

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ Pós-Graduação
em Biologia Celular e Molecular**

EDITH ALEJANDRA CARREÑO MENDIVELSO

TERAPIA FOTODINÂMICA PARA O TRATAMENTO DE TUMORES DO
SISTEMA NERVOSO: DA CONCEPÇÃO AOS TESTES *IN VITRO*

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como
parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora
em Biologia Celular e Molecular

Orientadores: Prof. Dr. Luiz Anastacio Alves

Prof. Dr. Andrea Henriques Pons

Rio de Janeiro
Dezembro de 2019

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ Programa de Pós-Graduação
em Biologia Celular e Molecular**

EDITH ALEJANDRA CARREÑO MENDIVELSO

TERAPIA FOTODINÂMICA PARA O TRATAMENTO DE TUMORES DO
SISTEMA NERVOSO: DA CONCEPÇÃO AOS TESTES *IN VITRO*

Aprovada em: ____/____/____

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Vinicius Cotta de Almeida IOC- FIOCRUZ **Presidente**

Prof. Dr. Carmen Penido Monteiro FARMACOLOGIA APLICADA - FIOCRUZ

Prof. Dr. Thereza Fonseca Quirico Dos Santos UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE

Prof. Dr. Floriano Paes Silva Junior IOC- FIOCRUZ

Prof. Dr. Paulo de Assis Melo UFRJ

Rio de Janeiro, 02 de dezembro de 2019

V

vii **Para você, meu doce amor que deu fruto** - La frase "la persona se hizo sola" no existe, carece de veracidad. Todos estamos hechos por otros miles de personas. Cada ser que hizo algo bueno por nosotros, o nos dijo algunas palabras de aliento o aprobación, influyó en nuestra personalidad y nuestros hechos. Es por eso que se vuelven parte de cualquier **éxito nuestro**
George Matthew Adams, escrito

AGRADECIMENTOS

Pessoalmente, este trabalho representa o ponto mais alto de uma fascinante e desafiadora jornada que teve início no ano de 2014, com duas malas e muitos sonhos.

Em primeiro lugar, agradeço a Deus, ao mestre Jesus e ao meu lindo protetor pela inspiração e pelo amor que me mantiveram no caminho, quando foi preciso parar, para que eu pudesse continuar, mais adiante.

Em segundo lugar, a meu amado esposo Elkin, a ele fonte luz, amor, paciência e perseverança; a toda minha família na Colômbia, especialmente a minha filha Maria Fernanda, e meu bebê, ainda por nascer.

Em terceiro lugar, manifesto um agradecimento particular ao pessoal do Laboratório de Comunicação Celular e a o Dr. Floriano Paes Silva Junior por aceitar ser o revisor deste trabalho.

A meus orientadores, Dra. Andrea Henriques Pons, pela amabilidade constante e pela ajuda fornecida sempre, especialmente com a cultura de células e a escrita da tese. Ao Dr. Luiz Anastacio Alves, por abrir as portas do laboratório de Comunicação Celular a uma colombiana, de forma a permitir seu crescimento profissional e pessoal. Obrigada pelas orientações e por cuidar de todos nós sempre.

Agradeço a Cristina Alves Magalhães de Souza, por sua ajuda, seus ensinamentos. São muitos os cafés “falados”, pelos quais meu coração estará sempre agradecido.

A Ivone Ventura, o “coração do laboratório”, pela ajuda fornecida não somente em questões de burocracia, mas também pelo sorriso sincero, a palavra certa e o abraço fraternal quando precisei.

A Luiza Dantas, pelo carinho e por me explicar tudo aquilo que nos primeiros dias no Brasil não conseguia entender, por conta do meu pouco conhecimento da língua portuguesa.

vii

A Liana Monteiro, pela cooperação laboratorial, e mais importante, pela amizade e pelas conversas fortificantes nos momentos mais difíceis.

A Natiele Carla Ferreira, pelas discussões de dados, além do compartilhamento de cada dia no laboratório e pela ajuda fornecida quando precisei.

A Dinarte Ferreira Neto, pelas conversas, pela disposição de ajudar sempre e pela

cooperação no projeto.

A Anael Viana, pela constante orientação, pela vontade constante de sorrir e pelas caronas.

A Renato Matos, Rodrigo, Edson Falcão e todos os estudantes de Iniciação Científica, Tatiane, Ayla, Heber obrigada pela assistência e pelos gratos momentos de pesquisa.

Em geral, a todos os que durante este trajeto contribuíram de forma construtiva para o resultado final, quero manifestar o meu profundo reconhecimento e minha imensa gratidão.

Por fim, agradeço às agências financiadoras CAPES, CNPq e FAPERJ que forneceram os meios financeiros para este trabalho e a pós-graduação *Stricto sensu* em Biologia Celular e Molecular por toda assistência e formação concedida ao longo destes quatro últimos anos.

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

**TERAPIA FOTODINÂMICA PARA O TRATAMENTO DE ALGUNS TUMORES DO SISTEMA
NERVOSO: DA CONCEPÇÃO AOS TESTES IN VITRO**

RESUMO

TESE DE DOUTORADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Edith Alejandra Carreño Mendivelso

Apesar do grande avanço sobre o entendimento da biologia de tumores, os fármacos seletivos com reduzidos efeitos colaterais, ainda são insuficientes. Sendo assim, é imprescindível a busca por novas abordagens terapêuticas. Uma opção promissora é a Terapia Fotodinâmica (TFD), que utiliza moléculas fotossensibilizadoras (FS), capazes de gerar espécies reativas de oxigênio na presença de luz com comprimento de onda adequado, causando lesão tecidual seletiva. Este projeto teve como finalidade desenvolver uma proposta de TFD, desde a concepção, até os testes *in vitro*, que finalmente possibilite o desenvolvimento de uma estratégia para o tratamento de tumores de difícil prognóstico como glioblastoma. Nesse contexto, nosso primeiro passo foi desenhar e construir dois protótipos de fonte de luz. Esses equipamentos fornecem luz vermelha com potências entre $1,4 \pm 0,02$ e $26,5 \pm 2,8$

mW/cm² para aplicações em TFD. Em seguida, os protótipos foram validados testando o FS - azul de metileno (AM), por possuir baixa toxicidade sem estimulação luminosa, além de ser aprovado para uso clínico. Assim sendo, o AM foi aplicado em células tumorais de glioblastoma (GL261 e U87) e de neuroblastoma (SHSY5Y), sendo que a dose de luz de $17,5 \pm 1,87$ J/cm² levou a uma diminuição da EC₅₀ do AM em 50%, nas três linhagens celulares testadas. Em seguida, com o auxílio de metodologias de padronização disponíveis para *high throughput screening* (HTS), foi desenhado um protocolo que permitirá a avaliação *in vitro* da atividade fotossensível de novos compostos. Por fim, para potencializar o uso de AM em TFD, procuramos uma via que facilitasse a difusão e a permeabilização seletiva do AM nas células tumorais. Uma possibilidade estudada foi a utilização de poros presentes na membrana de determinadas células. De acordo com a literatura, a molécula de AM (319 Da), passa facilmente através do poro induzido pelo receptor P2X7 (P2X7R) que em resposta a altas doses do agonista ATP, permite passagem de moléculas com aproximadamente 1 kDa. Diante disso, células GL261 e SHSY5Y foram transfectadas com P2X7R e, através dos ensaios de captação de corante (EtBr, IP e YOPRO 1 µM), foi detectada a expressão e a funcionalidade do P2X7R. Avaliando a viabilidade celular, observamos um efeito de potencialização entre o ATP (1 mM) e o AM (50 µM), aumentando assim a eficiência da TFD em 40%. Em síntese, esses resultados sugerem que o poro associado ao P2X7R poderia ser utilizado como via de entrada de fármacos hidrofílicos em células que expressem este receptor. Em conjunto, os resultados apresentados neste trabalho constituem um importante alicerce para o desenvolvimento de uma nova abordagem de AM-TDF, que permita complementar o tratamento de tumores do sistema nervoso.

ix

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

**PHOTODYNAMIC THERAPY IN THE TREATMENT OF SOME TUMORS OF THE NERVOUS
SYSTEM: FROM CONCEPTION TO IN VITRO TESTS**

ABSTRACT

PHD THESIS IN CELLULAR AND MOLECULAR BIOLOGY

Edith Alejandra Carreño Mendivelso

Despite the significant advance in the understanding of tumor biology, more selective drugs with reduced side effects are still necessary. Thus, the search for new therapeutic approaches is essential. A promising option is Photodynamic Therapy (PDT). PDT uses photosensitizing molecules (PS), capable of generating reactive oxygen species (ROS) in the presence of the light of adequate wavelength, causing selective tissue damage. This project aimed to develop a proposal of PDT, from conception to in vitro tests, which finally enables the development of a strategy for the treatment of tumors of difficult prognosis as glioblastoma. In this context, our first step was to design and build two light prototypes based on halogen lamps and LED technology. These devices provide red light with potentials between 1.4 ± 0.02 and 26.5 ± 2.8 mW / cm² for TFD applications. Then, the prototypes were validated by testing the methylene blue (AM) FS, as it has low toxicity without light stimulation, and is approved for clinical use. AM (1 - 400 μ M) was applied to glioblastoma (GL261 and U87) and neuroblastoma (SHSY5Y) tumor cells, and the light dose of 17.5 ± 1.87 J / cm² decreased the EC₅₀ of AM in 50% in the three cell lines tested. Then, with the help of standardization methodologies available for High-throughput screening (HTS), a protocol was designed to allow the in vitro evaluation of the photosensitive activity of new compounds. Finally, to potentiate the use of AM in PDT, we sought a pathway that facilitated the diffusion and selective permeabilization - of AM - in tumor cells. One possibility studied was the use of pores present in the membrane of cells. Thus, according to the literature, the AM (319 Da) molecule quickly passes through the P2X7 receptor-induced pore (P2X7R) which, in response to high doses of the ATP agonist, allows passage of approximately 1 kDa molecules. To this end, GL261 and SHSY5Y cells were transfected with P2X7R, and through dye uptake assays (EtBr, IP and YOPRO 1 μ M), P2X7R expression and functionality were detected. Evaluating cell viability, we observed a potentiation effect between ATP (1 mM) and AM (50 μ M), thus increasing the efficiency of PDT by 40%. Therefore, these results suggest that the P2X7R-associated pore could be used as an entry route for hydrophilic drugs in cells expressing this receptor. Overall, taken together, the results presented in this paper form an essential foundation for the development of a new approach to AM-TDF, which can complement the treatment of nervous system tumors.

RESUMO

INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos Gerais do Câncer	1
1.1.1 Tipos de crescimento celular e classificação das neoplasias	1
1.1.2 Formação do câncer	3
1.2 Epidemiologia	8
1.3 Aspectos gerais de tumores do SNC	10
1.3.1 Classificação dos tumores do SNC	10
1.3.2 Incidência dos tumores do SNC	12
1.3.3 Glioblastoma	15
1.3.4 Neuroblastoma	19
1.4 Terapia Fotodinâmica	26
1.4.1 Histórico da Terapia Fotodinâmica (TFD)	26
1.4.2 Conceitos básicos da Terapia Fotodinâmica	31
1.4.3 TFD na clínica	44
1.4.4 Proteínas formadoras de poros	47
1.5 Objetivo Geral	52
1.6 Objetivos Específicos	52
DOCUMENTO I.....	54
DOCUMENTO II	72
DOCUMENTO III.....	88
DISCUSSÃO.....	106
CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	123
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	125

APÊNDICE.	155
DOCUMENTO IV.....	155

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Tipos de crescimento celular.	2
Figura 2. Neoplasias benignas e malignas.	3
Figura 3. Capacidades adquiridas, facilitadoras e emergentes que conduzem ao desenvolvimento do câncer.	4
Figura 4. A célula origem, seguida da evolução de uma célula-tronco cancerosa..	5
Figura 5. Microambiente tumoral (TME).	6
Figura 6. Mecanismos genéticos e epigenéticos.	7
Figura 7. Taxas estimadas de mortalidade no mundo padronizada por idade em 2018.	9
Figura 8. Taxas estimadas de incidência de câncer do cérebro e sistema nervoso central no mundo	14
Figura 9. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer de maior incidência no Brasil.	14
Figura 10. Representação esquemática do processo de diferenciação de células-	

tronco neurais em NB.	15
Figura 11. Glioblastoma multiforme.	17
Figura 12. Desenvolvimento da linhagem simpatoadrenal da crista neural..	20
Figura 13. Apresentações clínicas do neuroblastoma..	23
Figura 14. Plantas usadas para o tratamento de doenças cutâneas na antiguidade.	27
Figura 15 - Linha do tempo com principais eventos da história da terapia fotodinâmica.	30
Figura 16. Uma molécula em estado triplete excitado pode reagir de duas formas	31
Figura 17. Diagrama de níveis de energia de Jablonski simplificado para TFD. .	32
Figura 18. Moléculas presentes nas células que podem experimentar modificações após TFD.	34
Figura 19. Visão geral das sub-rotinas de morte celular que podem ser desencadeadas pela terapia fotodinâmica..	36
Figura 20. Estrutura molecular do azul de metileno adaptado de Tardivo & et al, 2005	42
Figura 21. Espectros de absorção (nm) do azul de metileno	43
xii	
Figura 22. Terapia Fotodinâmica (TFD).	45
Figura 23. Esquema ilustrativo com todos os membros da família de receptores purinérgicos descritos até hoje	49
Figura 24. Etapas e conclusões obtidas neste trabalho.....	123

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação general adaptada da OMS dos tumores primários do SNC (2016).	11
Tabela 2. Propriedades ideais de um fotossensibilizador para TFD	41
Tabela 3. Fotossensibilizadores aprovados para uso clínico ou em estudos clínicos (atualizado até 2019).	46
Tabela 4. Expressão em câncer do receptor P2X7.	50
Tabela 5. Equipamentos para experimentos <i>in vitro</i> de TFD com tecnologia LED.	128
Tabela 6. Ensaio de avaliação da viabilidade celular comumente usados em triagem de fármacos em TFD.	129
Tabela 7. Compostos químicos que podem interferir no ensaio de MTT	131
Tabela 8. Metodologias de normalização usada em testes de viabilidade em linhagens celulares de glioblastoma	133

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURA

5-ALA - ácido 5- aminolaevulínico

A.c. - antes de Cristo

ADN - ácido desoxirribonucleico

ADP - difosfato de adenosina

AKT - proteína quinase B

ALK - tirosina quinase do receptor do linfoma anaplásico

AM - azul de metileno

ATP - trifosfato de adenosina

BMP - proteína óssea morfogênica

Bz-ATP - benzoil ATP

BCR-ABL - proteína tirosina quinase BCR-ABL

CAFS - fibroblastos associados ao câncer

CTM - câncer medular da tireoide

CDAMPS - cell death associated molecular patterns

CgA - cromogranina A

CIS - cruzamento intersistemas

CCH - hiperplasia de células C

c-Kit - proteína tirosina quinase c-kit

CSC - célula-tronco cancerosa

CXCR4 - quimiocina CXCR4

Damps - damage associated molecular patterns

DBH - β -hidroxilase da dopamina

ECM - matriz extracelular

EGFR - fator de crescimento epidérmico

EM - especial metastática

EMT - transição epitelial-mesenquimal

FGFR - receptores do fator de crescimento de fibroblastos

GBM - glioblastoma multiforme

HER2 - receptor tipo 2 do factor de crescimento epidérmico humano

H₂O₂ - peróxido de hidrogênio **Hpd** - derivado de hematoporfirina

IARC - Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer

IDH 1/2 - isocitrato desidrogenasa 1 e 2

INCA - Instituto Nacional de Câncer

LDH - lactato desidrogenase

MAL - metil-aminolevulinato

MEC - matriz extracelular

MGMT - promotor metilguanina-metiltransferase

MKI - índice de mitose cariorrexia

mTOR - alvo de mamíferos da rapamicina

MRI - Ressonância magnética

NB - Neuroblastoma

NOS - Não Especificado de Outra Forma” (da sigla em inglês)

OMS – Organização Mundial da Saúde

PDGFR - receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas

PI3K - fosfatidilinositol 3-quinase

P2X7 - receptor purinérgico de nucleotídeos

RAS – proteína quinase RAS (vírus do sarcoma de rato)

RB1 – retinoblastoma

Receptor G – receptor acoplado á proteína G

RM - Ressonância Magnética

ROS Espécies Reativas de Oxigênio

SDF1- fator 1 derivado de células estromais

SNC - sistema nervoso central

Tams - macrófagos associados a tumor

TC - Tomografia Computadorizada

TFD - Terapia Fotodinâmica

TH - tirosina hidroxilase

TME - microambiente tumoral

VEGF - fator de crescimento endotelial vascular

VEGFR - receptores do fator de crescimento endotelial vascular

c-Kit - proteína quinase c-kit

xvi

INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos Gerais do Câncer

As primeiras evidências classificadas como lesões compatíveis com câncer em humanos, datam de 150.000 anos atrás, segundo os registros disponíveis sobre o câncer na antiguidade. Há evidências de sua existência em fósseis de animais e de humanos antigos e de seus precursores (1). Alguns milênios depois, já no século IV a.C., nos escritos hipocráticos encontra-se não apenas as primeiras descrições, mas também a origem etimológica da palavra câncer. Assim, no *Corpus Hippocraticum*, são mencionadas lesões ulcerativas crônicas, às vezes endurecidas, que se desenvolvem progressivamente e sem controle (2), expandindo-se pelos tecidos simulando as patas de um caranguejo, em consequência disto, estas lesões foram nomeadas pela palavra grega *καρκίος*

(karkinos) (3).

Somente no século XVIII, Rudolf Virchow, que havia demonstrado que cada célula vem de outra célula, sugeriu da mesma forma, que as células cancerosas teriam sido derivadas de outras células (4). Seguidamente, Johannes Müller, sugeriu a malignidade como uma consequência do crescimento desordenado e anormal das células. Em paralelo, muitos outros pesquisadores descreveram diferentes imagens microscópicas de diferentes tumores junto com seus tecidos de origem (5,6).

Atualmente, segundo o Instituto Nacional do Câncer (INC), câncer é o nome geral dado a um conjunto de mais de 100 doenças, que apresentam crescimento desordenado de células e possuem a tendência de invadir tecidos vizinhos e distantes (7).

1.1.1 Tipos de crescimento celular e classificação das neoplasias

Os tecidos do corpo crescem aumentando o número de células que os compõem, por conseguinte, as células de muitos tecidos do corpo proliferam e crescem rapidamente entre a concepção e a idade adulta (8). Assim sendo, a maioria das

1

células normais cresce, multiplica-se e morre de maneira ordenada respondendo a necessidades fisiológicas específicas (9). Porém, a proliferação celular não implica necessariamente em malignidade (7,10). Além disso, a proliferação celular pode ser ou não controlada. Por exemplo, no crescimento controlado, observa-se um aumento localizado e autolimitado do número de células de tecidos normais que constituem o organismo, em resposta a estímulos fisiológicos ou patológicos. Nele,

as células são normais ou com pequenas modificações bioquímicas e morfológicas, podendo ser iguais ou diferentes do tecido em que se instalam. Contudo, o efeito pode ser reversível após o fim dos estímulos que o provocaram, dependendo de sua capacidade de resposta e de adaptação. A hiperplasia, a metaplasia e a displasia são exemplos desse tipo de crescimento celular, ver Figura 1 (11–13).

Figura 1. Tipos de crescimento celular. [A] Tecido tireoidiano normal. [B] Tecido tireoidiano normal com células C hiperplásicas (setas) dispersas entre os folículos. A hiperplasia de células C (CCH) foi definida como aglomerados de células C atípicas intra-foliculares (mais de 50 por "campo de baixa potência" com ampliação de 100X) que levam à obliteração parcial ou completa do espaço folicular. [C] Carcinoma folicular da tireoide mostrando um local em que o câncer cresce através das fibras. [D] Câncer medular da tireoide (CTM). Células C malignas romperam a membrana basal e invadiram o interstício, o que levou à fibrose estromal (setas). As lesões do CTM são compostas por ninhos sólidos de células epiteliais com bordas celulares mal definidas. Coloração Hematoxilina e Eosina. Adaptado de ABC do câncer, INCA 2019; PathologyOutlines.com (14) e Groot et al., 2006.

(15)

Contrariamente, no crescimento não controlado de células, pode ser observada uma massa anormal de tecido, com desenvolvimento quase autônomo, e, portanto, com proliferação excessiva, inclusive após o fim dos estímulos que o provocaram. As neoplasias (Figura 1) obedecem a essa forma não controlada de crescimento celular. A palavra neoplasia, significa “novo crescimento” e, na clínica, é denominada tumor (9). Entre os tumores, encontra-se uma classificação adicional, baseada no julgamento do potencial comportamento clínico de um tumor, assim temos as neoplasias benignas e as malignas, Figura 2.

Figura 2. Neoplasias benignas e malignas. Observam-se as características morfologias das neoplasias benignas e das neoplasias malignas. [A] A ceratose seborreica é considerada uma lesão benigna da pele, na imagem observa-se que mantém seu crescimento de forma organizada, lento, expansivo e apresenta limites bem nítidos. [B] A ceratose actínica (ou queratose actínica) é considerada uma lesão pré-maligna da pele, pois pode evoluir para o carcinoma espinocelular de maior autonomia com zonas dificilmente delimitadas e são capazes de invadir tecidos vizinhos e provocar metástases. Adaptado de ABC do câncer, INCA 2019.

1.1.2 Formação do câncer

O câncer é uma doença complexa, heterogênea e altamente dinâmica, com múltiplos constituintes moleculares em evolução (16). Essa evolução implica na aquisição, por parte das células, de certas capacidades sistematizadas

3

originalmente por Hanahan e Weinberg em 2011 (Figura 3), e que incluem: a manutenção da sinalização proliferativa, a inadequada resposta a supressores de crescimento, a relativa resistência à morte celular, a indução de angiogênese, a ativação de invasão e a capacidade de realizar metástase (17). Além disso, outros autores descreveram outras características facilitadoras às capacidades descritas acima, como a inflamação, instabilidade genética, metabolismo energético e evasão do sistema imune (16).

Figura 3. Capacidades adquiridas, facilitadoras e emergentes que conduzem ao desenvolvimento do câncer. Adaptado de Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011)

Ao contrário do que se pensava há cerca de quatro décadas, apenas poucas células da massa tumoral são capazes de proliferar e formar novos tumores quando enxertadas em animais imunodeficientes, como demonstrado no câncer: de mama (18), de próstata (19) e leucemia (20). Pelo contrário, existem evidências que

suportam uma outra teoria: as alterações genéticas e epigenéticas típicas do

câncer, podem ocorrer também em populações de células-tronco (21). Segundo essas evidências, foi sugerido o modelo mostrado na Figura 4. Nesse caso, as células-tronco parcialmente alteradas e com alguma mutação produziriam um clone de células mutadas. Esse processo seria repetido com cada subpopulação de células alteradas. Eventualmente, atingindo as células tronco cancerosas presentes em um tumor maligno (22).

Figura 4. A célula origem seguida da evolução de uma célula-tronco cancerosa. A hierarquia celular normal compreende algumas células-tronco que progressivamente geram células progenitoras comuns e mais restritas, produzindo todos os tipos de células maduras que constituem um tecido particular. Embora, a célula de origem para um tumor particular possa ser uma célula precursora precoce, como um progenitor comum, o acúmulo de mutações epigenéticas adicionais por uma célula dentro da população aberrante (neste caso, expandida) durante a progressão neoplásica pode resultar no surgimento de uma célula-tronco cancerosa (CSC). Nesse modelo,

apenas as CSCs (e não outras células tumorais) são capazes de sustentar a tumorigênese. Assim, a célula de origem, na qual a tumorigênese é iniciada, pode ser distinta da CSC, que propaga o tumor. Adaptado de Visvader, et al. (22).

Estímulo Estímulo

5

No entanto, os tumores também são consequência das contribuições do microambiente tumoral (TME) (vide legenda da Figura 5 para exemplos destas contribuições) (23). Os tumores são tecidos complexos que exibem interações

heterotípicas entre muitos tipos diferentes de células: células-tronco tumorais, células endoteliais, pericitos, células do sistema imune, fibroblastos e células-tronco e progenitoras estromais. Os múltiplos tipos de células estromais criam uma sucessão de microambientes tumorais que favorecem que o tumor invada, e forme colônias em outros tecidos normais distantes (17). Do mesmo modo, o quadro de células estromais, imunológicas e malignas cria um TME que impõe muitos desafios para as células cancerosas como: pressão física, estresse oxidativo, privação e competição de nutrientes, hipóxia e vigilância imunológica (23).

Figura 5. Microambiente tumoral (TME). Variáveis intrínsecas e extrínsecas influenciam as propriedades metabólicas de um tumor. Variáveis intrínsecas celulares incluem os programas genéticos (presentes no DNA), epigenéticos e metabólicos ativos em cada tipo de célula. As variáveis extrínsecas incluem interações entre as populações celulares heterogêneas,

disponibilidade de nutrientes, gradientes de resíduos e pH, tensão de oxigênio (O₂), deposição de matriz extracelular (ECM) e pressões físicas e oxidativas. Os gradientes são indicados pelas regiões

6

coloridas sombreadas. (CAFs) = fibroblastos associados ao câncer; (TAMs)=macrófagos associados a tumor. Adaptado de Lyssiotis, et al. (23).

É importante mencionar que a contribuição dos fatores genéticos e dos epigenéticos é importante no desenvolvimento do câncer humano. Contudo, a contribuição relativa parece depender do tipo de tumor. Por exemplo, na Figura 6, são mostrados três tumores distintos do sistema nervoso central ilustrando esse ponto (24).

Figura 6. Mecanismos genéticos e epigenéticos. Os mecanismos genéticos e epigenéticos são fatores importantes no desenvolvimento do câncer humano, mas sua contribuição relativa depende

do tipo de tumor. A seguir, são ilustrados três tumores distintos do sistema nervoso central; as mudanças no genoma, foram desenhadas em regiões em vermelho (genética) ou azul (epigenética). A maioria das regiões pode ser atribuída a fatores genéticos no glioblastoma (A), um tumor cerebral que afeta principalmente adultos. Enquanto os fatores epigenéticos predominam em tumores pediátricos, como o ependimoma (C), que exibe hipermetilação do DNA, mas carece de mutações recorrentes (MACK et al., 2014; BAYLISS et al., 2016). Os astrocitomas anaplásicos (B) podem apresentar exemplos de lesões genéticas e epigenéticas, levando a diferentes regiões. Adaptado de Flavahan *et al.* (24)

A B C

1.2 Epidemiologia

Atualmente, podemos indicar que o câncer é um dos problemas de saúde pública mais complexos do mundo, segundo estimativas da Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC), que publicou estimativas periódicas de incidência e mortalidade por câncer durante três décadas (Tabela 1) (25). De acordo com

essas estimativas, em 2018, 18,1 milhões de novos casos foram diagnosticados em todo o mundo (excluindo estatísticas de tumores de pele, não melanoma), dos quais 8 milhões ocorreram em países economicamente menos desenvolvidos.

Por outro lado, em relação às taxas de mortalidade no mesmo ano (Figura 7), foram estimados 9,6 milhões de óbitos, dos quais 5,3 milhões ocorreram em países subdesenvolvidos. Infelizmente, os casos anuais de câncer devem aumentar de 14 (disse acima que são 18 milhões) para 22 milhões nas próximas duas décadas, devido, simplesmente, ao aumento e envelhecimento da população (26,27).

Existem diferenças na incidência dos diferentes tipos de câncer nos países economicamente desenvolvidos, os três tipos de câncer mais diagnosticados são, nos homens: de próstata, de pulmão e colorretal; e nas mulheres: de mama, colorretal e de pulmão. Já nos países em desenvolvimento, os três cânceres mais diagnosticados são: de pulmão, de fígado e de estômago nos homens; e de mama, de útero e de pulmão, nas mulheres (28). Especificamente no Brasil, o câncer está entre as doenças não transmissíveis que mais impactam na mudança do perfil de adoecimento da população brasileira.

Quadro 1. Taxas de incidência e de mortalidade no mundo para homens e mulheres. Número de casos ou mortes estimadas por 100.000 pessoas por ano. Projeto GLOBOCAN 2012. **Figura 7. Taxas estimadas de mortalidade no mundo padronizada por idade em 2018.** As estimativas incluem todos os cânceres (exceto a câncer de pele não melanoma), ambos sexos e todas as idades. Adaptado de GLOBOCAN 2018, IARC (<http://gco.iarc.fr/today>)

Incidência em Homens

Incidência

Mortalidade Região

em em mulheres
mulheres

Centro América 4,5 3,4 2,5 1,9

Norte América 6,1 4,6 4,1 2,6

Sudamérica 5,4 4,3 4,0 3,2

África 2,1 1,6 1,6 1,2

Ásia 3,3 2,7 2,6 1,8

Europa 6,3 4,6 4,6 3,0

Oceania 5,3 3,4 4,0 2,6

Mundo 3,9 3,0 3,0 2,1

9

Mortalidade em homens

No entanto, além da alta incidência desses tipos de câncer no mundo e em nosso país em particular, existem também outros tipos de tumores que embora apresentem baixa incidência (< 6 para cada 100 mil habitantes) quando comparados com outros tipos de câncer, possuem uma alta taxa de mortalidade (>

80%), trata-se dos tumores do Sistema Nervoso Central.

1.3 Aspectos gerais de tumores do SNC

1.3.1 Classificação dos tumores do SNC

Desde a sua criação, a Organização Mundial da Saúde (OMS) tem editado quatro textos conhecidos como o “*livro azul*” para classificar os tumores do SNC. Em 2007, fundamentada em dados histológicos e epidemiológicos, classificou os tumores do SNC nos seguintes parâmetros: tipo celular, grau de malignidade e localização tumoral (29). Posteriormente, em 2016 (ver Tabela 1), revisou-se a anterior classificação com o objetivo de incorporar biomarcadores moleculares como: a isocitrato desidrogenase 1 e 2 (IDH 1/2), a metilação do promotor metilguanina-metiltransferase (MGMT), a co-deleção dos braços dos cromossomas 1p y 19q, dos loci 1p/19q H3F3A ou HIST1H3B/C K27M (H3-K27M), bem como as mutações e as fusões C11orf95 – RELA (também conhecida como p65) (30). Em resumo, e de maneira geral, na recente classificação foram inclusas algumas entidades tumorais, variantes e padrões reconhecidos recentemente e, do mesmo modo, suprimidos alguns tumores antigamente descritos e que não possuíam mais diagnóstico e/ou importância biológica. Assim, desenvolveu-se uma metodologia que nomeia estes tumores com maior precisão e estruturou-se um novo modo de diagnosticá-los.

Tabela 1. Classificação geral adaptada da OMS dos tumores primários do SNC (2016).**Adaptado de Louis et al., 2016 (31)****Tumores difusos astrocíticos e****oligodendrogliais Tumores da região pineal Linfomas**

Astrocitoma difuso Astrocitoma anaplásico Glioblastoma Oligodendroglioma Oligodendroglioma anaplásico Oligoastrocitoma Oligoastrocitoma anaplásico

Pineocitoma Tumor parenquimatoso de pineal de diferenciação intermediária Pineoblastoma Tumor papilífero da região da pineal

Linfoma difuso de células B do SNC Linfoma de células T e NK Linfoma Anaplásico Linfoma MALT da dura- máter

Outros tumores astrocíticos Tumores embrionários Tumores de células germinativas

Astrocitoma Pilocítico Astrocitoma subependimário de células gigantes

Meduloblastoma Tumor Embrionário Mediloepitelioma Neuroblastoma do SNC Ganglioneuroblastoma do SNC Tumor teratóide rabdóide atípico

Germinoma Carcinoma embrionário Coriocarcinoma Teratoma

Tumores ependimários Tumores dos nervos cranianos**e paraespinhais Tumores da região selar**

Subependimoma Ependimoma Ependimoma anaplásico

Schwannoma Schwannoma melanocítico Neurofibroma Tumor maligno da bainha do nervo periférico (MPNST)

Craniofaringioma Tumores de células granulares da região selar Oncocitoma de células em fuso

Outros gliomas Meningiomas**Outras classificações** Tumores neuronais e neuronais-gliais mistos (tumores neuronais e Gliais Mistos) Tumores melanocíticos Tumores histiocíticos Tumores mesenquimais**Tumores do plexo coroide**Papiloma de plexo coroide **Tumores metastáticos** Papiloma atípico do plexo coroide Carcinoma de plexo coroidePor outro lado, a malignidade tumoral é estabelecida em uma escala de **I a IV**.

Assim, baseados em aspectos histológicos, os gliomas de baixo grau I e II são de

crescimento lento (aproximadamente, 4 mm/ano) (32), diferenciados e passíveis de ressecção cirúrgica, sendo tumores de grau I encontrados tipicamente em crianças. Entre os gliomas de baixo grau os 5 principais subtipos são: astrocitoma difuso (acomete principalmente indivíduos adultos da faixa de 30 a 40 anos), astrocitoma pilocítico (ocorre quase exclusivamente em indivíduos com idade inferior a 25 anos), oligodendroglioma (o segundo tipo mais comum de glioma de baixo grau), gangliogliomas (misto de astrocitoma pilocítico e células neuronais; acomete indivíduos na faixa dos 20 anos), gliomas mistos (normalmente apresentam características de astrocitoma difuso e oligodendroglioma (29,33–35).

No mesmo sentido, os gliomas de alto grau **III** e **IV**, são tipicamente não-diferenciados ou anaplásicos, também exibem alta agressividade, com alta capacidade de metástase e crescimento a uma taxa mais rápida (aproximadamente, 3 mm/mês) (32) e com menor resposta aos medicamentos quimioterápicos; alta proliferação; raramente são candidatos para procedimentos de ressecção cirúrgica; resistentes à terapia; e finalmente, com prognóstico desfavorável nos pacientes e apresentam alta taxa de recorrência. Os dois subtipos mais comuns e agressivos são o astrocitoma anaplásico (grau III, com alto índice proliferativo e histologicamente definido pela atipia nuclear e atividade mitótica pronunciada) e o glioblastoma multiforme (grau IV, representa mais de 70% dos gliomas de alto grau diagnosticados e o tipo mais agressivo de tumor primário cerebral) (31,34–36).

A última classificação a ser descrita, é feita com base na localização tumoral, referente ao local onde os tumores se desenvolvem. Ela é baseada na estrutura

membranosa que separa o cérebro do cerebelo, o tentorium cerebelar (ou “teto” cerebelar). Assim, os gliomas podem ser definidos como supratentoriais, que se desenvolvem acima do tentorium (no cérebro) e infratentoriais, que se desenvolvem abaixo do tentorium (no cerebelo) (31,34–36).

1.3.2 Incidência dos tumores do SNC

12

Em termos de incidência, atualmente, a taxa global de incidência de tumores primários do SNC é de 23,03 casos por 100.000 habitantes por ano (ver Figura 8) (28). Quando se compara a taxa atual com aquelas de anos anteriores (1990 - 2018), podemos observar um incremento gradual, parecendo ser cada vez mais frequentes, podendo ser não tanto pelo aumento real de sua incidência, mas sim pelo aumento da expectativa de vida da população em geral e pelos avanços tecnológicos que permitem um diagnóstico mais precoce.

Igualmente, metanálises das características demográficas e clínicas básicas destes tumores descreveram sua complexa epidemiologia. Especificamente, nos países desenvolvidos, apenas 14% dos pacientes diagnosticados com tumores do SNC têm uma sobrevivência de mais de 10 anos e apenas o 1% deles são preveníveis (35,37). Algumas variedades de tumores são particularmente comuns em certas faixas etárias, por exemplo, o astrocitoma pilocítico é mais comum em crianças, enquanto o GBM é mais comum em adultos. Especificamente, para o Brasil, estimam-se para cada ano do biênio 2018/2019, 5.810 casos novos de câncer do

SNC em homens e 5.510 em mulheres. Esses valores representam um risco de 5,62 casos novos a cada 100 mil homens e 5,17 para cada 100 mil mulheres, correspondendo à décima e à nona posição de incidência do câncer (ver Figura 9), segundo cifras do Instituto Nacional de Câncer (38).

Figura 8. Taxas estimadas de incidência de Câncer do cérebro e sistema nervoso central no mundo padronizadas (por cada 100 mil habitantes em 2018. A estimativa inclui ambos sexos e todas as idades. Adaptado de GLOBOCAN 2018 IARC (<http://gco.iarc.fr/today>)

Figura 9. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer de maior incidência no Brasil.

Estimados para 2018 por sexo, sem considerar os tumores de pele não melanoma. Números arredondados para múltiplos de 10. Adaptado de Estimativas, Incidência de Câncer no Brasil, INCA (38).

Deve notar-se que, segundo informações fornecidas pelo do INCA e a Organização Mundial da Saúde (OMS), no mundo cerca de 88% dos tumores de SNC são intracraniais (28,31,38). Assim sendo, existem os tumores do parênquima cerebral originários das células da glia, os gliomas. Como descrito previamente, os gliomas são caracterizados pelas baixas taxas de incidência (> 6.000/100.000 habitantes) e altas taxas de mortalidade, ambas com tendência a aumentar nos próximos anos. Deste modo, esperam-se 5,1 casos/100.000 habitantes com mortalidade de 3,3 casos/100.000 habitantes; do mesmo modo, nos países menos desenvolvidos estima-se uma incidência de 3,0 casos/100.000 habitantes, junto com uma taxa de mortalidade de 2,2 casos/100.000 habitantes (39,40).

Adicionalmente, enquanto a incidência do Neuroblastoma (NB) no mundo (frase

truncada), as estatísticas o descrevem como o tumor sólido mais comum na infância após os tumores do SNC. Assim sendo, representa 8% do total dos tumores pediátricos, podendo aumentar para o 40% durante o primeiro ano de vida

14

(25,41). Especificamente, a prevalência no Brasil é de 1 caso por 700.000 nascimentos e é diagnosticado com mais frequência em crianças pequenas (38).

1.3.3 Glioblastoma

O glioma mais frequente nos EUA, Europa e Brasil é o Glioblastoma multiforme (GBM) (7,38,41). Um glioma de baixo grau (**graus I, II ou III**) pode progredir para um GBM (ou GBM secundário), e por outro lado, também os GBM podem surgir de novo (ou GBM primário). O termo "multiforme" pretende refletir a heterogeneidade intratumoral, de grau genômico e transcricional, dos glioblastomas. Essa complexidade, somada à presença de subpopulações de células-tronco tumorais (Figura 10), torna esse tumor um dos mais difíceis de serem compreendidos e tratados (36,42,43).

Figura 10. Representação esquemática do processo de diferenciação de células-tronco neurais em diferentes linhagens celulares do SNC e células putativas na origem dos gliomas.

O processo normal de diferenciação (setas verdes) origina três tipos principais de células no SNC maduro, incluindo neurônios e células da glia (particularmente oligodendrócitos e astrócitos; as células ependimárias não estão representadas). A hipótese mais clássica sobre a origem das células do glioma é representada por setas laranja (as células gliais diferenciadas são transformadas malignamente através de um processo de desdiferenciação). A hipótese mais recente que postula que os gliomas se originam da transformação direta de células-tronco neurais ou células

15

progenitoras da glia é representada por setas cinza. Os Marcadores das proteínas para as células-tronco neurais, as células progenitoras e as células diferenciadas são indicados em caixas.

Adaptado de Lourenço et al., 2013 (44).

Uma característica das células GBM é a sua grande resistência ou reduzida sensibilidade a estímulos que desencadeiam a morte celular, tais como radioterapia ou quimioterapia. Essa propriedade biológica está relacionada às alterações genéticas nas vias EGFR e PI3K-PTEN-AKT, bem como às alterações nas

moléculas efetoras intrínsecas (dependentes das mitocôndrias) e extrínsecas (mediadas pelos receptores de morte) de apoptose. Contraditoriamente, apesar da resistência a estímulos apoptóticos, as células de GBM têm uma alta propensão à necrose celular. A necrose é a forma mais proeminente de morte celular espontânea no GBM e se apresenta como pequenos focos de micro necrose cercados por infiltração do próprio tumor se projetando no parênquima (45,46). A infiltração tumoral em todo o cérebro é outra das características importantes dos gliomas, constituindo a principal causa da impossibilidade de uma intervenção cirúrgica eficaz (47,48). A invasão de células de glioma nas regiões do cérebro normal é produzida pelo grande movimento celular ativo das células malignas e pela interação destas com a matriz extracelular (MEC) e degradação proteolítica da MEC (49). Outra característica do GBM está relacionada à sua capacidade de invadir tecidos sadios e a sua grande capacidade angiogênica e vascularizante, principalmente através do VEGF (50).

O diagnóstico de astrocitomas malignos é estabelecido por meio de ressonância magnética (Figura 11). A lesão apresenta contraste irregular, frequentemente em forma de anel e geralmente se apresenta cercada por edema. O tumor envolve a substância branca, pode se espalhar pelo corpo caloso (como descrito, esses tumores são altamente infiltrantes) e envolver também o outro hemisfério. Os sinais e os sintomas mais comuns entre os pacientes são dores de cabeça, convulsões e perda neurológica progressiva, dependendo da área atingida (51).

Figura 11. Glioblastoma multiforme. (em borboleta). Ressonância magnética do tumor. O GBM envolve ambos os hemisférios cerebrais através do cruzamento do corpo caloso - localização bifrontal. (a) imagem sagital, T1 com contraste; (b) imagem axial T1 com contraste; (c) imagem coronal T1 com contraste; (d) imagem axial T2; (e) sequência de recuperação de inversão atenuada por fluido sagital (FLAIR); (f) imagem ponderada por difusão axial (DWI). Adaptado de Tataranu et al., (2018) (33)

O tratamento padrão do glioblastoma continua a ser a ressecção cirúrgica da massa tumoral seguida de rádio e de quimioterapia (geralmente, com Temozolomida (TMZ) no pós-operatório. Essa estratégia prolonga a sobrevivência média em até

14,6 meses. Os pacientes sem tratamento têm uma sobrevida média de 3 meses e os pacientes que recebem radioterapia têm uma sobrevida média de 12,1 meses (52). Por outro lado, existem atualmente vários ensaios clínicos concluídos ou em andamento, cujo objetivo é estudar fármacos inibitórios das vias de sinalização alteradas com maior frequência nesses tumores (Quadro 2) ou avaliar a viabilidade da aplicação de imunoterapia, de terapia gênica, de terapia baseada em células tronco e de nanotecnologia (53).

Quadro 2. Ensaios clínicos de fármacos direcionados contra alvos moleculares comumente alterados em gliomas. RT, radioterapia. Adaptado de Wang, H., et al., (2015).

17

Alvo molecular Fármaco/s Terapia Fase Ref.

VEGF Bevacizumab Bevacizumab +
irinotecan

II (Demirci, U., et
al., 2013)

Bevacizumab Bevacizumab +
TMZ + RT

II (Lai, A., et al.,
2011)

VEGF Afibercept Monoterapia II (de Groot, J.F.,
et al., 2011) **VEGFR, PDGFR, FGFR, c-KIT**

Cediranib Monoterapia II (Batchelor, T.T., et al., 2010)

VEGFR, c -KIT, PDGFR

I/II (Brandes, A.A.,
et al., 2010)

VEGFR, PDGFR, c-KIT

Vatalanib Vatalanib +
TMZ + RT

Pazopanib Monoterapia II (Iwamoto, F.M.,
et al., 2010)

Integrina $\alpha v\beta 3/\alpha v\beta 5$

Cilengitide Cilengitide + TMZ

I/IIa (Stupp, R., et + RT
al., 2010)

Cilengitide Cilengitide +
TMZ + RT

II (Nabors, L.B.,
2012)

Integrina $\alpha v\beta 3/\alpha v\beta 5$

Thalidomide Thalidomide +

II (Ruiz, J., et al., procarbazine
2012)

Thalidomide Thalidomide +
irinotecan
II (**Giglio, P., et al., 2012**)
EGFR Cetuximab Monoterapia II (**Lv, S., et al., 2012**) **EGFR** Gefitinib Monoterapia II (**Uhm, J.H., et al., 2011**) Gefitinib + RT II (**Chakravarti, A., et al., 2013**) **EGFR** Erlotinib Erlotinib + TMZ + RT
II (**Peereboom, D.M., et al., 2010**) Monoterapia I/II (**Kesavabhotla, K., et al., 2012**) **EGFR, HER2** Lapatinib Monoterapia I/II (**Thiessen, B., et al., 2010**) **PDGFR, c-KIT, BCR-ABL**
II (**Reardon, D.A., et al., 2009**)
PDGF R, SRC, c-KIT, BCR-ABL
Imatinib Imatinib + hydroxyurea
Dasatinib Dasatinib + I/II (**Franceschi, E., et al., 2012**)
mTOR Temsirolimus Monoterapia II (**Galanis, E., et al., 2005**) Temsirolimus Temsirolimus + TMZ + RT
I (**Sarkaria, J. N., et al., 2010**)
mTOR Everolimus Everolimus + TMZ + RT
I (**Sarkaria, J.N., et al., 2011**)
RAS Lonafarnib Lonafarnib + TMZ
I (**Desjardins, A., et al., 2011**)
RAS Tipifarnib Monoterapia II (**Lustig, R., et al., 2008**) **Proteasoma** Bortezomib Monoterapia I (**Phuphanich, S., et al., 2010**) **Bortezomib Bortezomib + TMZ + RT**
I (**Kubicek, G.J., et al., 2009**)

Como descrito previamente, o GBM é um tumor muito heterogêneo que apresenta alta resistência a radioterapia e quimioterapia. Assim sendo, essa resistência

18

somada à radiação limitada que pode ser administrada pela baixa tolerância por parte do cérebro normal; a presença da barreira hematoencefálica, que impede a passagem de alguns fármacos potencialmente eficazes; a interconexão entre as vias de sinalização alteradas e os poucos resultados clínicos satisfatórios obtidos pelo uso de um único agente alvo (monoterapia), tornam a busca e aplicação de novas estratégias terapêuticas um objetivo imperativo.

1.3.4 Neuroblastoma

O neuroblastoma (NB) é um tipo de câncer que se origina nas formas iniciais das células nervosas (geralmente encontradas no embrião ou no feto) do sistema nervoso simpático, que, por sua vez, é parte do sistema nervoso autônomo (SNA). Sendo importante lembrar que o SNA controla funções como a respiração, a pressão arterial, o batimento cardíaco e a digestão. Em outras palavras, o NB é um tumor neuroectodérmico de células embrionárias derivadas da crista neural (54,55). Assim sendo, durante o desenvolvimento embrionário, a crista neural dá origem, entre outras coisas, às células nervosas do sistema nervoso simpático formado pela medula suprarrenal, pelas cadeias laterais simpáticas e pelos gânglios simpáticos, que são encontradas ao longo da zona ventral da medula espinhal (Figura 12) (CHEUNG; DYER, 2013). Portanto, o tumor primário se desenvolve geralmente nas glândulas adrenais, que ficam em cima dos rins, no abdome ou nas células nervosas próximas da coluna espinhal, os chamados gânglios dorsais. Outros locais comuns para o desenvolvimento do NB são o tórax, o pescoço ou a espinha (DUMBA; JAWAD; MCHUGH, 2015). Em suma, a variedade de localizações onde estes tumores podem surgir e o espectro de sua diferenciação resultam em uma grande diversidade de manifestações e comportamento biológico. Outrossim, estes tumores podem apresentar regressão espontânea, diferenciação em tumores benignos ou exibir comportamento extremamente maligno.

Figura 12. Desenvolvimento da linhagem simpatoadrenal da crista neural. À medida que as células da crista neural (representadas por células verdes e vermelhas) migram, elas passam por transição epitelial-mesenquimal (EMT). Algumas células (vermelhas) migram em direção à aorta dorsal ao se comprometerem com a linhagem simpatoadrenal. Essa migração é parcialmente direcionada pela expressão do receptor de quimocina CXCR4 (CXCR4) nas células progenitoras da crista neural migratória (vermelho) e a expressão do quimioatrativo fator 1 derivado de células

estromais (SDF1) na aorta dorsal. Na aorta dorsal, as células progenitoras da crista neural migratória comprometidas com a linhagem simpatoadrenal iniciam seu programa de diferenciação em resposta à sinalização da proteína óssea morfogênica (BMP). Alguns dos principais fatores de transcrição envolvidos na diferenciação inicial na aorta dorsal são mostrados na caixa cinza superior. A partir desse ponto, as células se comprometem a se tornar células cromafins (células neuroendócrinas) suprarrenais ou gânglios simpáticos. As enzimas envolvidas na biossíntese de catecolaminas, como a tirosina hidroxilase (TH) e a β -hidroxilase da dopamina (DBH), são supra-reguladas nesta fase de diferenciação da linhagem simpatoadrenal. Acredita-se que o MYCN é expresso ao longo deste processo nas células da crista neural do tronco migratório que posteriormente se comprometem com a linhagem simpatoadrenal. Uma análise detalhada da sinalização da tirosina quinase do receptor do linfoma anaplásico (ALK) na crista neural do tronco de mamíferos em relação a toda a linhagem simpato-adrenal ainda não foi realizada. Adaptado de Cheung et, al. (56).

20

É interessante destacar que a maioria dos NB ocorre esporadicamente e apenas 1-2% ocorrem como uma associação familiar (57). Os mecanismos moleculares que levam ao desenvolvimento do NB ainda não estão totalmente esclarecidos. Nas últimas três décadas, desde a publicação em 1984 de Look et al., (58) estudando o conteúdo de DNA em 35 crianças com NB e sua relação com sua resposta a quimioterapia, grandes esforços foram dedicados para determinar a implicação de eventos genéticos e epigenéticos na tumorigênese e na progressão do NB.

Atualmente, as alterações genéticas mais bem caracterizadas no NB são:

- As alterações no conteúdo de DNA ou no número de cromossomos (aneuploidia)
- A amplificação do oncogene MYCN
- As deleções ou ganhos de regiões cromossômicas recorrentes

- As translocações (rearranjo de partes entre cromossomos não-homólogos) desequilibradas (57,59).

Por outro lado, as mutações somáticas no NB são raras, contudo estudos recentes, utilizando técnicas de sequenciamento avançadas identificaram algumas mutações somáticas recorrentes em genes como: ARID1A e ARID1B (11%), ALK (7-9,2%), TIAM1 (3-10%), PTPN11 (2,9%), ATRX (2,5%), MYCN (1,7%) e NRAS (0,83%) (60). Pelo contrário em NB familiar, identificaram no 90% dos casos, mutações dos genes de ALK ou de PHOX2B (61,62). O gene ALK codifica para um receptor de tirosina quinase, e desempenha um papel fundamental, na diferenciação neuronal, proliferação e sobrevivência celular. As mutações da ALK em NB esporádicos são menos frequentes, mas podem ser identificadas tanto no diagnóstico (8-10%) como nas recaídas (17%). Atualmente existem ensaios clínicos em fases iniciais com fármacos inibidoras de ALK (63,64).

Exemplos de genes cuja expressão é controlada por eventos epigenéticos incluem CASP8 e RASSF1A, ambos frequentemente hipermetilados em tumores primários de NB e seu nível de metilação está significativamente associado à sobrevida do

paciente (65). Até o momento, cerca de cem genes foram encontrados, cujo padrão de metilação está alterado no NB. Esses genes estão fundamentalmente envolvidos no controle do ciclo celular, na invasão e na arquitetura celular (66). As novas tecnologias abriram a possibilidade de investigar modificações epigenéticas em todo o genoma e integrar essas informações com outras informações, tais como perfis de expressão do mRNA e miRNA, proteômica e dados clínicos. O número de

biomarcadores clinicamente relevantes em epigenética NB é ainda muito baixa, portanto, a necessidade de mais estudos sobre o assunto para elucidar os diferentes perfis epigenômicos associados com diferentes fenótipos apresentando NB (67).

No que diz respeito aos aspectos clínicos do NB, por mais de um século, os pesquisadores notaram que os neuroblastomas exibem comportamentos clínicos diversos e frequentemente sérios (Figura 13). Os sintomas, em geral tardios, são usualmente inespecíficos e idênticas a outras doenças da infância (dor, febre e perda de peso), o que faz o diagnóstico precoce difícil para os pediatras. Inclusive, alguns NB são assintomáticos e são detectados acidentalmente (68,69). No entanto, existem algumas características que, embora raras, são altamente indicativas de NB. Entre elas estão:

- Diarreia refratária grave do tratamento padrão, devido à produção do Peptídeo Intestinal Vasoativo, pelas células tumorais
- Paraplegia dos membros devido à extensão epidural intra-espinal do tumor paraespinal primário
- Encefalopatia cerebelar aguda caracterizada por ataxia cerebelar, movimentos oculares caóticos e aleatórios (opsoclonus) e espasmos mioclicos
- Hipertensão, rubor e sudorese excessiva, às vezes causada por um aumento na concentração de catecolaminas
- Síndrome de Claudius Bernard Horner, frequentemente presente em pacientes com lesões no gânglio simpático cervical ou torácico superior

Figura 13. Apresentações Clínicas do Neuroblastoma. Os tumores podem surgir em qualquer lugar do SNS, com a maioria ocorrendo na medula adrenal. Os tumores primários no pescoço ou na parte superior do tórax podem causar a síndrome de Horner (ptose, miose e anidrose) (a). Os tumores ao longo da coluna vertebral podem se expandir através dos espaços intraforaminais e causar compressão da medula (b), com paralisia resultante. Embora muitos neuroblastomas de estágio inferior estejam encapsulados e possam ser extirpados cirurgicamente com poucas chances de complicações, os tumores de estágio superior geralmente se infiltram nas estruturas dos órgãos locais, envolvem nervos e vasos críticos, como o eixo celíaco (c), e são amplamente ressecáveis no momento da cirurgia. Os neuroblastomas tipicamente metastizam (50% dos casos) para os linfonodos regionais e para a medula óssea por meio do sistema hematopoiético. As células tumorais metastáticas para medula óssea podem se infiltrar no osso cortical (d). Os neuroblastomas também podem originar metástases no fígado (e), principalmente em pacientes com tumores em estágio 4S, nos quais o envolvimento pode ser extenso; no entanto, a regressão transitória e

completa geralmente poderia ocorrer sem outra intervenção além do tratamento de suporte.

Adaptado de Maris et al. 2010 (59).

O diagnóstico de NB baseia-se na existência de características histopatológicas típicas do tecido tumoral ou na presença de células tumorais em aspirados e biópsias de medula óssea, acompanhadas de altas concentrações de catecolaminas urinárias (69,71). Frequentemente, os pacientes apresentam altas concentrações de lactato desidrogenase (LDH) sérica, ferritina ou cromogranina A (CgA), mas esses metabólitos não são específicos (72). O ultrassom é sensível

(e)

(d)

(b)

(a)

para o estudo de tumores abdominais, incluindo a detecção de metástases linfáticas e hepáticas. Para estimar mais precisamente o volume do tumor, deve-se realizar uma Tomografia computadorizada (TC) ou ressonância magnética (RM), esta última é mais efetiva para avaliar a invasão do canal medular e irradiar menos o paciente (73). Alternativamente, a gamagrafia com o radioisótopo MIBG (MIBG, yodo-131-metayodobenzilguanidina o yodo-123-metayodobenzilguanidina) é uma técnica comumente utilizada no estudo de pacientes com NB. O MIBG é um análogo estrutural da guanidina que segue as mesmas vias metabólicas que as catecolaminas e é especificamente capturado pelo tumor e suas metástases (74,75). Nos casos em que não há captação do radioisótopo MIBG no tumor primitivo, uma cintilografia com Tc-99 deve ser realizada para descartar a presença de metástases ósseas (76). (77)

Semelhante a maior parte dos tumores, a classificação da doença vem passando por reclassificações ao longo dos anos. Por conseguinte, no ano 2009 estabeleceu-se o sistema de estadiamento INRGSS (International Neuroblastoma Risk Group Staging System), no qual a gravidade da doença é determinada pela presença ou ausência de fatores de risco avaliados por exames de imagem e de doença metastática (78,79). Como observado no quadro 3, as doenças locorregionais restritas foram classificadas como L1 (localizado 1) ou L2 (localizado 2), dependendo da presença ou ausência de fatores de risco definidos pela imagem. Os tumores metastáticos são definidos como estágios M (metastáticos), exceto aqueles definidos como EM (especial metastática), nos quais as metástases estão confinadas à pele, fígado e / ou medula óssea, em indivíduos menores de 18 meses. Similarmente, o atual sistema de estratificação de pacientes em grupos de

risco leva em consideração fatores de relevância clínica comprovada. Usando este sistema, 5 grupos de risco são definidos com diferentes taxas de sobrevida em 5 anos: pacientes de muito baixo risco (sobrevida acima de 85%), pacientes de baixo risco (sobrevida entre 75-85%), pacientes de risco intermediário (taxas de sobrevida entre 50 e 75%) e pacientes - sujeitos de alto risco (taxas de sobrevivência abaixo de 50%) (80,81).

24

Quadro 3. Classificação de neuroblastomas em grupos de risco pré-tratamento. Adaptado de Cohn et al., 2009 (80).

Estádio

Idade

Categoria INRG

(meses)

Histológica

Ploidia Grupos de resgo pré- tratamento

L1/L2 GN em maturação;

GNB misturado

GN: Ganglioneuroma; GNB: Ganglioneuroblastoma.

O tratamento do NB pode incluir: cirurgia, quimioterapia, progenitor hematopoiético autólogo, radioterapia e imunoterapia. O uso de cada um deles e sua maior ou menor intensidade depende do grupo de risco ao qual o paciente é designado. Pacientes com tumores localizados e sem amplificação de MYCN podem ser tratados apenas com cirurgia, com quimioterapia e cirurgia de intensidade moderada ou com quimioterapia, cirurgia, radioterapia local e ácido 13-cis-retinóico. Pacientes com doença metastática, com menos de um ano de idade e sem amplificação de MYCN, são tratados com quimioterapia e cirurgia padrão. Os tumores com classificação MS com estas características e com um perfil genético normal não são operados. Em alguns casos, os NB são apenas observados, pois neste grupo foram descritas altas taxas de regressão espontânea (55,82).

Diferenciação do tumor MYCN Deleção de 11 q

A-Muito baixo

L1

Qualquer exceto GN em maturação; GNB misturado

Não Amplificado B-Muito baixo

Amplificado K-Alto

L2

cualquiera exceto

Não D-Baixo

sim G-Intermedio

≥ 18 GNB nodular; neuroblastoma

Não < 18

Amplificado

Não E-Baixo Em Não sim diferenciação Amplificado

Pobremente Não diferenciado indiferenciado

o Amplificado H-Intermedio

Amplificado N-Alto

M

Não < 18

Amplificado Hiperdiploide F-Baixo

< 12

Não Amplificado Diploide I-Intermedio

12 a < 18

Não Amplificado Diploide J-Intermedio < 18 Amplificado O-Alto ≥ 18 P-Alto

MS < 18

Não Amplificado não C-Muito baixo

sim Q-Alto Amplificado R-Alto

25

Outrora, pacientes com tumores localizados ou metastáticos que apresentam amplificação de *MYCN*, ou aqueles com doença metastática com mais de um ano de idade, independentemente do status do oncogene *MYCN*, são considerados de alto risco. O tratamento de NB de alto risco inclui: quimioterapia de indução, cirurgia, progenitor hematopoiético autólogo, radioterapia e terapia de manutenção baseada em imunoterapia com ou sem citocinas e ácido 13-cis retinóico. Apesar da intensidade do tratamento recebido por esses pacientes, as taxas de sobrevida são inferiores a 50% (59,62).

1.4 Terapia Fotodinâmica

1.4.1 Histórico da Terapia Fotodinâmica (TFD)

Há milênios, a luz vem sendo usada no tratamento de enfermidades, principalmente associada à utilização de extratos vegetais. Existem publicações entre 4.000 até 1.200 A.c. que descrevem como Herbalistas egípcios (*Ebers papyrus*), citado por IBN EI, 1947 (83), indianos (*Atharva Veda*) citado por Blonfield, 1897 (84) e chineses (*manuscritos do período Sung*), citado por Fitzpatrick, 1959 (85) usavam

extratos de folhas, sementes ou raízes de certas plantas umbelíferas. Usavam por exemplo, *Ammi majus* L. (*Aatrillal*) no Egito e *Psoralea corylifolia* (*Bavachee* or *Vasuchika*) L. na Índia, para o tratamento de doenças cutâneas. As preparações feitas dessas plantas eram então aplicadas topicamente ou ingeridas como infusões e os pacientes eram expostos à luz solar para o tratamento de vitiligo e psoríase respectivamente (86,87). Os compostos ativos daquelas plantas, os psoralenos são importantes compostos fotossensibilizadores (com atividade fotoquímica). Os psoralenos podem ser encontrados em mais de trinta plantas, nas que se incluem: limão, bergamota, salsa, aipo, figo e cravo, figura 14 (88).

Figura 14. Plantas usadas para o tratamento de doenças cutâneas na antiguidade. Os povos antigos usavam uma combinação de plantas [A] *Ammi majus* L. (*Aatrilla*) no Egito e [B] *Psoralea corylifolia* (*Bavachee* or *Vasuchika*) L. na Índia, e luz solar, para tratar com sucesso o vitiligo. O ingrediente ativo desta planta é o [C] psoraleno, agora empregado com sucesso no tratamento mundial da psoríase. Adaptado do Manual de plantas da Bélgica e Boyle et al., 2008 (89).

Somente, até a primeira década do século XIX os tratamentos com plantas e luz solar alcançaram desenvolvimento na Europa, possibilitando sua aplicação clínica. Em 1896, Niels Ryberg Finsen baseando-se em trabalhos anteriores que demonstravam atividade bactericida da luz solar, desenvolveu uma lâmpada de “raios químicos” que utilizou para tratar diversos pacientes com *lupus vulgaris*, alcançando 80% de cura. Com esse feito, Niels foi laureado com o prêmio Nobel de 1903 (90). Em 1900, Oscar

Raab, estudante do laboratório de Hermann von Tappeiner do Instituto de Farmacologia da Universidade de Munique, ao avaliar o efeito da acridina sobre culturas de *Paramecium*, observou que esta possuía efeito tóxicos sobre o protozoário, quando as culturas eram expostas à luz (91).

27

Trabalhos subsequentes no laboratório de von Tappeiner chegaram à conclusão de que o oxigênio era essencial para a ocorrência do fenômeno descrito acima, e que este deveria ser diferenciado da fotossensibilização das chapas fotográficas por certos cromóforos. Essa descoberta levou finalmente a introduzir o termo "ação fotodinâmica", usado por Tappeiner em 1904. Em seguida, von Tappeiner e colaboradores conceberam o termo para descrever as reações fotobiológicas que ocorrem na presença de oxigênio molecular (92,93).

O uso da hematoporfirina no estudo da fotodinâmica veio logo após os estudos originais de Raab, sendo uma das primeiras moléculas descritas por Hausmann (1908) com atividade fotossensível. Assim, Hausmann reportou os primeiros ensaios com a hematoporfirina, que foi capaz de causar a morte de paramecium e de células vermelhas, além de descrever em detalhes os sintomas de camundongos sensibilizados, após exposição à luz (94,95). Já na década de vinte (1924), o cientista Frances, Policard, observou um acúmulo seletivo de porfirina em tecidos tumorais, evidenciado por fluorescência vermelha em tumores humanos e de animais, quando havia hemólise, e estes eram iluminados com luz ultravioleta, sendo um dos primeiros registros da TFD (96).

Os pioneiros da TFD moderna foram Richard Lipson e colaboradores com uma série

de experimentos bem-sucedidos, que demonstraram o potencial real desta terapia. Tais estudos envolveram um composto desenvolvido por Samuel Schwartz com a intenção de sintetizar preparações que permitissem otimizar a capacidade de localização dos tumores. Em 1955, Schwartz demonstrou que as preparações dos estudos anteriores, consistiam em uma mistura de diferentes tipos de porfirinas. Entre os procedimentos utilizados, Schwartz tratou hematoporfirina “pura” com ácido acético e ácido sulfúrico, o que resultou na obtenção de uma mistura de porfirina denominada “derivado de hematoporfirina” (HpD) (97,98). Em 1967, Lipson, Baldes e Gray realizaram os primeiros estudos quanto à fluorescência de HpD em tecidos tumorais de pacientes que passaram por broncoscopia ou endoscopia de vias digestivas altas com suspeita de doença maligna. Eles observaram que dos 50 pacientes tratados, 34 tiveram provas de malignidade e 32 foram detectados pela fluorescência do HpD (99).

28

Alguns anos mais tarde, Dougherty *et al.* (100) desenvolveram ainda mais a TFD, tratando tumores em modelos animais. No ano seguinte, foi realizado o primeiro estudo em pacientes com usando HpD e TFD em câncer de bexiga. Posteriormente, em 1978, o mesmo grupo de pesquisa, demonstrou pela primeira vez a eficácia clínica do TFD realizando tratamentos em 25 pacientes e tratando um total de 113 tumores cutâneos. Esse ensaio clínico em humanos alcançou 87% de sucesso, abrindo assim, caminho para muitos outros ensaios clínicos, além de estudos nesta área (101). Duas décadas depois, o conceito de TFD empregando ácido 5- aminolaevulínico (5-ALA) foi introduzido por Kennedy *et al.*, 1990 (102). Hoje, o 5-ALA e seu éster metílico (metilaminolevulinato) (MAL) são os pró-fármacos mais comumente usados para o TFD.

Em 2007, foram publicadas em um documento de referência as diretrizes internacionais, do emprego de ALA e MAL, para indicações oncológicas (103). Nos anos posteriores até nossos dias, se incorporaram novas tecnologias como nanomateriais, assim como a busca por direcionamento e especificidade do tratamento pela TFD, com a inclusão de anticorpos. Na Figura 15 vemos os principais eventos na história da TFD.

Figura 15 - Linha do tempo com principais eventos da história da terapia fotodinâmica. Adaptada

1.4.2 Conceitos básicos da Terapia Fotodinâmica

1.4.2.1 Reações Fotodinâmicas

A TFD surge como um tratamento alternativo, com um enfoque minimamente invasivo, baseado na administração (sistêmica ou tópica) de um agente fotossensibilizador (FS) não tóxico na dose utilizada, que gera moléculas em estado excitado ou ativado, tornando-as mais reativas (104) . Devido à incidência de luz em um comprimento de onda específico (geralmente entre 600 a 750 nm), a molécula excitada sofre uma série de transições eletrônicas mudando do estado fundamental *singlete* para o estado *triplete* de maior energia (Figura 16). Assim, dentro de um sistema biológico e em condições ideais, pode levar a efeitos citotóxicos, pela produção local e controlada, de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) (105–107).

Figura 16. Uma molécula em estado triplete excitado pode reagir de duas formas: diretamente com uma molécula orgânica num microambiente celular, adquirindo um átomo de hidrogênio ou de elétrons para a formação de um radical e produzir um ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) radical, reação do tipo I, ou, mais provável, transferir sua energia ao oxigênio molecular (3O_2) e formar oxígeno singlete (1O_2), reação de tipo II. (Fonte Mroz, et al, 2011).(108)

Figura 17. Diagrama de níveis de energia de Jablonski simplificado para TFD. A

molécula FS ao absorver fóton de luz de comprimento apropriado é elevada do seu estado fundamental (S_0) para um estado singlete excitado (S_n). Por relaxação vibracional, o estado singlete excitado S_n produz um estado singlete inferior (S_1), que pode decair para o estado fundamental por fluorescência ou sofrer cruzamento intersistemas (CIS), produzindo o estado triplete excitado (T_1). Nesse estado excitado de meia-vida mais longa (~ 10 - 320 ns) o FS pode decair para seu estado fundamental por fosforescência, ou reagir com moléculas adjacentes através de reações do tipo 1 ou do tipo 2, com produção de oxigênio singlete (1O_2). Adaptado de Li., *et al.*, 2013 e Silva Z., *et al.*, 2015 .(109,110)

É importante delinear (Figura 17), que em seu estado fundamental (estado singlete - S_0), o FS possui dois elétrons com spins opostos em um orbital molecular de baixa energia. Ao absorver um fóton de luz no comprimento de onda apropriado (específico para cada FS), um dos elétrons é excitado a um orbital de maior energia, conservando o mesmo spin. Nessa fase, o FS encontra-se em seu estado singlete excitado, S_n . Subsequente a essa fase inicial de excitação, a relaxação do estado singlete excitado S_n produz um estado singlete inferior, S_1 . Nesse estado eletrônico, as moléculas do FS podem decair diretamente para o estado fundamental, perdendo energia pela emissão de fluorescência ou por conversão interna na forma

de calor. Além disso, o FS pode ainda sofrer um processo conhecido como cruzamento intersistemas (**CIS**). Nesse caso, o elétron em seu estado excitado inverte seu spin, originando o estado triplete excitado de meia-vida mais longa (~10-320 ns), que possui, portanto, dois elétrons com spins paralelos (104,106,111).

32

Por outro lado, o tempo em que a molécula permanece no estado triplete excitado é definido como meia-vida do estado triplete (τ_T). Esse fator é fundamental para as reações subsequentes, porque condiciona o tempo disponível para transferência de energia através das colisões das moléculas excitadas, para outras moléculas adjacentes. Podemos dizer que, quanto mais lento é o decaimento do estado triplete excitado, maiores serão as possibilidades que o FS terá para interagir. Para uma fotossensibilização eficiente, preconiza-se uma meia-vida relativamente longa ($\tau_T > 500$ ns) (109,111). Conjuntamente, moléculas contendo um íon metálico central diamagnético acabam sendo mais apropriadas para TFD, uma vez que compostos com íons metálicos paramagnéticos possuem τ_T mais curtos (112).

Continuando com a descrição do processo, o FS no estado triplete excitado pode produzir dois tipos de reações diferentes: **Tipo 1** e **Tipo 2**. Nas reações do **tipo 1**, o FS excitado reage diretamente com o substrato (Oxigênio) através da transferência de elétrons (e^-), produzindo radicais livres, os quais, ao interagir com o oxigênio molecular (O_2), podem produzir espécies reativas de oxigênio (ROS), tais como peróxido (H_2O_2), ânions superóxidos (O_2^-) e radicais hidroxilo (OH^\cdot). Esses agentes iniciam uma cascata de reações que podem culminar com dano oxidativo para importantes moléculas biológicas (113–115). Com um potencial redox de $E_0=1,35$ V, pode atacar e oxidar qualquer molécula dentro de uma célula (tais como lipídeos de membrana e proteínas) como observado na figura 18, além

disso, as energias de ativação para essas reações são muito baixas (116).

De modo alternativo, na reação do **tipo 2**, o FS pode transferir energia diretamente para o oxigênio molecular em um processo permitido por spin para formar uma espécie altamente reativa denominada oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) (117). Certamente, as reações anteriormente descritas, podem ocorrer simultaneamente.

Adicionalmente, a razão entre esses dois processos vai depender diretamente do tipo de FS utilizado, das concentrações de substrato e de oxigênio, bem como da afinidade entre o FS e o substrato (118).

Figura 18. Moléculas presentes nas células que podem experimentar modificações após TFD.

O oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) é uma espécie muito reativa, com uma vida útil em água de aproximadamente quatro microssegundos. Sofre várias reações com substratos biológicos, como oxidação e cicloadição, como mostrado no Esquema, todas elas bastante perturbadoras dos processos biológicos. Adaptado de Sternberg, et al., 1998 (98).

1.4.2.2 TFD ao nível celular

A captação de FS pelas células tumorigênicas, bem como seu local intracelular preferencial, depende diretamente da sua natureza química (peso molecular, lipofilicidade, anfipaticidade, carga iônica e características de ligação às proteínas) (119,120). Enquanto ao processo de captação celular, os FS são compostos inespecíficos, ou seja, eles não têm como alvo uma enzima ou receptor específico da célula (121). Assim sendo, as moléculas hidrofóbicas podem rapidamente se difundir nas membranas plasmáticas, enquanto moléculas mais polares tendem a ser internalizadas via endocitose ou pelo transporte assistido por proteínas carreadoras de membrana e lipídios séricos, como as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) (122,123).

Uma vez já na célula, um entendimento preciso do local da acumulação subcelular preferencial do FS, poderia ajudar a determinar seu potencial citotóxico quando usado na TFD. Assim foi previamente demonstrado por Oliveira, et al., 2011. Em seu estudo usando células de adenocarcinoma cervical humano (HeLa), descreve como o FS violeta de metilo (VM), menos eficiente na produção de radicais livres, foi tão eficiente na indução da morte celular quanto o azul de metileno (AM), que produz 10 vezes mais radicais livres. Isso ocorre principalmente devido à

34

citocalização dos FSs na célula, pois o AM parece localizar-se preferencialmente no citosol e nos lisossomos, enquanto o VM apresenta afinidade pelas mitocôndrias. Consequentemente, sugerindo que a localização é inclusive mais importante do que a sua capacidade de produção de radicais livres (124).

Efetivamente, uma vez na célula tumoral o FS pode se localizar em diferentes

organelas como mitocôndrias, lisossomos, retículo endoplasmico, complexo de Golgi e membrana citoplasmática (115,125,126). Essa localização intracelular coordena a maior parte da sinalização produzida depois da TFD (Figura 19). Geralmente, as respostas ao estresse agudo ativam uma série de eventos bioquímicos como mudanças nas concentrações de cálcio (Ca^{2+}) e geração de ácidos graxos livres produzidos pela fosfolipase A2, levando a produção de citocinas e de mediadores de resposta ao estresse. Após esse evento, as proteínas quinases são ativadas e os fatores de transcrição são expressos. Muitas das principais respostas celulares estão nas mitocôndrias e com frequência levam à indução de apoptose pela ativação das caspases e subsequente liberação do citocromo c. Algumas proteínas específicas antiapoptose (tais como Bcl – 2) estão danificadas pela oxidação induzida pela TFD, aumentando assim a apoptose (106,108,125,127).

Contudo, quando a via apoptótica se encontra comprometida, a TFD pode causar a morte mediante a indução de mecanismos autofágicos (128), necroptose e/ou morte celular dependente de lisossomos (115,129). A necroptose é uma modalidade de morte celular programada que se ativa por perturbações da homeostase extracelular ou intracelular que depende criticamente da fosforilação, oligomerização e migração de MLKL (proteína semelhante ao domínio de linhagem cinase mista) para a membrana plasmática, as atividades de quinase de RIPK3 e (pelo menos em alguns contextos) de RIPK1 (proteína que interage com o receptor cinase-1 e 3, respectivamente). Finalmente, a morte celular dependente de lisossomo (MCDL) é uma consequência da permeabilização da membrana lisossômica e da liberação de catepsinas, com possível (ou não) permeabilização

da membrana mitocondrial (PMM) e caspases (130,131). De fato, podemos afirmar que uma vantagem da TFD e sua capacidade de induzir morte celular por diversas

35

vias, em outras palavras, é uma abordagem terapêutica capaz de contornar as diversas resistências a morte nas células alvo do tratamento.

· **Figura 19. Visão geral das sub-rotinas de morte celular que podem ser desencadeadas pela terapia fotodinâmica.** As localizações mais descritas dos diferentes fotossensibilizadores (PS) são a membrana plasmática (MP), retículo endoplasmático (ER), mitocôndrias (M) ou o lisossomo (L). Dependendo da sua localização, após a ativação pela luz (vermelha), ele pode danificar diretamente a MP causando necrose ou culminar em um ou mais mecanismos de morte celular programada (RCP). RPD: resposta proteica desdobrada; PML: permeabilização da membrana do lisossomo; Fe: ferro; ROS: espécies reativas de oxigênio; -P: grupo fosfato apresentado nas formas ativas de RIPK3 e MLKL na via de necroptose; MCLD: morte celular lisossômica dependente. Adaptado de Dos Santos, et al., 2019 (126).

1.4.2.3 TFD no tumor

O efeito fototóxico da PDT, como atualmente empregado na clínica, em geral não é seletivo para as células tumorais, a seletividade é dada pela aplicação da luz no local do tumor (105,132). Assim sendo, o FS administrado e absorvido pelas células

36

saudáveis e tumorais. Em geral, os tecidos normais (não cancerosas) são capazes de eliminar ou depurar o FS, segundo sua farmacocinética, ao longo do tempo. Pelo contrário, nos tecidos tumorais se produz uma certa retenção do FS (133,134), o que combinado com a ativação localizada pela iluminação específica, confere à

PDT alguma seletividade (135–137).

Os fatores que favorecem o acúmulo preferencial do FS no tecido neoplásico são complexos e ainda precisam de pesquisa para seu esclarecimento. As teorias propostas não são totalmente compreendidas e são fortemente influenciadas pelas características do FS utilizado (hidrofobicidade / anfifilicidade), dosagem (mg/kg) e tipo do tumor, entre outros aspectos (119,138). Aqui serão mencionadas as duas abordagens mais aceitas na literatura:

- O fenômeno chamado “Enhanced Permeability and Retention” (EPR), frequentemente utilizado na terapêutica do câncer. Devido ao crescimento rápido e descontrolado das células tumorais, os tumores sólidos podem apresentar vasculatura anormal e desorganizada, e com revestimento interno defeituoso. Conseqüentemente, o endotélio do tumor está com vazamento e as macromoléculas podem extravasar para o espaço extravascular. Além disso, eles são retidos por mais tempo em comparação com tecidos saudáveis devido à drenagem linfática prejudicada no tecido tumoral (127,133,139,140).
- O aumento da expressão de certos receptores nas células tumorais, diminuição do pH intratumoral ou macrófagos associados ao tumor (TAM) que fagocitam moléculas de FS (93,96,141).

Seguindo com a ação fotodinâmica nas células tumorais, basicamente, existem três mecanismos descritos por meio dos quais, a TFD causa a regressão do tumor: diretamente pela morte celular (necrose e/ou apoptose, autofagia, necroptose, entre outros) das células cancerosas; por lesão do sistema vascular que irriga o

tumor deixando-o sem oxigênio ou nutrientes; e finalmente, induzindo uma resposta imune, que frequentemente leva a estados inflamatórios (142,143).

37

A inflamação produzida pela TFD é um processo não específico, que é orquestrado pelo sistema imune inato, iniciado pela geração dos sinais de perigo DAMPs (damage associated molecular patterns) ou CDAMPs (cell death associated molecular patterns), e detectado por componentes da imunidade inata. Em seguida, o fluxo de neutrófilos e macrófagos, os quais invadem rapidamente os tumores submetidos à TFD removendo os restos celulares, incluindo as células lesionadas ou mortas (113).

O uso da TFD no tratamento das células tumorais apresenta uma série de vantagens importantes a serem consideradas: 1o) pode ser usada em diferentes modalidades de câncer, como por exemplo, a Temoporfina *Foscan*® (um FS de primeira geração) que foi usada no tratamento do câncer de pulmão, de estômago, de próstata e de pele (105); 2o) o tratamento pode ser repetido por diversas vezes, sem produzir efeitos colaterais; 3o) com a inativação do fotossensibilizador (FS), na ausência de luz, ocorre uma baixa toxicidade sistêmica; 4o) há supressão seletiva dos tumores sem efeito prejudicial secundário nos tecidos saudáveis circundantes (126,138) e 5o) a possibilidade do tratamento ambulatorial dos pacientes, leva a diminuição dos custos, resultando em uma maior adesão dos pacientes ao tratamento (122,144).

A eficácia da TFD está relacionada com a extensão do dano e da citotoxicidade

local alcançadas, dependendo de características, tais como: tipo de fotossensibilizador utilizado, sua localização extra e intracelular, dose total administrada, dose total e taxa de fluência da luz, disponibilidade de oxigênio e intervalo entre a administração de fármacos e a exposição à luz (119,145).

1.4.2.4 Interações da luz em TFD

Antes de prosseguir, é importante introduzir as quantidades radiométricas que são usualmente utilizadas na fotobiologia. Elas são, a “irradiância” (E), que é definida pela potência radiante incidente por unidade de área numa determinada superfície, tendo como unidade o Watt por metro quadrado (W/m^2) e a “exposição radiante” (H), usualmente tratada como “dose” e definida pela energia radiante incidente por

38

unidade de área numa determinada superfície, tendo como unidade Joule (J) por metro quadrado (J/m^2) (116,138).

Assim sendo, as unidades W/m^2 e J/m^2 (ou suas unidades derivadas) são adequadas para comparação das irradiâncias e doses em caso de uso da luz monocromática de comprimento de onda fixo (fontes laser e LED). Em consequência, a dose leve (LD), equação 1, em Joules (J) / cm^2 é usada para descrever o fornecimento de luz durante a TFD, sendo definida como a irradiância da superfície da pele I (Watts (W) / cm^2) multiplicada pelo tempo de tratamento, t, (segundos) (133,146,147).

$$(1) LD = I * t$$

Enquanto que para calcular estas características em caso da radiação distribuída em uma ampla região espectral (lâmpadas halógenas) seria mais adequado usar as unidades N/m^2 para irradiância e $(\text{N t})/\text{m}^2$, onde N é o número total dos fótons emitidos durante um segundo para uma unidade da superfície em toda região espectral da emissão e t é o tempo da irradiação (148–150).

Realmente, a velocidade de qualquer fotoreação depende somente do número dos fótons absorvidos pelo sistema e não depende da sua energia. Esta consideração está baseada no fato que para realizar a fototransformação de uma molécula é necessário e suficiente somente um fóton que possui a energia (equação 2):

$$(2) h = E^*_{\text{min}} - E_0$$

Em que h é constante de Planck, ν é frequência característica do fóton, E^*_{min} é energia do estado excitado mais baixo e E_0 é a energia do estado fundamental da molécula. A energia maior dos fótons que podem transmitir a molécula para os estados excitados mais altos será parcialmente perdida, devido os processos não radiativos da interconexão e de cruzamento intersistemas (descrita no item 1.4.2.1). A energia emitida por uma fonte durante um segundo por unidade de área num comprimento de onda definido é igual (equação 3):

39

$$(3) E = h N/t \text{ (W/m}^2\text{)}$$

Assim podemos determinar o número dos fótons emitidos por um segundo neste

comprimento de onda (λ) como (equação 4). Em que c é a velocidade da luz (151).

$$(4) N/t = E/h = E \lambda / h c$$

Em suma, as fontes laser e LED, devido ao seu comprimento de onda único, as facilidades do cálculo da dose leve, e a sua capacidade de serem acoplados a fibras ópticas para o tratamento interno e localizado (vias digestivas, pulmão, cérvix), são as fontes de luz mais usadas na TFD clínica (132,152). Tipicamente, doses leves entre 37 - 540 J / cm² foram já usadas, contudo a irradiância não deve exceder os 150 mW / cm², para evitar efeitos hipertérmicos (153,154). No entanto, para a TFD de câncer de pele não melanoma, uma fonte de luz não coerente - com um espectro relativamente estreito - como um diodo emissor de luz (LED) é geralmente escolhida devido à sua confiabilidade, custo, facilidade de uso e eficácia semelhante à irradiação a laser (155,156).

A escolha da fonte de luz depende muito do fotossensibilizador usado, pois um comprimento de onda apropriado da luz ativará o fotossensibilizador, levando à formação de espécies citotóxicas, resultando em destruição tecidual altamente específica (como já mencionado em outros apartados desta tese). O transporte de luz é uma característica significativa da TFD e depende em grande parte da composição do meio pelo qual está passando. Portanto, a propagação da luz no tecido biológico pode ser caracterizada por parâmetros de propriedade óptica do tecido (133,148,157).

1.4.2.5 Fotossensibilizadores

Como descrito anteriormente, o êxito da TFD depende, em parte, de uma adequada escolha do FS levando em consideração suas propriedades físico-químicas, a começar pela eficiência da passagem do estado excitado *singlete* ao estado excitado *triplete* próximo a 100% bem como uma energia do estado *triplete* do FS superior a do oxigênio *singlete* ($> 95 \text{ kJ mol}^{-1}$) para que ocorra transferência

40

eficiente de energia deste para o oxigênio; maiores tempos de vida do estado excitado (δ) permitindo um tempo suficiente para a colisão entre as moléculas do FS com as moléculas de oxigênio presentes no meio (129); alto rendimento quântico de produção do oxigênio *singlete* ($\Phi\Delta$) em diferentes meios; estabilidade térmica e fotoquímica; pureza; produção com baixo custo; uma rápida desintoxicação em células normais e uma rápida acumulação em tecido tumoral (106,158,159).

Por outro lado, também existe a dependência de uma excitação adequada do FS, que também necessita de uma fonte de luz apropriada, levando em consideração suas próprias características físicas (144). Dessa forma, podemos considerar que para uma molécula ser considerada como uma “boa” candidata a ser fotossensibilizadora deve possuir, no geral, as características citadas anteriormente (ver Tabela 2).

Tabela 2. Propriedades ideais de um fotossensibilizador para TFD

Tipo Propriedade

Químicas Pureza química (composição química bem definida)

Altamente estável e solúvel em líquidos corporais Facilidade de administração Síntese

química simples e barata Relativa hidrofiliidade *Fotofísicas* Forte absorção na região do vermelho do espectro visível (680-800 nm)

Elevado coeficiente de extinção ($50000-100000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) *Fotoquímicas* Alto rendimento quântico da produção de oxigênio singlete (FD)

Fluorescência Adequado fotobranqueamento *Biológicas* Baixa toxicidade no escuro para fotossensibilizador e metabólitos

Baixo potencial mutagênico Rápido clearance Acumulação preferencial nos tecidos/estruturas teciduais alvo Ausência de fototoxicidade na pele quando exposta à luz solar

Os Fotossensibilizadores podem ser categorizados de acordo com sua estrutura ou sua origem. E uma classificação tradicional separa os diversos compostos em três gerações. Porfirinas e outras substâncias desenvolvidas nos anos 70 ou início dos anos 80 são chamadas de fotossensibilizadores de primeira geração. Derivados de porfirina ou compostos sintéticos feitos no final dos anos 80 são denominados fotossensibilizadores de segunda geração. Fotossensibilizadores de terceira geração referem-se a modificações realizadas na estrutura do composto com objetivo de acumulação seletiva em tumores, tais como conjugados biológicos (conjugados a anticorpos ou lipossomos) (160–164). Além disso, os fotossensibilizadores existentes podem ser divididos em três grandes famílias: (1) fotossensibilizadores baseados em porfirina (p.ex.: Photofrin, ALA/PpIX, BPD-MA); (2) fotossensibilizadores baseados em clorofila (p.ex.: clorinas, purpurinas, bacterioclorinas); e (3) corantes (p.ex.: ftalocianinas, naftalocianinas, azul de metileno) (105,134,165,166).

1.4.2.6 Azul de metileno (AM)

É interessante destacar que alguns FS estão em fase de estudo, enquanto outros já estão prontos para uso terapêutico (106). Entre os FS da segunda geração (não porfirinoídes) encontramos o AM (*3,7-bis(dimethylamino)phenothiazine-5-ium chloride*). Sua estrutura é mostrada na Figura 20 e sua faixa de absorção localizada na região de 550 nm a 700 nm (Figura 21) (167). Esse composto já é utilizado na clínica como: corante ou para marcar linfonodos sentinelas e áreas tumorais (168), no tratamento da meta-hemoglobinemia, no tratamento e na profilaxia de toxicidade ifosfamida neuropsiquiátrica, bem como no tratamento de infecções fúngicas combinado com TFD (169). Além disso, estudos descrevem que o AM poderia atrasar ou reverter a neurodegeneração na doença de Alzheimer, pela inibição da agregação da proteína Tau (170).

Figura 20. Estrutura Molecular do Azul de Metileno. Tardivo & et al, 2005

Figura 21. Espectros de absorção (nm) do azul de metileno, e outros compostos de cadeias carbonadas análogos, n-pentil e n-hexil (10 mM em água). O comprimento de onda de máxima absorção encontra-se entre 600 e 70 nm, aproximadamente.

Em uso clínico, o AM é distribuído para dissolução em água estéril a uma concentração de 10 mg/mL (1%) ou em cápsulas de gelatina para consumo oral. Peters, 2000 demonstrou que o modo de administração de AM, interfere com a sua distribuição em diferentes órgãos; por via intravenosa as doses mais elevadas são no plasma e no cérebro (171). Outros estudos confirmam a passagem do AM, através da barreira hematoencefálica (170).

Apesar de possuir várias das características de um “bom” FS (172,173), a implementação do AM tem sido limitada devido sua baixa penetração na massa tumoral e sua rápida redução em seu forma Leuco, sendo evidentes os resultados obtidos em diferentes estudos *in vivo* e *in vitro* (144). Nesse sentido, os estudos *in vitro* tem possibilitado êxito no tratamento de linhagens tumorais de adenocarcinoma, de carcinoma de bexiga e em células HeLa (174), mas não

exercendo o mesmo efeito *in vivo* quando é administrado via intravenosa (175). Com a finalidade de solucionar o problema da permeabilidade, algumas pesquisas estão focadas na modificação da estrutura química do AM, mediante a sintetização de novos derivados e no estudo da sua efetividade no tratamento do câncer com resultados positivos (105,176). Contudo, outra opção a ser considerada é a procura de novos sistemas que facilitem a entrada do AM no citoplasma das células

43

cancerígenas. Por exemplo, através de poros presentes nas membranas das células cancerígenas como o poro induzido pelo receptor purinérgico (de nucleótidos) P2X7 (P2X7R) (177) ou peptídeos permanentes (PP) (178).

1.4.3 TFD na Clínica

O processo Fotodinâmico, na clínica, é realizado em diversas etapas sendo a primeira delas, a administração do FS ao paciente (via tópica ou intravenosas), seguido de um período de incubação, em que se espera a acumulação no tumor, e, por último, é feita a iluminação com uma fonte luminosa de comprimento de onda apropriado (400 – 630 nm). Dessa forma, a TFD vale-se da energia da luz para causar dano celular (Figura 22). Em relação ao nível molecular, o fenômeno, obedece à transferência de elétrons e/ou energia do FS excitado para uma molécula que funciona como um substrato (oxigênio molecular). Em condições ideais em um sistema biológico, a explosão oxidativa rápida e intensa que prossegue, leva a efeitos citotóxicos, pela produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) produzindo, desta forma, a morte das células tumorais por necrose, apoptose, autofagia, entre outros tipos (105) Como já mencionado no texto.

Figura 22. Terapia Fotodinâmica (TFD). O fotosensibilizador é administrado, permeando as células tumorais, onde fica maior tempo, se comparado com o tempo das células saudáveis, que tem a capacidade de removê-lo rapidamente. Depois é irradiado por uma fonte de luz ($h\nu$), induzindo a morte das células no tecido tumoral. Os modernos sistemas de fibra ótica em conjunto com os sistemas de endoscopia permitem que a aplicação de luz nos comprimentos de onda apropriados em diferentes regiões do organismo, seja aplicada em diversos tumores. (Adaptado de Mroz et al, 2011)(108)

Desde a aceitação do primeiro FS (Fotosensibilizador) pelo menos outros

doze (12) compostos foram aprovados para uso clínico em vários locais do mundo. Atualmente na Europa, nos Estados Unidos e no Japão, a TFD é usada de forma ativa no tratamento de malignidades e de lesões pré-malignas como: câncer de bexiga, câncer esofágico obstrutivo e câncer de pulmão em estágio inicial e final,

45

carcinoma de células basais, ceratose actínica e esôfago de Barrett (123,129,179). Adicionalmente, na tabela 3 observar-se estudos explorativos do uso dos FS com aprovação para o tratamento de outros cânceres.

Tabela 3. Fotossensibilizadores aprovados para uso clínico ou em estudos clínicos (atualizado até 2019).

Fotossensibilizador Classe $\lambda_{m\acute{a}x.}$ (nm)

Φ_{Δ} **Uso clínico**

Tipo de tumores

Em teste clínico (2010 - 2019)

Porfimer sodium Porfirina 630 0,89 Mundial Pulmão, esôfago,

ducto biliar, bexiga, cérebro, ovário

EUA (Paliativo) pulmão

EUA (Pos-operativo) - Câncer de pulmão

EUA (Fase II -IV) - câncer de pulmão Brônquico intratável

Japão (terapia de resgate Fase II) - carcinoma de células escamosas sem metástase

Japão - Carcinoma epidermoide oral

EUA (Paliativo - stent biliar com TFD) câncer do ducto biliar

EUA (Fase II) Carcinomatose e sarcomatose peritoneal

Levulan (ALA) Precursor

da Porfirina

635 0,56 Mundial Pele, bexiga,

cérebro, esôfago

Metvix (M-ALA) Precursor

da Porfirina

635 - Europa Pele, bexiga

Temoporfin (Foscan) (mTHPC)

Clorina 652 0,87 Europa Cabeça e

pescoço, pulmão, cérebro, pele, ducto biliar

Reino Unido - Leucoplasia ou eritroplaquia

Reino Unido - Carcinoma epidermoide oral

Países Baixos - Indonésia (terapia de resgate) - Carcinoma nasofaríngeo

Países Baixos - Carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço

(Visudyne) Vertiporfin Clorina 690 0,84 Mundial Oftálmico,

pâncreas, pele Reino Unido - Adenocarcinoma

pancreático (inoperável)

46

Φ_{Δ} **Fotossensibilizador Classe $\lambda_{m\acute{a}x.}$**

Uso (nm)

clínico

Em teste clínico (2010 - 2019)

Tipo de tumores

HPPH Clorina 665 Cabeça e

pescoço, esôfago, pulmão

EUA - adenocarcinoma intramucoso precoce do esôfago

EUA - Carcinoma espinocelular

SnEt2 (Purlytin) Clorina 660 - Pele e seios EUA

Talaporfin (Aptocine, LS11, MACE, NPe6)

Clorina 664 0,77 Japão Fígado, cólon,
cérebro, pulmão
EUA (Paliativo) Câncer de pulmão

EUA (Fase II -IV) - câncer de pulmão intratável com obstrução
Rússia (Fase II -IV) - câncer de pulmão de células não pequenas (inoperável)
Japão - Câncer de pulmão com lesões <ou> 1 cm
Japão - Vários cânceres primários de pulmão
Japão (terapia de resgate Fase II) - Carcinoma espinocelular
Ce6-PVP (Phootolon), derivados de C6e

Clorina 660 - Nasofaringe,

Sarcoma, cérebro

Rússia, Bielorrússia

Silicon phtalocyanine (Pc4)

Ftalocianina 675 - Linfoma de

célula T cutâneo, pele

EUA

Padoporfirin (TOOKAD)

Bacterioclori na

763 0,50 Próstata EUA

Motexafin lutetium (Antrin, Lutex)

Texafirina 732 - Seio EUA

Photosens Ftalocianina 670 0,38 Estômago, pele, lábios, cavidade oral, língua, seio

Rússia

Adaptado de Agostinis et al., 2011, Van Straten et al., 2017 (123,129).

1.4.4 Proteínas formadoras de poros

1.4.4.1 Receptores purinérgicos

Purinas e pirimidinas estão entre as mais primitivas moléculas presentes em todas as células vivas. São componentes essenciais para a fisiologia celular, exercendo funções variadas, que vão desde a fonte de energia para o metabolismo, até a síntese de ácidos nucleicos e a regulação enzimática.

47

Além disso, nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares têm sido reconhecidos desde a década de 70 como potentes mensageiros extracelulares, exercendo suas funções através de uma família de receptores conhecidos coletivamente como receptores purinérgicos (180–182). A existência desses receptores foi levantada pela primeira vez em uma revisão de 1976 que discutiu as diferenças observadas, até então, na atividade farmacológica e funcional dos nucleotídeos e nucleosídeos de purinas (183,184). No mesmo ano, Spedding & Weetman relataram que o composto 2,2'-piridilsatogênio era capaz de bloquear as respostas inibitórias em *taenia coli* de porquinhos-da-índia para ATP/ADP, mas não para adenosina. Assim, baseados nessas evidências, sugeriram a existência de receptores distintos para esses compostos (185). Dois anos depois, a partir de um levantamento dos efeitos

extracelulares de nucleotídeos e nucleosídeos, Burnstock propõe a primeira divisão dos receptores purinérgicos em receptores P1, mais responsivos à adenosina e AMP e antagonizados por metilxantina; e receptores P2, que eram mais responsivos ao ATP/ADP e não antagonizados por metilxantinas (184,186). Nas décadas seguintes, numerosos estudos farmacológicos, bioquímicos e moleculares confirmaram essa predição inicial. Em 1985, os receptores P2 (P2Rs) foram subdivididos em dois tipos, nomeados receptores P2X (P2XRs) e receptores P2Y (P2YRs), utilizando critérios farmacológicos, como a ordem de potência de agonistas (187). O advento de modernas técnicas de biologia permitiu o avanço nesse campo e a confirmação desses achados iniciais (Figura 23). No início da década de 90, surgiram os primeiros trabalhos de clonagem e de caracterização dos receptores P1 e P2. Tais trabalhos, associados às evidências estruturais e às propriedades eletrofisiológicas mostraram que os P2XRs funcionavam como canais iônicos, enquanto P2YRs eram acoplados à proteína G (188–190).

Ao longo do tempo, o conceito de sinalização purinérgica se ampliou bastante, e hoje sua importância é reconhecida devido a diversos fenômenos biológicos, tais como: agregação plaquetária; secreção exócrina e endócrina; vasodilatação endotelial; transdução mecanosensitiva de nocicepção; neuromodulação e neuroproteção; proliferação celular; diferenciação, migração e morte durante o desenvolvimento embrionário; cicatrização; reciclagem de células epiteliais; inflamação; secreção de citocinas e outras respostas imunes (191–193).

Figura 23. Esquema ilustrativo com todos os membros da família de receptores purinérgicos descritos até hoje (194).

1.4.4.2 Expressão em Câncer

Assim como nos processos fisiológicos, P2X7R não desempenha apenas uma função, mas, ao contrário, está envolvido em mecanismos celulares até mesmo antagônicos como morte e sobrevivência celular. Também a expressão desse receptor em neoplasias não obedece a nenhum padrão identificável (195). De fato, na maioria dos cânceres, o P2X7R está super-expresso como em câncer de próstata, de mama, de tireóide e de pâncreas (tabela 4), ou ainda sua expressão

está relacionada diretamente com a agressividade tumoral como na leucemia linfocitária crônica (196). Em carcinomas de pele, sua distribuição pode ajudar a diferenciar lesões benignas de tumores malignos. Por outro lado, em amostras de câncer epitelial uterino, a expressão de P2X7R está extremamente diminuída, de

49

tal maneira que os autores sugerem que essa diminuição possa ser utilizada no diagnóstico da doença (189,197). Em estudos que relatam somente a presença e a função do P2X7R, mostram que as respostas desencadeadas por este receptor também não são unificadas. Se em células de melanoma e de carcinoma epitelial de intestino, a ativação de P2X7R leva à morte celular, em neuroblastomas e em gliomas de rato C6 o mesmo receptor induz proliferação (198) e migração celular (199,200). De fato, o P2X7R parece estar envolvido na biologia tumoral e sua expressão e funcionalidade merecem ser investigadas em gliomas, como potencial alvo terapêutico (201,202).

Tabela 4. Expressão em câncer do receptor P2X7.

Ano	Tipo de Tumor	Nível de Expressão	Efeitos fisiológicos da ativação	Referências
2005	Próstata	Proteína Sem determinar		Slater M, <i>et al.</i> [101]
2013	Mama	mRNA/Proteína Incrementa concentração de Ca ²⁺ intracelular		Jelassi B, <i>et al.</i> [102]
2008	Tiróide	mRNA/Proteína Sem determinar		Solini A, <i>et al.</i> [103]
2007	Pâncreas	mRNA Sem determinar		Kunzli BM, <i>et al.</i> [104]
2005	Carcinoma da pele	mRNA Sem determinar		Slater M, <i>et al.</i> [101]
2006	Epitélio uterino	mRNA/Proteína Sem determinar		Li X, <i>et al.</i> [105]
2006	Neuroblastoma	mRNA/Proteína Induz proliferação celular		Raffaghello L, <i>et al.</i> [106]
2005	Melanoma	mRNA/Proteína Captação de YO-PRO-1		White N, <i>et al.</i> [107]
				2002 Leucemia Linfocítica crônica
			mRNA/Proteína Diminui a	

proliferação

Adinolfi E, *et al.*[108]

2015 Carcinoma

Hepatocelular

mRNA/Proteína Sem determinar Liu, H, *et al.*[109]

50

mRNA/Proteína 2014 Carcinoma de

Incrementa

Vázquez-Cuevas, ovário

concentração de

F. G., *et al.*[110] Ca²⁺ intracelular, mais não a morte celular

2010 Carcinoma

Papilar da Tireoide

Proteína Sem determinar Gu L-Q, *et al.*[111]

2012 Câncer de

Pulmão

mRNA/Proteína Captação de Brometo

Takai E, *et al.*[112] de Etídio

2012 Glioma mRNA/Proteína Captação de Brometo

de Etídio

Gehring MP, *et al.*[113]

2013 Câncer colorretal mRNA Captação de Brometo

de Etídio

Bian S, *et al.* [114]

51

OBJETIVOS

1.5 Objetivo Geral

Desenvolver uma proposta de TFD, desde a concepção até os testes *in vitro*, que finalmente possibilite o desenvolvimento de uma estratégia para o tratamento de tumores de baixo prognóstico terapêutico como o glioblastoma e o neuroblastoma.

1.6 Objetivos Específicos

1. Desenhar e construir um dispositivo de irradiação de luz vermelha com

tecnologia LED para o teste de células *in vitro* compatível com placas de 96 poços

2. Validar o dispositivo de irradiação de luz vermelha para comprovar sua aplicação na busca de moléculas com características fotossensíveis
3. Propor um protocolo que permita melhorar a avaliação da viabilidade celular para ensaios de PDT com o auxílio de análises disponíveis para HTS
4. Verificar a citotoxicidade do AM como um fotossensibilizador em condições de luz e na ausência de luz nos modelos celulares de glioblastoma e neuroblastomas *in vitro*.
5. Testar as condições experimentais *in vitro* na linhagem celular de glioblastoma GL261 e de neuroblastoma SH-SY5Y humano, para estudar o possível efeito sinérgico de um agonista do receptor P2X7 (ATP e benzoyl-ATP) e AM na viabilidade das células tumorais.

DOCUMENTO I

Título do artigo: Design of a portable equipment for delivery of light with LED technology for *in vitro* studies in Photodynamic Therapy

Referência bibliográfica: ¹ Carreño E.A., ¹ AVP. Alberto ¹ Souza, C.A.M.,

²Henriques-Pons A., ¹Alves LA.,

Situação: Esse artigo encontra-se submetido na revista Photochemistry and Photobiology A: Chemistry..

Descrição: Este artigo descreve em detalhe as características de um protótipo de irradiação celular de luz portátil com tecnologia LED, bem como o protocolo utilizado nos experimentos para sua validação. Este dispositivo é um equipamento desenhado especificamente para obter um fluxo de luz uniforme em placas de cultura celular de 96 poços, para estudos de Terapia fotodinâmica *in vitro*. O presente trabalho foi desenvolvido após uma revisão detalhada da literatura, ao observar que, apesar do número de publicações avaliando a atividade fotodinâmica de diferentes Fotossensibilizadores *in vitro*, não há uma padronização dos sistemas de iluminação utilizados na TFD, um fato importante que prejudica a reprodutibilidade dos estudos e permite as variações nas configurações experimentais em TFD. Além disso, não há equipamentos comercialmente disponíveis no Brasil, exclusivos para testes celulares *in vitro*.

29/11/2019 Gmail - Successfully received: submission DESIGN OF A PORTABLE EQUIPMENT FOR DELIVERY OF LIGHT WITH LED TECH...

Alejandra Carreño <acm.alejandra@gmail.com>

Successfully received: submission DESIGN OF A PORTABLE EQUIPMENT FOR DELIVERY OF LIGHT WITH LED TECHNOLOGY FOR IN VITRO STUDIES IN PHOTODYNAMIC THERAPY for Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry

Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry

<EvisSupport@elsevier.com> Responder a: jphotochem@elsevier.com Para: acm.alejandra@gmail.com

This message was sent automatically.

29 de noviembre de 2019, 10:47

Ref: JPHOTOCHEM_2019_1915 Title: DESIGN OF A PORTABLE EQUIPMENT FOR DELIVERY OF LIGHT WITH LED TECHNOLOGY FOR IN VITRO STUDIES IN

PHOTODYNAMIC THERAPY Journal: Journal of Photochemistry and Photobiology A:
Chemistry

Dear Dr. Carreno,

Thank you for submitting your manuscript for consideration for publication in Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry. Your submission was received in good order.

To track the status of your manuscript, please log into EVISE® at:

http://www.evise.com/evise/faces/pages/navigation/NavController.jspx?JRNL_ACR=JPHOTOCHEM and locate your submission under the header 'My Submissions with Journal' on your 'My Author Tasks' view.

Thank you for submitting your work to this journal. Kind regards, Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry

Noname manuscript No. (will be
inserted by the editor)

DESIGN OF A PORTABLE EQUIPMENT FOR DELIVERY OF LIGHT WITH LED TECHNOLOGY FOR IN VITRO STUDIES IN PHOTODYNAMIC THERAPY

E.A. Carreno · A.V.P. Alberto · C.A.M. Souza · A. Henriques-Pons · E. Y. Veslin
· G.A.P. Campos · L.A. Alves

Received: date / Accepted: date

Abstract The purpose of this investigation was to develop a based light-emitting diode (LED) technology instrument for high-throughput screening (HTS) of compounds with the chemical potential to be able to act as photosensitizing agents in vitro, providing a homogeneous light and distribution in cell culture 96-well plates allowing independent irradiation of each well. The

formed experiments to validate the prototype were rried out on human glioblastoma U87 MG and uroblastoma SH-SY5Y cell lines. Methylene Blue (5 to 0 μ M) was used as the photosensitizer. The cell toxicity is measured in 96-well culture arrays by MTT assay. ie created LED light source facilitates to expose cell ltures with narrow-band irradiation of 635 nm (red light), d tuneable radiation intensity from 0,2 to 1,4 \pm 0,02

mW/cm². The dose of light varies in the experiments according to the time of exposure, for 15 minutes, we have a light dose of 1,260 ±0,14 J/cm², and for 30 minutes, we have a light dose of 2,520 ±0,14 J/cm². Precision control of temperature conditions during the investigation is supplied (D =

E.A. Carreño · A.V.P. Alberto · C.A.M. Souza · L.A. Alves
Cellular Communication Laboratory. Oswaldo Cruz Institute.
Oswaldo Cruz Foundation - FIOCRUZ, Av. Brazil, 4365. Rio de Janeiro, RJ, Brazil

A. Henriques-Pons Laboratory of Innovations in Therapies, Teaching, and Bioproducts. Oswaldo Cruz Institute. Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil.

E. Y. Veslin Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

G.A. Campos Celso Suckow da Fonseca Federal Center for Technological Education - CEFET-RJ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

0,6). Finally, higher doses of MB with exposure to the red LED light achieved significant cytotoxic effects. The Ec50 for SH-SY5Y for 30 minutes of exposition to light was 121,9 µM, and for the neuroblastoma cell line, U87 for 0,2 mW/cm² for 15 minutes was 233,8 µM. Although, the Ec50 with 1,4 mW/cm² for 30 minutes decreased more than a half, 100,6 µM. Overall, our results concluded that the built-in LED light source equipment produces a uniform light flux in 96-well plates due to low S.D in the 2 E.A. Carreño et al.

a series of electronic transitions from the ground state to the singlet state and/or higher energy triplet ([19], [4], [7]). The photodynamic effect initiates the transference of electrons and/or energy from the excited photosensitizer (PS) to a molecule that functions as a substrate (molecular oxygen). Under ideal conditions in a biological system, the rapid and intense oxidative explosion leads to cytotoxic effects by the Reactive Oxygen Species (ROS) generation ([21], [64]). Basically, there are some mechanisms proposed to explain the tumor regression by PDT: cell death (Necrosis, Autophagy, Apoptosis or Necroptosis), injury to the vascular system impairing tumor irrigation and changes in the tumor microenvironment, and, finally the activation of immune system ([14], [35], [35], [3]). PS is administered orally or intravenously for the treatment of tumors of the gastrointestinal tract [41], brain tumors or

ht dose. The dependence of MB toxicity on light dose as evaluated, and significant photodynamic activity was demonstrated. Device plans, electric diagram, and ".STL" files have open-source availability.

Keywords LED Light source · photosensitizer · PDT · Cancer · Open-Source

Introduction

Light has been used in the treatment of many diseases (psoriasis, rickets, vitiligo, and others) in the past by Egyptians, Chinese and Indian civilizations [2]. However, this form of therapy upsurged in Europe, through Koppeiner and colleagues at the beginning of the last century [59], [60]. Thenceforth, Photodynamic Therapy (PDT), the name given to light-based treatments, has been successfully developed to treat diseases in several fields [39], [32].

Under the circumstances, PDT appears as an alternative treatment for cancer with a minimally invasive approach based on the administration (systemic or topical) of a photosensitizing agent ([17], [25]). The incidence of light at a specific wavelength (generally between 600 and 750 nm) excites the photosensitizing molecule that undergoes

bronchopulmonary tumors [40]. For endometrial tumors or bladder carcinoma, they are generally administered by instillation [24], although for the treatment of skin tumors these drugs are often most successful when applied topically [52].

The use of PDT for the treatment of tumor cells presents a number of important advantages to be considered: 1- can be used in different types of cancer, for example, Temoporfina Foscan® (a first-generation photosensitizer) used for the treatment of lung, gastric, prostate and skin cancer [64]; 2- treatment can be repeated in several occasions without producing side effects; 3- it presents low systemic toxicity due to an activated state of the PS in the absence of light; 4- there is selective suppression of tumors with no secondary harmful effect on surrounding healthy tissues [47], and 5- possibility of outpatient treatment, lowering costs, resulting in greater adherence of the patients to the

treatment ([28], [65]). However, PDT still has pitfalls due to the limitations of light penetration into deep tumor tissues, development of skin photosensitivity after treatment, and difficulty in treating metastatic cancers [3].

In addition to the various PSs already approved for use in the clinic by the FDA (United States) and by their counterparts in Asia and Europe, many candidates are currently under development. Therefore, the effort to improve the effectiveness of PDT and expand its use for new cancer treatments has become a major research focus [8], [1]. In this way, chemists, physicists, biologists, engineers, and physicians are constantly seeking to design, synthesize, purify and characterize new compounds to be used as PSs. Although obtaining a reliable evaluation of the efficacy of PDT is highly laborious, requiring considerable effort and time [15]. The process begins with in vitro experiments, which is necessary to study the functional properties in cell culture, as well as defining the concentrations of PS and the dose of optical radiation suitable, to produce the higher performance of photodynamic effect [3].

In the beginning, the first light source exploited for PDT was natural sunlight. Afterward, arc lamps (carbon, xenon) or slide projectors were employed. The spectral output of these light sources was either white light or bounded to a range of wavelengths which coincides with the absorption spectrum of the sensitizer used [66], [62]. The choice of optical parameters for a specific application in PDT is not simple. The wavelength, energy, exposure time and flow rate may be varied and induce a wide range of effects on cells and tissues ([6], [9]) . Treatment of skin with light is probably the most developed application of phototherapy in terms of technology and market growth [22]. In clinical practice,

lamps, incandescent lamps, or light-emitting diodes (LEDs) [30] which cover a vast range of the electromagnetic spectrum (generally from 400 to 1100 nm) [11]. Although, this approach allows the evaluation of a wide variety of PSs (considering radiation spectrum of white light sources broader than the absorption spectrum of PSs) ([64], [1]), the excess of power over the cell culture can lead to an undesirable heating of the cells. Moreover, the possible lateral photochemical reactions can seriously interfere in the interpretation of the

er light systems and LED light sources are generally used for a variety of PDT procedures, taking into account a treatment of internal solid tumors, as well as the treatment of some cutaneous lesions in dermatology [18], [4]. As mentioned, the sources allow the simple transfer of the radiation through flexible optical fibers, likewise within the spectral potential required, with a therapeutic window on the average of 50 nm ([30], [63]). The diometric quantities which are commonly used for characterizing the transmission and absorption of light by optical means, commonly used in photobiology are: "radiance" which is defined as the radiant power incident per unit of area on a surface – having as unit Watt per square meter (W/m^2) and the "radiant exposure", usually stated as "dose" and defined as incident radiant energy per unit area on a given surface - Joule per square meter (J/m^2). However, W/m^2 and J/m^2 units are suitable for radiance and dose comparisons in the case of red-wavelength monochromatic light. ([38], [56], [31], [5]).

For PDT the light source has to dispense sufficient intensity of light, up to 200 mW/cm^2 (up to 150 J/cm^2) for oncologic use and up to 50 mW/cm^2 (up to 40 J/cm^2) for non-oncologic applications [37]. The optical power of the light source must be suitable for the irradiation of areas up to 500 cm^2 , and the intensity delivered to the skin should be as homogenous as possible over the total area irradiated. By employing light in the red-infrared range of the spectrum, the interactions with chromophores of the skin (melanin, hemoglobin) are minimized leading to an adequate penetration of light into skin [57].

On other hand, for in vitro studies many groups use non-laser broadband light sources such as halogen

lamps. The latter leads to an undesired photothermal effect, which could be avoided by using light sources of less than 200 mW/cm^2 . So, for in vitro PDT, a light source has to provide sufficient intensity of light, up to 1 mW/cm^2 (up to 30 J/cm^2) for oncologic indications [1], [42]).

Hence, it is necessary to control the optimal experimental conditions when working with cell culture. In this regard, it is reasonable to use narrowband light sources in the study of photodynamic activity of PSs,

towards higher approximation of the experimental conditions with the conditions in clinical practice. An additional point to be addressed is the search for optimization of resources. Therefore, the trend in screening tests is to use 96-well plates (or more), which allows investigating a more significant number of parameters as well as the conditions in the same experiment [15]. After a detailed review of the literature, we observed that despite the high number of publications evaluating the photodynamic activity of different PSs in vitro, there is no standardization of the lighting systems used in PD. Besides, there is no equipment commercially available in Brazil, exclusive for this purpose. An important fact that impairs the reproducibility of the studies is the lack of a detailed description of the irradiation as much as the variations in the experimental protocols.

Therefore, considering the above, our work aims to describe in detail a prototype of cellular irradiation as well as the protocol of the experiments for validation of a device. Which is a portable light supply equipment with LED technology, to obtain a uniform light flux in 96 well plates, for in vitro PDT studies.

2 Methodology

2.1 Cell Culture

Cell lines of glioblastoma U87 MG (ATCC®HTB-14TM) and neuroblastoma SH-SY5Y (ATCC®CRL-2266TM) were cultured in DMEM-F12 medium (Sigma-Aldrich, Brazil), supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco, USA), 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin (Gibco, USA), according to ATCC recommendations and [33]. For all treatments, when the cells reached 80-90% confluence, they were detached with 0,025% trypsin and 0,4% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) over 1 min, followed by inactivation with fetal bovine serum. All cells were seeded in 96-well plates (Corning, USA) at density of 1x10⁴/well, incubated over 48 h at 37°C in 5% CO₂. The Methylene Blue photosensitizer (Merck, Darmstadt, Germany) was

4 E.A. Carreño et al.

dissolved in ultrapure water (Purelab Ultra; ELGA, Oodridge, IL, USA) to final concentration of 10 mM, stored at 4°C, and protected from light before use [10]. Cells were kindly provided by the Laboratório de imunofarmacologia, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ (Brazil).

2 Photodynamic Prototype: a red light irradiation device for in vitro cell assay

The prototype was specially designed for the photodynamic experiments in 96 well plates. The temperatures inside the wells were maintained at 36,5°C. The structures, as well as the figures described in the results section, were made in SolidWorks 2016 software. Then, a portable light supply equipment with LED technology was designed to obtain a uniform light flux in 96 well plates, for in vitro PDT studies. The equipment is made up of a 96 red LED plate shaped as 12 columns and 8 rows corresponding to the 96-well plate configuration of variable light intensity (0,2 to 1,4 W/cm²); the control unit is a source of power with a fine control of power control. Additionally, the temperature control was included by fans in the drawing (Fig. 1).

We also did some experiments with a halogen red light 40V DC, constructed at the top of an insulated box, in which a standard plate can be positioned at its use (Supplementary Fig. 1). The illumination power is regulated from 9 to 23 mW/cm² using an external manual controller. As the system is closed, it can accumulate heat raising the internal temperature in a short time; then a ventilation system was integrated to ensure prolonged exposure of the cells without damage.

3 Evaluation of cytotoxicity by the MTT reduction method

Standardizations of experimental conditions were defined for each cell line. After each experimental condition, the medium was withdrawn and 20 µL of MTT salt (5 mg/mL, Sigma®, Brazil) was added. Cells were incubated for 3 h. Then, the

Fig. 1 The structural configuration of the in vitro cell irradiation system (Prototype 1). Each LED illuminates one of the 96 wells of the plate, radiating red light with constant power in each test. The wavelength and the potency of the prototype is 635 nm, $1,4 \pm 0,02$ mW/cm², respectively. Two fans were adapted to the control of the temperature. Size is shown in millimeters.

medium was removed and 100 μ L of dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma®, Brazil) was added for the crystals solubilization. Absorbance was measured on the plate reader (Spectramax 190, Molecular Devices, CA, USA) at 570 nm [46]. The absorbance obtained from untreated control cells was averaged and considered as 100% cell viability. Absorbance readings from test samples must then be divided by those of the control and multiplied by 100, to give percentage cell viability [49].

2.4 Intrinsic cytotoxicity assay (in the dark) of methylene blue

Cells were incubated at different concentrations of MB (1 to 400 μ M) in the absence of light at 37°C to assess intrinsic MB toxicity during 15, 30 and 60 min. Cell viability was determined by the MTT reduction method [49].

2.5 Photodynamic evaluation of methylene blue

Cells were incubated at different concentrations of MB (5 to 400 μ M) and then, exposed to red LED light (1,4- 23

mW/cm²) for different time periods (3, 6, 11, 15 and 30 min). Cell viability was determined by the MTT reduction method. The same protocol was used for experiments with the halogen light, although with different times of exposure.

3 Statistical analysis

The result of each experiment is shown as the mean \pm SD. Data represent means of at least three independent experiments in triplicate. To test if the results fit a Gaussian distribution, the D'Agostino-Pearson normality test was adopted. If the data fit a Gaussian distribution, we used a parametric test ANOVA with Bonferroni post hoc test; if not, a nonparametric test (Kruskal-Wallis) with Dunn post hoc was used. Tests were two-tailed. The tests used are specified in each figure legends. Differences are considered significant at P values <0,05. Statistical and graphical analyses were performed using Graph Pad Prism version 7.00 for Windows (GraphPad Software, San Diego, California, USA).

RESULTS

3.1 Photodynamic light irradiation

As described, we searched for specific equipment's to use in PDT, although we observed various data with different methodologies and equipment's of light. So, we asked whether a new prototype construction specific for PDT would be helpful to standardize the tests in the laboratory. We considered designing a new apparatus based in LED technology with individual good irradiation (Prototype - Fig. 1), thus providing effective irradiation of multiwell plates. A LED light source comprising a plug-in LED array, a control unit and a thermostat was developed (Fig. 1). 96 identical small-size light-emitting diodes for surface mounting (High Power Lighting Corporation, Taiwan) with a 5 mm base and a consumed power of 3 mW/cm² were used for the apparatus. An effective collection of radiation and formation of a narrow (25°) radiation pattern for miniature array elements. A built-in heat sink permits temperature control (Fig. 1). LEDs characteristics is: input 3 to 3,3 V DC; lightness 8.000 mcd - 12.000 mcd; maximum current 20 mA; length: 37 mm e weight: 0,3 g. The irradiance wavelength of the prototype was 635 nm with a potency of 1,4 ± 0,02 mW/cm² (mean ±SD). The dose of light varies in the experiments according to the time of exposure. So, for 15 minutes, we have a light dose of 1,260 ±0,14 J/cm², for 30 minutes, we have a light dose of 2,520 ±0,14 J/cm² (Table 1). The temperature during all the tests was kept constant at 24 oC (Δ°C = 0,6). The electronic circuitry of the LED array can be observed in Fig. 2 .

well plates could be helpful to standardize the tests in the laboratory. We considered designing a new apparatus based in LED technology with individual good irradiation (Prototype - Fig. 1), thus providing

Table 1 Characteristics of the photodynamic prototype

Wavelength (nm)	Exposure time (min)	Light power (mW/cm ²)	Dose (mJ/cm ²)	Temperature (Δ°C)
635	15	1,4 ±0,02	1,260 ±0,14	0,6
635	30	1,4 ±0,02	2,520 ±0,14	0,6

Data are expressed as mean ±SD

effective irradiation of multiwell plates. A LED light source comprising a plug-in LED array, a control unit and a thermostat was developed (Fig. 1). 96 identical small-size light-emitting diodes for surface mounting (High Power Lighting Corporation, Taiwan) with a 5 mm base and a consumed power of 3 mW/cm² were used for the apparatus. An effective collection of radiation and formation of a narrow (25°) radiation pattern for miniature array elements. A built-in heat sink permits temperature control (Fig. 1). LEDs characteristics is: input 3 to 3,3 V DC; lightness 8.000 mcd - 12.000 mcd; maximum current 20 mA; length: 37 mm e weight: 0,3 g. The irradiance wavelength of the prototype was 635 nm with a potency of 1,4 ± 0,02 mW/cm² (mean ±SD). The dose of light varies in the experiments according to the time of exposure. So, for 15 minutes, we have a light dose of 1,260 ±0,14 J/cm², for 30 minutes, we have a light dose of 2,520 ±0,14 J/cm² (Table 1). The temperature during all the tests was kept constant at 24 oC (Δ°C = 0,6). The electronic circuitry of the LED array can be observed in Fig. 2 .

Fig. 2 A simplified schematic of the electronics of the LED array. The DC power supply connection is on the left side. The system is powered directly from an AC current point; the right current electric power is obtained from two electric transformers with 12 V and 24 V sources to feed the electrical devices. To ensure a constant supply of 1 A current to the LEDs a 24 V dual power regulator of 24 and -24 V was used at the terminals. At the same time, a regulated tension of 5 V voltage is used to control the illumination intensity through the potentiometer.

We also performed some experiments through a halogen lamp with power of 26,5 ±2,8 mW/cm² (mean ±SD). The dose of light varies in the experiments according to the time of exposure. So, for 3 minutes, we have a light dose of 4,77 ±0,51 J/cm². For 6 minutes, we have a light dose of 9,55 ±1,02 J/cm². Finally, at 11 minutes, we have a light dose of 17,51 ±1,87J/cm² (supplementary Table 1). The potencies obtained by both types of equipment approximate to those used in photodynamic studies and described in the literature ranging from 3,2 to 42 mW and 6 to 80 J/cm². [51].

nes tested (Fig. 3).

3.2 Evaluation of methylene blue as a PS

We choose the MB as a photosensitizer since this molecule is very cheap, has the pharmacokinetic described and is approved by the FDA to treat some diseases [53]. Firstly, we tested the intrinsic cytotoxicity of MB, and for that, we used the neuroblastoma cell line SH-SY5Y and the glioblastoma cell line U87 cell lines (Fig. 3). We investigated MB toxicity at concentrations ranging from 1 to 400 μM after different incubation times, 30 and 60 min for SH-SY5Y cells and 15, 30 and 60 min for U87 cells according to [46]. After the incubation (30 and 60 min), significant toxicity at doses of 150 to 400 μM MB is observed, when compared to the negative control (cells without MB), in SH-SY5Y. In contrast, in U87, toxicity is observed exclusively at a dose of 400 μM in all

6 E.A. Carreño et al.

3.3 Phototoxic plate prototyp

Next, to establish the inherent toxicity of red LED light, 37 and SH-SY5Y cells were seed in 96 well plates and after this period, the culture medium was changed, and exposed to the red LED light (630-670 nm), 1,4 mW/cm^2 different times (Fig. 4). According to expectation, the radiation does not show any significant cytotoxic effect under the conditions tested. The halogen red light, with a higher potency compared to the LED apparatus, did not alter the viability for both cell types (Supplementary Fig. 1).

[a]

[b]

Fig. 3 Intrinsic cytotoxicity assay (in the dark) of methylene blue. Cells were incubated with MB at concentrations from 1 to 400 μM , at different incubation times, 30 and 60 min for (a) U87 cells and 15, 30 and 60 min for (b) SHSY5Y cells. Viability cells were determined. The data were normalized as a function of the negative control treatment (CN = cells without MB). Homogeneity of variance was determined by Bartlett's test. Subsequently, we performed the Kruskal-Wallis test, followed by Dunn post-test. Data are expressed as mean \pm SD, n = 9. (***) P < 0,0001 compared to CN; ns = not significant. Representative results from at least three independent experiments performed in triplicate, ns = not significant.

Title Suppressed Due to Excessive Length 7

[a]

Fig. 4 Effect of irradiation with a red light on cell lines. Cell lines were exposed to the red LED light (630 - 660 nm), 1,4 mW/cm² at different times. Viability was determined immediately after treatment by the MTT assay. The results show the cell viability for (a) SH-SY5Y and (b) U87. Treatment with light under these conditions does not produce a significant toxic effect. The data were normalized as a function of the negative control treatment (CN = cells without light). To the normality test, was performed D Agostino-Pearson s test. Subsequently, the Mann-Whitney test was used, for SH-SY5Y cells; and for U87 cells, was performed using the Bartlett's test for homogeneity of variance. Subsequently, the ANOVA test was used, followed by the Tukey s post-test (***P* < 0,05). Data are expressed as mean ±SD. Representative results from at least three independent experiments performed in triplicate, ns = not significant.

3.4 Evaluation of the PDT devices: use of MB as PS

The next step was to validate the prototype for the use in photodynamic experiments with MB. Thus, SH-SY5Y and U87 cells were incubated for 30 min with increasing concentrations of MB (from 5 μM to 400 μM). Further, the culture medium was exchanged, and exposed to red light. Viability was assessed immediately after treatment (Figure 5).

The cytotoxic effect depends directly on the concentration of MB used as well as the exposure time (Figures 5A and 5B). Thus, higher doses of MB with longer exposure time to the red LED light, achieved significant cytotoxic effects. The EC_{50} for SH-SY5Y for 30 minutes of exposition to light was 121,9 μM and for the neuroblastoma cell line U87 for 0.2 mW/cm^2 for 15 minutes was 233,8 μM that was not so different from the same intensity with the exposition of 30 minutes (226,1 μM). Although, the EC_{50} with 1,4 mW/cm^2 for 30 minutes decreased more than a half, 100,6 μM . The same conclusion was evident when compared to the EC_{50} values, for SH-SY5Y cells, a reduction in response to the photodynamic treatment with halogen light irradiance of 18-23 mW/cm^2 for 3 and 6 min (218,7 μM and 156,3 μM , respectively) was observed, when compared to the values of EC_{50} obtained for MB treatment without exposure to red light (307,2 μM). In the case of the human glioblastoma strain, U87 a reduction in similar terms was observed. Since the value of the EC_{50} in response to photodynamic treatment with a light output of 18-23 mW/cm^2 for 6 min was estimated at 358 μM , while the result obtained for treatment with MB without light was 130,7 μM (data not shown). Similar photodynamic studies with MB refer to the same effects [20], [46].

4 DISCUSSION

Evaluations of photopharmaceutical compounds, in general, are based on achieving reproducible cytotoxicity tests under controlled irradiation with light at a specific wavelength [26]. There are many devices available on the market for performing photodynamic therapy (PDT) in the clinic, especially for dermatological applications ([27],

[3], [44]). However, *in vitro* cell testing is still necessary to develop devices that can attend the particular conditions of each assay. Thus, to improve the specificity of light irradiation, we built a prototype specially designed for *in vitro* 96 well plate assays.

Our prototype provides an adjustable power from 0,2 up to 1.4 $\pm 0,02$ mW/cm^2 . It can be used continuously for different time intervals, without increasing the light power and without increasing the temperature ($\Delta \pm 0.6$ $^{\circ}\text{C}$), so that allows the recommended doses for PDT (1,5 to 30 J/cm^2) by increasing the exposure time to the light. As well, it is small (14,8 x 9,7 cm), when it is compared to other similar equipment, which facilitates its transport, and can even be introduced into the cell incubator, if necessary. However, when compared to other contemporary equipment (2010 to 2016) and similar technologies (LED technology), it is evident that our prototype provides a higher light output, determined by their construction, as it was made with 5 mm diameter LED sources with a maximum power of 3 mW (12.000 mcd), which are the highest brightness currently marketed in Brazil. LED's diameter specs allow an 8X12 design that matches each source with the 96 wells of the culture plate. Furthermore, our prototype has been specially designed to facilitate its continuous improvement so that when more powerful LED light sources are available in the Brazilian market, they can be easily changed; as a result, the equipment can be easily improved.

Current constructed devices Butler et al. (2010) [2], offers light at different wavelengths and with an adjustable power between 10,2 and 44,1 mW/cm^2 , which is considerably higher than the light power supplied in our prototype. Hopkins et al. (2016) [26], designed a three-channel fixed irradiation equipment for three different wavelengths, corresponding to blue, green, and red; having the latter a power of 34,4 ± 1.7 mW/cm^2 (not adjustable). Shilyagina et al. (2014) [54] proposed a dual-wavelength LED light source (590 and 625 nm) and irradiation intensity with a maximum power of up to 90 mW/cm^2 , precise control of temperature conditions, and power instability of light is less than 1%. Finally, De Bôer et al., (2014) [16] designed a prototype for Photodynamic Immunotherapy (FIT) that ensures homogeneous

illumination over an area of 5x3 cm using 126 individual LED lamps with a tunable power source that allows to provide a power between 20 and 200 mW/cm².

Additionally, the fact that the equipment provides light at lower power is an advantage, as the equipment can be used to PS screening that requires small doses of energy to produce an efficient photodynamic effect. Also, it can be used to test the

Title Suppressed Due to Excessive Length 9

part of the PS conjugation with nanoparticles [5], or to test other photodynamic effect enhancing agents. Additionally, our proposal provides equipment the printing plans (included in the supplementary material), to be quickly printed with 3D technology in each lab as needed.

The basic requirements for light sources used PDT are first to encompass the region of the

[a]

Fig. 5 Photochemical test of methylene blue in cells lines. For this experiment (a) U87 cells (1x10⁴) and (b) SH-SY5Y cells (1x10⁴) were plated in 96-well plates and maintained for 48 h at 37°C and 5% CO₂. Cells were incubated with MB at concentrations from 5 to 400 µM, after 30 min of incubation the cells were subjected to the red LED light. Viability was determined immediately after the photodynamic treatment. The data were normalized as a function of the negative control treatment (CN = cells without MB). To test the homogeneity of variance, we used the Bartlett's test. Kruskal-Wallis test was performed, followed by Dunn post-test. Data were expressed as mean ± standard deviation (a) and as mean ± SEM (b). Representative results of three independent experiments performed in triplicate. (***) P < 0,05 compared to CN; ns = not significant.

[b]

10 E.A. Carreño et al.

ideal or maximum absorption wavelength of the PS. Depending on the structure, PSs with absorbance bands between 600 and 800 nm can be synthesized, since the penetration of light into the tissue increases with the wavelength [50], [24]. For example, protoporphyrin IX, one of the most used PS, has two major absorption peaks at 404-420 nm and 635 nm, corresponding to the blue and red regions of the visible spectrum, respectively ([29], [21], [58], [36]). In contrast, the PS (MB) used in this study, has maximum absorptions at 668 and 609 nm, perfectly matching with the emission wavelength of the red LEDs used in the manufacture of the prototypes, designed in this study [61], [53], [23].

The use of LEDs offers a number of benefits that deserve to be considered: firstly, low noise compared

other commonly used light sources such as halogen discharge lamps and white incandescent lamps. Secondly, they are an economical alternative. Finally, they exhibit a characteristic spectrum of monochromatic light [10]. On the other hand, the excessive energy applied by sources other than LEDs may give rise to undesirable cell heating as well as secondary photochemical reactions, which may hinder the interpretation of the results. In other words, cell death by heating may be falsely attributed to the effect of ROS production by FS.

Similarly, lasers have the advantage of producing monochromatic light, thus combining exactly with the absorption range of the FS, thus being able to avoid excessive heating. However, they present some important drawbacks such as volume and are costly. In

addition, the irradiation area is limited, requiring the light beam to be evacuated to treat larger areas [18].

On the other hand, when comparing the results obtained in our MB PDT trials with the literature data, it is evident that cancer cells can present different responses to PS. To this extent, in J774.G8 cells, after incubation for 15 min with MB, show cytotoxicity at doses of 75 and 100 μM MB [46]. However, Freitas et al. described a study made with cervical cancer cells using significantly cytotoxic doses (above 156.4 μM) for the HaCaT cell line and 39,1 μM for SiaH, after 20 min incubation with MB [20]. Finally, [23] reported that doses lower than 100 μM MB do not show toxicity in osteosarcoma cells (UMR106) after 1 h incubation [23]. However, through our assays, it was verified that, regardless of incubation time, MB showed no toxicity at the doses generally used in PDT (1 to 100 μM) in both U87 human glioblastoma cells and SH-SY5Y human neuroblastoma cells. This result was already expected since MB presents relative safety regarding toxicity ([13], [45], [48]).

Therefore, as expected, irradiation at these specific wavelengths do not exhibit any significant cytotoxic effect under the conditions tested. Similar results are reported in the literature, for example, those reported by Hopkins et al. After illuminating different cancer cell lines (A375, A431, A549, MCF7, MDA-MB-231, U-87 MG) for 5, 10, 15 and 30 min with 34,4 mW/cm^2 found no significant differences in cell viability.

5 CONCLUSION

Overall, our results concluded that the built-in LED light source equipment produces a uniform light flux in 96-well plates with precision control of the temperature conditions. The dependence of MB toxicity on light dose was evaluated and significant photodynamic activity was demonstrated.

6. Anderson RR, Parrish JA (1981) The Optics of Human Skin. *Journal of Investigative Dermatology* 77(1):13–19, DOI 10.1111/1523-1747.EP12479191 7. Bacellar IO, Tsubone TM, Pavani C, Baptista MS (2015) Photodynamic efficiency: From molecular photochemistry to cell death. DOI 10.3390/ijms160920523 8. Baldea I, Filip aG (2012) Photodynamic therapy in melanoma—an update. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society* 63(7):109–18, URL

ates with precision control of the temperature conditions. The dependence of MB toxicity on light dose was evaluated and significant photodynamic activity was demonstrated.

In summary, the results described in this study show that the designed and constructed LED light source equipment produces uniform and adjustable light flux compatible with 96-well plates. Thus, ensuring the provision of adequate conditions for the development of future in vitro photodynamic action study.

References

1. Abrahamse H, Hamblin MR (2016) New photosensitizers for photodynamic therapy. *The biochemical journal* 473(4):347–64, DOI 10.1042/BJ20150942
2. Ackroyd R, Kelty C, Brown N, Reed M (2001) The history of photodetection and photodynamic therapy. *Photochemistry and photobiology* 74(5):656–69, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11723793>
3. Agostinis P, Berg K, Cengel KA, Foster TH, Girotti AW, Jollnick SO, Hahn SM, Hamblin MR, Juzeniene A, Kessel D, Korbelik M, Moan J, Mroz P, Nowis D, Piette J, Wilson BC, Golab J (2011) Photodynamic therapy of cancer: An update. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 61(4):250–281, DOI 10.3322/caac.20114
4. Allison RR, Moghissi K (2013) Photodynamic Therapy (PDT): PDT Mechanisms. *Clinical endoscopy* 46(1):24–9, DOI 10.5946/ce.2013.46.1.24
5. Alves, LA and Ferreira, LGB and Pacheco, PAF and Carreño EA and Teixeira, PCN and Faria, RX (2017) Pore forming channels as a drug delivery system for Photodynamic Therapy in Cancer associated with Nanoscintillators. *Oncotarget* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22653896>
6. Barolet (2008) Light-Emitting Diodes (LEDs) in Dermatology. *Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery* 4(4):227–238, DOI 10.1016/j.sder.2008.08.003, S1545-9576(08)70033-4
7. Blázquez-Castro A, Stockert JC, Sanz-Rodríguez F, Zamarrón A, Juarranz A, Schick E, Giner R, Villanueva A, Fedorocko P, Esteller M, Juarranz A (2009) Differential photodynamic response of cultured cells to methylene blue and toluidine blue: role of dark toxic processes. *Photochemical & Photobiological*

- Sciences 8(3):371, DOI 10.1039/b818585a, URL <http://xlink.rsc.org/?DOI=b818585a>
11. Brancalion L, Moseley H (2002) Laser and non-laser light sources for photodynamic therapy. *Lasers in Medical Science* 17(3):173–186, DOI 10.1007/s101030200027
12. Butler MC, Itotia PN, Sullivan JM (2010) A high-throughput biophotonics instrument to screen for novel ocular photosensitizing therapeutic agents. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 51(5):2705–2720, DOI 10.1167/iovs.08-2862
13. Castano AP, Demidova TN, Hamblin MR (2005) Mechanisms in photodynamic therapy: Part three - Photosensitizer pharmacokinetics, biodistribution, tumor localization and modes of tumor destruction. DOI 10.1016/S1572-1000(05)00060-8
14. Castano AP, Mroz P, Hamblin MR (2006) Photodynamic therapy and anti-tumour immunity. *Nature Reviews Cancer* 6(7):535–545, DOI 10.1038/nrc1894, URL <http://www.nature.com/doi/finder/10.1038/nrc1894>, NIHMS150003
15. Chen YC, Lou X, Zhang Z, Ingram P, Yoon E (2015) High-Throughput Cancer Cell Sphere Formation for Characterizing the Efficacy of Photodynamic Therapy in 3D Cell Cultures. *Scientific reports* 5(July):12,175, DOI 10.1038/srep12175
16. De Boer E, Warram JM, Hartmans E, Bremer PJ, Bijl B, Crane LM, Nagengast WB, Rosenthal EL, Van Dam GM (2014) A standardized light-emitting diode device for photoimmunotherapy. *Journal of Nuclear Medicine* 55(11):1893–1898, DOI 10.2967/jnumed.114.142299
17. Dougherty TJ, Gomer CJ, Henderson BW, Jori G, Kessel D, Korblick M, Moan J, Peng Q (1998) Photodynamic Therapy. *Journal of the National Cancer Institute* 90(12):889–905, DOI 10.1093/jnci/90.12.889
18. Ericson MB, Wennberg AM, Larkö O (2008) Review of photodynamic therapy in actinic keratosis and basal cell carcinoma. *Therapeutics and Clinical Risk Management* 12 E.A. Carreño et al.
- Society for Photobiology 15(5):644–653, DOI 10.1039/c5pp00424a
27. Huang Z (2005) A review of progress in clinical photodynamic therapy. *Technology in cancer research & treatment* 4(3):283–93, DOI 10.1177/153303460500400308
28. Juarranz A, Jaén P, Sanz-Rodríguez F, Cuevas J, González S (2008) Photodynamic therapy of cancer. Basic principles and applications. *Clinical and Translational Oncology* 10(3):148–154, DOI 10.1007/s12094-008-0172-2, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18321817>, NIHMS150003
29. Juz P (2005) History and basic principles of photodynamic therapy (PDT). Oslo, Norway, URL <http://radium.no/moan>
30. Juzenas P, Ma V, Moan J, Juzeniene A, Iani V (2004) Effectiveness of different light sources for 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy. *Lasers in Medical Science* 19(3):139–149, DOI 10.1007/s10103-004-0314-x
31. Kilik M, Mahlapuu R, Soomets U, Langel U (2009) Analysis in vitro toxicity of five cell-penetrating peptides by metabolic profiling. *Toxicology* 265(3):87–95, DOI 10.1016/j.tox.2009.09.016
32. Kostron H, Hasan T (2016) DEFINITION OF TYPE I and TYPE II PHOTOSENSITIZED OXIDATION. *Photochemistry and Photobiology* 54(5):659–659, DOI 10.1111/j.1751-1097.1991.tb02071.x
20. de Freitas LM, Soares CP, Fontana CR (2014) Synergistic effect of photodynamic therapy and cisplatin: A novel approach for cervical cancer. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 140:365–373, DOI 10.1016/j.jphotobiol.2014.08.021
21. García-Fresnadillo (2005) Fotosensibilización y el sensibilizador: síntesis propiedades y limitaciones. *Solar Safe Water* pp 217–242
22. Grand View Research (2017) Phototherapy Equipment Market Size — Industry Report, 2018-2025. DOI Report ID: GVR-1-68038-701-8
23. Guan J, Lai X, Wang X, Leung AW, Zhang H, Xu C (2014) Photodynamic action of methylene blue in osteosarcoma cells in vitro. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 1(1):13–19, DOI 10.1016/j.pdpdt.2013.09.003, URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.pdpdt.2013.09.003>
24. Hamblin MR, Huang YY (2013) Handbook of Photomedicine
25. Hamblin MR, Hasan T, Dougherty TJ, et al (2004) Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochemical & Photobiological Sciences* 3(5):436, DOI 10.1039/b311900a, URL <http://xlink.rsc.org/?DOI=b311900a>
26. Hopkins SL, Ewert B, Askes SHC, Veldhuizen P, Zwier R, Heger M, Jonnet S (2016) An in vitro cell irradiation protocol for testing photopharmaceuticals and the effect of blue, green, and red light on human cancer cell lines. *Photochemical & Photobiological Sciences: Official Journal of the European Photochemistry Association and a European*

Photodynamic

- Medicine. DOI 10.1039/9781782626824 33.
- Kovalevich J, Langford D (2013) Considerations for the use of SH-SY5Y neuroblastoma cells in neurobiology. *Methods in Molecular Biology* 1078:9–21, NIHMS150003
34. Lee Y, Baron ED (2011) Photodynamic therapy: current evidence and applications in dermatology. *Semin Cutan Med Surg* 30(4):199–209, DOI 10.1016/j.sder.2011.08.001, URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.sder.2011.08.001>
35. Lovell JF, Liu TWB, Chen J, Zheng G (2010) Activable photosensitizers for imaging and therapy. *Chemical Reviews* 110(5):2839–2857
36. Lucky SS, Soo KC, Zhang Y (2015) Nanoparticles in photodynamic therapy. DOI 10.1021/cr5004198
37. Mang TS (2008) Dosimetric concepts for PDT. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 5(3):217–223, DOI 10.1016/j.pdpdt.2008.09.006
38. Marijnissen JPA, Star WM (1987) Quantitative light dosimetry in vitro and in vivo. *Lasers in Medical Science* 2(4):235–242, DOI 10.1007/BF02594166
39. Moan J, Peng Q (2003) An outline of the hundred-year history of PDT. *Anticancer research* 23(5A):3591–600, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14666654>
40. Moghissi K, Dixon K, Gibbins S (2015) A Surgical View of Photodynamic Therapy in Oncology: A Review. *The Surgery Journal* 01(01):e1–e15, DOI 10.1055/s-0035-1565246
41. Nanashima A, Nakashima K, Kawakami H, Ashizuka S, Kubota Y (2017) Nursing care management of photodynamic therapy in digestive tract carcinomas at a single cancer center. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 17(January):221–225, DOI 10.1016/j.pdpdt.2017.01.001, URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.pdpdt.2017.01.001>
42. Navaeipour F, Afsharan H, Tajalli H, Mollabashi M, Ranjbari F, Montaseri A, Rashidi MR (2016) Effects of continuous wave and fractionated diode laser on human fibroblast cancer and dermal normal cells by zinc phthalocyanine in photodynamic therapy: A comparative study. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 161:456–462, DOI 10.1016/J.JPHOTOBIO.2016.06.017
43. Noro Filho GA, Casarin RCV, Casati MZ, Giovani EM (2012) PDT in non-surgical treatment of periodontitis in HIV patients: A split-mouth, randomized clinical trial. *Lasers in Surgery and Medicine* 44(4):296–302, DOI 10.1002/lsm.22016, URL <http://doi.wiley.com/10.1002/lsm.22016>
44. Oniszczyk A, Wojtunik-Kulesza KA, Oniszczyk T, Asprzak K (2016) The potential of photodynamic therapy (DT)—Experimental investigations and clinical use. DOI 10.1016/j.biopha.2016.07.058
45. Oz M, Lorke DE, Asan M, Petroianu GA (2011) Cellular and molecular actions of Methylene Blue in the nervous system. *Medicinal Research Reviews* 31(1):93–117, DOI 10.1002/med.20177
46. Pacheco PAF, Ferreira LBG,endonça L, Ferreira DNM, Salles JP, Faria RX, Teixeira DN, Alves LA (2016) P2X7 receptor as a novel drug delivery system to increase the entrance of hydrophilic drugs into cells during photodynamic therapy. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 48(4):1–15, DOI 10.1007/s10863-016-9668-6, URL <http://dx.doi.org/10.1007/s10863-016-9668-6>
47. Alumbo G (2007) Photodynamic therapy and cancer: a brief sightseeing tour. *Expert opinion on drug delivery* 2(2):131–48, DOI 10.1517/17425247.4.2.131, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17335411>
48. Prates A, Kato IT, Ribeiro MS, Tegos GP, Hamblin MR (2011) Influence of multidrug efflux systems on methylene blue-mediated photodynamic inactivation of *Candida albicans*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*