



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ

**Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA TERAPIA FOTODINÂMICA
UTILIZANDO COMPOSTOS FENOTIAZÍNICOS SOBRE MELANOMA
*IN VITRO***

ANDERSON FONTES SUZART MIRANDA

**Salvador-Bahia
2015**

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

ANDERSON FONTES SUZART MIRANDA

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA TERAPIA FOTODINÂMICA
UTILIZANDO COMPOSTOS FENOTIAZÍNICOS SOBRE MELANOMA
IN VITRO

Orientador: Dr. Marcos André Vannier dos Santos

Dissertação de Mestrado ao curso de
Pós-Graduação em Biotecnologia e
Medicina Investigativa para obtenção do
Título de Mestre

Salvador-Bahia
2015

AGRADECIMENTOS

Aos seres superiores que me acompanharam em toda a vida, não sendo diferente nessa caminhada ao ouvir minhas lamentações e acalmando meu espírito.

Aos meus pais pelas preocupações e pelo apoio INCONDICIONAL.

A minha família que poucos podem ter a honra de fazer parte, obrigado!

Aos colegas que fizeram dos espinhos, carinho.

Ao LBP por todo apoio físico e psicológico.

Carla, Clarissa, Eliete, Rafael, Ciro, vocês não fazem ideia do quão sou grato.

Eliomara, Agostina, Marildes, Iêlê, MATIAAA você mais do que ninguém sabe o que passei simples palavras não podem agradecer e mesmo que eu lesse o antigo e o novo testamento não encontraria palavras para dizer MUITO OBRIGADO!!

Ao LETI pelos socorros prestados e foram vários.

Cássio, Thaís, Nana, Afrânio, Kelly, Gisele, as gargalhadas são as consequências, a amizade é a grande causa.

Rebecca, Flávia, Jéssica, Filipe, Maíra, Camila Victoria, alguns amigos já conhecidos outros conhecidos que se tornaram amigos, obrigado.

A UME pela ajuda e treinamento, em especial a Dr^a Adriana e Dr^a Lucia pelas palavras de carinho nos momentos mais difíceis.

Ao CPqGM e a Fundação Oswaldo Cruz.

Ao meu orientador pela confiança e paciência.

E aos demais que não são restantes, são DEMAIS, muito obrigado!

MIRANDA, Anderson Fontes Suzart. Avaliação dos efeitos da terapia fotodinâmica utilizando compostos fenotiazínicos sobre melanoma *in vitro*. 46 f. il. Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, Salvador, 2015.

RESUMO

O câncer é considerado a segunda maior causa de morte em países ocidentais. Nos Estados Unidos da América (EUA) as mortes por câncer anualmente superam a soma das mortes provocadas em guerras como Vietnã, Coreia e as Grandes Guerras Mundiais. Apresentando-se como a mais agressiva das neoplasias dermatológicas, o melanoma cutâneo está associado à cerca de 75% das causas de morte por câncer de pele. Um dos tratamentos estudados para aplicação em pacientes com esta e outras patologias é a Terapia Fotodinâmica (TFD), que é baseada no uso de corantes de baixa toxicidade, que tem seletividade por alguns tecidos ou células e quando ativados por baixas doses de luz visível induzam alterações celulares como a produção ERO. Os fenotiazínicos são moléculas catiônicas com, absorção de luz na região entre 620-660nm, espectro que permite maior penetração nos tecidos, promovendo maior ação do composto em tecidos mais profundos. A irradiação foi feita com luz laser com $\lambda = 660\text{nm}$, com potência de 100 mW, densidade de energia de 150 J/cm^2 por 1 min. As quantificações de viabilidade celular foram feitas por método colorimétrico, e realizada a leitura em leitor de microplaca a 655 nm. A determinação das IC_{50} do Azul de Metileno e Azul de Toluidina O foi $2,5\ \mu\text{M}$ e $8,4\ \mu\text{M}$, respectivamente. Utilizando a TFD observamos que os efeitos citotóxicos dos compostos fenotiazínicos apresentam significância estatística ($p < 0,05$) tanto em AM quanto em ATO. Em microscopia óptica com coloração por May-Grunwald-Giemsa observamos que existe uma aparente diminuição do conteúdo citoplasmático e preservação nuclear nas células tratadas com TFD, além da diminuição da quantidade de células por campo. A avaliação ultraestrutural por Microscopia de varredura mostra células com visível extração citoplasmática após a TFD, apontando uma lesão membranar. Novas avaliações precisam ser feitas como estabelecer um melhor protocolo para aumentar os efeitos da TFD.

Palavras chave: Palavras-Chave: Melanoma, Terapia Fotodinâmica, Azul de Metileno, Azul de Toluidina

MIRANDA, Anderson Fontes Suzart. Effects of Photodynamic Therapy using phenothiazinium compounds on melanoma *in vitro*. 46 f. il. Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2015.

ABSTRACT

Cancer is considered the second leading cause of death in Western countries. In the United States of America (USA) cancer deaths annually exceed the total of deaths in wars like Vietnam, Korea and the Great World Wars. Presenting as the most aggressive of the skin neoplasms, cutaneous melanoma is associated with circa 75% of the deaths from skin cancer. One of the therapies used in patients with melanoma and other pathologies is Photodynamic Therapy (PDT), which is based upon the use of dyes of low toxicity, which has selectivity for certain tissues or cells and low doses when activated by visible light induce cellular changes such as ROS production. The phenothiazic dyes are cationic molecules, absorption of light in the region between 620-660 nm, allowing greater spectrum tissue penetration, promoting higher activity of the compound in deeper tissues. The irradiation was performed with laser light with $\lambda = 660$ nm with 100 mW, energy density of 150 J/cm^2 for 1 min. Quantification of cell viability was performed by the colorimetric method, and performed a reading in a microplate reader at 655nm. Determination of IC_{50} of Methylene Blue and Toluidine Blue O was $2.5 \mu\text{M}$ and $8.4 \mu\text{M}$ respectively. Using the protocol of PDT observed that there is one of the cytotoxic effects of phenothiazine compounds with statistical significance ($p < 0.05$) in both MB and in TBO. Through optical microscopy by staining with fast Panotic was observed that there is an apparent decrease in the cytoplasm in cells treated with MB and TBO as well as reduced number of cells per field. The Scanning Electron Microscopy, shows cells with cytoplasm extraction, after PDT, indicated possibility, membrane damage. New assessments need to be made to establish a better protocol to potentiate the effects of PDT.

Keys word: Melanoma, Photodynamic Therapy, Methylene Blue, Toluidine Blue

LISTA DE ABREVIATURAS

ALA	Ácido 5-aminolevulínico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
AMP-c	Adenosina Monofosfato cíclico
ATP	Adenosina Trifosfato
AM	Azul de Metileno
ATO	Azul de Toludina O
IC ₅₀	Concentração Inibitória de 50%
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
EUA	Estados Unidos da América
VEGF	Fator de Crescimento do Epitélio Vascular
TFG- β	Fator de Crescimento tumoral -beta
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral alfa
PI3K	Fosfaidilinositol3cinase
FS	Fotosensibilizador
h	Hora
IL-2	Interlecina2
INCA	Intituto Nacional de Câncer
J/cm ²	Jaules por centímetro quadrado
LC3	Light Chain 3
CTLA-4	Linfócitos T Citotoxicos associados a antígeno 4
μ L	Microlitro
μ M	Micromolar
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
μ s	Microsegundo
mM	Milimolar
mW	Miliwatt
nm	Nanômetro
OMS	Organização Mundial de Saúde
P.A.	Para análise
VLS	Síndrome do Extravasamento Vascular
SBF	Soro Bovino Fetal
TFD	Terapia Fotodinâmica
UV	Ultravioleta
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REFERENCIAL TEÓRICO	11
2.1	CARCINOGENESE.....	11
2.2	MELANOMA	14
2.3	TERAPIA FOTODINÂMICA (TFD).....	17
2.3.1	Fotosensibilizadores	19
2.4	COMPOSTOS FENOTIAZÍNICOS	20
2.4.1	Estrutura	20
2.4.2	Aplicações	21
2.4.3	TFD empregando Compostos Fenotiazínicos	21
3	OBJETIVOS	23
3.1	GERAL	23
3.2	ESPECÍFICOS	23
4	METODOLOGIA	24
4.1	CULTURA DE CÉLULAS.....	24
4.1.1	Manutenção da Cultura B16f10	24
4.1.2	Preparo da Cultura para Experimento	25
4.2	TESTE COLORIMÉTRICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR E APLICAÇÃO EM BIOENSAIOS	25
4.3	DETERMINAÇÃO DA IC ₅₀ DOS COMPOSTOS FENOTIAZÍNICOS	25
4.4	TERAPIA FOTODINÂMICA UTILIZANDO COMPOSTOS FENOTIAZÍNICOS	26
4.5	MICROCOPIA ÓPTICA COM COLORAÇÃO	27
4.6	MICROSCOPIA ELETRÔNICA (ME).....	27
4.6.1	ME Varredura.....	27
4.7	MÉTODO ESTATÍSTICO	28
5	RESULTADOS	29
5.1	DETERMINAÇÃO DAS IC ₅₀ DOS COMPOSTOS FENOTIAZÍNICOS.....	29
5.2	TDF POTENCIALIZA O EFEITO CITOTÓXICO DOS COMPOSTOS FENOTIAZÍNICOS SOBRE CÉLULAS B16-F10.....	30
5.3	MICROSCOPIA ÓPTICA MOSTRA ALTERAÇÕES CELULARES APÓS TRATAMENTO COM COMPOSTOS FENOTIAZÍNICOS UTILIZADOS EM TFD.....	30
5.4	ALTERAÇÃO ULTRAESTRUTURAL APÓS TRATAMENTO COM COMPOSTOS FENOTIAZÍNICOS NA TFD.....	32
6	DISCUSSÃO	34

7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	37
	REFERÊNCIAS	38

1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença de grande relevância para a saúde pública por ser responsável pelas mortes de milhares de pessoas todos os anos. A Organização Mundial de Saúde divulgou os dados referentes às mortes por melanoma e outros tipos de câncer de pele no ano de 2008 e com base nos dados publicados, cerca de 78 mil indivíduos morreram por essas neoplasias, em todas as regiões do globo (OMS, 2011). Em 2012 esses números mostram uma relação de 1,6 mortes/100.000 indivíduos (OMS, 2013). O câncer é considerado como a segunda maior causa de morte em países ocidentais, sendo que nos Estados Unidos da América (EUA) as mortes por câncer anualmente superam a soma daquelas provocadas em guerras como Vietnã, Coreia e as grandes guerras mundiais (RUDDON, 2007).

Nos EUA a cada ano são diagnosticados cerca de 1,3 milhões de novos casos de câncer, excluindo os cânceres de pele basal e escamoso que somados chegam a 1 milhão de novos casos todos os anos (RUDDON, 2007). Em 2010, foram registrados nos EUA mais de 570 mil mortes por câncer (SIEGEL et al., 2014). Entre 1975 e 2010 a incidência do melanoma tem aumentado em ambos os sexos (SIEGEL et al., 2014), e é percebido que os indivíduos do sexo masculino tem maior incidência e mortalidade que as mulheres (JEMAL et al., 2011).

Uma estimativa feita pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA) indica que no biênio 2014-2015 cerca de 570 mil casos de câncer irão acometer indivíduos brasileiros, destas neoplasias a mais frequente é o câncer de pele (INCA, 2013). O melanoma, uma neoplasia maligna que atinge os melanócitos, tem altas taxas de mortalidade, entretanto sua incidência é baixa, sendo estimados mais de 5 mil novos casos no Brasil entre 2014 e 2015 (INCA, 2014).

Pessoas acometidas por melanoma possuem sobrevida global media de 8 (oito) a 18 (dezoito) meses (FINN et al., 2012), esta alta mortalidade pode estar diretamente relacionada com fatores ambientais que facilitam o aparecimento dessa neoplasia, como exposição ao sol e negligência do uso de protetores solares (FINN et al., 2012). Contradizendo o senso comum, o uso abusivo destes produtos pode não constituir um fator protetor, *per se*, até mesmo porque ao usá-los há uma tendência a se prolongar a exposição ao sol, podendo assim ser aumentada a incidência de neoplasias dérmicas (AUTIER et al., 2011)

A terapia fotodinâmica (TFD) é uma alternativa para o tratamento de doenças, utilizando compostos fotosensibilizados por uma radiação dentro do espectro de luz visível e que promove alterações biológicas em diversos tipos celulares desde patógenos como:

Leishmania sp., bactérias resistentes a múltiplas drogas, entre outros (PELOI et al., 2011; SUNG et al., 2013) e diversas neoplasias (CAPELLA e CAPELLA, 2003).

Os compostos que são utilizados pela TFD, chamados fotosensibilizadores, possuem diversas características que conferem a estes a capacidade de desenvolver alterações celulares principalmente pela produção de espécies reativas de oxigênio (ERO). Os fotosensibilizadores (FS) que são amplamente utilizados são os derivados de porfirina, um componente da via de formação do grupo Heme da hemoglobina que pode ser excitado em um comprimento de onda dentro do espectro de luz visível, entretanto outros compostos estão sendo estudados para supri as limitações decorrentes do uso das porfirinas e os casos de resistência a TFD (CASTANO et al., 2004; e MILLA et al., 2011).

Os compostos fenotiazínicos estão sendo utilizados como FS por apresentar características mais promissoras que os derivados de porfirinas, como: melhor absorção pelo tecido, ser excitado em um comprimento de onda com maior penetração em tecidos (BUCK, 2009).

A ação da TFD sobre cultura de células de melanoma murino da linhagem B16F10 ainda não está completamente esclarecida, incluindo os efeitos que essa terapia pode causar nas células a partir da excitação dos compostos fenotiazínicos como o azul de metileno (AM) e o azul de toluidina O (ATO).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 CARCINOGENESE

A carcinogênese depende de vários fatores, desde alterações epigenéticas e genéticas, causadas por agentes carcinogênicos físicos, químicos e/ou biológicos (PEREZ-MORENO et al., 2008). A partir destas alterações foram propostas por HANAHAN e WEINBERG (2000), seis características que demonstram a transformação de uma célula normal em célula tumoral: Imortalidade, ativação de oncogenes, inativação de genes supressores tumorais, evasão dos mecanismos apoptóticos, angiogêneses e capacidade de metástase, entretanto outras alterações foram recentemente propostas como: conteúdo energético desregulado, evasão do sistema

imune, inflamação promovida pelo tumor e instabilidade genômica (HANAHAN e WEINBERG, 2011).

A imortalidade pode ser iniciada pela ação de diversos mecanismos como sinalização de receptores com domínios tirosina cinase que por diversas vias de sinalização induzem tanto a proliferação celular quanto o aumento do volume celular. Essas alterações podem ser desencadeadas nas células tumorais por mecanismos como produção tumoral de fatores de crescimento, bem como, indução de células adjacentes (que formam o estroma tumoral) a produzir fatores de crescimento e a superexpressão de receptores para estes fatores tornando a célula hiperresponsiva a estes (HANAHAN e WEINBERG, 2011).

Além dessas modificações celulares a imortalidade pode ser desencadeada pela ação de genes que regulam a divisão celular, os proto-oncogenes, uma mutação nesses genes, tornando-os oncogenes, desencadeiam transcrições de proteínas que sinalizam a divisão celular, como as proteínas Ras-GTP, que iniciam diversos processos incluindo a ativação de proteínas MAPK, envolvidas na proliferação celular (HEJMADI, 2009).

Outra alteração que pode desencadear a imortalidade é a inativação de genes responsáveis por transcrição de proteínas que impedem a progressão na divisão celular, os genes supressores tumorais, alterações nestes genes promovem a transcrição de proteínas que não bloqueiam a progressão no ciclo celular, como a proteína p53, o que permite a proliferação desordenada das células tumorais (HEJMADI, 2009; HANAHAN e WEINBERG, 2011).

A imortalidade das células tumorais implica na evasão de mecanismos de morte programada, especificamente a apoptose, através de mutações em proteínas próapoptóticas, como a p53. A p53 é responsável para detecção de danos no DNA durante a divisão celular induzindo sinais de reparo do dano ao DNA ou induzindo apoptose caso não ocorra o reparo. Uma mutação nessa proteína desencadearia não ativação dos mecanismos apoptóticos tornando a célula tumoral menos responsiva a indução da apoptose. Além da p53, outras alternativas podem ser utilizadas pelas células tumorais para evadir os mecanismos de morte por apoptose, como o aumento da expressão de reguladores antiapoptóticos como Bcl-2 que é responsável pelo controle das concentrações de cálcio citoplasmáticos, e a diminuição da expressão de reguladores pró-apoptóticos como proteínas Bax/Bak, que estão presentes na membrana mitocondrial e promovem o aumento dos níveis de cálcio citoplasmático e inativam a Bcl-2 (HANAHAN e WEINBERG, 2011; MALHI e KAUFMAN, 2011).

Para que essa imortalidade seja mantida as células tumorais precisam de substrato para realizar produção de energia e permitir a divisão celular, para isso a indução da angiogênese é

necessária e a massa tumoral utiliza da produção de fatores de crescimento como o VEGF (Fator de Crescimento do Endotélio Vascular), que além da formação de novos vasos capilares também interagem com a matrix extracelular promovendo a passagem da vascularização na região tumoral e conseqüentemente a formação do microambiente tumoral com células acessórias a manutenção das células tumorais, como: fibroblastos, macrófagos tumorais e outras células e biomoléculas que compõe o estroma tumoral. (VILLARES e BAR-ELI, 2008; HANAHAN e WEINBERG, 2011).

A habilidade de invasão e proliferação em tecidos diferentes do que se originou o tumor e/distantes, chama-se metástase, essa possibilidade confere ao tumor malignidade, os mecanismos pelos quais a metástase ocorre depende da capacidade invasiva e motora das células tumorais. Uma invasão local é o primeiro passo para um tumor desencadear o processo de metástase, passando pela camada basal que circunda o órgão de origem das células tumorais. Esse processo é seguido da passagem da célula tumoral pela parede dos vasos capilares e/ou linfáticos, permitindo que a célula tumoral passe para a circulação sanguínea. Na circulação as células podem sofrer danos pelas condições inapropriadas para seu desenvolvimento, entretanto as células que sobreviverem podem formar pequenos trombos nos capilares. Então, as células passam novamente pela parede do capilar de um outro órgão ou em uma outra região do mesmo órgão, formando novamente uma pequena massa tumoral e desenvolvendo micrometástases. Um processo conhecido como colonização pode acontecer em conseqüência a adaptação das células tumorais ao novo microambiente onde, a massa tumoral cresce e o tumor é macroscopicamente detectado (HEJMADI, 2009, HANAHAN e WEINGBER, 2011).

Outros fatores que auxiliam na sobrevivência e proliferação do tumor foram descritos por HANAHAN e WEINBERG (2011), sendo que uns possibilitam essas alterações, como a instabilidade genética que promove mutações aleatórias que diferenciam os tumores, incluindo os de mesma origem, e a indução tumoral de processos inflamatórios, o que contribui positivamente para sobrevivência tumoral, pela presença de biomoléculas, como fatores de crescimento, pela ação de enzimas que modificam a matriz facilitando a angiogênese, entre outros processos. Outros fatores são considerados características emergentes que devem ser avaliadas na carcinogênese e na massa tumoral, como modificações do perfil energético e evasão dos mecanismos imunológicos. O efeito descrito por WARBURG et al. (1927) , foi a primeira modificação dos mecanismos pelo qual a célula tumoral produz energia, onde foi mostrado que a glicólise é o principal mecanismo para obtenção de energia pelas células tumorais, e já foi reportado associação entre esse efeito e a

ativação de oncogenes (HANAHAN e WEINBERG, 2011). O sistema imune pode reagir a formação do tumor de diversas formas, entretanto, a secreção de TFG- β (fator de crescimento tumoral) inibem a proliferação de linfócitos T (YOSHIMURA e MUTO, 2011), possibilitando a progressão tumoral (DERYNCK et al., 2001). O recrutamento de células T_{Reg} pelo tumor também funciona como uma forma de evasão da ação imunológica, uma vez que esses linfócitos regulam a ação de linfócitos T ativados (HANAHAN e WEINBERG, 2011 DEPPONG et al., 2013).

2.2 MELANOMA

A radiação UV pode desencadear na pele alterações como eritema e imunossupressão (KYRGIDIS et al., 2010) e pode ser dividida em três tipos: UVA, UVB e UVC, esta última é filtrada pela camada de ozônio (GRUPTA et al., 2013). A UVA pode promover danos ao DNA pela absorção de moléculas endógenas que são sensibilizadas pela radiação induzindo a produção de ERO, já a UVB promove danos mais severos e diretos ao DNA pela formação de dímeros de pirimidina ciclobutano em timinas e citosinas adjacentes (KYRGIDIS et al., 2010). Essas alterações atreladas a ineficiência dos mecanismos de reparo do DNA que as células tumorais apresentam (TOMESCU et al., 2001), são alguns dos fatores que desencadeiam a formação do melanoma.

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

Outros processos estão envolvidos na progressão do melanoma como a diminuição da expressão de proteínas como a APAF-1, um fator que é responsável pela ativação de proteases na via de morte celular por apoptose (SOENGAS et al., 2001; BAO et al., 2007). Além deste

e de outros mecanismos para evadir os processos que desencadeiam a morte por apoptose, as células do melanoma utilizam da expressão de outras moléculas que auxiliam na progressão e malignidade dessa doença, como a superexpressão de NEDD9 que está associado a metástase (KIM et al., 2006; KYRGIDIS et al., 2010).

A dificuldade no diagnóstico clínico entre os afrodescendentes faz desta, uma das mais letais neoplasias nestas populações (BRADFORD, 2009). Estas neoplasias podem acometer outras regiões do corpo que contém melanócitos como leptomeninges, úvea (região que compreende a íris, corpos ciliares e coróide) e regiões mucosas como trato respiratório, urinário e gastrointestinal (ALGAZI et al., 2010; SEETHARAMU et al., 2010; LEE et al., 2012a). Assim, podemos subclassificar os melanomas cutâneos em: mucosos, ocorrendo principalmente na oro e nasofaringe, região anal-genital e reto e os melanomas acrais que afetam a pele nas extremidades, palma das mãos, planta dos pés e regiões ungueais (ALGAZI et al., 2010).

A classificação histopatológica do melanoma foi proposta por Clark e colaboradores em 1969 observando cortes histológicos de 269 casos de melanoma, estabelecendo os seguintes níveis: Nível I, todas as células tumorais estão contidas pela membrana basal, sendo, por definição, um melanoma *in situ*; Nível II, quando as células neoplásicas invadem a membrana basal e se estendem até a derme papilar, mas não atingem a derme reticular; Nível III, invasão neoplásica na região entre a derme papilar e a derme reticular; Nível IV, extensão das células neoplásicas para a derme reticular; Nível V, invasão das células no tecido subcutâneo (CLARK et al., 1969). Outro parâmetro que deve ser avaliado no prognóstico desta neoplasia é a Escala de Breslow que determina a espessura tumoral, a partir do ponto mais profundo de invasão ao topo da camada granulosa ou à célula mais superficial em caso de ulceração (FERNANDES et al., 2005). Esta escala foi desenvolvida por Alexander Breslow, em seu estudo no qual, estimava uma espessura de 0,75 mm pra indicar uma lesão de Nível II, comparativamente com o proposto por Clark anos antes (BRESLOW, 1970), entretanto, para melhorar a avaliação da espessura tumoral, Büttner e colaboradores (1995), aperfeiçoaram esta leitura e propuseram que os tumores com espessura menor que 1,0 mm para um bom prognóstico, entre 2 e 4 mm para um prognóstico ruim aumentando os riscos de metástase tornando esta neoplasia mais letal.

Dentre os tipos de tratamento utilizados para o câncer a quimioterapia busca a inativação das células cancerosas agindo no citoesqueleto, bloqueando a divisão celular ou induzindo processos de morte celular, (BHATIA et al., 2010). Cisplastina foi a primeira substância usada no tratamento do melanoma, sua ação modifica o Ácido Desoxirribonucleico

(DNA) e dificulta a ação de fatores de transcrição de proteínas e à replicação celular, levando a célula à morte por apoptose, através da ativação das caspases (CHODUREK et al., 2012; BELLO et al., 2013), porém casos de resistência tem sido reportados devido ao aumento da expressão de proteínas reparadoras de danos no DNA (WELSH et al., 2004; LI e MELTON, 2012). A vimblastina é um antineoplásico usado no tratamento de diversos tipos de câncer, incluindo o melanoma, apresenta atividade em microtúbulos, impedindo sua polimerização e, por consequência, inibindo o crescimento celular e induzindo apoptose (SELIMOVIC et al., 2013), porém já estão descritos em literatura, casos de resistência relacionados à atividade de P-glicoproteína, diminuindo por extrusão a acumulação intracelular de compostos potencialmente ativos, demonstrado em célula de carcinoma renal (LONG et al., 2013). Paclitaxel uma outra opção para o tratamento antineoplásico que atua sobre β -tubulina, estabilizando o estado polimerizado de microtúbulos, impedindo sua despolimerização, dificultando a formação de fuso mitótico, bloqueando a progressão da mitose, produzindo células poliploides gigantes (ZHANG et al., 2014 a). Um dos mecanismos de resistência a esse inibidor mitótico, está relacionado à superexpressão de proteínas, como a Six1, que protegem as células cancerosas, inibindo as vias apoptóticas (COLLETA et al., 2008), e aumentam suas características malignas, como demonstrado por LI e colaboradores (2013), em células de câncer de mama.

Nos EUA, até 2011, o tratamento quimioterápico deste tipo de câncer de pele era composto por apenas duas terapias: altas doses de Interleucina-2 (IL-2) e Dacarbazina (FINN et al., 2012). As altas doses de IL-2 são muito tóxicas para o paciente podendo levar o indivíduo à síndrome de extravasamento vascular (Vascular Leakage Syndrome – VLS) generalizado levando os indivíduos a quadros de edema pulmonar e lesões hepáticas (OTTER et al., 2008; KRIEG et al., 2010; FINN et al., 2012). A dacarbazina tem uma baixa taxa de resposta (FINN et al., 2012), tornando seu uso insatisfatório em primeira instância e outro obstáculo é o fato deste composto ser mielossupressor, além de ser administrado por via intravenosa, causando dor e, conseqüentemente, reduzindo a adesão ao tratamento. Outro ponto, são suas propriedades farmacocinéticas como, absorção irregular, lenta e incompleta do medicamento, e características químicas como sua fotossensibilidade, instabilidade, e possuir uma meia-vida curta, dificultando seu uso em terapias com combinação de medicamentos (BEI et al., 2010). Os medicamentos citados acima não modificam a sobrevida global dos pacientes com câncer (FINN et al., 2012), mas apenas melhoram a qualidade de vida do indivíduo.

Outros medicamentos foram recentemente propostos para o tratamento do melanoma: os inibidores de *BRAF* e bloqueadores de CTLA-4. A mutação no gene *BRAF* está relacionada com a maioria dos casos de melanoma (REGAD, 2012). CTLA-4, é uma molécula presente nos linfócitos T citotóxicos associados ao antígeno 4 de um tipo de linfócitos T_{Reg}, os quais atuam fisiologicamente inibindo a ação das células T (CHEVOLET et al., 2015). O bloqueio das células CTLA-4 removeria as barreiras de ação das células T, deixando-as hiper-responsivas às células tumorais, sendo comum no melanoma a presença de infiltrados linfocitários (FINN et al., 2012). Com as limitações apresentadas pelos fármacos usados na terapia do melanoma, novas abordagens estão sendo utilizadas, na tentativa de diminuir a letalidade desta neoplasia. Um dos tratamentos atualmente estudados para aplicação em pacientes com esta e outras doenças é a TFD

2.3 TERAPIA FOTODINÂMICA (TFD)

O tratamento utilizando um composto não-tóxico e que seja possível excitá-lo por uma radiação luminosa em um comprimento de onda visível e após essa excitação este composto possa interagir com estruturas celulares induzindo ou provocando a morte celular, esse processo é conhecido como TFD (CASTANO et al., 2004). O protocolo para realização da TFD segue algumas etapas que devem ser avaliadas para determinar se este tipo de terapêutica é o recomendável. A primeira etapa é o diagnóstico e localização da doença, com posterior administração do fotosensibilizador que tende a se acumular no local da lesão, como por exemplo, na tumefação neoplásica onde as células tumorais demoram mais tempo para externalizar o fotosensibilizador (FS). Após esse período é realizada a irradiação local da lesão e posterior avaliação da recuperação do paciente na Figura 1 (KALKA et al., 2000)

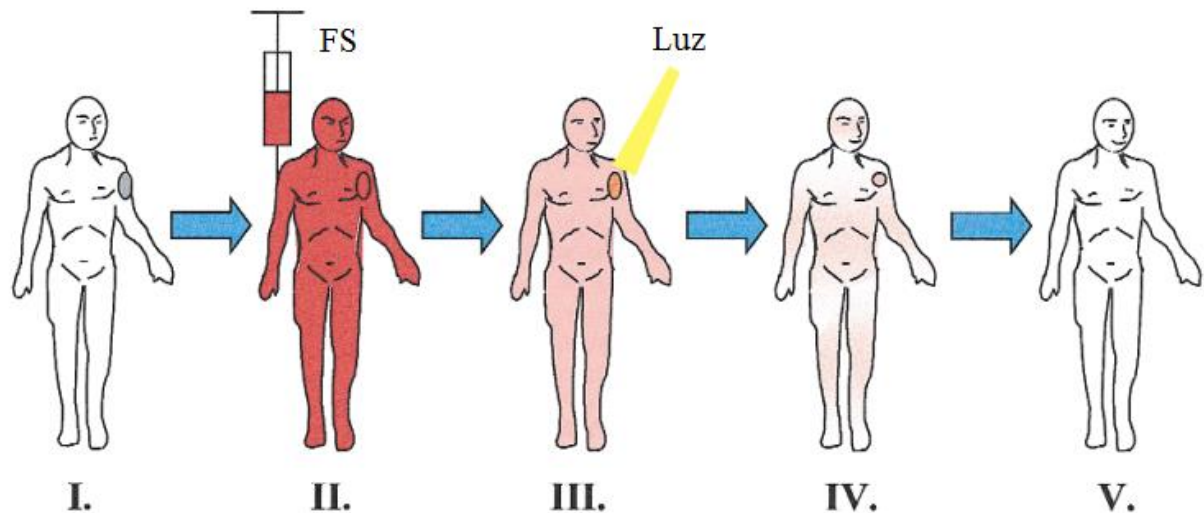


Figura 1. Etapas do Processo de TFD. Em um paciente diagnosticado com uma neoplasia ou lesão causada por um patógeno (I) é administrado o fotossensibilizador (FS) (II) este apresenta eliminação lenta na região afetada, garantindo a sua ação quando irradiado o local de interesse (III), após a irradiação o agente fotossensibilizador é gradativamente metabolizado (IV) e eliminando o tumor ou lesão (V) (Adaptado de KALKA et al. 2000).

A TFD no tratamento do câncer é indicada em estágios iniciais, quando métodos tradicionais de tratamento não são recomendados, podem causar sequelas irreversíveis ou tratamento de regiões tubulares, como: esôfago, traqueia, brônquios (FERREIRA & MENEZES, 2008). A TFD vem sendo empregada em casos humanos de neoplasias como mostrado por Lim et al. (2013) em linhagens de câncer de pulmão, câncer de esôfago (YI et al., 2013; YANO et al., 2014), lesões orais pré-malignas (VOHRA et al., 2014), neoplasias cervicais intraepiteliais (CHOI et al., 2014a). As contra indicações da TFD podem ser divididas em contraindicações severas, como no caso de paciente com deficiência cardiorrespiratória, caquexia, lúpus eritematoso sistêmico, ou contraindicações restritas, no caso de reações alérgicas e/ou metástase regional ou distante (FERREIRA e MENEZES, 2008).

Por conta das limitações apresentadas a TFD conta com grande versatilidade de aplicações podendo ser empregada em associação com outras metodologias utilizadas no tratamento do câncer, como: quimioterapia (HONG et al., 2014) e radioterapia (BRODIN et al., 2014). Além de junção a utilização de vesículas extracelulares (FUHRMANN et al., 2014), nanopartículas (YANG et al., 2014), lipossomos para modelos *in vivo* de câncer de mama (SHEMESH et al., 2014), nanomateriais (LU et al., 2014) micelas poliméricas (LAMCH et al., 2014), para melhorar a absorção e ação dos fotossensibilizadores já estão sendo estudadas. Outra associação recentemente estudada une a TFD com a terapia

ultrassonodinâmica como efetivo antitumoral em linhagens de células, *e.g.*, sarcoma (SADANALA et al., 2014; WANG et al., 2014).

2.3.1 Fotosensibilizadores

Os fotosensibilizadores efetivos para utilização na TFD devem apresentar as seguintes propriedades: baixa toxicidade quando não irradiado; estabilidade cinética e termodinâmica; baixo custo; seletividade por células-alvo; ser ampla e rapidamente absorvido pela célula; não ser absorvido ou ser eliminado rapidamente pelas células não-alvo; apresentar um comprimento de onda para sua ativação dentro do espectro de luz visível; bem como alta capacidade de produzir ERO; não apresentar efeito mutagênico (GONZALES, 2007). A maioria dos FS tem seletividade por células alteradas (neoplásicas ou não), isto ocorre porque as células normais eliminam o corante em aproximadamente 24 h enquanto as células neoplásicas, por exemplo, permanecem com os FS, num intervalo de 24 a 72 h (National Cancer Institute, 2011).

Os FS de maneira geral, podem agir intracelularmente em duas vias. A primeira é a interação dos FS com componentes celulares produzindo radicais livres que podem interagir com oxigênio e gerar ERO; a outra via está relacionada com a interação direta do FS com o oxigênio molecular (estado tripleto) tornando-o uma molécula mais reativa, oxigênio singleto. Ambas as vias podem acontecer simultaneamente, dependendo do tipo de FS, da disponibilidade de substratos moleculares e de oxigênio (CASTANO et al., 2004; MROZ et al., 2011; VUMMIDI et al., 2013).

O oxigênio singleto é um dos principais mediadores do dano fotoquímico causado por FS usados na TFD, por ter um tempo de meia vida curto (em água 4,0 μ s), por conta disso seu raio de ação é reduzido, corroborando o princípio segundo o qual a TFD atua de maneira localizada (CARVALHO, 2008).

Hematoporfirina foi o primeiro fotossensibilizador estudado, o qual teve uma ampla aplicação durante a década de 80, quando foram desenvolvidos os derivados de hematoporfirina ou porfirinas (CHRISTENSEN et al., 1981; BÖHMER e MORSTYN, 1985; CASTANO et al., 2004), os quais passaram a ser estudados e o são até hoje. As porfirinas são excitadas num comprimento de onda (λ) máximo de 630 nm, o que confere a estes compostos uma limitação porque neste comprimento de onda tecidos ricos em melanina não sofrem ação

dessa terapia porque a melanina absorve este comprimento de onda, sendo necessários compostos que possam ser estimulados por comprimentos de onda próximos ao infravermelho, uma vez que a melanina absorve melhor comprimentos menores que 620 nm (OU-YANG et al., 2004; VUMMIDI et al., 2013).

O ácido 5-aminolevulínico (ALA) é uma pró-droga usada para aumentar intracelularmente as concentrações de protoporfirina IX, um precursor do grupamento heme que possui atividade citotóxica quando estimulado no comprimento de onda de 630 nm, produzindo ERO, e já demonstrada em modelos de glioblastomas poder levar as células à morte por necrose, porém apresentam a mesma limitação que os derivados de hematoporfirina (COUPIENNE et al., 2011; VUMMIDI et al., 2013). Outro obstáculo enfrentado para o uso do ALA e seus derivados é que já foi reportado na literatura resistência em câncer de pele-não melanoma, especificamente câncer de pele escamoso (MILLA et al., 2011). Por conta das limitações apresentadas pelos fotosensibilizadores disponíveis, outros compostos têm sido estudados para serem utilizados como FS em TFD.

2.4 COMPOSTOS FENOTIAZÍNICOS

2.4.1 Estrutura

Esta classe de FS é constituída de moléculas catiônicas, aromáticas, tricíclicas, que apresenta um sistema altamente conjugado, estas características conferem aos compostos fenotiazínicos propriedades como, absorção de luz na região entre 620-660 nm, espectro que permite maior penetração nos tecidos, e promove maior rendimento do oxigênio singlete (ALISSON, et al., 2005; MEISEL e KOCHER, 2005; BUCK, 2009). Tendo como corantes mais conhecidos o azul de metileno (AM) e o azul de toluidina O (ATO), os fenotiazínicos atuam modificando lipídios de membrana, inativando proteínas de membrana indispensáveis para processos biológicos, provocando a morte celular. Estes dois corantes possuem características semelhantes, contendo na sua estrutura (Figura 4) três átomos de nitrogênio, um pode atuar reagindo com prótons e os demais estabilizam a molécula (BUCK, 2009).

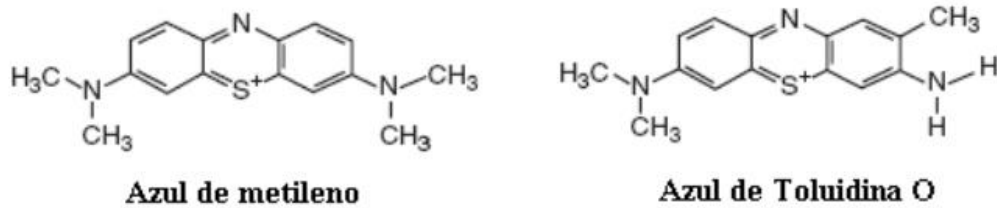


Figura 2. Estrutura das moléculas do Azul de Metileno e Azul de Toluidina O (Adaptado, BUCK, 2009).

2.4.2 Aplicações

Os compostos fenotiazínicos tem demonstrado diversos tipos de utilidade clínica desde o tratamento ao auxílio no diagnóstico e prognóstico de diversas enfermidades.

O AM foi o primeiro composto a ser indicado para o tratamento da malária, sendo posteriormente estudado como possível fármaco sinérgico com os quinolínicos que são os fármacos atualmente utilizados no tratamento dessa doença (GUTTMANN e EHRLICH, 1891; GORKA et al., 2013). Além da ação antiparasitária esse composto também mostrou, em diversos estudos, ser eficiente na terapêutica de modelos de Alzheimer (PETZER et al., 2014) e de cardiopatias como o Colapso Cardiovascular (LO et al., 2014), melhorando o prognóstico dessas doenças. Outra aplicação para o AM é a utilização como corante auxiliando no rastreamento e localização de estruturas alvo como, por exemplo, na retirada de linfonodo após uma cirurgia de câncer gástrico (AOYAMA et al., 2014).

O ATO e seus derivados tem uma aplicação muito mais voltada para diagnóstico e prognóstico sendo pouco estudado para finalidades terapêuticas, sem a aplicação da TFD. Estudos mostram o ATO como potencial corante para marcação de células neoplásicas como na detecção de células de carcinoma escamoso na região perineural (DROSOU et al., 2014) ou na detecção de estágios precoces do câncer oral (VASHISHT et al., 2014).

2.4.3 TFD empregando Compostos Fenotiazínicos

Os compostos fenotiazínicos são estudados em diversos modelos, obtendo resultados significantes, como a interação do AM com laser em culturas de *Escherichia coli* e *Staphyococcus aureus* (PHOENIX e HARRIS, 2003) ou o uso do AM e do ATO irradiados em culturas de *Candida albicans*, demonstrando uma redução das unidades formadoras de

colônia (PUPO et al., 2011) e como demonstrado por BARBOSA e colaboradores (2012), estes corantes tem efeito antiparasitário sobre *Leishmania braziliensis*.

Estes corantes já apresentam efeito conhecido sobre diversas linhagens neoplásicas, induzindo apoptose em células de câncer de pulmão (LIM et al., 2013) e demonstrando redução da proliferação de células de melanoma *in vitro* (MIRANDA et al., 2014) e *in vivo* (WAGNER et al., 2012), mas se faz necessário investigar as alterações que envolvem este processo para melhor entender como essa redução acontece.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Avaliar os efeitos da terapia fotodinâmica utilizando compostos fenotiazínicos como fotosensibilizadores sobre células de melanoma.

3.2 ESPECÍFICOS

- Determinar a atividade citotóxica dos compostos fenotiazínicos (AM e ATO) sobre a linhagem B16F10;
- Avaliar o efeito da terapia fotodinâmica sobre a proliferação de células da linhagem B16F10;
- Identificar alterações celulares citoplasmáticas e/ou nucleares por microscopia óptica;
- Avaliar as alterações ultraestruturais originadas pela ação da TFD;

4. METODOLOGIA

4.1. CULTURA DE CÉLULAS

As células de melanoma murino da linhagem B16F10 usadas neste estudo foram cedidas pelo Laboratório de Inflamação, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro IBCCF^o – UFRJ e mantidas em meio RPMI 1640 contendo 10% de Soro Bovino Fetal (SBF), 10 μ M de Gentamicina e 10 μ M de Fluconazol, à 37 °C e atmosfera a 5% de CO₂.

4.1.1. Manutenção da Cultura B16f10

As células foram mantidas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de SBF, Gentamicina e Fluconazol, ambos a 10 μ M. As trocas dos meios de cultura foram feitos dependendo da confluência das células nas garrafas: confluência abaixo de 30% a troca do meio aconteceu a cada três dias; entre 40% e 80% a cada dois dias; acima de 80% todos os dias, realizava-se a passagem da cultura, ou era realizado experimento.

A passagem da cultura acontecia sempre que as garrafas atingiam confluência acima de 80%. Utilizando solução antiaderente de Tripsina/EDTA (Gibco®) diluída 1:1 em meio RPMI 1640, foram incubadas sobre a cultura B16F10 por 10-15 minutos observando em microscópio invertido o descolamento das células do substrato, após esse processo as células foram centrifugadas a 200 g (força G) por 10 min a temperatura ambiente. O *pellet* formado foi resuspenso em meio RPMI 1640 suplementado, esse *pool* de células foi dispensado em garrafas novas dependendo da necessidade de novas culturas pela equipe do laboratório.

A avaliação da contaminação por *Mycoplasma* sp. foi realizada utilizando métodos de microscopia eletrônica realizados ao final dos experimentos de proliferação e microscopia óptica.

4.1.2. Preparo da Cultura para Experimento

As culturas após a ação da Tripisina/EDTA e centrifugação (descritas no Item 4.1.1) foram homogeneizadas em 1mL de meio RPMI 1640 suplementado e realizado a contagem em câmara de Newbauer utilizando a exclusão por coloração com o azul trypan. (OLIVEIRA et al., 2013)

4.2. TESTE COLORIMÉTRICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR E APLICAÇÃO EM BIOENSAIOS

Para o teste colorimétrico foi avaliada a relação entre o número de células e a absorbância, onde as células incubadas após a TFD e incubadas foram posteriormente processadas seguindo o método descrito por LSHAI-MICHAELI e colaboradores (1990). Após o tratamento as células foram fixadas com formol P.A. por 10 minutos e, em seguida, foi adicionado o corante azul de metileno 0,1% diluído em tampão borato pH 8,7. Após 10 minutos foram realizadas diversas lavagens com tampão borato para retirar o excesso de azul de metileno, com posteriori adição de 500 µL de ácido clorídrico a 0,1N. Em seguida foram transferidos 200 µL do sobrenadante para placas de 96 poços pela realização da leitura em VersaMax™ Tunable Microplate Reader no comprimento de onda de 655 nm.

4.3. DETERMINAÇÃO DA IC₅₀ DOS COMPOSTOS FENOTIAZÍNICOS

Em placa de 24 poços as células foram incubadas na concentração de 2×10^5 células/poço e incubadas overnight para promover a aderência das células. Após esse período as células foram lavadas e incubadas com diferentes concentrações dos compostos fenotiazínicos seguindo a diluição de 1:10, por 24 h a 37 ° C e 5% de CO₂. A quantificação da proliferação celular foi feita de acordo com o protocolo descrito no tópico 4.2 da Metodologia. O cálculo da IC₅₀ foi realizado no GraphPadPrism 5.0, utilizando o teste Regressão Não-linear.

4.4. TERAPIA FOTODINÂMICA UTILIZANDO COMPOSTOS FENOTIAZÍNICOS

As células B16F10 foram inoculadas em placas de 24 poços, na concentração de 2×10^5 células por poço, a 37 °C e 5% de CO₂, “overnight”, para promoção da adesão celular. Após esse período as células foram incubadas com a IC₅₀ do Azul de Metileno e Azul de Toluidina. O pelo tempo de pré-irradiação de 30 minutos, incubadas a 37 °C e 5% de CO₂ protegidas da luz, as células, foram irradiadas usando Laser, TF PREMIER – MMOptics®, com os parâmetros descritos na Tabela 1, e incubadas sob as mesmas condições de temperatura e atmosfera por 24 h. (HUANG et al., 2008)

Tabela 1: Parâmetros utilizados da Luz Laser.

Parâmetros	Valores
Comprimento de Onda	660 nm
Potência	100 mW
Densidade de Energia	150 J/cm ²
Tempo de Irradiação	60 segundos

Estes parâmetros foram determinados, após utilização de outros valores de potência e não obtenção de inibição significativa da proliferação celular além da literatura reportar o uso de dosagens similares em estudos *in vivo* e tratamentos clínicos (HADDAD et al., 1998; SHELEG et al., 2004).

Os controles utilizados foram identificados como:

- Controle absoluto: cultura de células B16F10, ausência de AM ou ATO e sem irradiação.
- Controle FS: Cultura de células B16F10 incubadas com AM ou ATO e sem irradiação.
- Controle Laser: Cultura de células B16F10, ausência de AM ou ATO e com irradiação.

A doxorubicina foi utilizada como controle positivo de inibição da proliferação das células B16F10 na concentração de 10 µM (MITTAL et al., 2014)

Para evitar que a radiação fosse absorvida pelos grupos controle e controle FS, foi adicionada tinta preta entre os poços e os inóculos foram distribuídos em poços alternados,

esta medida também previne que os grupos controle laser e o grupo teste recebam mais radiação do que determinado (Figura 5).

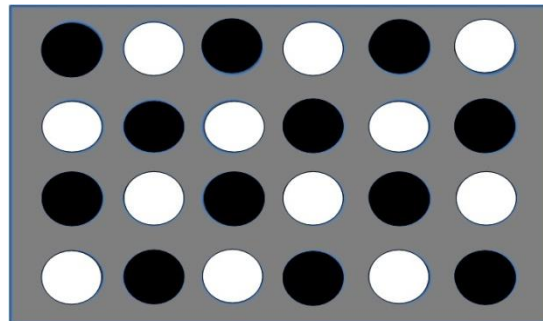


Figura 3. Modelo para placa usada em experimentos com Terapia Fotodinâmica. Os círculos negros representam os poços com tinta e os brancos, aqueles irradiados.

4.5. MICROCOPIA ÓPTICA COM COLORAÇÃO

Para avaliar as condições nucleares e estruturais foi utilizada a coloração por panótico rápido (May-Grunwald-Giemsa). As células foram cultivadas em lamínulas na concentração de 2×10^5 células por poço e realizada a terapia fotodinâmica. Após 24 h as lamínulas para fixação foram tratadas como previsto pelo fabricante, i.e., foram fixadas com o panótico 1, posteriormente coradas com o panótico 2, para compartimentos alcalinos e depois com o panótico 3 para coloração de compartimentos ácidos. As lâminas foram cuidadosamente lavadas com água corrente e observadas em microscópio óptico Olympus CX21 (BERNACKI et al., 2013).

4.6. MICROSCOPIA ELETRÔNICA (ME)

4.6.1. ME Varredura

As células B16F10 após a realização da TFD foram fixadas com glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1M pH 7,2, em seguida as amostras foram lavadas em tampão cacodilato 0,1 M. Então as células foram pós-fixadas com uma solução de tetróxido de ósmio 1%, contendo 0,8% de ferrocianeto de potássio. Posteriormente desidratadas em concentrações crescentes de etanol (30- 100%) por 10 minutos em cada concentração. As amostras foram processadas e secas em sistema de ponto crítico de CO_2 , montadas em

suportes metálicos, revestidas com ouro e observadas ao microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM 6390LV a 15 kV (VANNIER-SANTOS e LINS, 2001).

4.7. MÉTODO ESTATÍSTICO

O experimento para determinação da IC_{50} foi realizado em triplicada, os demais experimentos de viabilidade foram feitos em triplicata e em três experimentos independentes. Para a verificação de significância no crescimento celular foi utilizada a análise de variância (ANOVA) com pós-teste de comparação múltipla de Tukey, com o auxílio do ‘software’ “GraphPadPrism 5.0

5. RESULTADOS

5.1. DETERMINAÇÃO DAS IC_{50} DOS COMPOSTOS FENOTIAZÍNICOS.

Com determinação das IC_{50} dos compostos fenotiazínicos obtivemos os valores de 2,5 μ M para o azul de metileno e 8,4 μ M para o azul de toluidina O (Figuras 6A e 6B, respectivamente). Esses valores foram utilizados para realização dos demais experimentos.

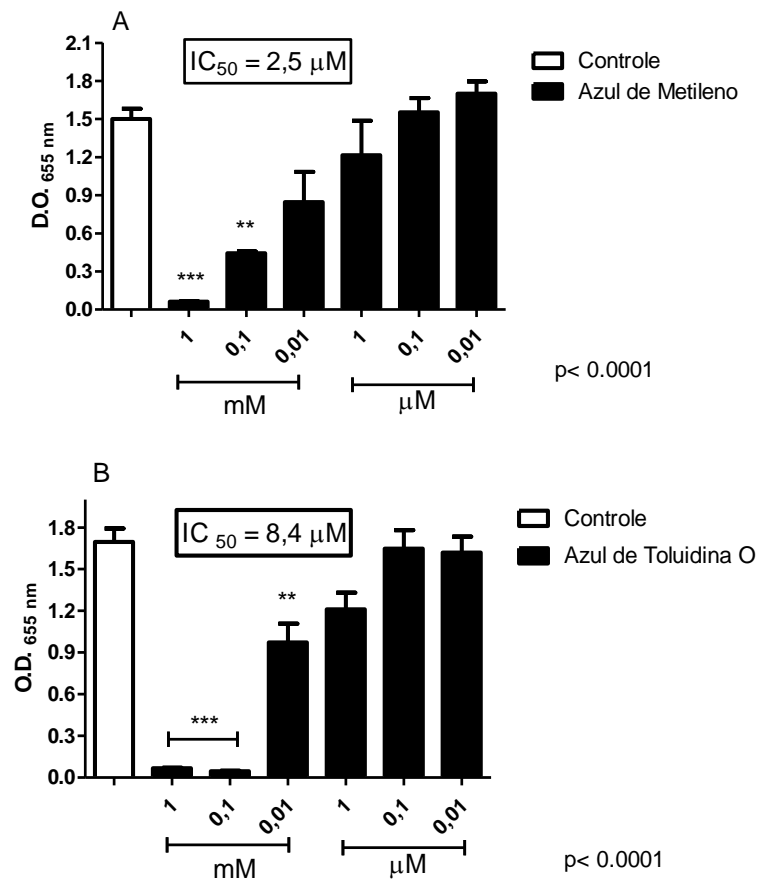


Figura 4. Determinação das IC_{50} dos compostos fenotiazínicos sobre células B16F10. O azul de metileno e o azul de toluidina apresentaram valores de IC_{50} de 2,5 μ M e 8,4 μ M, respectivamente. Os resultados demonstram que em (A) a inibição da proliferação de células B16F10 pelo azul de metileno (AM) é concentração-dependente e tem significância estatística apenas nas duas maiores concentrações – 1 e 0,1 mM. Em (B) o azul de toluidina O também apresentou inibição da proliferação celular, concentração-dependente, apresentando significância estatística nas concentrações de 1, 0,1 e 0,01mM. A análise estatística foi realizada aplicando a análise de variância (ANOVA) e pós-teste de comparação múltipla de Tukey, tendo, $p < 0,0001$ (***) e $p < 0,001$ (**).

5.2. TDF POTENCIALIZA O EFEITO CITOTÓXICO DOS COMPOSTOS FENOTIAZÍNICOS SOBRE CÉLULAS B16-F10.

Os efeitos da TFD sobre a proliferação das células da linhagem B16F10 foram determinados utilizando o método colorimétrico, onde foi observado que nas concentrações utilizadas do AM e do ATO, 2,5 μM e 8,4 μM , respectivamente, o efeito citotóxico dos compostos não foi significativo, entretanto, quando aplicados com a TFD a toxicidade dos compostos foi estatisticamente significativa quando comparados com o controle absoluto e com o controle dos compostos sem irradiação. Numa comparação entre os compostos é observado que na TFD com o AM (Figura 7A) existe uma inibição maior que em ATO (Figura 7 B), apresentando médias $0,45 \pm 0,09$ e $0,50 \pm 0,05$, respectivamente. O efeito citotóxico da TFD em células B16F10 foi menor quando comparado com o controle positivo utilizando a doxorubicina.

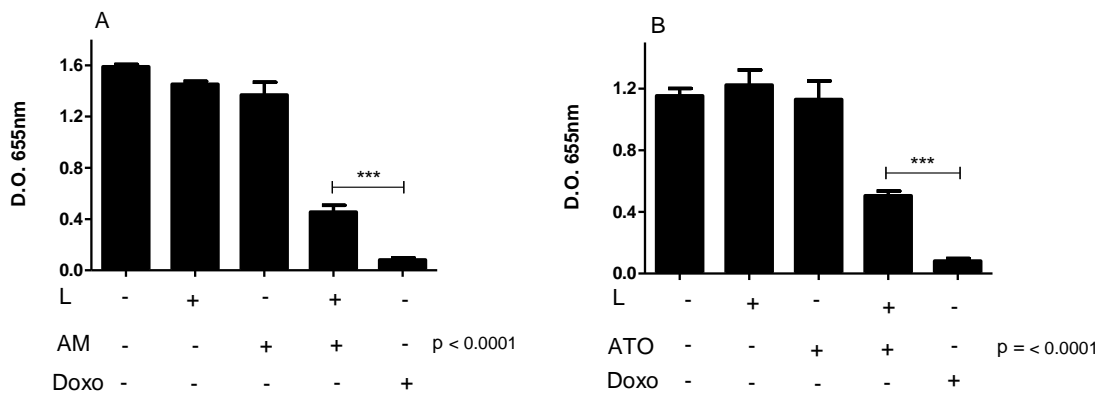


Figura 5. Avaliação da toxicidade da TFD sobre B16F10 utilizando os compostos fenotiazínicos. Em (A) é estatisticamente significativa a inibição da proliferação celular decorrente dos efeitos da TFD utilizando o azul de metileno (AM) a 2,5 μM (L+ AM+), a inibição causada pela TFD utilizando o azul de toluidina O (ATO) a 8,4 μM também mostrou ser estatisticamente significativa, ambos quando comparados com o grupo controle absoluto (L- AM-; L- ATO-). A doxorubicina (Doxo) na concentração de 10 μM apresenta uma inibição mais eficiente sobre as células B16F10 que a apresentada pela TFD utilizando ambos os compostos fenotiazínicos.

5.3. MICROSCOPIA ÓPTICA MOSTRA ALTERAÇÕES CELULARES APÓS TRATAMENTO COM COMPOSTOS FENOTIAZÍNICOS UTILIZADOS EM TFD.

Após o tratamento com os compostos fenotiazínicos por 24 h, as células B16F10 apresentavam prolongamentos citoplasmáticos, caracterizando espraçamento, semelhantes ao controle (Figura 8C-D). As células irradiadas na ausência dos compostos fenotiazínicos também demonstraram espraçamento, além de observarmos a presença de células em divisão celular (Figura 8B). Quando realizado o protocolo da TFD, é nitidamente percebida uma redução do número de células por campo, além do aumento da relação núcleo/citoplasma demonstrando que existe sim uma redução do conteúdo citoplasmático sem alteração nuclear (Figura 8E-F).

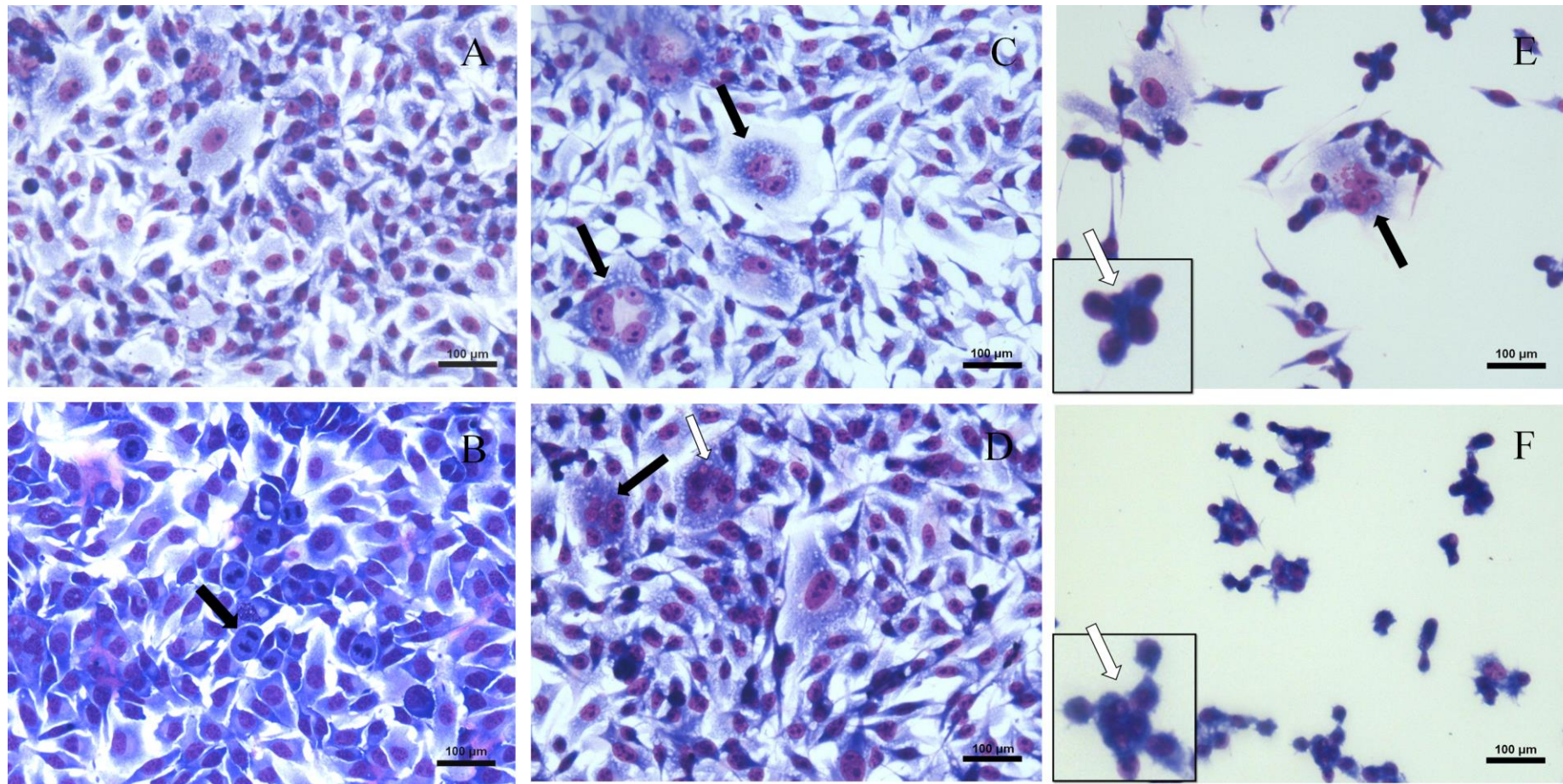


Figura 6 Efeito da TFD avaliada por coloração com panótico rápido. (A) Células controle, apresentando padrão de esperaimento característico e núcleos delimitados, mantendo o padrão normal de relação núcleo/citoplasma; (B) Células irradiadas na ausência dos compostos fenotiazínicos, mantendo características semelhantes ao controle, além disso é possível observar células em divisão celular (seta); (C) Células tratadas com 2,5 μM de Azul de Metileno (AM) com aparecimento de núcleos alterados com aparente fragmentação (setas pretas). (D) Células tratadas com 8,4 μM de Azul de Toluidina O (ATO), presença de núcleo aparentemente fragmentado semelhante ao encontrado em (AM (seta preta), além de células com vacúolos citoplasmáticos (seta branca). (E) Células submetidas à TFD utilizando AM mostrando células com possível fragmentação nuclear (seta preta) além da aparente formação de aglomerados indicativos de corpos apoptóticos (seta branca). (F) Células submetidas à TFD utilizando ATO demonstrando diminuição da quantidade de células no campo e presença de corpos apoptóticos semelhantes ao encontrado em (E) (seta branca). As imagens foram obtidas no aumento de 200x.

5.4. ALTERAÇÃO ULTRAESTRUTURAL APÓS TRATAMENTO COM COMPOSTOS FENOTIAZÍNICOS NA TFD.

Utilizando a Microscopia Eletrônica de Varredura, observamos o padrão dos prolongamentos citoplasmáticos característicos do controle (Figura 9A) e percebemos que o Laser não induz alteração nesse padrão (Figura 9B). Ao avaliarmos os efeitos dos compostos fenotiazínicos sem irradiação sobre células B16F10, observamos a presença de células arredondadas, demonstrando os efeitos tóxicos desses compostos (Figura 9C-D). Na TFD utilizando AM e ATO, figura 9 E e F, respectivamente, identificamos estruturas semelhantes a remanescente membranares provenientes dos prolongamentos celulares, entretanto, existe uma aparente ausência do seu conteúdo citoplasmático, indicando possível extração celular.

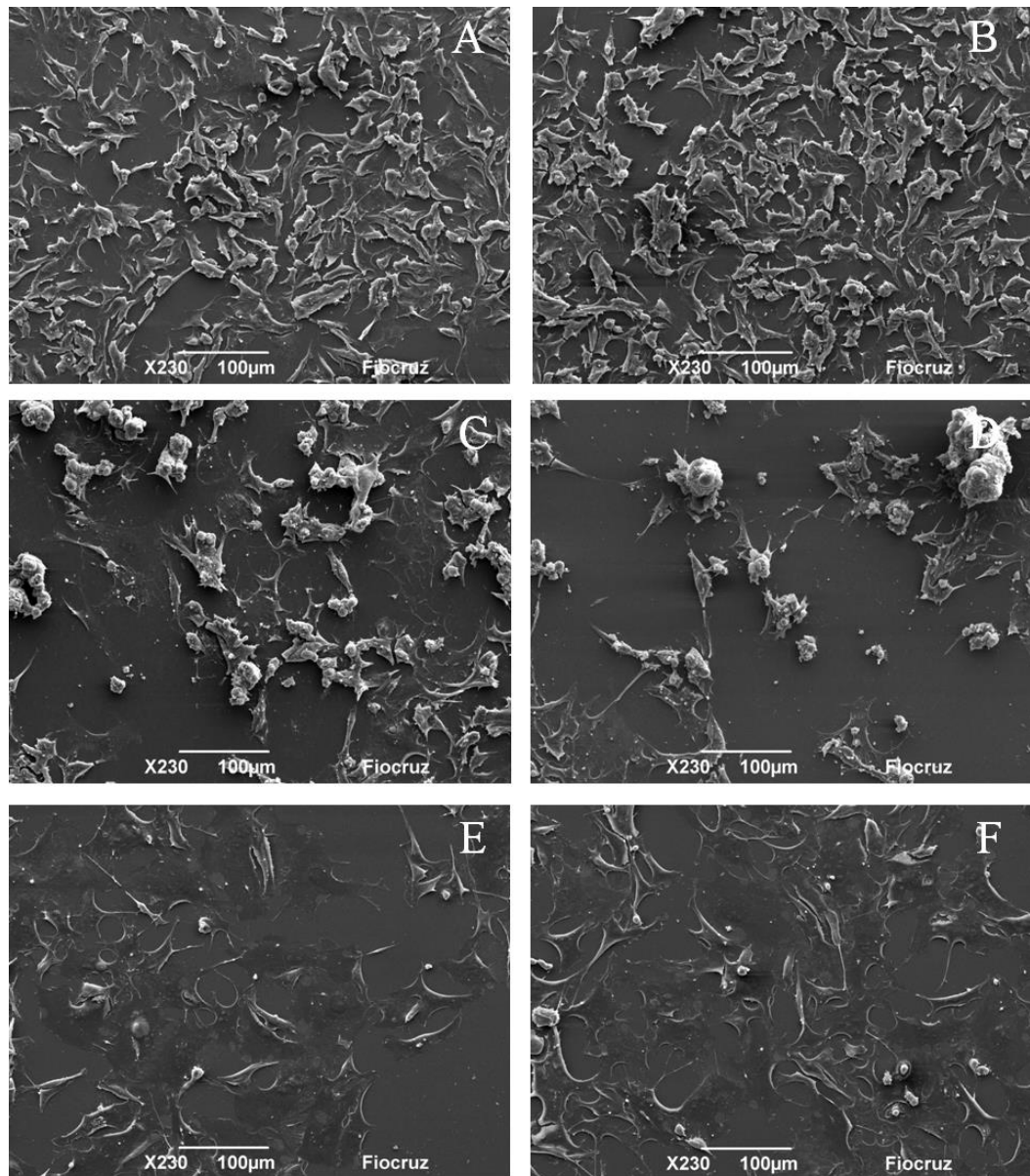


Figura 7 Alterações ultraestruturais em células B16F10 após TFD avaliadas por microscopia eletrônica de varredura. (A) Célula do controle mostrando espraio citoplasmático e tridimensionalidade celular; (B) Células irradiadas com laser 150 J/cm^2 , na ausência dos compostos fenotiazínicos, mostrando características semelhantes ao controle; (C) Células tratadas com $2,5 \text{ }\mu\text{M}$ de Azul de Metileno (AM), apresentando algumas células com padrão de reduzido espraio; (D) Células tratadas com $8,4 \text{ }\mu\text{M}$ de Azul de Toluidina apresentando mais células com padrão semelhante pouco espraio com as quais encontradas em (C); (E) Células tratadas com TFD utilizando AM mostrando estruturas membranares semelhantes ao espraio normal das células, entretanto sem aparente conteúdo celular; (F) Células submetidas à TFD utilizando ATO e presença de células com padrão extraído semelhante à figura E.

6. DISCUSSÃO

O melanoma é o mais agressivo dos tipos de câncer de pele, levando o indivíduo ao óbito entre 8 e 18 meses, além do tratamento atual não apresentar eficácia satisfatória, fatores ambientais facilitam o aparecimento dessa neoplasia, como exposição ao sol e negligência do uso de protetores solares (FINN et al., 2012).

Em nosso trabalho um efeito inibitório da proliferação celular decorrente da ação dos compostos fenotiazínicos utilizados na TFD foi demonstrado valor de IC_{50} de 2,5 μM para o AM e 8,4 μM para o ATO foram eficientes usando uma concentração cerca de uma ordem de grandeza abaixo daquela usada por CHEN et al. (2008), em linhagens de células de melanoma tratadas com TFD mostrando a eficácia na TFD utilizando AM na concentração de 20 μM em linhagens de melanoma.

A dosagem do laser utilizada foi de 150 J/cm^2 , é considerada alta para tratamentos *in vitro* e em algumas situações para experimentação *in vivo*, entretanto existem dados que reportam a utilização de dosagens próximas a esta em tratamentos clínicos de casos de melanoma como 120 J/cm^2 (SHELENG et al., 2004) ou 200 J/cm^2 (HADDAD et al., 1998)

A efetividade da TFD depende da seleção de comprimento de onda adequado para irradiação, bem como na escolha do FS, o qual exerce o efeito fotodinâmico, usualmente pela produção de ERO (DAVILA, 2011). Neste sentido a TFD pode constituir uma valiosa ferramenta na terapêutica do melanoma uma vez que a melanina, peptídeo que protege os epitélios de diferentes frequências de radiação (NATARAJAN et al., 2014) pode ser, *per se*, a origem de ERO, como no caso do melanoma (FRUEHAUF e TRAPP, 2008). Sendo a melanina capaz de absorver a radiação luminosa, entre outras, em algumas circunstâncias pode transduzir essa energia na geração de radical livre. Esse fato pode ser explorado no desenvolvimento de novos fármacos.

O Azul de Metileno e o Azul de Toluidina O são os compostos utilizados em associação à radiação de luz visível, uma vez que possuem características que proporcionam ampla aplicabilidade na TFD, incluindo o espectro de excitação desses compostos que permite ação em tecidos mais profundos, sua baixa toxicidade a qual resulta em uma considerável tolerância (BUCK, 2009).

O uso desses compostos no tratamento de diversas doenças já foram reportadas em modelos bacterianos como *Helicobacter pylori* (CHOI et al., 2014 b), parasitos *e. g.*, *Plasmodium* sp. (GORKA et al., 2013), modelos de Alzheimer (PABAN et al., 2014; PETZER et al., 2014) e de cardiopatias como o Colapso Cardiovascular (LO et al., 2014), melhorando o prognóstico dessas doenças. Neste ínterim, nosso grupo e outros grupos vêm empenhando esforços na padronização de experimentos que usem a linhagem B16F10 como modelo na terapia fotodinâmica a fim de investigar as possíveis modificações que possam estar associadas aos tratamentos quimioterápicos, visando a identificação de uma terapêutica eficiente de baixo custo para esta neoplasia (DAVILA, 2011; MIRANDA et al. 2014).

A avaliação estrutural celular por microscopia óptica vem sendo utilizada majoritariamente no diagnóstico laboratorial de neoplasias e doenças infecciosas. Entretanto pode-se utilizar essa metodologia para observar alterações citoplasmáticas e nucleares drásticas, detectáveis em menores aumentos. Ao observar, em nosso estudo, células tratadas com os compostos fenotiazínicos sem irradiação, uma aparente vacuolização e fragmentação nuclear foi encontrada, sugerindo alterações encontradas em células apoptóticas (MROZ et al., 2011).

A maioria das células observadas em microscopia óptica, além da evidência de fragmentação nuclear, tanto as células tratadas com a TFD utilizando o AM quanto ATO apresentava redução do conteúdo citoplasmático, podendo então não ser apoptose o tipo de morte celular envolvido, sugerindo alterações decorrentes de um processo necrótico (WACHOWSKA et al., 2011). Além disso, foram observados agregados de estruturas celulares indicativos de formação de corpos apoptóticos.

Quando avaliamos o perfil ultraestrutural através da microscopia eletrônica de varredura percebemos que as células tratadas apenas com os compostos fenotiazínicos apresentam padrão de reduzido espriamento indicando um possível dano celular (LIM et al., 2013), uma vez que as células do controle apresentam espriamento característico. Esse tipo de alteração sugere que a célula esteja em processo apoptótico, entretanto, em geral sob MEV as células apoptóticas não apresentam padrão de células espriadas sobre o substrato (KRYSKO et al., 2006). Quando irradiados os compostos fenotiazínicos promovem um tipo de alteração onde aparentemente o conteúdo celular foi extraído e mantendo parte do citoplasma aderido e espriado, o que nos leva à sugestão de necrose, já sendo reportado na literatura, eficiente dano membranar causado pela ação dos fenotiazínicos (BACELLAR et

al., 2014). Assim sendo, nas condições experimentais empregadas aqui, foram deflagradas dois mecanismo de morte celular i.e. apoptose e necrose. Vale salientar que estes processos não são reciprocamente excludentes, podendo ocorrer simultaneamente ou sucessivamente.

Os presentes dados indicam que a TFD sobre melanoma murino pode ser um processo efetivo na redução da proliferação tumoral, entretanto novos estudos devem ser feitos para elucidar com maior clareza os processos pelos quais essa terapêutica desencadeia essa inibição e como diminuir as limitações dessa técnica em casos de metástase ou má absorção dos fotosensibilizadores.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A TFD utilizando compostos fenotiazínicos pode vir a ser uma alternativa para o tratamento do melanoma, entretanto é necessário identificar os alvos celulares e alterações que esta terapêutica pode provocar.

Sabendo da redução da quantificação celular *in vitro*, e da possível alteração membranar decorrente da TFD, podemos sugerir que a avaliação dos processos de morte, deve ser realizada para concluirmos quais os eventos que desencadeiam os tipos de morte celular envolvidos na TFD, utilizando compostos fenotiazínicos.

Contudo outras abordagens devem ser consideradas enfocando efeitos a TFD pode desenvolver em outros tipos celulares incluindo células não neoplásicas de mamíferos.

REFERÊNCIAS

- ALGAZI, A. P.; SOON, C. W.; DAUD, A. I. Treatment of cutaneous melanoma: current approaches and future prospects; **Cancer Manag. Res.**, v. 2, p. 197-211, 2010.
- ALLISON, R. R. et al. Photosensitizers in clinical PDT. **Photo. Photo. Ther.**, v. 1, p. 27-42, 2004.
- AOYAMA, T. et al. Methylene blue-assisted technique for harvesting lymph nodes after radical surgery for gastric cancer: a prospective randomized phase III study. **BMC Cancer**, v.14, p.1-4, 2014.
- AUTIER, P.; BONIOL, M.; DORÉ, J. F. Is sunscreen use for melanoma prevention valid for all sun exposure circumstances? **J. Clin. Oncol.**, v. 29, e425-6, 2011.
- BACELLAR, I. O. L. et al. Membrane damage efficiency of phenothiazinium photosensitizers. **Photo. and Photo.**, vol. 90, p. 801–813, 2014.
- BAO, Q.; LU, W.; RABINOWITZ, J. D.; SHI, Y. Calcium blocks formation of apoptosome by preventing nucleotide exchange in Apaf-1. **Mol. Cell.**, v. 25, p. 181-92, 2007.
- BARBOSA, A. F. et al. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) using phenothiazine derivatives as photosensitizers against *Leishmania braziliensis*. **Las. Surg. Med.**, v. 44, p. 850-855, 2012.
- BEI, D.; ZHANG, T.; MUROWCHICK, J. B.; YOUAN, B. C. Formulation of dacarbazine-loaded cubosomes. part iii. physicochemical characterization; **Amer. Ass. Pharm. Sci.**, v. 11, p. 1243-1249, 2010.
- BELLO, B. D.; TOSCANO, M.; MORETTI, D.; MAELLARO, E. Cisplatin-induced apoptosis inhibits autophagy, which acts as a pro-survival mechanism in human melanoma cells. **Plos One**, v. 8, e57236, 2013.
- BHATIA, S.; TYKODI, S. S.; THOMPSON, J. A. Treatment of metastatic melanoma: An Overview; **Oncology**, v. 23, p. 488–496, 2009.
- BOHMER, R. M.; MORSTYN, G. Uptake of hematoporphyrin derivative by normal and malignant cells: effect of serum, pH, temperature, and cell size. **Cancer Res.**, v. 45, p. 5328-5334, 1985.
- BRADFORD, P. T. Skin cancer in skin of color. **Dermatol. Nurs.**, v.21, p. 170-178, 2009.
- BRESLOW, A. Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. **Ann. Surg.**, v. 172, p. 902-908, 1970.
- BRODIN, N. P.; GUHA, C.; TOMÉ, W. A. Photodynamic therapy and its role in combined modality anticancer treatment. **Technol. Cancer Res. Treat.**, v. 5, pii: 1533034614556192. [Epub ahead of print], 2014.

BUCK, S. T. G. **Relação entre Eficiência Fotodinâmica, Citotoxicidade e Propriedades Moleculares de Corantes Para Aplicação em Terapia Fotodinâmica.** Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, Instituto de Química de São Carlos, São Paulo, 2009.

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

CAPELLA, M. A.; CAPELLA, L. S. A light in multidrug resistance: photodynamic treatment of multidrug-resistant tumors. **J. Biomed. Sci.**, v. 10, p. 361-366, 2003.

CARVALHO, M. H. C. Drought stress and reactive oxygen species: Production, scavenging and signaling. **Plant Signal Behav.**, v. 3, p. 156-165, 2008.

CASTANO A. P.; DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: part one—photosensitizers, photochemistry and cellular localization. **Photo. Photodyn. Ther.**, v. 1, p. 279-293, 2004.

CHEN, Y. et al. Apoptosis induced by methylene-blue-mediated photodynamic therapy in melanomas and the involvement of mitochondrial dysfunction revealed by proteomics. **Cancer Sci**, v. 99, p. 2019–2027, 2008.

CHEVOLET, I. et al. Clinical significance of plasmacytoid dendritic cells and myeloid-derived suppressor cells in melanoma. **J. Transl. Med.**, v. 13, p. 1-18, 2015.

CHODUREK, E. et al. Valproic acid enhances cisplatin cytotoxicity in melanoma cells. **Acta Pol. Pharm. Drug Res.**, v. 69, p. 1298-1302, 2012.

CHOI, M. C.; LEE, C.; KIM, S. J. Efficacy and safety of photodynamic therapy for cervical intraepithelial neoplasia: A systemic review. **Photoch. Photodyn Ther.**, v. 11, p. 479-80, 2014 a.

CHOI, S. S.; LEE, H. K.; CHAE, H. S. Synergistic in vitro photodynamic antimicrobial activity of methylene blue and chitosan against *Helicobacter pylori* 26695. **Photo. Photodyn Ther.**, v. 11, p. 526-32, 2014 b.

CHRISTENSEN, T.; FEREN, K.; MOAN, J.; PETTERSEN, E. photodynamic effects of haematoporphyrin derivative on synchronized and asynchronous cells of different origin. **Br. J. Cancer**, v. 44, p. 717-724, 1981.

CLARK, W. H. Jr.; FROM, L.; BERNARDINO, E. A.; MIHM, M. C. The Histogenesis and Biologic Behavior of Primary Human Malignant Melanomas of the Skin; **Cancer Res.**, v. 29, p. 75-727, 1969.

COLETTA, R. D. et al. Six1 Overexpression in Mammary Cells Induces Genomic Instability and Is Sufficient for Malignant Transformation. **Cancer Res.**, v. 68, p. 2204-2213, 2008.

COUPIENNE, I. et al. 5-ALA-PDT induces RIP3-dependent necrosis in glioblastoma. **Photochem. Photobiol. Sci.**, v. 10, p. 1868-1878, 2011.

- DAVILA, M. L. Photodynamic therapy. **Gastrointest. Endosc. Clin. N. Am.**, v. 21, p.67-79, 2011.
- DEPPONG, C. M. et al. CTLA4Ig inhibits effector T cells through regulatory T cells and TGF- β . **J. Immunol.**, v. 191, p. 3082-3089, 2013.
- DERYNCK, R.; AKHURST, R. J.; BALMAIN, A. TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression. **Nat. Genet.**, v. 29, p. 117-129, 2001.
- DOUGHERTY, T. J. et al. Photodynamic therapy; **J. Nat.Canc. Inst.**, v. 90, p.889-905, 1998.
- EL-OSTA, H. et al. Mutations in advanced cancers: clinical characteristics and outcomes, **PlosOne**, v. 6; e25806, 2011.
- FERNANDES, N. C. et al. Cutaneous melanoma: prospective study of 65 cases, **An. Bras. Dermatol.**, v. 80, p.25-34, 2005.
- FERREIRA, J.; MENEZES, P. F. C. Terapia Fotodinâmica para tumores. In: BAGNATO, Vanderlei S. **Novas técnicas ópticas para as áreas da saúde**. São Paulo: Editora Livraria da Física, 2008. p. 97-122.
- FINN, L.; MARKOVIC, S. N.; JOSEPH R. W. Therapy for metastatic melanoma: thepast, present, and future. **BMC Med.**, v. 10, 2012.
- FRUEHAUF, J. P.; TRAPP, V. Reative oxigen species: an achilles' heel of melanoma? **Exp. Rev. Anticancer Ther.** v. 8, p. 1751-1757, 2008.
- FUHRMANN, G. et al. Active loading into extracellular vesicles significantly improves the cellular uptake and photodynamic effect of porphyrins. **J. Control. Release.** pii: S0168-3659(14)00777-9. [Epub ahead of print] 2014.
- GONZALES, F. P.; **Triagem, identificação e determinação de parâmetros funcionais de fotossensibilizadores com ação antifúngica**. Monografia (Mestrado em Biociências Aplicadas à Farmácia) – USP, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2007.
- GORKA, A. P., JACOBS, L.M., ROEPE, P. D, Cytostatic versus cytocidal profiling of quinolinedrug combinations via modified fixed-ratio isobologram analysis. **Malaria J.**, v. 12, 2013.
- GRACIANO, T. B. et al. Using chitosan gels as a toluidine blue O delivery system for photodynamic therapy of buccal cancer: In vitro and in vivo studies. **Photo Photodyn. Ther.** pii: S1572-1000(14)00139-2, 2014.
- GUPTA, A. et al. Ultraviolet radiation in wound care: sterilization and stimulation. **Adv. Wound Care (New Rochelle)**, v. 2, p. 422-437, 2013.
- GUTTMAN, P. EHRLICH, P. Ueber die wirkung des methylenbau bei malaria. **Berliner Klin. Wochen..**, v. 39, p. 953-956, 1981.
- HADDAD, R. et al. In vitro and in vivo effects of photodynamic therapy on murine malignant melanoma. **Ann. Surg. Oncol.**, v. 5, p. 241-247, 1998.

- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, p. 646-674, 2011.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, p. 57-70, 2000.
- HEJMADI, M. **Introduction to cancer biology**. Ed. BookBoon, 2009. p. 41.
- HOCKER, T. L., SINGH M. K.; TSAO, H. Melanoma genetics and therapeutic approaches in the 21st century: moving from the benchside to the bedside. **J. Invest Dermatol.**, v. 128, p. 2575-2595, 2008
- HONG, M. J. et al. Long-term outcome of photodynamic therapy with systemic chemotherapy compared to photodynamic therapy alone in patients with advanced hilar cholangiocarcinoma. **Gut and Liver**, v. 8, p. 318-323, 2014.
- HUANG, Z. et al. Photodynamic therapy for treatment of solid tumors – potential and technical challenges. **Technol. Cancer Res. Treat.**, v. 7, p. 309-320, 2008.
- INCA. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação Geral de Ações Estratégicas. **Diretrizes para a vigilância do câncer relacionado ao trabalho**. Rio de Janeiro, 2012.
- INCA. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. **Estimativa 2014: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, 2014.
- JEMAL, A. et al. Global cancer statistics. **CA Cancer J. Clin.**, v. 61, p. 69-90, 2011.
- KALKA, K.; MERK, H.; MUKHTAR H. Photodynamic therapy in dermatology. **J. Amer. Acad. Dermatol.**, v. 42, p. 309-413, 2000.
- KIM, M. et al. Comparative oncogenomics identifies NEDD9 as a melanoma metastasis gene. **Cell**, v. 125, p. 1269-1281, 2006.
- KRIEG, C. et al. Improved IL-2 immunotherapy by selective stimulation of IL-2 receptors on lymphocytes and endothelial cells; **PNAS**, v. 107, p. 11906-11911, 2010.
- KRYSKO D. V., D'HERDE K., VANDENABEELE P. Clearance of apoptotic and necrotic cells and its immunological consequences. **Apoptosis**, v. 11, p.1709-1726 2006.
- KYRGIDIS, A.; TZELLOS, T. G.; TRIARIDIS, S.; Melanoma: Stem cells, sun exposure and hallmarks for carcinogenesis, molecular concepts and future clinical implications. **J. Carcinog.**, v. 9, p. 1-17, 2010.
- LAMCH, L. et al. Polymeric micelles for enhanced Photofrin II(®) delivery, cytotoxicity and pro-apoptotic activity in human breast and ovarian cancer cells. **Photodiag. Photodyn Ther.**, v. 1, p. 570-585, 2014.
- LEE, H.Y. et al. Melanoma: differences between asian and caucasian patients; **Ann. Acad. Med.**, v. 41, p. 17-20, 2012.

- LI, W.; MELTON, D. W. Cisplatin regulates the MAPK kinase pathway to induce increased expression of DNA repair gene ERCC1 and increase melanoma chemoresistance. **Oncogene**, v. 31, p. 2412-2422, 2012.
- LI, Z. et al. Six1 mediates resistance to paclitaxel in breast cancer cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 441, p. 538-543, 2013.
- LIM, E. J.; OAK, C.; HEO, J.; KIM, Y. Methylene blue-mediated photodynamic therapy enhances apoptosis in lung cancer cells. **Oncol. Rep.**, v. 30, p. 856-862, 2013.
- LO, J. C.; DARRACQ, M. A.; CLARK, R. F. A review of methylene blue treatment for cardiovascular collapse. **J. Emerg. Med.**, v. 46, p. 670-679, 2014.
- LONG, Q. Z. et al. Interaction of CCN1 with $\alpha\beta 3$ integrin induces P-glycoprotein and confers vinblastine resistance in renal cell carcinoma cells. **Anticancer Drugs**, v. 24, p. 810-817, 2013.
- LSHAI-MICHAELI, R.; ELDOR, A.; VLODAVSKY, I. Heparanase activity expressed by platelets, neutrophils, and lymphoma cells releases active fibroblast growth factor from extracellular matrix. **Cell Regul.**, v. 1, 833-842, 1990.
- LU, K.; HE, C.; LIN, W. Nanoscale metal-organic framework for highly effective photodynamic therapy of resistant head and neck cancer. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 136, p. 16712-16715, 2014.
- MALHI, H.; KAUFMAN, R. J. Endoplasmic reticulum stress in liver disease. **J. Hepatol.**, v. 54, p. 795-809, 2011.
- MEISEL, P.; KOCHER, T. Photodynamic therapy for periodontal diseases: state of the art. **J. Photochem. Photobiol. B.**, v. 79, p. 159-170, 2005.
- MILLA, L. N. et al. Isolation and characterization of squamous carcinoma cells resistant to photodynamic therapy. **J. Cell. Biochem.**, v. 112, p. 2266-2278, 2011.
- MIRANDA, A. F. S. et al. Phenothiazinium dyes in association with diode laser against B16F10 melanoma cells: in vitro study. **Procee. - SPIE.**, v. 8932, p. 8932121-8932126, 2014.
- MITTAL, A.; TABASUM, S.; SINGH, R. P. Berberine in combination with doxorubicin suppresses growth of murine melanoma B16F10 cells in culture and xenograft. **Phytomedicine**, v. 21, p. 340-347, 2014.
- MROZ, P. et al. Cell death pathways in photodynamic therapy of cancer. **Cancers**, v. 3, p. 2516-2539, 2011.
- NATARAJAN, V. T. et al. Multifaceted pathways protect human skin from UV radiation. **Nat. Chem. Biol.**, v. 10, p. 542-551, 2014.
- OLIVEIRA, T. L. et al. Antitumoural effect of *Synadenium grantii* hook f. (Euphorbiaceae) latex. **J. Ethnopharmacol.**, v. 150, p. 263-269, 2013.
- OTTER, W. D. et al. Local therapy of cancer with free IL-2; **Cancer Immunol. Immunother.** v. 57, p. 931-950, 2008.

- OU-YANG, H.; STAMATAS G.; KOLLIAS, N. spectral responses of melanin to ultraviolet A irradiation. **J. Invest. Dermatol.**, v. 2, p.492-496, 2004.
- PELOI, L. S. et al. Photodynamic therapy for American cutaneous leishmaniasis: the efficacy of methylene blue in hamsters experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Exp. Parasitol.**, v. 128, p. 353-356, 2011.
- PEREZ-MORENO, M. et al. Loss of p120 catenin and links to mitotic alterations, Inflammation, and skin cancer. **PNAS**, v. 105, p. 15399-15404, 2008.
- PETZER, A., HARVEY, B. H., PETZER, J. P. The interactions of azure B, a metabolite of methylene blue, with acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 274, p.488-493, 2014.
- PHOENIX, D. A.; HARRIS, F. Phenothiazinium-based photosensitizers: antibacterials of the future? **Trends Mol. Med.**, v.9, p. 283-285, 2003.
- PUPO, Y. M. et al. Susceptibility of *candida albicans* to photodynamic therapy using methylene blue and toluidine blue as photosensitizing dyes. **Acta Odontol. Latinoam.**, v. 24, p. 188-192, 2011.
- REGAD T. Molecular and cellular pathogenesis of melanoma initiation and progression. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 70, p. 4055-4065, 2013.
- RUDDON, R. W. **Cancer biology — characteristics of human cancer**. 4^a ed., Oxford University Press, 2007. Cap. 1
- SADANALA, K. C. et al. Sono-photodynamic combination therapy: a review on sensitizers. **Anticancer Res.**, v. 34, p. 4657-4664, 2014.
- SEETHARAMU, N.; OTT, P. A.; PAVLICK, A. C Mucosal melanomas: a case-based review of the literature, **The Oncologist**, v. 15, p. 772-781, 2010.
- SELIMOVIC, D. et al. Vinblastine-induced apoptosis of melanoma cells is mediated by Ras homologous A protein (Rho A) via mitochondrial and non-mitochondrial-dependent mechanisms. **Apoptosis**, v. 18, p. 980-997, 2013.
- SERGEY, V. et al. Photodynamic therapy with chlorin e6 for skin metastases of melanoma. **Photoder., Photoimm. Photomed.**, v. 20, p. 1-9, 2004.
- SHEMESH, C. S.; MOSHKELANI, D.; ZHANG, H. Thermosensitive liposome formulated indocyanine green for near-infrared triggered photodynamic therapy: in vivo evaluation for triple-negative breast cancer. **Pharm Res.** [Epub ahead of print], 2014.
- SIEGEL, R.; MA, J.; ZOU, Z.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2014. **CA Cancer J. Clin.**, v. 64, p. 9-29, 2014.
- SOENGAS, M. S. et al. Inactivation of the apoptosis effector Apaf-1 in malignant melanoma. **Nature**, v. 409, p. 207-211, 2001.

- SUNG, N. et al. Inactivation of multidrug resistant (MDR)- and extensively drug resistant (XDR)-Mycobacterium tuberculosis by photodynamic therapy. **Photodiagn. Photodyn. Ther.**, v. 10, p.694-702, 2013.
- TOMESCU, D. et al. Nucleotide excision repair gene XPD polymorphisms and genetic predisposition to melanoma. **Carcinogenesis**, v. 22, p. 4038, 2001.
- VANNIER-SANTOS, M.A.; LINS, U. Cytochemical techniques and energy-filtering transmission electron microscopy applied to the study of parasitic protozoa.. **Biol. Proced Online**, v. 3, p. 8–18, 2001.
- VASHISHT, N. et al. Chemiluminescence and toluidine blue as diagnostic tools for detecting early stages of oral cancer: An invivo study. **J. Clin. Diagn. Res.**, v. 8 p. 35-38, 2014.
- VIDWANS, S. J. et al. A melanoma molecular disease model. **PlosONE**, v. 6, e18257, 2011.
- VILLARES, G. J.; BAR-ELI, M. Regulation of melanoma progression by the tumor microenvironment: the roles of PAR-1 and PAFR. **Regul. Gene Expr. Tumor Environ.** v. 2, p 1-10, 2008.
- VOHRA, F. et al. Efficacy of photodynamic therapy in the management of oral premalignant lesions. A systematic review. **Photodiagnosis Photodyn Ther.**, pii: S1572-1000(14)00126-4. [Epub ahead of print], 2014.
- VUMMIDI, B. R. et al. Photodynamic agents with anti-metastatic activities. **ACS Chem. Biol.**, v. 8, p. 1737-1746, 2013.
- WACHOWSKA, M. et al. Aminolevulinic Acid (ALA) as a prodrug in photodynamic therapy of cancer. **Molecules**, v. 16, p. 4140-4164, 2011.
- WAGNER, M. et al. Methylene blue photodynamic therapy in malignant melanoma decreases expression of Proliferating cell nuclear antigen and heparanases. **Clin. Exper. Dermatol.**, v. 37, p. 527-533, 2012.
- WANG, P. et al. Anti-metastatic and pro-apoptotic effects elicited by combination photodynamic therapy with sonodynamic therapy on breast cancer both in vitro and in vivo. **Ultrason. Sonochem.**, v. 23, p. 116-127, 2014.
- WARBURG, O.; WIND, F.; NEGELEIN, E. The metabolism of tumors in the body. **J. Gen. Physiol.**, v. 8, p, 519-530, 1927.
- WELSH, C. et al. Reduced levels of xpa, ercc1 and xpf dna repair proteins in testis tumor cell lines. **Int. J. Cancer**, v. 110, p. 352-361, 2004.
- YANG, K.; FENG, L.; LIU, Z. The advancing uses of nano-graphene in drug delivery. **Exp. Opin. Drug Deliv.**, v. 3, p.1-12, 2014.
- YANO, T. et al. Photodynamic therapy for esophageal cancer. **Ann. Transl. Med.**, v. 3, p. 1-4, 2014.
- YI, E. et al. Clinical outcome of photodynamic therapy in esophageal squamous cell carcinoma. **J. Photochem. Photobiol. B**, v. 141, p. 20-25, 2014.

YOSHIMURA, A.; MUTO, G. TGF- β function in immune suppression. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, v. 350, p. 127-147, 2011.

ZHANG, S.; MERCADO-URIBE, I.; LIU, J. Tumor stroma and differentiated cancer cells can be originated directly from polyploid giant cancer cells induced by paclitaxel. **Inter. J. Cancer**, v. 134, p. 508-518, 2014.

LINKS ELETRÔNICOS

INCA. **Atlas de mortalidade por câncer**. Última atualização 18.07.2013. Disponível em: <http://mortalidade.inca.gov.br/Mortalidade/prepararModelo02.action>. Acesso em: 17/03/2015

National Cancer Institute. **Photodynamic therapy for cancer**. Fact Sheet 09.06.2011. Disponível em: <http://www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/Therapy/photodynamic>. Acesso em: 17/03/2015

OMS. Organização Mundial de Saúde - **Causes of death 2008 summary tables; health statistics and informatics department**, World Health Organization, Geneva, Switzerland, 2011; Disponível em: <
http://www.google.com.br/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&ved=0CCQQFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.who.int%2Fentity%2Fgho%2Fmortality_burden_disease%2Fglobal_burden_disease_DTH6_2008.xls&ei=Kw-EUJ_mIb49QTssoDoDg&usg=AFQjCNF7PIHQNWUv8jairWoXmt7SFte_Ow>. Acesso em: 17/03/2015

OMS. Organização Mundial de Saúde – **Mortality and global health estimates: Cause-specific mortality**. 2013. Disponível em: <http://apps.who.int/gho/data/node.main.GHECOD?lang=en>. Acesso em: 17/03/2015