

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**INSTITUTO DE QUÍMICA**  
**Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas**  
**(Bioquímica)**

**NAYRA FERNANDES SANTOS**

**Relação entre estresse oxidativo fotoinduzido e morte  
celular autofágica**

Versão corrigida da dissertação defendida conforme Resolução CoPGr 5890  
O original se encontra disponível na Secretaria de Pós-Graduação do IQ-USP

**Orientador: Prof. Dr. Mauricio da Silva Baptista**

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

**17/01/2014**

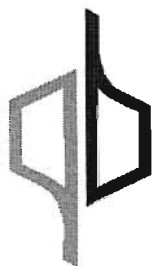
NAYRA FERNANDES SANTOS

**Relação entre estresse oxidativo fotoinduzido e morte  
celular autofágica**

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

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

São Paulo  
2014



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE QUÍMICA

**“Relação entre estresse oxidativo fotoinduzido e morte celular autofágica”**

**NAYRA FERNANDES SANTOS**

Dissertação de Mestrado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestra em Ciências - Área: Bioquímica.

Aprovado (a) por:

---

**Prof. Dr. Maurício da Silva Baptista  
(Orientador e Presidente)**

---

**Profa. Dra. Alicia Juliana Kowaltowski  
IQ - USP**

---

**Profa. Dra. Martha Simões Ribeiro  
IPEN**

**SÃO PAULO  
10 de abril de 2014**

***Aos meus pais, Natalina e José Carlos, pelo incentivo,  
apoio e amor incondicional***

***Ao meu irmão, Gregório, pelo afeto que nos une.***

## **AGRADECIMENTOS**

À DEUS que todos os dias, por mais que me desviasse, vacilasse, ou insistisse nos caminhos tortuosos, Ele sempre esteve presente me guiando e me protegendo.

Ao Prof. Dr. Mauricio Baptista pela orientação, apoio e por sempre acreditar no meu potencial, meu inestimável respeito e admiração.

À amiga-mãe Waleska com quem eu sempre pude contar nos momentos de alegria, de trabalho, de dificuldade e de superação, por me ajudar e torcer por mim sempre.

Às amigas e companheiras Darlene e Ancely, pelos momentos de conversa, de risada, de estudo, de trabalho, de ajuda mútua e de aprendizado.

Aos meus amigos Orlando, Alan e Divino, pela amizade, pela ajuda e apoio nos momentos que mais precisei.

Às amigas Ana e Cleide pela amizade verdadeira, pelo carinho, apoio, companheirismo, por contribuírem para minha vitória nessa jornada.

Às amigas Chris e Alê por sempre disponibilizarem um tempo para me ajudar, ouvir, auxiliar e aconselhar.

Aos amigos do grupo do Mau que se foram ou ainda estão no laboratório: Mariana, Isabel, Raul, Dani, Tayana, Alê, Alice, Paty, Décio, Natália, Helena, Tiago, André, Leticia, Pâmela, Melany, Michele, Adjaci e Gabriel, pelas colaborações na hora do trabalho e na hora da diversão.

Aos docentes, técnicos, e secretários do IQ-USP, em especial ao Décio, Adriana, Wilton e Edson.

À Prof. Dr<sup>a</sup> Beatriz Stolf e sua equipe pelo apoio experimental.

À minha grande família: pai, mãe, irmão, tios, tias, primos e primas e em especial à minha avó, que me deixou a lição de que para toda vitória exige luta.

Aos amigos que fiz em São Paulo e aos amigos que deixei, mas não os esqueci, em Minas Gerais, no Espírito Santo e no Rio de Janeiro.

À CAPES, ao CNPq e à FAPESP pelo financiamento da pesquisa.

*"Sempre que me batem o desânimo, a desesperança e o temor, procuro me desvencilhar destes sentimentos, lembrando que, lá no final, está um sonho muito maior que o meu. Está o sonho de Deus."*

*Ivna Sa*

## RESUMO

Santos, N.F. **Relação entre estresse oxidativo fotoinduzido e morte celular autofágica.** 2014. 100p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

A Terapia Fotodinâmica (TFD) é uma modalidade terapêutica promissora que tem mostrado resultados clínicos efetivos, além de custo benefício favorável ao sistema de saúde. Embora a TFD esteja associada à indução de morte celular por necrose e, ou apoptose, pesquisas recentes comprovam a ativação da autofagia. Visando entender a relação entre a quantidade de espécies reativas de oxigênio (EROs), produzidas após fotoativação dos fotossensibilizadores (FSs), com a indução de morte autofágica, foram utilizados os FSs fenotiazínicos estruturalmente semelhantes, azul de metileno (MB) e 1,9-dimetil azul de metileno (DMMB); as linhagens celulares HeLa e HaCat, como modelos biológicos e LEDs emitindo em 633 nm, como fonte luminosa.

Os ensaios de viabilidade em função da dose de luz e da concentração dos FSs verificaram que o aumento de morte celular está diretamente relacionado ao aumento da concentração e ao aumento da dose de luz, para ambos FSs. Verificou-se que nas condições de IC<sub>50</sub> a concentração do DMMB (10 nmol/L) é menor que a do MB (2,0 µmol/L) em duas ordens de grandeza, e essa diferença também se reflete no grau de desbalanço oxidativo gerado após fotossensibilização.

Foi verificado que para o MB, a elevada geração de EROs está fortemente correlacionada com a perda de viabilidade, enquanto que para o DMMB essa correlação é fraca, uma vez que há perda de sobrevivência sem grandes gerações de EROs. No entanto, a diminuição de sobrevivência causada pelo DMMB se correlaciona forte e significativamente ao aumento da autofagia, indicando ocorrência de morte celular autofágica tanto em células

HaCaT quanto em células HeLa. As análises de dano em organelas indicaram que ambos FSs, após serem fotoativados, causam danos em lisossomas e em mitocôndrias de células HaCaT. E confirmou-se, por ensaio de localização subcelular, que ambos FSs estão nessas organelas.

Uma vez que a localização subcelular do FS influencia no mecanismo de morte celular fotodesenvolvido, verificou-se que o MB nas mesmas concentrações nanomolares do DMMB não induz autofagia, pois o mesmo encontra-se fotoquimicamente inativo nas mitocôndrias, devido à redução pelas coenzimas presentes nesta organela. O DMMB possui um potencial de redução menor que o MB, o que impede a redução deste FS nas mitocôndrias, e, mesmo em baixas concentrações, o DMMB é capaz de comprometer a integridade de mitocôndrias e lisossomas, e induzir autofagia como um mecanismo de morte celular. As condições em que o MB não se encontra totalmente reduzido no ambiente celular são em concentrações mais elevadas, nas quais a geração do nível de estresse oxidativo é maior e não se observa resposta autofágica após fotossensibilização.

Esses resultados mostram que a eficiência de morte celular causada por TFD não está necessariamente relacionada ao nível de estresse oxidativo gerado, uma vez que o DMMB induziu estresse oxidativo em menor extensão do que MB e, no entanto, induziu morte celular em maior extensão. Confirmou-se o conceito de que, fotossensibilizadores mais eficazes para a TFD devem resultar da melhoria na especificidade das reações de fotossensibilização nos alvos celulares e não apenas em melhoria na eficiência de geração de EROs.

**Palavras-chave:** Terapia Fotodinâmica, TFD, 1,9-dimetil azul de metileno, Espécies Reativas de Oxigênio, Autofagia.



## ABSTRACT

Santos, N.F. Relationship between photoinduced oxidative stress and autophagic cell death. 2014. 100p. Masters Thesis - Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Photodynamic Therapy (PDT) is a promising therapeutic modality that has shown effective clinical outcomes and benefits in terms of costs to the national health system. Although PDT is associated with induction of cell death by necrosis or apoptosis, recent data suggest the activation of autophagy. In order to understand the relationship between reactive oxygen species (ROS), generated after light activation of photosensitizers (PSs), and the autophagic cell death induction, we have used two phenothiazines with similar structure - methylene blue (MB) and 1,9-dimethyl methylene blue (DMMB); HaCaT and HeLa cells were used as biological models and LEDs emitting at 633 nm were used as light source.

Cell viability assays as function of light dose and PS concentration showed that the increase in cell death was directly proportional to the PS concentration and light dose, to the both PSs. At  $IC_{50}$  was verified that DMMB concentration (10 nmol/L) is lower than MB concentration (2,0  $\mu$ mol/L) in two order of magnitude, and this difference is reflected in degree of oxidative stress promoted by photosensitizers.

Only for MB the amount of detected ROS is highly correlated with loss of cell viability, while for DMMB this correlation is weak, because there is loss of viability without large generation of ROS. Nevertheless, the viability decreased for DMMB is highly correlated with the increase of autophagy, indicating occurrence of autophagic cell death in both HaCaT cells and in HeLa cells. The analyses of damaged cell organelles indicated that both PSs, after be photoactivated, induce lysosomal and mitochondrial damage in HaCaT cells. And the subcellular localization assay confirmed that DMMB and MB are localized in these organelles.

Because the subcellular localization of PSs influences cell death mechanisms, this research identified that MB, in the same nanomolar concentration of DMMB, does not induce autophagy, because it is photochemically inactive in mitochondria due the reducing coenzymes present in this organelle. DMMB has a lower reduction potential than MB, which hinders PS reduction in mitochondria, and possibly generate a mild oxidative stress that compromise the integrity of mitochondria and lysosomes, and justify autophagy induction as a cell death mechanism. The conditions that MB is not fully reduced in the cellular environment are at higher concentrations, in which was detected high level of oxidative stress and autophagic cell death was not observed after photosensitization.

These results show that the efficiency of cell death induced by PDT is not necessarily related with oxidative stress level, since the oxidative stress induced by DMMB was lesser than by MB, however, the cell death was greater. This research confirms the concept that more effective photosensitizers for PDT means greater specificity of photosensitization reactions, and not only improvement of the efficiency of ROS generation.

**Keywords:** Photodynamic Therapy, PDT, 1,9-dimethyl methylene blue, Reactive Oxygen Species, Autophagy.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AAU – Unidades Arbitrárias de Autofagia
- Abs – Absorbância
- AO – Laranja de Acridina
- ATP – Adenosina Trifosfato
- CO<sub>2</sub> – Dióxido de Carbono
- CQ – Cloroquina
- CV – Cristal Violeta
- CVS – *Crystal Violet Staining*
- DAPI – dihidrocloreto 4',6'-diamidino-2-fenilindole
- DCF – 2', 7'- diclorofluoresceína
- DMMB – 1,9 dimetil Azul de Metileno
- DMSO – Dimetilsulfóxido
- EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético
- ERN – Espécie Reativa de Nitrogênio
- ERO – Espécie Reativa de Oxigênio
- FADH<sub>2</sub> – forma reduzida da flavina-adenina dinucleotídeo
- FS – Fotossensibilizador
- H<sub>2</sub>DCFDA – 2', 7'- diclorodihidrofluoresceína diacetato
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – Peróxido de hidrogênio
- IC – Índice de Citotoxicidade
- IC<sub>50</sub> – Índice de Citotoxicidade 50%
- IP – Iodeto de Propídeo
- LAMP2A – Proteína de Membrana Associada ao Lisossoma Tipo 2 A
- LEDs – Diodos Emissores de Luz
- LYS – LysoTracker Green
- MB – Azul de Metileno
- MMP – Potencial de Membrana Mitocondrial
- MPT – Transição de Permeabilidade Mitocondrial
- MTT – Brometo de 3-(4,5,-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazólio
- NADH – forma reduzida da nicotinamida adenina dinucleotídeo
- NADPH – forma reduzida da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NR – Vermelho Neutro

NRU – *Neutral Red Uptake*

$O_2^{\cdot -}$  – Ânion radical superóxido

$OH^{\cdot}$  – Radical hidroxila

PBS – Tampão fosfato de sódio

Pc – Ftalocianina

R123 – Rodamina 123

SFB – Soro Fetal Bovino

TFD – Terapia Fotodinâmica

UV – Luz ultravioleta

X-Gal –  $\beta$ -D-galactopiranosídeo

$^1FS^*$  – Fotossensibilizador em estado eletronicamente excitado singlete

$^3FS^*$  – Fotossensibilizador em estado eletronicamente excitado triplete

$^1O_2$  – Oxigênio singlete

$^3O_2$  – Oxigênio molecular

$\epsilon_{max}$  – Coeficiente de absorvidade molar

$\phi_{\Delta}$  – Rendimento quântico de geração de oxigênio singlete

$\lambda$  – Comprimento de onda

$\lambda_{max}$  – Comprimento de onda de máxima absorção

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
1.1. Fundamentos da Terapia Fotodinâmica .....	16
1.2. A TFD e o desbalanço oxidativo celular .....	17
1.3. Fotossensibilizadores Fenotiazínicos .....	20
1.4. Mecanismos de morte celular desencadeados pela TFD .....	23
1.4.1. Autofagia e morte celular autofágica .....	25
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>30</b>
2.1. Objetivo geral .....	30
2.2. Objetivos específicos .....	30
<b>3. DETALHES EXPERIMENTAIS.....</b>	<b>31</b>
3.1. Materiais .....	31
3.2. Equipamentos.....	32
3.3. Células .....	33
3.3.1. Linhagens celulares .....	33
3.3.2. Plaqueamento das células .....	33
3.4. Solução de Fotossensibilizadores .....	33
3.5. Métodos .....	34
3.5.1. Análise da sobrevivência celular em função da concentração de FS e da dose de luz (J/cm <sup>2</sup> ) em células HaCaT .....	34
3.5.2. Princípio da estratégia AAU para mensuração <i>in vitro</i> de morte celular por autofagia .....	36
3.5.3. Análise da indução de estresse oxidativo usando-se a sonda H <sub>2</sub> DCFDA .....	37
3.5.4. Análise da indução de estresse oxidativo usando a sonda MitoTracker Red (CM-H <sub>2</sub> TMRos) .....	37
3.5.5. Avaliação da indução de vacúolos autofágicos e da indução de necrose .....	38
3.5.6. Avaliação da indução de vacúolos autofágicos por imunofluorescência LAMP2A e LC3-II .....	40
3.5.7. Comprometimento lisossomal avaliado pela atividade de β-D-galactosidase ...	41
3.5.8. Análise do comprometimento mitocondrial após TFD por detecção de fluorescência de Rodamina 123 por citometria de fluxo .....	42
3.5.9. Ensaio de cito-localização dos FSs.....	43

3.5.10. Indução de morte celular autofágica em células HaCaT após fotoativação do MB.....	45
3.5.11. Efeitos da TFD induzida por DMMB e MB em células HeLa.....	46
3.5.12. Análise estatística dos dados .....	46
<b>4. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS .....</b>	<b>47</b>
4.1. Sobrevida celular de células HacaT em função da concentração de FS e da dose de luz (J/cm <sup>2</sup> ).....	47
4.2. Mensuração de estresse oxidativo a partir da fluorescência de H <sub>2</sub> DCFDA e de MitoTracker Red.....	49
4.3. Detecção de autofagia <i>in vitro</i> .....	52
4.4. Detecção de vacúolos autofágicos por fluorescência de AO .....	55
4.5. Detecção de autofagia por imunofluorescência LAMP2A e LC3-II em células HaCaT após TFD.....	58
4.6. Análise do comprometimento lisossomal avaliado pela atividade de β-D-galactosidase .....	61
4.7. Análise do comprometimento mitocondrial avaliado pela sonda fluorescente Rodamina 123.....	63
4.8. Análise de localização subcelular dos FSs MB e DMMB.....	66
4.9. Indução de autofagia em células HaCaT após fotossensibilização com MB .....	70
4.10. Comparação da sobrevida celular após fotossensibilização do MB e DMMB em células HaCaT e em células HeLa .....	76
<b>5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>80</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>84</b>
<b>SÚMULA CURRICULAR.....</b>	<b>96</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O desafio em se estabelecer novas abordagens terapêuticas para o tratamento do câncer humano, usando-se estratégias com poucos efeitos colaterais, representa ainda um dogma na oncologia clínica. Embora haja grandes esforços em busca de novos quimioterápicos com poucas reações adversas, a toxicidade é ainda um grande problema. Neste sentido, a busca de novas abordagens tem se destacado no cenário científico, representando também um tema de grande apelo na saúde pública.

Diversas metodologias baseadas em iluminação com luz visível têm promovido avanços no diagnóstico e no tratamento do câncer e de outras doenças. Entre essas metodologias está a Terapia Fotodinâmica (TFD) (Ochsner, 1997), uma modalidade terapêutica que se destaca por promover, a partir de um desequilíbrio redox artificialmente e intencionalmente induzido, o tratamento antitumoral (Williams et al., 1989, Wagner et al., 2012), bem como, de diversas outras doenças infecciosas, causadas por bactérias, vírus ou fungos (Wainwright, 2002, Dai, Huang and Hamblin, 2009). A TFD é um tratamento não invasivo, que leva a um comprometimento menor da homeostase de células normais causando, conseqüentemente, poucos efeitos colaterais, quando comparada à terapias clássicas (Dalla Via and Magno, 2001; Pandey, 2000).

A TFD tem como princípio básico a fotossensibilização com o envolvimento de três componentes essenciais: a droga a ser fotoativada (fotossensibilizador - FS); a luz visível e o oxigênio (Oseroff and Morgan, 2001). O FS deve ser absorvido seletivamente pelo tecido alvo, e posteriormente excitado numa região específica de comprimento de onda de luz visível. A interação da luz com o FS desencadeará uma série de processos fotofísicos e fotoquímicos que promovem a formação de espécies reativas (oxigênio singlete, espécies

tripletes e outras espécies reativas de oxigênio – ERO – ou nitrogênio – ERN). A geração destas espécies reativas causa um desbalanço oxidativo que resulta na morte celular do tecido alvo (Ochsner, 1997), que pode ser morte programada (apoptose ou autofagia) ou não programada (necrose) (Dougherty et al., 1998).

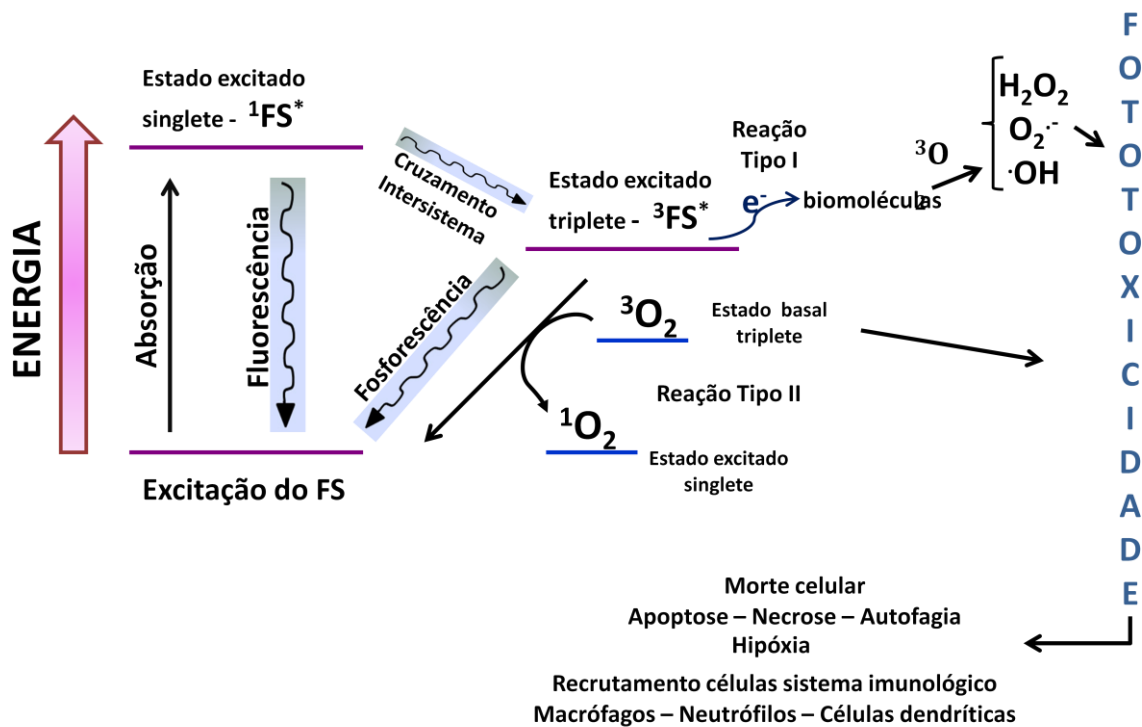
Muitos estudos defendem a idéia de que a eficiência fotodinâmica de um FS é proporcional à quantidade de espécies reativas geradas por sua fotoativação no tecido doente (Aveline and Redmond, 1999; Pogue et al., 2000; Chen et al., 2002; Lee et al., 2008). Diante dessa hipótese, muitos buscam por melhores FSs baseando-se somente na eficiência de geração de EROs, principalmente de oxigênio singlete. No entanto, diversos estudos têm demonstrado que a eficiência de um FS não depende apenas do rendimento de espécies reativas, mas também da sua localização intracelular e do mecanismo de morte celular induzido (Kessel et al., 1997; Castano, Deminova and Hamblin, 2004; Oliveira et al., 2011; Pavani et al., 2012).

### **1.1. Fundamentos da Terapia Fotodinâmica**

Fotossensibilizadores (FSs) são moléculas que absorvem energia luminosa em comprimento de onda ( $\lambda$ ) específico, passando do estado fundamental para um estado eletronicamente excitado singlete ( $^1\text{FS}^*$ ) de maior energia e que, geralmente, tem tempo de vida curto. Este pode retornar ao estado fundamental emitindo luz (fluorescência), calor ou passar para outro estado excitado, usualmente estado triplete ( $^3\text{FS}^*$ ), através do cruzamento de intersistema, no qual há inversão de spin no estado excitado. O  $^3\text{FS}^*$ , por ser reativo e ter tempo de vida relativamente longo, é o principal envolvido nas reações de foto-oxidação de biomoléculas. Os tripletes podem reagir no ambiente biológico por dois mecanismos fotoquímicos principais (Figura 1): tipo I, que ocorre através de uma reação de transferência de elétrons (reação de óxido-redução) entre o FS no estado excitado e constituintes celulares, produzindo radicais livres, que interagem com o oxigênio molecular ( $^3\text{O}_2$ ), gerando as



Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), como por exemplo o ânion radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), radical hidroxila ( $OH^{\cdot}$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ); ou tipo II, onde há transferência de energia para o oxigênio molecular ( $^3O_2$ ) formando oxigênio singlete ( $^1O_2$ ) - uma espécie excitada de oxigênio, altamente eletrofílica e reativa (Foote, 1968; Foote, 1991; Ronsein et al., 2008), que é considerado o principal agente citotóxico da TFD.



**Figura 1:** Representação esquemática dos mecanismos de fotossensibilização.

Ambos os mecanismos tipo I e tipo II podem ocorrer simultaneamente e a relação de velocidade entre os dois processos depende da localização subcelular dos FSs, bem como, da concentração do oxigênio molecular (Henderson and Dougherty, 1992; Wainwright, 1996; Ochsner, 1997; Baptista and Indig, 1998).

## 1.2. A TFD e o desbalanço oxidativo celular

Em condições normais de metabolismo aeróbico, as mitocôndrias representam a principal fonte de geração de EROs, a partir da cadeia transportadora de elétrons, e de ERNs, a partir da enzima óxido nítrico sintetase (Boveris and Chance, 1973; Ritcher et al., 1995;

Cadenas and Davies, 2000). Estima-se que 0,1% do O<sub>2</sub> consumido pela mitocôndria seja convertido em EROs (Tahara, Navarete, and Kowaltowski, 2009). No entanto, compostos antioxidantes (NADH, NADPH, ácido ascórbico, vitamina E, glutathione) e enzimas de reparo (superóxido dismutase, glutathione peroxidase, catalase) estão em constante atuação para manter o equilíbrio entre moléculas pró-oxidantes e antioxidantes (Vercesi et al., 1997; Kowaltowski et al., 2009 ).

Em condições fisiológicas, as EROs e ERNs mitocondriais desempenham papel nas vias de sinalização celular (Dröge, 2002) e são fundamentais para a manutenção da homeostase celular. Em condições de desbalanço oxidativo, os lipídeos de membrana desta organela ficam sujeitos a peroxidação, o DNA mitocondrial está sujeito a lesões oxidativas e as proteínas mitocondriais são susceptíveis ao mau dobramento e agregação, que podem levar à transição de permeabilidade da membrana mitocondrial (MPT, do inglês *mitochondrial permeability transition*). A MPT é caracterizada pela abertura de um poro protéico não seletivo na membrana mitocondrial interna tornando-a permeável à íons, água e moléculas com peso de até 1,5 kDa (Crompton et al., 1999; Kowaltowski, Castilho and Vercesi, 2001). Assim, para o controle da produção de EROs e ERNs intracelular e manutenção da homeostase celular, tais mitocôndrias estão sujeitas a autofagia para remoção tanto de moléculas mitocondriais danificadas quanto da organela total, pelo processo denominado mitofagia (Lemasters, 2005).

As respostas celulares estimuladas pelas EROs e ERNs são diversas. Em baixas concentrações, estas espécies atuam na sinalização celular influenciando processos como a modulação da expressão de citocinas, de fatores de crescimento e de fatores de expressão gênica. Em níveis elevados, as mesmas provocam alteração no transporte iônico das células; liberação de enzimas hidrolíticas lisossomais; formação de produtos citotóxicos; danos em biomoléculas como, colesterol e fosfolipídeos insaturados das membranas celulares através da

peroxidação lipídica, proteínas em vários resíduos de aminoácidos (histidina, triptofano, tirosina, cisteína e metionina) e bases nitrogenadas dos ácidos nucleicos; e, finalmente, indução de morte celular por necrose, apoptose ou autofagia (Zhang et al., 2003; Miller et al., 2003; Niki et al., 2005; Barreiros e David, 2006).

Além das espécies reativas serem geradas em processos fisiológicos e em condições patológicas, como câncer, envelhecimento celular e processos degenerativos, fontes exógenas, como nutrição, fármacos, radiação solar, tabagismo, gases tóxicos e metais, contribuem para a sua produção excessiva (Aruoma, 1994; Halliwell, 1994; Svobodová, Psotová and Walterová 2003). No caso da luz ultravioleta (UV) e visível, bem como, no caso de tratamentos por TFD, os mecanismos fotoquímicos tipo I e tipo II geram um desbalanço oxidativo que prejudica a homeostase celular, podendo levar a vários mecanismos de morte celular (Klotz, Kröncke and Sies, 2003; Moserova and Kralova, 2012).

Há evidências que a localização subcelular do FS e, conseqüentemente, o local de produção de EROs, com destaque para o  $^1\text{O}_2$ , não influencia apenas a susceptibilidade de morte celular, mas influencia também o mecanismo de morte celular fotoinduzido (Kessel, 2004; Redmond and Kochevar, 2006). Por exemplo, a dependência do local de geração do  $^1\text{O}_2$  na toxicidade do FS reflete-se, em parte, no fato de que o tempo de vida intracelular desta espécie reativa ser pequeno (de aproximadamente 1 a 3  $\mu\text{s}$ ), conseqüentemente não há tempo para o mesmo se difundir na célula. Em água, o raio de difusão do  $^1\text{O}_2$  tem no máximo 150 nm, distância que é muito menor do que as dimensões da célula e de suas organelas. Portanto o  $^1\text{O}_2$  não deve atingir outras biomoléculas senão às próximas ao seu local de geração (Redmond and Kochevar, 2006; Hatz, Poulsen and Ogilby, 2008).

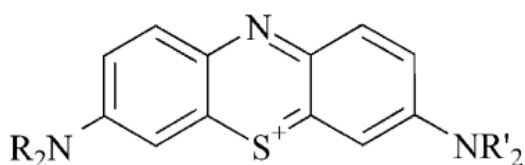
Oliveira e colaboradores (2011) observaram que dois fotossensibilizadores geram quantidades equivalentes de morte celular apesar de possuírem propriedades fotoquímicas bem diferentes. Um deles é o Azul de Metileno (MB, do inglês *Methylene Blue*), um

excelente FS cujo rendimento quântico de oxigênio singlete ( $\Phi\Delta$ ) é 0,50, e o outro é o Cristal Violeta (CV), um FS com rendimento de oxigênio singlete praticamente desprezível ( $\Phi\Delta < 0,01$ ). Os pesquisadores explicaram estes resultados a partir de diferenças de localização subcelular dos FSs. O CV se localiza exclusivamente na mitocôndria sem sofrer redução, causando injúria nas células na mesma faixa de concentração que o MB, que tem grande rendimento de EROs, mas de localização subcelular aleatória. Estes resultados confirmaram que é possível induzir morte celular especificamente, sem a necessidade de gerar grandes quantidades de EROs.

### 1.3. Fotossensibilizadores Fenotiazínicos

Os corantes fenotiazínicos são moléculas catiônicas, relativamente lipofílicas, cuja estrutura central cromófora é composta por um sistema heteroaromático planar tricíclico, contendo átomos de enxofre e nitrogênio (Figura 2). Em geral, apresentam em meio aquoso máximo de absorção entre 590 e 680 nm, intervalo este compreendido na chamada janela terapêutica (600 – 950 nm) (Wainwright and Giddens, 2003), em que a penetração da radiação nos tecidos vivos é maior e a absorção por cromóforos endógenos (água, proteínas, pigmentos como melanina e bilirrubina) é menor (Castano, Deminova and Hamblin, 2004).

Os fenotiazínicos são FSs com grande potencial para tratamento de diversas doenças (Wainwright and Giddebs, 2003).



**Figura 2:** Estrutura geral de compostos fenotiazínicos – região cromófora.

Dentre os FSs fenotiazínicos destaca-se o MB, que tem sido bastante utilizado para tratamento de câncer e de doenças infecciosas (Mellish et al., 2002; Tardivo et al., 2004;

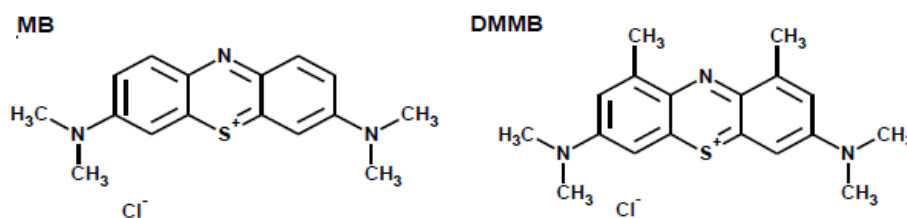
Tardivo et al., 2005; Wainwright, 2005). Este FS age principalmente pelo mecanismo tipo II, sendo capaz de gerar oxigênio singlete com altos rendimentos quânticos em uma variedade de ambientes biológicos e químicos. No entanto, quando se encontra em sua forma reduzida (leuco), o MB não é capaz de absorver energia no intervalo da janela terapêutica, portanto não transfere energia para o oxigênio triplete via processos do tipo II, o que diminui sua eficiência fotodinâmica (Tardivo et al., 2005).

Outro fenotiazínico, derivado do MB, o 1,9-dimetil-azul de metileno (DMMB), também tem sido considerado para o tratamento antimicrobiano (Wainwright et al., 1999; O'Neill, Wilson and Wainwright, 2003; Phoenix et al., 2003; Demidova and Hamblin, 2005; Rágas et al. 2010), antiviral (Wagner et al., 1998) e antitumoral (Wainwright et al., 1997; Rice, Wainwright and Phoenix, 2000), apesar de existirem poucos trabalhos mecanísticos considerando sua atividade.

Wainwright e colaboradores (1997) verificaram que a metilação do MB formando o DMMB fez aumentar sua atividade fotodinâmica (o  $IC_{50}$  para MB foi de 18,7  $\mu\text{mol/L}$  e para DMMB foi de 0,09  $\mu\text{mol/L}$ ) na linhagem celular de tumor mamário murino (EMT-6). Rice e colaboradores (2000) também observaram aumento semelhante na atividade fotodinâmica do DMMB em linhagens de melanoma murino (SK-23), cujo  $IC_{50}$  para MB foi de 15,2  $\mu\text{mol/L}$  e de 0,04  $\mu\text{mol/L}$  para DMMB. Este aumento foi relacionado com a maior lipofilicidade do DMMB em relação ao MB, propriedade esta considerada como um fator importante para incorporação intracelular do FS.

A lipofilicidade não é uma propriedade físico-química bem definida, mas pode ser estimada de várias formas, como o coeficiente da partição n-octanol/água, parâmetro geralmente expresso na forma logarítmica, ou seja, coeficiente de partição ( $\log P$ ). A partir do valor de  $\log P$  pode-se estimar a interação e a incorporação de uma molécula em uma fase lipofílica, por exemplo, membranas biológicas (Engelmann et al., 2007). Medidas de  $\log P$

relatadas na literatura mostram que o DMMB possui log P maior ( $\log P = + 1,01$ ) do que o MB ( $\log P = - 0,10$ ) (Wainwright and Giddens, 2003). Consequentemente, o DMMB se liga às membranas com maior eficiência em comparação a MB. Estudos com sistemas biomiméticos realizados por Bacellar e colaboradores (2014) confirmaram a maior porcentagem de ligação em membranas pelo DMMB (50% para DMMB e 1,01% para MB) e um aumento significativo na eficiência de danos em membranas pelo DMMB (99%) em relação ao MB (3,1%). As estruturas do MB e do DMMB estão representadas na Figura 3.



**Figura 3:** Estrutura química do Azul de Metileno (MB) e do 1,9-dimetil-azul de metileno (DMMB).

Bacellar e colaboradores (2014) também mediram a produção de oxigênio singlete, e verificaram um maior rendimento quântico ( $\Phi\Delta$ ) para o DMMB (0,71) em relação ao MB (0,52). Wainwright e colaboradores (1997), utilizando microeletrodos de ouro, observaram que os derivados metilados do MB possuem uma menor taxa de redução à forma leuco (fotoquimicamente inativa em 654 nm) do que o MB. Essa menor taxa de redução do DMMB foi confirmada por Rice e colaboradores (1998) a partir do ensaio enzimático NADH-diaforase, em que se observou menor taxa de reação de oxidação do NADH através da transferência do hidrogênio para o fotossensibilizador, reduzindo-o à forma leuco. Mellish e colaboradores (2002) utilizando outros derivados metilados do MB, diferentes do DMMB, justificaram que a menor taxa de redução destes derivados para a forma inativa leuco, em relação ao MB, se deve ao efeito indutivo doador de elétrons provenientes dos grupos metil para o anel fenotiazínico, o que diminui seu potencial de redução, explicação essa que também pode ser aplicada ao DMMB.

Wainwright e colaboradores (1997) afirmaram também que o local de ação intracelular dos FSs é variável e depende da linhagem celular e da estrutura do FS, principalmente dos grupos periféricos ligados ao cromóforo. Em vista disso estes autores sugeriram que o padrão de localização intracelular do derivado metilado DMMB poderia ser diferente do MB o que, juntamente com sua maior lipofilicidade, rendimento quântico de oxigênio singlete e menores taxas de redução à forma leuco, justificariam sua maior cito e fototoxicidade observadas em relação ao MB. No entanto, Wainwright e colaboradores (1997) não explicaram molecularmente no ambiente celular porque o DMMB é mais eficiente fotodinamicamente que o MB.

#### **1.4. Mecanismos de morte celular desencadeados pela TFD**

Há vários trabalhos na literatura que permitem concluir que o mecanismo de morte celular provocada por TFD é dependente do FS (propriedades químicas, concentração, localização subcelular), do tipo celular considerando seu potencial metabólico e fenótipo, e das condições de tratamento empregadas (tempo de incubação do FS nas células e dose de luz irradiada) (Castano, Deminova and Hamblin, 2005; Buytaert, Dewaele and Agostinis, 2007). Inicialmente, acreditava-se que a TFD matava as células apenas via necrose. Entretanto, em 1991, Agarwal e colaboradores demonstraram a indução de apoptose por TFD (Agarwal et al., 1991).

A morte por necrose ocorre após danos severos e descontrolados em várias estruturas celulares, causando a perda do controle homeostático, o aumento do volume celular, a interrupção da função mitocondrial e o rompimento da membrana celular ocorrendo liberação do conteúdo intracelular no tecido, danificando células vizinhas e causando uma resposta inflamatória intensa. Na morte por apoptose (ou mecanismo de morte celular programada tipo I) há diminuição do volume celular com a condensação nuclear e do citoplasma, causando a perda da aderência com a matriz extracelular e com as células vizinhas. Durante a apoptose a

cromatina é condensada, o DNA cromossômico é clivado por endonucleases em fragmentos internucleossômicos, formando-se os corpos apoptóticos, que por sua vez são fagocitados por macrófagos (Williams and Smith, 1993; McConkey, 1998).

A ativação da apoptose depende do equilíbrio entre proteínas regulatórias pró- e anti-apoptóticas. A família de proteínas Bcl-2 intervém de forma direta na regulação da apoptose (Borner, 2003), através da regulação do potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$  - MMP) e da ativação das caspases (Kuwana and Newmeyer, 2003; Sharpe et al., 2004). Esta família de proteínas inclui membros anti-apoptóticos (Bcl-2 e Bcl-xL), que preservam a integridade da membrana mitocondrial, e membros pró-apoptóticos (Bax, Bid e Bak), que induzem a formação ou desregulação de poros da membrana externa das mitocôndrias provocando a liberação de fatores pró-apoptóticos para o citosol (Vander Heiden and Thompson, 1999).

Os mecanismos de morte celular não são totalmente independentes, podendo haver múltiplos mecanismos de morte celular que atuam simultaneamente (Zhvivotovsky and Orrenius, 2010), assim como é observado na TFD, em que um mesmo FS pode induzir distintos mecanismos de morte celular (Dougherty, 1987; Buytaert, Dewaele and Agostinis, 2007). Na década passada descobriu-se que além da necrose e da apoptose, a TFD pode induzir também a morte celular por autofagia (Kessel, Vicente and Reiners, 2006; Buytaert et al. 2006; Chen and Gibson, 2008).

A resposta celular autofágica foi relacionada com a intensidade do estímulo da TFD e consequentemente com o nível de desbalanço oxidativo gerado. Em baixas intensidades de luz e de FS, a autofagia atua garantindo a remoção dos componentes celulares fotodanificados, prevenindo o início das vias apoptóticas, mantendo assim a viabilidade celular. Inversamente, em doses médias de TFD, tanto a apoptose quanto a autofagia podem contribuir para a morte celular (Kessel and Reiners, 2007; Kessel and Arroyo; 2007; Andrzejak, Price and Kessel, 2011), e em doses muito elevadas de TFD observa-se a ocorrência de necrose.



### **1.4.1. Autofagia e morte celular autofágica**

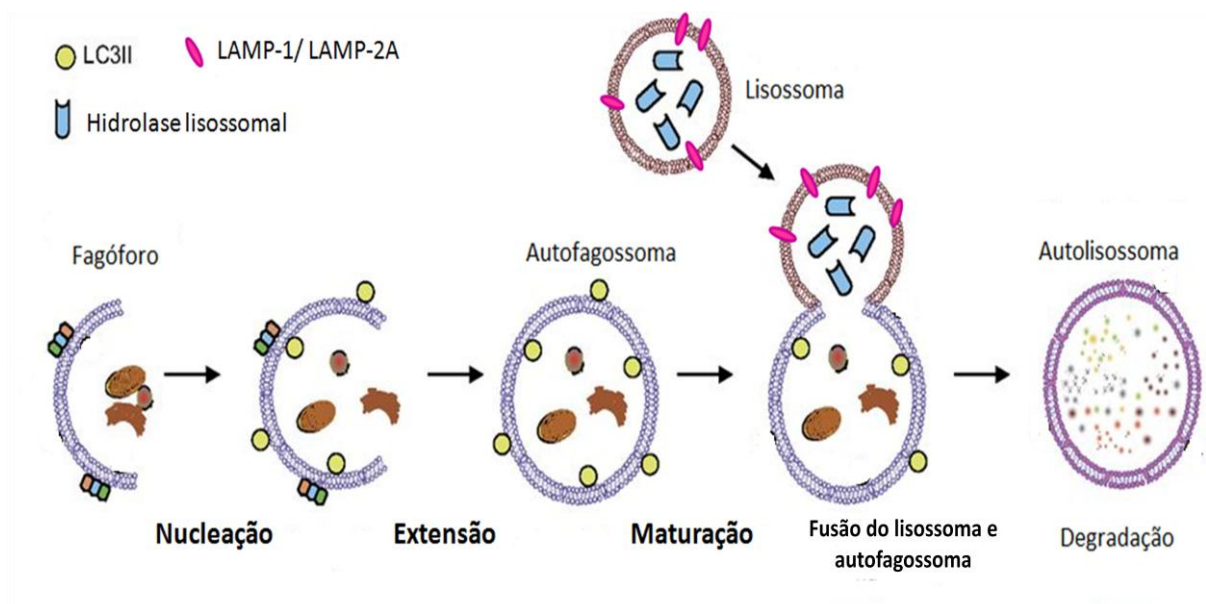
Autofagia é uma via celular lisossomal de degradação e reciclagem de componentes citosólicos, como proteínas e organelas (Baehrecke, 2005), é uma via constitutiva em funções celulares como crescimento, desenvolvimento e homeostase celular. De acordo com o mecanismo de formação do vacúolo autofágico e com o caminho pelo qual o material citoplasmático é entregue ao lisossomo, há três tipos de autofagia em células eucarióticas - autofagia mediada por chaperonas, microautofagia e macroautofagia (Scherz-Shouval and Elazar, 2007).

Na autofagia mediada por chaperonas, proteínas citoplasmáticas dobradas erroneamente ou oxidadas são sinalizadas por um motivo pentapeptídico (lisina-fenilalanina-glutamato-arginina-glutamina) em sua sequência de aminoácidos, permanecendo então ligadas às chaperonas. Estas direcionam as moléculas danificadas ao lisossoma através do reconhecimento do motivo pela glicoproteína da membrana lisossomal, LAMP2A (Proteína de Membrana Associada ao Lisossoma Tipo 2A), que efetuará a translocação seletiva de polipeptídeos mal dobrados através da membrana lisossomal, para posterior degradação e reutilização do produto degradado (Cuervo and Dice, 1996). A proteína LAMP2A por ser encontrada principalmente na membrana lisossomal é comumente utilizada como um marcador dessa organela (Cuervo and Dice, 2000; Eskelinen, 2006).

Diferente da autofagia mediada por chaperonas, a microautofagia caracteriza-se pela dinâmica de rearranjos na membrana lisossomal, resultando em invaginações que captam diretamente porções citoplasmática contendo as moléculas a serem degradadas, sendo então responsável pela degradação lisossomal basal de componentes citosólicos (Ahlberg and Glaumann, 1985).

A macroautofagia é a via mais estudada e responde por mais de 90% da autofagia celular. Pela macroautofagia, ou simplesmente autofagia, o conteúdo citoplasmático a ser

degradado é isolado (nucleação) por uma membrana lipídica dupla, o fagóforo, que se alonga englobando o conteúdo celular (extensão), formando o autofagossoma. A origem dessa membrana lipídica dupla é controversa, mas evidências indicam que essa estrutura origina-se de regiões do retículo endoplasmático sem ribossomos, do complexo de golgi, do endossomo ou até mesmo da mitocôndria (Dunn, 1990; Tooze and Yoshimori, 2010; Hailey et al., 2010). Durante a formação do autofagossoma, a proteína de Cadeia Leve 3 Associada à Microtúbulo (MAP1LC3 ou LC3), principal marcadora do desenvolvimento desse processo autofágico, é convertida de sua forma citoplasmática, LC3-I, em LC3-II (Klionsky et al., 2008). Isso por que, quando o processo autofágico é ativado, a forma citoplasmática LC3-I é covalentemente ligada ao lipídeo fosfatidiletanolamina e convertida à isoforma LC3-II. Esta, auxiliada pelo fosfatidiletanolamina, se associa às membranas lipídicas interna e externa das vesículas autofágicas, autofagossomas (Kabeya et al., 2000). Por fim o autofagossoma se funde com o lisossoma (maturação), dando origem ao autolisossoma, que finaliza a degradação do seu conteúdo a partir das enzimas lisossomais (Klionsky, 2007) (Figura 4).



**Figura 4:** Esquema do processo autofágico (macroautofagia), adaptado de Nakahira and Choi, 2013.

Todas as etapas envolvidas no processo autofágico dependem de ATP (Kim and Klionsky, 2000) e de moléculas de sinalização que modulam a atividade e expressão de genes relacionados à autofagia (Atg) (Meijer and Codogno, 2004).

A autofagia representa um mecanismo de resgate celular frente a um dado estresse, como a privação de nutrientes extracelulares ou diminuição na concentração de metabólitos intracelulares, e estresse oxidativo propriamente dito. Contudo, há evidências sólidas apontando a autofagia como uma via alternativa de morte celular, denominada morte celular programada tipo II (Eskelinen, 2005).

Os grupos de Kessel (2006) e de Buytaert (2006) foram os primeiros a documentar que a TFD induz morte celular por autofagia em condições cujos mecanismos para apoptose estavam inibidos. O primeiro grupo usou o FS porfíceno em células de leucemia murina, L1210, em presença de inibidor apoptótico de caspase3/7, o tetrapeptídeo sintético N-benziloxicarbonil-Asp-Glu-Val-Asp fluorometil cetona (zDEVD-FMK). A autofagia também foi verificada em células de câncer de próstata, DU145, Bax deficientes. O outro grupo reportou autofagia após fotossensibilizar, com hipericina, fibroblastos embrionários murinos, MEF, duplo nocaute para as proteínas próapoptóticas Bax e Bak ( $Bax^{-/-}Bak^{-/-}$ ). Nota-se que todos esses exemplos demonstram que a autofagia ocorreu em ocasiões de comprometimento da maquinaria apoptótica.

Experimentos independentes realizados por Oleinick e colaboradores (2009) e por Xue e colaboradores (2010) mostraram que, em células com bloqueio em alguma via do processo de apoptose, a sensibilidade à TFD foi modulada pela maquinaria autofágica e a mesma atuou desempenhando um papel de morte celular. Nessas condições, medidas de inibição dos mecanismos autofágicos proporcionaram uma proteção contra citotoxicidade causada pela TFD (Xue et al., 2007).

No entanto, em células competentes para apoptose, as pesquisas realizadas até o momento identificaram que a autofagia atua com um papel citoprotetor, a fim de limitar a propagação do dano oxidativo, aumentando, assim, a resistência à morte celular por TFD (Dewaele et al., 2011). Neste mesmo paradigma, medidas de inibição dos mecanismos autofágicos em células competentes para apoptose indicaram um aumento do efeito citotóxico da TFD, ou seja, atestando o papel citoprotetor da autofagia (Dewaele et al., 2011).

Apesar de o processo autofágico ocorrer gerando morte celular fotoinduzida independente da presença ou não de vias apoptóticas (Xue et al., 2007; Dini et al., 2010), Andrzejak e colaboradores (2011) sugeriram que, em células competentes para apoptose e para autofagia, a taxa de iniciação das vias apoptóticas pode ser um fator que modula a resposta autofágica, isto é, em células com uma rápida resposta apoptótica, a autofagia pode atuar como uma via de proteção celular, enquanto que células que exibem uma resposta lenta para apoptose, a autofagia pode atuar como uma via de morte celular (Andrzejak, Price and Kessel, 2011).

A elevada reatividade das EROs geradas fotoquimicamente, principalmente o  $^1\text{O}_2$ , sugere que a autofagia é iniciada numa tentativa de remover organelas e proteínas danificadas por reações fotoquímicas. No entanto, o nível de estresse oxidativo que conduzirá uma via autofágica de sobrevivência ou de morte celular não é definido, e a contribuição funcional dos processos catabólicos autofágicos para a morte celular ainda é muito incerto. Portanto, mais estudos são necessários para definir se a autofagia contribui diretamente para morte celular ou se a mesma é uma tentativa fracassada de preservar a viabilidade celular. Outra questão que ainda não é consenso na comunidade científica é se a indução de um mecanismo específico de morte celular programada leva a uma melhoria na eficiência da terapia antitumoral, como da TFD.

Assim, o presente estudo pretende contribuir para o esclarecimento da indução de morte celular autofágica associada ao tratamento com TFD. Ainda não se identificou maneiras de usar o mecanismo de morte celular autofágica para melhoria da eficiência da TFD. Não há modelos que caracterizam e explicam relações quantitativas entre os danos às organelas celulares, associadas à autofagia e à apoptose. Também se espera contribuir para o entendimento do paradigma central da autofagia, ou seja, quanto sua ação como promotora de sobrevivência ou indutora de morte celular.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

Caracterizar a ocorrência de morte celular autofágica após a fotoativação de FSs fenotiazínicos estruturalmente semelhantes, MB e DMMB.

### **2.2. Objetivos específicos**

1. Avaliar a cito e a fototoxicidade dos FSs MB e DMMB em diferentes doses de luz em queratinócitos humanos normais (HaCaT). Demonstrar as relações quantitativas entre dose de luz e a sobrevivência celular.
2. Mensurar a produção de EROs em células HaCaT antes e após o tratamento com os FSs MB e DMMB. Demonstrar as relações quantitativas entre concentração de FS e a quantidade de espécies reativas mensuráveis.
3. Determinar a associação entre TFD e a indução de autofagia em queratinócitos humanos normais (HaCaT).
4. Avaliar o desenvolvimento da via autofágica por imunofluorescência LAMP2A e LC3-II em células HaCaT.
5. Localizar o alvo subcelular dos FSs MB e DMMB em células HaCaT.
6. Avaliar possíveis danos aos lisossomos e às mitocôndrias de células HaCaT após fotossensibilização com MB e DMMB e relacioná-los à indução de autofagia.
7. Verificar a manutenção de resposta autofágica após fotossensibilização com DMMB em outra linhagem celular, adenocarcinoma de útero humano (HeLa).

### 3. DETALHES EXPERIMENTAIS

#### 3.1. Materiais

Os meios de cultura celular Dulbecco MEM (DMEM), o soro fetal bovino (SFB), a solução de tripsina, a solução de antibiótico e antimicótico contendo penicilina (10 U.I./mL), estreptomicina (10 mg/mL) e anfotericina B (1 g/mL) foram adquiridos da Vitrocell. O tampão fosfato de sódio (PBS) foi preparado com cloreto de sódio, cloreto de potássio, fosfato de sódio dibásico, fosfato de potássio monobásico todos adquiridos da Synth, assim como o ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). Os corantes azul de Tripán; brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT); vermelho neutro (NR, do inglês *Neutral Red*, hidrocloreto de [3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazina]); cristal violeta (CV, Cloreto de hexametileno-pararosanilina); azul de metileno (MB); 1,9-dimetil-azul de metileno (DMMB); laranja de acridina (do inglês *Acridine Orange*, AO); iodeto de propídeo (IP) e o corante Rodamina 123 foram obtidos da Sigma-Aldrich, assim como o dimetil sulfóxido (DMSO), o Triton X-100, a Albumina de Soro Bovino e a Cloroquina (CQ). As placas para cultivo celular com diferentes quantidades de poços foram obtidas da Corning®. Os anticorpos primários monoclonais de coelho anti-LC3-II foram obtidos da Cell Signaling Technology® e anticorpos primários monoclonais de camundongo anti-LAMP2A foram obtidos da ABCAM®. Os anticorpos secundários anti-IgG de coelho conjugado com Alexa-488 e anti-IgG de camundongo conjugado com Alexa-633 foram obtidos da Molecular Probes, assim como o marcador nuclear dihidrocloreto 4',6'-diamidino-2-fenilindole (DAPI) e as sondas 2',7'- diclorodihidrofluoresceína diacetato (H<sub>2</sub>DCFDA), MitoTracker Red CM-H<sub>2</sub>XRos e LysoTracker green. O substrato cromogênico 5-bromo-4-cloro-3-indolil β-D-galactopiranosídeo (X-Gal) foram obtidos da Promega.

### 3.2. Equipamentos

As células foram mantidas em incubadora ThermoScientific a 37°C com fluxo de gás carbônico (CO<sub>2</sub>) controlável (5%) e manipuladas em ambiente estéril, em capela de fluxo laminar Nuair Class II tipo A/B3 com lâmpada UV, utilizando material esterilizado em Autoclave Stermax. A visualização das células foi realizada na sala de cultivo celular em microscópio ótico invertido Nikon Eclipse TS100. Diodos Emissores de Luz (LEDs), emitindo luz vermelha na região de 633 nm, foram utilizados como fonte de luz para irradiação.

As medidas de absorção e de fluorescência foram realizadas usando-se o leitor de microplacas TECAN INFINITE 200M, e medidas de fluorescência também foram realizadas usando-se o leitor de microplacas SpectraMax Molecular Devices (Life Technologie). Os cálculos de concentração das soluções estoques dos corantes fenotiazínicos foram realizados por medidas de absorbância no espectrômetro UV-2401PC (Shimadzu Co.) em uma cubeta de quartzo (Hellma).

O ensaio de citometria de fluxo (Fluorescence Activated Cell Sorting - FACS) foi realizado no citômetro Beckman Coulter FC500 MPL, utilizando os filtros de excitação (488/637 nm) e emissão (645 nm).

Microscopia de transmissão e microscopia de fluorescência foram realizadas em microscópio invertido de luz transmitida e epifluorescência Zeiss Axiovert 200 equipado com uma objetiva C-APOCHROMAT 40X/1.20 W Corr M27 (Zeiss). Imagens de imunofluorescência foram obtidas em microscópio confocal de varredura a laser Zeiss Axiovert 200 LSM-510 Meta equipado com uma objetiva Plan-APOCHROMAT 63X/1.40 de imersão em óleo DIC M27 (Zeiss). As imagens de colocalização subcelular dos FSs foram obtidas em microscópio confocal de varredura a laser Zeiss Axiovert 100 LSM-510 equipado com uma objetiva 40X/1.20 de imersão em água (Zeiss).



### **3.3. Células**

#### **3.3.1. Linhagens celulares**

Queratinócitos humano normais imortalizados (HaCaT) (Boukamp et al., 1998) e células de adenocarcinoma de útero humano (HeLa) disponíveis no Instituto de Química (IQUSP), foram cultivados em meio essencial Dulbecco's Eagle (DMEM) acrescido de 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB), 1% (v/v) de solução penicilina-estreptomicina com antimicótico. Para garantia da reprodutibilidade e confiabilidade dos dados, as linhagens celulares foram manipuladas cuidadosamente, em ambiente e com material estéril, evitando a contaminação por bactérias, fungos, micoplasma, ou ainda contaminação cruzada.

#### **3.3.2. Plaqueamento das células**

As células foram ressuspensas utilizando a tripsina, e posteriormente contadas utilizando a câmara de Neubauer e microscópio ótico com auxílio do corante azul de Tripan, este ajuda a distinguir células viáveis de células danificadas, uma vez que nestas últimas a membrana celular está rompida possibilitando a internalização do corante mais facilmente, acarretando coloração azul. Após contagem, o número de células desejado foi distribuído nas placas e estas foram mantidas em incubadora a 37°C e 5% CO<sub>2</sub> por pelo menos 18 horas até a realização do experimento.

### **3.4. Solução de Fotosensibilizadores**

As soluções estoque dos FSs fenotiazínicos azul de metileno (MB) e 1,9-dimetil-azul de metileno (DMMB) foram preparadas em água Milli-Q a partir de amostras sólidas, e tiveram suas concentrações determinadas a partir da Lei de Lambert-Beer valendo-se de medidas de absorção realizadas em solução etanólica (para evitar dímeros) e dos coeficientes de absorvidade molar ( $\epsilon_{\max}$ ), 81600 L/mol.cm para MB e 78000 L/mol.cm para DMMB, determinados por Bacellar e colaboradores (2014).

### 3.5. Métodos

#### 3.5.1. Análise da sobrevivência celular em função da concentração de FS e da dose de luz ( $\text{J}/\text{cm}^2$ ) em células HaCaT

Para se avaliar a fototoxicidade em função da dose de luz após a fotoativação dos FSs MB e DMMB usaram-se células HaCaT. Resumidamente,  $3,2 \times 10^5$  células foram plaqueadas em placas de 96 poços por 24 horas a  $37^\circ\text{C}$  e 5%  $\text{CO}_2$ . Antes do tratamento as células foram lavadas duas vezes em PBS 1x para a total retirada do meio DMEM suplementado com SFB a 10% (v/v). Em seguida foram incubadas por 1 hora em 0,2 mL de PBS 1x acrescido de DMMB ou MB em diferentes concentrações a  $37^\circ\text{C}$  e 5%  $\text{CO}_2$ . Após lavar as células duas vezes em PBS 1x para retirada da solução de FSs, as microplacas foram irradiadas em presença de PBS 1x com diodos emissores de luz (LEDs), em comprimento de onda máximo de emissão a 633 nm e  $34 \text{ W}/\text{m}^2$  de irradiância, localizados a 18 cm de distância da microplaca, nas doses de luz de  $2,75 \text{ J}/\text{cm}^2$ ,  $5,5 \text{ J}/\text{cm}^2$  e  $11 \text{ J}/\text{cm}^2$ . As amostras não irradiadas permaneceram no escuro em presença de PBS 1x.

Após o tratamento, as células foram mantidas em meio DMEM suplementado com antibiótico a 1% (v/v) e SFB a 10% (v/v) por 48 horas a  $37^\circ\text{C}$  e 5% de  $\text{CO}_2$ . Após esse período avaliou-se simultaneamente a viabilidade celular a partir dos testes colorimétricos de redução do MTT, de incorporação do Vermelho Neutro (NR, do inglês *Neutral Red*) e de citotóxica, usando-se Cristal Violeta (CV), segundo proposto por Martins e colaboradores (2013). Os valores percentuais de sobrevivência celular foram obtidos a partir da proporção da absorbância obtida das células tratadas em relação às não tratadas, ambas corrigidas pela absorbância referência a 800 nm. Os ensaios foram realizados em quadruplicadas e foram repetidos em três experimentos independentes.

### 3.5.1.1. Ensaio de viabilidade celular pela redução do MTT

O MTT (Brometo de 3-[4,5,-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-2H-tetrazólio) é um composto solúvel que, uma vez internalizado, é reduzido por enzimas mitocondriais (Succinato Desidrogenase e Citocromo c Oxidase) formando um produto de cor púrpura denominado de formazan (Carmicheal et al., 1987). Esse produto uma vez solubilizado em dimetil sulfóxido (DMSO) pode ser quantificado espectrofotometricamente. Essa redução do MTT em cristais de formazan é considerada indicativa da atividade metabólica celular e sua medida é comumente utilizada para se avaliar proliferação e viabilidade celular (Mosmann, 1983; Collier and Pritsos, 2003; Trevisi et al., 2006).

Resumidamente, foram adicionados em cada poço 0,2 mL de meio DMEM contendo MTT a 50 µg/mL, seguido de incubação a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por 2 horas. A seguir, removeu-se o meio com MTT e adicionou-se 0,1 mL de DMSO. Em seguida, agitou-se a placa para total solubilização dos cristais de formazan. Por último, obtiveram-se os valores de absorbância a 550 nm com correção de referência a 800 nm.

### 3.5.1.2. Ensaio de viabilidade NRU

O ensaio de NRU, do inglês *Neutral Red Uptake*, se baseia no acúmulo do corante catiônico Vermelho Neutro (NR) em membranas lisossomotrópicas. NR se difunde através da membrana celular, ficando retido nos lisossomas de células viáveis devido às mudanças de cargas causadas pelo pH ácido lisossomal. O ensaio NRU se resume no tratamento por 2 horas das células em meio DMEM 1,0% SFB (v/v) acrescido de 30 µg/mL de NR a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após lavagens em PBS 1x, elui-se o NR retido no interior dos lisossomas em 0,2 mL de solução de etanol a 50% (v/v) e ácido acético 1,0% (v/v), seguido de incubação por 10 minutos à temperatura ambiente. A incorporação lisossomotrópica do NR foi estimada a 540 nm com correção de referência a 800 nm.

### 3.5.1.3. Ensaio de viabilidade CVS

O ensaio CVS do inglês *Crystal Violet Staining* é um ensaio de marcação citoquímica, que avalia a sobrevivência celular *in vitro* dada pela densidade relativa de células coradas em relação a não coradas. Esse ensaio é realizado na mesma placa em que se avaliou a sobrevivência por NRU conforme elaborado por Martins e colaboradores (2013). Assim, após serem lavadas duas vezes com H<sub>2</sub>O destilada, as células fixadas no ensaio NRU foram coradas com solução de Cristal Violeta 0,02% (p/v) por 5 minutos à temperatura ambiente. Após lavagem em PBS 1x, elui-se o CV em solução 50% (v/v) de etanol acrescido de citrato de sódio 0,1 mol/L, seguido de incubação por 5 minutos à temperatura ambiente. A seguir, após breve agitação, obtiveram-se os valores de absorvância a 585 nm com correção de referência a 800 nm.

### 3.5.2. Princípio da estratégia AAU para mensuração *in vitro* de morte celular por autofagia

Para se mensurar autofagia *in vitro* empregou-se a estratégia de detecção de vacúolos autofágicos pela variável AAU, do inglês, *arbitrary autophagic units* (Unidades Arbitrárias de Autofagia), descrita originalmente por Martins e colaboradores (2013). Sumariamente, essa estratégia baseia-se na marcação de vacúolos autofágicos pelo corante lisossomotrópico NR, usando-se o ensaio NRU acima descrito.

Segundo essa abordagem, durante a indução de morte por autofagia há um acúmulo de NR em autolisossomas ou vacúolos autofágicos tardios em comparação ao controle não tratado, onde se tem em maior frequência lisossomas viáveis. Assim, em decorrência da maior incorporação e retenção do NR em vacúolos autofágicos tardios lisossomotrópicos há uma superestimação da taxa de sobrevivência celular. E, ao se normalizar essa taxa pela média das taxas de sobrevivência celular estimadas pelos ensaios CVS e redução do MTT, tem-se a variável AAU que, quando maior que 1,0, se correlaciona significativamente e linearmente com morte celular autofágica.

### 3.5.3. Análise da indução de estresse oxidativo usando-se a sonda H<sub>2</sub>DCFDA

A formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) foi monitorada pelo ensaio indireto de oxidação da molécula não fluorescente 2',7'- diclorodihidrofluoresceína diacetato – H<sub>2</sub>DCFDA na molécula fluorescente 2',7'- diclorofluoresceína (DCF). Resumidamente, após incubar células HaCaT com os FSs MB (1,0 a 4,0 µmol/L) e DMMB (5,0 a 30 nmol/L) por 1 hora, lavaram-se as células com PBS 1x por duas vezes, seguido de incubação com 10 µmol/L de H<sub>2</sub>DCFDA em tampão PBS 1x por 30 minutos a 37°C. A seguir, as células foram irradiadas a 633 nm, sob a dose de luz de 11 J/cm<sup>2</sup>. Após a fotossensibilização, mantiveram-se as células em gelo e realizou-se a leitura da fluorescência verde com os filtros de excitação (485 nm) e emissão (520 nm). A possibilidade de interferência no ensaio com DCF a partir da sua auto-fotossensibilização não ocorre neste caso, uma vez que a DCF não absorve em 633 nm.

Considerou-se para as análises comparativas, o valor da fluorescência da amostra diminuída do valor da fluorescência *background* local, representado pela fluorescência do corante DCF em um poço sem células. Através da comparação da intensidade de fluorescência normalizada pela densidade celular dada pelo método CVS, pôde-se estimar o grau de oxidação de H<sub>2</sub>DCFDA na população de células HaCaT após TFD.

### 3.5.4. Análise da indução de estresse oxidativo usando a sonda MitoTracker Red (CM-H<sub>2</sub>TMRos)

Para se confirmar os dados obtidos a partir do ensaio com a sonda H<sub>2</sub>DCFDA, a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) também foi monitorada utilizando-se a sonda reduzida MitoTracker Red CM-H<sub>2</sub>XRos, que é um clorometil derivado da dihidroX-rosamina.

O MitoTracker Red CM-H<sub>2</sub>XRos é um corante lipofílico que, por estar reduzido, não fluoresce até entrar numa célula com metabolismo energético ativo e ser oxidado a clorometil

X-rosamina, CMXRos. Em presença de espécies reativas de oxigênio este corante oxida, torna-se catiônico e se concentra no interior da mitocôndria a partir do potencial de membrana negativo desta organela celular. A presença do grupo clorometil (CM) garante o acúmulo desta sonda no interior desta organela ao se ligar covalentemente à nucleófilos nela presentes, por exemplo, os grupos tiol de peptídeos e proteínas (Poot et al., 1996). Assim, apenas EROs mitocondriais são detectadas.

Resumidamente, lavaram-se as células HaCaT uma vez em PBS 1x, seguido de incubação com MitoTracker Red CM-H<sub>2</sub>XRos (1,0 µmol/L) em tampão PBS 1x por 15 minutos a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. A seguir, lavaram-se as células duas vezes em PBS 1x, seguido de incubação com os FSs MB (1,0 e 2,0 µmol/L) e DMMB (5,0 e 10 nmol/L) por 1 hora a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. A seguir, as células foram irradiadas a 633 nm com dose de 11 J/cm<sup>2</sup>. Após a fotossensibilização, lavaram-se as células em PBS 1x acrescido de EDTA a 0,05% (p/v), seguido de tratamento com tripsina durante 10 minutos a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse período, as células tripsinizadas foram transferidas para tubo de microcentrífuga contendo 0,5 mL de meio DMEM a 1,0% SFB (v/v) e concentradas por centrifugação a 600 g por 5 minutos à temperatura ambiente. A seguir, lavou-se esse precipitado celular seguido de centrifugação a 600 g por 5 minutos à temperatura ambiente. Por último, ressuspenderam-se as células em PBS 1x acrescido de EDTA a 0,05% (p/v) e detectou-se a fluorescência vermelha da sonda por citometria de fluxo com os filtros de excitação (488/633 nm) e emissão (645 nm).

### **3.5.5. Avaliação da indução de vacúolos autofágicos e da indução de necrose**

A indução de morte autofágica dada pelo acúmulo de vacúolos autofágicos tardios ou autolisossomas em células HaCaT foi avaliada 0, 3 e 48 horas após a fotoativação dos FSs MB a 2,0 µmol/L e DMMB 10 nmol/L, usando-se o marcador laranja de acridina (AO, do inglês *Acridine Orange*). Como controle utilizou-se a droga indutora de autofagia, Cloroquina

(CQ) a 60  $\mu\text{mol/L}$ , incubada a 37°C 5%  $\text{CO}_2$  por 24 horas (Martins et al., 2013). A Cloroquina é uma base fraca que se concentra em vesículas ácidas, como os lisossomas/endossomos, esta molécula bloqueia o fluxo autofágico normal, uma vez que impede a degradação lisossomal de vacúolos autofágicos, provocando o acúmulo de autofagossomas ou de autolisossomas não digeridos devido à diminuição de lisossomas viáveis para degradar seus conteúdos com sucesso (Geng et al., 2010; Yoon et al.; 2010), resultando assim em morte celular autofágica (Martins et al., 2013).

Assim como o NR, AO é um agente acidotrópico/lisossomotrópico fracamente básico que se acumula, na sua forma ionizada, especificamente em ambientes celulares ácidos, endossomo/lisossoma. Uma vez ionizada, AO formam agregados que sob excitação a 488 nm emitem fluorescência laranja-vermelha, cuja intensidade se mostra proporcional tanto à acidez quanto ao volume e ao acúmulo de vacúolos autofágicos tardios (Traganos and Darzynkiewicz, 1994; Paglin et al., 2001). Moléculas de AO que se encontram no citoplasma e no núcleo estão na sua forma não ionizada emitindo uma fluorescência verde sob excitação a 488 nm (Ditaranto, Tekirian and Yang, 2001).

A indução de necrose foi investigada usando-se o marcador iodeto de propídeo (IP), que, em decorrência de seu tamanho, é incorporado apenas por células que apresentam comprometimento de membrana plasmática, intercalando-se ao DNA picnótico característico de células necróticas. O acúmulo de IP também pode ser visualizado em células em apoptose tardia (necrose secundária), que apresentam permeabilidade de membrana, núcleo aumentado e com condensação de cromatina (Ormerod et al., 1993). Após a fotoativação dos FSs a 633 nm sob a dose de luz de 11  $\text{J/cm}^2$ , incubaram-se as células em 1,0  $\mu\text{g/mL}$  de AO e de IP por 10 minutos a 37°C e 5% de  $\text{CO}_2$ . Após lavar por duas vezes em PBS 1x, as células foram observadas ao microscópio invertido de epifluorescência Zeiss. A fluorescência do marcador

AO foi detectada usando-se o filtro 09 (Zeiss) que promove excitação a 450-490 nm com emissão *long pass* (LP) de 515 nm.

### **3.5.6. Avaliação da indução de vacúolos autofágicos por imunofluorescência LAMP2A e LC3-II**

Para se confirmar os dados de AAU após indução de fototoxicidade pelos FSs MB e DMMB, assim como avaliar o fluxo autofágico, realizou-se o ensaio de imunofluorescência colocalizada para as proteínas de marcação de autofagossoma, LC3-II, e de marcação lisossomal, LAMP2A, usando-se microscopia confocal. Ao se analisar a força de colocalização desses dois marcadores, torna-se possível avaliar o status do fluxo autofágico, conforme sugerido por Klionsky e colaboradores (2008). Havendo colocalização significativa dada pelo coeficiente de correlação de Mander (1993), assume-se que há um fluxo autofágico normal, caracterizado pela fusão do autofagossoma com o lisossoma formando-se o vacúolo autofágico tardio ou autolisossoma. Essa análise de correlação foi realizada usando-se o plugin “*Colocalization analysis*” do Image J (National Institutes of Health, Bethesda), um software para processamento e análise de imagens.

A indução de vacúolos autofágicos em células HaCaT foi verificada 6 horas após a fotoativação ( $11 \text{ J/cm}^2$ ) do FS MB a  $2,0 \text{ } \mu\text{mol/L}$  e do DMMB a  $10 \text{ nmol/L}$ . Como controle positivo para indução de autofagia trataram-se as células com CQ a  $60 \text{ } \mu\text{mol/L}$  (Martins et al., 2013) em meio DMEM suplementado com 1% (v/v) de SFB, e as manteve a  $37^\circ\text{C}$  e 5% de  $\text{CO}_2$  por 24 horas.

Após os tratamentos, as células aderidas em lamínulas foram lavadas em PBS 1x e, em seguida, fixadas em solução tamponada de formaldeído a 4% (p/v) por 15 minutos à temperatura ambiente. Após fixação, as células foram lavadas três vezes com PBS 1x gelado, em intervalos de 5 minutos. Após o bloqueio por 1 hora à temperatura ambiente em solução de PBS 1x contendo Triton X-100 a 0,3% (v/v) e Albumina de Soro Bovino 5% (p/v),



incubaram-se as lamínulas *overnight* a 4°C em presença dos anticorpos primários monoclonais de coelho anti-LC3-II e de camundongo anti-LAMP2A diluídos respectivamente 1:200 e 1:100 em PBS 1x contendo 1% (p/v) de Albumina de Soro Bovino e Triton X-100 a 0,3% (v/v).

Após o período de incubação do anticorpo primário, lavaram-se três vezes as lamínulas em PBS 1x, seguido de incubação em PBS 1x acrescida de Triton X-100 a 0,3% (v/v) contendo anticorpos secundário anti-IgG de coelho conjugado com Alexa-488 e anti-IgG de camundongo conjugado com Alexa-633 ambos diluídos 1:500. Finalmente, após lavagens consecutivas em PBS 1x, montaram-se as lamínulas com Prolong-DAPI para detecção das imagens em microscópio confocal. Os filtros de excitação e emissão de fluorescência utilizados foram os seguintes: para visualizar o marcador nuclear DAPI, 362 nm/475 nm (emissão na cor azul); Alexa 488, 488 nm/520 nm (emissão na cor verde) e Alexa 633, 547 nm/630 nm (emissão na cor vermelha).

### **3.5.7. Comprometimento lisossomal avaliado pela atividade de $\beta$ -D-galactosidase**

A enzima  $\beta$ -D-galactosidase é uma hidrolase lisossômica eucariótica com atividade máxima em pH ácido (pH 4.0 a 5.0). Ela catalisa a clivagem de resíduos de galactose terminal em ligações  $\beta$  de substratos naturais, como, gangliosídeos, glicoproteínas e glicosaminoglicanos, bem como de substratos artificiais (Suzuki et al., 1980, O'Brien, 1989).

A análise de sua atividade em pH subótimo (pH 6.0) tem sido associada à senescência celular (Dimri et al., 1995), uma vez que, apesar de sua atividade não ser necessária à ocorrência de senescência, observou-se que em células senescentes há um aumento do nível de  $\beta$ -D-galactosidase e seu acúmulo nos lisossomas, podendo assim ser detectada mesmo em condições subótimas de pH (Lee et al., 2006). Contudo, pode-se também empregá-la para avaliação do status lisossomal de uma célula após determinado tratamento, conforme proposto originalmente nesse trabalho. Para isso, avaliou-se a atividade da  $\beta$ -D-galactosidase

lisossomal através de um ensaio citoquímico realizado em pH ótimo a 5.0, utilizando-se o substrato cromogênico 5-bromo-4-cloro-3-indolil  $\beta$ -D-galactopiranosídeo (X-Gal). Após a clivagem desse composto há formação de um composto insolúvel azul (Miller, 1972), cuja intensidade de marcação avaliada por microscopia de luz se correlaciona linearmente com a atividade da  $\beta$ -D-galactosidase lisossomal, conforme proposto por Debacq-Chainiaux e colaboradores (2009). Ao analisar as imagens geradas usando-se o plugin “*Segmentation*”, disponibilizado no Image J (National Institutes of Health, Bethesda), foi possível avaliar quantitativamente as marcações obtidas.

Essa análise do status lisossomal se deu 120 horas após a indução da citofototoxicidade promovida pelos FSs MB a 2,0  $\mu$ mol/L e DMMB a 10 nmol/L. Resumidamente, lavaram-se as células HaCaT por duas vezes em PBS 1x, seguido de fixação em solução tamponada de formaldeído a 2% (v/v) e glutaraldeído a 0.2% (v/v), durante 15 minutos à temperatura ambiente. Após lavagens por duas vezes em PBS 1x, incubaram-se as células a 37°C em ausência de CO<sub>2</sub>, por 16 horas, em solução de marcação da  $\beta$ -D-galactosidase contendo 1 mg/mL de 5-bromo-4-cloro-3-indolil  $\beta$ -D-galactopiranosídeo (X-Gal), ácido cítrico/ tampão fosfato de sódio pH 5.0 a 40 mmol/L, ferrocianeto de potássio (K<sub>4</sub> [Fe(CN)<sub>6</sub>]) a 5,0 mmol/L, ferricianeto de potássio (K<sub>3</sub> [Fe(CN)<sub>6</sub>]) a 5,0 mmol/L, NaCl a 150 mmol/L e MgCl<sub>2</sub> a 2,0 mmol/L. Após a coloração por 16 horas a 37°C as células foram lavadas em PBS 1x por duas vezes. As imagens foram obtidas por microscopia de transmissão e avaliaram-se quantitativamente as marcações obtidas usando-se o plugin “*Segmentation*”, disponibilizado no Image J (National Institutes of Health, Bethesda).

### **3.5.8. Análise do comprometimento mitocondrial após TFD por detecção de fluorescência de Rodamina 123 por citometria de fluxo**

A citometria de fluxo por fluorescência (Fluorescence Activated Cell Sorting ou FACS) é uma técnica que permite determinar propriedades quantitativas e qualitativas de

moléculas e organelas de células suspensas em meio líquido em fluxo. Para isso, células previamente coradas com fluorocromos de interação específica são excitadas pelo laser, emitem luz de acordo com suas características fluorescentes, podendo-se então examinar aspectos bioquímicos, biofísicos e moleculares das mesmas.

Para análise do dano mitocondrial após a TFD utilizou-se o fluoróforo catiônico Rodamina 123 (R123), este é permeável à membrana celular e incorpora-se em mitocôndrias metabolicamente ativas devido à diferença de potencial de membrana dessa organela (Emaus, Grunwald and Lemasters, 1986). Para isso, foram plaqueadas aproximadamente  $6 \times 10^5$  células HaCaT em placas de 6 poços, as quais foram mantidas por 24 horas a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. Após esse período as células foram lavadas em PBS 1x e incubadas com DMMB e MB por 1 hora. Seguido de lavagem em PBS 1x por duas vezes e posterior irradiação no comprimento de onda a 633 nm, na dose de 11 J/cm<sup>2</sup>. Imediatamente após a irradiação, as células foram incubadas com R123 a 500 nmol/L por 30 minutos. Passado 30 minutos, lavaram-se as células uma vez em PBS 1x e uma vez em PBS 1x/EDTA 0,05% (p/v) e acrescentou-se 0,3 mL de tripsina por 5 minutos. Após as células serem tripsinizadas, adicionou-se 0,5 mL de meio DMEM a 10% (v/v) de SFB, para inativação da tripsina, e transferiram-se as células para tubos de 2,0 mL para serem centrifugadas a 300 g por 5 minutos a 4°C. Após o descarte do sobrenadante, ressuspendeu o precipitado em 0,2 mL de PBS 1x/EDTA 0,05% (p/v) a 4°C. Os tubos foram novamente centrifugados a 300 g por 5 minutos. Por último, descartou-se o sobrenadante seguido de ressuspensão do precipitado celular em 0,2 mL de solução de PBS 1x/EDTA 0,05% (p/v). A fluorescência da sonda R123 foi medida por citometria de fluxo com filtros de excitação a 488 nm e emissão a 550 nm.

### **3.5.9. Ensaio de cito-localização dos FSs**

A cito-localização dos FSs pode ser determinada de maneira eficiente e com elevada resolução através da microscopia confocal de varredura a laser, a partir do ensaio de

colocalização de sondas específicas para organelas celulares que possuem máximos de emissão de fluorescência diferentes dos FSs (Wilson, Olivo and Singh, 1997).

A fim de analisar a localização subcelular dos FSs MB e DMMB através da microscopia confocal, células HaCaT ( $3 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>) foram plaqueadas em lamínulas de vidro. Após 18 horas de plaqueamento, incubaram-se as células com os FSs MB e DMMB por 1 hora a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, faltando meia hora para o término da incubação com os FSs, adicionou-se o marcador mitocondrial R123, na concentração de 300 nmol/L. Para marcação lisossomal, após a 1 hora de incubação com os FSs, incubou-se as células com o marcador Lysotracker Green na concentração de 300 nmol/L imediatamente antes da análise ao microscópio. O Lysotracker Green é constituído por uma sonda fluorescente ligada a uma base fraca parcialmente protonada em pH neutro, esta sonda é altamente permeável em membranas celulares e capaz marcar seletivamente organelas que possuem pH ácido, incluindo lisossomos, que mediante a protonação permanece ligada a tais organelas.

Após a marcação, as lamínulas foram lavadas com PBS 1x gelado e transferidas para lâmina de vidro para análise por microscopia confocal de varredura à laser, utilizando filtro de excitação a 488 nm e detectando a emissão em 505-530 nm (verde) para visualização dos marcadores das organelas e filtro excitando a 633 nm e detectando a 651-704 nm (vermelho) para visualização da emissão de fluorescência dos FSs.

As imagens obtidas foram tratadas por técnicas de deconvolução 2D através do software MetaMorph 6.3r2, Molecular Devices, utilizado também para determinar a porcentagem de colocalização entre os FSs e os marcadores de organelas, a partir do cálculo de integral da área, num determinado plano cartesiano, da fluorescência emitida por ambos fluoróforos.

### **3.5.10. Indução de morte celular autofágica em células HaCaT após fotoativação do MB**

A fim de verificar a ocorrência de acúmulo de vacúolos ácidos autofágicos após fotoativação do MB, células HaCaT ( $3 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>) foram plaqueadas em lamínulas de vidro, após 18 horas de plaqueamento incubaram-se as células com os indutores de mitofagia, conforme descrito por Frank e colaboradores (2012), peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 3,3 mmol/L em meio DMEM 1% SFB por 10 minutos a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, ou rotenona 1 µmol/L em meio DMEM 1% SFB por 1 hora a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, seguido de incubação com MB 0,5 µmol/L por 1 hora e posterior fotoativação a 633 nm, na dose de 11 J/cm<sup>2</sup>. Passado 48 horas de tratamento, incubaram-se as células com 1,0 µg/mL de AO por 10 minutos a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após lavar por duas vezes em PBS 1x, as células foram observadas ao microscópio invertido de epifluorescência Zeiss. A fluorescência do marcador AO foi detectada usando-se o filtro 09 (Zeiss) que promove excitação a 450-490 nm com emissão *long pass* (LP) de 515 nm. Sob essas mesmas condições de tratamento, células HaCaT foram submetidas a ensaios de viabilidade celular e cálculo de AAU, conforme descrito nos tópicos 3.5.1.1, 3.5.1.2, 3.5.1.3 e 3.5.2, para verificação de citotoxicidade e morte celular autofágica.

Nas condições definidas por Frank e colaboradores (2012), o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 3,3 mmol/L por 10 minutos induz um desbalanço oxidativo intracelular baixo e transitório, e a rotenona a 1 µmol/L por 1 hora inibe a atividade do complexo I mitocondrial levando a formação moderada de EROs nas mitocôndrias. Assim, ambas as moléculas causam danos pequenos e seletivos nas mitocôndrias, levando especificamente à mitofagia como um mecanismo de reparo e recuperação da homeostase celular sem afetar a viabilidade das células.

### **3.5.11. Efeitos da TFD induzida por DMMB e MB em células HeLa**

Para avaliar os efeitos da TFD com os FSs DMMB e MBs em outra linhagens celulares além da HaCaT, realizaram-se as mesmas metodologias descritas nos tópicos 3.5.1.1, 3.5.1.2, 3.5.1.3, 3.5.2 e 3.5.5 utilizando-se células de adenocarcinoma de útero humano (HeLa).

### **3.5.12. Análise estatística dos dados**

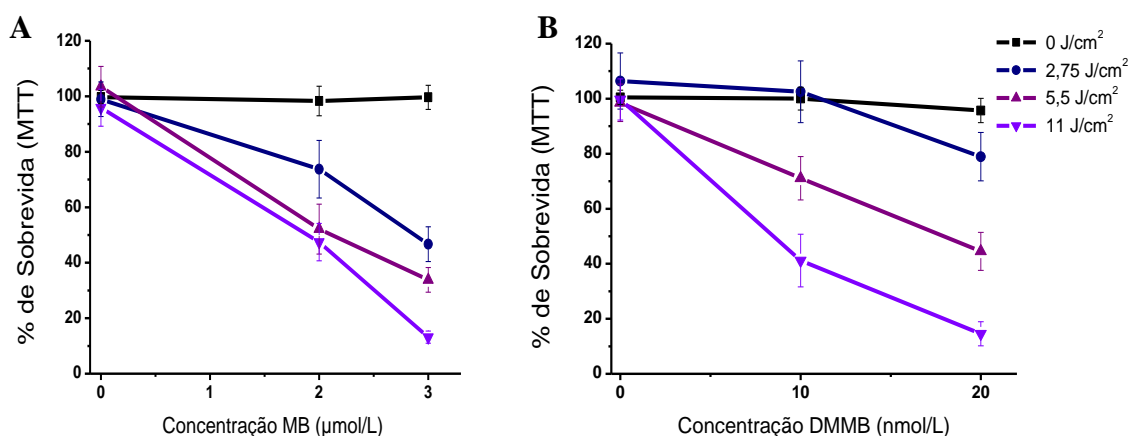
Para análise de dados numéricos utilizou-se o programa Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation, Redmond, WA). Para a construção e análise de gráficos utilizou-se o software OriginPro 7.0 (Origin Lab Corporation, Northampton, MA). Os resultados são apresentados sob a forma de média  $\pm$  desvio padrão, e as barras de erro são desvios padrão de um conjunto de dados.

Para análise estatística de correlação foi empregado o software para Windows SPSS 13.0, na análise comparativa aplicaram-se testes estatísticos para amostras pareadas. Antes de se realizar tais testes, aplicou-se o teste de Kolmogorov-Sminorv para se avaliar a aderência de uma variável à distribuição normal. Em casos de distribuição Gaussiana foram aplicados testes paramétricos T de Student-pareado e de Pearson, caso contrário utilizaram-se testes não-paramétricos de Wilcoxon e Spearman's.

## 4. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

### 4.1. Sobrevida celular de células HaCaT em função da concentração de FS e da dose de luz ( $\text{J}/\text{cm}^2$ )

As taxas de sobrevida de células HaCaT foram determinadas 48 horas após a fotoativação do MB e DMMB em diferentes concentrações, nas doses de luz de  $2,7 \text{ J}/\text{cm}^2$ ;  $5,5 \text{ J}/\text{cm}^2$  e  $11 \text{ J}/\text{cm}^2$  a  $633 \text{ nm}$ , a partir do ensaio colorimétrico MTT (Figura 5).

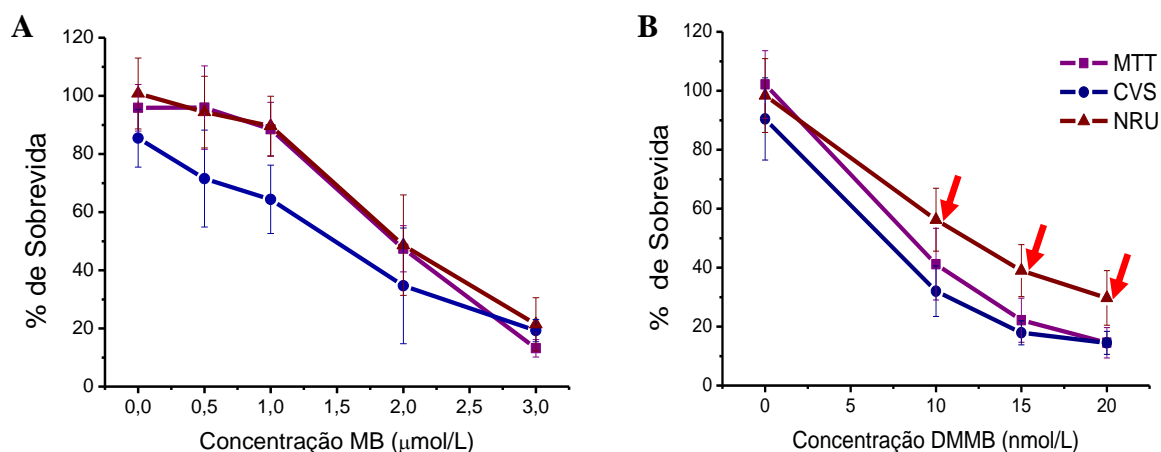


**Figura 5:** Curva de dose-resposta 48 h após a fotoativação do MB (0; 2,0 e 3,0  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ) (A) e DMMB (0; 10 e 20,0  $\text{nmol}/\text{L}$ ) (B) escuro (ausência de luz - 0  $\text{J}/\text{cm}^2$ ) e sob as doses de luz de 2,75; 5,5 e 11  $\text{J}/\text{cm}^2$ . A sobrevida média foi calculada a partir de três experimentos independentes. A dispersão dos dados está representada pelo desvio padrão-médio.

Observa-se claramente que nas concentrações estudadas ambos os FSs no escuro (não irradiados) não são citotóxicos para células HaCaT. Entretanto, após a fotoativação a  $633 \text{ nm}$  observa-se a diminuição da sobrevida celular com o aumento da dose de luz. Observa-se também a diminuição da sobrevida com o aumento da concentração de ambos FSs analisados (Figura 5). Nota-se também que, a faixa de concentração na qual os compostos são fototóxicos é bem distinta. No caso do DMMB a fototoxicidade é observada na faixa de nanomolar e no caso do MB, a faixa é micromolar.

Para continuar a análise comparativa dos efeitos biológicos dos FSs após irradiação, considerou-se a dose de luz  $11 \text{ J}/\text{cm}^2$ , uma vez que nesta dose de luz detectou-se nas

concentrações de 2,0  $\mu\text{mol/L}$  para o MB e de 10  $\text{nmol/L}$  para o DMMB o valor do  $\text{IC}_{50}$  (Figura 6). Nota-se que no caso do DMMB há um aumento aparente da sobrevivida quando a medida é realizada por NRU, o que é sugestivo de morte celular autofágica (Figura 6B) (Martins et al., 2013).



**Figura 6:** Curva dose-resposta 48 h após a fotoativação do MB (0 a 3,0  $\mu\text{mol/L}$ ) (A) e do DMMB (0 a 20  $\text{nmol/L}$ ) (B). Irradiado a 633 nm, na dose de 11  $\text{J/cm}^2$ . Ensaio de viabilidade pelos métodos de redução do MTT, acúmulo de vermelho neutro (NRU) e de marcação citoquímica com cristal violeta (CVS). A sobrevivida média foi calculada a partir de três experimentos independentes. A dispersão dos dados está representada pelo desvio padrão-médio. Setas indicam valores de NRU acima das medidas de sobrevivida quantificada pelos outros dois métodos.

O índice de morte celular após fotoativação do DMMB foi obtido numa concentração significativamente menor do que a concentração do MB (na escala de duas ordens de grandeza), em todas as doses de luz analisadas (Figura 5). Desta forma, pode-se afirmar que o DMMB apresenta maior eficiência fotodinâmica quanto à indução de morte celular do que o MB. Dados semelhantes de fototoxicidade entre o DMMB e o MB foram observados por Waingwright e colaboradores (1997) em células de tumor mamário murino (EMT-6) pelo teste colorimétrico de redução do MTT. Como já comentado na introdução, essa maior eficiência foi justificada devido ao caráter mais lipofílico e ao menor potencial de redução do DMMB em relação ao MB.

Considerando que a eficiência fotodinâmica tem sido geralmente relacionada com a eficiência de geração de EROs, a maior eficiência do DMMB sugere que este FS pode gerar um maior nível de desbalanço redox. No entanto, esta relação não é necessariamente



verdadeira, uma vez que outros fatores, como o mecanismo de morte celular fotoinduzido e a citolocalização dos FSS, também estão relacionados com a eficiência de morte celular.

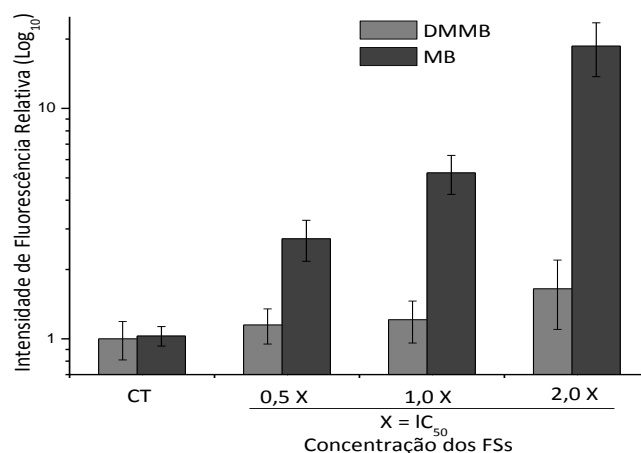
#### **4.2. Mensuração de EROs a partir da fluorescência de H<sub>2</sub>DCFDA e de MitoTracker Red**

As quantificações de vários parâmetros do desbalanço redox têm sido comumente realizadas através de sondas fluorescentes. Neste trabalho utilizaram-se duas sondas, H<sub>2</sub>DCFDA e MitoTracker Red.

Apesar das limitações na interpretação do aumento de fluorescência de H<sub>2</sub>DCFDA pela formação de DCF (Kalyanaraman et al., 2012), empregamos essa metodologia como uma abordagem de mensuração de EROs após fotossensibilização das células HaCaT em presença de MB e DMMB, na dose de luz de 11 J/cm<sup>2</sup> e nas concentrações dentro do intervalo em que se analisou a morte celular fotoinduzida. Este tipo de ensaio não sofre as principais interferências nos ensaios de DCF, uma vez que se trabalhou com a mesma linhagem celular e a única variável alterada foi justamente a quantidade de espécies reativas geradas por excitação em luz visível. Não houve, também, possibilidades de fotossensibilização da sonda e conseqüente geração estresse oxidativo pela mesma, uma vez que a DCF não absorve no comprimento de onda de excitação dos FSS analisados (633 nm) (Daghasanli, Itri and Baptista, 2008).

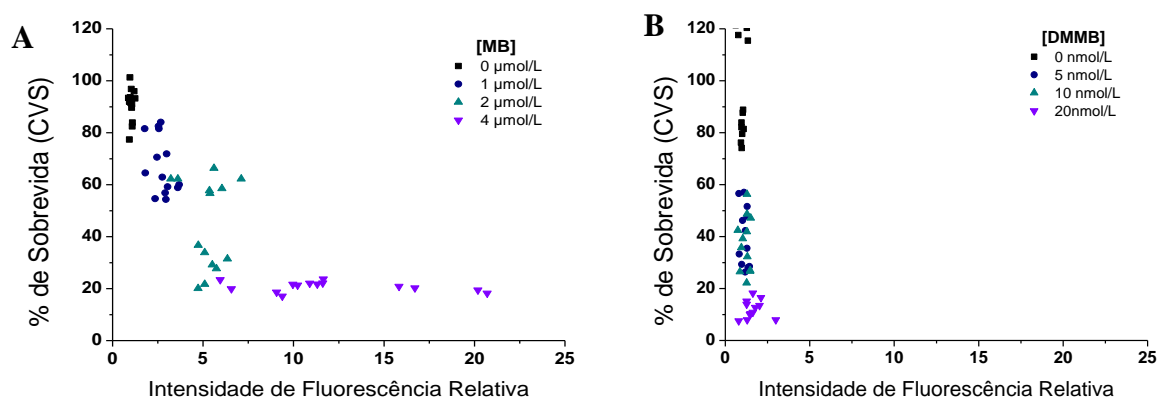
Como se pode observar no gráfico de intensidade de fluorescência relativa de DCF em função da concentração dos FSS, que está expressa em função dos múltiplos do valor de IC<sub>50</sub> (Figura 7), a intensidade de fluorescência de DCF aumenta proporcionalmente ao aumento da concentração de MB (1,0 a 4,0 µmol/L), indicando que a geração de EROs e a eficiência de morte celular aumentam proporcionalmente ao aumento da concentração do MB. Já a intensidade de fluorescência de DCF emitida após fotossensibilização do DMMB, nas concentrações 5,0 a 20 nmol/L, não sofre grandes variações e é menor em uma ordem de

grandeza àquela emitida após fotossensibilização do MB. Esse resultado mostra-se contrário ao paradigma “quanto mais EROs mais morte celular”, pois, no caso da fotossensibilização do DMMB, há morte celular sem um aumento significativo na fluorescência de DCF, ou seja, sem a geração de EROs capaz de ser detectada pela tal sonda (Figura 7).



**Figura 7:** Gráfico da análise de intensidade de fluorescência relativa de DCF em função dos múltiplos de  $IC_{50}$  dos FSS MB ( $X = 2,0 \mu\text{mol/L}$ ) e DMMB ( $X = 10 \text{ nmol/L}$ ), após fotoativação a 633 nm e dose de  $11 \text{ J/cm}^2$ . A dispersão dos dados está representada pelo desvio padrão-médio. CT, corresponde à células controle, não tratadas com FSS.

Os resultados de desbalanço oxidativo, obtidos no intervalo de concentração dos FSS que incluem seus respectivos valores de  $IC_{50}$ , foram correlacionados com os dados fototoxicidade através da construção e análise de gráficos de dispersão (Figura 8).

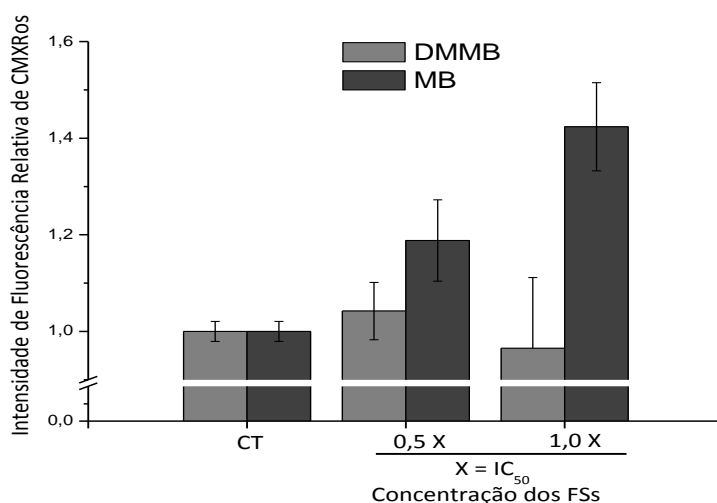


**Figura 8:** Correlação linear entre fluorescência relativa de DCF e sobrevivência celular dada por CVS após a fotoativação dos FSS em diferentes concentrações de MB (0 a  $4,0 \mu\text{mol/L}$ ) (A) e DMMB de (0 a  $20 \text{ nmol/L}$ ) (B), a 633 nm na dose de  $11 \text{ J/cm}^2$ . Coeficientes de correlação linear foram calculados segundo o teste não-paramétrico de correlação de Spearman.

Conforme demonstrado na Figura 8A, há uma correlação forte e significativa ( $Rho = -0,8$ ;  $p = 10^{-6}$ ) entre os níveis de EROs gerados pela fotossensibilização do MB e a diminuição de sobrevivência celular. O mesmo não ocorre após fotossensibilização do DMMB (Figura 8B), em que a correlação entre o nível EROs e a diminuição de sobrevivência celular é muito pequena ( $Rho = -0,5$ ;  $p = 5 \times 10^{-4}$ ).

Esses resultados indicam que a morte das células HaCaT após a fotoativação do DMMB incorporado tem pequena correlação com a quantidade de EROs gerada, uma vez que o aumento na concentração do FS aumenta o índice de morte celular sem alterações no nível de EROs gerado (Figura 8B).

A fim de confirmar os resultados obtidos com a sonda  $H_2DCFDA$ , o desbalanço oxidativo gerado após a fotossensibilização também foi mensurado utilizando a sonda MitoTracker Red (CM- $H_2XRos$ ), a partir da análise de emissão de fluorescência em função da concentração de FS, que também está expressa em função de múltiplos do  $IC_{50}$  (Figura 9).



**Figura 9:** Gráfico da análise de intensidade de fluorescência relativa de CMXRos para detecção de EROs após fotoativação dos FS MB e DMMB a 633 nm, na dose de  $11 J/cm^2$ . A concentração dos FSs está em função dos seus valores fracionais de  $IC_{50}$  ( $X = 2,0 \mu mol/L$  para MB e  $X = 10 nmol/L$  para DMMB). A dispersão dos dados está representada pelo desvio padrão. CT, corresponde à células controle, não tratadas com FS.

Ratificando os dados obtidos pelo ensaio com DCF, a correlação entre fluorescência de CMXRos e concentração de FS, após fotossensibilização das células HaCaT, foi significativa apenas para o MB ( $Rho = 0,7$   $p = 0,021$ ). Esses dados corroboram com a

correlação direta entre fototoxicidade do MB e desbalanço oxidativo. Nota-se que, após fotossensibilização das células HaCaT em presença do DMMB, o aumento da concentração deste FS não resultou em aumento significativo da intensidade de fluorescência de CMXRos ( $Rho = -0,2$   $p = 0,45$ ) (Figura 9).

Portanto, destaca-se que a eficiência de fototoxicidade do DMMB não está relacionada com um desbalanço oxidativo suficiente para ser mensurado pela oxidação destas sondas, sugerindo que este composto é capaz de induzir morte celular com pequenas concentrações de EROs. Uma vez que a elevada eficiência de morte celular do DMMB não está relacionada à maior eficiência de geração de EROs, investigou-se se o DMMB estaria induzindo um mecanismo específico de morte celular programada.

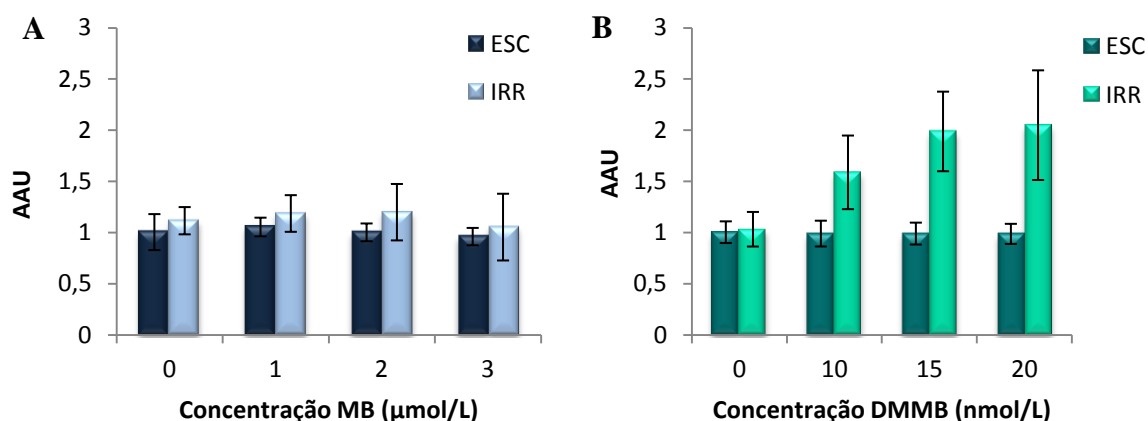
#### **4.3. Detecção de autofagia *in vitro***

A análise de detecção de autofagia foi inicialmente realizada a partir do perfil de incorporação do NRU em comparação com CVS e MTT (Martins et al., 2013). Esta estratégia, conforme descrito no item 3.5.2, está baseada na maior captação de vermelho neutro em caso de morte autofágica, uma vez que este corante tem afinidade por vacúolos ácidos, que estão presentes em maior quantidade em células realizadoras do processo autofágico. Sendo assim, a avaliação de porcentagem de sobrevivência por NRU fornece um valor superestimado. Quando o valor de sobrevivência obtido por NRU é comparado com os valores de sobrevivência obtidos por CVS e MTT obtém-se o valor de AAU (do inglês *autophagy arbitrary units*). Valores de AAU acima de 1,0 indicam morte celular por autofagia (Martins et al., 2013) e quanto maior este valor, maior é a correlação com morte celular programada tipo II (autofagia).

Observou-se que, após fotossensibilização de células HaCaT com dose de luz de 11  $J/cm^2$  em presença de DMMB, o valor de sobrevivência celular avaliado pelo ensaio NRU estava superestimado (Figura 6B, setas indicativas), não correspondendo àqueles medidos pelos

ensaios de redução do MTT e CVS. Conforme proposto por Martins e colaboradores (2013), essa discrepância se deve à maior incorporação de NR por vacúolos ácidos autofágicos (autolisossomas/anfissomos) em células fotossensibilizadas em comparação ao controle não-irradiado, em que o NR é incorporado apenas por lisossomas viáveis. Após a fotossensibilização em presença de MB, diferente do observado para o DMMB, os valores de sobrevivência pelos ensaios de NRU, MTT e CVS foram semelhantes (Figura 6A), não apresentando assim indícios de excesso de vacúolos ácidos quantificados pelo ensaio de NRU.

Diante deste resultado prévio, calculou-se o valor de AAU 48 horas após fotossensibilizar as células HaCaT com MB e DMMB. Este foi graficado em histogramas conforme podemos observar na Figura 10.



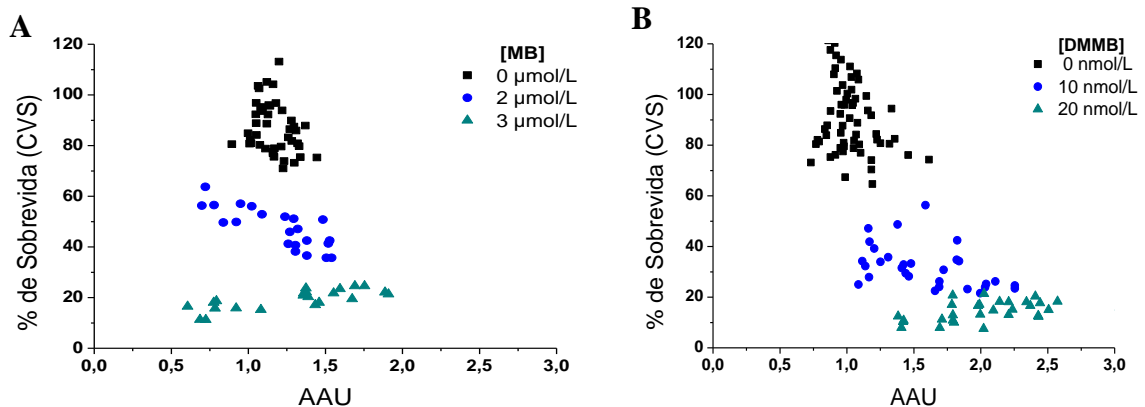
**Figura 10:** Histograma com os valores de AAU calculados a partir dos ensaios de viabilidade MTT, CVS e NRU, 48 h após o tratamento com os FSs, MB nas concentrações de 1,0 a 3,0 µmol/L (A) e com DMMB nas concentrações de 10 a 20 nmol/L (B). AAU média foi calculada a partir de três experimentos independentes. A dispersão dos dados está representada pelo desvio padrão médio. ESC: Escuro; IRR: Irradiado a 633 nm na dose de 11 J/cm<sup>2</sup>.

O histograma com valores de AAU para as células tratadas com MB mostra que, à medida que a concentração desse FS aumenta, os valores de AAU permanecem em torno de 1,0, não apresentando variações significativas tanto em células no escuro quanto nas irradiadas a 633 nm, na dose de luz de 11 J/cm<sup>2</sup> (Figura 10A), indicando ausência de morte celular por autofagia.

Cálculos de correlação entre AAU e sobrevivência celular dependente da concentração de MB segundo o teste não-paramétrico de correlação de Spearman, mostraram que não há

correlação relevante entre valores de AAU e diminuição da sobrevivência celular após fotossensibilização do MB ( $Rho = -0,5$   $p < 0,001$ ) (Figura 11A), sugerindo que a diminuição observada na viabilidade das células HaCaT esteja correlacionada com outros mecanismos de morte celular diferente da autofagia. Trabalhos anteriores já demonstraram o desencadeamento de morte celular por apoptose após TFD com MB em células HeLa (Lu et al., 2008), em células de melanoma murino (B16F1) (Chen et al., 2008) e em célula de adenocarcinoma de pulmão (Lim et al., 2013).

Diferente do que foi observado após TFD com MB, os valores de AAU para as células HaCaT sob TFD com DMMB foram maiores que 1,0 e crescentes a medida que a concentração de DMMB aumentava (Figura 10B), confirmando os dados de super estimação de sobrevivência pelo ensaio com vermelho neutro, observados na Figura 6B. Desta forma, foi possível avaliar estatisticamente, a partir do coeficiente de correlação de Spearman, a associação da diminuição da sobrevivência após a fotoativação do DMMB com o aumento dos valores de AAU ( $Rho = -0,9$   $p < 0,001$ ) (Figura 11B), sugerindo que a fotossensibilização das células HaCaT em presença de DMMB induz morte celular por autofagia.

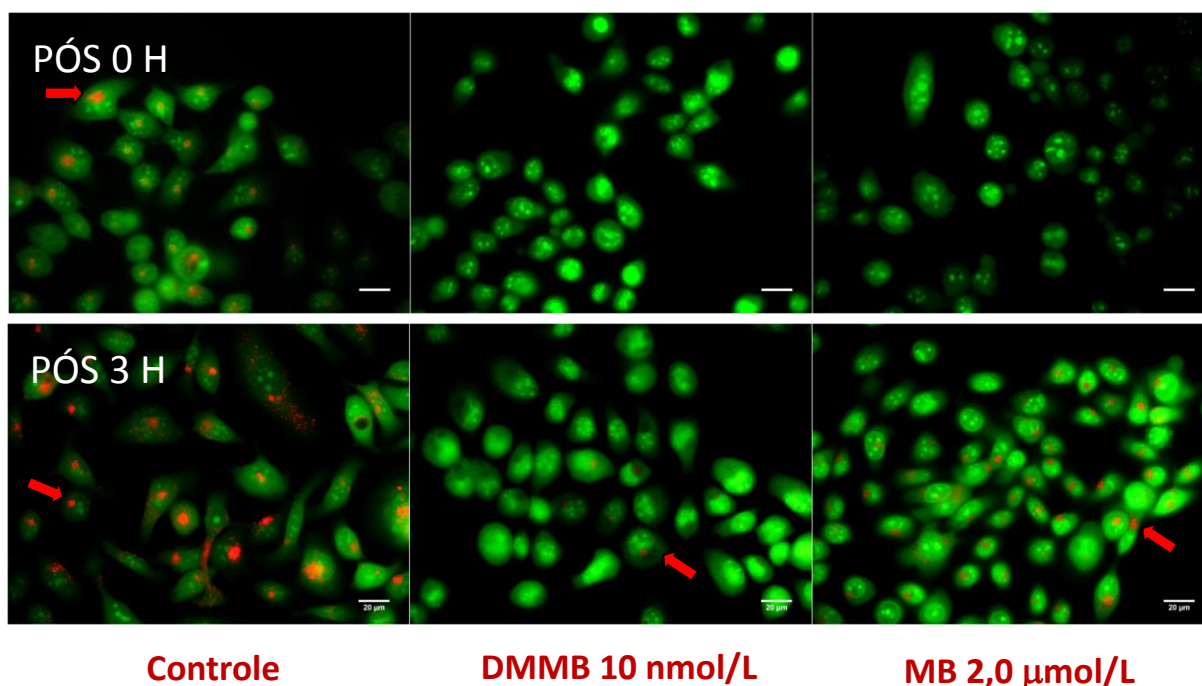


**Figura 11:** Correlação linear entre AAU e sobrevivência celular dada por CVS após a fotoativação dos FSs em diferentes concentrações de MB (0 a 3,0 µmol/L) (A) e DMMB de (0 a 20 nmol/L) (B), a 633 nm na dose de 11 J/cm<sup>2</sup>. Coeficientes de correlação linear foram calculados segundo o teste não-paramétrico de correlação de Spearman.

#### 4.4. Detecção de vacúolos autofágicos por fluorescência de AO

Após identificarmos a correlação entre os valores de AAU e a sobrevivência celular após o tratamento com MB e DMMB, validou-se a indução de autofagia usando o ensaio de detecção de fluorescência de laranja de acridina (AO), amplamente aplicado para identificação de ambientes celulares ácidos, endossomo/lisossoma e vacúolos autofágicos tardios (anfissomos e autolisossomas) (Paglin et al., 2001).

A fim de se visualizar o acúmulo de vacúolos autofágicos tardios, ou autolisossomas, e a presença de dano na membrana citoplasmática, células HaCaT tratadas com os FSs foram marcadas com AO e IP 0 hora e 3 horas após a TFD (Figuras 12). Para ambos FSs nas respectivas concentrações de  $IC_{50}$  não houve indução de necrose em nenhum dos tempos avaliados, uma vez que não se observaram células com núcleos picnóticos marcados com IP.



**Figura 12:** Análise de vacúolos ácidos e de necrose dada pela marcação com AO e IP, respectivamente, 0 h e 3 h após a fotoativação de células HaCaT em presença dos FSs DMMB 10 nmol/L e MB 2,0 μmol/L, a 633 nm na dose de 11 J/cm<sup>2</sup>. Controle: células não tratadas com FSs. Setas vermelhas indicam células com lisossomas viáveis. Aumento de 520X. Escala 20 μm. Todas as imagens representam campos aleatórios a partir de duas repetições de dois experimentos independentes.

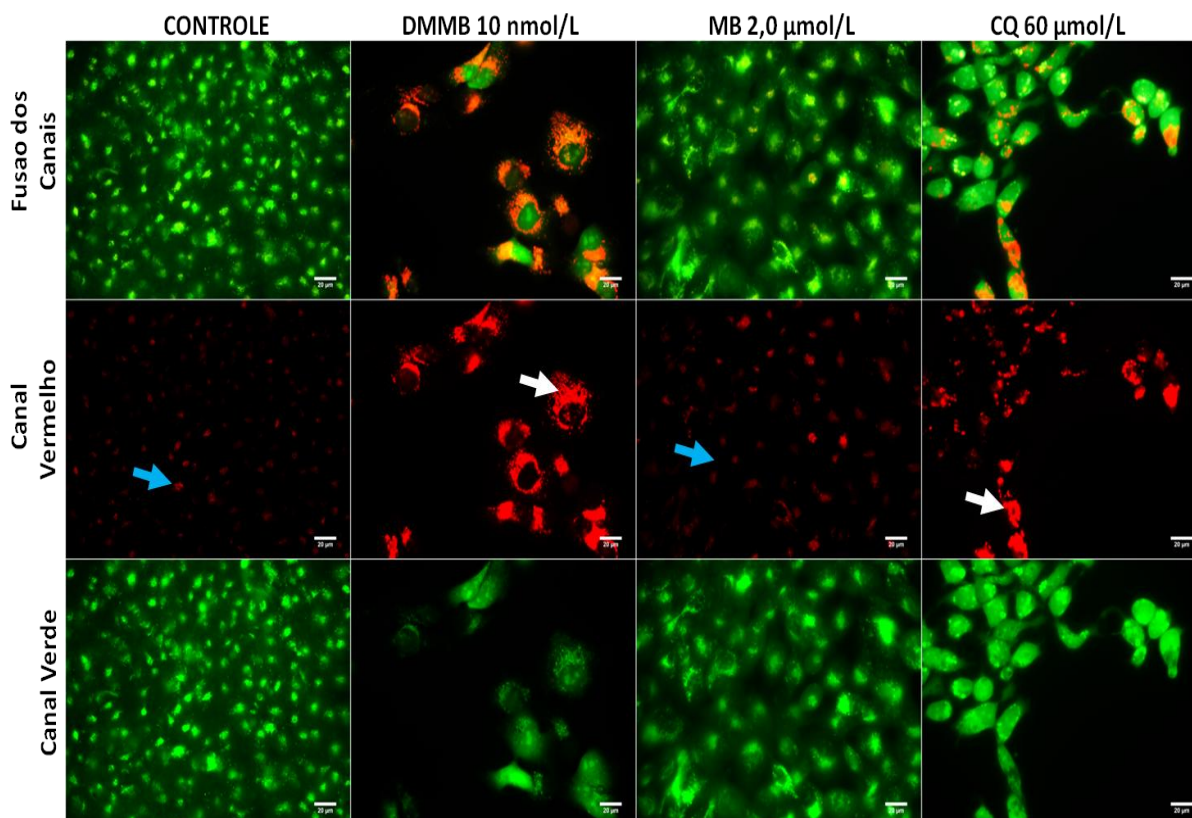
Conforme pode-se observar na Figura 12, as células HaCaT irradiadas na ausência de FSs, nos tempos 0 e 3 horas analisados após a TFD, apresentaram seus lisossomas viáveis

corados em vermelho brilhante por AO (seta vermelha). Diferentemente, nos campos avaliados, as células HaCaT em presença dos FSs MB e DMMB logo após a TFD, apresentaram diminuição de marcação por AO comparadas às células na ausência de FS (células controle), sugerindo ocorrência de comprometimento lisossomal após TFD. No entanto, 3 horas após a TFD, observou-se que apenas as células fotossensibilizadas com MB recuperaram a marcação por AO, indicando presença de células morfológicamente compatíveis com células viáveis, tais como as visualizadas no controle. Já, as células fotossensibilizadas com DMMB obtiveram um dano lisossomal, este podendo ser alteração de pH ou lesão em membranas lisossomais, tal que a marcação pelo corante AO permaneceu comprometida mesmo passado 3 horas após a TFD.

Esses dados sugerem que ambos fotossensibilizadores possuem, nas células HaCaT, os lisossomas como alvo subcelular. Oliveira e colaboradores (2011), por exemplo, mostraram que em células HeLa o MB apresentou os lisossomas como sítio de localização inicial.

Para se avaliar a extensão do comprometimento lisossomal observado 0 e 3 horas após fotoativação do DMMB, realizou-se a mesma abordagem de avaliação morfológica mostrada na Figura 12, mas 48 horas após a TFD (Figura 13).





**Figura 13:** Células HaCaT marcadas com AO 48 h após fotoativação do MB (2,0  $\mu\text{mol/L}$ ) e do DMMB (10  $\text{nmol/L}$ ) e após o tratamento por 24 h a  $37^\circ\text{C}$  com controle positivo para autofagia, Cloroquina (CQ) a 60  $\mu\text{mol/L}$ . Controle: células não tratadas com FS. Seta Azul: células apresentando lisossomas viáveis corados com AO. Seta Branca: células apresentando vacúolos ácidos sugestivos de autolisossomas. Aumento 520X. Escala 20  $\mu\text{m}$ . Todas as imagens representam campos aleatórios a partir de duas repetições de dois experimentos independentes.

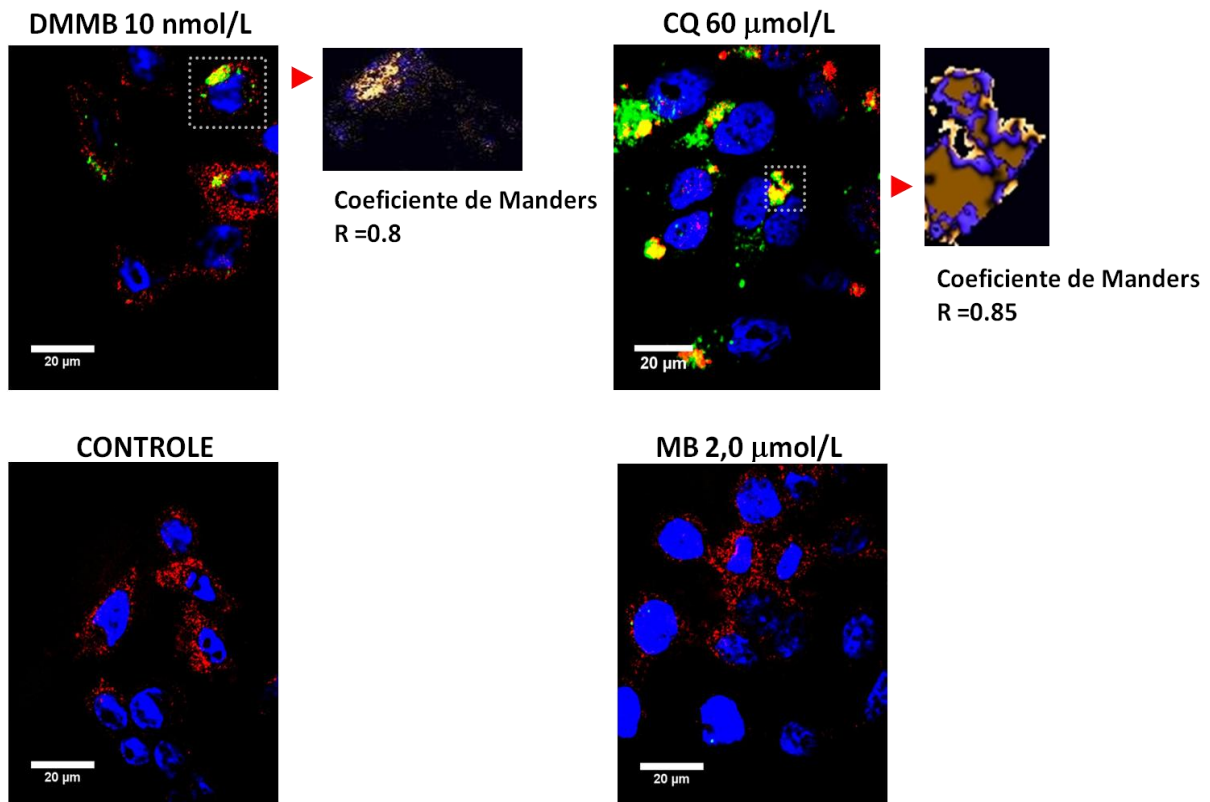
A Figura 13 apresenta a digitalização das imagens obtidas por microscopia de fluorescência, após marcar células com AO 48 horas após TFD, a partir dos canais de detecção vermelho e verde e a sobreposição de ambos. Nas células fotossensibilizadas com DMMB é observado um excesso de marcação de AO no canal vermelho (seta branca) por organelas vesiculares ácidas, sugestivas de vacúolos autofágicos tardios (autolisossomas/anfissomos), assim como é observado no controle positivo para acúmulo de autolisossomas, células tratadas com cloroquina (CQ). De forma contrária, nas células fotossensibilizadas com MB, observa-se no canal vermelho marcação pontual (seta azul) semelhante ao observado nas células não tratadas com FS, sugestivas de endossomos/lisossomas, confirmando a ausência de vacúolos autofágicos conforme observado anteriormente pelos valores de AAU.

O acúmulo de fluorescência vermelha de AO, indicando ocorrência de autofagia e acúmulo de autolisossomas após fotossensibilização com DMMB, condiz com os dados analisados anteriormente pelo ensaio colorimétrico com vermelho neutro (Figura 6B) e pelo cálculo dos valores de AAU (Figura 10B). Esse resultado sugere que a morte celular autofágica detectada pelo AAU é devido à inibição da conclusão do fluxo autofágico normal, que levou ao acúmulo de vacúolos ácidos autofágicos tardios, supostamente devido à ineficiência digestiva dos autolisossomas.

#### **4.5. Detecção de autofagia por imunofluorescência LAMP2A e LC3-II em células HaCaT após TFD**

A análise de indução de morte celular por autofagia detectada pelas metodologias de AAU e AO são uteis para a identificação da indução de autofagia *in vitro*. No entanto, estas análises não são eficientes para verificar o fluxo autofágico na vigência da formação de autofagossomas (vacúolos autofágicos iniciais) e de autolisossomas (vacúolos autofágicos tardios) (Martins et al., 2013).

Portanto, a fim de analisar a dinâmica do fluxo autofágico e confirmar se as estruturas coradas por AO correspondem aos autolisossomas, realizou-se o ensaio de imunofluorescência para LAMP2A, proteína marcadora de lisossoma, e LC3-II, proteína marcadora de autofagossoma, objetivando avaliar a colocalização dessas imunomarcações que caracterizam a formação de autolisossomas. Para isso, 6 horas após a fotossensibilização de células HaCaT em presença do MB ou DMMB efetuou-se o ensaio de imunomarcação simultânea para LAMP2A, com emissão de fluorescência vermelha; LC3-II, com emissão de fluorescência verde, e marcação nuclear com DAPI, cuja emissão de fluorescência é azul. Como controle positivo de indução de autofagia utilizou-se a condição de tratamento de células HaCaT com CQ a 60  $\mu\text{mol/L}$  (Figura 14).



**Figura 14:** Imunomarcaco de LC3-II e LAMP2A ps 6 h  fotoativao do DMMB 10 nmol/L e do MB 2,0 µmol/L em células HaCaT. Controle: células HaCaT na ausência de FS. Controle positivo para autofagia: células tratadas com CQ a 60 µmol/L por 24 h a 37°C. Marcaco nuclear DAPI em azul; proteína lisossomal LAMP2A, em vermelho; proteína LC3-II presente no autofagossoma, em verde; colocalizao para as proteínas LC3-II e LAMP2A em amarelo. Aumento de 1260X. Escala em 20 µm.

Nota-se que em células fotoativadas em presença de MB a 2,0 µmol/L, assim como observado nas células controle, há presença apenas de marcao da proteína lisossomal LAMP2A (em vermelho) e ausência de marcao para proteína de autofagossoma, LC3-II, indicando que a TFD com MB não induz autofagia, conforme já previsto nos ensaios anteriores por AAU e marcao por AO.

No entanto, após a fotossensibilizao das células HaCaT em presença de DMMB a 10 nmol/L observa-se além da marcao lisossomal em vermelho, a marcao para proteína de autofagossoma, LC3-II, em verde, similar ao observado nas células sob induo de autofagia por CQ. E, verifica-se ainda, devido  presença de colorao amarela, a fusão dos marcadores de LC3-II e de LAMP2A, cuja colocalizao medida pelo coeficiente de Mander apresentou-se elevada ( $R = 0,8$ ), assim como  para o controle autofágico, CQ ( $R = 0,85$ ). Confirmando

que as estruturas coradas por AO, 48 horas após fotoativação de DMMB em células HaCaT, correspondem de fato aos autolisossomas, e que a ocorrência do fluxo autofágico é normal até a etapa de maturação, ou seja, até formação dos autolisossomas.

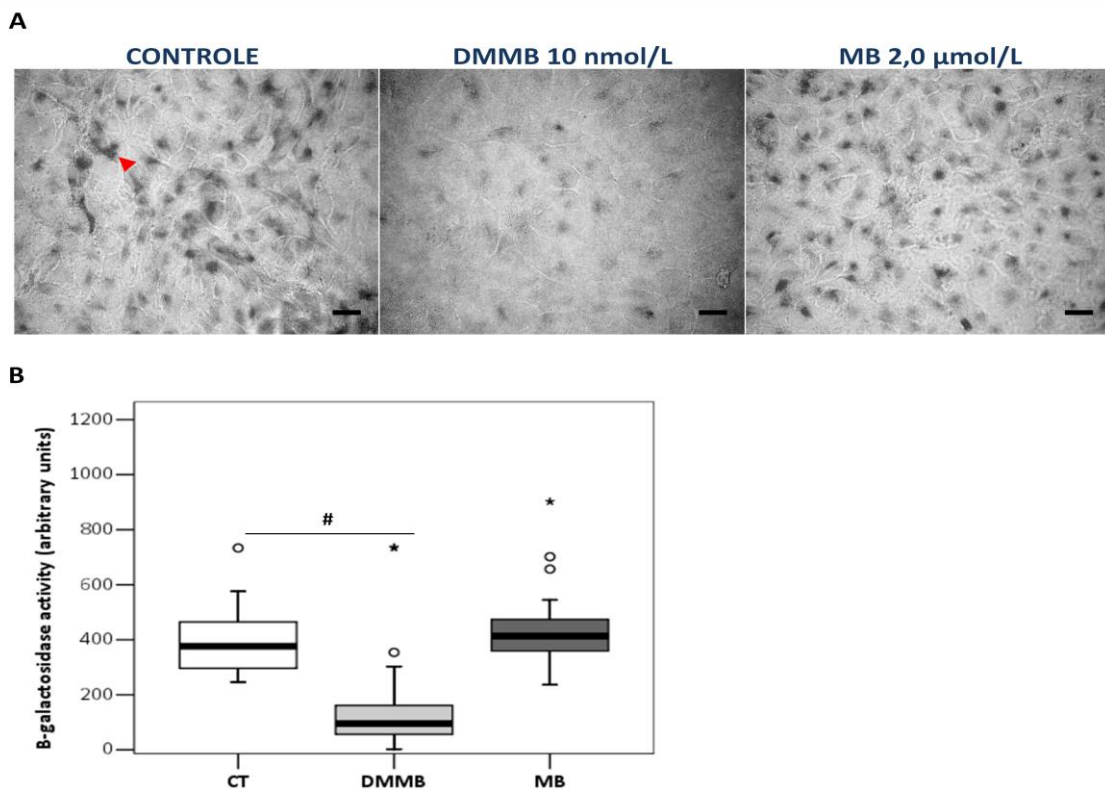
Tal fato nos leva a propor que o prejuízo lisossomal observado 0 hora e 3 horas após a fotoativação do DMMB (Figura 12) não foi grande o suficiente para inviabilizar toda a população lisossomal celular e anular o fluxo autofágico na etapa de fusão do autofagossoma com o lisossoma formando o autolisossoma, ou seja, o dano lisossomal observado não prejudicou o início do fluxo autofágico até a etapa de maturação, mas foi suficiente para interromper o fluxo autofágico no estágio terminal de maturação, conforme pode se observar na Figura 13 o acúmulo de vacúolos autofágicos tardios.

Isto indica que a morte celular autofágica desencadeada após TFD com o DMMB, é resultado da interrupção na degradação do conteúdo presente nos autolisossomas, devido à falha lisossomal em degradá-lo com sucesso, assim como foi sugerido por Kessel e colaboradores (2012), de que FSs que possuem os lisossomas/endosomas como alvos subcelular possuem considerável eficiência fotodinâmica, uma vez que a inviabilização destas organelas levaria à interrupção do fluxo autofágico normal, impedindo que funções autofágicas de sobrevivência celular se concluam levando, então, à indução de morte celular autofágica. Resultados de eficiência fotodinâmica semelhantes foram obtidos por Rodriguez e colaboradores (2009), apesar de não ter sido mencionado nada sobre autofagia nessa pesquisa, constatou-se que a fotossensibilização de células de adenocarcinoma mamário humano (MCF-7c3) com ftalocianina (Pc) cujo alvo subcelular são os lisossomas (Pc181) gera fototoxicidade semelhante à obtida após fotossensibilização com ftalocianina cujo alvo subcelular são as mitocôndrias (Pc4), mesmo a Pc181 estar numa concentração cerca de 10 vezes menor e apresentar uma indução de apoptose muito menos eficiente do que a Pc4, o que é sugestivo de

ocorrência de morte celular autofágica em função da inviabilização lisossomal causada pela fotoativação da Pc181.

#### 4.6. Análise do comprometimento lisossomal avaliado pela atividade de $\beta$ -D-galactosidase

A análise do possível comprometimento lisossomal de células HaCaT causado pela TFD foi realizada através da detecção da atividade da enzima lisossomal  $\beta$ -D-galactosidase, usando como substrato cromogênico o X-Gal, cujo produto de reação, após clivagem, é um composto azulado insolúvel.



**Figura 15:** **A-** Imagens de microscopia de transmissão 120 h após a fotoativação celular em presença de DMMB a 10 nmol/L e MB a 2,0  $\mu$ mol/L. Controle: corresponde às células não tratadas com FS. Seta vermelha: produto insolúvel azulado resultado da reação enzimática  $\beta$ -D-galactosidase com o substrato X-Gal. Aumento 520X. Escala 20  $\mu$ m. Todas as imagens representam campos aleatórios a partir de repetição de dois experimentos independentes. **B-** Quantificação dos valores médios da intensidade de coloração azul observadas nas imagens de microscopia de transmissão (A). A dispersão dos dados está representada pelo desvio padrão médio.

A partir das imagens obtidas (Figura 15A) se observou que, após a fotossensibilização celular em presença de DMMB a 10 nmol/L, há uma diminuição significativa na intensidade da coloração azul, indicando menor atividade enzimática dessa hidrolase lisossomal e

sugerindo que mesmo após a TFD, as células remanescentes ficam com os lisossomas comprometidos, isto é, não funcionais. Todavia, para a fotossensibilização com MB não observou tal diminuição, assim como para as células controle não tratadas com FS.

Os valores médios da intensidade da coloração azul foram obtidos a partir da análise de campos aleatórios, usando-se o plugin “*Segmentation*”, disponibilizado no Image J. A partir da análise estatística comparativa, calculou-se a significância da diferença da intensidade da coloração azul aplicando-se o teste pareado *t-student* (Figura 15B). Conforme apresentado na Figura 15B, após fotossensibilização celular em presença de DMMB há um decréscimo significativo ( $p < 0,001$ ) da atividade enzimática da  $\beta$ -D-galactosidase lisossomal. Isto confirma que houve prejuízo à população lisossomal das células HaCaT, conforme observado anteriormente imediatamente (0 hora) e 3 horas após a fotossensibilização em presença de DMMB (Figura 12).

Esses resultados indicam que os lisossomas representam a organela alvo para o FS DMMB, cujo comprometimento após fotossensibilização sinaliza para a ativação de morte autofágica. E, mesmo as células HaCaT que sobreviveram à esse processo de morte celular programada, há uma persistente diminuição da atividade enzimática lisossomal (Figura 15B). Strømhaug e colaboradores (1997) relataram que a fotoativação da porfirina tetra-4sulfonatofenilporfirina, cujo alvo subcelular é o lúmen lisossomal, quando utilizado em baixa concentração molecular e sob baixa dose de luz acarreta a degradação oxidativa das enzimas desta organela sem causar a ruptura de sua membrana, induzindo assim um extenso comprometimento lisossomal sem afetar o citosol e sem comprometer a integridade de outras organelas. Provavelmente, isso se dá pelo fato desse fotossensibilizador ser capturado pela célula pelo processo de endocitose, localizando-se direto no lúmen da organela, de maneira que o acesso para a membrana lisossomal fica restringido pelo revestimento de

polissacarídeos na região interna da membrana dos lisossomas, não acarretando assim danos às mesmas.

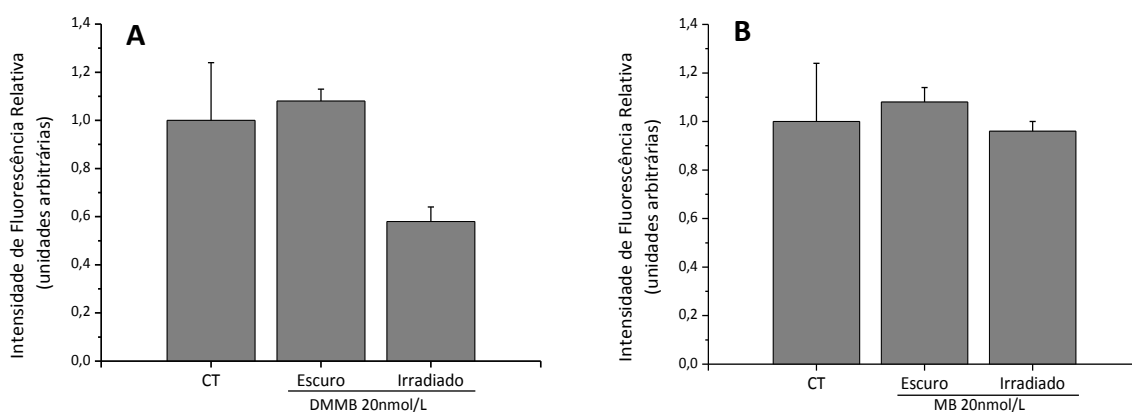
Esses dados nos levam a propor que algo semelhante tenha ocorrido com os lisossomas das células HaCaT após serem fotossensibilizadas com DMMB. Contudo, para a fotossensibilização com MB o prejuízo lisossomal, observado logo após o tratamento e recuperado parcialmente após 3 horas (Figura 12), parece ser totalmente recuperado pós 120 horas de tratamento (Figura 15B), diferente do observado após fotossensibilização com DMMB, cujas células sobreviventes apresentam lisossomas remanescentes não funcionais.

#### **4.7. Análise do comprometimento mitocondrial avaliado pela sonda fluorescente**

##### **Rodamina 123**

Além do comprometimento lisossomal observado após TFD com ambos FSs nas respectivas concentrações de  $IC_{50}$ , verificou-se também o comprometimento mitocondrial de células HaCaT após fotossensibilização, utilizando a sonda Rodamina 123. Tal fluorocromo é atraído pela diferença de potencial eletroquímico da membrana mitocondrial interna. Desta forma, a diminuição na detecção de fluorescência em relação às células controle (não fotossensibilizadas) e em relação às células tratadas com os FSs na ausência de irradiação, indica efeito danoso da TFD para tal organela.

Inicialmente analisou-se a intensidade de emissão de fluorescência de R123 após o tratamento das células HaCaT com os FSs em estudo na concentração de 20 nmol/L, seguido ou não de irradiação. Os resultados obtidos com DMMB foi a diminuição de fluorescência de R123 nas células irradiadas a 633 nm, sob dose de luz de  $11 \text{ J/cm}^2$  (Figura 16A). No entanto, para as células tratadas com MB não houve diminuição de fluorescência de R123 tanto para células no escuro quanto para as células irradiadas (Figura 16B).



**Figura 16:** Gráfico de intensidade de fluorescência relativa de R123 para análise de dano mitocondrial após fotossensibilização de células HaCaT com DMMB 20 nmol/L (A) e MB 20 nmol/L (B) no escuro e irradiado a 633 nm e 11 J/cm<sup>2</sup>. CT, células na ausência de FS (células controle). A dispersão dos dados está representada pelo desvio padrão médio.

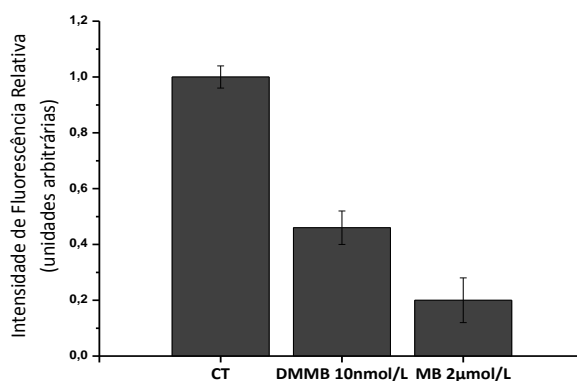
Como a incorporação de R123 é mediada via diferença de potencial da membrana mitocondrial, esses dados indicam que a fotoativação do DMMB a 20 nmol/L (Figura 16A) causou uma perturbação no ambiente mitocondrial que alterou seu potencial de membrana, diminuindo assim a incorporação de R123 na matriz mitocondrial. No entanto, após a fotoativação do MB a 20 nmol/L (concentração cem vezes menor que seu valor de IC<sub>50</sub>) não foi verificado dano mitocondrial, uma vez que não se observou alteração no índice de intensidade fluorescência de R123 comparados às células controles na ausência de FS, e na ausência de irradiação (Figura 16B).

Gabrielli e colaboradores (2004) relataram, a partir de estudos com mitocôndrias isoladas de fígado de rato, que o MB, por apresentar lipofilicidade suficiente para cruzar membranas e apresentar carga positiva, é atraído por tais organelas devido ao ambiente eletroquímico negativo da matriz mitocondrial. No entanto, dependendo da concentração de MB o mesmo pode encontrar-se nessa organela totalmente reduzido, ou seja, na forma leuco. Esses dados nos levam a propor que a possível ausência de detecção de dano mitocondrial após a fotoativação do MB na concentração de 20 nmol/L, seja devido ao fato de que este FS nessa concentração encontrar-se totalmente na forma fotoquimicamente inativa (leuco), devido à redução pelas coenzimas mitocondriais NADH e FADH<sub>2</sub>. Como o DMMB possui



um potencial de redução menor que o MB (Rice et. al., 1998), o mesmo não se encontra reduzido a 20 nmol/L, sendo então fototóxico às células HaCaT nessa concentração, conforme observamos os dados da Figura 6B, e com prejuízo às organelas mitocondriais, conforme observamos os dados da Figura 16A.

A fim de confirmar a presença de dano mitocondrial após a fotoativação do MB, usou a sonda R123 após a irradiar as células HaCaT incubadas com os FSs nas suas respectivas concentrações de IC<sub>50</sub> (Figura 17).



**Figura 17:** Gráfico de intensidade de fluorescência de R123 para análise de dano mitocondrial após fotoativação de células HaCaT com DMMB 10 nmol/L e MB 2,0 µmol/L. CT, células na ausência de FS (células controle). A dispersão dos dados está representada pelo desvio padrão médio.

A Figura 17 apresenta uma diminuição de fluorescência de R123 após fotoativação de ambos FSs, indicando que tanto o MB quanto o DMMB, nas concentrações de IC<sub>50</sub>, produzem um efeito deletério para as mitocôndrias. Esses resultados nos levam a propor que, a falta de verificação de dano mitocondrial após a fotoativação do MB a 20 nmol/L não é devido à ausência deste FS em tal organela, mas sim à sua presença na forma reduzida (leuco), inativa fotoquimicamente a 633 nm.

Estudos recentes afirmam que, em células fotossensibilizadas com moléculas cujo alvo subcelular são preferencialmente as mitocôndrias causando-nas apenas um desbalanço oxidativo brando, incapaz de inviabilizar totalmente essas células, desencadeia-se o mecanismo de eliminação seletivo dessas organelas por mitofagia (Yan and Yan, 2011; Mai et al., 2012). Dessa maneira, prolonga-se a vitalidades dessas células ao protegê-las de danos

causados por mitocôndrias com metabolismo desordenado, de liberação de proteínas pró-apoptóticas e conseqüentemente, de mecanismos de morte celular. Baseando-se nas idéias desses estudos e diante aos dados de dano mitocondrial e de brando desbalanço redox, propomos estar ocorrendo uma resposta mitofágica após fotoativação do DMMB em células HaCaT. E, o acúmulo de vacúolos ácidos observados 48 horas após fotoativação do DMMB seria devido à interrupção do fluxo mitofágico, uma vez que os lisossomas, essenciais para conclusão do fluxo, também são inviabilizados após TFD com DMMB.

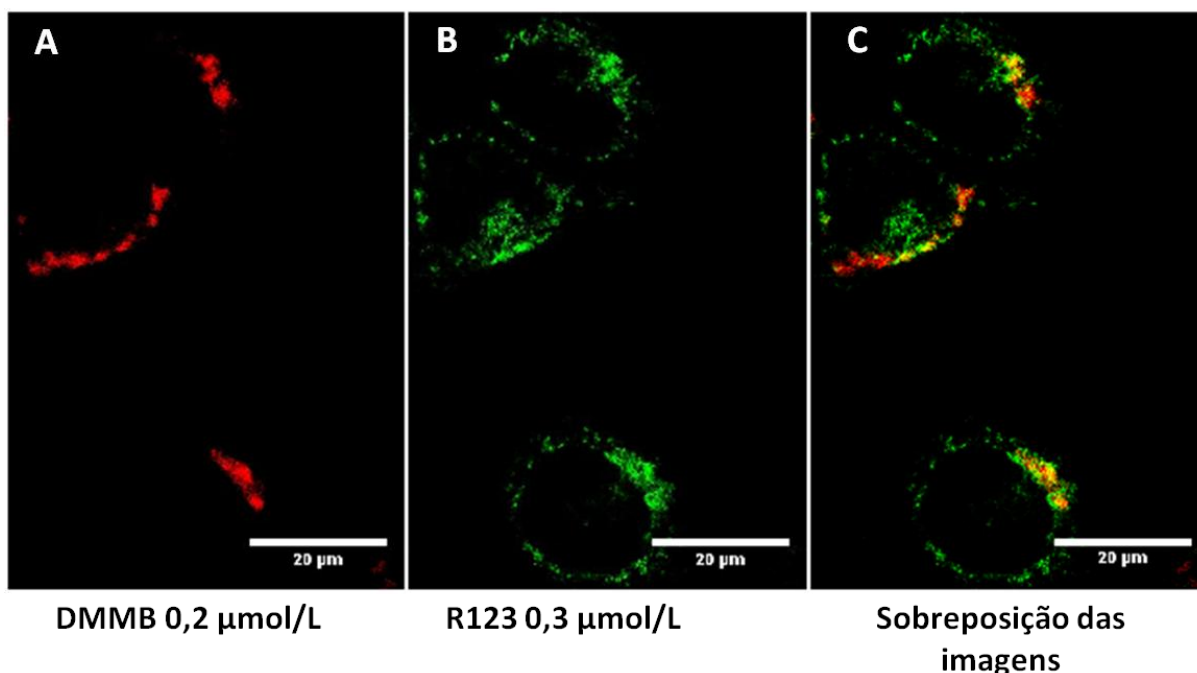
#### **4.8. Análise de localização subcelular dos FSs MB e DMMB**

Relatos na literatura destacam que o mecanismo de resposta para TFD, bem como a eficiência do dano celular causados pela fotoativação dos FSs, depende da localização intracelular dos mesmos (Kessel, 2004). Uma vez que as EROs geradas fotoquimicamente possuem tempo de meia vida pequeno, elas atuam próximas ao seu local de geração, assim, o conhecimento da localização subcelular dos FSs é importante para compreender os mecanismos de morte celular envolvidos na TFD. Desta forma, pode-se contribuir na escolha do FS, bem como, dos parâmetros a serem empregados para obtenção de uma melhor eficiência terapêutica da TFD (Castano, Deminova and Hamblin, 2004).

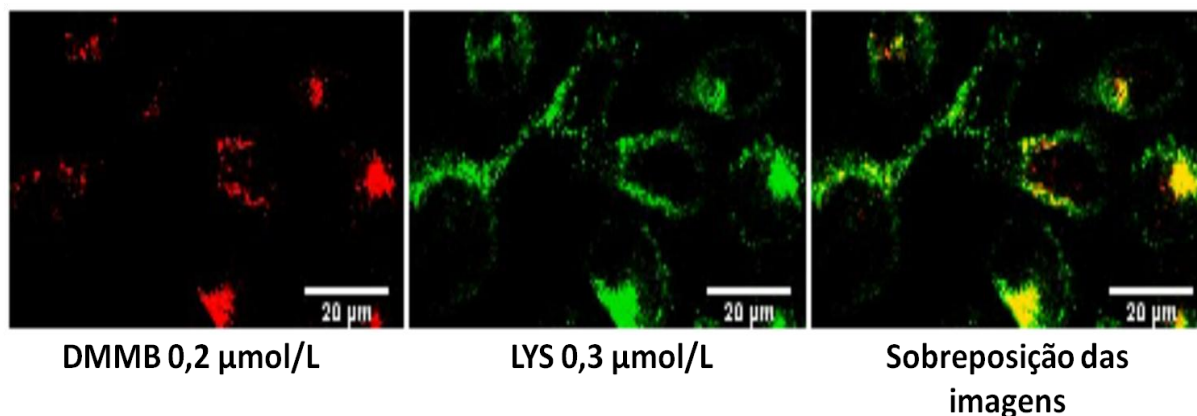
De acordo com os resultados obtidos e descritos anteriormente, sugere-se que ambos FSs estudados, MB e DMMB, possuem as organelas mitocondrial e lisossomal como alvo subcelular. Trabalhos presentes na literatura relatam que o MB localiza-se primariamente nos lisossomas de células epiteliais de ratos RR1022 (Rück et. al., 1992); nos lisossomas de células de fibrosarcoma de camundongo RIF-1 (Mellish et. al., 2002); nas mitocôndrias e nos lisossomas de células de adenocarcinoma de útero humano HeLa (Oliveira et. al., 2011). No entanto, é difícil estabelecer padrões de localização destas substâncias fotossensíveis porque suas propriedades fotofísicas podem sofrer interferências de diferentes microambientes dentro da célula (Gabrielli et al., 2004).

Para confirmar a organela alvo destes FSs em células HaCaT, foram realizados ensaios de colocalização entre marcadores específicos de lisossomas, LysoTracker Green (LYS), e de mitocôndrias, Rodamina 123 (R123), que emitem fluorescência verde, e os FSs MB e DMMB, que emitem fluorescência vermelha. A colocalização pode ser caracterizada pela coloração amarela, proveniente da sobreposição das imagens de fluorescência da sonda e do FS.

A distribuição de fluorescência do DMMB a 0,2  $\mu\text{mol/L}$  e a distribuição de fluorescência das sondas podem ser observadas nas micrografias confocais apresentadas na Figura 18 para a sonda mitocondrial, R123, e na Figura 19 para a sonda lisossomal, LYS. Trabalhou-se com DMMB a 0,2  $\mu\text{mol/L}$ , diferente do valor  $\text{IC}_{50}$  (10  $\text{nmol/L}$ ), pois não se consegue detectar emissão de fluorescência do DMMB a 10  $\text{nmol/L}$  (dado não apresentado).



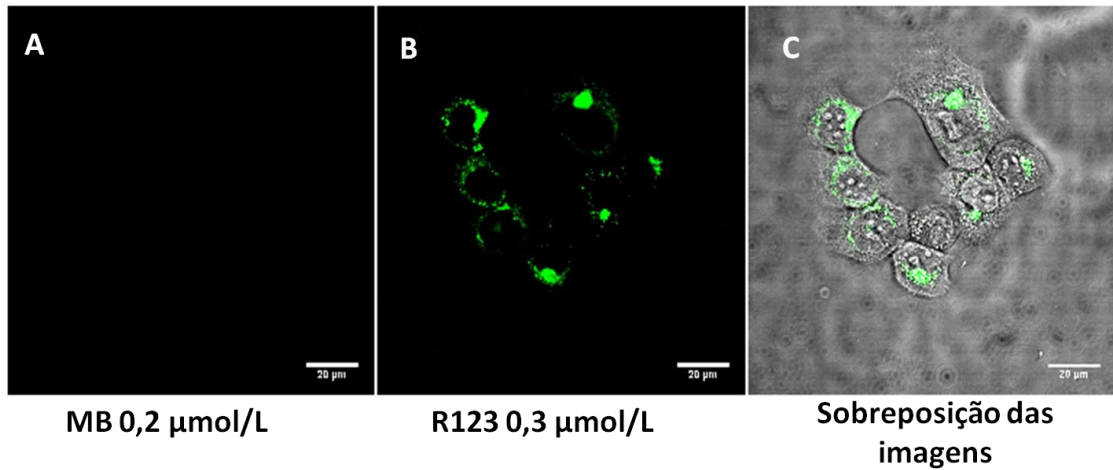
**Figura 18:** Imagens de microscopia confocal de células HaCaT em presença simultânea de DMMB a 0,2  $\mu\text{mol/L}$  e R123 a 0,3  $\mu\text{mol/L}$ . Excitação do FS no comprimento de onda 633 nm e emissão a 650 nm (A), excitação da sonda no comprimento de onda 488 nm e emissão 505 nm (B), sobreposição das imagens A e B (C). Aumento 882X. Escala 20  $\mu\text{m}$ .



**Figura 19:** Imagens de microscopia confocal de células HaCaT em presença simultânea de DMMB a 0,2 μmol/L e LYS a 0,3 μmol/L. Excitação do FS no comprimento de onda 633 nm e emissão a 650 nm (A), excitação da sonda no comprimento de onda 488 nm e emissão 505 nm (B), sobreposição das imagens A e B (C). Aumento 480X. Escala 20 μm.

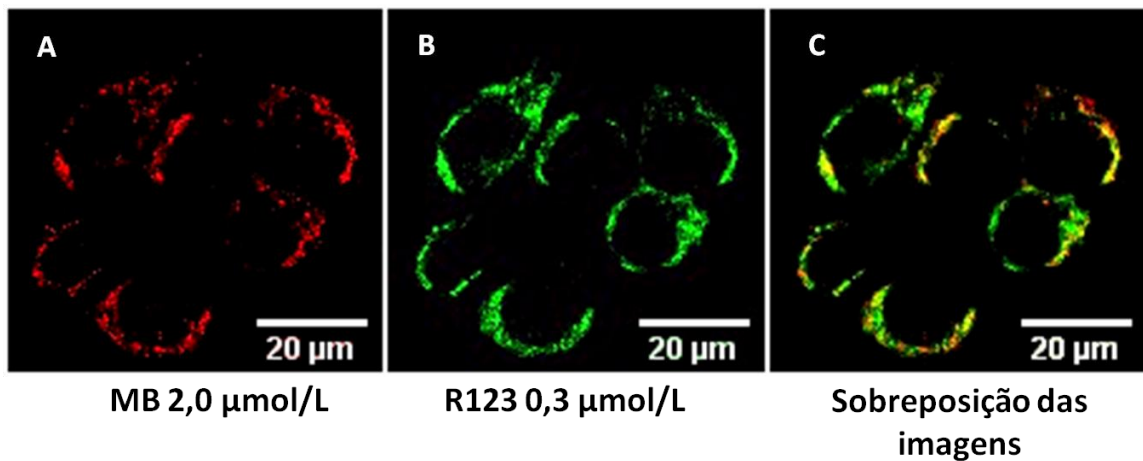
As micrografias apresentadas nas Figuras 18 e 19 sugerem a localização subcelular do DMMB nas mitocôndrias e nos lisossomas, corroborando com os dados obtidos anteriormente de fotodano gerado pelo DMMB (10 a 20 nmol/L) à essas organelas. O cálculo da área de colocalização entre o DMMB 0,2 μmol/L e o marcador mitocondrial foi de  $33,4\% \pm 11$  e de colocalização entre o DMMB e o marcador lisossomal foi de  $66,6\% \pm 11,4$ .

A análise de localização subcelular do MB foi inicialmente realizada na mesma concentração utilizada para ensaio com o DMMB, 0,2 μmol/L, no entanto não se conseguiu observar emissão de fluorescência após excitação desse FS (Figura 20). Como já mencionado, isso ocorre pelo fato de que nessa concentração, em ambiente celular, o MB encontra-se totalmente na forma não fluorescente, reduzida (leuco), impedindo sua visualização direta.

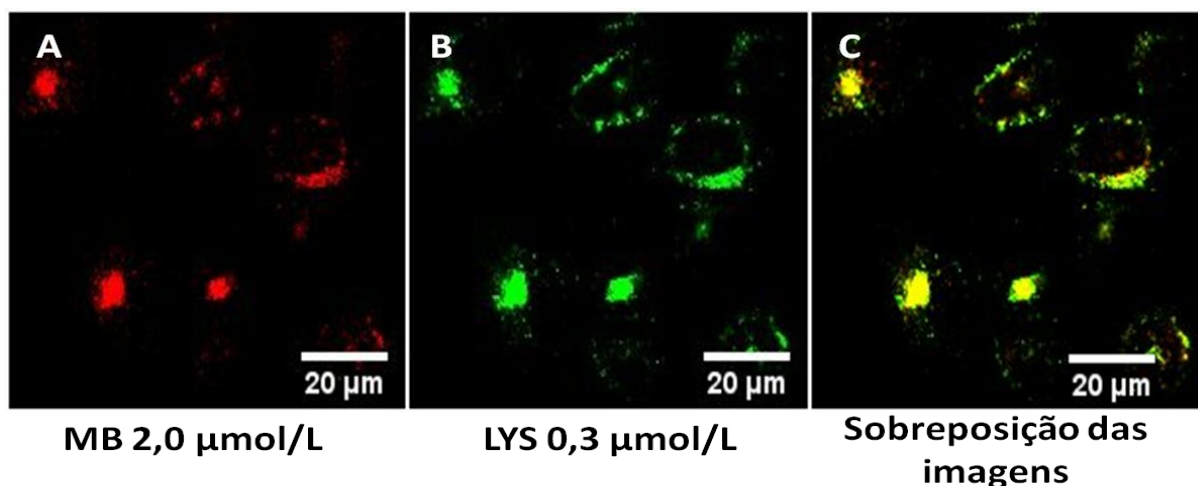


**Figura 20:** Imagens de microscopia confocal de células HaCaT em presença simultânea de MB a 0,2 µmol/L e R123 a 0,3 µmol/L. Excitação do FS no comprimento de onda 633 nm e emissão a 650 nm (A), excitação da sonda no comprimento de onda 488 nm e emissão 505 nm (B), sobreposição das imagens de transmissão juntamente com as imagens de fluorescência A e B (C). Aumento 882X. Escala 20 µm.

Devido ausência de emissão de fluorescência do MB a 0,2 µmol/L, o ensaio de localização subcelular desse FS nas células HaCaT foi realizado em sua respectiva concentração de  $IC_{50}$ , 2,0 µmol/L, com o marcador mitocondrial, R123 a 0,3 µmol/L, Figura 21, e, com o marcador lisossomal, LYS a 0,3 µmol/L, Figura 22.



**Figura 21:** Imagens de microscopia confocal de células HaCaT em presença simultânea de MB 2,0 µmol/L e R123 a 0,3 µmol/L. Excitação do FS no comprimento de onda 633 nm e emissão a 650 nm (A), excitação da sonda no comprimento de onda 488 nm e emissão 505 nm (B), sobreposição das imagens A e B (C). Aumento 480X. Escala 20 µm.



**Figura 22:** Imagens de microscopia de fluorescência de células HaCaT em presença simultânea de MB 2,0 μmol/L e LYS 0,3 μmol/L. Excitação do FS no comprimento de onda 633 nm e emissão a 650 nm (A), excitação da sonda no comprimento de onda 488 nm e emissão 505 nm (B), sobreposição das imagens A e B (C). Aumento 480X. Escala 20 μm.

A visualização de fluorescência após alteração na concentração de MB confirma que sua detecção depende da concentração intracelular do FS, e que os locais de acúmulo intracelular também afetam seu comportamento de emissão fluorescência (Rück et. al., 1992). E, assim como observado nas micrografias para o DMMB, as micrografias para o MB (Figuras 21 e 22) confirmam os dados obtidos anteriormente de dano mitocondrial e lisossomal após a fotoativação do MB 2,0 μmol/L, sendo que a porcentagem de colocalização entre o FS e o marcador mitocondrial foi de  $44,5\% \pm 4$ , e de colocalização entre o MB e o marcador lisossomal foi de  $55,5\% \pm 10$ .

#### **4.9. Indução de autofagia em células HaCaT após fotossensibilização com MB**

O resultado de dano lisossomal e mitocondrial juntamente com o de citolocalização, mostraram que ambos FSs possuem alvos subcelulares semelhantes (lisossomos e mitocôndrias). No entanto, essa semelhança não é suficiente para que eles induzam a mesma resposta de dano às células HaCaT. Conforme pode ser observado pelos dados de toxicidade na mesma dose de luz (Figuras 5 e 6), o DMMB induz porcentagem de fototoxicidade semelhante ao MB, mesmo estando numa concentração 200 vezes menor do que este, gerando um desbalanço oxidativo também menor, e induzindo um mecanismo específico de morte celular programada (autofágica) não observado após TFD com o MB.

Sabendo que as EROs mitocondriais são importantes moléculas de sinalização para indução de autofagia (Chen et al., 2007) e formação de autofagossomas (Scherz-Shouval, et al., 2007), Frank e colaboradores (2012) concluíram que, em condições brandas e transitória de desbalanço oxidativo mitocondrial há indução exclusiva e seletiva de mitofagia para remoção específica de mitocôndrias danificadas, redução das EROs derivadas dessas mitocôndrias e recuperação da homeostase celular sem haver perda da viabilidade. Todavia, em condições cujo nível de estresse oxidativo é elevado, não há tempo para as células se adaptarem às vias sinalização autofágica (Scherz-Shouval and Elazar, 2007), assim, danos oxidativos em proteínas de membrana mitocondrial levam a transição de permeabilidade de membrana desta organela (MPT), que por sua vez desencadeia o inchamento osmótico da matriz mitocondrial causando a ruptura da membrana externa, a liberação de proteínas pró apoptóticas e liberação de citocromo c que ativam caspases para indução de apoptose. Em condições cujo estresse oxidativo é mais severo, a MPT causa dissipação do potencial de membrana e consequente desacoplamento da fosforilação oxidativa, havendo então incapacidade síntese de ATP e consequente morte por necrose (Kim, He and Lemasters, 2003). Portanto, EROs mitocondriais, dependendo da intensidade, podem estar envolvidas tanto na ativação de mitofagia citoprotetora, quanto nas vias de sinalização de morte celular por apoptose ou por necrose (Rubio et al. 2012).

Diante da análise de Frank e colaboradores (2012) e com os resultados obtidos até então, propomos que as células HaCaT utilizam o mecanismo autofágico, mais especificamente mitofágico, para se recuperar da injúria mitocondrial decorrente do brando desbalanço oxidativo desencadeado pela TFD com DMMB a 10 nmol/L (Figuras 7 e 9). No entanto, como os lisossomas destas células também são prejudicados pela fotoativação do DMMB (Figuras 12 e 15), a conclusão fluxo autofágico se torna inviabilizada, conforme é

observado pelo acúmulo de vacúolos ácidos (Figura 13), ocasionando então a morte celular autofágica.

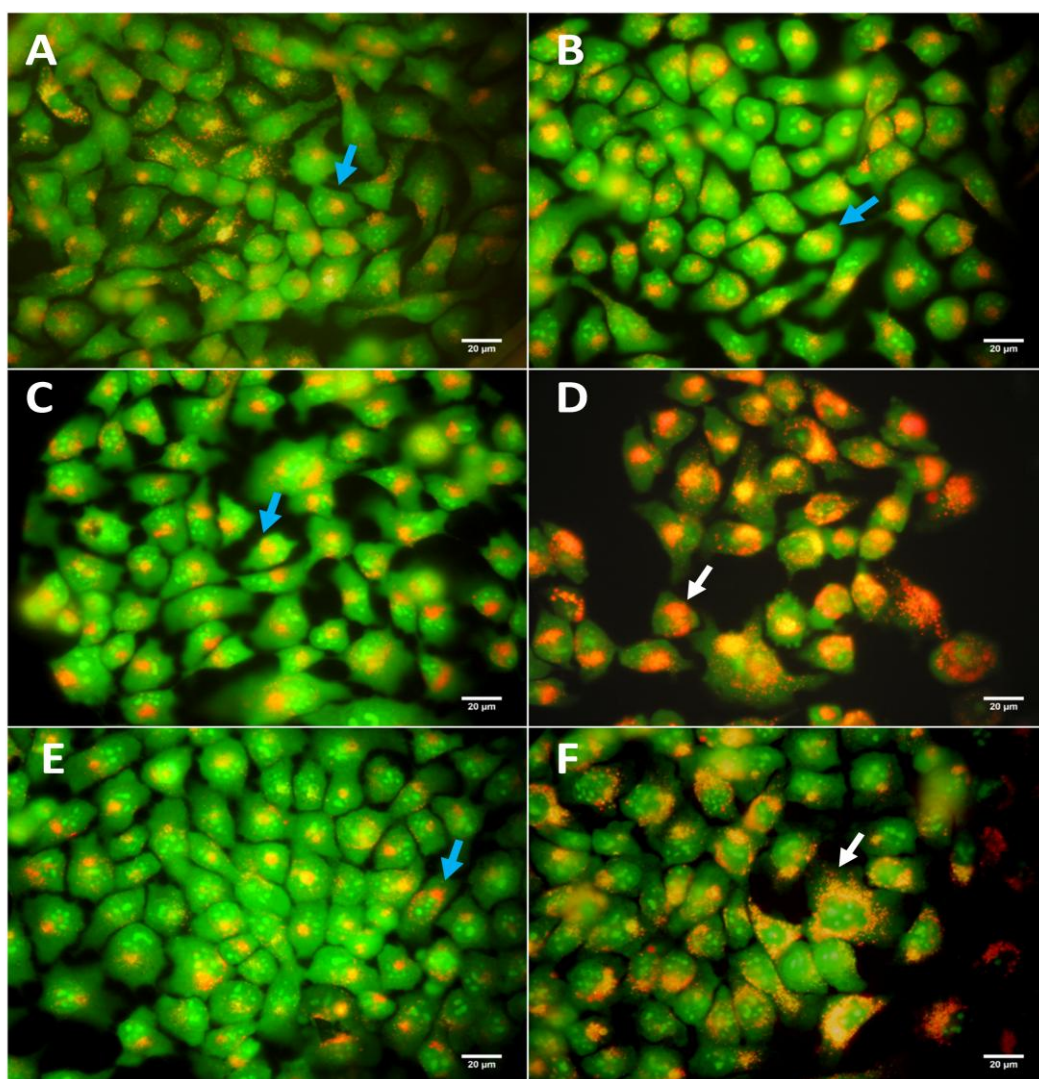
Propomos ainda que, o mesmo não é observado para as células HaCaT fotossensibilizadas com MB, pois em baixas concentrações de MB em que o nível de estresse oxidativo gerado seria brando, este FS encontra-se nas mitocôndrias na forma leuco devido a redução pelas coenzimas NADH e FADH<sub>2</sub> (Gabrielli et al., 2004), não podendo ser fotoativado e, conseqüentemente, não gerando desbalanço oxidativo. E, em concentrações de MB mais elevadas, em que o MB não se encontra totalmente reduzido, e se observa um nível de EROs significativo (Figuras 7 e 9), ausência de sinalização para necrose (Figura 12) e para autofagia (Figura 14), supõe-se estar ocorrendo morte celular por apoptose, conforme verificado em trabalhos desenvolvidos pelos pesquisadores Lu et al. (2008), Chen et al. (2008) e Lim et al. (2013).

Portanto, diante da dificuldade de indução de vias autofágicas após fotoativação do MB, propomos ser possível reproduzir a mesma resposta autofágica observada nas células HaCaT após fotoativação do DMMB, mas agora utilizando o MB numa concentração baixa e não fototóxica em conjunto à um indutor de mitofagia. Dessa maneira, a indução de EROs pela fotoativação deste FS será branda, gerando apenas um comprometimento lisossomal que impediriam a conclusão do fluxo mitofágico induzido previamente pelas moléculas indutoras de mitofagia, levando então ao acúmulo de vacúolos ácidos e conseqüente morte celular autofágica, semelhante ao que foi observado após fotoativação do DMMB 10 nmol/L.

Assim, trabalhando-se com MB a 0,5 µmol/L em células HaCaT pré-tratadas com os indutores de mitofagia, peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e rotenona, nas condições descritas por Frank e colaboradores (2012), essa ideia foi confirmada utilizando o marcador de vacúolos ácidos, laranja de acridina (AO), conforme podemos observar na Figura 23. A concentração de MB selecionada para esse experimento, 0,5 µmol/L, não é fototóxica (Figura 7), os níveis



de EROs gerados após sua fotossensibilização são baixos (cerca de duas vezes menor que o nível obtido na concentração de  $IC_{50}$ ) e sabe-se que não se trata de uma concentração cujo MB encontra-se totalmente reduzido à forma leuco, uma vez que há visualização por microscopia da emissão de sua fluorescência (dados não apresentados).

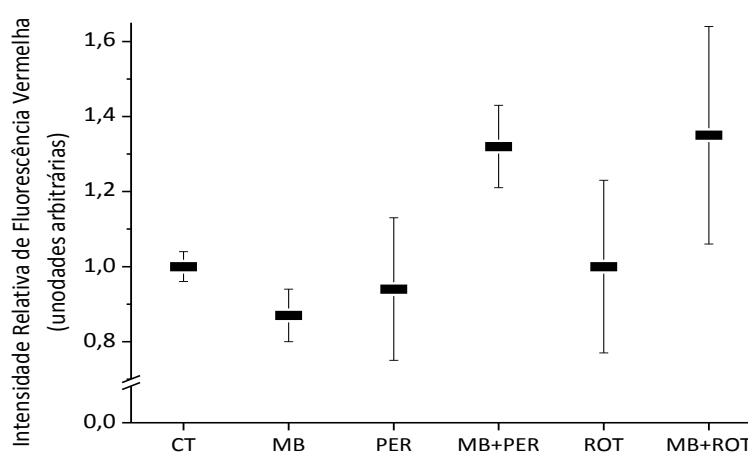


**Figura 23:** Imagens de microscopia de fluorescência de células HaCaT marcadas com AO para visualização de vacúolos ácidos, 48 h após tratamento com indutores mitofágicos seguido ou não de fotossensibilização com MB 0,5  $\mu\text{mol/L}$  a 633 nm na dose de 11  $\text{J/cm}^2$ . **A-** Controle negativo, ausência de indutores mitofágicos e de fotossensibilização com MB. **B-** Células fotossensibilizadas com MB 0,5  $\mu\text{mol/L}$ . **C-** Células tratadas apenas com  $\text{H}_2\text{O}_2$  3,3  $\text{mmol/L}$  por 10 minutos. **D-** Células tratadas com  $\text{H}_2\text{O}_2$  3,3  $\text{mmol/L}$  por 10 minutos, seguido de fotoativação do MB 0,5  $\mu\text{mol/L}$ . **E-** Células tratadas apenas com rotenona 1,0  $\mu\text{mol/L}$  por 1 h. **F-** Células tratadas com rotenona 1,0  $\mu\text{mol/L}$  por 1 h, seguido de fotoativação do MB 0,5  $\mu\text{mol/L}$ . Seta azul: Células apresentando lisossomas viáveis. Seta Branca: Células contendo acúmulo de vacúolos ácidos sugestivos de autolisossomas. Todas as imagens representam campos aleatórios a partir de duas repetições de dois experimentos independentes. Aumento 520X. Escala 20  $\mu\text{m}$ .

As células controle (Figura 23A), as células fotossensibilizadas com MB 0,5  $\mu\text{mol/L}$  (Figura 23B) e as células tratadas apenas com os indutores de mitofagia,  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Figura 23C)

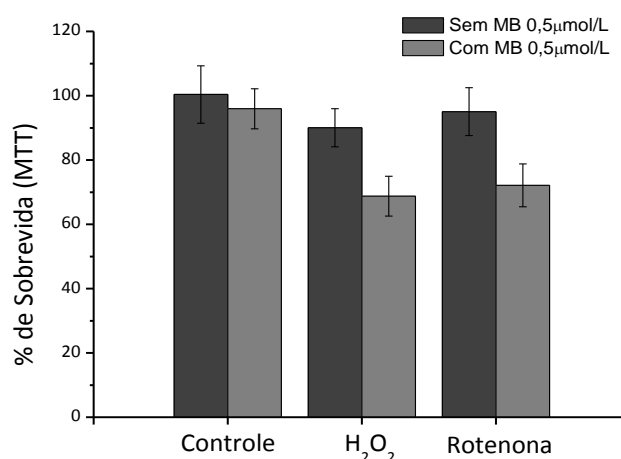
ou rotenona (Figura 23E), apresentam imagens de fluorescência com marcação vermelha característica de organelas ácidas endossomos/lisossomas (Seta azul). Já as células pré-tratadas com os indutores mitofágicos,  $H_2O_2$  ou rotenona, seguido de fotossensibilização com MB 0,5  $\mu\text{mol/L}$  (Figura 23D e 23F, respectivamente), observa-se um excesso de marcação de fluorescência vermelha por AO, indicando o acúmulo de vacúolos ácidos autofágicos (Seta branca), semelhante ao observado após a fotossensibilização do DMMB 10  $\text{nmol/L}$  (Figura 13).

A intensidade média de fluorescência vermelha foi quantificada e representada em um gráfico em função da fluorescência média das imagens de células controle (Figura 24). Esse dado nos permite concluir quantitativamente o que foi classificado qualitativamente, ou seja, o nível de fluorescência vermelha observado nos tratamentos somente com os indutores de mitofagia ou somente com o MB, foi semelhante às células não tratadas (controle), já o nível de fluorescência de células pré-tratadas com indutores mitofágicos e então fotossensibilizadas com MB foi maior para as duas condições empregadas, confirmando o acúmulo de vacúolos ácidos.



**Figura 24:** Quantificação dos valores médios da intensidade de fluorescência vermelha, obtida após marcação com AO, observadas nas imagens de microscopia de fluorescência (Figura 23). CT, células na ausência de indutor mitofágico e de FS (células controle); MB, células fotossensibilizadas com MB; PER, células tratadas com  $H_2O_2$ ; MB+PER, células tratadas com  $H_2O_2$ , seguido de fotossensibilização com MB; ROT, células tratadas com rotenona; MB+ROT, células tratadas com rotenona, seguido de fotossensibilização com MB. A dispersão dos dados está representada pelo desvio padrão médio.

Após confirmar o acúmulo de vacúolos ácidos supostamente devido ao comprometimento da via mitofágica, iniciada pelos indutores  $H_2O_2$  ou rotenona, e inviabilizada pela presença de lisossomas danificados pela TFD com MB 0,5  $\mu\text{mol/L}$ , testou-se a viabilidade celular pelo método colorimétrico de redução do MTT (Figura 25) e calcularam-se os valores de AAU (Figura 26).

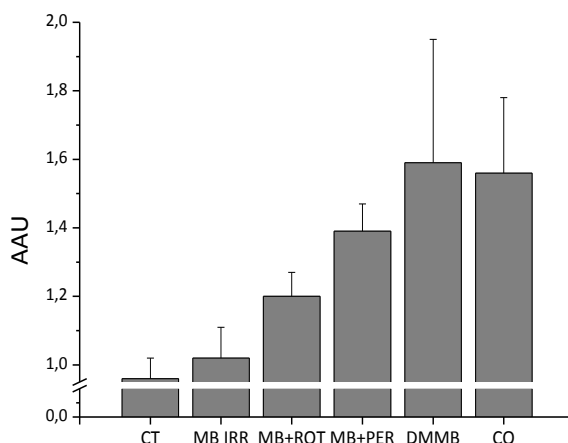


**Figura 25:** Gráfico de viabilidade celular 48 h após o tratamento com os indutores de mitofagia,  $H_2O_2$  ou rotenona, seguidos ou não de fotoativação do MB a 633 nm e dose de 11  $\text{J/cm}^2$ . A dispersão dos dados está representada pelo desvio padrão-médio. O Controle corresponde à células na ausência de  $H_2O_2$  ou rotenona. A dispersão dos dados está representada pelo desvio padrão médio.

O gráfico de viabilidade (Figura 25) confirma que o tratamento apenas com  $H_2O_2$  ou apenas com rotenona, nas concentrações e nos períodos de incubação propostos por Frank e colaboradores (2012), não é citotóxico às células HaCaT. O FS MB a 0,5  $\mu\text{mol/L}$  sob a dose de 11  $\text{J/cm}^2$  também não é fototóxico às células. No entanto, quando usados em conjunto, o indutor mitofágico mais a fotoativação do MB, ocorre uma perda de viabilidade de cerca 30%.

O cálculo de AAU, plotado no gráfico abaixo (Figura 26), confirma o acúmulo de vacúolos ácidos autofágicos após os pré-tratamentos com  $H_2O_2$  ou rotenona seguido da fotoativação do MB, pois os valores de AAU calculados estão acima de 1,0 (1,2 para células tratadas com rotenona, seguido de fotossensibilização com MB e 1,39 para células tratadas com  $H_2O_2$ , seguido de fotossensibilização com MB). Ou seja, a fotossensibilização de células

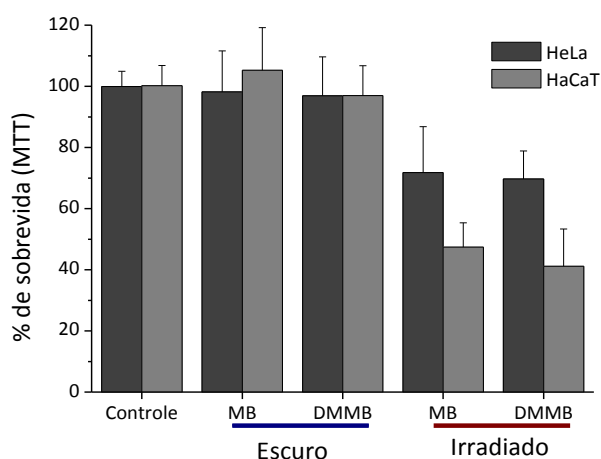
HaCaT, com MB, sob condições de mitofagia induz morte celular por autofagia, semelhante ao que é observado após os tratamentos com o controle positivo para autofagia, Cloroquina 60  $\mu\text{mol/L}$ , cujo valor de AAU é 1,56, e com o FS DMMB 10  $\text{nmol/L}$ , cujo valor de AAU é 1,59.



**Figura 26:** Histograma com os valores de AAU calculados a partir dos ensaios de viabilidade MTT, CVS e NRU, 48 h após o tratamento com os indutores mitofágicos,  $\text{H}_2\text{O}_2$  e rotenona, e com o FS MB. CT, células na ausência de indutor mitofágico e de FS (células controle); MB IRR, células fotossensibilizadas com MB 0,5  $\mu\text{mol/L}$ ; MB+ROT, células tratadas com rotenona, seguido de fotossensibilização com MB; MB+PER, células tratadas com  $\text{H}_2\text{O}_2$  seguido de fotossensibilização com MB. DMMB, células fotossensibilizadas com DMMB 10  $\text{nmol/L}$ ; CQ, controle positivo para autofagia, Cloroquina (CQ) a 60  $\mu\text{mol/L}$ . A média dos valores de AAU foi calculada a partir de três experimentos independentes. A dispersão dos dados está representada pelo desvio padrão médio.

#### 4.10. Comparação da sobrevivência celular após fotossensibilização do MB e DMMB em células HaCaT e em células HeLa

A fim de verificar se o padrão de resposta celular à TFD mediada por MB e DMMB seria obtido por outra linhagem celular, submeteram-se células de adenocarcinoma de útero humano, HeLa, às mesmas condições aplicadas às células HaCaT. A Figura 27 apresenta os resultados de viabilidade após tratar células HeLa com MB e DMMB nos respectivos valores de  $\text{IC}_{50}$  obtidos para as células HaCaT.



**Figura 27:** Média de sobrevivida de células HeLa (cinza escuro) e HaCaT (cinza claro), 48 h após a fotossensibilização com MB a 2,0  $\mu\text{mol/L}$  e DMMB a 10  $\text{nmol/L}$  no escuro e irradiado a 633 nm na dose de 11  $\text{J/cm}^2$ . A sobrevivida média foi calculada a partir de três experimentos independentes. A dispersão dos dados está representada pelo desvio padrão-médio.

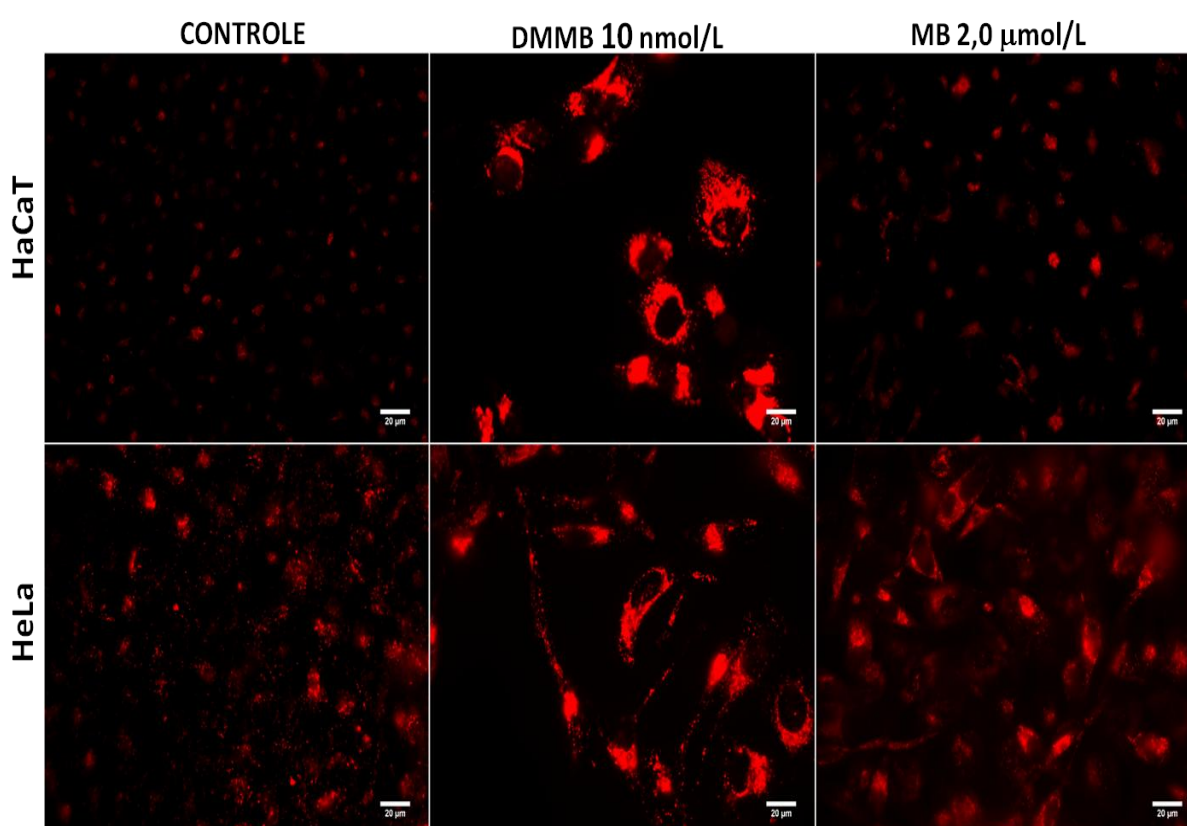
Conforme apresentado na Figura 27, observou-se pelo ensaio colorimétrico de redução do MTT que nas concentrações de FS próximas ao  $\text{IC}_{50}$  (MB 2,0  $\mu\text{mol/L}$  e DMMB 10  $\text{nmol/L}$ ) para células HaCaT, na dose de luz de 11  $\text{J/cm}^2$ , não houve citotoxicidade no escuro para ambas linhagens celulares. Após a fotoativação dos FSs a 633 nm a 11  $\text{J/cm}^2$ , houve diminuição na sobrevivida celular média das células HeLa similar para ambos FS (cerca de 30%), mas em menor proporção quando comparado aos valores obtidos para as células HaCaT (cerca de 50%).

Ao analisar os resultados de sobrevivida após a fotoativação concentração-dependente de DMMB em células HeLa, e correlacioná-los com seus respectivos valores de AAU segundo o teste não-paramétrico de correlação de Spearman (gráfico de correlação não apresentado), notou-se uma moderada e significativa correlação entre diminuição de viabilidade celular e autofagia ( $\text{Rho} = -0,6$   $p < 0,001$ ), semelhante ao observado para células HaCaT ( $\text{Rho} = -0,9$   $p < 0,001$ ). A partir dessa análise, sugere-se que a fotossensibilização do DMMB é capaz de induzir morte celular por autofagia independente do tipo celular.

Todavia, a mesma análise após a fotoativação do MB em células HeLa mostrou baixa correlação entre a diminuição de sobrevivida e os valores de AAU ( $\text{Rho} = -0,4$   $p < 0,001$ ),

conforme também foi observado após sua fotoativação em células HaCaT ( $Rho = -0,5$ ,  $p < 0,001$ ), o que nos permite afirmar que, em ambas as linhagens celulares, a perda de viabilidade após TFD por MB não está correlacionada com autofagia, ou seja, a morte celular detectada pelo método colorimétrico de redução de MTT não é devido ao mecanismo de morte celular autofágica.

A presença de vacúolos autofágicos em células HeLa após o tratamento com DMMB, foram confirmados pelo ensaio de fluorescência com AO (Figura 28).



**Figura 28:** Imagens células HeLa e HaCaT marcadas com AO, mostrando apenas o canal de emissão de fluorescência vermelha indicando vacúolos ácidos, 48 h após fotoativação do MB a 2,0  $\mu\text{mol/L}$  e DMMB a 10  $\text{nmol/L}$  a 633 nm, sob dose de 11  $\text{J/cm}^2$ . Controle: células não tratadas com FS. Aumento 520X. Escala 20  $\mu\text{m}$ . Todas as imagens representam campos aleatórios a partir de duas repetições de dois experimentos independentes

De acordo com a Figura 28, a presença de vacúolos ácidos após o tratamento com DMMB a 10  $\text{nmol/L}$  em células HeLa é muito mais expressivo quando comparado às células controle, indicando, principalmente, o acúmulo de vacúolos autofágicos. Esses dados assemelham-se ao padrão de marcação obtido após a fotossensibilização do DMMB em células HaCaT (Figura 13). Entretanto, o padrão de marcação de AO após fotossensibilização

do MB em células HeLa revelou um perfil de maior quantidade de vacúolos ácidos quando comparado às células HaCaT após fotoativação deste mesmo FS, mas esse perfil é semelhante ao das células HeLa na ausência de FS (células controle).

Esses dados confirmam a presença de vacúolos autofágicos em ambas as linhagens celulares após fotossensibiliza-las com DMMB, indicando que o padrão de resposta celular após TFD com este FS é semelhante, independente do tipo celular.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A análise concentração-dependente da toxicidade dos FSs MB e DMMB em células HaCaT, usando-se três ensaios colorimétricos comumente utilizados na avaliação de sobrevivência celular, demonstrou que na ausência de irradiação, ambos FSs não são citotóxicos, mas sob irradiação a 633 nm, região de excitação dos FSs, mostraram fototoxicidade dose de luz-dependente.

Dentre os FSs, o DMMB mostrou ser mais eficiente quanto à indução de morte por TFD, uma vez que, numa concentração diferindo à do MB em duas ordens de grandeza, gerou mesmo índice de morte celular que o MB. As análises de geração de EROs, dentro do limite de detecção das sondas utilizadas, apresentaram que a indução de estresse oxidativo promovido após fotoativação do MB foi mais proeminente do que a observada para o DMMB. E, conforme análises de correlação, o aumento do nível EROs concentração-dependente mostrou-se alto e significativamente correlacionado com aumento de morte celular após fotoativação de MB em células HaCaT. Ao contrário, para DMMB esta correlação não foi relevante.

Através das estratégias de medida de AAU e de quantificação de vacúolos autofágicos, foi possível determinar a associação da fotossensibilização de DMMB com morte celular autofágica em células HaCaT e em células HeLa. E, por imunoenaios pela dupla-marcação de LC3-II e LAMP2A, foi possível verificar em células HaCaT que o fluxo autofágico prossegue até a etapa de maturação, na formação de autolisossomas.

Ao analisar as organelas danificadas após TFD, verificou-se que ambos os FSs causam injúrias tanto ao lisossomas quanto às mitocôndrias de células HaCaT. Além disso, os ensaios de citolocalização do MB e DMMB confirmam a localização desses FSs nessas organelas.



Apesar da localização subcelular de ambos FSs ser a mesma, não se observou fotodano após TFD com MB nas mesmas concentrações nanomolares obtidas após TFD com DMMB, pois, em tais condições, o MB encontra-se fotoquimicamente inativo nas mitocôndrias devido à redução pelas coenzimas presentes nesta organela. Como o DMMB possui um potencial de redução menor, o mesmo não se encontra reduzido, sendo então fototóxico às células mesmo em baixas concentrações, condições estas que justificam o brando desbalanço oxidativo gerado e a indução de autofagia como resposta celular. As condições em que o MB não se encontra totalmente reduzido são em concentrações mais elevadas, nas quais se observa a geração de um nível de EROs maior e não se observa resposta autofágica após fotossensibilização.

A partir desses dados concluímos que a indução de autofagia por fotoirradiação do DMMB está correlacionada com a morte celular fotoinduzida, em que observamos uma interrupção do fluxo autofágico tardio, e conseqüentemente uma morte celular autofágica em condições cujo desbalanço oxidativo fotoinduzido é pequeno. Portanto, a morte celular fotoinduzida por DMMB não está exclusivamente relacionada com o nível geral de estresse oxidativo por ele gerado, mas em vez disso, esta se relaciona com a geração de EROs em níveis brandos, no local adequado da célula e na indução de mecanismos específicos de morte celular. Sugere-se então que, o dano mitocondrial observado após TFD-DMMB acarreta a indução de mitofagia, porém, como os lisossomas também foram comprometidos pela TFD o fluxo autofágico não pôde ser concluído, conforme foi observado o acúmulo de vacúolos ácidos.

Esses resultados nos levaram a propor que seria possível induzir a mesma resposta autofágica obtida com TFD-DMMB usando o MB. A partir de uma indução prévia de mitofagia, utilizando  $H_2O_2$  e rotenona em condições de induzir um desbalanço oxidativo mitocondrial brando e, conseqüentemente, a autofagia desta organela, seguiu-se com

fotoativação do MB, numa concentração não fototóxica, mas que possivelmente o desbalanço oxidativo gerado causasse injúrias lisossomais que impediriam o fluxo mitofágico. O esperado foi observado pelo acúmulo de vacúolos ácidos autofágicos, pelo aumento dos valores de AAU e pela diminuição da viabilidade celular, assim como foi observado para o DMMB.

Os trabalhos de Reiners e colaboradores (2010) sugeriram que a TFD cujos FSs têm como alvo subcelular os lisossomas, provavelmente induzirão uma forma abortada de autofagia, uma vez que lisossomas danificados não poderão concluir o fluxo autofágico. No entanto, diferente do que observamos para o DMMB em células HaCaT, os pesquisadores propõem que nesses casos o fluxo autofágico ocorreria somente até a etapa de extensão, ou seja, até a etapa de formação de autofagossoma, não podendo ser prolongado, pois não haveria lisossomas viáveis cujo autofagossoma pudesse se fundir para cumprir a etapa de maturação. Todavia, a extensão em que a interrupção do processo autofágico afeta a fototoxicidade relativa de FSs cujo alvo subcelular são os lisossomas, não é conhecida.

Dado que as células cancerosas normalmente desenvolvem resistência a tratamentos que induzem morte celular por apoptose (Dias and Bailly, 2005; Olie e Zangemeister- Wittke, 2001), a ativação seletiva de autofagia possibilitada pelo tratamento de TFD com DMMB em células cancerosas, poderia ser uma estratégia viável para tratamento de cânceres resistentes para vias apoptóticas.

Além disso, os mecanismos pelos quais o DMMB fotoativo pode interferir nas funções celulares são de interesse não só do ponto de vista terapêutico, mas também do ponto de vista experimental, ao servir de metodologia para o estudo das vias de interação autofágica com vacúolo lisossômico.

Essa dissertação apresenta resultados conclusivos mostrando que a eficiência fotodinâmica está relacionada à condições de fotossensibilização em organelas específicas,

mitocôndria e lisossomas, desencadeando a morte celular autofágica, sob baixas concentrações de geração de EROs. Esse trabalho também ajuda a desenvolver o conceito de que propor fotossensibilizadores mais eficazes para a TFD, significa melhoria na especificidade das reações de fotossensibilização e não apenas melhoria na eficiência de geração de EROs.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agarwal, M.L.; Clay, M.E.; Harvey, E.J.; Evans, H.H.; Antunez, A.R.; Oleinick, N.L. Photodynamic therapy induces rapid cell death by apoptosis in L5178Y mouse lymphoma cells. *Cancer Research*, **1991**, 51:5993–5996.
- Ahlberg, J.; Glaumann H. Uptake – microautophagy - and degradation of exogenous proteins by isolated rat liver lysosomes: Effects of pH, ATP, and inhibitors of proteolysis. *Exp Mol Pathol*, **1985**, 42:78–88.
- Andrzejak, M.; Price, M.; Kessel, D.H. Apoptotic and autophagic responses to photodynamic therapy in 1c1c7 murine hepatoma cells. *Autophagy*, **2011**, 7, 979-984.
- Aruoma, O.I. Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants. *Food Chemical Toxicology*, **1994**, v.32, n.7, p.671-683.
- Aveline, B. M.; Redmond, R. W. Can cellular phototoxicity be accurately predicted on basis of sensitizer photophysics? *Photochemistry and Photobiology*, **1999**, 69:306–316.
- Bacellar, I.O.L.; Pavanni, C.; Sales, E.M.; Itri, R.; Wainwright, M.; Baptista, M.S. Membrane Damage Efficiency of Phenothiazinium Photosensitizers. *Photochemistry and Photobiology*, **2014**.
- Baehrecke, E. H. Autophagy: dual roles in life and death? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*, **2005**, 6, 505-510.
- Baptista, M.S.; Indig, G.L. Effect of BSA binding on photophysical and photochemical properties of triarylmethane dyes. *Journal of Physical Chemistry*, **1998**, 102, 4678-4688.
- Barreiros, A.L.B.S.; David, J.M. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova*, **2006**, v. 29, n. 1, p. 113-123.
- Borner, C. The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Molecular Immunology*, **2003**, 39:615-47.
- Boveris, A.; Chance, B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide: general properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem. J*, **1973**, 134, 707–716.
- Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, **1976**, 72. p.248-254.
- Buytaert, E., Callewaert, G.; Hendrickx, N.; Scorrano, L.; Hartmann, D.; Missiaen, L.; Vandenheede, J.R.; Heirman, I.; Grooten, J.; Agostinis P. Role of endoplasmic

- reticulum depletion and multidomain proapoptotic BAX and BAK proteins in shaping cell death after hypericin-mediated photodynamic therapy. *The FASEB Journal*, **2006**, 20, 1–30.
- Buytaert, E.; Dewaele, M.; Agostinis P. Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy. *Biochimica et Biophysica Acta*, **2007**, 1776: 86–107.
- Cadenas, E.; Davies, K.J. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med.* **2000**, 29(3-4):222-30.
- Carmicheal, J.; DeGraff, W.G.; Gazdar, A.F.; Minna, J.D.; Mitchell, J.B. Evaluation of a tetrazolium-based, semi-automated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Research*, **1987**, 47: 936-942.
- Castano, A.P.; Demidova, T.N.; Hamblin, M.R. Mechanisms in photodynamic therapy: part one – photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, **2004**, 1, 279–293.
- Castano, A. P.; Deminova, T. N.; Hamblin, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: part two – cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, **2005**, 2, 1-23.
- Chen, Q.; Huang, Z.; Chen, H.; Shapiro, H.; Beckers, J.; Hetzel, F.W. Improvement of Tumor Response by Manipulation of Tumor Oxygenation During Photodynamic Therapy. *Photochemistry and Photobiology*, **2002**, 76:197–203.
- Chen, Y.; McMillan-Ward, E; Kong, J; Israels, S.J.; Gibson S.B. Mitochondrial electron-transport-chain inhibitors of complexes I and II induce autophagic cell death mediated by reactive oxygen species. *J Cell Sci.* **2007**, 120:4155–4166.
- Chen, Y.; Gibson, S.B. Is mitochondrial generation of reactive oxygen species a trigger for autophagy? *Autophagy*, **2008**, 4:246–248.
- Chen, Y.; Zheng, W.; Li, Y.; Zhong, J.; Ji, J.; Shen, P. Apoptosis induced by methylene-blue-mediated photodynamic therapy in melanomas and the involvement of mitochondrial dysfunction revealed by proteomics. *Cancer Science*, **2008**, 99:2019–2027
- Collier, A.C.; Pritsos, C.A. The mitochondrial uncoupler dicumarol disrupts the MTT assay. *Biochemical Pharmacology*, **2003**, 66, 281-287.
- Cordero, M.D.; De Miguel, M.; Moreno Fernández, A.M.; Carmona López, I.M.; Garrido Maraver, J.; Cotán, D.; et al. Mitochondrial dysfunction and mitophagy activation in blood mononuclear cells of fibromyalgia patients: implications in the pathogenesis of the disease. *Arthritis Research & Therapy*, **2010**, 12:R7.

- Crompton, M.; Virji, S.; Doyle, V.; Johnson, N.; Ward, J.M. The mitochondrial permeability transition pore. *Biochemical Society Symposia*, **1999**, 66: 67-79.
- Cuervo, A.M.; Dice, J.F. A receptor for the selective uptake and degradation of proteins by lysosomes. *Science*, **1996**, 273, 501-503.
- Cuervo, A.M.; Dice, J.F. Unique properties of lamp2a compared to other lamp2 isoforms. *Journal of Cell Science*, **2000**, 113, 4441–4450.
- Daghastanli, N.A.; Itri, R.; Baptista, M.S. Singlet Oxygen Reacts with 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein and Contributes to the Formation of 2',7'-Dichlorofluorescein. *Photochemistry and Photobiology*, **2008**, 84, 5:1238-1243.
- Dalla Via, L.; Magno, S.M. Photochemotherapy in the Treatment of Cancer, *Current Medicinal Chemistry*, **2001**, 8, 1405-1428.
- Dai, T; Huang, Y.Y.; Hamblin, M.R. Photodynamic therapy for localized infections—State of the art. *Photodiagn Photodyn Ther*. **2009**; 6:170-188.
- Debacq-Chainiaux, F.; Erusalimsky, J.D.; Campisi, J.; Toussaint, O. Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-beta-gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. *Nature Protocols*, **2009**, 4, 1798–1806.
- Demidova, T.N.; Hamblin, M.R. Photodynamic inactivation of Bacillus spores, mediated by phenothiazinium dyes. *Applied and Environmental Microbiology*, **2005**, 71, 6918–6925.
- Dewaele, M.; Martinet, W.; Rubio, N.; Verfaillie, T.; de Witte, P.A.; Piette, J.; Agostinis, P. Autophagy pathways activated in response to PDT contribute to cell resistance against ROS damage. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, **2011**, 15, 1402-1414.
- Dias, N.; Bailly, C. Drugs targeting mitochondrial functions to control tumor cell growth. *Biochem. Pharmacol*, **2005**, 70, 1-12.
- Dimri, G.P.; Lee, X.; Basile, G.; Acosta, M.; Scott, G.; Roskelley, C.; Medrano, E.E.; Linskens, M.; Rubelj, I.; Pereira-Smith, O.; Peacocke, M.; Campisi, J. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, **1995**, 92, 9363-9367.
- Dini, L.; Inguscio, V.; Tenuzzo, B.; Panzarini, E. Rose bengal acetate photodynamic therapy-induced autophagy. *Cancer Biology and Therapy*, **2010**, 10(10), 1048-1055.
- Ditaranto, K.; Tekirian, T.L.; Yang A.J. Lysosomal membrane damage in soluble Aβ-mediated cell death in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Disease*, **2001**, 8: 19–31.
- Dougherty, T.J. Studies on the structure of porphyrins contained in Photofrin. *Photochemistry and Photobiology*, **1987**, 46, 569-573.

- Dougherty, T.J.; Gomer, C.J.; Henderson, B.W.; Jori, G.; Kessel, D.; Korbélik, M.; Moan, J.; Peng, Q. Photodynamic therapy. *Journal of the National Cancer Institute*, **1998**, 90:889–905.
- Dröge, W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews*, **2002**, 82 (1), 47–95.
- Dunn, W.A.J. Studies on the mechanisms of autophagy: formation of the autophagic vacuole. *Journal Cell Biology*, **1990**, 110(6): 1923-1933.
- Emaus R.K.; Grunwald R.; Lemasters J.J. Rhodamine 123 as a probe of transmembrane potential in isolated rat-liver mitochondria:spectral and metabolic properties. *Biochim Biophys Acta*. **1986**, 850:436–448.
- Eskelinen, E.L. Doctor Jekyll and Mister Hyde: Autophagy can promote both cell survival and cell death. *Cell Death and Differentiation*, **2005**, 12 (2):1468–1472.
- Eskelinen, E.L. Roles of LAMP-1 and LAMP-2 in lysosome biogenesis and autophagy. *Mol Aspects Med.*, **2006**, 27:495–502.
- Foote, C.S. Definition of Type I and Type II photosensitized oxidation. *Photochemistry and Photobiology*, **1991**, 54, 659.
- Foote, C.S. Mechanisms of photosensitized oxidation. *Science*, **1968**, 162, 963-970.
- Frank, M.; Duvezin-Caubet, S.; Koob, S.; Occhipinti, A.; Jagasia, R.; Petcherski, A.; Ruonala, M.O.; Priault, M.; Salin, B.; Reichert, A.S. Mitophagy is triggered by mild oxidative stress in a mitochondrial fission dependent manner. *Biochim Biophys Acta*, **2012**, 1823:2297-2310.
- Geng, Y.; Kohli, L.; Klocke, B.J.; Roth, K.A. Chloroquine-induced autophagic vacuole accumulation and cell death in glioma cells is p53 independent. *Neuro Oncology*, **2010**, 12, 473–481.
- Gabrielli, D.S.; Belisle, E.; Severino, D.; Kowaltowski, A.J.; Baptista, M.S. Binding, aggregation and photochemical properties of methylene blue in mitochondrial suspensions. *Photochemistry and Photobiology*, **2004**, 79, 227-232.
- Hailey, D.W.; Rambold, A.S.; Satpute-Krishnan, P.; Mitra, K.; Sougrat, R.; Kim, P.K.; Lippincott-Schwartz, J. Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation. *Cell*, **2010**, 141, 656–667.
- Halliwell, B. Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutrition Review*, **1994**, 52 (8), 253-265.

- Hatz, S.; Poulsen, L.; Ogilby, P.R. Time-resolved Singlet Oxygen Phosphorescence Measurements from Photosensitized Experiments in Single Cells: Effects of Oxygen Diffusion and Oxygen Concentration. *Photochemistry and Photobiology*, **2008**, 84:1284–1290.
- Henderson, B.W.; Dougherty, T.J. How Does Photodynamic Therapy Work. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **1992**, 55, 145-157.
- Kabeya Y.; Mizushima N.; Ueno T.; Yamamoto A.; Kirisako T.; Noda T.; Kominami E.; Ohsumi, Y.; Yoshimori T. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO Journal*, **2000**, 19 (21), 5720-5728.
- Kalyanaraman, B.; Darley-Usmar, V.; Davies, K.J.; Dennery, P.A.; Forman, H.J.; Grisham, M.B.; Mann, G.E.; Moore, K.; Roberts, L.J.; Ischiropoulos, H. Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations. *Free Radical Biology and Medicine*, **2012**, 52(1):1-6.
- Kessel, D.; Luo, Y.; Deng, Y.Q. and Chang, C.K. The role of subcellular localization in initiation of apoptosis by photodynamic therapy. *Photochemistry and Photobiology*, **1997**, 65:422–426.
- Kessel D. Correlation between subcellular localization and photodynamic therapy. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, **2004**, 8:1009–1014.
- Kessel, D.; Vicente, M.G.H.; Reiners J.J. Initiation of apoptosis and autophagy by photodynamic therapy. *Lasers in Surgery and Medicine*, **2006**, 38:482–488.
- Kessel, D.; Reiners, J.J. Apoptosis and autophagy after mitochondrial or endoplasmic reticulum photodamage. *Photochemistry and Photobiology*, **2007**, 83:1024-8.
- Kessel, D.; Arroyo, A.S. Apoptotic and autophagic responses to Bcl-2 inhibition and photodamage. *Photochemical and Photobiological Science*, **2007**, 6:1290–1295.
- Kessel, D.; Price, M; Reiners, J.J. ATG7 deficiency suppresses apoptosis and cell death induced by lysosomal photodamage. *Autophagy*, **2012**, 8:1333-1341.
- Kim J.S.; He, L.; Lemasters, J.J. Mitochondrial permeability transition: a common pathway to necrosis and apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, **2003**, 304:463–470.
- Kim, J.; Klionsky, D.J. Autophagy, cytoplasm-to-vacuole targeting pathway, and pexophagy in yeast and mammalian cells. *Annual Review Biochemistry*. **2000**, 69: 303-342.
- Klionsky, D.J. Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2007**; 8:931-937.



- Klionsky, D.J.; Abeliovich, H.; Agostinis, P.; Agrawal, D. K. et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. *Autophagy* **2008**, *4*, 151–75.
- Klotz, L.O.; Kröncke, K.D.; Sies, H. Singlet Oxygen-Induced Signaling Effects in Mammalian Cells. *Photochemical and Photobiological Science*, **2003**, *2*:88–94.
- Kowaltowski, A.J.; Castilho, R.F.; Vercesi, A.E. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. *FEBS Lett.* **2001**, *495*(1-2): 12-5.
- Kowaltowski, A.J.; Souza-Pinto, N.C.; Castilho, R.F.; Vercesi, A.E. Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radical Biology and Medicine*, **2009**, *47*(4):333-43.
- Kuwana, T.; Newmeyer, D.D. Bcl-2-family proteins and the role of mitochondria in apoptosis. *Current Opinion in Cell Biology*, **2003**, *15*:691-699.
- Lee, B.Y.; Han, J.A.; Im, J.S.; Morrone, A.; Johung, K.; Goodwin, E.C.; Kleijer, W.J.; DiMaio, D.; Hwang, E.S. Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase. *Aging Cell*, **2006**, *5*: 187–95.
- Lee, S.; Zhu, L.; Minhaj, A.M.; Hinds, M.F.; Vu, D.H.; Rosen, D.I.; Davis, S.J.; Hasan, T. Pulsed diode laser-based monitor for singlet molecular oxygen. *J. Biomed. Opt.* **2008**, *13*(3):034010-034010-8.
- Lemasters, J.J.; Nieminen, A.L.; Qian, T.; Trost, L.C.; Elmore, S.P.; Nishimura, Y.; et al. The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy. *Biochim Biophys Acta*, **1998**, *1366*:177-196.
- Lemasters, J.J. Selective mitochondrial autophagy, or mitophagy, as a targeted defense against oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging. *Rejuvenation Research*, **2005**, *8*, 3–5
- Lim, E.; Oak, C.; Heo, J.; Kim, Y. Methylene blue-mediated photodynamic therapy enhances apoptosis in lung cancer cells. *Oncology Reports*, **2013**, *30*(2), 856-862
- Lu, Y.; Jiao, R.; Chen, X.; Zhong, J.; Ji, J.; Shen, P. Methylene blue-mediated photodynamic therapy induces mitochondria-dependent apoptosis in HeLa cell. *Journal of Cellular Biochemistry*, **2008**, *105*:1451–60.
- Mai, S.; Muster, B.; Bereiter-Hahn, J.; Jendrach, M. Autophagy proteins LC3B, ATG5 and ATG12 participate in quality control after mitochondrial damage and influence lifespan. *Autophagy*, **2012**, *8*:47-62.
- Manders, E.M.M; Verbeek, F.J.; Aten J.A. Measurement of colocalization of objects in dual-colour confocal images. *Journal of Microscopy*, **1993**, *169*:375-382.

- Martins, W.K.; Severino, D.; Souza, C.; Stolf, B.S.; Baptista, M.S. A novel in-vitro approach to evaluate autophagic vacuole. *Biotechnology Journal*, **2013**, 8:730-737.
- McConkey, D.J. Biochemical determinants of apoptosis and necrosis. *Toxicology Letters*, **1998**, 99, 157-168.
- Meijer, A.J.; Codogno, P. Regulation and role of autophagy in mammalian cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **2004**, 36(12): 2445-2462.
- Mellish, K.J.; Cox, R.D.; Vernon, D.I.; Griffiths, J.; Brown, S.B. In Vitro Photodynamic Activity of a Series of Methylene Blue Analogues. *Photochemistry and Photobiology*, **2002**, 75(4), 392-397.
- Miller, J. H. Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. **1972**, pp. 171-224.
- Miller, T.J.; Phelka, A.D.; Tjalkens, R.B.; Dethloff, L.A.; Philbert, M.A. CI-1010 induced opening of the mitochondrial permeability transition pore precedes oxidative stress and apoptosis in SY5Y neuroblastoma cells. *Brain Research*, **2003**, v. 963, p. 43-56.
- Moserova, I.; Kralova, J. Role of ER Stress Response in Photodynamic Therapy: ROS Generated in Different Subcellular Compartments Trigger Diverse Cell Death Pathways. *PLoS One*, **2012**, 7:e32972.
- Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, **1983**, 65, 55-63.
- Nakahira, K.; Choi, A.M. Autophagy: a potential therapeutic target diseases. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, **2013**, 305(2)L93-L107.
- Niki, E.; Yoshida, Y.; Saito, Y.; Noguchi, N. Lipid peroxidation: mechanisms, inhibition, and biological effects. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **2005**, v. 338, p. 668-676.
- O'Brien, J.S. Beta-galactosidase deficiency (GM1 gangliosidosis, galactosialidosis, and Morquio syndrome Type B); ganglioside sialidase deficiency (Mucopolidosis IV). In Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, et al ed. *The Metabolic Basis of Inherited Disease*, 6th, New York: McGraw-Hill Book Co, **1989**, 1797–1806.
- Olie, R.A.; Zangemeister-Wittke, U. Targeting tumor cell resistance to apoptosis induction with antisense oligonucleotides: progress and therapeutic potential. *Drug Resist. Updat.* **2001**, 4, 9-15.

- O'Neill, J.; Wilson, M.; Wainwright, M. Comparative antistreptococcal activity of photobactericidal agents. *Journal of Chemotherapy*, **2003**, 15(4), 329-34.
- Ochsner, M. Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumors. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **1997**, 39, 1-18.
- Oleinick, N.L.; Xue, L.Y.; Chiu, S.M.; Joseph S. Autophagy in response to photodynamic therapy: Cell survival vs. cell death. *Progress in Biomedical Optics and Imaging - Proceedings of SPIE*, **2009**, Vol. 7164, 716403, 1-9.
- Oliveira, C.S.; Turchiello, R.; Kowaltowski, A.J.; Indig, G.L.; Baptista, M.S. Major determinants of photoinduced cell death: Subcellular localization versus photosensitization efficiency. *Free Radical Biology and Medicine*, **2011**, 51(4):824-833.
- Ormerod, M.G.; Sun, X.M.; Brown, D.; Snowden, R.T.; Cohen, G.M. Quantification of apoptosis and necrosis by flow cytometry. *Acta Oncologica*, **1993**, 32, 417-424.
- Oseroff, A.R.; Morgan, J. Mitochondria-based photodynamic anti-cancer therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **2001**, 49, 71-86.
- Paglin, S.; Hollister, T.; Delohery, T.; Hackett, N.; McMahon, M.; Sphicas, E.; Domingo, D.; Yahalom, J. A novel response of cancer cells to radiation involves autophagy and formation of acidic vesicles. *Cancer Research*, **2001**, 61: 439-444.
- Pallotti, F.; Lenaz, G. Isolation and subfractionation of mitochondria from animal cells and tissue culture lines. *Methods in Cell Biology*, **2001**, 65:1-35.
- Pandey, R. K. Recent advances in photodynamic therapy. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, **2000**, 4, 368-373.
- Pavani, C.; Iamamoto, Y.; Baptista, M.S. Mechanism and Efficiency of Cell Death of Type II Photosensitizers: Effect of Zinc Chelation. *Photochemistry and Photobiology*, **2012**, 88(4):774-81.
- Phoenix, D.A.; Sayed, Z.; Hussain, S.; Harris, F.; Wainwright, M. The phototoxicity of phenothiazinium derivatives against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, **2003**, 39(1):17-22.
- Pogue, B.W.; Ortel, B.; Chen, N.; Redmond, R.W.; Hasan, T. A photobiological and photophysical-based study of phototoxicity of two chlorins. *Cancer Research*, **2001** 61:717-724.

- Poot, M.; Zhang, Y.Z.; Kramer, J.A.; Wells, K.S.; Jones, L.; Hanzel, D.K.; Lugade, A.G.; Singer, V.L.; Haugland, R.P. Analysis of mitochondrial morphology and function with novel fixable fluorescent stains. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, **1996**, 44:1363–1372.
- Ragàs, X.; Dai, T.; Tegos, G.P.; Agut, M.; Nonell, S.; Hamblin, M.R. Photodynamic inactivation of *Acinetobacter baumannii* using phenothiazinium dyes: in vitro and in vivo studies. *Lasers in Surgery and Medicine*, **2010**, 42(5):384–390.
- Redmond, R.W.; Kochevar, I.E. Spatially-Resolved Cellular Responses to Singlet Oxygen. *Photochemistry and Photobiology*, **2006**, 82(5):1178-1186.
- Reiners, J.J.; Agostinis, P.; Berg K., Oleinick, N.L.; Kessel, D. Assessing autophagy in the context of photodynamic therapy. *Autophagy*, **2010**, 6: 7–18.
- Rice, L.; Phoenix, D.A.; Wainwright, M.; Waring, J. Effect of increasing methylation on the ability of methylene blue to cause diaphorase-catalysed oxidation of NADH. *Biochemical Society Transaction*, **1998**, 26.
- Rice, L.; Wainwright, M.; Phoenix, D.A. Phenothiazine photosensitisers. III. Activity of methylene blue derivatives against pigmented melanoma cell lines. *Journal of Chemotherapy*, **2000**, 12, 94 –104.
- Richter, C.; Gogvadze, V.; Laffranchi, R.; Schlapbach, R.; Schweizer, M.; Suter, M.; Walter, P.; Yaffee, M. Oxidants in mitochondria: from physiology to diseases. *Biochim. Biophys. Acta*, **1995**, 1271, 67–74.
- Rodriguez, M.E.; Azizuddin, K.; Chiu, S.M.; Xue, L.Y.; Zhang, P.; Lam, M.; et al. Structural factors and mechanisms underlying the improved photodynamic cell killing with silicon phthalocyanine photosensitizers directed to lysosomes versus mitochondria. *Photochemistry and Photobiology*, **2009**, 85:1189–1200.
- Ronsein, G.E.; Oliveira, M.C.B.; Miyamoto, S.; Medeiros, M.H.G.; Di Mascio, P. Tryptophan Oxidation by Singlet Molecular Oxygen [ $O_2 (^1\Delta_g)$ ]: Mechanistic Studies Using  $^{18}O$ -Labeled Hydroperoxides, Mass Spectrometry, and Light Emission Measurements. *Chemical Research in Toxicology*, **2008**, 21, 1271–1283.
- Rubio, N.; Coupienne, I.; Di Valentin E.; Heirman, I.; Grooten, J.; Piette, J.; Agostinis, P. Spatiotemporal autophagic degradation of oxidatively damaged organelles after photodynamic stress is amplified by mitochondrial reactive oxygen species. *Autophagy*, **2012**, 8:1312-1324;
- Ruck, A.; Kollner, T.; Dietrich, A.; Strauss W.; Schneckenburger, H. Fluorescence formation during photodynamic therapy in the nucleus of cells incubated with cationic and

- anionic water-soluble photosensitizers. *Journal of Photochemistry and Photobiology*, B, **1992**, 12, 403–412.
- Scherz-Shouval, R.; Elazar, Z. ROS, mitochondria and the regulation of autophagy. *Trends in Cell Biology*, **2007**, 17:422-7.
- Scherz-Shouval, R.; Shvets, E.; Fass, E.; Shorer, H.; Gil, L.; Elazar, Z. Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. *EMBO J.* **2007**, 26, 1749–1760.
- Sharpe, J.C.; Arnoult, D.; Youle, R.J. Control of mitochondrial permeability by Bcl-2 family members. *Biochimica et Biophysica Acta*, **2004**, 1644:107-113.
- Strømhaug, P.E.; Berg, T.O.; Berg, K.; Seglen, P.O. A novel method for the study of autophagy: destruction of hepatocytic lysosomes, but not autophagosomes, by the photosensitizing porphyrin tetra(4-sulphonatophenyl) porphine. *Biochem J*, **1997**, 321:217-225.
- Suzuki, K.; Tanaka, H.; Yamanaka, T.; Van Damme, O. The specificity of beta-galactosidase in the degradation of gangliosides. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **1980**. 125:307.
- Svobodová, A.; Psotová, J.; Walterová, D. Natural phenolics in the prevention of UV-induced skin damage. *Biomedical Papers*, **2003**, v. 147, n. 2, p. 137-145.
- Tahara, E. B.; Navarete, F. D.; Kowaltowski, A. J. Tissue-, substrate-, and sitespecific characteristics of mitochondrial reactive oxygen species generation. *Free Radical Biology Medicine*, **2009**, 46:1283–1297.
- Tardivo, J.P.; Del Giglio A.; Paschoal, L.H.C.; Ito A.S.; Baptista, M.S. Treatment of Melanoma Lesions Using Methylene Blue And RL50 Light Source. *Photodyagnosis and Photodynamic Therapy*, **2004**, 1, p. 345-346
- Tardivo, J.P.; Del Giglio, A.; Oliveira, C.S.; Gabrielli, D.S.; Junqueira, H.C.; Tada, D.B.; Severino, D.; Turchiello, R., Baptista, M.S. Methylene blue in photodynamic therapy: from basic mechanisms to clinical applications. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, **2005**. v. 2, p. 175-191.
- Traganos, F.; Darzynkiewicz, Z. Lysosomal proton pump activity: supravital cell staining with acridine orange differentiates leukocytes subpopulations. *New York: Academic Press*, **1994**, Vol. 41: 185–194.
- Trevisi, L.; Pighin, I.; Bazzan, S.; Luciani, S. Inhibition of 3-(4,5 dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) endocytosis by ouabain in human endothelial cells. *FEBS Letters*. **2006**, 580 (11), 2769-2773.

- Vander Heiden, M.G.V.; Thompson, C.B. Bcl-2 proteins: regulators of apoptosis or of mitochondrial homeostasis? *Nature Cell Biology*, **1999**, 1:E209-216.
- Vercesi, A.E.; Kowaltowski, A.J.; Grijalba, M.T.; Meinicke, A.R.; Castilho, R.F. The role of reactive oxygen species in mitochondrial permeability transition. *Bioscience Reports*, **1997**, 17: 43–52.
- Wagner, S.J.; Skripchenko, A.; Robinette, D.; Mallory D.A.; Cincotta, L. Preservation of red cell properties after virucidal phototreatment with dimethyl methylene blue. *Transfusion*, **1998**, 38, 729–737.
- Wagner, M.; Suarez, E.R.; Theodoro, T.R.; Machado Filho, C.D.; Gama, M.F; Tardivo, J.P.; Paschoal, F.M.; Pinhal, M.A. Methylene blue photodynamic therapy in malignant melanoma decreases expression of proliferating cell nuclear antigen and heparanases. *Clin Exp Dermatol*. **2012**, 37:527–533.
- Wainwright, M. Non-porphyrin Photosensitizers in Biomedicine. *Chemical Society Review*, **1996**, 25, 351-359.
- Wainwright, M.; Phoenix, D.A.; Rice, L.; Burrow, S.M.; Waring, J.J. Increased cytotoxicity and phototoxicity in the methylene blue series via chromophore methylation. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **1997**, 40, 233–239.
- Wainwright, M.; Phoenix, D.A.; Gaskell, M.; Marshall, B. Photobactericidal activity of methylene blue derivatives against vancomycin -resistant *Enterococcus* spp. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **1999**, v. 44, n 6, p. 823-825.
- Wainwright, M. The emerging chemistry of blood disinfection. *Chemical Society Reviews*. **2002**, 31, 126–136.
- Wainwright, M.; Giddens, R.M. Phenothiazinium photosensitisers: choices in synthesis and application. *Dyes and pigments*, **2003**, v. 57, p. 245-257.
- Wainwright, M. The development of phenothiazinium photosensitisers. *Photodiagnosis Photodynamic Therapy*, **2005**. 2, 263–272.
- Williams, G.T.; Smith, C.A. Molecular regulation of apoptosis: genetic controls on cell death. *Cell*, **1993**, 74, 777-779.
- Williams, J.L.; Stamp, J.; Devonshire, R.; Fowler, G.J.S. Methylene blue and the photodynamic therapy of superficial bladder cancer. *J.Photochem. Photobiol. B*, **1989**, 4: 229–232.
- Wilson, B.C.; Olivo, M.; Singh, G. Subcellular localization of Photofrin and aminolevulinic acid and photodynamic crossresistance in vitro in radiation-induced fibrosarcoma cells

- sensitive or resistant to Photofrin-mediated photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.* **1997**, 65, 166-176
- Xue, L.Y.; Chiu, S.M.; Azizuddin, K.; Joseph, S.; Oleinick, N.L. The death of human cancer cells following photodynamic therapy: apoptosis competence is necessary for Bcl-2 protection but not for induction of autophagy. *Photochemical and Photobiology*, **2007**, 83, 1016-1023.
- Xue, L.Y.; Chiu, S.M.; Oleinick, N.L. Atg7 deficiency increases resistance of MCF-7 human breast cancer cells to photodynamic therapy. *Autophagy*, **2010**, 6:248-255.
- Yang J.Y.; Yang, W.Y. Spatiotemporally controlled initiation of Parkin-mediated mitophagy within single cells. *Autophagy*, **2011**, 7:1230-1238.
- Yoon, Y.H.; Cho, K.S.; Hwang, J.J.; Lee, S.; Choi, J.A.; Koh, J. Induction of lysosomal dilatation, arrested autophagy, and cell death by Chloroquine in cultured ARPE-19 cells. *Investigative Ophthalmology Visual Science*, **2010**, 51, 6030-6037.
- Zhang, Z.; Leonard, S.S.; Huang, C.; Vallyathan, V.; Castranova, V.; Shi, X. Role of reactive oxygen species and MAPKS in vanadate-induced G<sub>2</sub>/M phase arrest. *Free Radical Biology and Medicine*, **2003**, 34 (10), 1333-1342.
- Zhivotovsky, B.; Orrenius, S. Cell death mechanisms: Cross-talk and role in disease. *Experimental Cell Research*, **2010**, 316(8), 1374-1383.

## SÚMULA CURRICULAR

### 1-Dados Pessoais

**Nome** Nayra Fernandes Sandos

**Nome em** Santos, N.F.

**Citações**

**Bibliográficas**

**Sexo** Feminino

**Filiação** Jose Carlos Nascimento dos Santos e Natalina Santos Fernandes de Jesus

**Nascimento** 28/07/1987 - Vila Velha / ES - Brasil

**Endereço** Rua Camurupim, nº 06, quadra A.

**Residencial** Chácara do Cricaré – 29934-470 – São Mateus – Espírito Santo  
Brasil

Telefone: (27) 99811-7852

E-mail: nayra\_fs@hotmail.com

**Endereço** Universidade de São Paulo, Instituto de Química.

**Profissional** Av. Prof. Lineu Prestes, 748, Bloco 12, sala 1262.

Butantã – 05508-900 – São Paulo, SP – Brasil.

Telefone: (11) 3091-8951

E-mail: nayra.santos@usp.br



## **2- Formação**

### **2006-2010**

Graduação em Bacharelado em Bioquímica.

Universidade Federal de Viçosa, UFV, Brasil.

Bolsista Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico- (CNPq) de Iniciação Científica.

## **3- Idioma**

- **Inglês:** Compreende bem, fala bem, lê bem e escreve bem.

## **4- Atividades Didáticas**

4.1- Monitoria no VI Curso de Inverno em Temas Avançados de Bioquímica e Biologia Molecular realizado no Instituto de Química da USP (**2011**).

4.2- Monitoria na disciplina Estrutura de Biomoléculas e Metabolismo realizada no Instituto de Química da USP (**2011**).

4.3- Prática de Ensino em Química e Bioquímica (**2011**).

4.4- Monitoria na disciplina Laboratório de Bioquímica I realizada no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFV (**2007-2008**).

## **5- Publicações**

### **5.1 - Artigos completos publicados em periódicos**

Mafra, C.L.; Agostini, M.M.; Santos, N.F.; Oliveira, L.S.; Szabó, M.; Labruna, M.B. and Lima, P.H.C. ITS2 as a Marker for Molecular Taxonomic Identification of Ticks Vectors of Rickettsial Agents from Brazil. Submetido, **2014**.

## 5.2- Apresentação Oral de Trabalhos

Apresentação Oral nos Simpósios da UFV: XIX de Iniciação Científica – SIC; IX Mostra Científica da Pós-Graduação – Simpós; VII de Extensão Universitária - SEU e III de Ensino - SEn, **2009**. Investigação de marcadores moleculares para diferenciação e identificação de gêneros e espécies de carrapatos vetores de agentes rickettsiais.

## 5.3- Trabalhos publicados em anais de eventos internacionais

1. Santos, N.F.; Bacellar, I.O.F.; Viotto, A. C.; Martins, W.K., Pavani, C.; Baptista, M.S. In the search for specific mechanisms of photo-induced cell death. In: 62<sup>o</sup> annual Montagna Symposium on the Biology of Skin, Skamania Lodge, Stevenson, WA, United States, **2013**.
2. Santos, N.F.; Bacellar, I.O.F.; Viotto, A. C.; Pavani, C.; Baptista, M.S and Martins, W.K. In the Search for Specific Mechanisms of Photo-Induced Cell Death. In: 10th International Congress on Cell Biology, Rio de Janeiro, RJ, Brazil, **2012**.
3. Viotto, A. C.; Santos, N.F.; Cleidiane, S.; Severino, D.; Baptista, M.S. and Martins, W.K. The Protective Effect Against Photodamage of Aloe barbadensis (Miller) in Human Keratinocytes. In: 10th International Congress on Cell Biology, Rio de Janeiro, RJ, Brazil, **2012**.
4. Santos, N. F.; Moreira, H.N.S.; Barros, E.; Fonseca, L.M.; Malta, T.M.; Mafra, C.L. and Fietto, L.G. Ehrlichia spp. in Ticks Collected from an Area Altered by Anthropic Action, Caratinga County, Minas Gerais, Brazil. In: XXXIX Annual Meeting of The Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq), Foz do Iguaçu, Brazil, **2010**.
5. Moreira, H.N.S.; Barros, E.; Santos, N.F.; Fonseca, L.M.; Malta, T.M. and Mafra, C.L. Ehrlichia spp. in Ticks Collected From an Area Altered by Anthropic Action in Minas Gerais State, Brazil. In: 24th Meeting of the American Society for Rickettsiology, Stevenson, USA, **2010**.
6. Barros, E.; Moreira, H.N.S.; Santos, N.F.; Fonseca, L.M.; Malta, T.M.; Mourão, L.C.; Campos, P.S.; Santos, P.S.; Galvão, M.A.M. and Mafra, C.L. Molecular investigation of

*Rickettsia* in an area under high anthropogenic change in Minas Gerais State, Brazil. In: 24th Meeting of the American Society for Rickettsiology, Stevenson, USA, **2010**.

7. Santos, N.F., Agostini, M.M., Mourão, L.C., Malta, T.M., Silva, W. G., Galvão, M.A.M, Siqueira, C. L. M., Moraes, G.H.K. Standardization of Polymerase Chain Reaction for Molecular Identification of Ixodidae Ticks. In: XXXVIII Annual Meeting of the Brazilian Biochemistry and Molecular Biology Society, Águas de Lindóia, São Paulo, **2009**.

#### **5.4- Trabalhos publicados em anais de eventos nacionais**

1. Santos, N. F.; Mafra, C.L. e Moreira, H.N.S. Taxonomia Molecular para Diferenciação e Identificação de Gêneros e Espécies de Carrapatos do Gênero *Amblyomma*. Simpósio de Integração Acadêmica, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, **2010**.

2. Moreira, H.N.S.; Mafra, C.L. e Santos, N. F. Marcadores Moleculares para identificação e diferenciação de carrapatos do gênero *Rhipicephalus*. Simpósio de Integração Acadêmica, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, **2010**.

3. Kill-Silveira, A.; Santos, N.F.; Amado, S.; Mafra, C.L. and Fonseca, A.H. Caracterização de Ecossistemas com Potenciais de Risco para a Infestação por Carrapatos e Transmissão de *Rickettsia* spp. para Humanos no Estado do Rio de Janeiro. Congresso Brasileiro Parasitologia Veterinária, Campo Grande, **2010**.

4. Santos, N.F.; Silva, W.G.; Aguiar, A.P.; Rezende, N.G.; Souto, X.M.; Souza, I. M. and Fietto, L.G. Purificação e Caracterização Parcial de Amilases Extraídas de Sementes de Milho (*Zea Mays*). XIX Simpósio de Iniciação Científica (SIC), IX SIMPÓS - Mostra Científica da Pós-graduação, VII Simpósio de Extensão Universitária e III Simpósio de Ensino, Universidade Federal Viçosa, Minas Gerais, **2009**.

5. Santos, N.F. and Siqueira, C.L.M. Investigação de marcadores moleculares para diferenciação e identificação de gêneros e espécies de carrapatos vetores de agentes rickettsiais. XIX Simpósio de Iniciação Científica (SIC), IX SIMPÓS - Mostra Científica da

Pós-graduação, VII Simpósio de Extensão Universitária e III Simpósio de Ensino Universidade Federal Viçosa, Minas Gerais, **2009**.

#### **6- Depósito de Patente**

Mafra, C.; Agostini, M.; Santos, N.F.; Santos, J.A.D.; Lamego, M.R. A.; Fietto, J.L.R.; Szabó, M.P.J.; Labruna, M.B.; Galvao, M.A.M. Kit diagnostico contendo iniciadores moleculares para a identificação e diferenciação taxonomica de carrapatos. 2011, Brasil. Patente: Patente no Exterior. Número do registro: 014110002448. Data de depósito: 11/08/2011, título: "Kit diagnostico contendo iniciadores moleculares para a identificacao e diferenciacao taxonomica de carrapatos". Instituição financiadora: CNPq.