic chromatin condensation. **The Embo Journal**, [S.L.], v. 21, n. 8, p. 1967-1977, 15 abr. 2002. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1093/emboj/21.8.1967>.
114. SALVESEN, Guy s; DIXIT, Vishva M. Caspases: intracellular signaling by proteolysis. **Cell**, [S.L.], v. 91, n. 4, p. 443-446, nov. 1997. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80430-4](http://dx.doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80430-4).
115. SANTOS, Ancély F. dos; INAGUE, Alex; ARINI, Gabriel S.; TERRA, Letícia F.; WAILEMANN, Rosangela A. M.; PIMENTEL, André C.; YOSHINAGA, Marcos Y.; SILVA, Ricardo R.; SEVERINO, Divinomar; ALMEIDA, Daria Raquel Q. de. Distinct photo-oxidation-induced cell death pathways lead to selective killing of human breast cancer cells. **Cell Death & Disease**, [S.L.], v. 11, n. 12, dez. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41419-020-03275-2>.
116. SANTOS, Ancély F. dos; TERRA, Letícia F.; WAILEMANN, Rosangela A. M.; OLIVEIRA, Talita C.; GOMES, Vinícius de Moraes; MINEIRO, Marcela Franco; MEOTTI, Flávia Carla; BRUNI-CARDOSO, Alexandre; BAPTISTA, Maurício S.; LABRIOLA, Leticia. Methylene blue photodynamic therapy induces selective and massive cell death in human breast cancer cells. **Bmc Cancer**, [S.L.], v. 17, n. 1, p. 1-2, 15 mar. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12885-017-3179-7>.
117. SANTOS, Ancély Ferreira dos. **Estudos das vias de sinalização mediadoras dos efeitos citotóxicos da terapia fotodinâmica em**

- células de tumores mamários humanos.** 2016. 157 f. Tese (Doutorado) - Curso de Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica), Universidade São Paulo, São Paulo, 2016.
118. SAUER, Heinrich; WARTENBERG, Maria; HESCHELER, Juergen. Reactive Oxygen Species as Intracellular Messengers During Cell Growth and Differentiation. **Cellular Physiology And Biochemistry**, [S.L.], v. 11, n. 4, p. 173-186, 2001. S. Karger AG. <http://dx.doi.org/10.1159/000047804>.
119. SCHIRMER, R. Heiner; ADLER, Heike; PICKHARDT, Marcus; MANDELKOW, Eckhard. "Lest we forget you — methylene blue ...". **Neurobiology Of Aging**, [S.L.], v. 32, n. 12, p. 7-16, dez. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2010.12.012>.
120. SER, Jinhui; LEE, Ji Yeon; KIM, Yong Ho; CHO, Hoonsung. Enhanced Efficacy of Photodynamic Therapy by Coupling a Cell-Penetrating Peptide with Methylene Blue. **International Journal Of Nanomedicine**, [S.L.], v. 15, p. 5803-5811, ago. 2020. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.2147/ijn.s254881>.
121. SERGIO, Luiz Philippe da Silva; SILVA, Ana Paula Almeida da; AMORIM, Philipi Freitas; CAMPOS, Vera Maria Araújo; MAGALHÃES, Luis Alexandre Gonçalves; PAOLI, Flavia de; FONSECA, Adenilson de Souza da. DNA damage in blood cells exposed to low-level lasers. **Lasers In Surgery And Medicine**, [S.L.], v. 47, n. 4, p. 361-368, 5 mar. 2015. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/lsm.22344>.
122. SHAHZIDI, Susan; BRECH, Andreas; SIOUD, Mouldy; LI, Xiaoran; SUO, Zhenhe; NESLAND, Jahn M.; PENG, Qian. Lamin A/C cleavage by caspase-6 activation is crucial for apoptotic induction by photodynamic therapy with hexaminolevulinate in human B-cell lymphoma cells. **Cancer Letters**, [S.L.], v. 339, n. 1, p. 25-32, out. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2013.07.026>.
123. SHINTANI, Takahiro; KLIONSKY, Daniel J.. Autophagy in Health and Disease: a double-edged sword. **Science**, [S.L.], v. 306, n. 5698, p. 990-995, 5 nov. 2004. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.1099993>.

124. SORRIN, Aaron J.; RUHI, Mustafa Kemal; FERLIC, Nathaniel A.; KARIMNIA, Vida; POLACHECK, William J.; CELLI, Jonathan P.; HUANG, Huang-Chiao; RIZVI, Imran. Photodynamic Therapy and the Biophysics of the Tumor Microenvironment. **Photochemistry And Photobiology**, [S.L.], v. 96, n. 2, p. 232-259, mar. 2020. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/php.13209>.
125. SPIKES, John D.; BOMMER, Jerry C.. PHOTOBLEACHING OF MONO-I-ASPARTYL CHLORIN e6(NPe6): a candidate sensitizer for the photodynamic therapy of tumors. **Photochemistry And Photobiology**, [S.L.], v. 58, n. 3, p. 346-350, set. 1993. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1751-1097.1993.tb09572.x>.
126. SVYATCHENKO, Victor A.; NIKONOV, Sergey D.; MAYOROV, Alexander P.; GELFOND, Mark L.; LOKTEV, Valery B.. Antiviral photodynamic therapy: inactivation and inhibition of sars-cov-2 in vitro using methylene blue and radachlorin. **Photodiagnosis And Photodynamic Therapy**, [S.L.], v. 33, p. 102112, mar. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pdpdt.2020.102112>.
127. TANAKA, Mamoru; KATAOKA, Hiromi; YANO, Shigenobu; SAWADA, Takuya; AKASHI, Haruo; INOUE, Masahiro; SUZUKI, Shugo; INAGAKI, Yusuke; HAYASHI, Noriyuki; NISHIE, Hirotada. Immunogenic cell death due to a new photodynamic therapy (PDT) with glycoconjugated chlorin (G-chlorin). **Oncotarget**, [S.L.], v. 7, n. 30, p. 47242-47251, 30 maio 2016. Impact Journals, LLC. <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.9725>.
128. Tappeiner H, Jodlbauer A. Die Sensibilisierende Wirkung fluoriszierender Substanzen. Gesamte Untersuchungen über die photodynamische Erscheinung. Vogel, Leipzig: F. C. W, 1907.
129. TARDIVO, João Paulo; GIGLIO, Auro del; OLIVEIRA, Carla Santos de; GABRIELLI, Dino Santesso; JUNQUEIRA, Helena Couto; TADA, Dayane Batista; SEVERINO, Divinomar; TURCHIELLO, Rozane de Fátima; BAPTISTA, Mauricio S.. Methylene blue in photodynamic therapy: from basic mechanisms to clinical applications. **Photodiagnosis And Photodynamic Therapy**, [S.L.], v. 2, n. 3, p. 175-191, set. 2005. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1572-1000\(05\)00097-9](http://dx.doi.org/10.1016/s1572-1000(05)00097-9).

130. TIAN, Ye; KIM, Hyejin; KANG, Hyun Wook. In vitro anti-tumor effect of high-fluence low-power laser light on apoptosis of human colorectal cancer cells. **Lasers In Medical Science**, [S.L.], v. 36, n. 3, p. 513-520, 28 maio 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10103-020-03050-x>.
131. TORATANI, Shigeaki; TANI, Ryouji; KANDA, Taku; KOIZUMI, Koichi; YOSHIOKA, Yukio; OKAMOTO, Tetsuji. Photodynamic therapy using Photofrin and excimer dye laser treatment for superficial oral squamous cell carcinomas with long-term follow up. **Photodiagnosis And Photodynamic Therapy**, [S.L.], v. 14, p. 104-110, jun. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pdpdt.2015.12.009>.
132. TUIE, Eimer M.; KELLY, John M.. New trends in photobiology. **Journal Of Photochemistry And Photobiology B: Biology**, [S.L.], v. 21, n. 2-3, p. 103-124, dez. 1993. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/1011-1344\(93\)80173-7](http://dx.doi.org/10.1016/1011-1344(93)80173-7).
133. TURCHIELLO, R.F.; OLIVEIRA, C.s.; FERNANDES, A.u.; GÓMEZ, S.L.; BAPTISTA, M.s.. Methylene blue-mediated Photodynamic Therapy in human retinoblastoma cell lines. **Journal Of Photochemistry And Photobiology B: Biology**, [S.L.], v. 222, p. 112260, set. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2021.112260>.
134. TURUBANOVA, Victoria D.; BALALAEVA, Irina V.; MISHCHENKO, Tatiana A.; CATANZARO, Elena; ALZEIBAK, Razan; PESKOVA, Nina N.; EFIMOVA, Iuliia; BACHERT, Claus; MITROSHINA, Elena V.; KRYSKO, Olga. Immunogenic cell death induced by a new photodynamic therapy based on photosens and photodithazine. **Journal For Immunotherapy Of Cancer**, [S.L.], v. 7, n. 1, dez. 2019. BMJ. <http://dx.doi.org/10.1186/s40425-019-0826-3>.
135. UNTERGASSER, Andreas; CUTCUTACHE, Ioana; KORESSAAR, Triinu; YE, Jian; FAIRCLOTH, Brant C.; REMM, Maida; ROZEN, Steven G.. Primer3—new capabilities and interfaces. **Nucleic Acids Research**, [S.L.], v. 40, n. 15, p. 1-12, 21 jun. 2012. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gks596>.
136. USUDA, Jitsuo; AZIZUDDIN, Kashif; CHIU, Song-Mao; OLEINICK, Nancy L.. Association Between the Photodynamic Loss of

- Bcl-2 and the Sensitivity to Apoptosis Caused by Phthalocyanine Photodynamic Therapy. **Photochemistry And Photobiology**, [S.L.], v. 78, n. 1, p. 1-8, jul. 2003. American Society for Photobiology. [http://dx.doi.org/10.1562/0031-8655\(2003\)0780001abtplo2.0.co2](http://dx.doi.org/10.1562/0031-8655(2003)0780001abtplo2.0.co2).
137. VANDONGEN, G; VISSER, G; VROUENRAETS, M. Photosensitizer-antibody conjugates for detection and therapy of cancer. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [S.L.], v. 56, n. 1, p. 31-52, 13 jan. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2003.09.003>.
138. VERMA, Suresh K.; JHA, Ealisha; PANDA, Pritam Kumar; THIRUMURUGAN, Arun; PATRO, Shubhransu; PARASHAR, S.K.s.; SUAR, Mrutyunjay. Molecular insights to alkaline based bio-fabrication of silver nanoparticles for inverse cytotoxicity and enhanced antibacterial activity. **Materials Science And Engineering: C**, [S.L.], v. 92, p. 807-818, nov. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2018.07.037>.
139. WEI, Jingping; LI, Jingchao; SUN, Duo; LI, Qi; MA, Jinyuan; CHEN, Xiaolan; ZHU, Xuan; ZHENG, Nanfeng. A Novel Theranostic Nanoplatform Based on Pd@Pt-PEG-Ce6 for Enhanced Photodynamic Therapy by Modulating Tumor Hypoxia Microenvironment. **Advanced Functional Materials**, [S.L.], v. 28, n. 17, p. 1706310, 26 fev. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/adfm.201706310>.
140. YAMAUCHI, Masaya; HONDA, Norihiro; HAZAMA, Hisanao; TACHIKAWA, Shoji; NAKAMURA, Hiroyuki; KANEDA, Yasufumi; AWAZU, Kunio. Effective photodynamic therapy in drug-resistant prostate cancer cells utilizing a non-viral antitumor vector (a secondary publication). **Laser Therapy**, [S.L.], v. 25, n. 1, p. 55-62, 2016. International Phototherapy Association. <http://dx.doi.org/10.5978/islsm.16-or-05>.
141. YANG, Weijing; ZHANG, Fuwu; DENG, Hongzhang; LIN, Lisen; WANG, Sheng; KANG, Fei; YU, Guocan; LAU, Joseph; TIAN, Rui; ZHANG, Mingru. Smart Nanovesicle-Mediated Immunogenic Cell Death through Tumor Microenvironment Modulation for Effective Photodynamic Immunotherapy. **Acs Nano**, [S.L.], v. 14, n. 1, p. 620-631, 26 dez. 2019.

American Chemical Society (ACS).
<http://dx.doi.org/10.1021/acsnano.9b07212>.

142. YANG, Yannan; TANG, Jie; ABBARAJU, Prasanna Lakshmi; JAMBHRUNKAR, Manasi; SONG, Hao; ZHANG, Min; LEI, Chang; FU, Jianye; GU, Zhengying; LIU, Yang. Hybrid Nanoreactors: enabling an off :the :shelf strategy for concurrently enhanced chemo :immunotherapy. **Angewandte Chemie International Edition**, [S.L.], v. 57, n. 36, p. 11764-11769, 3 set. 2018. Wiley.
<http://dx.doi.org/10.1002/anie.201807595>.
143. ZONG, Wei-Xing; THOMPSON, Craig B.. Necrotic death as a cell fate. **Genes & Development**, [S.L.], v. 20, n. 1, p. 1-15, 1 jan. 2006. Cold Spring Harbor Laboratory. <http://dx.doi.org/10.1101/gad.1376506>.