

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

Bruno Andrade Ono

Avaliação da resposta fotodinâmica em células de melanoma murino
utilizando Photodithazine

São Carlos
2016

Bruno Andrade Ono

Avaliação da resposta fotodinâmica em células de melanoma murino
utilizando Photodithazine

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Física do Instituto de
Física de São Carlos da Universidade de
São Paulo, para obtenção do título de
Mestra em Ciências.

Área de concentração: Física Aplicada
Opção: Física Biomolecular
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Cristina Kurachi

Versão Corrigida
(versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)

São Carlos
2016

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica revisada pelo Serviço de Biblioteca e Informação do IFSC,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Ono, Bruno Andrade
Avaliação da resposta fotodinâmica em células de melanoma murino utilizando Photodithazine / Bruno Andrade Ono; orientadora Cristina Kurachi - versão corrigida -- São Carlos, 2016.
82 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Física Biomolecular) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2016.

1. Terapia fotodinâmica. 2. Photodithazine. 3. Co-localização. 4. FLIM. I. Kurachi, Cristina, orient.
II. Título.

Aos meus pais pelo amor, carinho e ensinamentos

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Sonia e Armando, por todos os ensinamentos e por serem meu exemplo de vida. As minhas conquistas foram e serão sempre de vocês. Muito obrigado por todo amor e carinho.

Ao meu irmão, Roberto, que teve papel fundamental, sendo meu amigo e companheiro. Sou muito grato por ser seu irmão. Muito obrigado.

Ao meu irmão, Carlos, pela ajuda e companheirismo.

À minha segunda família, Beto, Katia e meus dois irmãozinhos, Lucas e Yuji, que sempre torceram pelo meu sucesso.

À minha família, por todo apoio ao longo dos anos.

À minha orientadora, Prof. Dra. Cristina Kurachi, por me receber como aluno e me orientar durante o mestrado e a iniciação científica. Obrigado por todos os ensinamentos passados e, principalmente, por me mostrar como ser um bom pesquisador.

Aos técnicos de laboratório, Dra. Lilian Tan Moryama, Dra. Natalia Mayumi Inada e Dr. Sebastião Pratavieira, que foram essenciais no decorrer do projeto. Obrigado pela amizade e por estarem sempre à disposição para me auxiliar nos experimentos.

Ao Prof. Dr. Vanderlei Bagnato, pelas discussões e observações de grande ajuda para o projeto.

Ao CNPQ, pelo apoio financeiro ao projeto.

A todos os colegas do Laboratório de Biofotônica, com que fiz muitas amizades e deixaram estes anos mais felizes e produtivos. Em especial, aos amigos, Pan, Ila, Marcelo, Isa, Hilde, Paulinha e Clara, que sempre estiveram por perto.

Ao pessoal do Laboratório de Apoio Tecnológico (LAT) e Laboratório de Instrumentação Eletrônica (LIEPO), que sempre ajudaram com a instrumentação do projeto.

Aos amigos de São Carlos, Éverton, Italo, Alex, Herbert, Naiara, Monique, Mari, Raíssa e Débora, por todo o companheirismo durante todos estes anos de graduação e mestrado.

Aos meus amigos de São Paulo, Paulo, Aline, Kelme, Danilo e Samuel por todos os anos de amizade desde o ensino médio. E aos professores e amigos Roseli, Dalvaci e Zanella, que sempre ensinaram com dedicação e me fizeram almejar o ensino superior.

“Que os seus esforços desafiem as impossibilidades. Lembre-se de que as grandes coisas da humanidade foram conquistadas do que parecia impossível.”

-- Charles Chaplin

RESUMO

ONO, B. A. **Avaliação da resposta fotodinâmica em células de melanoma murino utilizando Photodithazine**. 2016. 82 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

A terapia fotodinâmica é uma técnica que vem sendo aprimorada para o tratamento de cânceres e infecções e seu efeito terapêutico consiste na geração de espécies reativas de oxigênio que causam danos irreversíveis às células, levando-as a morte. Ela é considerada menos invasiva que outros tratamentos, podendo ser repetida diversas vezes e utilizada em conjunto com outros tratamentos sem o comprometimento do paciente. Um dos focos da terapia fotodinâmica é o tratamento de cânceres de pele melanoma devido a localização superficial das lesões e a elevada taxa de letalidade que a doença ocasiona, esta alta taxa esta relacionada a formação de tumores secundários em outras regiões do corpo que dificulta a cura. Neste trabalho buscou-se entender a interação do fotossensibilizador de segunda geração, Photodithazine, com as células de melanoma murino de linhagem B16F10. Foram analisadas a captação celular e a co-localização intracelular deste fotossensibilizador através da marcação de componentes celulares em microscopia confocal. Ensaios de viabilidade celular foram realizados para obtenção das concentrações menos citotóxicas sem e com luz, utilizando o teste de MTT. Foi realizada a caracterização do tempo de vida médio fluorescência do fotossensibilizador durante a terapia fotodinâmica em microscópio FLIM (fluorescence lifetime imaging microscopy). Os resultados indicaram que um maior tempo de incubação no escuro causa maior citotoxicidade para as concentrações acima de 0,1 mg/mL de Photodithazine. Os ensaios de terapia fotodinâmica apresentaram redução de mais de 90% de viabilidade celular para baixas concentrações de Photodithazine®, utilizando fluências acima de 2J/cm². O tempo de vida médio de fluorescência do Photodithazine livre em solução apresentou tempo de 3,75 ns e quando ligado às células de 4,63 ns, durante a terapia fotodinâmica o tempo de vida médio de fluorescência apresentou alteração de aproximadamente 0,2 ns. Através do cálculo de coeficientes de correlação, foi observado a alta co-localização em mitocôndrias.

Palavras-chave: Terapia fotodinâmica. Photodithazine. Co-localização. FLIM.

ABSTRACT

ONO, B. A. **Evaluation of photodynamic therapy response in murine melanoma cells using Photodithazine**. 2016. 82 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

Photodynamic therapy is a technique mainly applied in the treatment of cancers and infections. The principal compound of this therapy is the reactive oxygen species generated that react and damage various cellular components, causing cell death. Photodynamic therapy is considered minimally invasive and can be repeated several times without compromising the patient. One of the main focuses of photodynamic therapy is the treatment of melanoma skin cancer due to its superficial location of the lesions and also because the disease has a high rate of mortality, caused by the formation of secondary tumors elsewhere in the body that makes it difficult to cure. In this study, murine melanoma cells were studied in monolayer model using Photodithazine, a photosensitizer of second generation. Cellular uptake and intracellular co-localization of the photosensitizer was observed by labeling cellular components that were analyzed by confocal microscopy. Cell viability assays were performed to obtain the cytotoxic concentrations in the dark, using the MTT test. Using the less cytotoxic concentrations, photodynamic therapy trials were performed to obtain the cytotoxic fluences. Finally, the average lifetime fluorescence of photosensitizer was measured to characterize the photodynamic therapy in FLIM (fluorescence lifetime imaging microscopy). The results indicated that longer dark incubation causes greater cytotoxicity at the concentrations above 0.1 mg/mL of Photodithazine. Thereby the results of photodynamic therapy experiments observed the decreasing from over 90% cell viability at low concentrations of Photodithazine using fluences above 2 J/cm². The average fluorescence lifetime of the free Photodithazine solution was 3.75 ns and cell-bound 4.63 ns, during the photodynamic therapy the average lifetime fluorescence changed approximately 0.2 ns. By calculating correlation coefficients, the high colocalization was observed in mitochondria.

Keywords: Photodynamic therapy. Photodithazine. Co-localization. FLIM.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação do melanoma e sua localização na pele.	23
Figura 2 - Mapa do Brasil mostrando a incidência do câncer de pele melanoma para a) homens e b) mulheres.	24
Figura 3 - Funcionamento da Terapia Fotodinâmica. É necessária a presença de três elementos fundamentais: Luz, oxigênio e fotossensibilizador para que a terapia possa causar danos como necrose, apoptose e autofagia.	28
Figura 4 - Diagrama adaptado de Jablonski	29
Figura 5 - Estrutura química do Photodithazine	30
Figura 6 - Espectro de absorção do Photodithazine a 20 µg/ml em PBS 10 mM e pH = 7.4.....	30
Figura 7 - Espectro de absorção da melanina.....	31
Figura 8 - Princípio da contagem de contagem de fóton único correlacionado no tempo	34
Figura 9 - Sistema de iluminação homogênea para placa de 96 poços.....	41
Figura 10 - Fonte de luz LED em 660 nm para iluminação de placa de Petri desenvolvido pelo Laboratório Apoio Técnico (LAT).....	44
Figura 11 - Viabilidade Celular de Células B16F10 incubadas com Photodithazine no escuro por 1 hora no escuro.....	45
Figura 12 - Viabilidade Celular de Células B16F10 incubadas com Photodithazine no escuro por 4 hora no escuro.....	46
Figura 13 - Viabilidade Celular de Células B16F10 incubadas com Photodithazine no escuro por 24 hora no escuro.	47
Figura 14 - Espectros de fluorescência do Photodithazine em diferentes soluções de PBS, DMEM, DMSO e DMEM com SFB.....	49
Figura 15 - Medição da intensidade de fluorescência de Photodithazine liberado pelas células lisadas.	50
Figura 16 - Curva de calibração do Photodithazine em solução de 90% DMSO e 10% de PBS A 10 mM.....	51
Figura 17 - Curva de correlação da intensidade de fluorescência com a concentração de Photodithazine.	52
Figura 18 - Células B16F10 incubadas com 5g/mL de Photodithazine observadas em microscópio confocal em diversos tempos. Foram empregadas as cores	

<p>falsas verde e vermelho, respectivamente para a autofluorescência das células e do Photodithazine. Escala em 100 μm. Em todos os tempos analisados o fotossensibilizador permaneceu internalizado, não penetrou o núcleo e apresentou acúmulo ao redor do núcleo. A) 1h de incubação, B) 3h de incubação, C) 5h de incubação e D) 24h de incubação.</p>	54
<p>Figura 19 - Células de melanoma murino com Photodithazine visualizadas em um gráfico de intensidade por pixel e uma reconstrução tridimensional de uma sequência de imagens obtidas variando z.</p>	55
<p>Figura 20 - Marcação de componentes celulares das células B16F10. Barra de escala de 20 μm. A) Fluorescência de mitocôndrias, B) Fluorescência do citoesqueleto, C) Fluorescência do Photodithazine e D) Sobreposição das imagens de fluorescência.</p>	57
<p>Figura 21 - Marcação de componentes celulares das células B16F10. Barra de escala de 20 μm. a) Fluorescência de mitocôndrias, b) Fluorescência do citoesqueleto, c) Fluorescência do Photodithazine e D) Sobreposição das imagens de fluorescência.</p>	58
<p>Figura 22 - Marcação de componentes celulares das células B16F10. a) Fluorescência de mitocôndrias, b) Fluorescência do Photodithazine e c) Fluorescências sobrepostas</p>	59
<p>Figura 23 - Marcação de componentes celulares das células B16F10. Barra de escala de 20 μm. A) Fluorescência de mitocôndrias, B) Fluorescência do Photodithazine e C) Fluorescências sobrepostas.....</p>	60
<p>Figura 24 - Viabilidade celular de células B16F10 após o tratamento da Terapia fotodinâmica para as fluências investigadas de: a) 2 J/cm^2, b) 4 J/cm^2, c) 6 J/cm^2, d) 8 J/cm^2, e) 10 J/cm^2 e f) 20 J/cm^2.-ol.....</p>	63
<p>Figura 25 - Viabilidade celular de células B16F10 após o tratamento da Terapia fotodinâmica com Photodithazine para as concentrações investigadas de: a) 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, b) 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, c) 40$\mu\text{g}/\text{mL}$, d) 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$, e) 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e f) 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$.</p>	65
<p>Figura 26 - Tempo de vida médio de fluorescência do Photodithazine a 5 g/mL em 10 mM de PBS. A) Imagem de FLIM da solução de Photodithazine. B) Distribuição do tempo vida médio de fluorescência do Photodithazine com pico em $3,75 \pm 0,07$ ns e desvio padrão de 1,57.....</p>	67
<p>Figura 27 - Imagens de Tempo de vida de fluorescência do Photodithazine em células B16F10 com suas respectivas distribuições do tempo de vida de fluorescência para cada hora de incubação. a) 1 hora de incubação de Photodithazine, b) Distribuição do tempo vida médio de fluorescência para a incubação de 1 hora com pico em 4,63 ns e desvio padrão de 0,64, c) 3 horas de incubação de Photodithazine, d) Distribuição do tempo de vida médio de fluorescência para a incubação de 3 horas com pico em 4,74 ns</p>	

e desvio padrão de 0,79, e) 5 horas de incubação de Photodithazine, f) Distribuição do tempo de vida médio de fluorescência para a incubação de 5 horas com pico em 4,54 ns e desvio padrão de 0,56.....68

Figura 28 - Imagens de tempo de vida médio de fluorescência após aplicado a terapia fotodinâmica em células B16F10. A) Antes da TFD, B) 2 J/cm², C) 6 J/cm², D) 16 J/cm², E) 32 J/cm² e F) 76 J/cm².....70

Figura 29 - Distribuições do tempo de vida médio de fluorescência do Photodithazine. O ajuste da curva esta representada pela linha vermelha e os pontos pretos representam a contagem do tempo de vida de fluorescência. A) Antes da TFD com pico em $4,49 \pm 0,07$ ns e desvio padrão de 1,01. B) 2 J/cm² com pico em $4,61 \pm 0,07$ ns e desvio padrão de 1,23, C) 6 J/cm² com pico em $4,57 \pm 0,07$ ns e desvio padrão de 1,15, D) 16 J/cm² com pico em $4,61 \pm 0,07$ ns e desvio padrão de 1,31, E) 32 J/cm² com pico em $4,55 \pm 0,07$ ns e desvio padrão de 1,37. F) 76 J/cm² com pico em $4,55 \pm 0,07$ ns e desvio padrão de 1,27.....72

Figura 30 - Imagens das células B16F10 durante a TFD acompanhando a fluorescência do Photodithazine. Barra de escala e 50 μm. A) 2 J/cm², B) 6 J/cm², C) 16 J/cm², D) 32 J/cm², E) 76 J/cm² e F) Após toda fotodegradação do Photodithazine74

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ATCC: American Type Culture Collection

DMEM: Meio de Dulbecco Modificado por Eagle

DMSO: dimetil sulfóxido

EROS: Espécies reativas de oxigênio

FLIM: Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy

FS: Fotossensibilizador

MAL: Metil aminolevulinato

MTT: Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2

PBS: Tampão salino fosfato

SFB: Soro fetal bovino

TFD: Terapia fotodinâmica

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
2.1	Melanoma	23
2.1.1	Células de melanoma murinho	26
2.2	Terapia fotodinâmica e os tipos de morte celular	26
2.3	Terapia Fotodinâmica	27
2.4	Photodithazine	29
2.5	Tratamento do melanoma	31
2.6	Co-localização	31
2.7	FLIM	33
3	OBJETIVOS	35
3.1	Objetivos gerais	35
3.2	Objetivos específicos	35
4	MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1	Manutenção das linhagens celulares de câncer de pele	37
4.2	Ensaio de MTT	37
4.3	Citotoxicidade do Photodithazine no escuro em células de melanoma murino .	38
4.4	Lise Celular e quantificação de Photodithazine	39
4.5	Marcação de citoesqueleto e mitocôndrias	39
4.6	Análise da dinâmica do fotossensibilizador em microscopia confocal	40
4.7	Ensaio de terapia fotodinâmica	41
4.8	Ensaio de terapia fotodinâmica e tempo de vida de fluorescência no microscópio confocal e FLIM	42
5	RESULTADOS	45
5.1	Citotoxicidade do Photodithazine no escuro	45
5.2	Internalização do Photodithazine em células de melanoma murino	48

5.3	Caracterização da dinâmica de internalização do Photodithazine e visualização do acúmulo celular em células B16F10.....	53
5.4	Co – localização do Photodithazine em organelas celulares	56
5.5	Tratamento de células de melanoma murino com terapia fotodinâmica utilizando Photodithazine.	61
5.6	FLIM.....	66
6	Conclusão.....	75
	REFERÊNCIAS	77

1 INTRODUÇÃO

A terapia fotodinâmica (TFD) é uma técnica que vem sendo estudada e utilizada com maior frequência atualmente. Desde a década de 70, pesquisas são realizadas para o tratamento de tumores. (1) A técnica atualmente é usada no tratamento de cânceres, infecções por microrganismo e na descontaminação de locais de trabalho. (2-3)

Uma vantagem da terapia é a utilização conjunta com outros tipos de tratamento, pois não causa interferência. (4) Seu funcionamento consiste na ativação de compostos fotossensíveis, os fotossensibilizadores (FS), com uma fonte de luz apropriada para a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs). As espécies reativas de oxigênio são os agentes causadores dos danos intracelulares que levam a morte celular. Alguns fotossensibilizadores, como o Photofrin, possui regulamentação desde 1993 para o uso do tratamento de câncer de pulmão e intestino. (5)

Existem diversas vantagens sobre outros tratamentos como a cirurgia e a radioterapia, pois a TFD não é invasiva e pode ser direcionada ao local de tratamento com precisão. Ao contrário de outras terapias, pode ser realizada diversas vezes e o local do tratamento apresenta geralmente pouca ou nenhuma cicatriz. (6)

Entretando, é comum o relato da sensação de dores nas regiões tratadas com a TFD, além disso as sessões são relativamente demoradas e o paciente necessita passar grande parte do dia no hospital, pois é o local onde é administrado o medicamento e é feita a irradiação da luz. (7)

A TFD é utilizada em hospitais e clínicas no Brasil como opção de tratamento de tumores não melanoma e está sendo difundida através do projeto Terapia Fotodinâmica Brasil, utilizando o Metil aminolevulinato (MAL) como fotossensibilizador. (8)

Um dos problemas de saúde na qual a TFD tem sido investigada é no tratamento do câncer de pele, uma doença que se origina nas células da pele. Só no Brasil, é esperado que haja 175.760 novos casos de câncer de pele não melanoma para o ano de 2016, de acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA). Um dos grandes desafios da TFD é o tratamento do câncer de pele melanoma, pois apesar da baixa incidência na população brasileira, é o câncer que possui alta taxa de

mortalidade. (9)

Existem diversos estudos mostrando a eficácia da TFD em modelos animais (10) e novos testes clínicos estão sendo realizados para a implementação em clínica e hospitais como uma opção a outros tipos de tratamento. Por se tratar de um método minimamente invasivo ao paciente, pode apresentar melhores taxas para recuperação e maior aceitação pelos pacientes.

Algumas limitações da TFD são a baixa penetração nos tecidos, menos que um 1 cm com os fotossensibilizadores atualmente aprovados, e complicações como metástases são dificilmente tratadas pela terapia. Estudos clínicos demonstraram uma baixa seletividade do tumor pelo fotossensibilizador, o que gera prolongada fotossensibilização da área. (11)

Para que haja um aprimoramento, é crescente o número de pesquisas básicas realizado ao longo dos anos. O entendimento do funcionamento de mecanismos celulares pode contribuir para a melhora dos protocolos específicos para cada alvo.

Neste trabalho, buscou-se um melhor entendimento da terapia fotodinâmica investindo os mecanismos de ação de um fotossensibilizador derivado de clorina e_6 em células de melanoma murino.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Melanoma

O câncer de pele é uma doença de alta incidência no mundo e pode ser classificada em dois tipos: melanoma e não melanoma. Os dois tipos atingem células da pele, porém o primeiro atinge o melanócito, célula especializada na produção de melanina, um pigmento de cor escura que confere proteção contra os raios ultravioletas (UV) do sol, e o segundo atinge os queratinócitos, células produtoras de queratina, composto de impermeabilização da pele. Os melanócitos e as células basais (figura 1) são encontrados entre a derme e a epiderme.

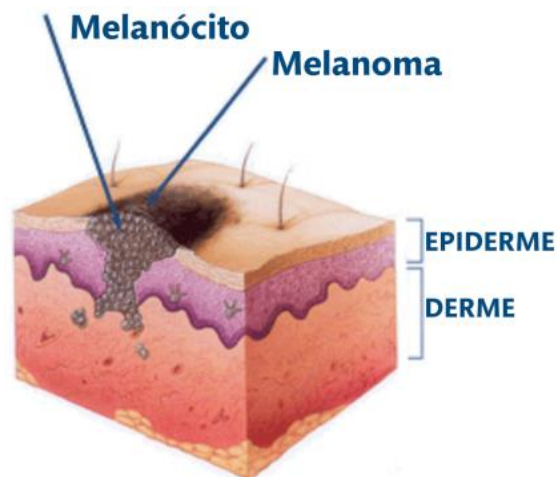


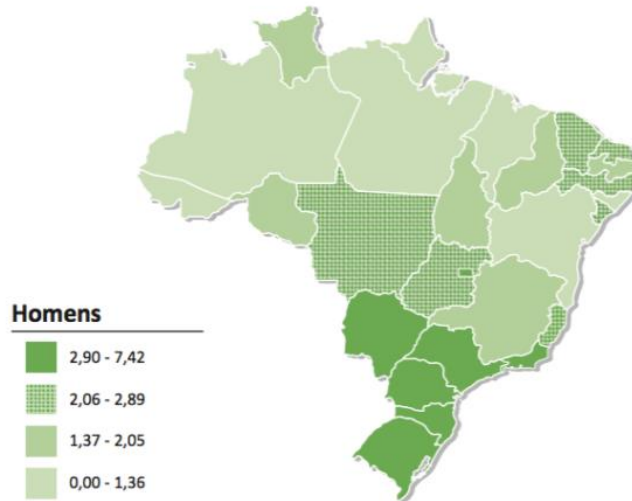
Figura 1 - Representação do melanoma e sua localização na pele.
Fonte: LA BIBLIOTECA...(12)

No Brasil, o câncer melanoma não possui alta incidência, cerca de 6 mil novos casos são estimados para o ano de 2016 de acordo com o INCA (Instituto Nacional de Câncer), entretanto, nos Estados Unidos da América, de acordo com a Sociedade Americana do Câncer, cerca de 73.870 novos casos eram esperados para o ano de 2015. (13)

Apesar da baixa incidência do câncer melanoma no Brasil, a doença é considerada muito preocupante devido as suas complicações, pois possui alta taxa de metástase, quando as células cancerosas se espalham pelo corpo e dão início a novos tumores, essa complicação causa uma elevada taxa de óbito entre os pacientes.

No Brasil, a incidência do melanoma é maior nas regiões sul, sudeste e centro-oeste do país, observado na figura 2, para os dois sexos. E permanece baixa para as regiões norte e nordeste, com menos de um caso a cada 100.000 habitantes.

A) Representação espacial das taxas brutas de incidência por 100 mil homens, estimadas para o ano de 2014, segundo Unidade da Federação (melanoma maligno da pele)



B) Representação espacial das taxas brutas de incidência por 100 mil mulheres, estimadas para o ano de 2014, segundo Unidade da Federação (melanoma maligno da pele)

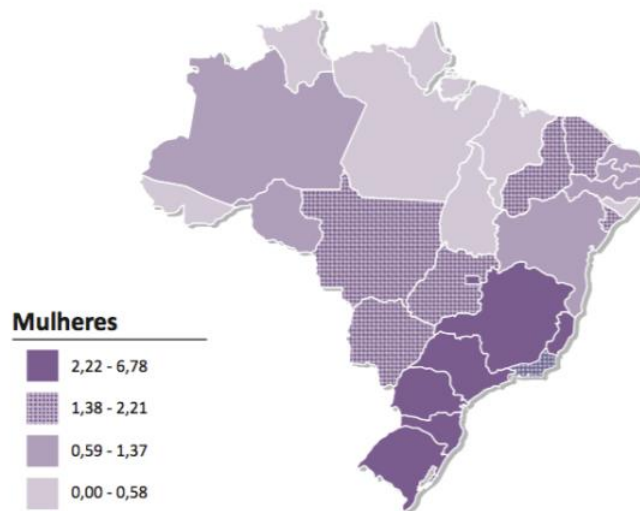


Figura 2 - Mapa do Brasil mostrando a incidência do câncer de pele melanoma para a) homens e b) mulheres.

Fonte: INSTITUTO... (14)

Os tumores metastáticos decorrentes do melanoma podem iniciar outros tumores sólidos em qualquer órgão. De 42% a 59% dos pacientes que possuem melanoma, os primeiros tumores secundários aparecem na pele, em tecidos

subcutâneos e linfonodos distantes, entretanto, os locais mais comuns são, em ordem crescente de frequência: intestino, ossos, cérebro, fígado e pulmões. (9)

A mutação dos genes *BRAF* e *NRAS* estão envolvidos com a proliferação do melanócito, a alteração do controle de apoptose celular e a sobrevivência celular, o que leva à proliferação celular desencadeada do câncer. A mutação do gene *BRAF* está presente em 50% dos casos de melanoma. (15) O gene *BRAF* codifica uma proteína que regula o metabolismo de sinalização das proteínas MAP (Mitogen Activated Protein) e quinase/ERKs (extracellular-signal-regulated kinases). Sinais moleculares no meio extracelular são reconhecidos por estas proteínas sinalizadoras, que transmitem o sinal ao núcleo celular, assim a proteína codificada pelo gene *BRAF* pode ativar a divisão celular, a diferenciação e a secreção de proteínas. (16)

Essas mudanças genéticas causam a migração das células, crescimento irregular do tumor e um aumento da mancha escura devida a elevada produção de melanina. Existem diversos tratamentos dependendo do estágio da doença e é comum a utilização de mais de uma opção terapêutica para o tratamento em função da agressividade do tumor (tabela 1) devido a pobre resposta aos tratamentos convencionais.

Tabela 1 - Opção terapêutica dependente do estágio da doença

Estágios	Tratamento
I	Ressecção da lesão e/ou dos linfonodos ou não
II	Ressecção da lesão e/ou dos linfonodos ou não
III	Quimioterapia, imunoterapia ou medicamentos direcionados e radioterapia
IV	Quimioterapia, imunoterapia ou medicamentos direcionados e radioterapia

Fonte: MELANOMA... (17)

É relatado que o tratamento do melanoma a partir da terapia fotodinâmica em animais utilizando um derivado de clorina, induziu morte por apoptose das células

tumorais, diminuição do volume tumoral, necrose e uma maior taxa de sobrevida. A irradiação de tumores e veias linfáticas preveniu a metástase em modelo animal. Porém, raramente, houve a completa remissão do tumor e em alguns casos, a recorrência foi observada. (18)

Alguns autores relatam eficácia para o tratamento de metástase de câncer de pele utilizando clorina e₆ injetada pela via endovenosa.(19) Entretanto, existem poucos estudos clínicos com TFD em melanoma e eles necessitam de acompanhamento clínico mais extenso, buscando a eficácia para casos mais avançados da doença. (20)

2.1.1 Células de melanoma murinho

As células de melanoma murino linhagem B16F10, são melanócitos altamente metastáticos. Elas foram selecionadas de tumores secundários crescidos em pulmões de ratos da linhagem C57BL. Iniciando através da linhagem B16, os pesquisadores injetaram as células neoplásticas nos animais, esperaram a formação de novos tumores nos pulmões, retiraram as novas células tumorais e começaram uma nova cultura.

A primeira nova cultura foi nomeada de B16F1, este processo foi repetido até obter a cultura celular B16F10. Os pesquisadores notaram que o número de tumores metastáticos aumentaram a cada nova cultura selecionada. (21)

2.2 Terapia fotodinâmica e os tipos de morte celular

Existem três tipos de morte celulares causada pela terapia fotodinâmica: apoptose, necrose e autofagia.

A apoptose é um mecanismo de morte celular programada que está presente em todas as células do corpo. Este mecanismo é natural da defesa celular e renovação das células, ele é ativado quando ocorrem danos às células por agentes nocivos, como a irradiação e o uso de medicamentos quimioterápicos que afetam o Ácido desoxirribonucleico (DNA). (22) A ativação ocorre inicialmente através da liberação de citocromo c pelas mitocôndrias ou da ativação de receptores específicos controladores da morte celular, que levam à ativação da via das caspases. Essa via

causa mudanças das características morfológicas das células, começando com a diminuição da célula, a formação bolhas ao redor da membrana plasmática e formação de corpos apoptóticos, que por sua vez, são fagocitados por macrófagos e degradados em fagolisossomos. (23)

Ao contrário da apoptose, a necrose é causada principalmente por danos físicos ou químicos e é considerada uma morte não programada. As células em necrose apresentam aumento volumétrico do citoplasma, organelas danificadas e rompimento da membrana plasmática. A liberação dos componentes celulares causa a liberação de sinais pró-inflamatórios, o que leva a inflamação da região. (24) É comum que a TFD induza necrose quando aplicada com uma alta concentração de fotossensibilizador ou alta fluência de luz. (25)

A autofagia é um mecanismo de proteção celular que permite à célula manter seus processos e reciclar o conteúdo citoplasmático caso existam organelas danificadas.(26) Porém, pode levar à morte celular se for demasiadamente ativada. Ela ocorre principalmente devido a sinais externos como a falta de oxigênio, a falta de nutrientes e o estresse oxidativo. (27) Dentro da célula, uma estrutura com dupla membrana, chamada de autofagossomo, envolve os componentes que serão reciclados e uma fusão ocorre com os lisossomos, onde hidrolases degradam os materiais envolvidos, permitindo à célula a distribuir os nutrientes provenientes da degradação de componentes não mais utilizados. (25)

Para a TFD, a localização celular do fotossensibilizador, a fluência de luz e o tipo celular são parâmetros importantes para determinar o tipo de morte celular causada. (28)

2.3 Terapia fotodinâmica

A terapia fotodinâmica foi reportada pela primeira vez, com os conceitos mais modernos, em 1900, por Oscar Raab. Pesquisando os efeitos do composto laranja de acridina sobre o organismo *Parameciumcau datum*, ele percebeu o aumento da toxicidade quando os organismos na solução de laranja de acridina eram expostos à luz. Em 1905, foi reportado pela primeira vez o tratamento utilizando a terapia fotodinâmica, Jesionek e Von Tappeiner utilizaram 5% de eosina, como composto

fotossensível para o tratamento de cânceres de pele não-melanoma, lúpus vulgaris e condilomas utilizando somente a luz artificial.(29)

O composto fotossensível foi denominado como fotossensibilizador. Atualmente existem diversos tipos derivados de fotossensibilizadores, como os derivados de porfirinas e clorinas. (30) A TFD (figura 3) gera espécies reativas de oxigênio através da excitação dos fotossensibilizadores e essas substâncias são responsáveis pela morte celular causada a diversos organismos, pois são altamente reativas e causam danos às estruturas celulares incapacitando os processos celulares e levando à morte celular. (31)

Terapia fotodinâmica

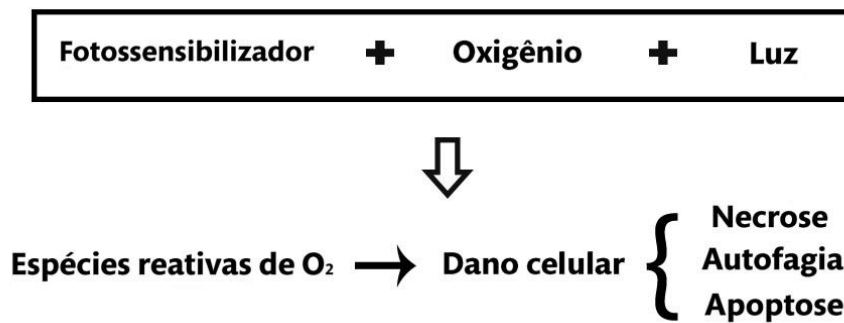


Figura 3 - Funcionamento da Terapia Fotodinâmica. É necessária a presença de três elementos fundamentais: Luz, oxigênio e fotossensibilizador para que a terapia possa causar danos como necrose, apoptose e autofagia.

Fonte: Elaborada pelo autor.

O mecanismo de ação da terapia fotodinâmica é baseada na transferência de energia para o oxigênio e pode ser explicado através do gráfico de Jablonski (figura 4). O primeiro processo para que ocorra reação fotodinâmica é a excitação do fotossensibilizador através de uma fonte de luz de comprimento de onda apropriado. Com a excitação, o composto passa do estado fundamental singleto para o primeiro estado excitado também singleto, nesse novo estado excitado o fotossensibilizador tentará voltar ao seu estado fundamental – de menor energia – emitindo fluorescência ou decaindo através de reações não radioativas.

Em alguns casos, o FS pode fazer um cruzamento intersistema e passar para um novo estado excitado tripleto, que é mais duradouro. O FS ao tentar retornar ao estado fundamental pode emitir fosforescência ou realizar reações do tipo I ou II.

Reações do tipo I são caracterizadas pela interação do FS com substratos formando radicais, que reagem com o oxigênio do ambiente e formam EROs. Reações do tipo II formam oxigênio singleto, uma molécula altamente reativa.

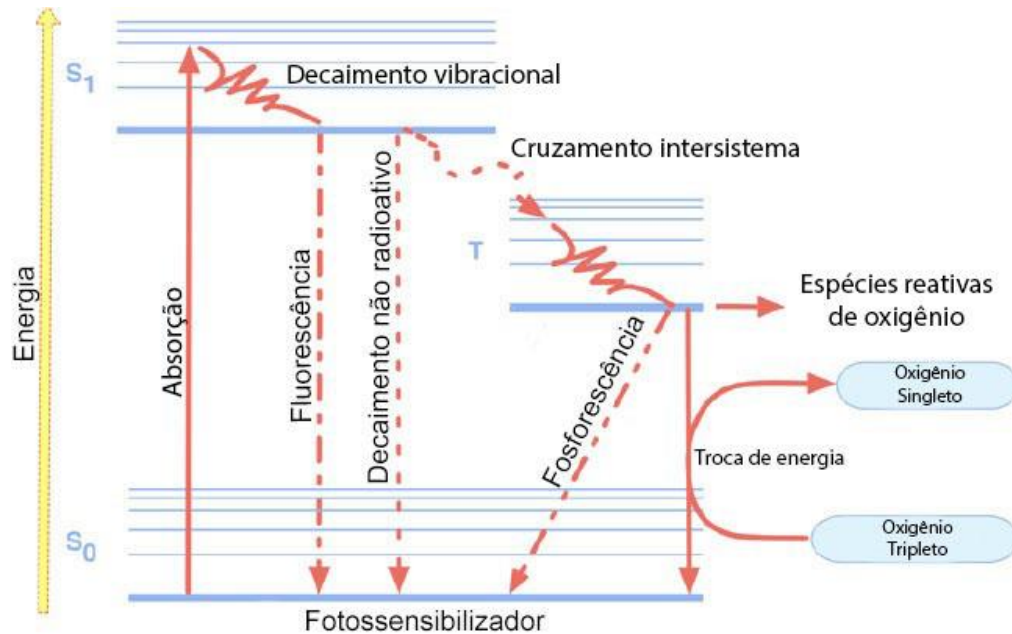


Figura 4 – Diagrama adaptado de Jablonski
Fonte: DISCOVERY...(32)

Atualmente, a terapia fotodinâmica tem sido empregada em diversas áreas, como no tratamento de diversos tipos de cânceres e na inativação de microorganismos causadores de cáries dentárias(33), onicomicoses(34) e outros tipos de infecções. (35-37)

2.4 Photodithazine

O Photodithazine é um fotossensibilizador derivado de clorina e_6 fabricado pela VETA-GRAND Co. (Moscou, Rússia). A formulação deste fotossensibilizador contém uma mistura de complexos de Clorina e_6 conjugada com di-N-metil-D-glucosamina (60%), Clorina p_6 e purpurinas.(38) Em sua estrutura química (Figura 5) vemos que o substituinte glucosamina apresenta carga elétrica positiva. Além disso, possui máxima absorção em torno de 401 nm (Banda Soret) e baixas

absorções nos comprimentos de 505, 600 e 670 nm (Bandas Q) (figura 6).

Este fotossensibilizador foi utilizado em testes clínicos para os tratamentos de tumores de brônquios, esôfago, pele, cavidade oral entre outros. No tratamento, 53,7% dos pacientes apresentaram remissão completa do tumor e 46,3% apresentaram remissão parcial. (39)

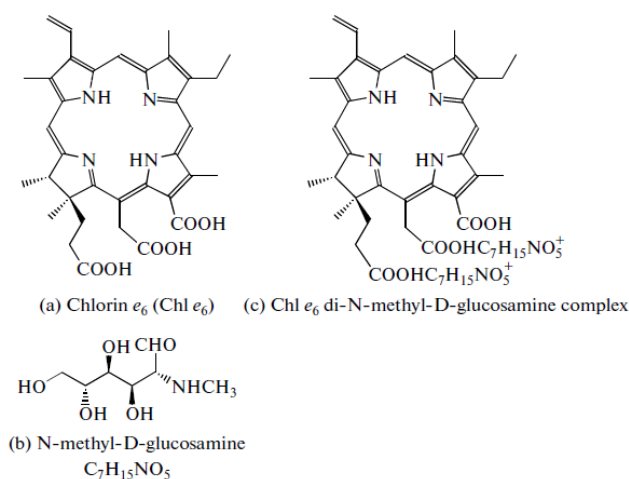


Fig. 1. Chemical structure of Photodithazine by VETA-GRAND Co., Moscow, Russia. A complex of di-N-methyl-D-glucosamine of Chl e_6 .

Figura 5 - Estrutura química do Photodithazine
Fonte: CORREA (40)

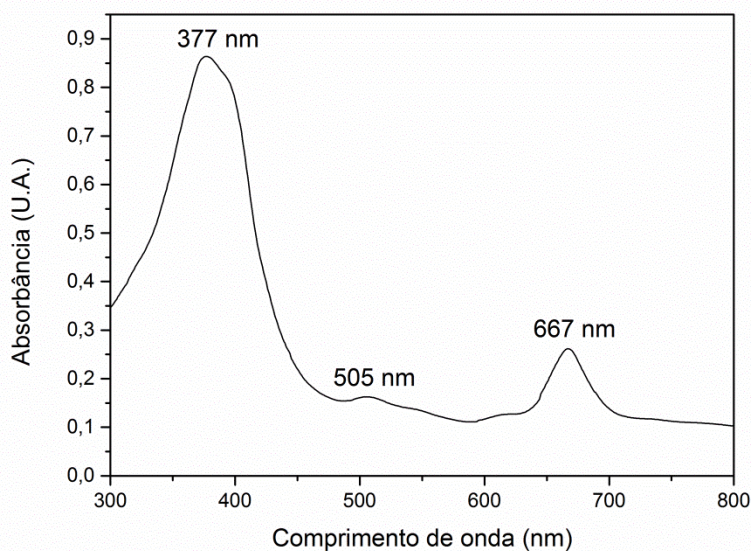


Figura 6 - Espectro de absorção do Photodithazine a 20 μ g/ml em PBS 10 mM e pH = 7.4
Fonte: Elaborada pelo autor

2.5 Tratamento do melanoma

O crescimento anormal das células leva ao surgimento de tumores escuros na pele e a resposta fotodinâmica que é somente induzida através da irradiação por uma fonte de luz é diminuída pela absorção da melanina. A melanina possui um espectro de absorção com máxima absorção próximo de 335 nm no ultravioleta decaído até o infravermelho, como podemos ver no gráfico da figura 7.

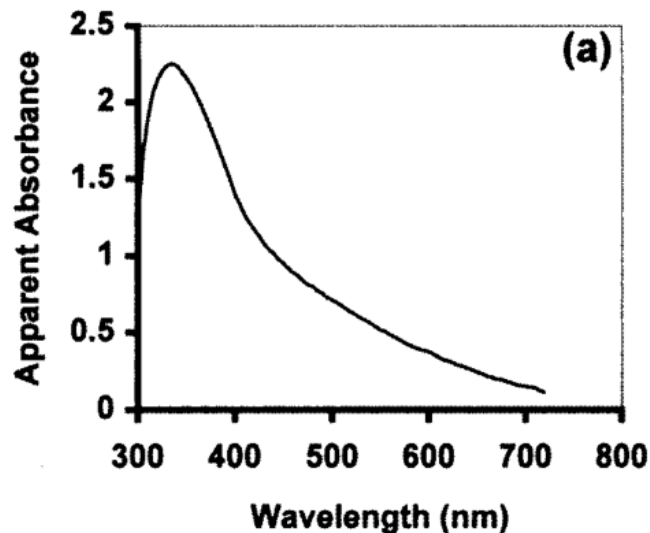


Figura 7 - Espectro de absorção da melanina.
Fonte: YOUNG. (41)

Derivados de clorina com emissão acima de 700 nm vem sendo estudados, como as bacterioclorinas. Estes fotossensibilizadores novos são sintetizados para serem excitados na região do infra-vermelho, onde a melanina possui mínima absorção. Além disso, o aumento do comprimento de onda ajuda na penetração da luz no tecido biológico. (42)

2.6 Co-localização

Microscópios de fluorescência podem medir qualitativamente a interação entre duas moléculas ou entre uma região intracelular e uma molécula através da marcação com dois fluoróforos diferentes. Para isso, imagens de fluorescência de cada marcação são obtidas com a seleção de lasers de excitação e filtros específicos de cada fluoróforo. As imagens de cada fluoróforo são sobrepostas e através de algoritmos programas reconhecem a localização da fluorescência nas

duas imagens.

A análise quantitativa é feita através de programas que calculam coeficientes de correlação, como o coeficiente de Pearson e os coeficientes de Mander. Estes coeficientes expressam quantitativamente a co-localização entre as moléculas. (43)

O coeficiente de Pearson (CP) é referenciado normalmente como a porcentagem de sobreposição de pixels e é calculado de acordo com a equação 1.

$$CP = \frac{\sum_i (R_i - \bar{R}) \times (G_i - \bar{G})}{\sqrt{\sum_i (R_i - \bar{R})^2 \times (G_i - \bar{G})^2}} \quad (1)$$

Onde, R_i e G_i se referem ao valor de intensidade no pixel "i", e \bar{R} e \bar{G} representa a intensidade média nos respectivos canais. É uma medida estatística de correlação usada entre imagens. O teste indica se há uma relação linear entre as intensidades dos diferentes canais em cada pixel da imagem e isso pode indicar a co-localização de dois fluoróforos. O CP pode variar de - 1 a 1, no qual, "1" indica uma perfeita correlação, "0" indica nenhuma correlação e "-1" indica correlação negativa ou ausente. Sendo os valores positivos indicativos de co-localização e negativos nenhuma co-localização. Além disso é possível classificar em alta correlação, moderada correlação moderada e baixa correlação quando o coeficiente de Pearson está entre, respectivamente, 1 - 0.7, 0.69 - 0.36, e 0.35 - 0.2. Valores abaixo de 0.2 indicam nenhuma correlação. (44)

O coeficientes de Mander são baseados no coeficiente de Pearson, porém os valores médios de intensidade não são empregados no cálculo. São calculados dois coeficientes, M_1 e M_2 de acordo com a equação 2. O coeficiente M_1 é definido como a razão entre a soma das intensidades de todos os pixels no canal 1 e a intensidade total do canal 2 e M_2 é como a razão entre a soma das intensidades de todos os pixels no canal 2 e a intensidade total do canal 1. Estes coeficientes podem variar de 0 a 1 e são bons indicadores da proporção do sinal do canal 1 coincidente com o sinal do canal 2. Para dois fluoróforos, R e G, dois coeficientes de Mander são calculados pela seguinte formula:

$$M_1 = \frac{\sum_i R_{i,co-localizado}}{\sum_i R_i}, e M_2 = \frac{\sum_i G_{i,co-localizado}}{\sum_i G_i} \quad (2)$$

Onde, $R_{i, co-localizado} = R_i$ se $G_i > 0$ e $R_{i, co-localizado} = 0$ se $G_i < 0$, do mesmo modo

$G_{i, \text{co-localizado}} = G_i$ se $R_i > 0$ e $G_{i, \text{co-localizado}} = 0$ se $R_i < 0$. Os valores dos coeficientes de Pearson e Mander analisados separadamente podem levar a falsas interpretações(45), por isso os dois coeficientes foram utilizados para descobrir se houve ou não co-localização.

Para a terapia fotodinâmica, a localização do FS é muito importante, pois dependendo da organela, a geração de espécies reativas de oxigênio pode indicar diferentes tipos de morte celular. Além disso, as espécies reativas de oxigênio possuem tempos de vida variados (46) que esta entre nanosegundos a segundos(47) e acabam reagindo localmente onde é produzida. As mitocôndrias, por exemplo, são organelas importantes para a respiração celular, o comprometimento de suas membranas leva a ativação da via de caspases e conseqüentemente à morte por apoptose.

2.7 FLIM

A microscopia por tempo de vida de fluorescência, ou FLIM (*fluorescence lifetime imaging microscopy*), é uma técnica utilizada para analisar o ambiente e o estado metabólico celular. Ela é muito utilizada para visualizar alterações no ambiente celular devido a mudanças no pH, ligações à componentes celulares, íons e sais. (48)

Uma das principais maneiras de medição é através do método da contagem de fóton único correlacionado no tempo (TCSPC - *time correlated single photon counting*). Após a irradiação da amostra com um laser de pulso ultracurto, o tempo de chegada dos fótons ao detector é medido e para cada pixel da imagem é registrado uma contagem de fótons e atribuído um tempo de vida de fluorescência (figura 8). (49)

As imagens obtidas são expressas com cores falsas para representar o tempo de vida de fluorescência, que é calculado da equação 3, onde " τ_{int} " indica o tempo médio no qual o fluoróforo permanece no estado excitado após a excitação.

$$\tau_{int} = \frac{\sum_i Ampl_i \times \tau_i^2}{\sum_i Ampl_i \times \tau_i} \quad (3)$$

No qual, " $Ampl_i$ " e " τ_i " representam, respectivamente, a intensidade e o tempo de fluorescência medido para um determinado pixel.

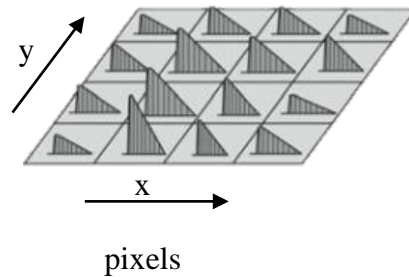


Figura 8 - Princípio da contagem de contagem de fóton único correlacionado no tempo /FLIM
Fonte: BECKER (49)

A técnica FLIM tem sido estudada para o diagnóstico de metástase, a eficiência do tratamento de cânceres e a detecção de câncer bucal. (50-52) Poucos estudos foram realizados para caracterização da TFD em microcópico FLIM.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

- Avaliar a resposta fotodinâmica empregando o Photodithazine em células de melanoma murino.

3.2 Objetivos específicos

- Estudar a dinâmica e localização celular do fotossensibilizador;
- Obtenção da co-localização do Photodithazine com organelas celulares
- Avaliar a resposta fotodinâmica para diferentes parâmetros de iluminação em células de melanoma murino;
- Estudar a distribuição do tempo de vida de fluorescência após a incubação do fotossensibilizador e após a TFD;

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Manutenção das linhagens celulares de câncer de pele

A linhagem de melanoma murino, B16F10 (CRL-6475, ATCC), foi obtida do Banco de Células American Type Culture Collection. As células foram cultivadas em garrafas de cultivo celular a temperatura de 37°C em ambiente umidificado, contendo 5% de CO₂ (Estufa Sanyo MCO 17AC) em meio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, Cultilab, Campinas-SP) contendo vermelho de fenol e suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (Cultilab, Campinas-SP), 0,1% de uma solução de antibióticos (Penicilina 10.000 U.I. e Estreptomicina 10 mg/mL, Cultilab, Campinas-SP).

A troca completa do meio de cultura foi realizada a cada 48 h e como essa linhagem cresce aderida na forma de monocamada, ao atingirem a confluência de 80%, as amostras foram tripsinizadas e distribuídas em novas garrafas de cultivo celular e o restante das células foram congeladas em nitrogênio líquido (-196°C) em uma solução crioprotetora de 10% de DMSO e 90% de Soro fetal bovino.

4.2 Ensaio de MTT

A viabilidade celular foi analisada com teste de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio, Sigma-Aldrich) um sal de coloração amarela, que é metabolizado por células viáveis e transformado por enzimas desidrogenases mitocondriais, em um sal de coloração violeta, o formazan. A absorbância deste sal foi medida no espectrofotômetro (Multiskan GO, ThermoScientific) no comprimento de onda de 570 nm e o sinal de fundo foi obtido em 690 nm, e realizou-se a subtração entre as intensidades relativas de absorções em 570 e 690 nm. O grupo controle, sem fotossensibilizador e sem luz, foi considerado como sem tratamento e com 100% de viabilidade celular. A viabilidade celular foi calculada de acordo com a equação 4.

$$Viabilidade = \left(\frac{Grupo\ teste}{Grupo\ controle} \right) \times 100\% \quad (4)$$

O desvio padrão foi considerado como erro experimental, uma vez que o erro do instrumento era muito menor. Para cada medida, o erro foi estimado através da propagação de erro (equação 5).

$$Erro = \frac{x \cdot \Delta y + y \Delta x}{x^2} \quad (5)$$

Sendo “x” a média das absorbâncias do grupo controle, “Δx” o desvio padrão do grupo controle, “y” a média das absorbâncias do grupo tratado e “Δy” o desvio padrão do grupo tratado.

4.3 Citotoxicidade do Photodithazine no escuro em células de melanoma murino

Utilizando as concentrações de: 0,1, 20, 40, 60, 80 e 100 μg/mL de Photodithazine as células foram analisadas para a incubação de 1 hora no escuro. Utilizando concentrações mais amplas de 10⁻⁴, 10⁻³, 10⁻², 10⁻¹ e 1 mg/mL de Photodithazine as células foram incubadas por 4 e 24 horas para obtenção do IC₅₀. Cada condição foi testada em quintuplicata.

Após decorrido 24 horas para adesão celular em placa de 96 poços, o meio suplementado foi retirado e as células foram lavadas duas vezes com 10 mM de PBS a 37°C. O fotossensibilizador diluído em meio DMEM foi adicionado para atingir as concentrações necessárias para a análise. As placas foram recolocadas na incubadora e os tempos de incubação na presença do fotossensibilizador investigados foram de 1, 4 e 24 h.

A viabilidade celular foi estimada a partir da análise do metabolismo das células através do teste de MTT, como descrito no item 4.2. Afim de calcular o IC₅₀, concentração na qual 50% das células perdem a viabilidade celular, foi utilizado a curva dose-resposta (equação 6).

$$4 \text{ Viabilidade} = \text{Extremo inferior} + \frac{\text{Extremo superior} - \text{extremo inferior}}{(1 + 10^{\log(X_0 - X)^p})} \quad (6)$$

Onde, “X” representa a concentração do fotossensibilizador, “X₀” o IC₅₀ e “p” o coeficiente de hill. Utilizando o programa OriginPro (Origin 9.0.0 SR1 b76 (Academic), OriginLab Corporation, Estados Unidos da América) a curva dose-resposta foi ajustada e identificada pela cor vermelha nos gráficos.

4.4 Lise celular e quantificação de Photodithazine

Em placas de 6 poços, foram plaqueadas 5x10⁵ células por poço para serem investigados os tempos de incubação de 1, 2, 3 e 24 horas, cada condição foi realizada em triplicata. Após o período de adesão de 24 horas, o meio foi retirado e o poço foi lavado duas vezes com PBS a 10 mM a 37°C. Com base nos testes de citotoxicidade seção 5.1 uma solução de DMEM sem vermelho de fenol com 5 µg/mL de Photodithazine foi preparada e incubada nos tempos mencionados. Ao final de cada tempo de incubação, os poços foram lavados duas vezes com PBS a 10 mM a 37°C e as células foram incubadas por 10 min com 1 mL da solução de lise celular descrita por Wang et al. constituída de 90% de DMSO e 10% de PBS a 10 mM (53). A fluorescência então do sobrenadante foi medida em um fluorímetro (Molecular Devices, SpectraMax M5) utilizando uma cubeta de quartzo de 4 lados transparentes de 1mmx10mm.

4.5 Marcação de citoesqueleto e mitocôndrias

As mitocôndrias foram marcadas utilizando 100 nM de MitoTrackerRed CM-H₂XROS (Molecular Probes, Thermo Fischer Scientific) diluído em meio DMEM sem soro fetal bovino previamente aquecido a 37°C por 45 min. Após a marcação, as células foram fixadas com uma solução com 4% de formaldeído em meio DMEM por 15 min.

A marcação do citoesqueleto foi realizada com o marcador de citoesqueleto AlexaFluor (R) 532 conjugado com faloidinas (Molecular Probes, ThermoFischerScientific). Primeiramente, a cultura celular foi incubada com uma solução de acetona a -20°C por 5 min para que ocorresse a permeabilização da

membrana citoplasmática. Logo após esta etapa, 5 μ L do marcador de citoesqueleto com 200 μ L de PBS a 10 mM e 1% de SFB foi adicionado e incubado com as células por 20 min em temperatura ambiente. Após isso, as células foram lavadas com PBS a 10 mM e avaliadas em microscopia confocal.

No microscópio confocal (LSM 780, Zeiss, Alemanha), a excitação e coleta de fluorescência foi feita separadamente para cada marcador molecular. A excitação do marcador de mitocôndrias foi feita em 579 nm e a coleta da fluorescência entre 605 e 647. A excitação do marcador de citoesqueleto foi realizada em 488 nm e a coleta da fluorescência foi feita entre 524 e 571 nm.

4.6 Análise da dinâmica do fotossensibilizador em microscopia confocal

Em placas de Petri de 35 mm de diâmetro (Corning, EUA) foram plaqueadas 5×10^4 células por placa que permaneceram overnight em incubadora (Estufa Sanyo MCO 17AC) a 37°C e com 5% de CO₂ para que ocorresse a adesão celular.

Após a adesão, o fotossensibilizador, Photodithazine, diluído em meio DMEM com 10% de SFB e na concentração de 5 μ g/mL foi incubado com as células por 1, 3, 5 e 24 horas e levados para aquisição de imagens em microscópio confocal (LSM 780 invertido, Zeiss, Alemanha). Antes da aquisição, as células foram lavadas duas vezes com 1 mL de PBS a 10 mM e a 37°C. Para a aquisição das imagens, as células foram incubadas com de 2 mL de PBS a 10 mM para prevenir que as células sofressem desidratação.

O laser de diodo com emissão em 405 nm foi utilizado como fonte de excitação do fotossensibilizador e uma baixa potência foi empregada para diminuir a fotodegradação. No microscópio, a fluorescência do fotossensibilizador e a autofluorescência celular foram separadas em dois canais. A autofluorescência foi captada com filtros entre 500 e 530 nm e o FS entre 650 e 680 nm. Para diferenciação dos sinais emitidos, cores falsas foram empregadas, verde para a autofluorescência celular e vermelho para o fotossensibilizador.

4.7 Ensaios de terapia fotodinâmica

Em uma placa de 96 poços foram plaqueadas 2×10^4 células por poço. Após 24 horas, foram testadas as concentrações menos citotóxicas no escuro 1, 20, 40, 60, 80 e 100 $\mu\text{g/mL}$ diluídas em meio DMEM com 10% de Soro Fetal Bovino e utilizando um tempo mínimo de incubação de 1 hora.

Após a incubação, o fotossensibilizador foi retirado e as células foram lavadas duas vezes com 10 mM de PBS a 37°C para garantir que a terapia fosse feita somente com o fotossensibilizador interiorizado pelas células e as células foram incubadas com 200 μL de PBS por poço para evitar a desidratação e desconsiderar efeitos de absorção do meio DMEM.

Foi utilizado um sistema de iluminação homogênea (figura 9) para iluminação de placas de cultura de 96 poços com LEDs de emissão no comprimento de onda em 660 nm e com intensidade por poço de $20 \pm 1 \text{ mW/cm}^2$ desenvolvido no Laboratório de Apoio Técnico (LAT), do Instituto de Física de São Carlos. Após a irradiação, as células foram novamente incubadas com meio DMEM com 10% de SFB e 0,5% de antibióticos até a realização do ensaio de MTT.



Figura 9 – Sistema de iluminação homogênea para placa de 96 poços
Fonte: Elaborada pelo autor

As seguintes fluências de luz foram investigadas: 2, 4, 6, 8, 10 e 20 J/cm^2 . Foi utilizada a equação abaixo para o cálculo do tempo para cada fluência de luz:

$$t = \frac{F}{I} \quad (8)$$

Onde, “F” corresponde à fluência entregue (J/cm^2), “I” corresponde a intensidade (W/cm^2) e “t” o tempo (s). Os tempos calculados são mostrados na tabela 2.

Tabela 2 - Tempos de irradiação para cada fluência utilizada na Biotable

Fluência (J/cm^2)	Tempo (min)
2	1,40
4	3,20
6	5
8	6,40
10	8,20
20	16,40

Fonte: Elaborada pelo autor.

Após 24 horas da TFD, a viabilidade celular foi avaliada utilizando o teste de MTT descrito na sessão 4.2 de materiais e métodos. Este tempo de espera pós-tratamento é indicado para que as vias de morte celular, necrose e apoptose, estejam estabelecidas.

O grupo sem luz e sem fotossensibilizador foi utilizado como grupo controle, no qual a viabilidade celular foi estipulada como 100% em relação aos grupos tratados. Grupos irradiados também foram investigados para determinar se somente a emissão em 660 nm poderia afetar as viabilidades celulares.

4.8 Ensaios de terapia fotodinâmica e tempo de vida de fluorescência no microscópio confocal e FLIM

Para investigar a variação do tempo de vida médio de fluorescência em relação aos diferentes tempos de incubação de Photodithazine, 2×10^5 células foram plaqueadas em placa de Petri de 35 mm de diâmetro (Corning, EUA).

O fotossensibilizador com concentração de 5 $\mu\text{g/mL}$ foi incubado com as células durante os seguintes tempos de 1, 3 e 5 horas. Após cada tempo de incubação, as células foram lavadas duas vezes com 10 mM de PBS a 37°C para garantir que houvesse a presença somente de Photodithazine internalizado pelas células. Para as células não desidratarem e sofrerem com o tempo de aquisição das imagens foram incubados 2 ml de PBS à 37°C.

O microscópio confocal de fluorescência Zeiss (modelo LSM 780 invertido, Alemanha) acoplado ao sistema FLIM (PicoQuant, Alemanha) foi utilizado com o laser de emissão em 405 nm e frequência de 40 MHz.

Utilizando a ferramenta *Fast Flim* do software Symphotime (PicoQuant, Alemanha), o tempo médio para a chegada dos fótons após o pulso de femtosegundo do laser foi medido. Cada tempo de vida médio de fluorescência foi transformado em uma cor falsa na imagem, na qual os tempos lentos são caracterizados por cores próximas do vermelho e tempos rápidos são caracterizados por cores próximas do azul.

Para cada imagem, foi adquirida uma distribuição do tempo de vida de fluorescência das células presentes no campo visualizado. Os dados foram ajustados para uma curva gaussiana utilizando o programa OriginPro (Origin 9.0.0 SR1 b76 (Academic), OriginLab Corporation, Estados Unidos da América) e obtidos os parâmetros de desvio padrão e tendência central.

Após a análise em relação ao tempo de incubação, os ensaios de TFD foram realizados utilizando uma fonte de luz LED (Light Well, Laboratório de Apoio Técnico) em 660nm (figura 10). Neste estudo, foram plaqueadas 2×10^5 células por placa de Petri de 35 mm de diâmetro (Corning, EUA) para microscopia confocal. Após a adesão celular, uma solução contendo 5 $\mu\text{g/mL}$ de Photodithazine foi incubado por 1 hora no escuro em meio DMEM com 10% de Soro Fetal Bovino em estufa a 37°C.



Figura 10 - Fonte de luz LED em 660 nm para iluminação de placa de Petri desenvolvido pelo Laboratório Apoio Técnico (LAT).

Fonte: Elaborada pelo autor

Foram analisadas as fluências de 2, 6, 16, 32, 76 J/cm². Logo após cada fluência irradiada, as imagens foram adquiridas utilizando o microscópio FLIM. Foi tomado o cuidado para diminuir o ganho e a intensidade do laser, para que não ocorresse a intensa fotodegradação do Photodithazine.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Citotoxicidade do Photodithazine no escuro

Na figura 11 é apresentado os resultados de viabilidade celular após a incubação do Photodithazine por 1 hora no escuro. Analisando o gráfico é possível observar uma baixa citotoxicidade no escuro para as concentrações analisadas e uma diminuição da viabilidade celular com o aumento da concentração do fotossensibilizador. Na maior concentração utilizada de 100 $\mu\text{g/mL}$, a viabilidade celular diminuiu 20% em relação ao grupo controle, prejudicando o metabolismo celular.

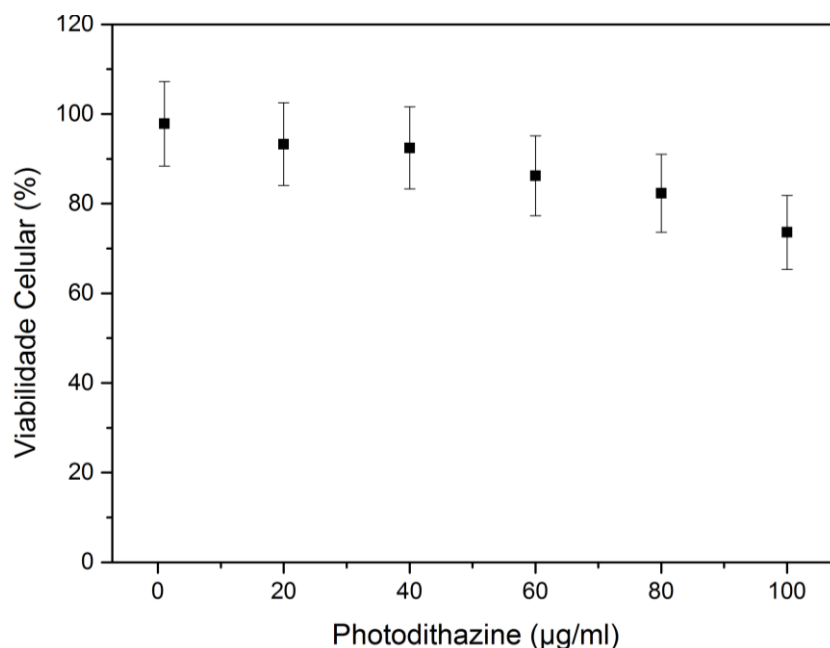


Figura 11 - Viabilidade Celular de Células B16F10 incubadas com Photodithazine no escuro por 1 hora no escuro.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Após este ensaio, foi analisada a citotoxicidade de 4 e 24 horas com a obtenção do IC_{50} . Para a incubação de 4 h (figura 12), observamos uma diminuição acentuada da viabilidade celular com as concentrações de 0,1 mg/mL e 1 mg/mL de Photodithazine. A concentração de 1 mg/mL causou a maior diminuição da viabilidade celular, $15 \pm 19 \%$. Já a concentração de 0,1 mg/mL apresentou uma

viabilidade celular maior, $35 \pm 23 \%$, isso representa uma diminuição de aproximadamente 40% em relação à incubação de 1 hora para a mesma concentração. As concentrações iguais ou menores que 0,01 mg/mL não foram efetivas para diminuir a viabilidade celular, isso demonstra que estas concentrações para este tempo analisado não apresentam citotoxicidade no escuro.

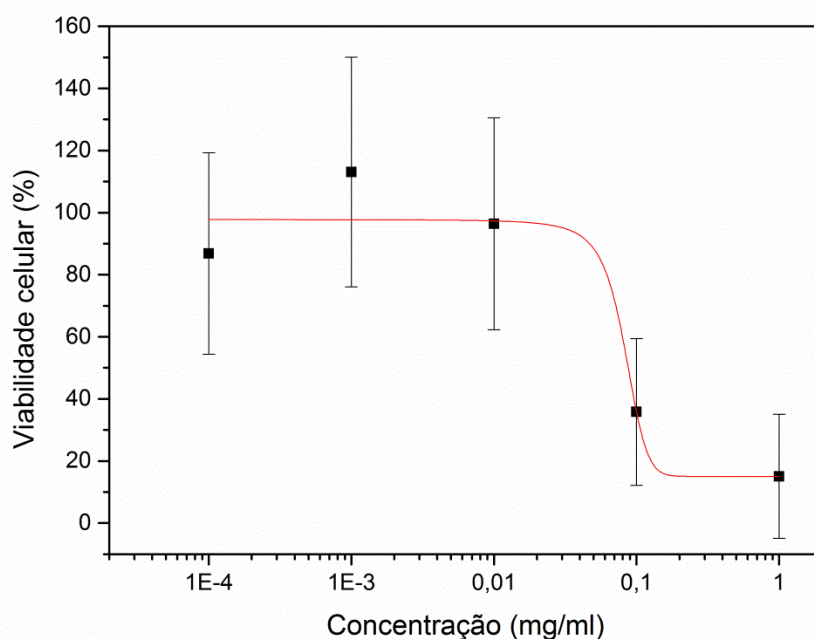


Figura 12 - Viabilidade Celular de Células B16F10 incubadas com Photodithazine no escuro por 4 hora no escuro.
Fonte: Elaborada pelo autor.

O valor de IC_{50} para este tempo de incubação foi de 82 μ g/mL. A curva dose-resposta obtida para a incubação de 24 horas é mostrada na figura 13. Assim como na incubação de 4 horas, as concentrações menos citotóxicas foram 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} mg/mL para a incubação de 24 horas e apresentaram aproximadamente 100% de viabilidade celular. As concentrações de 0,1 mg/mL e 1 mg/mL apresentaram as menores viabilidade celulares, de $9 \pm 11\%$ e $8 \pm 11\%$, respectivamente, portanto, estas concentrações prejudicaram o funcionamento celular.

O valor de IC_{50} obtido para a incubação de 24 horas foi de 33 μ g/mL.

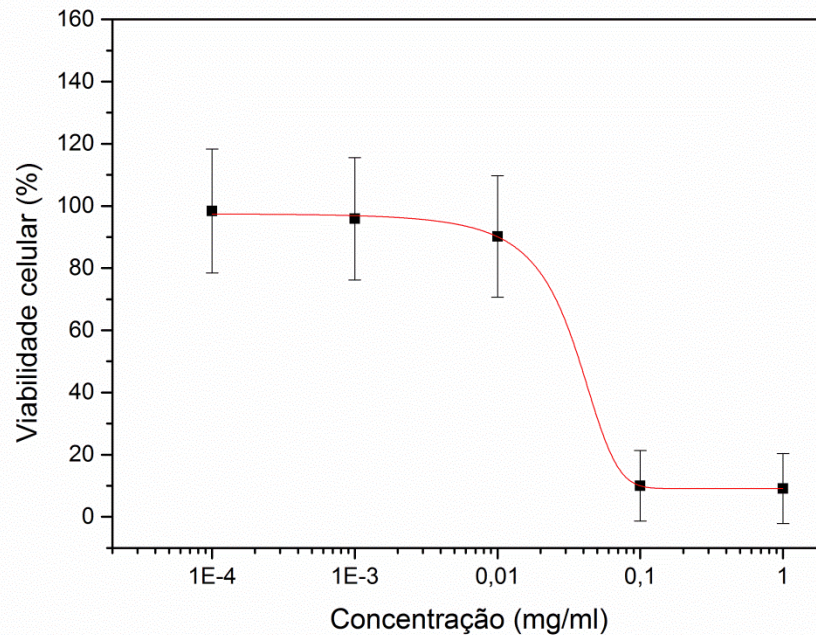


Figura 13 - Viabilidade Celular de Células B16F10 incubadas com Photodithazine no escuro por 24 hora no escuro.
 Fonte: Elaborada pelo autor.

Comparando os tempos de incubação, observou-se uma diminuição do valor do IC_{50} de $82 \mu\text{g/mL}$ para $33 \mu\text{g/mL}$ para os tempos de incubação de 4 e 24 horas, respectivamente. Isso indica que a toxicidade do Photodithazine aumenta bastante para tempos prolongados de incubação nas células B16F10. Pesquisadores que trabalharam com Photodithazine observaram esse aumento de citotoxicidade com o aumento do tempo de incubação para as células HEP-2 (Células cancerígenas de fígado) e Vero (Células de rim de macaco). Para a incubação de 4 horas com Photodithazine, as células Vero e HEP-2 apresentam, respectivamente, valores de IC_{50} de $60 \pm 2 \mu\text{g/mL}$ e $33 \pm 3 \mu\text{g/mL}$. (54)

Pesquisadores utilizando o fotossensibilizador clorina e_6 , composto quimicamente parecido ao Photodithazine, também mostraram o aumento da toxicidade com o aumento da concentração. Além disso, eles mostraram que na qual foi incubado $10 \mu\text{g/mL}$ de clorina e_6 por 24 horas apresentou citotoxicidade de 10%, similar ao que encontramos para a mesma concentração e tempo analisados (figura 13). (55)

5.2 Internalização do Photodithazine em células de melanoma murino

A captação do fotossensibilizador pela célula é um processo importante para que ocorra a produção de EROs pela TFD. Estudos mostram que mecanismos de resistência celular, como os transportadores protéicos do tipo ABC, são responsáveis por expelir os fotossensibilizadores e prejudicar a ação da TFD.(56)

Nesse estudo foi investigada a dinâmica do Photodithazine captado pelas células B16F10 em diferentes tempos utilizando o método de lise celular como descrito na sessão 4.4. Primeiramente foram realizados espectros de emissão de fluorescência do Photodithazine (figura 14) para diferentes soluções, pois os espectros de emissão dos fluoróforos podem sofrer deslocamento do pico dependendo das características químicas dos solventes em que estão diluídos.

Foi observado, nos gráficos de emissão da fluorescência, uma mudança do pico de emissão, quando houve a diluição do fotossensibilizador em solução de lise celular composta de DMSO e PBS 10 mM. Nesta solução, observamos um deslocamento do pico de emissão de 10 nm do comprimento de onda original de emissão em 660 nm, com isso, as medidas utilizando a solução de lise foram padronizadas com a coleta da emissão de fluorescência em 670 nm. A excitação do PDZ foi realizada em 405 nm, centrada na banda de maior absorção do Photodithazine.

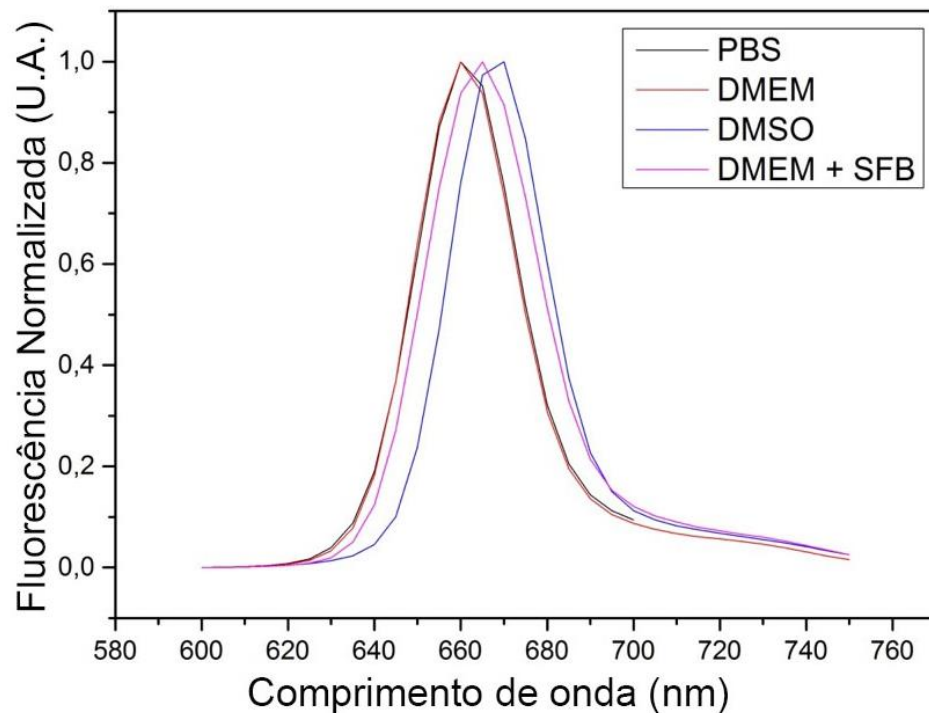


Figura 14 - Espectros de fluorescência do Photodithazine em diferentes soluções de PBS, DMEM, DMSO e DMEM com SFB.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Na figura 15, vemos a curva de intensidade de fluorescência do Phodithazine retirado das células utilizando o procedimento de lise celular descrito na sessão 4.4. Analisando o gráfico (figura 15) observamos um decaimento da intensidade de fluorescência do FS da incubação de 1 hora para 2 horas. A fluorescência volta a apresentar um aumento para a incubação de 3 horas e o tempo de 24 horas apresenta a maior emissão. O decaimento apresentado pode sugerir um efluxo de PDZ dos melanócitos. Cheng et al. observou que os melanossomos, organelas responsáveis por exportar a melanina, também sequestram moléculas citotóxicas do meio intracelular. (57)

A condição controle onde nenhuma célula recebeu o fotossensibilizador permaneceu com baixa fluorescência apresentada na condição de 0 horas.

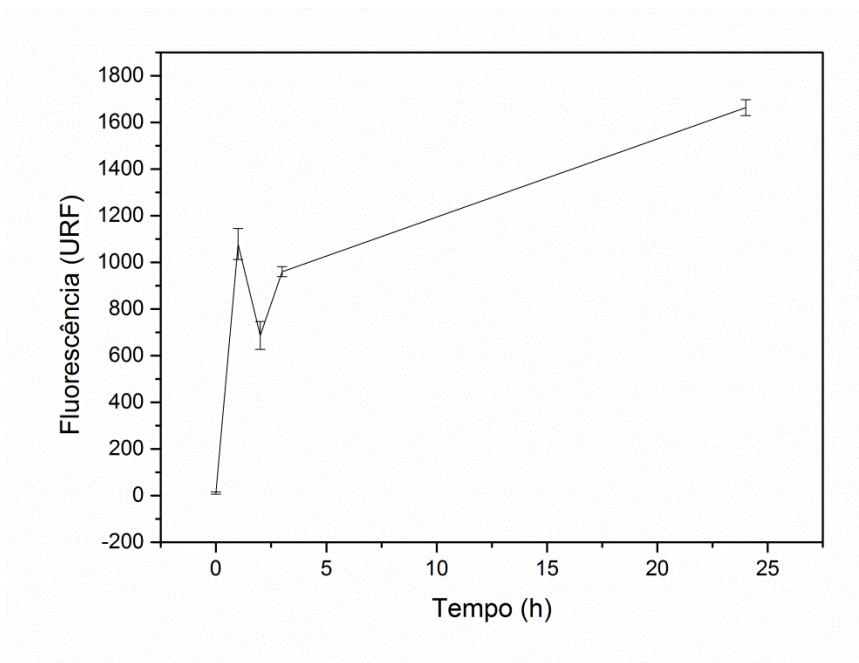


Figura 15 - Medição da intensidade de fluorescência de Photodithazine liberado pelas células lisadas. Fonte: Elaborada pelo autor

Para inferir a concentração de Photodithazine captado pelas células, uma curva de calibração foi realizada (figura 16) para relacionar a concentração do fluoróforo com a intensidade de fluorescência medida. Foram utilizadas as concentrações de 0,1 , 0,2 , 0,3 , 0,4 , 0,5 , 1 , 2 , 3 , 4 e 5 $\mu\text{g/mL}$ para construção da curva.

Foi observado que a curva (figura 16) apresentou forma crescente, porém não linear. Muitos modelos de emissão de fluorescência consideram o regime linear para baixas concentrações de fluoróforo, como previsto em teoria. (58)

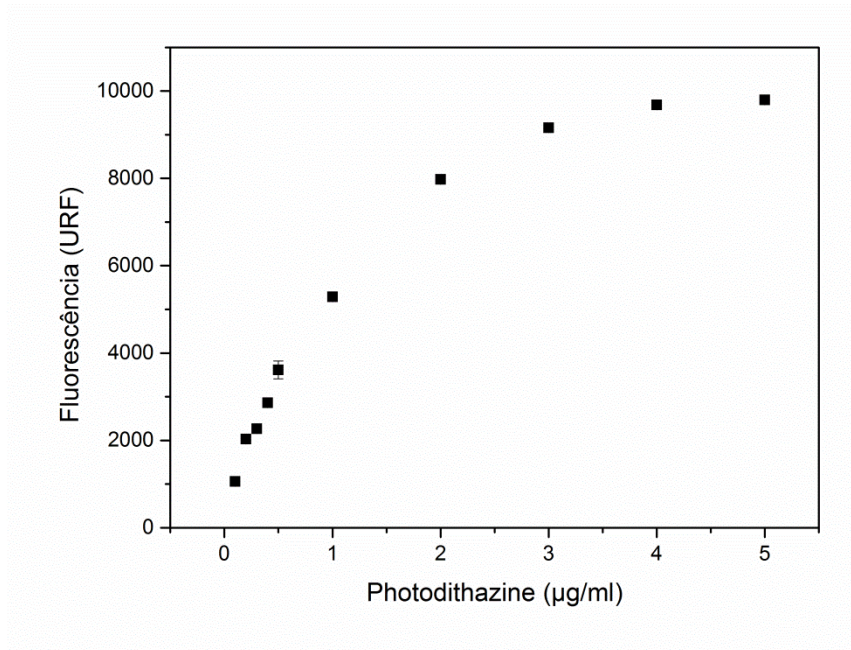


Figura 16 - Curva de calibração do Photodithazine em solução de 90% DMSO e 10% de PBS A 10 mM

Fonte: Elaborada pelo autor

Utilizando as menores concentrações de Photodithazine uma reta foi ajustada, indicada pela cor vermelha na figura 17, para inferir a concentração do fotossensibilizador. Houve baixa correlação, 0,78, entre as medidas de fluorescência e concentração. Já que uma forte correlação para regressão linear é um valor próximo de um. No entanto, dadas as limitações presentes no procedimento de lise celular, assim como das baixas concentrações investigadas, a correlação pode ser considerada satisfatória. Através dos parâmetros obtidos da curva ajustada, foi possível obter a seguinte reta:

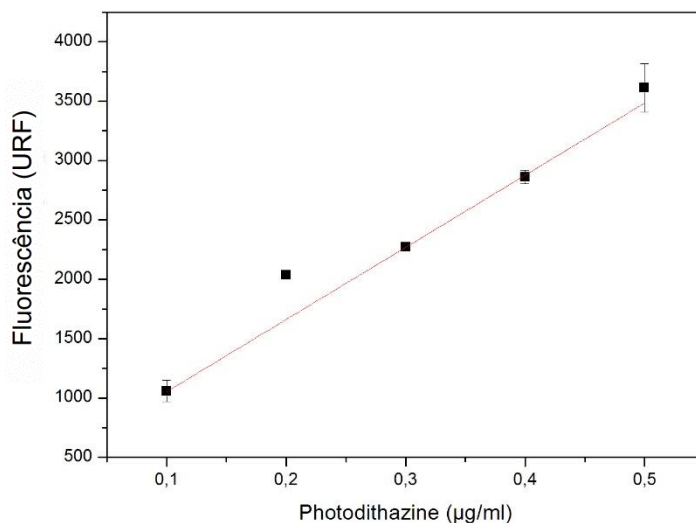


Figura 17 – Curva de correlação da intensidade de fluorescência com a concentração de Photodithazine.

Fonte: Elaborada pelo autor

$$F([FS]) = 6079,85 \times [FS] + 445,08 \quad (7)$$

Utilizando este simples modelo, no qual “F” é uma função da fluorescência em função da concentração do fotossensibilizador “[FS]”. Os valores de concentração de fotossensibilizador previstos da equação acima são mostrados na tabela 3 para os quatro tempos de incubação investigados.

Foi observado que houve uma menor concentração para o tempo de 2 horas, indicando um possível mecanismo de liberação do fotossensibilizador. Além disso, foi observado que o tempo de incubação de 24 horas apresentou aproximadamente o dobro da quantidade de fotossensibilizador quando comparado ao tempo de 1 hora de incubação.

Tabela 3 - Previsão da concentração de Photodithazine presente nas células lisadas.

Tempo de incubação	Concentração prevista
(h)	(µg/mL)
1	0,099
2	0,033
3	0,083
24	0,198

Fonte: Elaborada pelo autor

5.3 Caracterização da dinâmica de internalização do Photodithazine e visualização do acúmulo celular em células B16F10

A captação e acúmulo de FS pelas células neoplásticas é um fator importante para que ocorra a TFD. Muitos estudos sugerem que essas células apresentam características estruturais e metabólicas que resultam em uma maior captação de FS em comparação às células normais.(59-60) Além disso, as respostas da TFD, como o tipo de morte celular, podem ser previstas em função da quantidade de FS internalizado e a sua localização celular deste.(25)

Neste estudo, as células B16F10 foram analisadas quanto a sua captação e localização intracelular em microscopia confocal.

É mostrado na figura 18 o resultado da incubação de Photodithazine para os tempos de 1, 3, 5 e 24 horas.

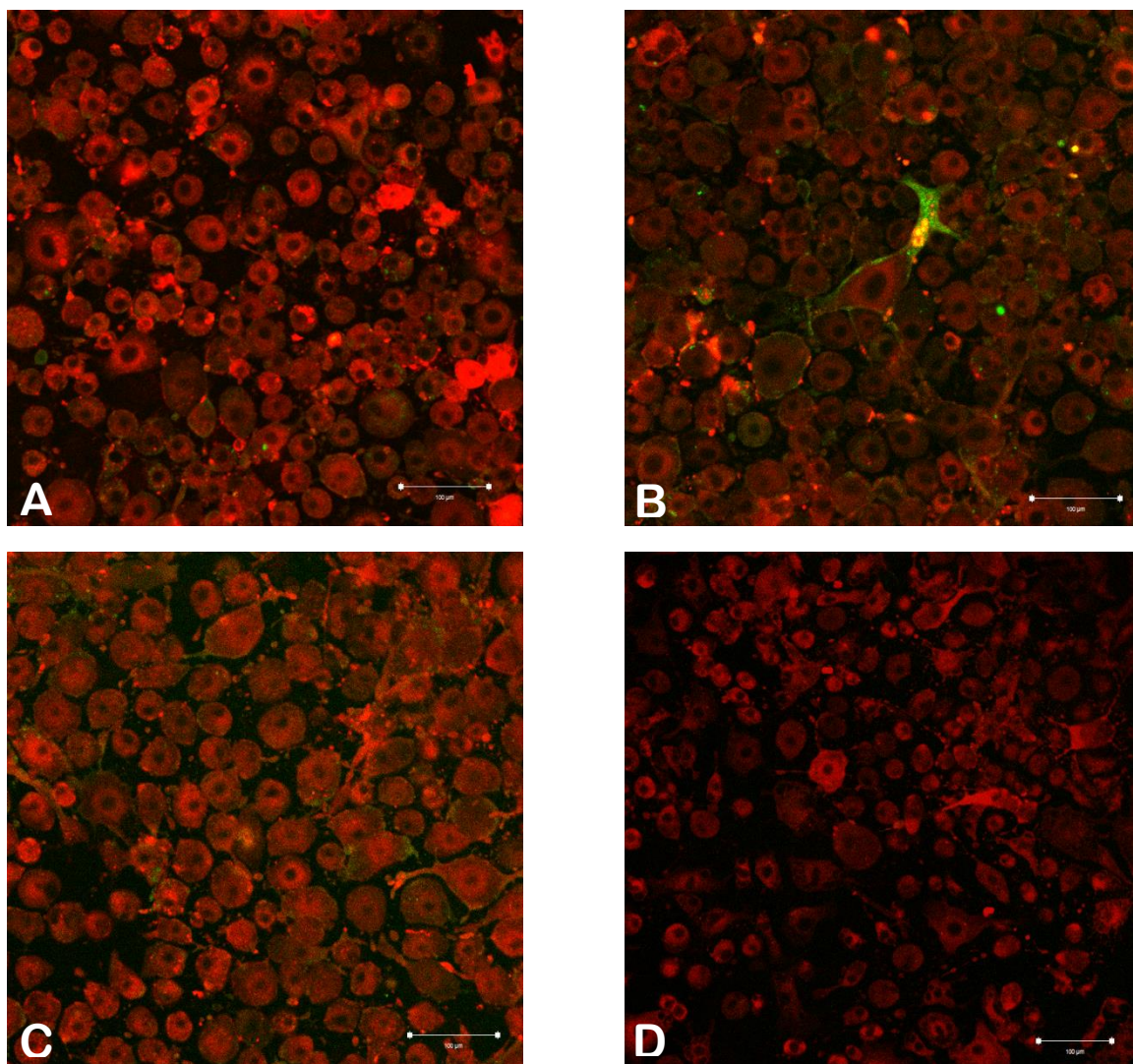


Figura 18 - Células B16F10 incubadas com 5g/mL de Photodithazine observadas em microscópio confocal em diversos tempos. Foram empregadas as cores falsas verde e vermelho, respectivamente para a autofluorescência das células e do Photodithazine. Escala em 100 μm . Em todos os tempos analisados o fotossensibilizador permaneceu internalizado, não penetrou o núcleo e apresentou acúmulo ao redor do núcleo. A) 1h de incubação, B) 3h de incubação, C) 5h de incubação e D) 24h de incubação.

Fonte: Elaborada pelo autor

Em todos os tempos de incubação investigados a presença intracelular do fotossensibilizador foi observada. Em algumas células o FS se encontrou mais presente ao redor do núcleo celular, observado pelo brilho mais intenso. Em geral, não foi possível observar variações da intensidade de fluorescência em função do tempo de incubação de Photodithazine. Entretanto, existem células com uma maior intensidade em relação a outras, indicando uma incorporação não homogênea do fotossensibilizador na cultura celular de monocamada. Essa distribuição

heterogênea também foi relatada por outros autores utilizando o fotossensibilizador Photogem, um derivado de hematoporfirina, em células Hep-G2.(61)

Para os tempos analisados, o Photodithazine não foi detectado no núcleo celular, isso é uma vantagem, pois poderia causar dano ao material genético quando aplicada a TFD, levando à outras mudanças. Estudos indicam que apenas pequenos metabólitos, íons metálicos e com massa molecular de aproximadamente 40 kDa conseguem passar livremente pelos poros nucleares.(62) Entretanto, apesar do Photodithazine possuir uma massa molecular que permita sua passagem pelos poros nucleares, de aproximadamente 1 kDa - quarenta vezes menor que a massa limite – as superfícies interiores dos poros apresentam cargas positivas (63), criando uma barreira nuclear para moléculas carregadas positivamente, como é o caso do Photodithazine.

A presença do fotossensibilizador ao redor do núcleo pode ser explicado através da interação com a dupla bicamada lipídica, uma vez que o coeficiente de partição, $K_p = 1.6$, determinado em estudo anterior (40), prevê uma maior interação com membranas celulares.

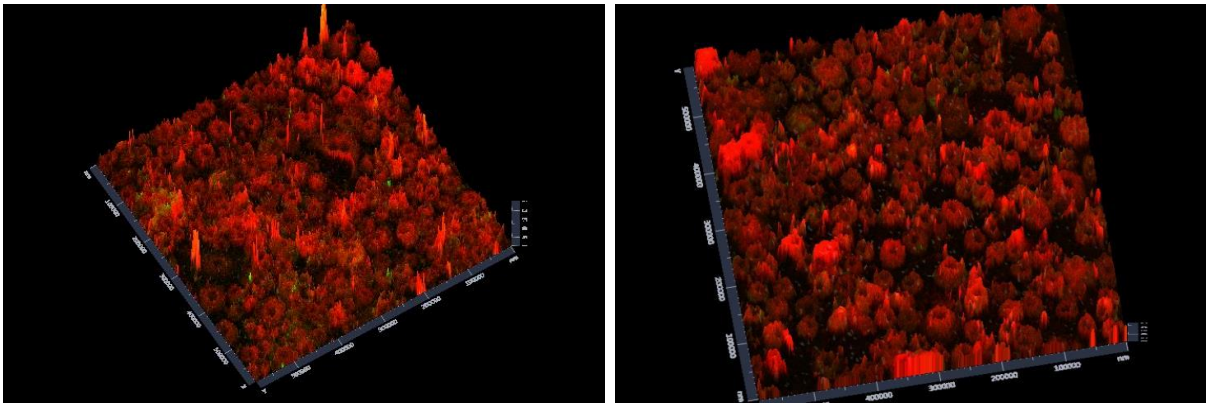


Figura 19 - Células de melanoma murino com Photodithazine visualizadas em um gráfico de intensidade por pixel e uma reconstrução tridimensional de uma sequência de imagens obtidas variando z.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Em uma análise computacional do software Zen (Zeiss), a ferramenta computacional “2,5D” foi utilizada para gerar gráficos de intensidade por pixel da imagem. Na figura 19, é possível comprovar a maior intensidade da fluorescência do fotossensibilizador ao redor do núcleo celular e a ausência de fluorescência dentro do núcleo celular. Wawrzyńska et al. observou o acúmulo de clorina e_6 dentro do citoplasma e também ao redor do núcleo celular. (64)

5.4 Co – localização do Photodithazine em organelas celulares

A marcação de organelas celulares pode indicar a localização intracelular dos fotossensibilizadores através da detecção da fluorescência de dois fluoróforos em um mesmo local. Com a identificação da presença do fotossensibilizador em uma determinada organela ou estrutura celular, é possível prever, qual via de morte a TFD induzirá. (25) Neste experimento foi realizada a marcação do citoesqueleto e das mitocôndrias, como descrito na sessão 4.5 de materias e métodos.

As imagens de fluorescência de cada fluoróforo – MitoTracker, faloidina e Photodithazine - foram transformadas para uma escala de cinza e, duas a duas foram comparadas utilizando a ferramenta Jacop do software ImageJ. Nessa ferramenta, os coeficientes de Pearson e Mander descritos na sessão 2.6 foram calculados. O coeficiente M_1 representa a fração de pixels que contém a fluorescência da mitocôndria ou citoesqueleto sobreposta com a fluorescência do Photodithazine, inversamente, o coeficiente M_2 representa a fração de pixels que contém a fluorescência de Photodithazine sobreposta com a fluorescência de mitocôndria.

Nas imagens abaixo, a fluorescência foi representada pelas cores falsas vermelho, verde e azul, respectivamente, para o fotossensibilizador, o marcador de mitocôndria (MitoTracker) e do citoesqueleto (AlexaFluor 532 - Faloidina).

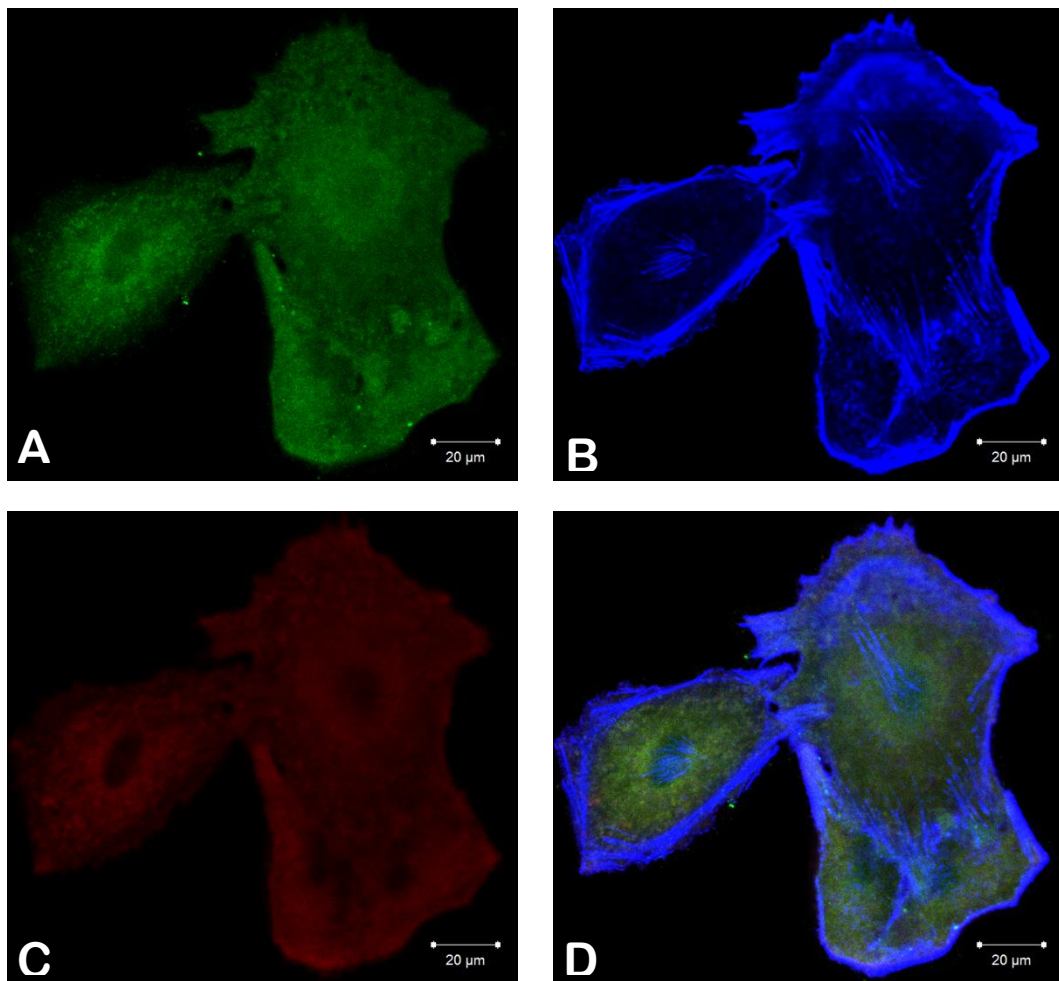


Figura 20 - Marcação de componentes celulares das células B16F10. Barra de escala de 20 μm . A) Fluorescência de mitocôndrias, B) Fluorescência do citoesqueleto, C) Fluorescência do Photodithazine e D) Sobreposição das imagens de fluorescência.

Fonte: Elaborada pelo autor

As imagens de fluorescência obtidas após a marcação dos componentes celulares são apresentadas na figura 20. Pode ser observado que a fluorescência do fotossensibilizador (Figura 20-C), assim como a fluorescência das mitocôndrias (20-A) estão distribuídas por toda a célula. Já a fluorescência do citoesqueleto foi observada ao redor da membrana plasmática e em algumas regiões próximas ao núcleo celular. As regiões com coloração amarela clara (Figura 20 - D) indicam áreas de sobreposição da fluorescência emitidas pelo Photodithazine e MitoTracker.

Os valores calculados dos coeficientes de Pearson para correlação das imagens de fluorescência entre Photodithazine/mitocôndria e Photodithazine/citoesqueleto foram, respectivamente, de 0,867 e 0,581. Os dois valores apresentados são positivos e acima de 0,2. O coeficiente de Pearson, 0,867, indica que há uma alta correlação entre a mitocôndria e o Photodithazine e, 0,581,

uma moderada correlação entre o citoesqueleto e o fotossensibilizador.

Os valores dos coeficientes de Mander, M_1 e M_2 , entre Photodithazine e MitoTracker foram respectivamente de 0,818 e 0,757, esses valores próximos de 1 indicam que houve uma alta frequência da presença destes dois fluoróforos no mesmo pixel da imagem analisada e, portanto, de mesma localização celular.

O mesmo não ocorreu com a relação entre citoesqueleto e Photodithazine, no qual os valores de M_1 e M_2 foram, respectivamente, 0,585 e 0,294. O baixo valor de M_2 mostra que na maioria dos pixels analisados da fluorescência do Photodithazine, não foi encontrada fluorescência do citoesqueleto marcado, ou seja, quase não houve co-localização entre eles.

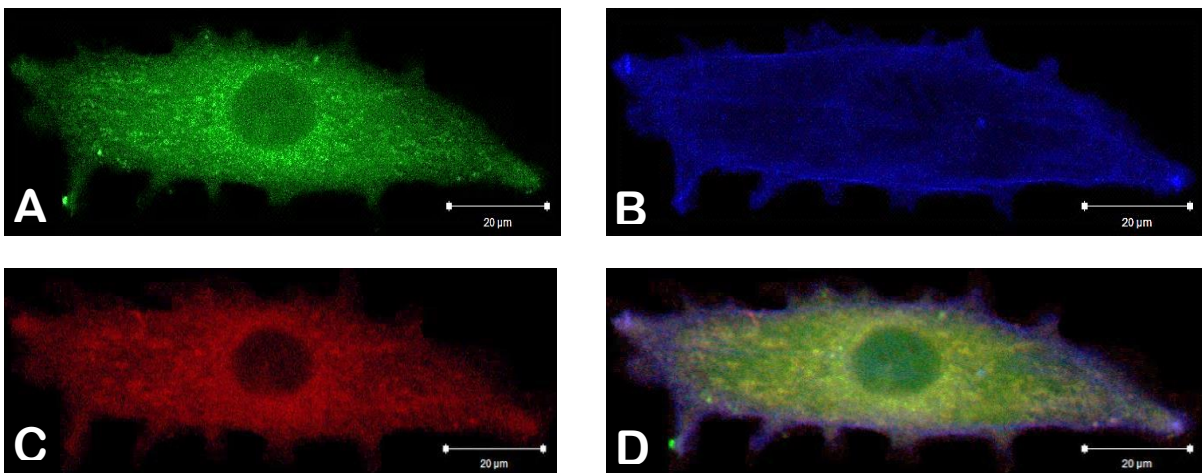


Figura 21 - Marcação de componentes celulares das células B16F10. Barra de escala de 20 μm . a) Fluorescência de mitocôndrias, b) Fluorescência do citoesqueleto, c) Fluorescência do Photodithazine e D) Sobreposição das imagens de fluorescência.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Na figura 21 são apresentadas imagens de fluorescência de uma única célula marcada. Nela também foi observada a distribuição da fluorescência do fotossensibilizador (figura 21-C), assim como a fluorescência das mitocôndrias (figura 21-A) por toda a célula. A fluorescência do citoesqueleto (figura 21-B) foi observada com menor intensidade em relação ao citoesqueleto das células da figura 20B.

Nesse caso, (figura 22D) também foram observadas algumas regiões amarelas, resultado da sobreposição da fluorescência originadas do Photodithazine e do MitoTracker, próximo à membrana plasmática e ao núcleo.

Para as imagens da figura 22, o coeficiente de Pearson calculado apresentou novamente uma alta correlação entre mitocôndria e Photodithazine, 0,849, e uma

moderada correlação entre citoesqueleto e o fotossensibilizador, 0,497.

Os coeficientes de Mander calculados para figura 22, apresentaram valores de M_1 e M_2 , respectivamente, 0,735 e 0,789, entre Photodithazine e MitoTracker. Isso indica, alta co-localização entre os dois fluoróforos e, portanto, entre o fotossensibilizador e mitocôndria. Além disso, esta é uma fração que mostra a frequência da presença destes dois fluoróforos no mesmo pixel analisado.

A co-localização entre citoesqueleto e Photodithazine, ao contrário, apresentou valores de M_1 e M_2 , respectivamente, de 0,344 e 0,356, estes valores baixos demonstram que praticamente não houve co-localização entre eles.

As imagens das figuras 23 e 24 apresentam a marcação apenas das mitocôndrias celulares e do Photodithazine.

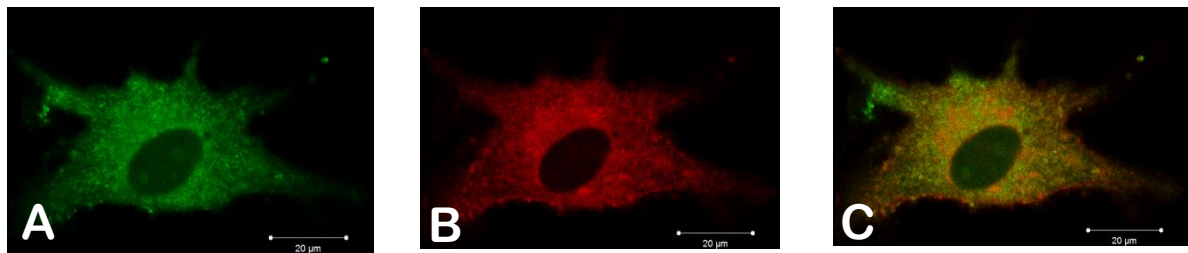


Figura 22 - Marcação de componentes celulares das células B16F10. a) Fluorescência de mitocôndrias, b) Fluorescência do Photodithazine e c) Fluorescências sobrepostas
Fonte: Elaborada pelo autor.

A sobreposição da fluorescência foi observada apenas em regiões próximas ao núcleo celular e à membrana plasmática (figura 22-C). O coeficiente de Pearson calculado, 0,728, apresenta alta correlação entre Photodithazine e mitocôndria. Os coeficientes de Mander, M_1 e M_2 , calculados foram respectivamente, 0,529 e 0,765. O menor valor de M_1 indica que houve muitos pixels com a presença da fluorescência da mitocôndria, porém sem a presença de Photodithazine, ou seja, não foi observada em todas as mitocôndrias celulares a presença do fotossensibilizador.

Por outro lado, o valor de M_2 , 0,765, indica que houve maior co-localização entre Photodithazine e mitocôndrias, em praticamente todos os pixels analisados houve o fotossensibilizador encontrado junto às mitocôndrias.

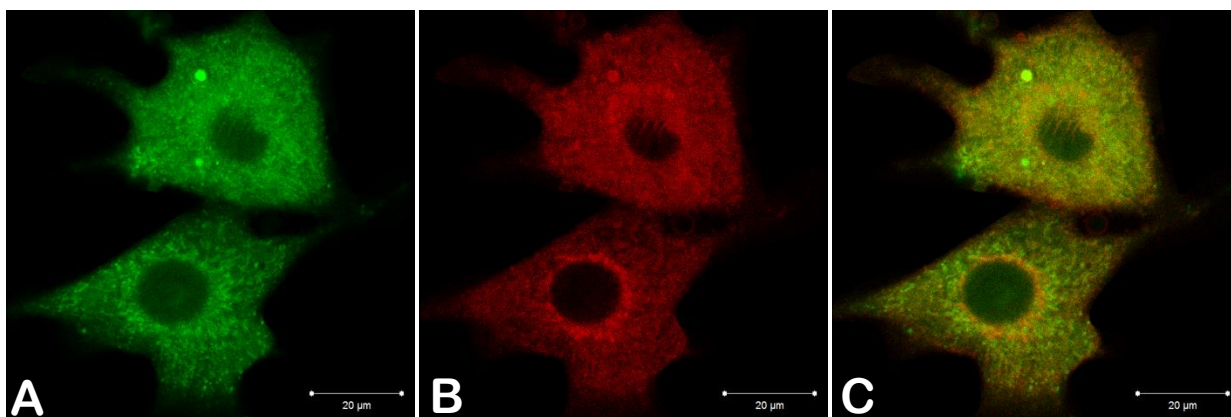


Figura 23 - Marcação de componentes celulares das células B16F10. Barra de escala de 20 μm . A) Fluorescência de mitocôndrias, B) Fluorescência do Photodithazine e C) Fluorescências sobrepostas.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Assim como na figura 22C, foi possível observar na figura 23C regiões amarelas próximas ao núcleo celular e à membrana plasmática. O coeficiente de Pearson calculado de 0,748 para a figura 22, mostra uma alta correlação entre os fluoróforos. Os coeficientes de Mander, M_1 e M_2 , calculados, 0,539 e 0,78, mostram novamente que o fotossensibilizador foi co-localizado na maioria dos pixels analisados na presença de mitocôndrias, porém o valor de M_1 mostra que a fluorescência do marcador de mitocôndria e de Photodithazine não foi, como para M_2 , encontrados no mesmo pixel.

Analisando os coeficientes de Pearson e Mander para as imagens acima, foi observado que o Photodithazine e a mitocôndria estão co-localizados. Os valores dos coeficientes de Pearson foram classificados com uma alta correlação entre 1 e 0,7. Isso, porém, não ocorreu com o par Photodithazine e citoesqueleto, que apresentou valores na faixa da correlação moderada. Luo et al. realizando experimentos de co-localização observou que o fotossensibilizador clorina e_6 , composto quimicamente similar ao Photodithazine, apresentou co-localização também com mitocôndrias celulares. Apesar disso, pesquisadores observaram um comportamento contrário, após 8 horas de incubação de clorina e_6 a 0,5 $\mu\text{g/mL}$, analisando apenas a sobreposição de imagens mostraram que pouca ou nenhuma co-localização foi observada entre clorina e_6 e mitocôndria.(65) Dunn et al. mostraram que este tipo de análise pode levar à falsas interpretações, pois pequenas variações da intensidade de cada fluoróforo pode mudar a percepção da co-localização dos fluoróforos. (45)

Os coeficientes de Mander corroboram com o resultado de CP, os valores mostram que há co-localização entre o Photodithazine e as mitocôndrias. Além disso, o coeficiente M_2 , fração de Photodithazine que obteve co-localização com as mitocôndrias foi maior em comparação ao M_1 , fração do marcador Mitotracker que obteve co-localização com Photodithazine. Isso indica que o fotossensibilizador estava na presença com maior frequência de mitocôndrias e o baixo valor de M_1 indica que nem todas as mitocôndrias continham o fotossensibilizador no mesmo pixel.

Para a TFD, isso indica que a utilização de Photodithazine pode levar à morte por apoptose as células B16F10, assim como Wen et al.(66) reportaram para as células A20 utilizando o mesmo fotossensibilizador e Wawrzyńska et al.(64) reportaram para as células TG/HA-VSMCs utilizando clorina e_6 , composto semelhante ao Photodithazine. Entretanto, não somente a localização celular, mas parâmetros como o tempo de incubação do FS e a fluência de luz utilizada também são importantes para determinar a via de morte celular. (67)

5.5 Tratamento de células de melanoma murino com terapia fotodinâmica utilizando Photodithazine.

Neste experimento, as células foram tratadas no protocolo descrito na sessão 4.7 de materiais e métodos.

Na figura 24 são apresentados os resultados da viabilidade celular do tratamento da terapia fotodinâmica utilizando diferentes concentrações de Photodithazine e mantendo fixa a fluência em cada gráfico.

Analisando os gráficos, foram observadas diminuições de mais de 90% de viabilidade celular para todas as concentrações de Photodithazine investigadas (figura 24 A-F), com exceção da condição de concentração de 1 $\mu\text{g/mL}$. Nesta condição, as células apenas apresentaram diminuição significativa da viabilidade celular com o aumento da fluência (figura 25 A). Wen et al. aplicando a TFD em células de ratos leucêmicas, linhagem A20, com fluência de 6,25 J/cm^2 e utilizando Photodithazine a 1 $\mu\text{g/mL}$, viu que as células perderam $90,6 \pm 1\%$ da viabilidade celular.(66) Quando comparadas com as células B16F10, foi possível verificar que elas foram mais resistentes, pois com fluência e concentração aproximadamente

iguais, 6 J/cm^2 e $1 \text{ }\mu\text{g/mL}$ de Photodithazine, as células apresentaram viabilidade celular de $70 \pm 8\%$ (figura 25 A), ou seja, possuindo 60% a mais de viabilidade do que as células, A20.

Wen et al. observou também a diminuição da viabilidade celular com o aumento da fluência de $3 - 25 \text{ J/cm}^2$, para a condição de $1 \text{ }\mu\text{g/mL}$ de Photodithazine. Assim como na figura 25 A.

Analisando o análogo químico do Photodithazine, clorina e_6 , Li et al. mostraram que o tratamento da terapia fotodinâmica utilizando concentrações menores entre $0,125 - 8 \text{ }\mu\text{g/mL}$ e fluência de 6 J/cm^2 , apresentou decaimento da viabilidade celular das células cancerígenas humanas do cólo do útero SW480 com o aumento da concentração de fotossensibilizador.(65) No presente estudo, foi possível observar que a TFD para concentrações acima de $20 \text{ }\mu\text{g/mL}$ de Photodithazine são letais às células até para pequenas fluências como 2 e 4 J/cm^2 .

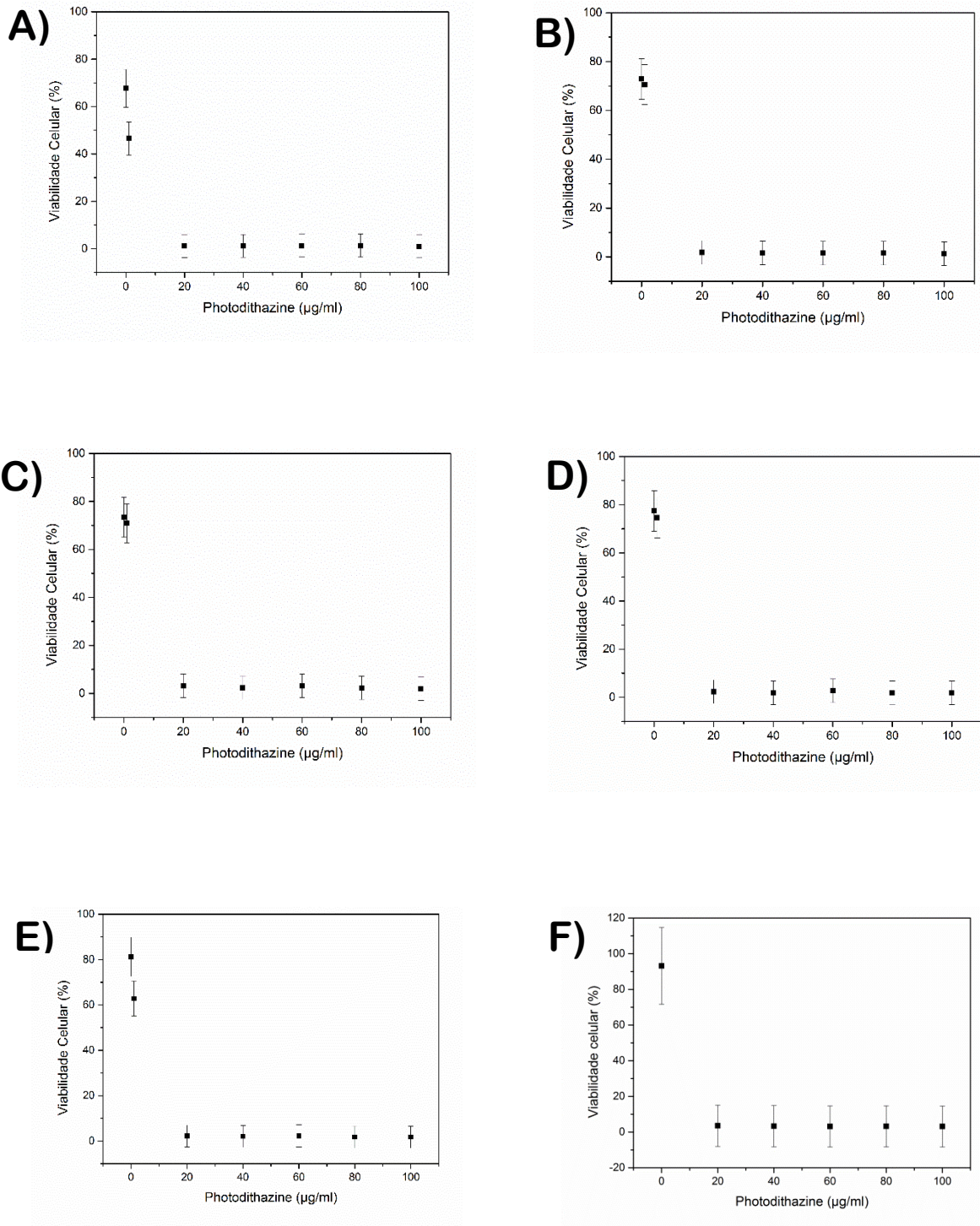


Figura 24 - Viabilidade celular de células B16F10 após o tratamento da Terapia fotodinâmica para as fluências investigadas de: a) 2 J/cm², b) 4 J/cm², c) 6 /cm², d) 8 /cm², e) 10 /cm² e f) 20 /cm².

Fonte: Elaborada pelo autor.

Na figura 25 é mostrada a viabilidade celular após a TFD com variação da fluência para uma concentração fixa de fotossensibilizador. As concentrações de 20, 40, 60, 80 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figura 25 B-F) não apresentaram variações significativas das viabilidades celulares, todas permaneceram próximas da viabilidade celular de 2%. A concentração de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ foi a única que apresentou diminuição da viabilidade celular com o aumento das fluências entregues.

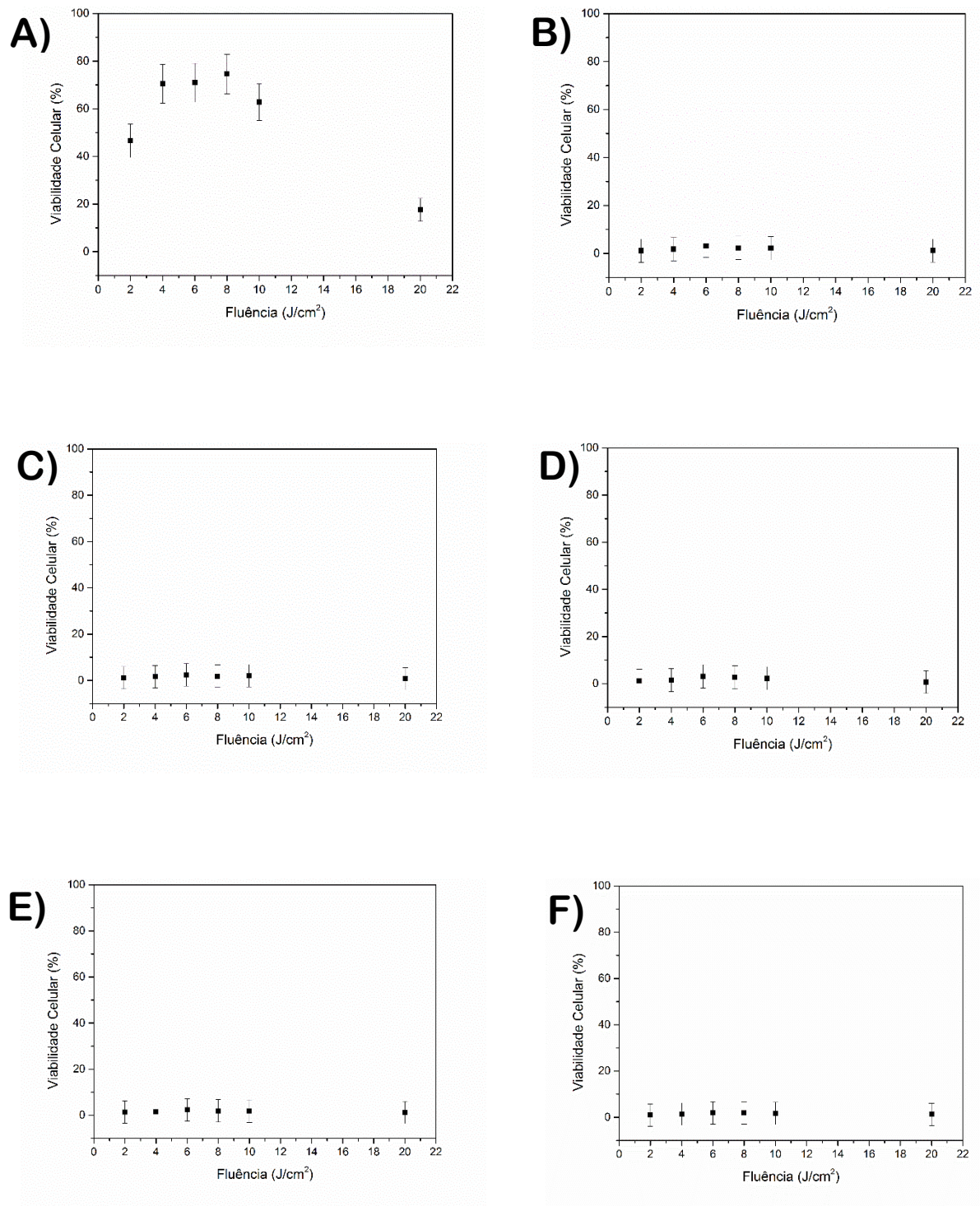


Figura 25 - Viabilidade celular de células B16F10 após o tratamento da Terapia fotodinâmica com Photodithazine para as concentrações investigadas de: a) 1 µg/mL, b) 20 µg/mL, c) 40 µg/mL, d) 60 µg/mL, e) 80 µg/mL e f) 100 µg/mL.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Na avaliação morfológica realizado em microscópio óptico com fonte de luz branca, foi observado logo após o tratamento da TFD que as células permaneceram aderidas na placa, embora tenham perdido 90% de sua viabilidade celular.

Analisando após 11 horas do tratamento da TFD, as células continuaram aderidas. Indicando que a TFD não foi capaz de induzir o desaderimento.

5.6 FLIM

A técnica FLIM (*fluorescence lifetime imaging microscopy*) vem sendo muito estudada para caracterizar os FS's, determinando a localização celular (68), as variações do ambiente celular dependente do tempo da incubação (69-70) e as variações entre células. (71) Poucos estudos foram feitos até o presente momento para caracterização da TFD em FLIM.

Neste estudo, foi caracterizado o tempo de vida médio de fluorescência do Photodithazine em diferentes tempos de incubação e após a TFD, utilizando células B16F10.

A imagem (figura 26) mostra o tempo de vida médio de fluorescência da solução de Photodithazine a 5 $\mu\text{g/mL}$ em 10 mM de PBS e sua respectiva distribuição do tempo de vida médio de fluorescência. O pico da distribuição do tempo de vida médio de fluorescência da solução do FS foi de $3,61 \pm 0,07$ ns.

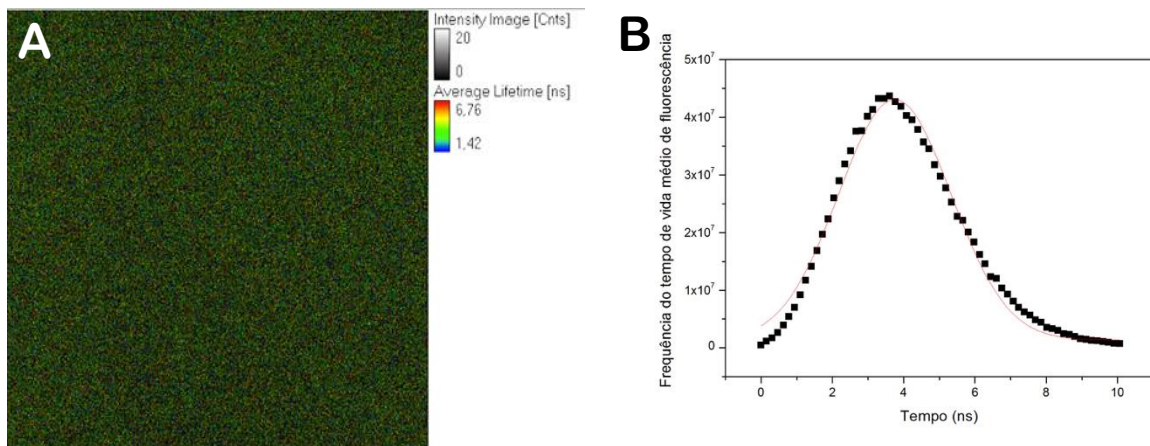


Figura 26 - Tempo de vida médio de fluorescência do Photodithazine a 5 g/mL em 10 mM de PBS. A) Imagem de FLIM da solução de Photodithazine. B) Distribuição do tempo vida médio de fluorescência do Photodithazine com pico em $3,75 \pm 0,07$ ns e desvio padrão de 1,57. Fonte: Elaborada pelo autor.

São mostradas as imagens de FLIM (figura 27) para cada tempo de incubação e suas respectivas distribuições do tempo de vida médio de fluorescência. As imagens do tempo de vida médio de fluorescência do fotossensibilizador incubado com as células para os diferentes tempos não apresentaram mudanças (Figura 27 A, 27 C e 27 E).

Assim como nos resultados da microscopia confocal (sessão 5.3), foi observado um acúmulo de Photodithazine ao redor do núcleo através da maior intensidade de fluorescência detectada.

Foram obtidos os valores de pico central de 4,63, 4,75 e 4,54 ns para os tempos de incubação de 1, 3 e 5 horas respectivamente. O valor médio de pico entre as três incubações foi de $4,63 \pm 0,07$ ns, sendo o erro considerado metade da menor unidade de tempo medido. Para os tempos e concentrações analisadas, o Photodithazine incubado com as células apresentou um aumento de 1 ns comparado com ele livre em solução (figura 26), isso pode representar uma ligação do fluoróforo a algum alvo biológico, assim como Bird et al. relataram sobre a mudança do tempo de vida de fluorescência dos cofatores NADH e FAD ao se ligarem à proteínas. (72)

Yeh et al. e colegas reportaram mudanças do tempo de vida médio de fluorescência a partir de 2 horas de incubação (68), utilizando Photofrin. Eles notaram que o fotossensibilizador ingressava nas células aos poucos, e por isso, as mudanças de cores eram notadas, ao contrário do Photodithazine, que apresentou em 1 hora distribuição quase homogênea por toda a célula (sessão 5.3) e mesmo

após 5 horas de incubação não apresentou mudanças significativas do tempo de vida médio de fluorescência (figura 27F).

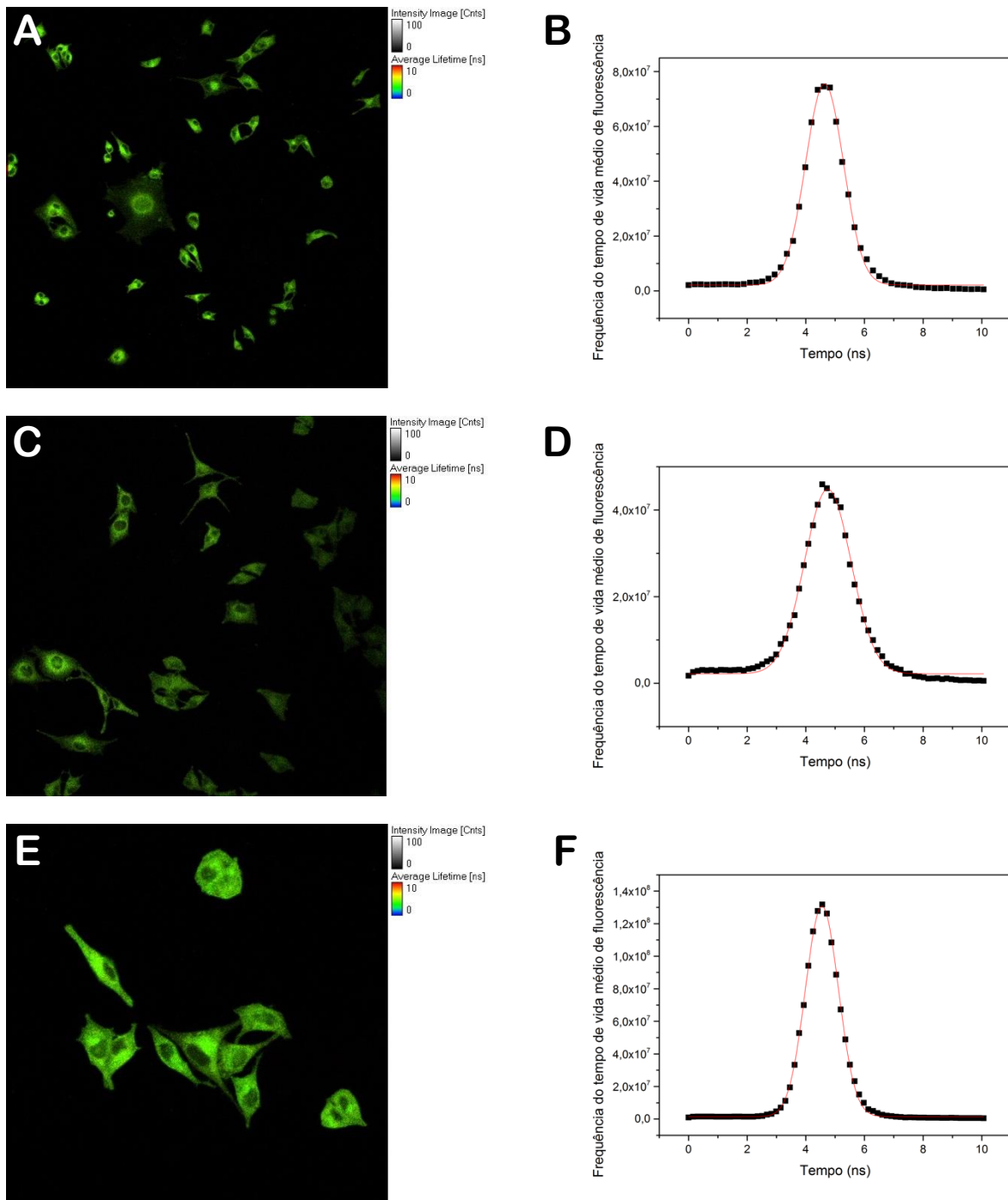


Figura 27 - Imagens de Tempo de vida de fluorescência do Photodithazine em células B16F10 com suas respectivas distribuições do tempo de vida de fluorescência para cada hora de incubação. a) 1 hora de incubação de Photodithazine, b) Distribuição do tempo vida médio de fluorescência para a incubação de 1 hora com pico em 4,63 ns e desvio padrão de 0,64, c) 3 horas de incubação de Photodithazine, d) Distribuição do tempo de vida médio de fluorescência para a incubação de 3 horas com pico em 4,74 ns e desvio padrão de 0,79, e) 5 horas de incubação de Photodithazine, f) Distribuição do tempo de vida médio de fluorescência para a incubação de 5 horas com pico em 4,54 ns e desvio padrão de 0,56.

Fonte: Elaborada pelo autor.

As distribuições apresentaram baixos valores de desvio padrão de 0,64, 0,79 e 0,56 para os respectivos tempos de incubação de 1, 3 e 5 horas.

Foi investigado o tempo de vida médio de fluorescência do Photodithazine, quando aplicado a terapia fotodinâmica em uma área de 218 x 218 μm . As imagens (figura 28) apresentam uma diminuição da intensidade de fluorescência mediante a irradiação de uma maior fluência de luz nas células, indicando que ocorreu fotodegradação, porém o tempo de vida médio de fluorescência representado pela cor verde não mudou com o aumento da fluência de luz.

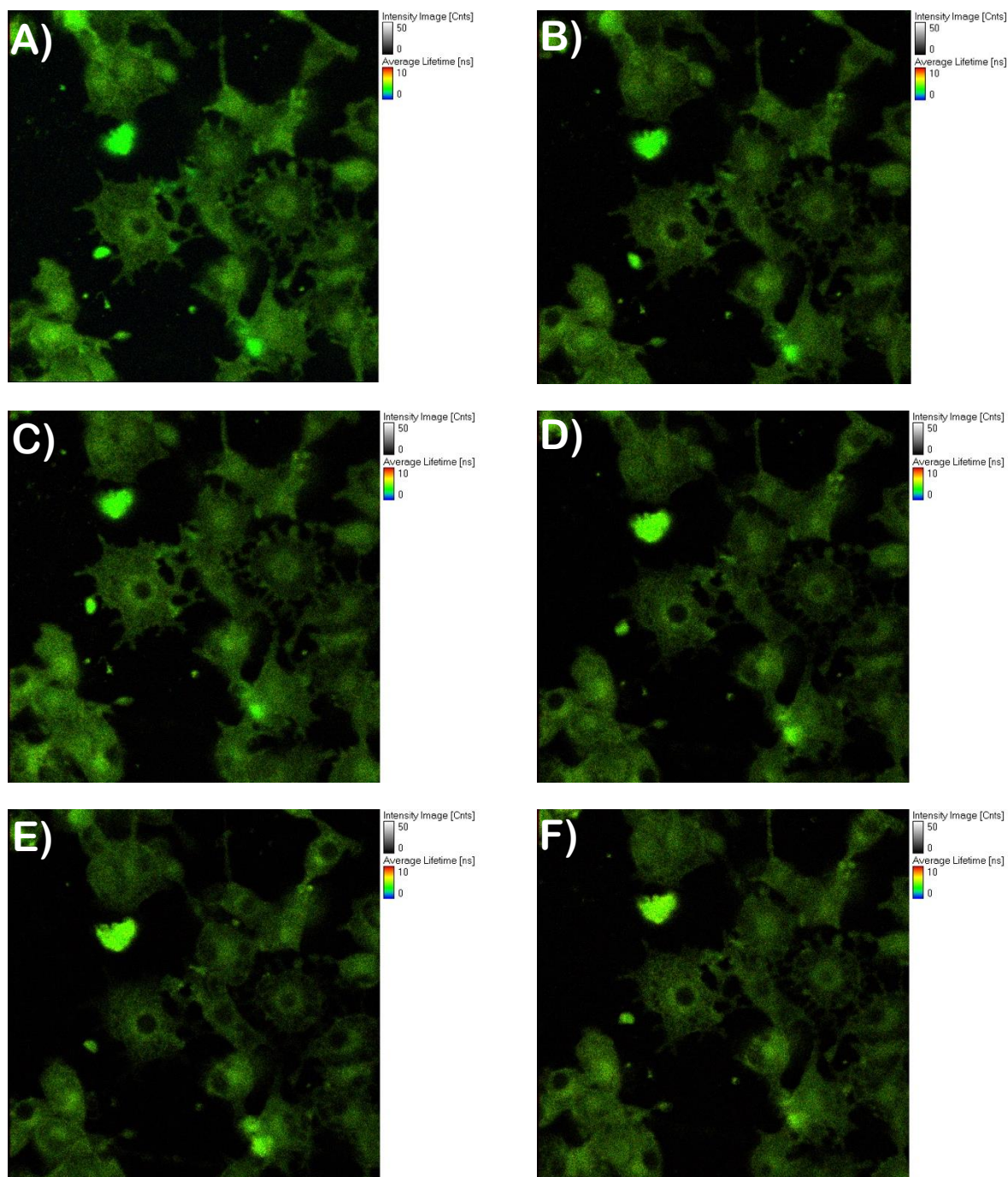


Figura 28 - Imagens de tempo de vida médio de fluorescência após aplicado a terapia fotodinâmica em células B16F10. A) Antes da TFD, B) 2 J/cm^2 , C) 6 J/cm^2 , D) 16 J/cm^2 , E) 32 J/cm^2 e F) 76 J/cm^2

Fonte: Elaborada pelo autor.

São mostrados na figura 29 as distribuições do tempo de vida médio de fluorescência para cada fluência utilizada e os valores de tendência central e desvio padrão são mostrados na tabela 4.

A solução de Photodithazine incubado com as células apresentou tempo de vida médio de fluorescência diferente da solução de PDZ. Após iniciado o tratamento

da TFD, um acréscimo de no máximo 0,2 ns foi observado para as diferentes fluências. Isso pode indicar que houve alterações no ambiente celular. Awasthi et al. relataram um pequeno deslocamento da distribuição do tempo de vida médio de fluorescência de células cancerígenas W31 após a irradiação das células.(71)

Tabela 2 - Parâmetros obtidos do ajuste das distribuições do tempo de vida médio de fluorescência do Photodithazine.

Condição	Tendência central (μ)	Sigma (σ)
Solução de PDZ	$3,75 \pm 0,07$ ns	1,57
Antes da TFD	$4,49 \pm 0,07$ ns	1,01
2 J/cm ²	$4,61 \pm 0,07$ ns	1,23
6 J/cm ²	$4,57 \pm 0,07$ ns	1,15
16 J/cm ²	$4,61 \pm 0,07$ ns	1,31
32 J/cm ²	$4,55 \pm 0,07$ ns	1,37
76 J/cm ²	$4,75 \pm 0,07$ ns	1,27

Fonte: Elaborada pelo autor.

Além disso, como as medidas foram logo após as sessões de TFD, não foram observadas variações morfológicas das células, que pode, dependendo do tipo de morte celular ocorrer após muito tempo.

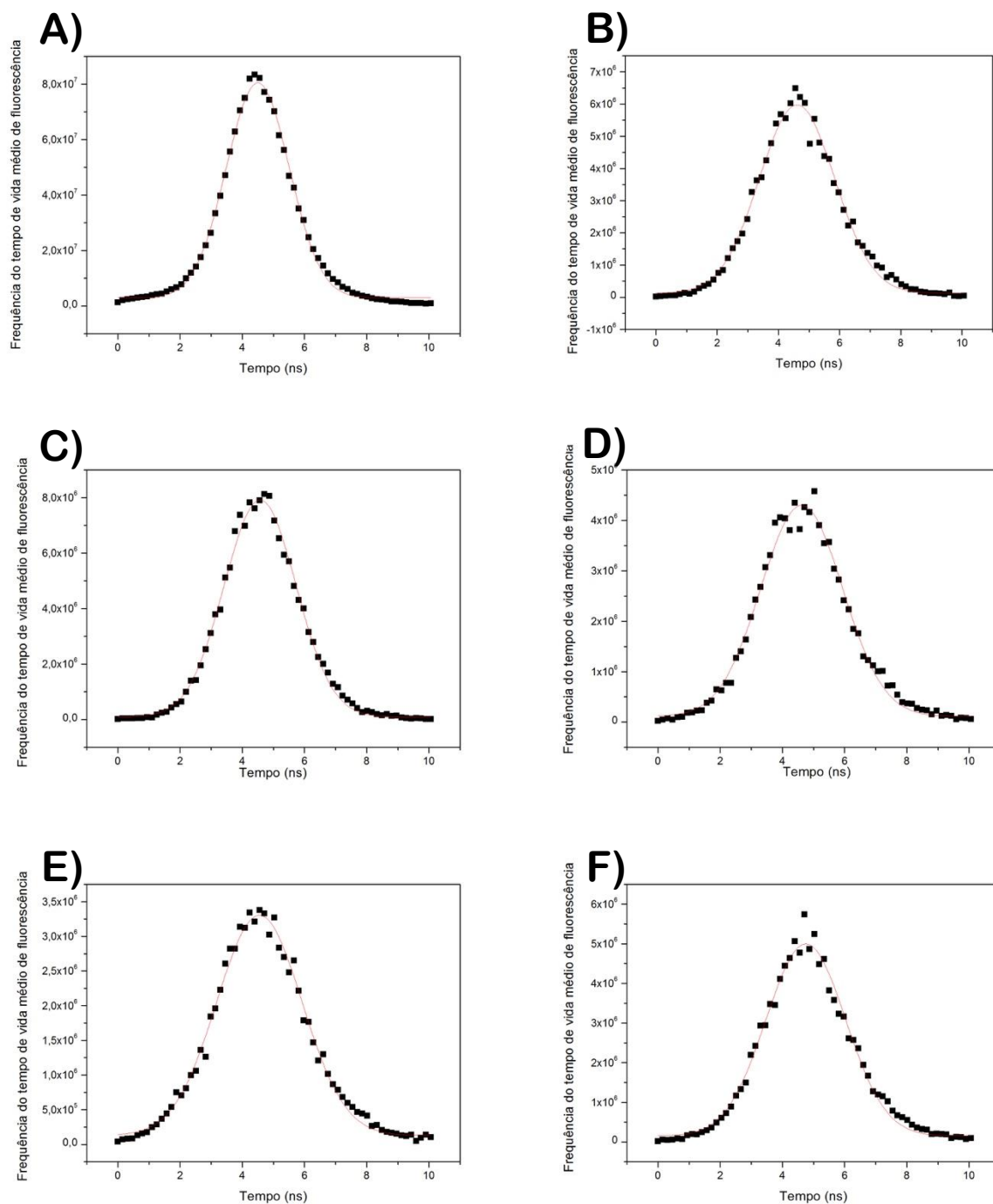


Figura 29 - Distribuições do tempo de vida médio de fluorescência do Photodithazine. O ajuste da curva esta representada pela linha vermelha e os pontos pretos representam a contagem do tempo de vida de fluorescência. A) Antes da TFD com pico em $4,49 \pm 0,07$ ns e desvio padrão de 1,01. B) 2 J/cm^2 com pico em $4,61 \pm 0,07$ ns e desvio padrão de 1,23 , C) 6 J/cm^2 com pico em $4,57 \pm 0,07$ ns e desvio padrão de 1,15, D) 16 J/cm^2 com pico em $4,61 \pm 0,07$ ns e desvio padrão de 1,31, E) 32 J/cm^2 com pico em $4,55 \pm 0,07$ ns e desvio padrão de 1,37. F) 76 J/cm^2 com pico em $4,55 \pm 0,07$ ns e desvio padrão de 1,27.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A fotodegradação do Photodithazine foi observado pelas imagens de fluorescência (figura 28), onde a emissão do fotossensibilizador foi separado através do filtro em 660 nm. As imagens foram coletadas em microscópio confocal juntamente com as imagens FLIM. A imagem (figura 28 F) mostra as células após total fotodegração do fotossensibilizador. Foi observado que não ocorreu mudanças morfológicas das células, porém é esperado que as células percam a viabilidade celular após a alta fluência aplicada.

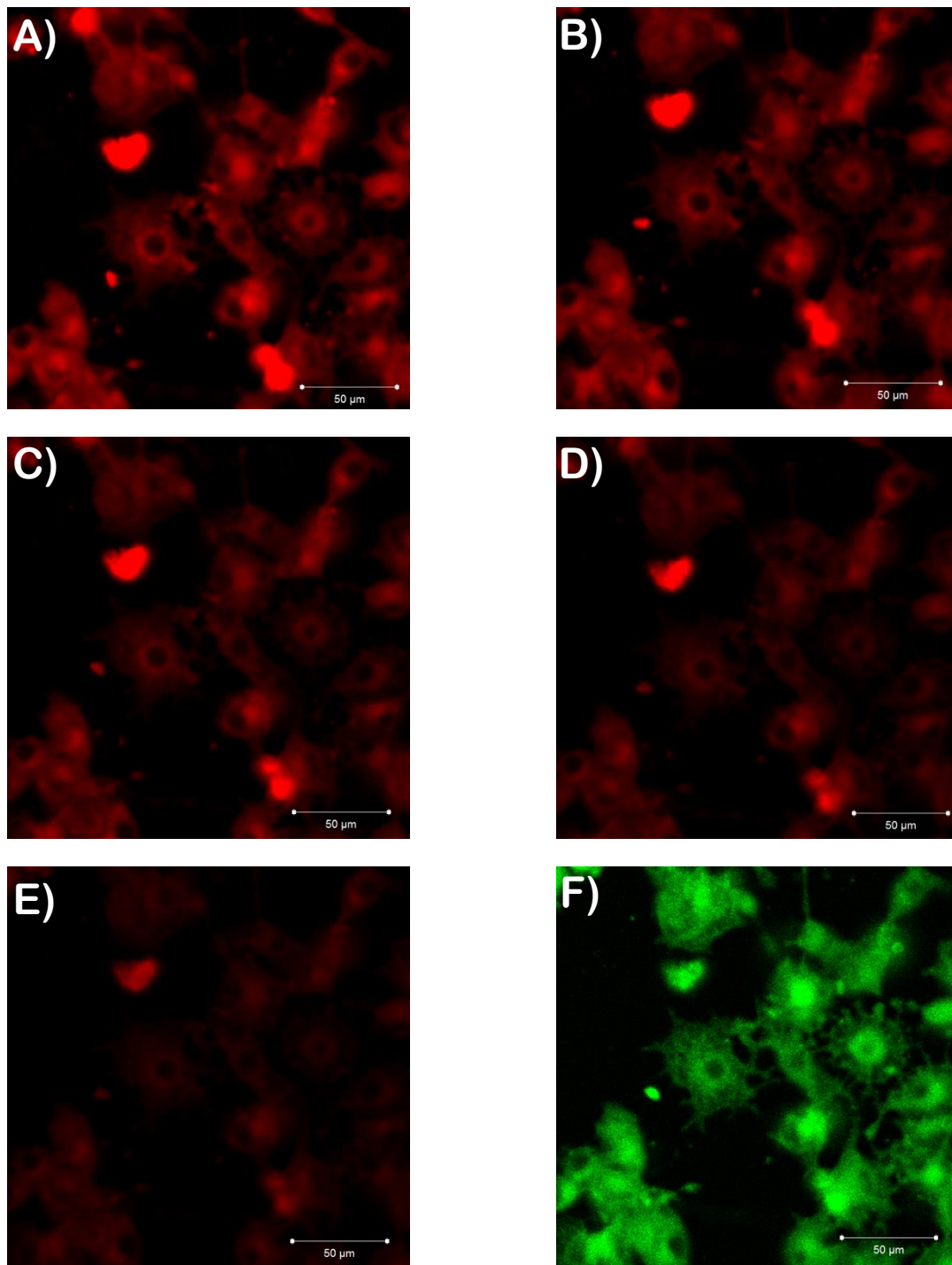


Figura 30 - Imagens das células B16F10 durante a TFD acompanhando a fluorescência do Photodithazine. Barra de escala e 50 μm . A) 2 J/cm^2 , B) 6 J/cm^2 , C) 16 J/cm^2 , D) 32 J/cm^2 , E) 76 J/cm^2 e F) Após toda fotodegradação do Photodithazine

Fonte: Elaborada pelo autor

6 Conclusão

Com base nos resultados apresentados, foi possível obter valores de IC_{50} do Photodithazine incubado no escuro para as células de melanoma murino, B16F10. Estes valores ficaram próximos dos valores calculados para outras linhagens celulares que utilizaram o mesmo composto.

Foi possível observar a diminuição da concentração de fotossensibilizador retido pelas células após 1 hora de incubação, apesar de haver estudos sobre a resistência celular de células melanóticas, não foi achado indícios na literatura sobre a liberação do fotossensibilizador pelas células.

A marcação celular de organelas juntamente com análises computacionais de imagens de fluorescência, revelou a alta co-localização entre as mitocôndrias e o Photodithazine. Apesar do fotossensibilizador não estar presente em todas as mitocôndrias é esperado que haja uma morte por apoptose após o tratamento da terapia fotodinâmica.

O Photodithazine foi eficiente para inativação de mais de 90% das células de melanoma murino. Foi observado que o tratamento da terapia fotodinâmica para faixa de fluências entre 2 e 20 J/cm^2 e concentrações acima de 20 $\mu g/mL$ não causaram inativação crescente com o aumento de fluência ou fotossensibilizador. Porém, para a concentração de 1 $\mu g/mL$ foi observado uma taxa de inibição maior com o aumento da fluência.

Pelas as análises de FLIM, foi possível caracterizar o Photodithazine livre em solução e ligado às células de melanoma murino. Nas células, foi observado um aumento do tempo de vida médio de fluorescência de aproximadamente 1 ns, o que indica que o fotossensibilizador demorou mais tempo para decair do seu primeiro estado excitado.

Os estudos realizados revelaram a eficácia da inativação das células de melanoma utilizando o Photodithazine e sua caracterização utilizando o tempo de vida de fluorescência pode ajudar a elucidar os processos que ocorrem na célula com a mudança do ambiente celular provocado pela terapia fotodinâmica.

REFERÊNCIAS

- 1 DIAMOND, I.; MCDONAGH, A.; WILSON, C.; GRANELLI, S.; NIELSEN, S.; JAENICKE, R. Photodynamic therapy of malignant tumours. **Lancet**, v. 2, p. 1175–1177, 1972. doi:10.1016/S0140-6736(72)92596-2.
- 2 BROVKO, L. Photodynamic treatment: a new efficient alternative for surface sanitation. **Advances in Food Nutrition Research**, v. 61, p. 119–147, 2010. doi: 10.1016/B978-0-12-374468-5.00003-9.
- 3 SPERANDIO, F. F.; HUANG, Y. Y.; HAMBLIN, M. R. Antimicrobial photodynamic therapy to kill gram-negative bacteria. **Recent Patents on Anti-infective Drug Discovery**, v. 8, n. 2, p. 108–120, 2013.
- 4 ZHAO, B.; HE, Y. Y. Recent advances in the prevention and treatment of skin cancer using photodynamic therapy. **Expert Review of Anticancer Therapy**, v. 10, p. 1797–809, 2010. doi: 10.1586/era.10.154.
- 5 DOUGHERTY, T. J.; GOMER, C. J.; HENDERSON, B. W.; JORI, G.; KESSEL, D.; KORBELIK, M.; MOAN, J.; PENG, Q. Photodynamic therapy. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 90, n. 12, p. 889–905, 1998.
- 6 BROWN, S. B.; BROWN, E. A.; WALKER, I. The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment. **Lancet Oncology**, v. 5, n. 8, p. 497–508, 2004.
- 7 WILKIE, R.; IBBOTSON, S. Patient satisfaction in the photodynamic therapy clinic. **Photodermatology, Photoimmunology and Photomedicine**, v. 32, n. 1, p. 44–47, 2016.
- 8 RAMIREZ, D. P.; KURACHI, C.; INADA, N. M.; MORIYAMA, L. T.; SALVIO, A. G.; VOLLET, J. D.; PIRES, L.; BUZZÁ, H. H.; DE ANDRADE, C.T.; GRECO, C.; BAGNATO, V. S. Experience and BCC subtypes as determinants of MAL-PDT response: preliminary results of a national Brazilian project. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 11, n. 1, p. 22–26, 2014.
- 9 RASTRELLI, M.; TROPEA, S.; PIGOZZO, J. Melanoma m1: diagnosis and therapy. **In Vivo**, v. 28, n. 3, p. 273–285, 2014.
- 10 DELLIAN, M.; RICHERT, C.; GAMARRA, F.; GOETZ, A. E. Photodynamic eradication of amelanotic melanoma of the hamster with fast acting photosensitizers. **International Journal of Cancer**, v. 65, n. 2, p. 246–248, 1996.
- 11 VROUENRAETS, M. B.; VISSER, G. W. M.; SNOW, G. B.; DONGEN, G. A. Basic principles, applications in oncology and improved selectivity of photodynamic therapy. **Anticancer Research**, v. 3, n. 1, p. 505–522, 2003.
- 12 LA BIBLIOTECA MÉDICA. Santa Cruz de la Sierra, 2015. Disponível em: < <http://www.biblioteca-medica.com.ar/2012/09/melanoma.html> > Acesso em: 07 dez. 2015.
- 13 AMERICAN CANCER SOCIETY. Estados Unidos da América, 2015. Disponível em: < <http://www.cancer.org/research/cancerfactsstatistics/cancerfactsfigures2015/> > Acesso em: 07 dez. 2015

14 INSTITUTO NACIONAL DO CANCER. **Estimativa 2014**: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2014.

15 ASCIERTO, P. A.; KIRKWOOD, J. M.; GROB, J. J.; SIMEONE, E.; GRIMALDI, A. M.; MAIO, M.; PALMIERI, G.; TESTORI, A.; MARINCOLA, F. M.; MOZZILLO, N. The role of BRAF V600 mutation in melanoma. **Journal of Translational Medicine**, v. 10, n. 85, p. 1-9, 2012.

16 JARELL, A. D.; LAWRENCE, D.; TSAO, H. The RAS/mitogen activated protein (MAP) kinase pathway in melanoma biology and therapeutics. **Biologics**, v. 1, n. 4, p. 407–414, 2007.

17 MELANOMA INTERNATIONAL FOUNDATION. **Glenmoore**. 2015. Disponível em: <<http://melanomainternational.org/>>. Acesso em: 10 dez. 2015.

18 DABROWSKI, J. M.; KRZYKAWSKA, M.; ARNAUT, L. G.; PEREIRA, M. M.; MONTEIRO, C. J. P.; SIMÕES, S.; URBANSKA, K.; STOCHEL, G. Tissue uptake study and photodynamic therapy of melanoma-bearing mice with a nontoxic, effective chlorin. **Chemistry Medicinal**, v. 6, n. 9, p. 1715–1726, 2011.

19 SHELEG, S. V.; ZHAVRID, E. A.; KHODINA, T. V.; KOCHUBEEV, G. A.; ISTOMIN, Y. P.; CHALOV, V. N.; ZHURAVKIN, I. N. Photodynamic therapy with chlorin e_6 for skin metastases of melanoma. **Photodermatology, Photoimmunology and Photomedicine**, v. 20, n. 1, p. 21–26, 2004.

20 BALDEA, I.; FILIP, A. G. Photodynamic therapy in melanoma - an update. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 63, n. 7, p. 109–118, 2012.

21 FIDLER, I. J.; FIDLER, J. Biological behavior of malignant melanoma cells correlated to their survival *in vivo*. **Cancer Research**, v. 35, n. 1, p. 218–224, 1975.

22 NORBURY, C. J.; HICKSON, I. D. Cellular responses to DNA damage. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 41, n. 1, p. 367–401, 2001.

23 ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicologic Pathology**, v. 35, n. 4, p. 495–516, 2007.

24 ROCK, K. L.; KONO, H. The inflammatory response to cell death. **Annual Review of Pathology**, v. 3, p. 99–126, 2008. doi: 10.1146/annurev.pathmechdis.3.121806.151456.

25 MROZ, P.; YAROSLAVSKY, A.; KHARKWAL, G. B.; HAMBLIN, M. R. Cell death pathways in photodynamic therapy of cancer. **Cancers**, v. 3, n. 4, p. 2516–2539, 2011.

26 ESSICK, E. E.; SAM, F. Oxidative stress and autophagy in cardiac disease, neurological disorders, aging and cancer. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 3, n. 3, p. 168–77, 2010.

27 LEVINE, B.; KROEMER, G. Autophagy in the pathogenesis of disease. **Cell**, v. 132, n. 1, p. 27–42, 2008.

28 BUYTAERT, E.; DEWAELE, M.; AGOSTINIS, P. Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1776, n. 1, p. 86–107, 2007.

- 29 ACKROYD, R.; KELTY, C.; BROWN, N.; REED, M. The history of photodetection and photodynamic therapy. **Photochemistry and Photobiology**, v. 74, n. 5, p. 656–669, 2001.
- 30 ZHANG, L. J.; BIAN, J.; BAO, L. L.; CHEN, H. F.; YAN, Y. J.; WANG, L.; CHEN, Z. L. Photosensitizing effectiveness of a novel chlorin-based photosensitizer for photodynamic therapy in vitro and in vivo. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 140, n. 9, p. 1527–1536, 2014.
- 31 KOLAROVA, H.; NEVRELOVA, P.; TOMANKOVA, K.; KOLAR, P.; BAJGAR, R.; MOSINGER, J. Production of reactive oxygen species after photodynamic therapy by porphyrin sensitizers. **General Physiology and Biophysics**, v. 27, n. 2, p. 101–105, 2008.
- 32 DISCOVERY medicine. Maryland, 2015. Disponível em: <http://www.discoverymedicine.com/Diana-M-Tacelosky/files/2012/04/discovery_medicine_no_71_brian_m_barth_figure_1.png> Acesso em: 10 dez. 2015.
- 33 NAGATA, J. Y.; HIOKA, N.; KIMURA, E.; BATISTELA, V. R.; TERADA, R. S. S.; GRACIANO, A. X.; BAESSO, M. L.; HAYACIBARA, M. F. Antibacterial photodynamic therapy for dental caries: evaluation of the photosensitizers used and light source properties. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 9, n. 2, p. 122–131, 2012.
- 34 SIMMONS, B. J.; GRIFFITH, R. D.; FALTO-AIZPURUA, L. A.; NOURI, K. An update on photodynamic therapies in the treatment of onychomycosis. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 29, n. 7, p. 1275–1279, 2015.
- 35 SHISHKOVA, N.; KUZNETSOVA, O.; BEREZOV, T. Photodynamic therapy for gynecological diseases and breast cancer. **Cancer Biology & Medicine**, v. 9, n. 1, p. 9–17, 2012.
- 36 SHIEH, S.; DEE, A. S.; CHENEY, R. T.; FRAWLEY, N. P.; ZEITOUNI, N. C.; OSEROFF, A. R. Photodynamic therapy for the treatment of extramammary Paget's disease. **British Journal of Dermatology**, v. 146, n. 5, p. 1000–1005, 2002.
- 37 BHATTACHARJEE, H.; DEKA, H.; DEKA, S.; BARMAN, M. J.; MAZUMDAR, M.; MEDHI, J. Verteporfin photodynamic therapy of retinal capillary hemangioblastoma in von Hippel-Lindau disease. **Indian Journal of Ophthalmology**, v. 58, n. 1, p. 73–75, 2010.
- 38 UZDENSKY, A. B.; DERGACHEVA, O. Y.; ZHAVORONKOVA, A. A.; RESHETNIKOV, A. V.; PONOMAREV, G. V. Photodynamic effect of novel chlorin e_6 derivatives on a single nerve cell. **Life Sciences**, v. 74, n. 17, p. 2185–2197, 2004.
- 39 THE FIRST experience of Photodithazine clinical application for photodynamic therapy of malignant tumors. Moscow, 2016. Disponível em: <<http://veta-grand.narod.ru/publ/publ003.html>>. Acesso em: 12 jan 2016.
- 40 CORREA, J. C.; BAGNATO, V. S.; IMASATO, H.; PERUSSI, J. R. Previous illumination of a water soluble chlorine photosensitizer increases its cytotoxicity. **Laser Physics**, v. 22, n. 9, p. 1387–1394, 2012.
- 41 YOUNG, A. Chromophores in human skin. **Physics in Medicine and Biology**, v. 42, p. 789–802, 1997.

- 42 DABROWSKI, J. M.; URBANSKA, K.; ARNAUT, L. G.; PEREIRA, M. M.; ABREU, A. R.; SIMÕES, S.; STOCHÉL, G. Biodistribution and photodynamic efficacy of a water-soluble, stable, halogenated bacteriochlorin against melanoma. **Chemistry Medicinal**, v. 6, n. 3, p. 465–475, 2011
- 43 BOLTE, S.; CORDELIÈRES, F. P. A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. **Journal of Microscopy**, v. 224, n. 3, p. 213–232, 2006
- 44 MALGADY, R. G.; KREBS, D. B. Understanding correlation coefficients and regression. **Physical Therapy**, v. 66, n. 1, p. 110–114, 1986.
- 45 DUNN, K. W.; KAMOČKA, M. M.; MCDONALD, J. H. A practical guide to evaluating colocalization in biological microscopy. **Cell Physiology**, v. 300, n. 4, p. 723–742, 2011.
- 46 POWERS, S. K.; JI, L. L.; KAVAZIS, A. N.; JACKSON, M. J. Reactive oxygen species: impact on skeletal muscle. **Comprehensive Physiology**, v. 1, n. 2, p. 941–969, 2011.
- 47 WANG, X.; FANG, H.; HUANG, Z.; SHANG, W.; HOU, T.; CHENG, A.; et al. Imaging ROS signaling in cells and animals. **Journal of Molecular Medicine**, v. 91, n. 8, p. 917–927, 2013
- 48 BEREZIN, M. Y.; ACHILEFU, S. Fluorescence lifetime measurements and biological imaging. **Chemical Reviews**, v. 110, n. 5, p. 2641–2684, 2010.
- 49 BECKER, W. Fluorescence lifetime imaging - techniques and applications. **Journal of Microscopy**, v. 247, n. 2, p. 119–136, 2012.
- 50 RICE, W. L.; SHCHERBAKOVA, D. M.; VERKHUSHA, V. V.; KUMAR, A. T. N. In vivo tomographic imaging of deep-seated cancer using fluorescence lifetime contrast. **Cancer Research**, v. 75, n. 7, p. 1236–1243, 2015.
- 51 ARDESHIRPOUR, Y.; CHERNOMORDIK, V.; HASSAN, M.; ZIELINSKI, R.; CAPALA, J.; GANDJBAKHCHÉ, A. In vivo fluorescence lifetime imaging for monitoring the efficacy of the cancer treatment. **Clinical Cancer Research**, v. 20, n. 13, p. 3531–3539, 2014.
- 52 SUN, Y.; PHIPPS, J. E.; MEIER, J.; HATAMI, N.; POIRIER, B.; ELSON, D. S.; FARWELL, D. G.; MARCU, L. Endoscopic fluorescence lifetime imaging for in vivo intraoperative diagnosis of oral carcinoma. **Microscopy and Microanalysis**, v. 19, n. 4, p. 791–798, 2013.
- 53 WANG, G.; GONG, Y.; BURCZYNSKI, F. J.; HASINOFF, B. B. Cell lysis with dimethyl sulphoxide produces stable homogeneous solutions in the dichlorofluorescein oxidative stress assay. **Free Radical Research**, v. 42, n. 5, p. 435–441, 2008.
- 54 CORREA, J. C. **Fotodegradação do photodithazine e citotoxicidade dos fotoprodutos formados após irradiação com laser**. 2006. 96 p. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.
- 55 LUO, W.; LIU, R. S.; ZHU, J. G.; LI, Y. C.; LIU, H. C. Subcellular location and photodynamic therapeutic effect of chlorin e6 in the human tongue squamous cell cancer Tca8113 cell line. **Oncology Letters**, v. 9, n. 2, p. 551–556, 2015.
- 56 HUANG, Y.; VECCHIO, D.; AVCI, P.; YIN, R.; GARCIA, D. M.; HAMBLIN, M. R. Melanoma resistance to photodynamic therapy : new insights. **Biological Chemistry**, v. 394, n. 2, p. 239–250, 2014.

- 57 CHEN, K. G.; VALENCIA, J. C.; GILLET, J. P.; HEARING, V. J.; GOTTESMAN, M. M. Involvement of ABC transporters in melanogenesis and the development of multidrug resistance of melanoma. **Pigment Cell and Melanoma Research**, v. 22, n. 6, p. 740–749, 2009.
- 58 LAKOWICZ, J. R. **Principles of fluorescence spectroscopy**. 3rd ed. New York: Springer Science & Business Media, 2006.
- 59 HAYASHI, M.; FUKUHARA, H.; INOUE, K.; SHUIN, T.; HAGIYA, Y.; NAKAJIMA, M.; TOHRU, T.; OGURA, S. I. The effect of iron ion on the specificity of photodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid. **PLoS One**, v. 10, n. 3, p. e0122351, 2015.
- 60 PENJWEINI, R.; LOEW, H. G.; BREIT, P.; KRATKY, K. W. Optimizing the antitumor selectivity of PVP-hypericin re A549 cancer cells and HLF normal cells through pulsed blue light. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 10, n. 4, p. 591–599, 2013.
- 61 SABINO, L. G. **Estudo da distribuição de doses limiares em TFD para um modelo de cultura tridimensional de células obtido pelo método de levitação magnética**. 2014. 114 p. Tese (Doutorado em Física Aplicada) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.
- 62 WENTE, S. R.; ROUT, M. P. The nuclear pore complex and nuclear transport. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 2, n. 10, p. e000562, 2010.
- 63 COLWELL, L. J.; BRENNER, M. P.; RIBBECK, K. Charge as a selection criterion for translocation through the nuclear pore complex. **PLOS Computational Biology**, v. 6, n. 4, p. e1000747, 2010.
- 64 WAWRZYNSKA, M.; KALAS, W.; BIALY, D.; ZIOLO, E.; ARKOWSKI, J.; MAZUREK, W.; STRZADALA, L. *In vitro* photodynamic therapy with chlorin e_6 leads to apoptosis of human vascular smooth muscle cells. **Archivum Immunologiae et Therapia Experimentalis**, v. 58, n. 1, p. 67–75, 2010.
- 65 LI, Y.; YU, Y.; KANG, L.; LU, Y. Effects of chlorin e_6 -mediated photodynamic therapy on human colon cancer SW480 cells. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, v. 7, n. 12, p. 4867–4876, 2014.
- 66 WEN, L. Y.; BAE, S. M.; CHUN, H. J.; PARK, K. S.; AHN, W. S. Therapeutic effects of systemic photodynamic therapy in a leukemia animal model using A20 cells. **Lasers in Medical Science**, v. 27, n. 2, p. 445–452, 2012.
- 67 ACEDO, P.; STOCKERT, J. C.; CAÑETE, M.; VILLANUEVA, A. Two combined photosensitizers: a goal for more effective photodynamic therapy of cancer. **Cell Death & Disease**, v. 5, p. 1-12, 2014. doi: 10.1038/cddis.2014.77.
- 68 YEH, S. C. A.; DIAMOND, K. R.; PATTERSON, M. S.; NIE, Z.; HAYWARD, J. E.; FANG, Q. Monitoring photosensitizer uptake using two photon fluorescence lifetime imaging microscopy. **Theranostics**, v. 2, n. 9, p. 817–826, 2012.
- 69 KRESS, M. Time-resolved microspectrofluorometry and fluorescence lifetime imaging of photosensitizers using picosecond pulsed diode lasers in laser scanning microscopes. **Journal of Biomedical Optics**, v. 8, n. 1, p. 26, 2003.

70 SASNOUSKI, S.; PIC, E.; DUMAS, D.; ZORIN, V.; D'HALLEWIN, M. A.; GUILLEMIN, F.; BEZDETAYAYA, L. Influence of incubation time and sensitizer localization on meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin (mTHPC)-induced photoinactivation of cells. **Radiation Research**, v. 168, n. 2, p. 209-217, 2007.

71 AWASTHI, K.; YAMAMOTO, K.; FURUYA, K.; NAKABAYASHI, T.; LI, L.; OHTA, N. Fluorescence characteristics and lifetime images of photosensitizers of talaporfin sodium and sodium pheophorbide a in normal and cancer cells. **Sensors**, v. 15, n. 5, p. 11417–11430, 2015.

72 BIRD, D. K. Metabolic mapping of MCF10A human breast cells via multiphoton fluorescence lifetime imaging of the coenzyme NADH. **Cancer Research**, v. 65, n. 19, p. 8766–8773, 2005.