

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO – USP
INSTITUTO DE QUÍMICA – IQ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOQUÍMICA)

DARIA RAQUEL QUEIROZ DE ALMEIDA

**Participação da ferroptose na morte celular desencadeada pela
terapia fotodinâmica com o azul de metileno em adenocarcinoma
de ducto pancreático humano**

Versão corrigida da Tese defendida

São Paulo
24/02/2023

DARIA RAQUEL QUEIROZ DE ALMEIDA

**Participação da ferroptose na morte celular desencadeada pela
terapia fotodinâmica com o azul de metileno em adenocarcinoma
de ducto pancreático humano**

*Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências Biológicas do Instituto de Química da
Universidade de São Paulo – USP, como parte das
exigências para obtenção do título de Doutora em
Ciências (Bioquímica).*

Orientadora: Prof^a. Dra. Leticia Labriola
Co-Orientador: Prof. Dr. Maurício da Silva Baptista

São Paulo
2022

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 elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

A447p	<p>Almeida , Daria Raquel Queiroz de Participação da ferroptose na morte celular desencadeada pela terapia fotodinâmica com o azul de metileno em adenocarcinoma de ducto pancreático humano / Daria Raquel Queiroz de Almeida . - São Paulo, 2022. 120 p.</p> <p>Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Bioquímica. Orientador: Labriola, Leticia Coorientador: Baptista, Maurício da Silva</p> <p>1. Ferroptose. 2. Adenocarcinoma de Ducto Pancreático. 3. Terapia Fotodinâmica. 4. Organoides. 5. Morte Celular. I. T. II. Labriola, Leticia , orientador. III. Baptista, Maurício da Silva, coorientador.</p>
-------	---

"Participação da ferroptose na morte celular desencadeada pela terapia fotodinâmica com o azul de metileno em adenocarcinoma de ducto pancreático humano"

DARIA RAQUEL QUEIROZ DE ALMEIDA

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutora em Ciências obtido no Programa Ciências Biológicas (Bioquímica) - Área de Concentração: Bioquímica.

Profa. Dra. Leticia Labriola
(Orientadora e Presidente)

APROVADO(A) POR:

Profa. Dra. Ana Maria da Costa Ferreira
IQ - USP

Prof. Dr. Enrique Mario Boccardo Pierulivo
ICB - USP

Prof. Dr. Hernandes Faustino de Carvalho
IB - UNICAMP

SÃO PAULO
16 de dezembro de 2022

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Maria Nogueira e José Reinaldo

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo dom da vida e por ter me guiado durante toda essa jornada. Por Ele ser a minha fortaleza e o meu refúgio, me dando equilíbrio e me permitindo enxergar o lado bom de cada situação vivida, mesmo naquelas que me parecem demasiadamente pesadas, aquecendo o meu coração pela minha fé e me mantendo firme na busca pelos meus sonhos.

À Professora Leticia Labriola, pela confiança no meu trabalho e por ter me orientado durante essa jornada. Pela oportunidade de desenvolver esse projeto em seu laboratório e sob sua orientação. Agradeço, principalmente, por ter continuado comigo até aqui, apesar de todas as mudanças durante esse trajeto, e me ajudado sempre que solicitei. Obrigada pelas conversas, conselhos, jantares na sua casa e por todo o auxílio e compreensão, principalmente nessa reta final. Sou muito grata pelo incentivo e por me proporcionar um ambiente amigável e afetivo durante toda essa jornada, desde o mestrado. Eu levarei o seu jeito leve de olhar para a vida, sua ética e dedicação profissional comigo.

Aos meus pais, pelo amor, torcida tão calorosa, suporte emocional e apoio incondicional em todas as minhas caminhadas. Todas as etapas até aqui vencidas, os méritos desse trabalho e dos novos que seguirei são frutos dos esforços que vocês fizeram para me educar e dos ensinamentos que me deram. Obrigada por terem sempre priorizado a minha educação e, mesmo com todas as dificuldades, terem me possibilitado expandir meus horizontes e lutar contra as limitações que sempre nos foram impostas.

À minha família, pelo amor, torcida e suporte. Em especial, à minha querida irmã, Fátima, e ao meu irmão, Dassio, pelo amor, cuidado, apoio e torcida de sempre. Eu amo e sou grata a vocês.

Aos meus queridos ex-companheiros do Laboratório de Mecanismos Moleculares de Citoproteção (LMMC): Dra. Ancély Ferreira, Dr. Vinícius de Moais e Msc Gabriel Arini. Obrigada por terem me acolhido e me ajudado durante o período em que desenvolvi esse projeto e que estivemos juntos. Agradeço por toda a ajuda nos experimentos, pelas discussões científicas e, também, conversas informais. Essa interação e troca, com certeza, foi fundamental para o meu crescimento como cientista. Foi uma honra trabalhar e aprender com vocês!!

À amiga que a pós-graduação me deu e que hoje é a minha melhor amiga na vida, Layanne Cabral, por toda a força, pelo suporte emocional, orientações e conselhos científicos e pela ajuda nos experimentos. Sou infinitamente grata por sua generosidade em se disponibilizar a viajar à São Paulo e me acompanhar pessoalmente no laboratório, no momento mais difícil. Essa ajuda foi imprescindível para que eu concluísse esse trabalho. Muito obrigada.

Ao meu melhor amigo e namorado, Marcelo Victor, por todo o apoio, por vibrar comigo nas vitórias e, principalmente, por ser amor e conforto nos momentos de dificuldade. Por entender e me incentivar mesmo à distância, por torcer pelos meus sonhos tanto quanto eu mesma. Obrigada por estar comigo.

Aos meus queridos Fábio Mesquita e Daniel Veras pela amizade sincera (presentes da UERN pra minha vida), paciência e disponibilidade para me ajudarem sempre que precisei. Nestes últimos dois anos, mesmo distantes, vocês estiveram presentes me ajudando a construir esse sonho.

As minhas amigas Nayane Queiroz, Wigna Almeida e Idilvância Queiroz, por todo o amor que me fazem sentir mesmo à distância! Pelas conversas, pela leveza das conversas que me ajudaram a relaxar nos momentos de tensão que o estar “sozinha” e longe da nossa casa e dos nossos cria naturalmente. Obrigada pelas orações, amor e amizade!

Ao Prof. Dr. Maurício Baptista pela co-orientação e parceria durante o período de execução desse projeto. Agradeço, também, por ter me acolhido no seu laboratório nessa reta final e por ter me permitido integrar o seu rico time de pesquisadores nos últimos meses da parte experimental desse projeto. Por fim, agradeço por sua atenção, dicas e pela cordialidade e atenção em todas as nossas reuniões. Especialmente nessa reta final, sua orientação foi imprescindível para o êxito desse trabalho.

Ao pessoal do laboratório de processos fotoinduzidos e interfaces, do IQ-USP, pelo acolhimento tão afetuoso na etapa final desse projeto, por me permitirem participar das reuniões científicas e aprender com o grupo, pelo espaço e pelo uso dos equipamentos e outros materiais. Agraço, especialmente, à Helena, Alessandra, Divinomar, Décio e Lucas, pelo apoio técnico, ajuda com os equipamentos, discussões científicas e parceria no desenvolvimento dos experimentos. Sou muito grata a vocês.

Ao Professor Alexander Kleger, por ter me recebido para desenvolver parte do trabalho dessa tese no seu laboratório. Agradeço pelo acesso a todas as instalações, reagentes e pela oportunidade de trabalhar e aprender com um grupo de cientistas tão bem qualificados e humanos.

Ao pessoal do laboratório "*Pancreatic Development, Stem Cell Differentiation and Cancer*", especialmente os membros do "Upstairs lab", Dr. Johann Goat, Dra. Elodie Roger, Dr. Frank Arnold, Dharini Srinivasan, Lena Schütte, e Anna Härle pela recepção calorosa, pelos treinamentos, pela ajuda e orientações nos experimentos, por me auxiliarem com as questões burocráticas na Universidade. Agradeço, também, pela companhia, pelas conversas nos almoços, pelos nossos "D days" e as cervejas regadas a boa conversa e risadas. Eu levarei cada ensinamento e cada momento compartilhado com cada um de vocês para sempre.

À profa. Dra. Bettina Malnic e ao pessoal do Laboratório de Neurociência Molecular pela disponibilidade e por me permitirem utilizar o microscópio de fluorescência, equipamento que foi fundamental para o desenvolvimento desse projeto.

Aos professores Dr. Bayardo Batista Torres, Dra. Clelia Ferreira Terra, Dra. Iolanda Midea Cuccovia e Dra. Carla Columbano, por terem me proporcionado uma experiência profissional tão enriquecedora durante suas supervisões no PAE. Obrigada pelas aulas de didática e de profissionalismo. Honrada por ter tido a oportunidade de trabalhar em aprender com vocês.

Ao Instituto de Química e à USP. Ao Departamento de Bioquímica., à Secretaria de Pós-Graduação e aos funcionários e pessoal terceirizado de serviços gerais, pelo auxílio e suporte. O desenvolvimento desse projeto foi possibilitado, também, pelo trabalho de vocês.

A todos os que direta ou indiretamente estiveram comigo durante essa caminhada. Obrigada de coração!

Finalmente, agradeço à CAPES, FAPESP e CNPq pelo financiamento desse projeto e à CAPES pela concessão da bolsa, que foi fundamentais para minha manutenção nesse trabalho.

“...aprender a ver – habituar os olhos à calma, à paciência, ao deixar que as coisas se aproximem de nós; aprender a adiar o juízo, a rodear e a abarcar o caso particular de todos os lados. Este é o primeiro ensino preliminar para o espírito: não reagir imediatamente a um estímulo, mas sim controlar os instintos que põem obstáculos, que isolam...”

Friedrich Nietzsche, em “Crepúsculos dos Ídolos”

RESUMO

ALMEIDA, D.R.Q. **Participação da ferroptose na morte celular desencadeada pela terapia fotodinâmica com o azul de metileno em adenocarcinoma de ducto pancreático humano**. 2022. 126p. Tese de Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo.

O adenocarcinoma de ducto pancreático (PDAC) é a quarta causa de morte relacionada ao câncer em todo mundo na atualidade, e estudos apontam que ele ocupará a segunda posição neste *ranking* antes de 2030. Além disso, esses tumores apresentam a menor sobrevida global de cinco anos pós-diagnóstico entre todas as neoplasias, inferior a 9%. O diagnóstico em estágios avançados, devido à ausência de marcadores precisos para as fases iniciais da doença e sintomatologia ausente ou inespecífica, limita a elegibilidade dos pacientes à cirurgia ressectiva entre 15 e 20%, que é, atualmente, a única abordagem com potencial de cura para esses tumores. Adicionalmente, mesmo os pacientes com tumores confinados ao sítio primário e submetidos à cirurgia e que recebem quimioterapia adjuvante apresentam recidiva tumoral em menos de um ano. No presente trabalho, nós investigamos a capacidade da MB-PDT em ativar a ferroptose, via de morte celular regulada independente da apoptose, em diferentes linhagens de PDAC, MIAPaCa-2, Panc-1, AsPC-1 e BxPC-3, células que apresentam diferentes perfil moleculares e características fenotípicas. Além disso, foi avaliado o potencial dessa terapia combinada com diferentes quimioterápicos utilizados na clínica sobre modelos de organoides derivados de pacientes com PDAC. Os resultados aqui apresentados demonstraram que a MB-PDT é capaz de aumentar a peroxidação lipídica e ativar a ferroptose em diferentes linhagens de PDAC, especialmente em células com maior expressão basal de ACSL-4, enzima participante na inserção de lipídeos poli-insaturados nas membranas biológicas. Nesse contexto, foi identificado que a suplementação com lipídeos deuterados protegeu a linhagem BxPC-3 contra a morte induzida pela MB-PDT, de forma semelhante à ação da Fer-1, um inibidor de ferroptose. Por outro lado, identificamos que a linhagem Panc-1 apresenta resistência à ferroptose no contexto da MB-PDT, provavelmente devido ao menor conteúdo de ferro lábil intracelular, menor expressão basal de ACSL-4, altos níveis de G6PD, e a capacidade de montar uma resposta antioxidante mais eficiente, que foi capaz de protegê-la contra o aumento da peroxidação lipídica. Além da ferroptose, a MB-PDT foi capaz de ativar a necroptose, uma via de necrose regulada dependente de RIPK3 e MLKL, em duas

das quatro linhagens avaliadas, AsPC-1 e BxPC-3, além da morte celular dependente de lisossomos em MIAPaCa-2, o que indica o potencial dessa terapia em ativar múltiplos mecanismos de morte nesse tipo de tumor. Por fim, nós identificamos que a MB-PDT foi capaz de atuar sinergicamente aumentando a efetividade dos quimioterápicos gemcitabina, irinotecano, 5-fluorouracil e oxaliplatina sobre organoides derivados e amostras tumorais de pacientes com PDAC. Com base nesses dados, é possível concluir que a MB-PDT é eficiente para eliminar células de PDAC de diferentes subtipos, sendo capaz de ativar múltiplos mecanismos de morte celular simultaneamente, incluindo mecanismos não-apoptóticos, como a ferroptose e a necroptose e, por meio de sua atuação sinérgica com diferentes quimioterápicos, aumentar a susceptibilidade de organoides de PDAC à morte. Em conjunto, os dados aqui apresentados trazem evidências moleculares da ação da MB-PDT sobre o PDAC e reforçam seu potencial como adjuvante à quimioterapia, o que pode melhorar o cenário de tratamento desses tumores resistentes a vias clássicas de morte celular, diminuindo os efeitos colaterais desencadeados pelas altas doses de quimioterápicos e, assim, aumentar tanto a sobrevida dos pacientes quanto a sua qualidade de vida.

Palavras chaves: Adenocarcinoma de Ducto Pancreático; Terapia Fotodinâmica; Morte Celular, Ferroptose, Organoides.

ABSTRACT

ALMEIDA, D.R.Q. **Ferroptosis is involved in the cytotoxic effect of Photodynamic Therapy using Methylene Blue in human pancreatic ductal adenocarcinoma.** 2022. 120p. Tese de Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo.

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is the fourth leading cause of cancer-related death worldwide, and studies indicate that it will occupy the second position in this ranking before 2030. In addition, these tumors have the lowest overall five years survival rate after diagnosis among all neoplasms, less than 9%. The absence of precise markers for the early stages of the disease leads to its diagnosis in advanced stages, thus limiting the eligibility of patients for surgery to 15 to 20%. Surgery is, today, the only approach with potential to cure this cancer. Additionally, even patients with tumors confined to the primary site undergoing surgery and receiving adjuvant chemotherapy experience tumor recurrence in less than one year. The inter and intratumoral heterogeneity and the complexity of the tumor microenvironment (TME), with pronounced desmoplastic content and important immunomodulatory capacity, are key factors in the resistance of PDAC to the state-of-the-art therapeutic approaches. Most of them activate apoptosis, for which these tumors have developed evasion mechanisms. In this work, we investigated the ability of MB-PDT (a cytotoxic therapy based on the excitation of a photosensitizing molecule (Ps) that undergoes a specific sequence of reactions, inducing oxidative stress and leading to tumor cell death) to activate the ferroptosis, an apoptosis-independent regulated cell death pathway, in human PDAC cells, MIAPaCa-2, Panc-1, AsPC-1 and BxPC-3. To test the effect of this therapy in models that are closer to the tumor biology, we tested the killing capacity of MB-PDT in combination with different chemotherapeutics used in the clinic on organoid models derived from patients with PDAC. Our results showed that MB-PDT increases lipid peroxidation and activate ferroptosis in different PDAC cell lines, especially in those with higher basal expression of ACSL-4, an enzyme that participates in the insertion of polyunsaturated lipids (PUFAs) in biological membranes. Our results also showed that supplementation with deuterated lipids protected the BxPC-3 strain against MB-PDT-induced death, similarly to the action of Fer-1, a ferroptosis inhibitor. Furthermore, we showed that the Panc-1 exhibits resistance to ferroptosis in the context of MB-PDT, probably due to lower intracellular labile iron content, lower basal expression of ACSL-4, high levels of G6PD, and the ability to

assemble a more efficient antioxidant response, which was able to protect it against increased lipid peroxidation. MB-PDT was able not only to activate necroptosis, a regulated necrosis pathway dependent on RIPK3 and MLKL, in two of the four strains evaluated, AsPC-1 and BxPC-3, but also lysosome dependent cell death in MIAPaCa-2, which indicates the potential of this therapy to activate multiple mechanisms of death in this type of tumor. Additionally, we identified that MB-PDT was able to act synergistically and increase the effectiveness of the chemotherapy drugs gemcitabine, irinotecan, 5-fluorouracil and oxaliplatin on organoids derived from patients with PDAC. Based on these data, it is possible to conclude that MB-PDT display a significant capacity to eliminate PDAC cells of different subtypes, by the activation of multiple mechanisms of cell death simultaneously, including non-apoptotic ones, such as ferroptosis and necroptosis. Moreover, the possibility of using MB-PDT in combination with chemotherapy tackles two drawback of the actual treatment by being able to not only of increasing survival time of the patients but also of reducing the side effects triggered by high doses of these compounds. Altogether, the data presented here provide molecular evidence of the action of MB-PDT against PDAC and reinforce its potential as an adjuvant to chemotherapy, which may improve the treatment scenario for these tumors resistant to classical cell death pathways

Keywords: Pancreatic Duct Adenocarcinoma; Photodynamic Therapy; Cell Death, Ferroptosis, Organoids.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μg	Micrograma
μL	Microlitro
μM	Micromolar
μm	Micrometro
%	Porcentagem
$^{\circ}\text{C}$	graus Celsius
BAK	<i>BCL2 homologous antagonist/killer</i>
BAX	<i>BCL2 associated X protein</i>
BCL2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BCLXL	<i>BCL extra large</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumine</i>
Caspase	<i>Cysteine-dependent aspartate-specific proteases</i>
ciAP	cellular IAP
cm^2	Centímetros quadrados
CP	Câncer de Pâncreas
Ctrl	Controle
CDKN2A	<i>Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A</i>
DC	<i>Dendritic cell</i>
DIABLO	<i>Direct IAP-Binding Protein with Low pI</i>
DISC	<i>Death-Inducing Signaling Complex</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DTT	Ditiotreitol
ECM	<i>Extracellular Matrix</i>
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EGTA	<i>Ethylene glycol tetraacetic acid</i>
EMT	<i>Epithelial–mesenchymal transition</i>
EPM	Erro Padrão da Média
ER	<i>Endoplasmic reticulum</i>
FADD	<i>Fas-Associated Death Domain</i>
GEF	<i>guanine nucleotide exchange factor</i>
H	Hora
hCNT	<i>human concentrative nucleoside transporters</i>
HEPES	<i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i>
HER2	<i>Human epidermal growth factor receptor 2</i>
hENT	<i>Human equilibrative nucleoside transporters</i>
HIF-1	<i>Hypoxia-inducible factor 1</i>
HO	<i>Hoescht</i>
IAP	<i>Inhibitor of Apoptosis</i>

IFN	Interferon
INCA	Instituto Nacional de Câncer
IPMN	<i>Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm</i>
kDa	quiloDalton
L	Litro
LMP	<i>Lisossomal membrane permeabilization</i>
MB	<i>Methylene Blue</i>
MB-PDT	<i>Methylene Blue-Photodynamic Therapy</i>
MCN	<i>Mucinous Cystic Neoplasm</i>
MEM	<i>Eagle's Minimum Essential Medium</i>
MET	<i>Mesenchymal–epithelial transition</i>
Mg	Miligrama
Min	Minuto
mL	Mililitro
MLKL	<i>Mixed Lineage Kinase Domain-like</i>
mM	Milimolar
MOMP	<i>Mitochondrial outer membrane permeabilization</i>
mTOR	<i>Mammalian Target of Rapamycin</i>
NF- κ B	<i>Factor Nuclear kappa B</i>
ng	Nanograma
nM	Nanomolar
NSA	Necrossulfonamida
PaIN	<i>Pancreatic Intraepithelial Neoplasia</i>
PBSA	<i>Phosphate buffered saline</i>
PDO	<i>Pancreatic ductal-derived organoid</i>
PDT	<i>Photodynamic Therapy</i>
PDAC	<i>Pancreatic Ductal Adenocarcinoma</i>
PI	<i>Propidium Iodide</i>
Ps	Photosensitizer
PSCs	<i>Pancreatic Stellate Cells</i>
PVDF	<i>Polyvinylidene difluoride</i>
RIPK	<i>Receptor Interacting Protein</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
s	Segundo
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SFB	Soro Fetal Bovino
SMAC	<i>Second Mitochondria-derived Activator of Caspase</i>
TCR	<i>T-Cell Receptor</i>
TGF β	<i>Transforming growth factor beta</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF α	<i>Tumor Necrosis Factor α</i>
TNFR	<i>TNF Receptor</i>

TRADD	<i>TNFR-Associated Death Domain</i>
TRAF2	<i>TNF receptor-associated factor 2</i>
UA	Unidades Arbitrárias
WB	Western Blot

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representações esquemáticas e imagens de microscopia ótica (hematoxilina e eosina – H&E) do pâncreas normal, e dos cenários de pancreatite e progressão de PanIN1 para PDAC invasivo.....	32
Figura 2: Esquema simplificado dos principais mecanismos de ativação da via intrínseca e extrínseca da apoptose.....	36
Figura 3: Esquema representativo do mecanismo molecular da necroptose.....	38
Figura 4: Representação esquemática das vias supressoras da ferroptose.....	41
Figura 5: Resumo esquemático dos mecanismos de fotossensibilização na PDT.....	44
Figura 6: Representação da estrutura química do azul de metileno.....	45
Figura 7: Resumo geral das vias de morte celular que podem ser desencadeadas pela terapia fotodinâmica, considerando a localização intracelular do Ps.....	46
Figura 8: Diferenças na susceptibilidade de linhagens de PDAC humanas à MB-PDT.....	63
Figura 9: Diferenças nos níveis de enzimas com função redox ou no armazenamento de ferro em linhagens de PDAC em condições ótimas de crescimento.....	65
Figura 10: Níveis de LIP estão reduzidos em células de PDAC com menor propensão à ferroptose.....	66
Figura 11: A inibição da ferroptose é a principal mecanismo capaz de reduzir a morte celular induzida pela MB-PDT nas linhagens de PDAC.....	68
Figura 12: MB-PDT modula a expressão de enzimas antioxidantes em células de PDAC.....	70
Figura 13: MB-PDT induz um aumento de peroxidação lipídica em células de PDAC.....	71
Figura 14: O tratamento com lipídeos deuterados inibe a morte celular induzida por MB-PDT.....	73
Figura 15: Expressão de genes relacionados com função redox e ferroptose e sua correlação com a sobrevida de pacientes com PDAC.....	74

Figura 16: Expressão de genes relacionados com atividade anti-ferroptose e resposta antioxidante em pâncreas normal e em células transformadas dos PDAC humanos.....75

Figura 17: Combinação com MB-PDT aumenta a eficácia de quimioterápicos na indução de morte celular sobre organoides derivados de PDAC humanos.....79

SUMÁRIO

1. Introdução	29
1.1 O Adenocarcinoma de ducto pancreático (PDAC)	29
1.2 Mecanismos de morte celular	32
1.2.1 Apoptose	33
1.2.2 Necroptose	37
1.2.3 Ferroptose	39
1.3 Limitações das opções terapêuticas para o PDAC.....	41
1.4 Terapia Fotodinâmica	44
2. Objetivos	48
2.1 Objetivo geral	49
2.2 Objetivos específicos	49
3. Material e métodos	50
3.1. Linhagens celulares	51
3.2. Condições de cultivo das células em 2D.....	51
3.3. Preparo e quantificação do azul de metileno (MB)	51
3.4. Fotossensibilização e irradiação	52
3.5. Ensaio de viabilidade celular	52
3.6. Avaliação dos níveis proteicos basais ou pós-MB-PDT por western- blot.....	53
3.7. Inibição farmacológica das vias de morte	54
3.8. Quantificação LIP basal	55
3.9. Ensaio de peroxidação lipídica	56
3.10. Tratamento com lipídeos deuterados.....	57
3.11. Plaqueamento de organoides (3D) derivados de pacientes com PDAC.....	57
3.12. Tratamento dos organoides com quimioterápicos e a MB-PDT.....	58
3.13. Análise de sobrevivência global	59
3.14. Análises estatísticas	60
4. Resultados	61
4.1. Susceptibilidade de diferentes linhagens de PDAC à MB-PDT.....	62
4.2. Perfis de expressão basal de enzimas antioxidantes e de proteínas envolvidas no metabolismo de ferro em células de PDAC.....	63
4.3. Diferenças nas quantidades de ferro lábil intracelular em linhagens de PDAC	66
4.4. MB-PDT induz ferroptose em células de PDAC	66
4.5. O tratamento com MB-PDT modula a expressão de enzimas antioxidantes em linhagens de PDAC	68
4.6. MB-PDT promove aumento da peroxidação lipídica em linhagens de PDAC.....	70
4.7. Suplementação com lipídeos deuterados inibe a morte induzida por MB- PDT em BxPC-3	72
4.8. Associação entre sobrevivência global de pacientes com PDAC e o nível de expressão de proteínas envolvidas na resposta antioxidante	73
4.9. Análise de dados de RNAseq para a avaliação da expressão de mRNA codificantes de enzimas envolvidas na ferroptose em células componentes de tumores de PDAC	75

4.10. A combinação com MB-PDT melhora a eficiência de quimioterápicos no tratamento de PDACs em organoides derivados de pacientes	76
5. Discussão	80
6. Conclusão	92
Referências	94

1. INTRODUÇÃO

1.1. O Adenocarcinoma de ducto pancreático (PDAC)

O pâncreas é um órgão bifuncional, desempenhando funções endócrinas e exócrinas. As ilhotas pancreáticas (Ilhotas de Langerhans) são responsáveis pela síntese de diferentes hormônios, como a insulina e o glucagon que participam na regulação do metabolismo de carboidratos. A maior parte da massa que compõe o pâncreas, entretanto, é composta por células com função exócrina que constituem os ácinos pancreáticos, perfazendo mais de 90% da estrutura total desse órgão. Em condições homeostáticas, as células acinares produzem enzimas digestivas que são lançadas e recolhidas por uma rede de pequenos ductos que se unem e formam o ducto pancreático principal. Dele, as enzimas digestivas são, posteriormente, secretadas no duodeno onde atuam na digestão de macromoléculas, possibilitando a sua absorção (Chuin et al., 2017).

O pâncreas adulto apresenta grande plasticidade, o que é fundamental para a integridade do órgão frente a estresses internos e externos (Chuin et al., 2017; Liot et al., 2021). Por exemplo, sob condições extremas, como em quadros de pancreatites, as células acinares podem, em resposta a fatores específicos, passar por um processo denominado metaplasia acinar ductal (ADM), no qual elas sofrem mudanças morfológicas e no perfil transcricional, convertendo-se em células semelhantes a células ductais, apresentando características de células progenitoras embrionárias. Estresses persistentes, como em caso de pancreatite crônica e a simultânea ativação de oncogenes, como KRAS, essas células podem perder sua capacidade de retornar ao estado de diferenciação, como ocorre em eventos de estresse agudo. Esse conjunto de fatores e a deterioração causada por estresse crônico, cria o ambiente propício para o desenvolvimento das lesões pré-invasivas que originam o PDAC (*Pancreatic Ductal Adenocarcinoma*) (Chuin et al., 2017) (Fig. 1).

O PDAC é uma doença que apresenta um prognóstico desfavorável, com elevada incidência de quadro metastático e alta taxa de mortalidade associada (Siegel & Miller, 2020). Além disso, ele apresenta a menor sobrevida global de cinco anos pós-diagnóstico entre todas as neoplasias, inferior a 9% (Siegel e Miller 2020; Wang et al., 2021) e é predito se tornar a segunda causa de mortes relacionadas a neoplasias até 2030 (Garrido-Laguna & Hidalgo, 2015; Rahib et al., 2014; Siegel &

Miller, 2020). O diagnóstico em estágios avançados da doença, que limita a elegibilidade dos pacientes para a cirurgia ressectiva do tumor (o único tratamento com potencial curativo atualmente), e a resistência desses tumores as abordagens terapêuticas de quimioterapias e radioterapia disponíveis contribuem para a alta mortalidade associada a esses tumores (Wang et al., 2021).

O PDAC evolui a partir de lesões pré-invasivas que podem ser do tipo PanIN (*pancreatic intraepithelial neoplasia*), IPMN (*intraductal papillary mucinous neoplasm*) e MCN (*mucinous cystic neoplasm*), as quais podem se originar a partir de quadros crônicos de pancreatites (Liot et al., 2021). A lesão do tipo PanIN é a mais prevalente na biologia do desenvolvimento do PDAC e pode ser classificada em PanIN1A, PanIN1B, PanIN2 e PanIN3, de acordo com o aumento progressivo de alterações celulares, no tipo de células e na arquitetura tecidual (Hruban et al., 2008; Liot et al., 2021; Ying et al., 2016). A partir da evolução dessas lesões pode ocorrer o estabelecimento do PDAC, evento decisivo para viabilizar a ocorrência posterior de invasão e metástase tumoral (Fig. 1).

A heterogeneidade intratumoral e a complexidade do microambiente tumoral (TME, *Tumor Microenvironment*), o qual apresenta um pronunciado conteúdo desmoplásico (Fokas et al., 2014) e importante capacidade imunomodulatória, são fatores determinantes na resistência do PDAC às abordagens terapêuticas disponíveis atualmente (Grasso et al., 2017; Koikawa et al., 2021; Samulitis et al., 2015). A resistência desses tumores a vias clássicas de morte celular está também relacionada ao largo espectro de mutações genéticas observado nos PDACs e pela alteração da intrincada rede de sinalização controlada pelos produtos desses genes.

Como representado na figura 1, a carcinogênese do PDAC é um processo que ocorre em múltiplas etapas e é o resultado de um acúmulo de diferentes mutações genéticas ao longo do tempo. São encontrados, em média, 63 genes mutados nos tumores de PDAC, dentre os quais, KRAS (*v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*), CDKN2A (*cyclin-dependent kinase inhibitor 2A - CDKN2A/ p16/ INK4A*), TP53 (*tumor protein 53*) e SMAD4 (*SMAD Family member 4*) representam os quatro mais prevalentes.

Mais de 95% dos adenocarcinomas de ducto pancreático apresentam mutações em KRAS, que é uma das primeiras mutações na biologia evolutiva desses tumores (Wang et al., 2021). Assim como outros membros da família Ras, K-Ras é uma proteína com capacidade de interação com nucleotídeos de guanina e de

transduzir, por meio da sua atividade GTPásica e alternância entre os estados ativados (ligado à GTP) e desativados (associado à GDP), sinais específicos do meio extracelular para o núcleo das células, controlando, por meio deles, processos relacionados ao crescimento e a proliferação celular. Nesses tumores pancreáticos mutantes, K-Ras encontra-se constitutivamente ativa e, portanto, participando na sinalização para crescimento e proliferação constantes dessas células (Campbell et al., 1998; Malumbres & Barbacid, 2003; S. Wang et al., 2021).

Além de KRAS, genes supressores de tumores, como TP53, CDKN2A e SMAD4 encontram-se mutados em 50, 80 e 55% dos casos de PDAC, respectivamente. A identificação dessas alterações genéticas, o estudo das características biológicas e o entendimento sobre a composição desses tumores, enquanto microambientes patológicos complexos, os quais apresentam diferentes elementos celulares, além das células tumorais: fibroblastos (CAFs – *Cancer-Associated Fibroblasts*), células estreladas (PSCs, *Pancreatic Stellate Cells*), macrófagos (TAMs, *Tumor Associated Macrophages*), e outras células do sistema imune, e componentes não celulares (elementos de matriz extracelular, fatores de crescimento e vasos sanguíneos, por exemplo), são importantes fatores a serem considerados na busca pelo desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas (Liot et al., 2021).

Nas últimas décadas, diversos estudos de análises de programas transcricionais de diferentes amostras de PDAC para identificação de subtipos tumorais, a fim de elucidar padrões de assinaturas genéticas e possibilitar prognósticos e tratamentos mais eficazes em um padrão direcionado a subtipos-específicos, têm sido conduzidos (Bailey et al., 2016; Chan-Seng-Yue et al., 2020; Collisson et al., 2011; Dijk et al., 2020; Flowers et al., 2021; Maurer et al., 2019; Moffitt et al., 2015; Wartenberg et al., 2018).

Dessas abordagens, é consensual a existência de, pelo menos, dois subtipos de PDAC: “*classical-like*”, apresentando alta expressão de genes epiteliais, de adesão e marcadores de diferenciação de células epiteliais (GATA6, *GATA Binding Protein 6*, principalmente). Esse subtipo é associado a um melhor prognóstico dos pacientes. A segunda assinatura genética identificada refere-se ao subtipo classificado como “*basal-like*”, menos diferenciado, com maior expressão de marcadores de EMT (*epithelial-mesenchymal transition*) e com pior prognóstico dos pacientes (Xu et al., 2021).

Alguns fatores estão associados à resistência dos tumores pancreáticos aos tratamentos disponíveis atualmente. Além dessa grande heterogeneidade tumoral, com os diferentes subtipos apresentando resistências distintas a terapias e o diagnóstico em estados avançados da doença, a capacidade de se evadirem das vias clássicas de morte celular está entre os principais desafios para o estabelecimento de novas alternativas terapêuticas mais abrangentes e efetivas.

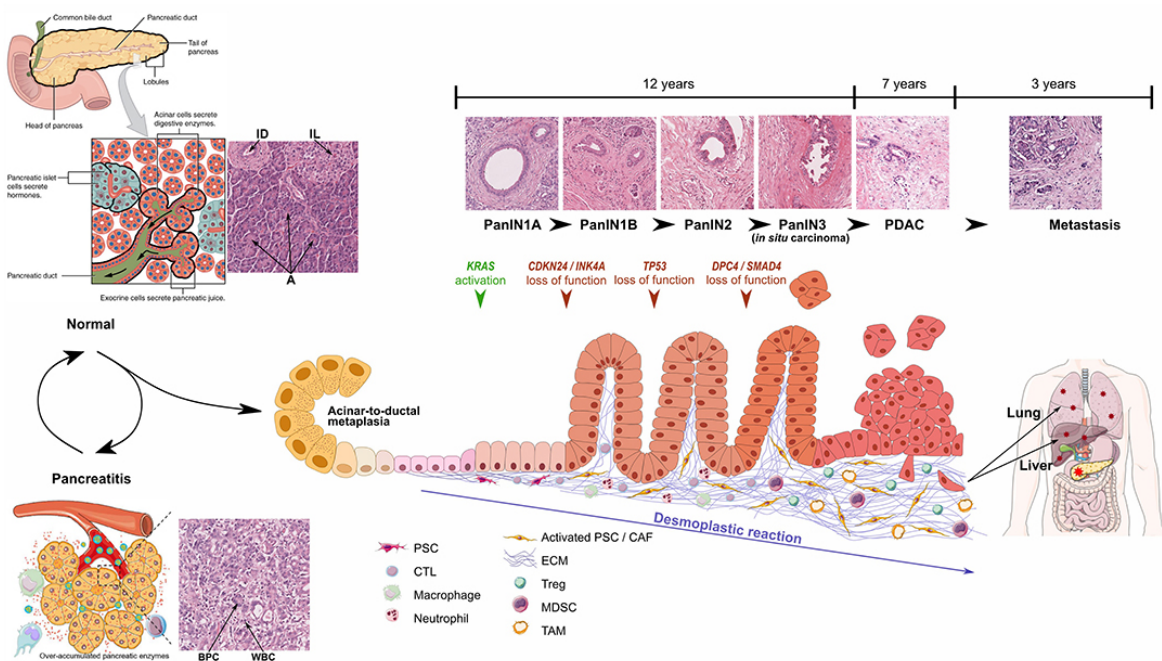


Figura 1: Representações esquemáticas e imagens de microscopia ótica (hematoxilina e eosina – H&E) do pâncreas normal, e dos cenários de pancreatite e progressão de PanIN1 para PDAC invasivo. Representação esquemática e corte histológico de uma secção de um pâncreas normal, mostrando elementos constituintes e seus padrões teciduais (esquerda e superior do painel); Esquema e histologia de um quadro de pancreatite (esquerda e inferior do painel) e esquema ilustrativo do desenvolvimento progressivo do estroma, com os principais elementos, celulares ou de matriz, associando as principais mutações identificadas em cada etapa com as respectivas histologias identificadas (direita, superior e inferior do painel). ID, Ducto Inter-lobular; IL, Ilhota de Langerhans; A, Ácino; BPC, Células Pancreáticas Benignas; WBC, Glóbulos Brancos. (Liot et al., 2021).

1.2. Mecanismos de morte celular

A morte celular é entendida como a degeneração das funções celulares vitais, como a capacidade de síntese de ATP ou de manutenção da homeostase redox, que culminam com a perda da integridade, caracterizada pela ruptura e fragmentação das membranas celulares. Ela desempenha papel fundamental no desenvolvimento dos organismos (especialmente os multicelulares), tanto em contextos fisiológicos, quanto

em cenários patológicos. De acordo com o *Nomenclature Committee on Cell Death* 2018, os mecanismos de morte celular podem ser classificados em dois grandes grupos: morte celular acidental (ACD, *accidental cell death*) ou morte celular regulada (RCD, *regulated cell death*) (Galluzzi et al., 2018).

A morte celular acidental é uma morte catastrófica, instantânea e incontrolável, que ocorre em decorrência da exposição de uma célula a condições de alto estresse, o qual pode ser de natureza física, química ou mecânica. Em contrapartida, a morte celular regulada apresenta um conjunto de mecanismos dependentes de maquinaria molecular específica, sendo passível de modulação por intervenção farmacológica ou estratégias genéticas (Galluzzi et al., 2018).

Ao contrário das ACDs, as RCDs podem ser iniciadas independentemente de perturbações no meio extracelular, perfazendo um importante componente para diferentes eventos, como a renovação tecidual, o desenvolvimento de organismos e a defesa contra diferentes doenças. As RCDs que respondem autonomamente também são entendidas como vias de morte celular programadas. Essas vias de morte são importantes, por exemplo, para a eliminação de células com acúmulo de mutações genéticas (Galluzzi et al., 2018; Vandenabeele et al., 2010). Considerando esse papel central das RCDs na homeostase dos organismos, é razoável considerar que exista uma relação entre disfunções nas maquinarias moleculares envolvidas nessas vias de morte e o desenvolvimento de doenças como o câncer (Delbridge et al., 2012; Hanahan, 2022).

A apoptose foi a primeira RCD conhecida, e é o mecanismo melhor entendido até o presente (Galluzzi et al., 2018; Peter et al., 1997). Entretanto, várias outras vias de RCD são conhecidas atualmente. Morte celular dependente de lisossomo (LDCD), necroptose e ferroptose são alguns exemplos (Degterev et al., 2005; Dixon et al., 2012; Galluzzi et al., 2018). A seguir, serão discutidos brevemente os principais mecanismos implicados na condução dessas vias de morte, considerando-se suas implicações no contexto no PDAC.

1.2.1. Apoptose

A apoptose foi primeiro cunhada em 1972 (Kerr et al., 1972). Ela é um mecanismo de morte celular regulada que ocorre em uma sequência de eventos ordenados, sendo ativada pelas células em resposta a alterações irreversíveis em seus componentes ou na sua arquitetura. Essa via de morte prepara células

danificadas ou disfuncionais para serem eliminadas em um padrão direcionado para o seu reconhecimento por fagócitos, evitando respostas imunes inflamatórias indesejadas (Elmore, 2007; Fulda & Debatin, 2006; Obeng, 2021).

A morte celular apoptótica pode ser desencadeada por duas vias: uma que é iniciada por uma rede de transdução de sinais, via ativação de receptores de morte específicos presentes na membrana plasmática das células, a partir de sinalizadores extracelulares, denominada via extrínseca; a segunda, denominada via intrínseca, é iniciada a partir de alterações intracelulares, que podem ser de diferentes tipos: desbalanço redox, acúmulo de danos no DNA, problemas na replicação ou em alguma das fases da divisão celular, estresse de retículo endoplasmático ou alterações na integridade mitocondrial (Galluzzi et al., 2018).

Ambas as vias, intrínseca e extrínseca, culminam com a ativação de um grupo de enzimas denominadas caspases (Fig. 2). As caspases são cisteíno-proteases com capacidade de clivar proteínas em resíduos de aspartato, embora diferentes caspases apresentem padrões distintos de reconhecimento de resíduos de aminoácidos vizinhos a estes. Elas são pró-enzimas que, uma vez clivadas, se ativam e atuam clivando diferentes substratos proteicos, sendo os executores finais da apoptose. Atualmente, são conhecidas, pelo menos, 18 tipos de caspases. Elas são divididas em caspases ativadoras (-2, -8, -9, -10) e caspases executoras (-3, -6 e -7). Além das caspases, a família de proteínas *B-cell lymphoma 2* (BCL2), composta por proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-x, Bcl-w, Bf-1, Bcl-XL, B-XS, Bcl-w, BAG) e pró-apoptóticas (Bak, Bcl-10, Bax, Bad, Bid, Bim, Bik, Hr, por exemplo) é importantes reguladora dessa via de morte. Essas duas famílias de proteínas são evolutivamente bem conservadas (Elmore, 2007; Fulda & Debatin, 2006; Obeng, 2021).

A via intrínseca da apoptose envolve uma série de alterações que culminam com o desbalanço entre proteínas anti e pró-apoptóticas, onde estas últimas estão em maior quantidade, e induzem a permeabilização da membrana mitocondrial externa (MOMP). Esse rompimento da integridade desse sistema membranar causa a perda do potencial de membrana da mitocôndria e possibilita a liberação de proteínas pro-apoptóticas, citocromo c, Smac/DIABLO e na serina protease HtrA2/Omi para o citoplasma. No citosol, o citocromo c interage com (e ativa) Apaf-1 e pró-caspase-9, formando uma plataforma denominada “apoptossomo”. Compondo o apoptossomo, pró-caspase-9 é ativada caspase-9 e atua na clivagem de proteínas, ampliando o sinal de apoptose. Smac/DIABLO e HtrA2/Omi, por sua vez, podem atuar inibindo as IAPs

(*inhibitors of apoptosis proteins*), regulando positivamente essa via de morte (Elmore, 2007; Obeng, 2021) (Fig. 2).

O retículo endoplasmático está envolvido com processos de síntese, modificação e enovelamento de proteínas. Problemas na maquinaria celular responsável por esses eventos levam ao acúmulo de proteínas mal dobradas nessa organela e ativam a chamada resposta a proteínas mal dobradas (UPR). Por uma intrincada rede de sinalização que se inicia com a ativação de ATF6, PERK e/ou IRE1 α , a UPR induz, entre outros eventos, um desbalanço das proteínas regulatórias da apoptose, favorecendo a sinalização pró-morte. Isso ocorre porque, em última instância, a UPR leva ao aumento da expressão de Bim (pró-apoptótica) e diminuição de Bcl2 (anti-apoptótica), via CHOP. Além disso, pela ativação de JNK, ocorre um aumento da fosforilação dessas proteínas anti e pró-apotóticas, favorecendo a ativação da apoptose (Obeng, 2021).

A via extrínseca da apoptose é iniciada pela ativação de receptores de morte transmembranares presentes na membrana plasmática das células após sua interação com ligantes específicos. FasL/FasR, TNF- α /TNFR1 e TRAIL/TRAIL-R são exemplos bem caracterizados de iniciadores da via extrínseca da apoptose. A interação entre o ligante e seu receptor promove a formação de trímeros do receptor e interação de seus domínios de morte citoplasmáticos, que recrutam proteínas adaptadoras citoplasmáticas que exibem domínios de morte correspondentes, TRADD, FADD, formando um complexo indutor de morte denominado DISC. Após a associação de outras proteínas, que incluem pró-caspase-8, RIPK1, TRAF2 e cIPAs, e internalização do receptor nesse complexo, ocorre a clivagem e consequente ativação de caspase-8, que cliva e ativa caspase-3 efetora, levando a apoptose (Duprez et al., 2009; Elmore, 2007). A via de morte apoptótica pode ser inibida por estratégias moleculares ou pela utilização de fármacos, como z-VAD, um inibidor de pan-caspases.

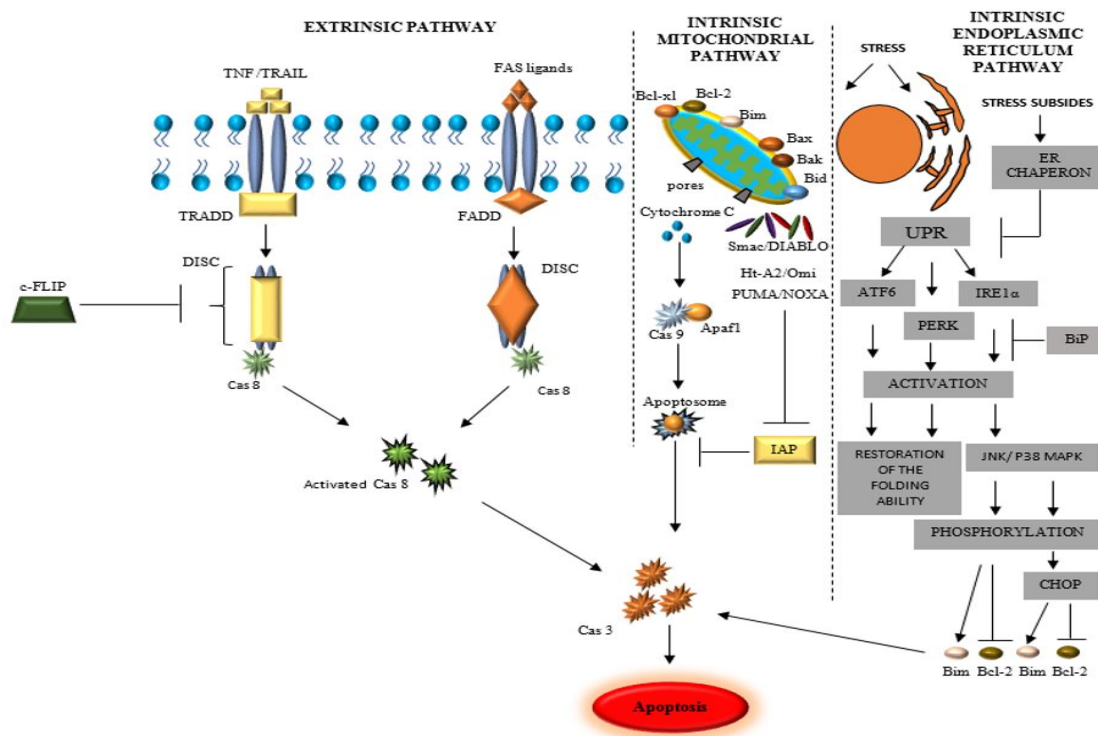


Figura 2: Esquema simplificado dos principais mecanismos de ativação da via intrínseca e extrínseca da apoptose. A via extrínseca da apoptose é iniciada pela ativação de receptores de morte TNFR/TRAILR por TNF/TRAIL ou FAS com FASR na membrana plasmática. Esse evento promove o recrutamento de uma série de proteínas adaptadoras (aqui suprimidas por questões didáticas) e formação do complexo DISC, que inclui pró-caspase-8, a qual é clivada e se ativa. Caspase-8 ativa caspase-3 que leva à apoptose (Obeng, 2021).

Embora diferentes drogas que têm como alvo a família BCL-2 (por exemplo, ABT-199 e ABT-263) estejam sendo testadas em ensaios clínicos (Montero & Letai, 2018), os pacientes com PDAC apresentam um desequilíbrio na expressão de membros da família BCL-2, o que torna menos efetiva a atuação dessas drogas. A expressão de BCL-2 é geralmente baixa em tumores primários de PDAC (Campani et al., 2001; Song et al., 2017), enquanto BCL-2L1 e MCL1, ambas apresentando função anti-apoptótica, são encontradas na maioria dos pacientes com PDAC invasivo (Krajewska et al., 1996). Nesse cenário onde diferentes artifícios moleculares antiapoptóticos são desenvolvidos pelas células tumorais de PDAC, são necessárias abordagens que atinjam múltiplos membros antiapoptóticos da família BCL-2 simultaneamente para induzir a apoptose de forma otimizada nesses tumores. Nesse sentido, evitar essas terapias combinadas e que aumentam as chances de desenvolvimento de efeitos adversos críticos para os pacientes é um desafio. Dessa forma, é razoável considerar que uma terapia mais efetiva para esses tumores deveria ser capaz de ativar diferentes mecanismos de morte celular, principalmente

independentes da apoptose, o que aumentaria a possibilidade de sucesso terapêutico para os pacientes.

1.2.2. Necroptose

A descoberta de que o TNF é capaz de desencadear, além da apoptose, uma morte celular com características de necrose, em 1980, abriu caminho para uma série de investigações que, nas décadas seguintes, mostrou que essa morte necrótica ocorria em contextos onde se tinha caspases inibidas (Degterev et al., 2005; Weinlich et al., 2017). Esses achados, juntos à descoberta da função regulatória sobre processos de morte celular de uma família de proteínas da família RIPK (*receptor-interacting serine/threonine protein kinases*), e a identificação de necrostatina-1 (Nec-1) como inibidor da atividade cinase de RIPK1, possibilitaram a descoberta de uma via de necrose regulada, denominada necroptose.

A morte por necroptose pode ser exemplificada pela ativação do receptor de morte TNFR1. Geralmente, o TNF ativa genes pró-inflamatórios através da sinalização de NF- κ B, induzindo uma resposta inflamatória. Após a ligação do TNF ao seu receptor, é formado o complexo I. Esse complexo é uma plataforma de proteínas que inclui o domínio de morte associada a TNFR1 (TRADD), fator 2 associado ao receptor de TNF (TRAF2), RIPK1, inibidores celulares de apoptose (cIAP1 ou cIAP2), e o complexo de montagem da cadeia de ubiquitina linear (LUBAC). O complexo I é estabilizado pela ação de cIAPs e LUBAC, que promovem a poliubiquitinação de RIPK1, e forma uma plataforma da maquinaria de ativação da via do NF- κ B e da proteína cinase ativada por mitógeno (MAPK). Nesse contexto de ativação de NF- κ B, há um aumento na expressão de genes relacionados à sobrevivência, proliferação e produção de citocinas pró-inflamatórias (Seo et al., 2021; Weinlich et al., 2017).

No entanto, em um cenário de desestabilização do complexo I, em que haja a inibição da ubiquitinação de RIPK1, ou a deubiquitinação dessa cinase, a sinalização de TNF pode criar dois cenários: indução de apoptose ou de necroptose. O primeiro deles envolve a formação de um complexo apoptótico citosólico (complexo IIa), incluindo a proteína com domínio de morte associada ao Fas (FADD) e dímeros de caspase-8. Uma vez ativa nesse complexo, caspase-8 cliva diferentes substratos, como as caspases efetoras -3 e -7 e BID, ativando-os e induzindo apoptose.

No segundo cenário, no qual caspase-8 encontra-se inibida, RIPK1 deubiquitinada pode recrutar e interagir com RIPK3, via seus motivos de interação de

homologia RIP homotípica (RHIM). Essa interação promove a auto e transfosforilação dessas duas cinases, formando o complexo denominado necrossomo. Nesse complexo, MLKL (*mixed-lineage kinase domain-like protein*) é fosforilada por RIPK3, formando oligômeros que vão atuar desestabilizando a membrana plasmática, levando a célula a morte por necroptose (Seo et al., 2021) (Fig. 3).

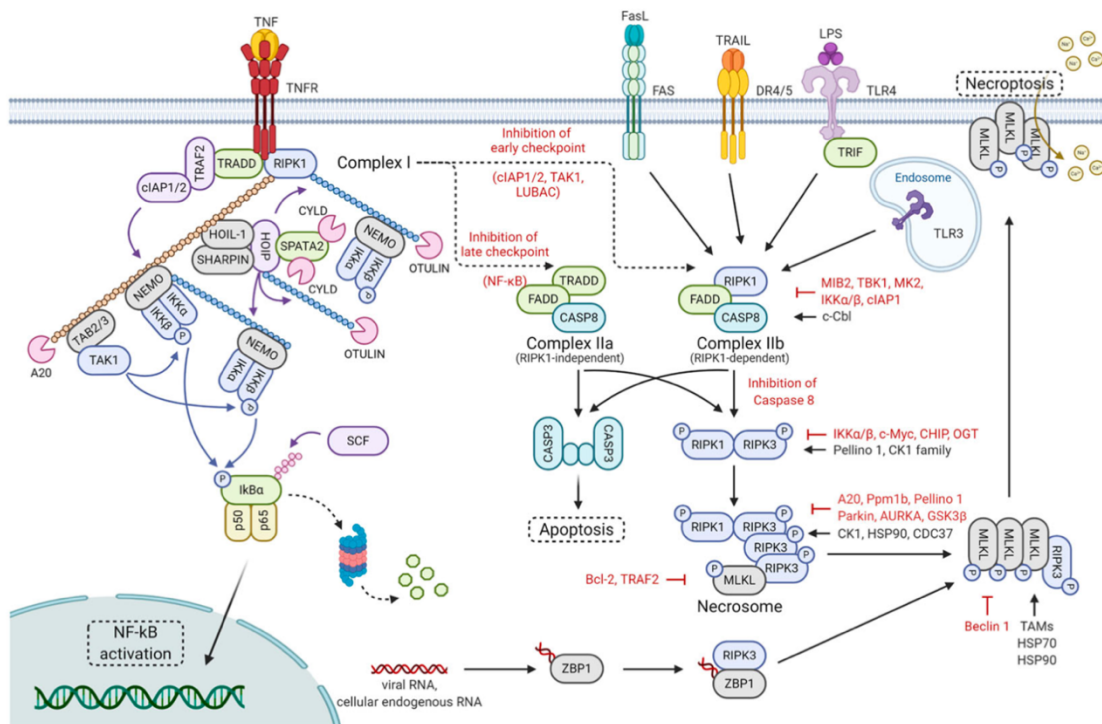


Figura 3: Esquema representativo do mecanismo molecular da necroptose. A ligação do TNF aos seu receptor induz a formação do complexo I, que é composto por TRADD, TRAF2, cIAP1/2, RIPK1, TAK1, LUBAC e o complexo IKK. A formação desse complexo resulta na ativação da via de sinalização NF-κB. Quando a síntese da proteína alvo de NF-κB está inibida pelo tratamento com cicloheximida, o complexo IIa, formado por TRADD, FADD e caspase-8, é ativado. A caspase-8, estando ativa no complexo IIa, induz apoptose através da clivagem de moléculas à jusante. A inibição da ubiquitinação da RIPK1 ou a inibição da fosforilação induzida por citotoxicidade, as etapas iniciais da sinalização do TNF, resulta na indução do complexo IIb. Esse último complexo é formado por RIPK1, FADD e caspase-8. A ativação do complexo IIb, finalmente, resulta na indução da apoptose por meio da ativação de caspase-8. Em cenários onde caspase-8 é inibida, RIPK1 e RIPK3 formam complexos, por meio de interações homotípicas com RHIM, denominados necrossomos, resultando na ativação de MLKL via fosforilação. MLKL fosforilada se oligomeriza e migra para a membrana plasmática, formando poros e induzindo sua ruptura, ou regulando o fluxo iônico. Ligantes de morte, incluindo FasL e TRAIL, iniciam a necroptose por meio da indução da formação do complexo necrossômico. LPS, poli(I:C), RNA de fita dupla e RNA viral ativam a necroptose pela formação do complexo necrossômico mediado por TRIF. A ligação de RNA viral ou RNA endógeno celular a ZBP1 resulta em necroptose independente de RIPK1 através do complexo ZBP1-RIPK3. Esses fatores que participam da necroptose são estritamente regulados por ubiquitinação, fosforilação, glicosilação e interações proteína-proteína (Seo et al., 2021).

1.2.3. Ferroptose

Como relatado até aqui, o contexto celular é determinante sobre o destino final de uma célula. A capacidade de lidar com estresse oxidativo representa um eixo crítico nessa determinação, uma vez que quase todos os organismos vivos dependem de processos metabólicos redox e apresentam o oxigênio molecular como último aceptor de elétrons, processos que envolvem a formação de radicais e outras espécies oxidantes. Um dos problemas causados pelo desbalanço redox é a modificação química de lipídeos constituintes das membranas celulares. Em especial, a peroxidação lipídica exacerbada tem sido associada a uma via de morte celular regulada recentemente descoberta denominada ferroptose (Dixon et al., 2012; Jiang et al., 2021).

O termo ferroptose foi aplicado pela primeira vez em 2012, em um estudo conduzido por Dixon e colaboradores, no qual os autores identificaram, a partir de um *screening* de drogas para tratamento de câncer, uma pequena molécula com citotoxicidade seletiva para células tumorais com mutação em KRAS, a erastina. A ferroptose foi identificada como uma via de morte que é dependente de ferro, mas não de outros íons bivalentes, fato de onde derivou a inspiração para a denominação 'ferroptose'. Além disso, os autores identificaram um potente inibidor dessa via de morte, a ferrostatina-1 (Fer-1) (Dixon et al., 2012). A via de sinalização da ferroptose é ativada quando há um desbalanço nas células envolvendo os metabolismos primários de grupos tióis, lipídeos e ferro, onde ocorra uma exacerbada peroxidação lipídica dependente de ferro (Dixon et al., 2012).

Desde a sua descoberta, a ferroptose tem atraído a atenção de diversos grupos de pesquisas tanto para o entendimento de seus mecanismos controladores, quanto sobre o seu possível envolvimento em diversos contextos, de desenvolvimento normal de organismos multicelulares e/ou patológicos. O primeiro mecanismo protetivo contra ferroptose identificado foi o eixo "sistema x_c^- -GSH-GPX4". Como descrito na figura 4, o sistema x_c^- , um complexo proteico transmembranar que atua como antiporte de glutamato e cistina, fornece cisteínas para o meio intracelular. Essas moléculas de cisteínas são utilizadas como substrato para a síntese da GSH utilizada como co-fator pela glutatona peroxidase 4. A erastina é uma pequena molécula que se liga e inibe o sistema x_c^- , induzindo ferroptose em diferentes modelos (Dixon et al., 2012; Jiang et al., 2021).

A glutathiona reduzida, GSH (do inglês, *reduced glutathione*), além de ser o mais abundante redutor em células de mamíferos, é um importante co-fator para a atuação de diversas enzimas antioxidantes, incluindo a família das glutathiona peroxidases, GPXs (*glutathione peroxidases*) (Jiang et al., 2021). A GPX4 (*glutathione peroxidase 4*) é a principal enzima envolvida na catálise da redução de hidroperóxidos de fosfolipídeos (PLOOHs). Para a redução desses hidroperóxidos aos seus álcoois correspondentes pela GPX4, é indispensável a participação de um resíduo de selenocisteína na estrutura da enzima e um par de elétrons que, na maioria das vezes, é cedido pelo cofator, a GSH. RSL-3 é uma molécula capaz de inibir a atividade da GPX4 e induzir ferroptose.

Embora o eixo sistema γ -GSH-GPX seja considerado o principal regulador da ferroptose, outros mecanismos independentes de GPX4 têm sido descobertos como protetores contra a ferroptose em diferentes cenários (Bersuker et al., 2019; Doll et al., 2019; Kraft et al., 2020).

A atividade anti-ferroptose de FSP1 (também denominada AIFM2, do inglês, *flavoprotein apoptosis-inducing factor mitochondria-associated 2*), por exemplo, tem sido associada à uma capacidade de suprimir a peroxidação lipídica via redução da coenzimaQ10, também denominada ubiquinona (ou seu produto parcialmente oxidado semi-hidroquinona), a ubiquinol. O ubiquinol pode reduzir diretamente os radicais lipídicos e diminuir o processo de auto-oxidação lipídica, ou, ainda, indiretamente, regenerar o radical α -tocoferil oxidado (vitamina E), um potente antioxidante, que minimiza esse processo oxidativo de lipídeos (Bersuker et al., 2019; Doll et al., 2019) (Figura 4).

A GCH1 (do inglês, GTP cyclohydrolase 1) também tem sido associada à resistência a morte por ferroptose, através de seus produtos metabólicos tetrahydrobiopterina (BH4) e dihydrobiopterina (BH2). BH4 confere proteção de fosfolipídios contendo duas caudas de PUFAs contra a degradação oxidativa, provavelmente envolvendo um mecanismo duplo: agindo como um antioxidante de captura direta de radicais e estando envolvido na síntese de ubiquinona (Kraft et al., 2020).

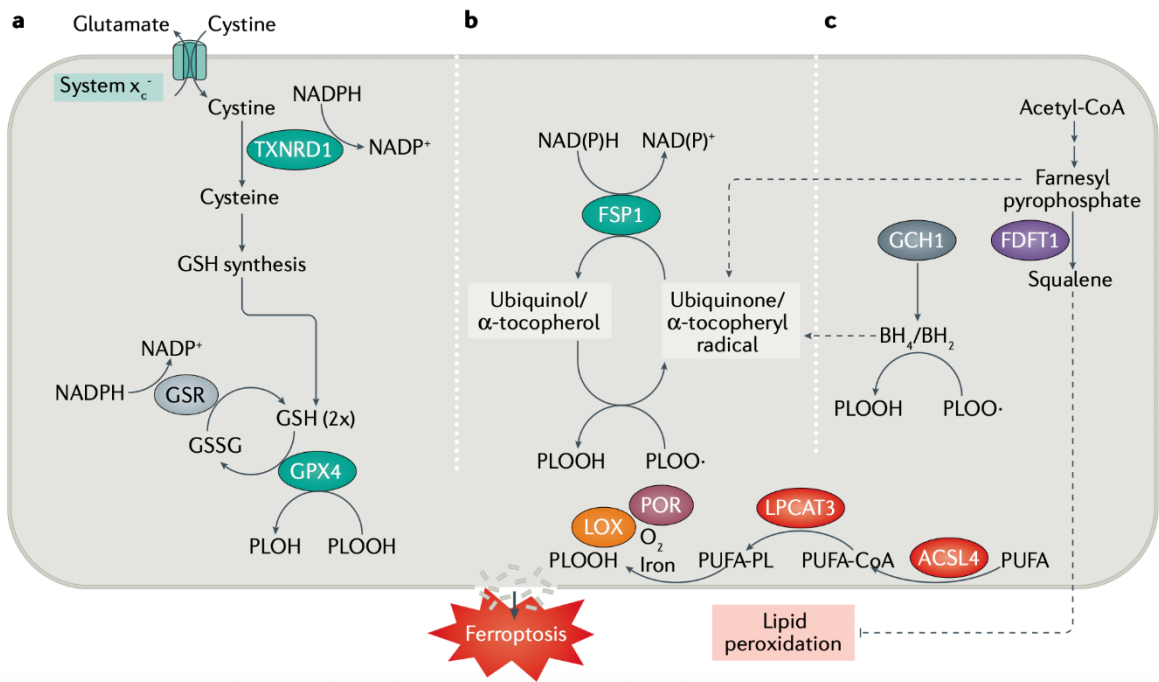


Figura 4: Representação esquemática das vias supressoras da ferroptose. O eixo canônico de controle da ferroptose envolve a captação de cistina através do antiporte cistina-glutamato sistema x_c^- , seguido pela redução da cistina em cisteína, pela glutatona (GSH) e/ou tioredoxina redutase 1 (TXNRD1) e a biossíntese de GSH. GSH é um redutor potente e um cofator para a glutatona peroxidase 4 (GPX4), promovendo assim a redução mediada por GPX4 de quaisquer hidroperóxidos de fosfolípidios (PLOOHs) gerados na célula para produzir os álcoois correspondentes (PLOHs). A reciclagem de glutatona oxidada (GSSG) é conseguida via glutatona-dissulfeto redutase (GSR) usando elétrons fornecidos por NADPH/H⁺. b | Duas telas genéticas independentes revelaram que o sistema de proteína supressora de ferroptose 1 (FSP1)-ubiquinona protege completamente as células contra a ferroptose induzida por inibição farmacológica ou deleção genética de GPX4. O FSP1 previne a peroxidação lipídica e a ferroptose associada por meio da redução da ubiquinona a ubiquinol (que, por sua vez, pode reduzir diretamente os radicais lipídicos para encerrar a autooxidação lipídica) e/ou por meio da regeneração do radical α -tocoferil oxidado (vitamina E) para sua forma não radical, que funciona como o mais poderoso antioxidante natural de quebra de cadeia em lípidios. c | Mecanismos alternativos de supressão da ferroptose incluem inibição da peroxidação lipídica mediada por squaleno e di/tetrahidrobiopterina (BH₂/BH₄), provavelmente agindo como antioxidantes endógenos de captura de radicais. ACSL4, membro da família de cadeia longa de acil-CoA sintetase 4; FDFT1, farnesil-difosfato farnesiltransferase 1; GCH1, GTP ciclo-hidrolase 1; LOX, lipoxigenase; LPCAT3, lisofosfatidilcolina aciltransferase 3; PLOO•, radical peroxil; POR, citocromo P450 oxidorreductase; PUFA, ácido graxo poliinsaturado; PUFA-PL, fosfolípido contendo cadeia de ácidos graxos poli-insaturados (Jiang et al., 2021).

1.3. Limitações das opções terapêuticas para o PDAC

Atualmente, a única abordagem terapêutica com potencial curativo para o PDAC é a ressecção tumoral. No entanto, por ausência de marcadores efetivos para o diagnóstico da doença nas suas fases iniciais, assim como a falta de uma sintomatologia específica, a maioria dos pacientes é diagnosticada tardiamente com PDAC, impossibilitando, muitas vezes, a cirurgia ressectiva. Dessa forma, a maioria dos pacientes é diagnosticada em uma fase avançada da doença e desenvolvimento

de metástases (Ansari et al., 2015). Além disso, a maioria dos pacientes com PDAC pode apresentar recorrência local e sistêmica após a cirurgia. A utilização de quimioterapias adjuvantes é usada rotineiramente para prevenir a recorrência precoce do tumor (Principe et al., 2021).

No final da década de 1990, a gemcitabina começou a ser usada como primeira linha de tratamento para o PDAC metastático (Chen et al., 2021). Mais recentemente, duas terapias combinadas, incluindo o regime de FOLFIRINOX (uma combinação de drogas, incluindo ácido folínico, fluorouracil, irinotecano e oxaliplatina) e a combinação de nab-paclitaxel (*nanoparticle albumin-bound paclitaxel*) com gemcitabina, produziram impactos positivos, embora ainda modestos, na sobrevida dos pacientes em relação à monoterapia mediada por gencitabina em pacientes com PDAC metastático (Chen et al., 2021; Hajatdoost et al., 2018).

Grande parte dos quimioterápicos que têm sido classicamente utilizados na clínica para o tratamento do PDAC interferem na síntese do DNA, como são os casos de gemcitabina, fluorouracil e oxaliplatina. De forma semelhante, a maioria dos demais quimioterápicos atua em mecanismos que culminam com a ativação da apoptose. Entretanto, as células de PDAC são intrinsecamente resistentes ou desenvolvem múltiplos mecanismos moleculares que lhes conferem resistência ao tratamento com indutores dessa via de morte, o que reflete na ineficiência desses tratamentos (Chen et al., 2021; Modi et al., 2016; Principe et al., 2021).

1.4. Modelos pré-clínicos, *in vitro*, para o estudo do PDAC: Cultura em monocamada (2D) e organoides (3D)

Comparativamente a outros modelos pré-clínicos, a cultura celular em monocamada (2D) representa uma forma mais simples, econômica e rápida para se estudar diferentes parâmetros relacionados ao PDAC, como a capacidade de invasão e metástase desses tumores, facilmente acessadas por ensaios de migração celular, por exemplo. Utilizando essa abordagem, diferentes grupos têm contribuído com o entendimento para a caracterização do processamento desses eventos no PDAC (C. Gao et al., 2021; Luo et al., 2021);

Além disso, a possibilidade de realização de co-cultura das células tumorais e outras células componentes do microambiente tumoral (TME), em 2D, também oferece um importante meio para se estudar a influência da comunicação entre as células tumorais e outros componentes do TME (Gao et al., 2021). O conhecimento

gerado a partir desses estudos utilizando cultura celular em 2D, quando combinados com outras abordagens, viabilizam uma melhor caracterização desses tumores.

O cultivo de linhagens tumorais comerciais por longos períodos em monocamada, entretanto, pode criar alguns limitantes na utilização desses modelos. Dentre outras razões, o fato de que essas células são retiradas do seu tecido originário e cultivadas em superfícies artificiais planas (recipientes plásticos específicos) pode contribuir para uma mudança na sinalização dessas células. Isso se dá, em parte, devido a redução do contato com outros elementos celulares, que passa a ocorrer apenas em alguns de seus limites laterais, mudanças no seu padrão de divisão, achatamento morfológico e perda progressiva do seu fenótipo diferenciado (Kapałczyńska et al., 2018). Essas modificações são, em parte, uma consequência das várias etapas de seleção desse tipo de cultivo *in vitro*.

Além disso, as ferramentas tecnológicas de sequenciamento em célula única têm possibilitado a identificação de um alto grau de heterogeneidade nas linhagens celulares de PDAC comumente utilizadas (Monberg et al., 2021). Esse caráter de heterogeneidade recentemente identificado dentro de uma mesma linhagem pode estar associado a variações nas diferentes condições de cultivo e peculiaridades das culturas nos diferentes laboratórios.

Considerando as limitações da cultura em 2D, modelos mais complexos, como o cultivo dessas células em estruturas tridimensionais, e com maior capacidade de mimetizar o microambiente tumoral *in vivo* têm sido desenvolvidos e aprimorados. Dentre os sistemas de cultivo celular em 3D para a pesquisa com PDAC, a utilização de organoides derivados de pacientes (PDOs – *patient-derived pancreatic cancer organoids*) tem emergido como uma metodologia capaz de recapitular características histológicas e as alterações genéticas comumente encontradas nesse tipo de tumores (Beutel et al., 2021; Driehuis et al., 2019).

A utilização de organoides derivados de PDAC tem sido identificada como um método viável de modelagem da doença e que tem permitido a triagem, em pequena escala, de drogas já aprovadas para uso clínico. Essa abordagem fornece um meio eficiente para a predição, *in vitro*, da resposta desses tumores à diferentes drogas, possibilitando o desenho personalizado de tratamentos para os pacientes de PDAC (Beutel et al., 2021; Frappart et al., 2020).

Uma vez que são utilizados em paralelo à rotina clínica diária e funcionam como uma ferramenta de auxílio direto na determinação de regimes quimioterápicos mais

efetivos em medicina personalizada, é plausível imaginar que os PDOs podem ser utilizados na pesquisa científica básica como modelos pré-clínicos mais sofisticados

para viabilizar a condução de testes mais eficazes para determinar a eficiência de novos tratamentos para o adenocarcinoma de ducto pancreático.

1.5. Terapia Fotodinâmica

Diante do cenário de limitações dos atuais tratamentos disponíveis para o PDAC, a Terapia Fotodinâmica (PDT, *Photodynamic Therapy*) aparece como uma alternativa promissora para o tratamento desta doença. A PDT se baseia na utilização de uma substância fotossensibilizadora (Ps, *Photosensitizer*) que, após interagir com um comprimento de luz específico, torna-se ativa. Uma vez ativado, o Ps passa do seu estado fundamental para um estado singlete excitado e, na presença do oxigênio molecular dos tecidos, pode transferir esta energia para essa molécula, levando à formação de $^1\text{O}_2$ (oxigênio singlete). Esta última é uma espécie altamente reativa e oxidante para os componentes celulares, podendo culminar com a morte das células ou tecido de interesse. Além disso, durante o seu curto tempo de vida, os estados excitados são espécies muito mais reativas do que os respectivos estados fundamentais, e podem se envolver com processos redox, através de reações de transferência de elétron ou hidrogênio em contato direto com os alvos biológicos (Tardivo et al. 2005; di Mascio et al. 2019; Agostinis et al. 2011; Dos Santos et al. 2017; Dos Santos et al. 2020) (Fig. 5).

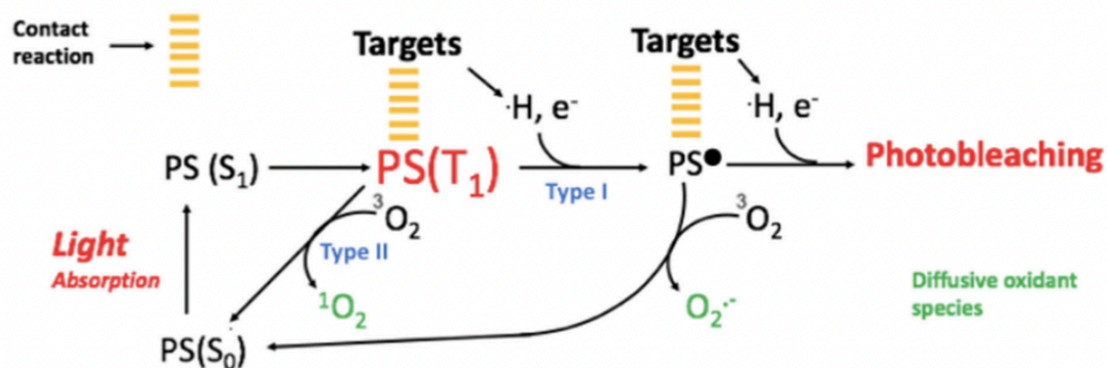


Figura 5: Resumo esquemático dos mecanismos de fotossensibilização na PDT. O fotossensibilizador (PS), é uma molécula que apresenta estrutura química capaz de absorver energia da luz em um comprimento de onda específico. Uma vez irradiado e excitado, o PS transita de seu estado fundamental $\text{PS}(\text{S}_0)$, para seus estados excitado singlete, $\text{PS}(\text{S}_1)$, e excitado tripleto, $\text{PS}(\text{T}_1)$. Nesse último estado de excitação, após ter sofrido mudança no spin do elétron excitado, cruzamento

inter-sistemas (suprimido por questões didáticas, nesse esquema), o PS(T1) pode reagir diretamente com biomoléculas, como proteínas ou lipídios (alvos), via reação fotoquímica Tipo I, o que resulta na formação de radicais, como o PS●, capazes de iniciar reações em cadeia e formar radicais. Por outro lado, o PS (T1) pode reagir com oxigênio molecular ($^3\text{O}_2$), através da reação fotoquímica Tipo II. Ambos geram espécies oxidantes com capacidade de difundirem pelo microambiente celular, como radical superóxido, O_2^- , e oxigênio singleto, $^1\text{O}_2$, via tipo I e II respectivamente, fenômeno capaz de estender o dano oxidativo da PDT (Dos Santos et al. 2019).

No contexto da PDT, o fotossensibilizador é um componente central e pode ser decisivo para o sucesso do tratamento *in vivo*. Um bom Ps deve apresentar características que melhorem a performance e viabilidade de aplicação da PDT, dentre os quais podem ser destacados: pureza química, baixo custo, seletividade pelo tecido tumoral, baixa toxicidade no escuro, vias rápidas de eliminação pelo organismo, rotas de administração variáveis e excitação por comprimento de onda dentro da janela óptica da PDT (entre 600 e 800nm, que permite maior penetrabilidade nos tecidos vivos) (Agostinis et al., 2011; Huang et al., 2008).

O fotossensibilizador utilizado neste projecto foi o azul de metileno (MB) que é um corante da família dos compostos fenotiazínicos (Fig. 6). Este composto apresenta características fotoquímicas adequadas para o uso no tratamento com a PDT, além de apresentar baixa toxicidade e ausência de efeitos colaterais, sendo ainda de custo reduzido e fácil acessibilidade (Pinto et al., 2017; Tardivo et al., 2005). Em trabalho prévio, nós mostramos que o MB co-localiza com os lisossomos das células de PDAC humanas (de Almeida et al., 2022) e é capaz de induzir a morte massiva de diferentes linhagens desses tumores de mama e de pâncreas (Dos Santos et al., 2017).

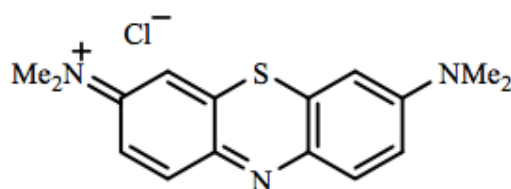


Figura 6: Representação da estrutura química do azul de metileno. (Ormond & Freeman, 2013)

A localização intracelular do Ps é decisiva para desencadear diferentes vias de morte celular, e muitos trabalhos têm estabelecido relações entre a localizações intracelular e o desencadeamento de vias específicas de morte celular, ACD e RCDs, em diversos modelos tumorais (Dos Santos et al., 2019) (Fig. 7).

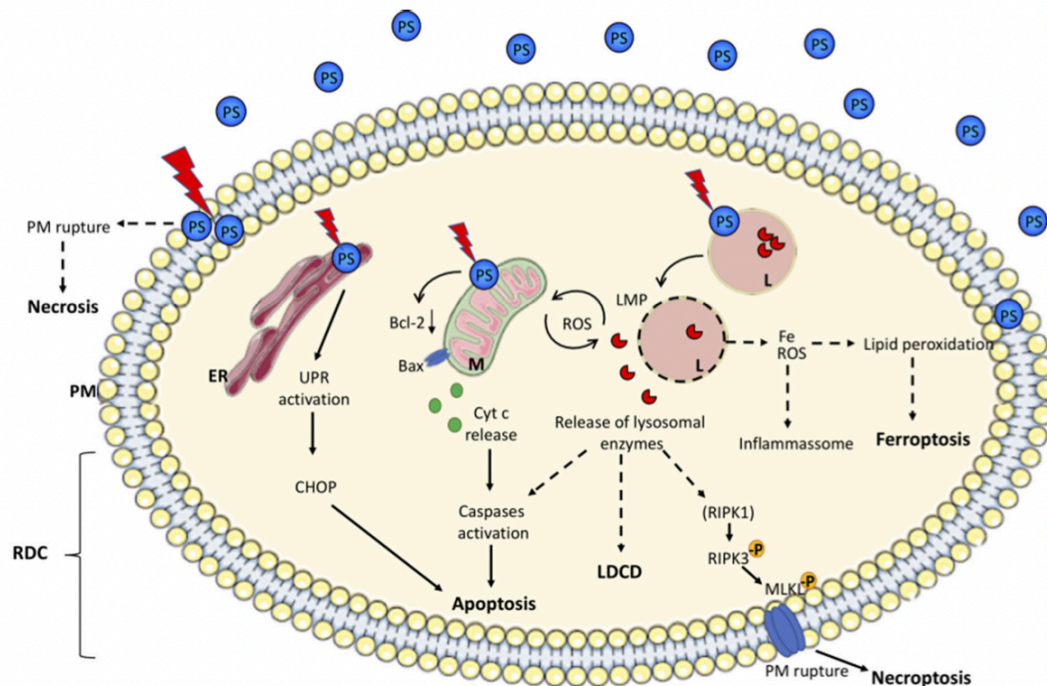


Figura 7: Resumo geral das vias de morte celular que podem ser desencadeadas pela terapia fotodinâmica, considerando a localização intracelular do Ps. Diferentes Ps podem apresentar localizações distintas nas células, de acordo com suas propriedades químicas, e a mais descritas são: a membrana plasmática (PM), o retículo endoplasmático (ER), a mitocôndria (M) ou o lisossomo (L). Dependendo de sua localização, após a ativação pela luz (raios vermelhos), o Ps pode danificar diretamente o MP causando necrose desregulada ou culminar em um ou mais mecanismos regulados de morte celular (RDC). UPR: resposta de proteína desdobrada; LMP: permeabilização da membrana do lisossomo; Fe: ferro; ROS: espécies reativas de oxigênio; -P: grupo fosfato presente nas formas ativas de RIPK3 e MLKL na via de necroptose; LDCD: morte celular dependente de lisossomos (Dos Santos et al., 2019).

In vivo, além da destruição tumoral, a PDT pode causar danos na microvasculatura local e apresentar propriedades imunoestimulatórias que potencializam os seus efeitos anti-tumorais (Garg & Agostinis, 2014; Reginato et al., 2014). Dentre as diversas vantagens da PDT, tem sido mostrado que ela apresenta alta seletividade citotóxica para células tumorais, danificando minimamente os tecidos normais (Agostinis et al., 2011; Dos Santos et al., 2017; Y. Wang et al., 2020) e não atua imunossuprimindo os pacientes em tratamento, como se verifica em outras abordagens terapêuticas (Li et al., 2012; Y. Wang et al., 2020).

A PDT já vem sendo empregada como terapia paliativa, especialmente para o tratamento tumores superficiais e de pequena extensão, como os de pele. Entretanto, para tumores sólidos, ainda há muitas limitações acerca da implementação clínica da PDT, em parte devido ao pouco conhecimento acerca dos mecanismos moleculares

desencadeados pós-terapia. Além disso, as limitações terapêuticas desta abordagem estão intimamente relacionadas à fatores como a utilização de protocolos pouco precisos, escolha de fotossensibilizadores com padrões bioquímicos, farmacocinéticos e ópticos inadequados e variações genotípicas e fenotípicas dos tumores tratados (Broekgaarden et al., 2015). Todos esses fatores, quando incorretamente estabelecidos, podem conferir resistência a(s) via(s) de morte celular desencadeada(s) por um determinado Ps em diferentes tumores. Nesse sentido, estudos que vinculem o entendimento dos mecanismos envolvidos na ação da PDT, de forma tumor-específica, poderiam contribuir ao estabelecimento de protocolos adequados, aumentando a eficiência e a especificidade da terapia.

Entretanto, os mecanismos de morte celular desencadeados pela terapia fotodinâmica com o azul de metileno (MB-PDT) sobre tumores pancreáticos humanos ainda não são elucidados e sua compreensão representa uma etapa fundamental para implementação dessa terapia *in vivo*. Portanto, o presente projeto visa entender os mecanismos moleculares desencadeados pela MB-PDT, com ênfase na morte celular por ferroptose, sobre diferentes subtipos de PDAC humanas e modelos de esferoides derivados de autopsias de PDAC humanos.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Estudar a participação da ferroptose na morte celular desencadeada pela terapia fotodinâmica com o azul de metileno como fotossensibilizador (MB-PDT) sobre modelos de PDAC humanos.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os níveis proteicos basais de enzimas antioxidantes que apresentam atividades relacionadas à ferroptose em diferentes linhagens celulares de PDAC;
- Quantificar os níveis de LIP basal em diferentes linhagens de PDAC;
- Avaliar o impacto dessa inibição da ferroptose na ação da MB-PDT sobre linhagens de PDAC;
- Inibir outras vias de morte: apoptose, necroptose e morte celular dependente de lisossomos (LCD) e avaliar seus impactos na morte desencadeada pela MB-PDT sobre as diferentes linhagens de PDAC;
- Avaliar a modulação de enzimas antioxidantes e do metabolismo do ferro após o tratamento com a MB-PDT em células de PDAC;
- Avaliar o impacto da suplementação com lipídeos deuterados sobre o efeito da MB-PDT em células de tumores pancreáticos;
- Investigar se há uma correlação entre a expressão gênica para proteínas relacionadas à ferroptose e a sobrevida de pacientes de PDAC;
- Avaliar o efeito da MB-PDT quando combinada com diferentes quimioterápicos já utilizados para o tratamento de PDAC sobre organoides derivados de pacientes.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Linhagens celulares

As linhagens utilizadas neste trabalho são derivadas de adenocarcinomas de ducto pancreático (PDAC) humanos: Panc-1 (ATCC® CRL-1469™), MIAPaCa-2 (ATCC® CRL-1420™), AsPC-1 (ATCC® CRL-1682™) e BxPC-3 (ATCC® CRL-1687™).

3.2. Condições de cultivo das células em 2D

Todas as linhagens celulares foram cultivadas em frascos plásticos descartáveis e mantidas em estufa com atmosfera de 5% CO₂ e à uma temperatura de 37°C. Aos meios de cultura específicos para cada linhagem, foram adicionados 100 mg/ml de ampicilina e estreptomicina. As especificações das condições de cultura para cada uma das células foram as seguintes: A linhagem Panc-1 foi mantida em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) suplementado com 10% de soro fetal bovino; MIAPaCa-2 foi cultivada em meio DMEM adicionado de soro fetal bovino numa concentração final de 10% e soro de cavalo 2,5%; As células BxPC-3 e AsPC-1 foram cultivadas em meio RPMI implementado com 10% de soro fetal bovino (todos o reagente foram da Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Os estoques celulares foram mantidos em meio de cultura contendo 90% de soro fetal bovino e 10% DMSO (dimetilsulfóxido) à -80°C e em reservatório contendo nitrogênio líquido. Ao atingirem aproximadamente 80% de confluência, as culturas celulares foram destacadas com 0,025% de tripsina e 1 mM de EDTA, lavadas, suspensas em meio fresco e subcultivadas e/ou plaqueadas para o tratamento experimental. O cultivo das células em monocamada para o tratamento experimental foi realizado plaqueando-se 5x10⁴/cm² células em placas de 24 poços, em meio com suplementação reduzida de 2,5% SFB e incubação em atmosfera úmida contendo de 5% de CO₂ a 37°C.

3.3. Preparo e quantificação do azul de metileno (MB)

O azul de metileno (MB) (Synth, Diadema, Brasil) purificado (Junqueira et al., 2002), fornecido pelo Professor Dr. Maurício da Silva Baptista do Laboratório de Processos Fotoinduzidos e Interfaces do Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da USP (IQ-USP), foi utilizado como fotossensibilizador. O MB foi diluído em água purificada via sistema Milli-Q (Millipore, Billerica, MA, EUA) para uma

concentração de aproximadamente 8 mM. A solução foi diluída em etanol e o espectro de absorvância realizado em espectrofluorímetro (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, Estados Unidos) na faixa de 450-700nm. A quantificação mais precisa da solução foi obtida, pela média de três medidas independentes, com a relação:

$$A=cM\varepsilon$$

em que: A = absorvância em 655 nm; c = caminho óptico (cm); M = concentração (M); ε = coeficiente de extinção molar do azul de metileno em etanol ($85000 \mu^1\text{cm}^{-1}$).

3.4. Fotossensibilização e irradiação

As células foram sub-cultivadas em placas de 24 poços e, após 24h, submetidas ao tratamento com o azul de metileno (MB) como fotossensibilizador (Ps) na concentração de 20 μM , como previamente estabelecido pelo nosso grupo (de Almeida et al., 2022). Nesta etapa, o meio das células foi substituído por um meio novo (RPMI ou DME-F12, de acordo com a especificidade de cada linhagem, com 2,5% SFB) contendo o Ps na concentração final desejada. As células foram incubadas a 37°C durante 2 horas com o Ps e, posteriormente, foram irradiadas com 4,5 J/cm² por 16 minutos com um LED vermelho ($\lambda=642$ nm). Para obter a quantidade de energia desejada, a altura do LED até as placas foi ajustada para se obter a potência necessária para a irradiação por 16 minutos.

Todos os experimentos foram realizados com amostras tratadas ou não com MB e irradiadas ou não, como controles de citotoxicidade do composto e de fototoxicidade da irradiação, a fim de garantir que os efeitos observados são obtidos somente com a combinação do fotossensibilizador e a luz.

3.5. Ensaio de viabilidade celular

Os experimentos de viabilidade executados nesse trabalho foram conduzidos utilizando-se 20 μM de MB, e 16 minutos de irradiação. Os experimentos foram realizados nas condições de células tratadas ou não com MB e irradiadas ou não, como controles experimentais. Os tempos analisados foram de 1, 3 e 24 horas após a irradiação. Após estes tempos, a porcentagem de células mortas foi determinada pela relação entre o número de células total, determinado pela contagem dos núcleos marcados com o fluoróforo Hoechst 33342 (Ho; Sigma), e o número de células mortas,

determinado pelo número de núcleos corados por Iodeto de Propídeo (PI; Sigma). Alíquotas de estoque desses compostos fluorescentes foram preparadas em água purificada via sistema Milli-Q (Millipore) na concentração de 1mg/ml. A partir dessas soluções concentradas foi preparada solução de uso, em meio de cultura, na concentração final de 5 µg/ml para cada fluoróforo. O meio de cultura das células foi então removido e 200 µL de solução contendo os fluoróforos foi adicionado às células por um período de 15 minutos a 37°C. Após este tempo, as culturas em monocamada foram visualizadas diretamente no microscópio de fluorescência invertido (TE 300, Nikon, Tokyo, Japão), com aumento de 200x, e fotografadas para posterior contagem e determinação da porcentagem de morte obtida. A fluorescência das células marcadas foi detectada utilizando-se filtros de 461 nm e 545 nm para excitação do Hoescht e do Iodeto de Propídeo, respectivamente.

Para cada condição (concentração de MB e tempo pós irradiação) foram realizados pelo menos 4 experimentos independentes, sendo analisadas no mínimo 500 células de cada condição, tratada ou controle, em cada experimento independente. Os gráficos e as análises estatísticas foram gerados no programa *GraphPad Prism 9*.

3.6. Avaliação dos níveis proteicos basais ou pós-MB-PDT por western-blot

Para obtenção do extrato proteico total, as culturas foram lavadas com PBSA gelado e, mantendo-se no gelo, adicionou-se tampão de lise (10 mM HEPES; 1% SDS; 1,5 mM MgCl₂.6H₂O; 10 mM KCl; 1 mM DTT; 0,1% NP-40) contendo inibidor de protease (#14928300, GE, Little Chalfont, Reino Unido) e inibidor de fosfatase (Cocktail 2 P5726, Sigma). Após incubação de 20 minutos, sob agitação, o extrato foi coletado por raspagem da monocamada. Ao final do processo foi adicionado tampão de amostra (60 mM Tris-HCl [pH 6,8]; 10% SDS; 50% glicerol; 0,5% azul de bromofenol; 2,5% 2-mercaptoetanol) e o extrato foi aquecido (99°C) por 10 minutos, sendo posteriormente armazenado em freezer (-20°C). Quantidades iguais em volume, deste extrato proteico, foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 12%, para a quantificação dos níveis de expressão das proteínas ACSL-4, GPX4, NRF2, GR, G6PD, FTH1 e SOD1.

As proteínas foram transferidas para membranas de Fluoreto Polivinilideno (PVDF, 0,2 µm; GE; Germany), por transferência úmida, em tampão de transferência

(0,3% Tris; 1,44% Glicina, 0,1% SDS; 20% metanol) a 4°C, 300 mA por 2 h. As membranas foram, em seguida, bloqueadas incubando-as em uma solução de bloqueio Superblock (#37515, Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, EUA) e BSA 5% 1:1 ou leite, a 4°C *overnight*.

Após o bloqueio, as membranas foram incubadas com o anticorpo ACSL4 (SantaCruz, sc-271800, 1:200), GPX4 (abcam, ab125066, 1:1000), G6PD (abcam, ab993, 1:2000), NRF2 (abcam, ab137550, 1:1000), SOD1 (abcam, ab51254, 1:2000), alpha-tubulina clone B-5-1-2 (Sigma-Aldrich, T5168, 1:10.000), anti-rabbit, *Vector Laboratories* PI1000, 1:1000), anti-mouse (*Vector Laboratories*, PI2000, 1:1000). Após este período de incubação, as membranas foram lavadas 3 vezes de 10 minutos cada com uma solução de lavagem (PBSA contendo 0,1% de Tween 20) e, então, incubadas com anticorpo secundário apropriado, conjugado a peroxidase (*Vector Laboratories*, Burlingame, CA, EUA). Em seguida, as membranas foram lavadas 2 vezes de 10 minutos cada com solução de lavagem e 1 vez de 10 minutos com PBSA e reveladas com sistema quimioluminescente (*Immobilon* - Millipore). Como controle, a outra parte das membranas foi incubada com anticorpo monoclonal de camundongo anti- α -tubulina Clone B-5-1-2 (T5168; Sigma).

Após a imunorreacção e quando necessário, as membranas foram submetidas ao processo de *stripping* para a retirada dos anticorpos. O *stripping* foi executado da seguinte forma: as membranas foram submetidas à duas lavagens com água por 10 min, uma lavagem com a solução de *stripping* (Glicina 25 mM com SDS 1% pH 2,0) por 20 min e posteriormente 4 lavagens com PBSA com 0,1% de Tween 20 e por 10 min.

Em todos os casos, a detecção da intensidade das bandas obtidas foi realizada utilizando-se um aparelho fotodocumentador com um sistema de *Imagens Nine Alliance 9.7.17.00b*, 2015; Câmera HD 9 megapixels refrigerada -35°C; Software *Alliance 1D*, 2015 (Cambridge - UK). Posteriormente, foi realizada a densitometria quantitativa de cada banda de interesse, utilizando-se o software *ImageJ* (*National Institute of Health* [NIH]). As densitometrias de cada proteína foram normalizadas pelos seus respectivos controles. A α -tubulina foi usado como o normalizador da quantidade de proteínas aplicadas no gel.

3.7. Inibição farmacológica das vias de morte

As células foram sub-cultivadas em placas de 24 poços e, após 24 h, incubadas com 20 μM de MB, com ou sem o concomitante tratamento com 20 μM de ferrostaina-1 (inibidor de ferroptose), 5 μM de NSA (inibidor de necroptose), 20 μM de z-VAD-fmk (inibidor de apoptose) ou 400 nM de CA-074 (inibidor de LCD), a 37°C durante 2 horas e, posteriormente, foram irradiadas com 4,5 J/cm² por 6 minutos com um LED vermelho ($\lambda=633\text{nm}$). Este protocolo foi anteriormente estabelecido por nosso grupo de pesquisa.

3.8. Quantificação LIP (*Labile Iron Pool*) basal

As placas foram tratadas com solução de CAL-AM entre 0 e 0,5 mM e incubadas (37°C, 5% CO₂) por 20 min. Em seguida, as soluções nos poços foram descartadas, a placa foi lavada com tampão (pH = 7) e cada poço recebeu 100 μL de solução de probenecid 0,5mM. Feito isto, prosseguiu-se com a leitura da fluorescência em 517 nm. Após estabilização da curva fluoresecência X tempo, as células foram tratadas com: (i) SIH 50mM em DMSO 0,5% ou (ii) Fe-8HQ 2,5 mM em DMSO 0,5%. Para avaliar se o DMSO presente nas soluções provocaria efeito às células foram feitos controles tratados apenas com DMSO 0,5%. Outros controles foram: (a) células sem tratamento com CAL-AM 0 a 0,5mM; (b) células sem tratamento e sem calceína; (c) meio DMEM incolor com e (d) sem calceína. O layout da placa foi:

POÇO	AMOSTRA / CONCENTRAÇÃO (mM)											
	CAL-AM	CONTROLES		CAL-AM + Fe8HQ	CAL-AM + SIH	CONTROLES		CAL-AM + Fe8HQ	CAL-AM + SIH	CAL-AM		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B	0,0	Branco + CAL-AM 0,3 mM	Branco sem CAL-AM	0,0	0,0	Branco + CAL-AM 0,3 mM	Branco sem CAL-AM	0,0	0,0	0,0		
C	0,1			0,1	0,1			0,1	0,1			
D	0,2			0,2	0,2			0,2	0,2			
E	0,3	DMSO + CAL-AM 0,3 mM	Células sem CAL-AM	0,3	0,3	DMSO + CAL-AM 0,3 mM	Células sem CAL-AM	0,3	0,3	0,3		
F	0,4			0,4	0,4			0,4	0,4			
G	0,5			0,5	0,5			0,5	0,5			
H												

Para cada amostra e concentração de calceína foi construída uma curva “intensidade de fluorescência (R.L.U) X tempo (s)”. Cada curva teve sua área (integral) calculada, considerando a mesma variação de tempo (eixo x da curva, dt = dx) para dados obtidos da mesma placa. Com tais dados obtiveram-se gráficos da “intensidade

de fluorescência ($R.L.U. s^{-1}$) \times [CAL-AM] (mM)” para controles e ensaios, dos quais foram obtidas equações de reta a serem utilizadas para determinar a concentração de calceína em dada amostra em função de sua intensidade de fluorescência. A determinação da concentração de ferro lábil nas células foi calculada através da intensidade de fluorescência antes (valores de F) e depois (valores de Fc) do tratamento com SIH. A fluorescência foi normalizada (em %) e a variação na intensidade de fluorescência foi considerada a quantidade de calceína que estava ligada a ferro lábil antes da adição do quelante.

3.9. Ensaio de peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica foi quantificada utilizando-se a sonda BODIPY-C11 e um leitor de microplacas para excitação 488 nm / emissão 510 nm (forma oxidada) da sonda, como descrito a seguir. $1,5 \times 10^4$ células/poço foram plaqueadas em placas de 96 poços escura e fundo claro. 24 h após o plaqueamento, as células foram tratadas com o azul de metileno $20 \mu M$, como descrito no item 3.4. dessa sessão, e mantidos por 2 horas na estufa à $37^\circ C$. Após esse período, procedeu-se com a irradiação das células. Ao fim do foto-tratamento, a placa foi mantida por 10 min em estufa à $37^\circ C$. Em seguida, o sobrenadante foi removido e a solução *work* de BODIPY-C11 ($10 \mu M$) foi adicionada aos poços e incubada por mais 10 minutos a $37^\circ C$ no leitor de placas. As leituras de intensidade de fluorescência foram obtidas de 5 em 5 minutos por 1 hora (488/510 nm - exc/em). Os valores de *slopes* de cada curva obtida a partir do gráfico da cinética de emissão de fluorescência em função do tempo foram normalizadas pela viabilidade das células obtidas utilizando-se o ensaio de incorporação de cristal violeta (CV). Para o ensaio de viabilidade: as células foram lavadas 1x com PBS, e, em seguida, foram incubadas com solução de CV 0,02% (v/v) por 5 minutos a temperatura ambiente. Após esse período, o CV foi removido e as células foram lavadas duas vezes com água destilada. As placas foram mantidas à temperatura ambiente até secagem completa e o corante foi eluído com uma solução de citrato de sódio 0,1 M em etanol 50% (v/v) preparado em H₂O milliQ. Por fim, realizou-se a leitura da absorbância em comprimento de onda de 585 nm. Os valores dos *slopes* normalizados pelas respectivas absorbâncias de CV foram calculadas em relação ao respectivo controle para cada uma das quatro linhagens.

3.10. Tratamento com lipídeos deuterados

5x10⁴ células foram plaqueadas em placa de 24 poços e mantidas em condições ótimas de crescimento. 24 h após o plaqueamento, o meio foi substituído por RPMI 10% suplementado com 25 µM de 11,11-D2-Lin (D2 PUFA) ou 11,11,14,14-α-D4-Lin (D4 PUFA) (fabricados pela Retropore). 24 h após a suplementação, as células foram submetidas ao tratamento com o 20 µM de azul de metileno. Como descrito no item 3.4 desta seção, nessa etapa, o meio das células foi substituído por um meio novo (RPMI com 2,5% SFB) contendo o Ps na concentração final desejada. As células foram incubadas a 37°C durante 2 horas com o Ps e, posteriormente, foram irradiadas com 4,5 J/cm² por 16 minutos com um LED vermelho (λ=642 nm). A morte celular foi avaliada por microscopia de fluorescência utilizando-se os fluoróforos HO e PI, como descrito no item 3.5 dessa seção, 24 h após o tratamento com luz.

3.11. Plaqueamento de organoides (3D) derivados de pacientes com PDAC

Os experimentos desta etapa foram realizados no laboratório “*Pancreatic Development, Stem Cell Differentiation and Cancer*”, do Hospital da Universidade de Ulm, na Alemanha (*Universitätsklinikum Ulm*), chefiado pelo Dr. Alexander Kleger, Professor de Oncologia Molecular e médico sênior, chefe do setor de pancreatologia do Departamento de Medicina Interna I, dessa Universidade. Os experimentos foram executados sob a supervisão do Professor Dr. Kleger e do Dr. Johann Gout, pós-Doc pesquisador e responsável pela linha de pesquisa que engloba a utilização do cultivo experimental dos organoides derivados de pacientes de PDAC no mesmo laboratório.

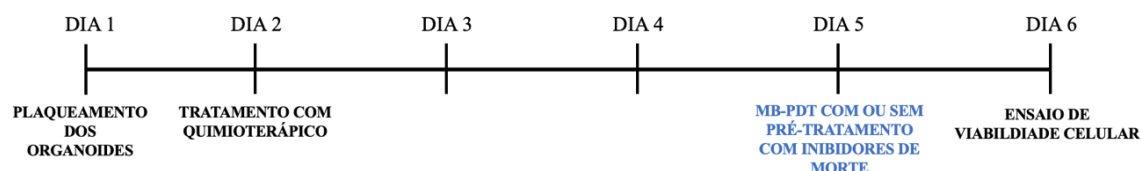
As condições de cultivo dos organoides foram seguidas de acordo com o estabelecido previamente pelo grupo do Professor Dr. Kleger (Frappart et al., 2020) Para os experimentos de viabilidade, foram utilizados organoides derivados de amostras obtidas de tumores de quatro pacientes de PDAC do Hospital da Universidade de Ulm, denominados: 26152, 30029, 28178 e 30121. Esses organoides foram mantidos em cultura em domos de GFR-Matrigel (Corning, 354230) em meio de cultura para organoides contendo meio condicionado de WNT-3/RSP01.

Para o plaqueamento dos organoides, os seguintes passos foram seguidos: os organoides foram digeridos com colagenase/dispase (2,5 h, em estufa à 37°C), seguido por acutase (Sigma-Aldrich, A6964) por 40 min em banho-maria (37°C),

pipetando-se gentilmente a cada intervalo de 10 min. Após verificada a digestão dos organoides e presença de células individuais, seguiu-se com a inativação da acutase com meio resfriado (4°C) (“*ressuspension medium*”), DMEM contendo BSA 10 mg/mL. Após centrifugação do conteúdo (300 x g), à 4°C por 5 min, prosseguiu-se para a contagem das células. A suspensão de células foi preparada em meio contendo inibidor de Rho cinase (Y-27632) (Merck, Y0503-5MG) e 5% GFR-Matrigel. Foram plaqueadas 2000 células em 80 µL de volume por poço, em placas de 96 poços (p96) escuras e de fundo claro, previamente recoberto com uma camada de GFR-Matrigel (40 µL) em PBS (Life Technologies. 14190-094) (1:3).

3.12. Tratamento dos organoides com quimioterápicos e a MB-PDT

Os quimioterápicos utilizados nesse estudo foram os seguintes: gemcitabina (GEM), paclitaxel (PAC), irinotecano (IRI), 5-fluorouracil (5-FU) e oxaliplatina (OX) (Todas obtidas da Selleckchem), e o tratamento se deu seguindo a escala de tempo representada no esquema a seguir:



Após um período de 24 h de plaqueamento, os organoides foram tratados com os diferentes quimioterápicos individualmente (0.013 µM). Essa concentração foi utilizada para todos os quimioterápicos utilizados. A escolha dos quimioterápicos para o tratamento de cada organoide se deu de acordo com os perfis de resistência pré-estabelecidos por Frappart e colaboradores (2020), sendo que cada um dos quatro tipos de organoides recebeu tratamento com três diferentes drogas + MB-PDT, no seguinte esquema: um quimioterápico + MB-PDT (por exemplo: 0.013 µM de gemcitabina + MB-PDT), segundo a tabela 1:

Organoide	Quimioterápicos
26152	GEM, PAC ou IRI
30029	GEM, PAC ou IRI
28178	5-FU, OX ou IRI
30121	5-FU, OX ou IRI

Tabela 1: Descrição dos quimioterápicos que foram utilizados para tratar os diferentes organoides derivados de PDAC.

No terceiro dia de contato com o quimioterápico, cada organoide foi submetido ao tratamento com a MB-PDT. Nenhum conteúdo foi removido dos poços. À cada poço de p96, foi pipetado 1 μL de uma solução com MB para uma concentração final no poço de 20 μM de MB. Nos poços de interesse, junto com o MB, foram pipetados os inibidores das vias de ferroptose, Fer-1 (20 μM), apoptose, z-VAD (20 μM) ou necroptose, NSA (5 μM), de acordo com a condição desejada. Após duas 2,5 h, os organoides foram irradiados, ou não, por 16 min, com um LED vermelho ($\lambda=642\text{ nm}$), totalizando com 9 J/cm^2 . 24 h após o tratamento com MB-PDT, a porcentagem de morte celular foi acessada por microscopia de fluorescência, como descrito no sub-ítem 3.5. desta sessão.

3.13. Análise de sobrevida global

Dados de sobrevida específicos de câncer de casos de PDAC do ICGC (PACA-AU, n = 87) foram recuperados do portal de dados do ICGC (Zhang et al., 2011). Pacientes com acompanhamento ou sobrevida global abaixo de 60 dias foram excluídos da análise. Os dados foram censurados à direita em 3 anos. As contagens de leitura bruta de todos os genes foram convertidas em contagens por milhão de unidades (CPM). Genes com CPM > 1 em pelo menos 20% das amostras foram filtrados e então normalizados usando o método quantil da função Voom (Ritchie et al., 2015). Para cada gene de interesse, os pacientes foram classificados de acordo com seu nível de expressão e atribuídos a grupos de expressão "alta" ou "baixa" com base no nível de expressão mediano de todas as amostras. As curvas de sobrevivência Kaplan-Meier (KM) foram geradas com o pacote R 'survival' (Thermeau, 2015) e as diferenças entre as curvas KM foram verificadas usando o teste log-rank. As razões de risco (HR) foram calculadas em relação ao grupo de expressão "alta"

(ou seja, $HR > 1$ indica que o grupo de expressão mais alta está em maior risco) usando regressão de Cox e um intervalo de confiança de 95%. Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

3.14. Análises estatísticas

Os dados obtidos foram submetidos a análise estatística com o software GraphPad Prism 9 estabelecendo-se o mínimo de $p < 0,05$ (nível de significância) e grau de confiança de 95%. Os resultados foram analisados para distribuição gaussiana. Aqueles que passaram o teste de normalidade foram submetidos a uma análise por ANOVA, empregando o *Tukey's Multiple Comparison Test* (Teste de comparação múltipla de Tukey). A análise não paramétrica de Kruskal–Wallis seguida do post-test Dunns para comparações múltiplas foi utilizada para analisar os conjuntos de dados que não apresentaram uma distribuição normal.

4. RESULTADOS

4.1. Susceptibilidade de diferentes linhagens de PDAC à MB-PDT

Resultados prévios do nosso grupo mostraram que a diminuição na taxa de fluência luminosa de $1,2 \times 10^{-2} \text{ J/cm}^2 \cdot \text{s}$ ($4,5 \text{ J/cm}^2$ durante 6 min) para $4,7 \times 10^{-3} \text{ J/cm}^2 \cdot \text{s}$ ($4,5 \text{ J/cm}^2$ durante 16 min) aumenta consideravelmente a sensibilidade das linhagens MIAPaCa-2 e Panc-1 à PDT. Mostramos que o aumento no tempo de irradiação é acompanhado por um aumento significativo na depleção dos níveis de GSH (*reduced glutathione*), assim como por um aumento no estresse oxidativo. Esses dois eventos estão relacionados à maior efetividade da MB-PDT quando a irradiação é realizada com uma menor taxa de fluência da energia (de Almeida et al., 2022).

Visando aprofundar o entendimento sobre os mecanismos de ação da PDT sobre esses tumores pancreáticos, investigamos a participação da ferroptose, uma via de morte celular regulada e dependente da depleção das defesas antioxidantes e do aumento da peroxidação lipídica. Além disso, avaliamos a efetividade dessa terapia sobre organoides derivados de pacientes com adenocarcinoma de ducto pancreático (PDOs, *pancreatic ductal adenocarcinoma organoids*), um modelo de estudo mais complexo e que melhor recapitula as características desses tumores *in vivo*.

Nós confirmamos, inicialmente, a efetividade da MB-PDT sobre as quatro linhagens de PDAC em monocamada. Os dados apresentados na figura 8 mostram que a MB-PDT é eficiente em induzir a morte de diferentes células, sendo a máxima porcentagem de morte observada 24 h após a irradiação: MIAPaCa-2 (Ctrl: $0,12\% \pm 0,07$ vs 24 h-MB-PDT: $93,64\% \pm 0,50$); Panc-1 (Ctrl: $0,27\% \pm 0,15$ vs 24 h-MB-PDT: $67,18\% \pm 3,17$); AsPC-1 (Ctrl: $0,23\% \pm 0,11$ vs 24 h-MB-PDT: $73,53\% \pm 2,09$) e BxPC-3 (Ctrl: $0,59\% \pm 0,15$ vs 24 h-MB-PDT: $71,33\% \pm 2,40$).

Os resultados indicaram uma efetividade significativamente maior da MB-PDT sobre as células MIAPaCa-2 quando comparadas as demais linhagens celulares avaliadas, evidenciada pelas porcentagens observadas 24 h pós-tratamento: MIAPaCa-2 ($93,64\% \pm 0,50$) vs Panc-1 ($67,18 \pm 3,17$), AsPC-1 ($73,53 \pm 2,09$) e BxPC-3 ($71,33 \pm 2,40$).

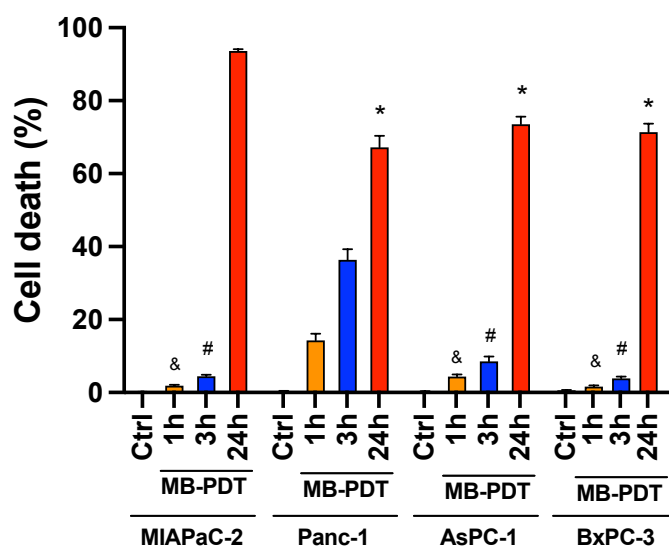


Figura 8: Diferenças na susceptibilidade de linhagens de PDAC humanas à MB-PDT. Porcentagens de morte celular obtidas numa cinética de 1, 3 ou 24 h após o tratamento com $4,7 \times 10^{-3} \text{ J/cm}^2 \cdot \text{s}$ ($4,5 \text{ J/cm}^2$ de energia em 16 min de irradiação). As células foram tratadas, ou não, com MB-PDT e morte celular foi avaliada nos pontos específicos após o tratamento com o MB-PDT, por microscopia de fluorescência, a partir da marcação dos núcleos com HO e PI. * $p < 0,0001$ versus MB-PDT-24 h MIAPaCa-2; & $p < 0,0001$ versus MB-PDT 1 h Panc-1; e # $p < 0,0001$ versus MB-PDT 1 h Panc-1

4.2. Perfis de expressão basal de enzimas antioxidantes e de proteínas envolvidas no metabolismo de ferro em células de PDAC

Os níveis de expressão de enzimas participantes de processos de neutralização de espécies pró-oxidantes nos ambientes celulares são importantes indicadores da capacidade das células se manterem em homeostase, evitando o desbalanço redox, e, como consequência, resistirem às vias de morte celular específicas, dentre as quais destaca-se a ferroptose (Dixon et al. 2012). Sendo assim, os perfis de expressão proteica basais de proteínas, cujas funções são importantes no contexto da manutenção da homeostase redox celular, foram caracterizados em extratos proteicos de células de PDAC, mantidas em condições ótimas de crescimento.

Os resultados apresentados na figura 9 (A e B) mostram o perfil de ACSL4 e GPX4, respectivamente. Essas são duas das principais enzimas envolvidas em processos que regulam diretamente a propensão de células à ferroptose. As linhagens AsPC-1 e BxPC-3 apresentaram níveis significativamente mais elevados de ACSL4 em relação às células Panc-1 e MIAPaCa-2, sendo, entre as duas primeiras linhagens, a maior expressão dessa enzima observada em BxPC-3 (Fig. 9A). Adicionalmente,

observamos que as células contêm níveis comparáveis de GPX4, com exceção das células Panc-1. Nesse caso, foram observados níveis proteicos significativamente menores (Fig. 9B).

Adicionalmente, foram avaliados os níveis de NRF2 (*Nuclear factor E2-related factor 2*), e observou-se que esse fator de transcrição, que atua na regulação da expressão de genes, cujos produtos têm importante função redox, está significativamente mais expresso em AsPC-1 e BxPC-3 em relação à MIAPaCa-2 e Panc-1. Além disso, a expressão de NRF2 é maior em AsPC-1, quando se compara às duas últimas linhagens (Fig. 9C e H).

A G6PD (*Glucose-6-phosphate dehydrogenase*) é uma enzima chave da via pentose-fosfato que oxida glicose para manter o nível NAPH nas células e, conseqüentemente, tem um papel proeminente para o bom funcionamento das defesas antioxidantes celulares. Assim, nós avaliamos os níveis proteicos dessa enzima nas diferentes linhagens aqui estudadas. Panc-1 e BxPC-3 apresentaram níveis equivalentes de G6PD, que foram significativamente maiores do que aqueles observados em MIAPaCa-2 e AsPC-1 (Fig. 9A e C).

Além das enzimas acima mencionadas, nós avaliamos o conteúdo de GR (*Gluthathione reductase*), uma flavoproteína que atua regenerando o conteúdo de glutathiona reduzida (GSH), sendo importante para o reestabelecimento de sistemas que utilizam esse tripeptídeo para executar suas funções antioxidantes, e, a SOD1 (*superoxide dismutase 1*), que evita o acúmulo de ânion radical superóxido, promovendo a sua transformação a oxigênio e água e, conseqüentemente, desempenhando função antioxidante direta. Dentre as quatro linhagens testadas, BxPC-3 apresentou maior expressão de GR comparada às demais células, as quais não diferiram estatisticamente entre si nesse parâmetro (Fig. 9E e H). Adicionalmente, MIAPaCa-2 e AsPC-1 apresentaram níveis semelhantes de SOD1, os quais foram significativamente maiores do que aqueles apresentados por Panc-1 e BxPC-3 (Fig. 9F e H).

Adicionalmente à avaliação dos níveis de expressão de enzimas com funções antioxidante, nós analisamos os níveis de expressão basal de FTH1 (*ferritin heavy chain 1*). Como pode ser observado nos itens G e H da figura 9, AsPC-1 apresentou significativamente menos FTH1 quando comparada às demais linhagens. Essa enzima desempenha importante papel na manutenção de níveis adequados de ferro lábil intracelular e, conseqüentemente, é decisiva para o desencadeamento da morte

ferroptótica. É importante lembrar que o conteúdo de ferro lábil fornece os espécimes químicos que participam das reações de Fenton, que aumentam a formação de oxidantes potentes, como o radical hidroxila. Por ser um parâmetro que pode indicar o grau de susceptibilidade à ferroptose, nós avaliamos os níveis de ferro lábil nas linhagens de PDAC.

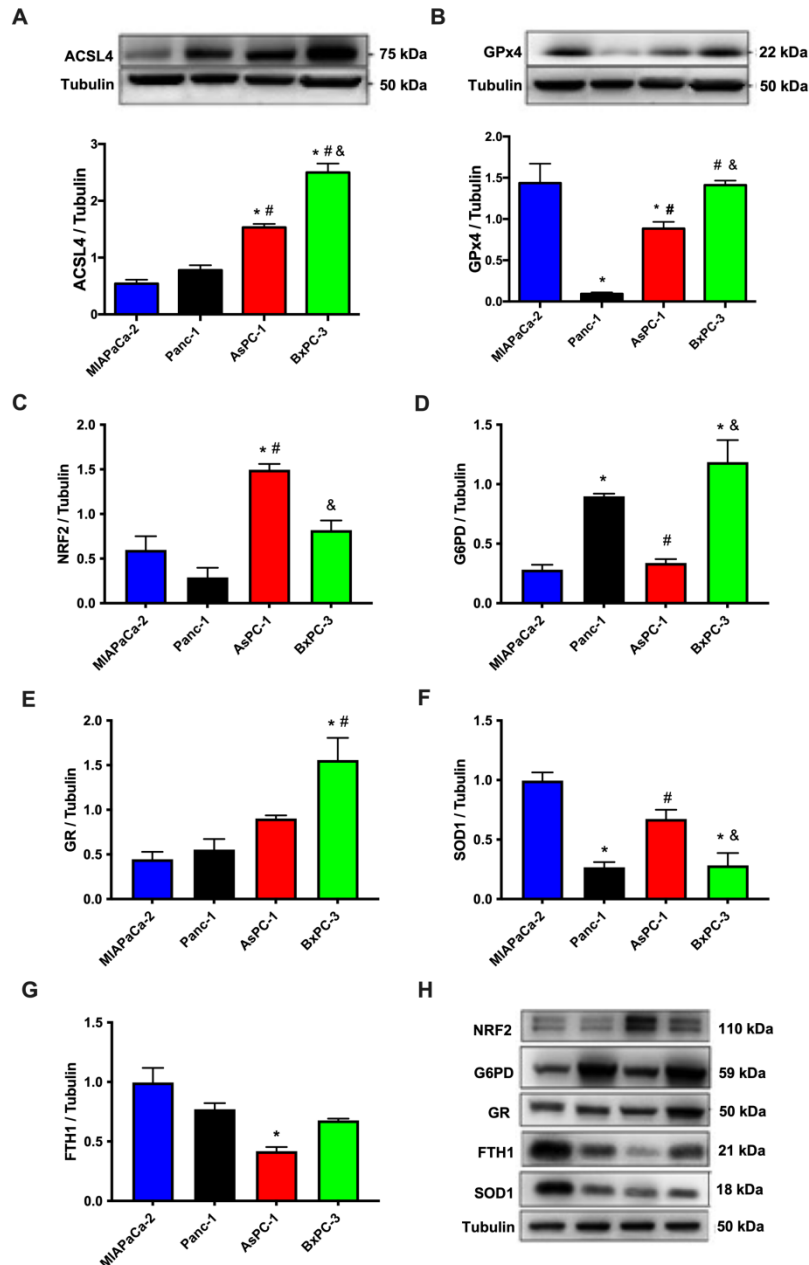


Figura 9: Diferenças nos níveis de enzimas com função redox ou no armazenamento de ferro em linhagens de PDAC em condições ótimas de crescimento. Imagens representativas dos WB para NRF2, G6PD, GR, FTH1, SOD1 e tubulina nas linhagens MIAPaCa-1, Panc-1, AsPC-1 e BxPC-3 (A). Quantificação da expressão das proteínas NRF2 (B), G6PD (C), GR (D), FTH1 (E), SOD1 (F). * $p < 0.05$ versus MIAPaCa-2; # $p < 0.05$ versus Panc-1; & $p < 0.05$ versus AsPC-1; $n = 3$ experimentos independentes.

4.3. Diferenças nas quantidades de ferro lábil intracelular em linhagens de PDAC

O *pool* de ferro lábil (LIP) é um parâmetro importante na pré-disposição à morte por ferroptose, visto que esse parâmetro determina a quantidade de ferro intracelular não ligado com alta afinidade a proteínas e que estaria disponível para participar na formação intracelular de espécies reativas de oxigênio, principalmente por meio das reações de Fenton. Com base nisso, foram avaliados os níveis de LIP nas quatro linhagens aqui estudadas. Os resultados obtidos mostram que a linhagem BxPC-3 apresentou o maior *pool* de ferro lábil, sendo significativamente maior que as quantidades observadas em Panc-1 (Panc-1: $0,07 \pm 0,01$ versus BxPC-3: $0,3 \pm 0,1$) (Fig. 10). Esses resultados indicam que a ferroptose pode ser mais facilmente ativável em células BxPC-3, uma vez que esta linhagem apresentou níveis significativamente maiores de LIP intracelular.

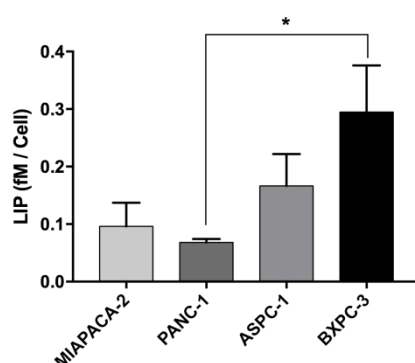


Figura 10. Níveis de LIP estão reduzidos em células de PDAC com menor propensão à ferroptose. Quantificação de ferro lábil intracelular (LIP), em fM em fento-molar, normalizado pelo total de calceína intracelular incorporada pelas células. * $p < 0,05$; $n \geq 3$ experimentos independentes.

4.4. MB-PDT induz ferroptose em células de PDAC

Com o intuito de avaliar a participação da ferroptose na morte celular desencadeada pela MB-PDT, as linhagens de PDAC foram submetidas à inibição farmacológica dessa via de morte celular por meio do pré-tratamento com $20 \mu\text{M}$ de ferostatina-1 (Fer-1) por 2 h previamente à irradiação. Além desta, foram utilizados inibidores farmacológicos de outras vias de morte celular reguladas como apoptose ($20 \mu\text{M}$ de z-VAD), necroptose ($5 \mu\text{M}$ de NSA) e morte celular dependente do lisossomo (400 nM de CA-074).

Os resultados apresentados na figura 11 mostram que o tratamento com Fer-1 inibiu, significativamente, a morte celular induzida por MB-PDT, 24 h após o tratamento, em todas as linhagens celulares testadas: inibição de 9,34% da morte observada em MIAPaCa-2 (Fer-1+MB-PDT: 84,89% *versus* MB-PDT: 93,64%), 21,68% em AsPC-1 (Fer-1+MB-PDT: 57,59% *versus* MB-PDT: 73,53%) e 44,26% em BxPC-3 (Fer-1+MB-PDT: 39,76% *versus* MB-PDT: 71,33%), exceto nas células Panc-1, menos sensíveis ao tratamento. Além disso, o pré-tratamento com NSA também foi capaz de reduzir em 13,75% a morte desencadeada pela MB-PDT em células AsPC-1 (NSA+MB-PDT: 63,42% *versus* MB-PDT: 73,53%, $p < 0,01$, Fig. 11C) e em 20,69% no caso das células BxPC-3 (NSA+MB-PDT: 56,57% *versus* MB-PDT: 71,33%, $p < 0.0001$, Fig. 11D). Adicionalmente, a inibição de catepsina B, por CA-074, promoveu uma inibição na morte induzida por MB-PDT somente nas células MIAPaCa-2 (CA-074+MB-PDT: 82,71% *versus* MB-PDT: 93,64%, $p < 0.0001$, Fig. 11A). Cabe destacar que, em nenhum caso, a inibição da apoptose promoveu uma diminuição na sensibilidade das células ao tratamento. Outro resultado interessante corresponde ao observado nas células Panc-1. Nessa linhagem, em nenhum caso a inibição das vias de morte testadas promoveu menor morte celular. A inibição de outros mecanismos deveria ser testada a fim de determinar quais são os tipos de morte responsáveis pela citotoxicidade da MB-PDT sobre esta linhagem.

Em conjunto, esses resultados indicam que as diferenças moleculares entre as linhagens, no que se refere à sua capacidade de promover a ativação de diferentes vias de sinalização são muito importantes para aumentar a suscetibilidade do PDAC à terapia fotodinâmica.

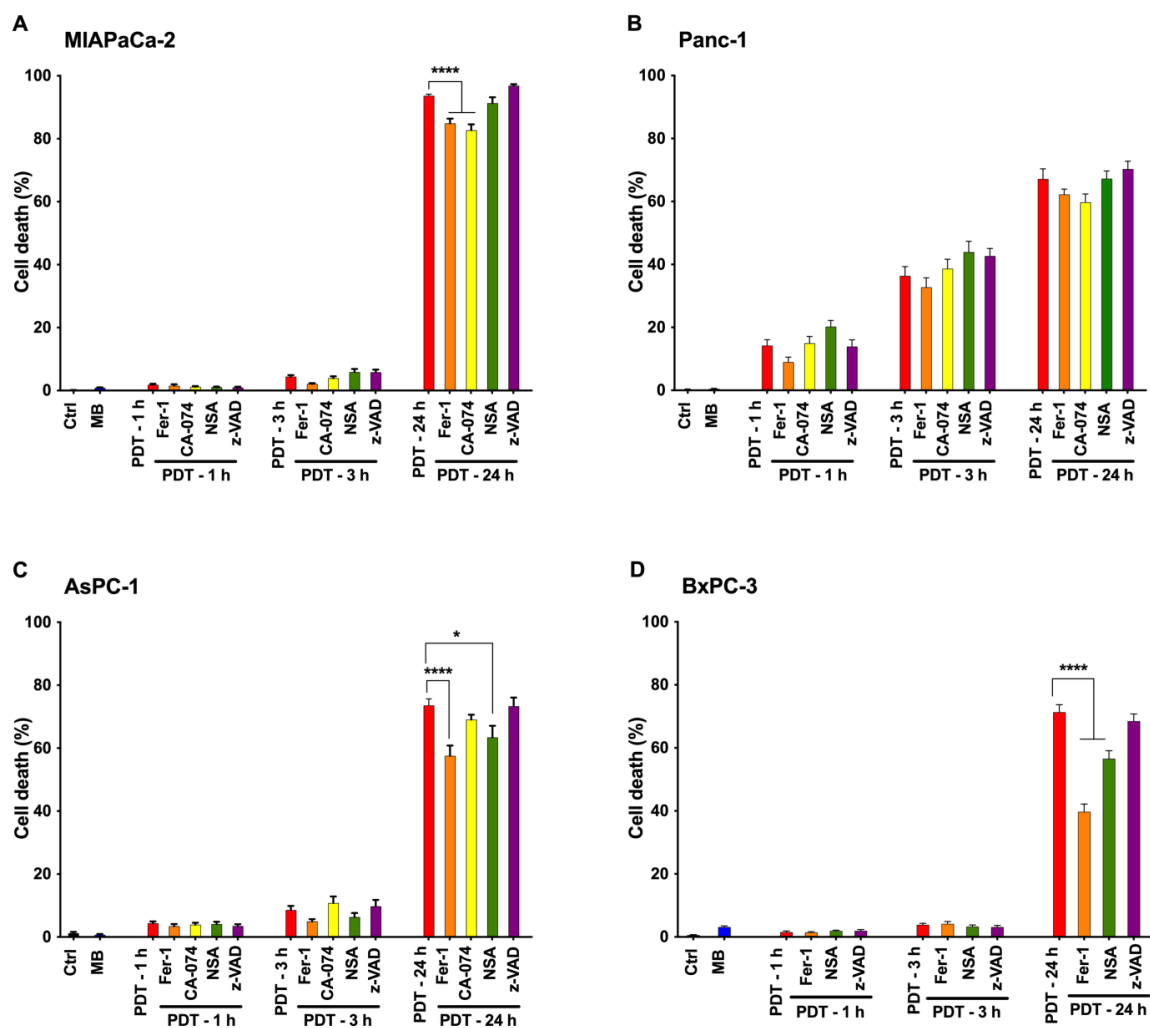


Figura 11: A inibição da ferroptose é a principal mecanismo capaz de reduzir a morte celular induzida pela MB-PDT nas linhagens de PDAC. Células MIAPaCa-2, Panc-1, AsPC-1 ou BxPC-3 foram incubadas com 20 μ M de azul de metileno +/- Fer-1 (20 μ M), z-VAD (20 μ M), NSA (5 μ M) ou CA-074 (400 nM) por 2 h. Após a incubação, as células foram irradiadas (642 nM, 16 min, energia total: 4,5 J/cm²). A porcentagem de morte celular foi calculada a partir da razão entre o número de células mortas, marcadas com iodeto de propídeo (PI, 5 μ g/mL), e o número de células totais, marcadas com Hoescht (HO, 10 μ g/mL), 1 h, 3 h ou 24 h após o tratamento. * $p < 0.01$ e, **** $p < 0.0001$ versus PDT-24 h; n = 3 experimentos independentes para BxPC-3 e n \geq 3 experimentos independentes para MIAPaCa-2, Panc-1 e AsPC-1.

4.5. O tratamento com MB-PDT modula a expressão de enzimas antioxidantes em linhagens de PDAC

Considerando que a morte celular induzida pela MB-PDT pode ser inibida pelo tratamento com Fer-1 em MIAPaC-a2, AsPC-1 e BxPC-3, mas não em Panc-1 (Fig. 11), foram realizados ensaios de *western blot* para determinar se o tratamento com a terapia fotodinâmica apresenta a capacidade de modular

diferencialmente os níveis de proteínas relacionadas à manutenção do balanço redox nas diferentes linhagens (Fig. 12).

Como pode ser observado no gráfico e nas imagens representativas da figura 12A, sobre a linhagem MIAPaCa-2, a MB-PDT induziu um aumento significativo na expressão de NRF2 24 h após o foto-tratamento ($p < 0.05$). A expressão de GPx4, G6PD, FTH1 e SOD1 não sofreram modulação após a MB-PDT na mesma linhagem (Fig. 12A).

É importante destacar que o tratamento com a MB-PDT foi capaz de modular positivamente a expressão de G6PD, enzima importante da via das pentoses-fosfato e produção de NADPH, sobre a linhagem Panc-1 a partir da terceira hora pós-tratamento, tendo sido observado o pico máximo de expressão dessa enzima 24 h após a irradiação (Fig. 12B). Nessa mesma linhagem, observou-se um aumento significativo de FTH1 no ponto de 24 h após o tratamento, e uma significativa diminuição dos níveis de SOD1 já na primeira hora após a MB-PDT. Por outro lado, GPX4 e NRF2 não sofreram modulação significativa pela MB-PDT nessas células (Fig. 12B).

Além disso, foi observado que o tratamento com a MB-PDT sobre a célula AsPC-1 induziu um aumento na expressão de NRF2 na primeira hora após a terapia. Esses valores retornaram a níveis semelhantes ao controle, às 3 h pós-tratamento, e, observou-se um segundo evento de aumento na sua expressão às 24 h pós-irradiação (Fig. 12C). De forma semelhante, esse padrão de expressão aumentada 1 h após a terapia, seguido de diminuição às 3 h e, novo aumento nos níveis proteicos às 24 h depois da MB-PDT, também se repetiu no perfil de expressão de FTH1 nessa linhagem (Fig. 12C). GPX4, G6PD e SOD1 não sofreram modulação pelo tratamento com a PDT nessas células.

Sobre a linhagem BxPC-3, o tratamento com a terapia fotodinâmica induziu um aumento na expressão de NRF2, 1 h e 3 h após a irradiação (Fig. 12D). Os níveis proteicos desse fator de transcrição retornaram a valores semelhantes ao controle, às 24 h após o foto-tratamento. Além disso, nessa mesma linhagem foi observado um aumento nos níveis de FTH1 3 h após a MB-PDT. Os níveis dessa proteína, importante para o armazenamento de ferro e a homeostase desse íon nas células, assemelharam-se ao controle às 24 h pós-MB-PDT (Fig. 12D).

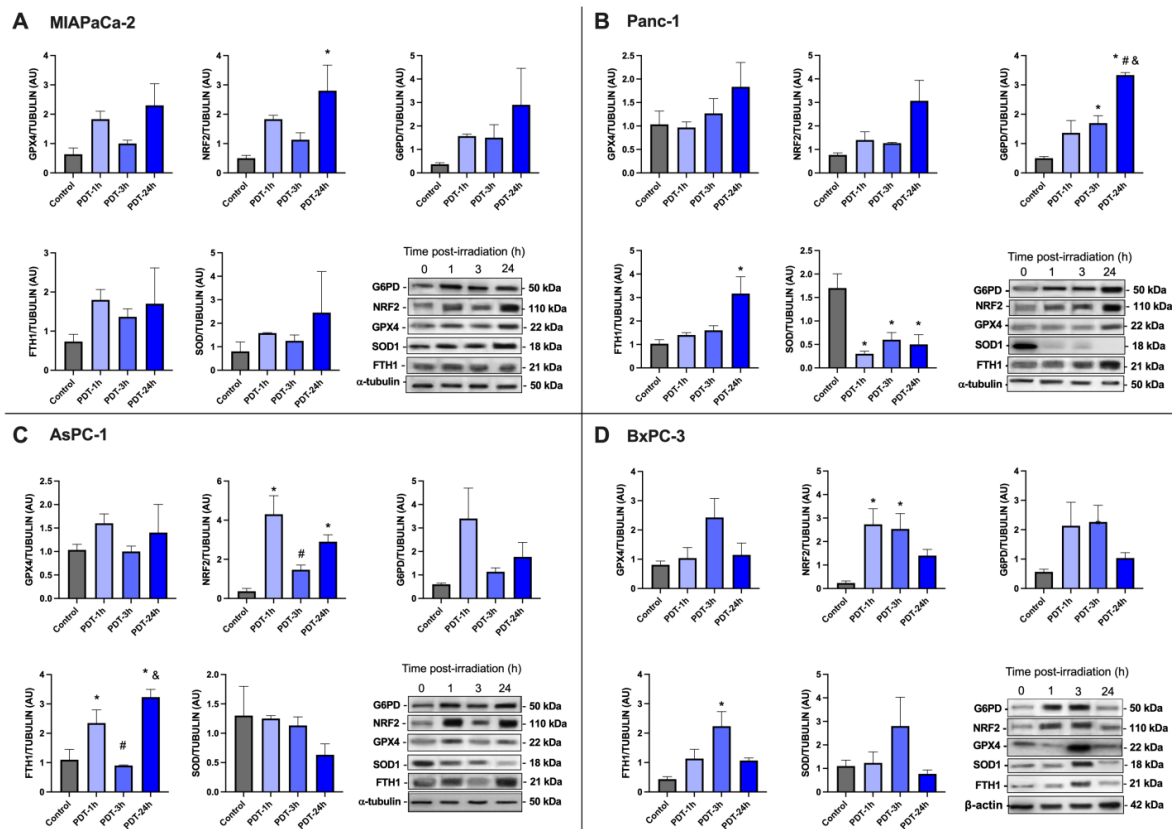


Figura 12: MB-PDT modula a expressão de enzimas antioxidantes em células de PDAC. Histogramas das quantificações dos níveis de GPX4, NRF2, G6PD, FTH1 e SOD1 nas linhagens MIAPaCa-2 (A), Panc-1 (B), AsPC-1 (C) e BxPC-3 (D), 1, 3 ou 24 h após o tratamento com a MB-PDT. Nos painéis inferiores e à direita de cada grupo de histogramas estão as respectivas imagens representativas para cada proteína analisada e as α -tubulinas ou β -actina correspondentes à cada membrana. * $p \leq 0,005$ versus Control, # $p \leq 0,005$ versus PDT-1h e & $p \leq 0,005$ versus PDT-3h. n = 3 experimentos independentes. Dados são apresentados \pm SEM.

Convém ressaltar que diferentes linhagens celulares apresentam padrões distintos de modulação da expressão de proteínas frente ao tratamento com a MB-PDT. O conhecimento sobre esse padrão de modulação ajuda a determinar regimes de PDT mais efetivos, visando potencializar a indução de morte dessas células.

4.6. MB-PDT promove aumento da peroxidação lipídica em linhagens de PDAC

O aumento da peroxidação lipídica dependente do metabolismo do ferro é uma característica clássica da morte celular por ferroptose (Dixon et al. 2012). Em trabalho anterior, identificamos, por meio do aumento da fluorescência da sonda DCF, que o tratamento com a MB-PDT promove aumento de espécies oxidantes e estresse oxidativo intracelular sobre a linhagem MIAPaCa-2 (de Almeida et al., 2022). Além disso, a indução do estresse oxidativo pela PDT tem sido amplamente reportada como

um mecanismo de ação dessa terapia sobre diferentes sistemas, incluindo o tratamento de células tumorais (Bacellar et al., 2015; Dos Santos et al., 2017).

No presente trabalho, foram investigados os níveis de peroxidação lipídica em MIAPaCa-2, Panc-1, AsPC-1 e BxPC-3, 1 h após MB-PDT. A figura 13 mostra que a terapia induziu um aumento significativo da oxidação da sonda bodipy-C11, o que indica um aumento de quase duas vezes na peroxidação lipídica nas células AsPC-1 e BxPC-3 (Fig. 13C e Fig. 13D) quando comparado aos respectivos controles. É importante destacar que na linhagem Panc-1 não foi observado aumento nos níveis de oxidação da sonda bodipy-C11 após a MB-PDT, indicando que 1 h após o tratamento não ocorre aumento da peroxidação lipídica nessas células e que na linhagem MIAPaCa-2 o aumento observado na peroxidação lipídica não foi significativamente maior quando comparado ao respectivo controle (Fig. 13B).

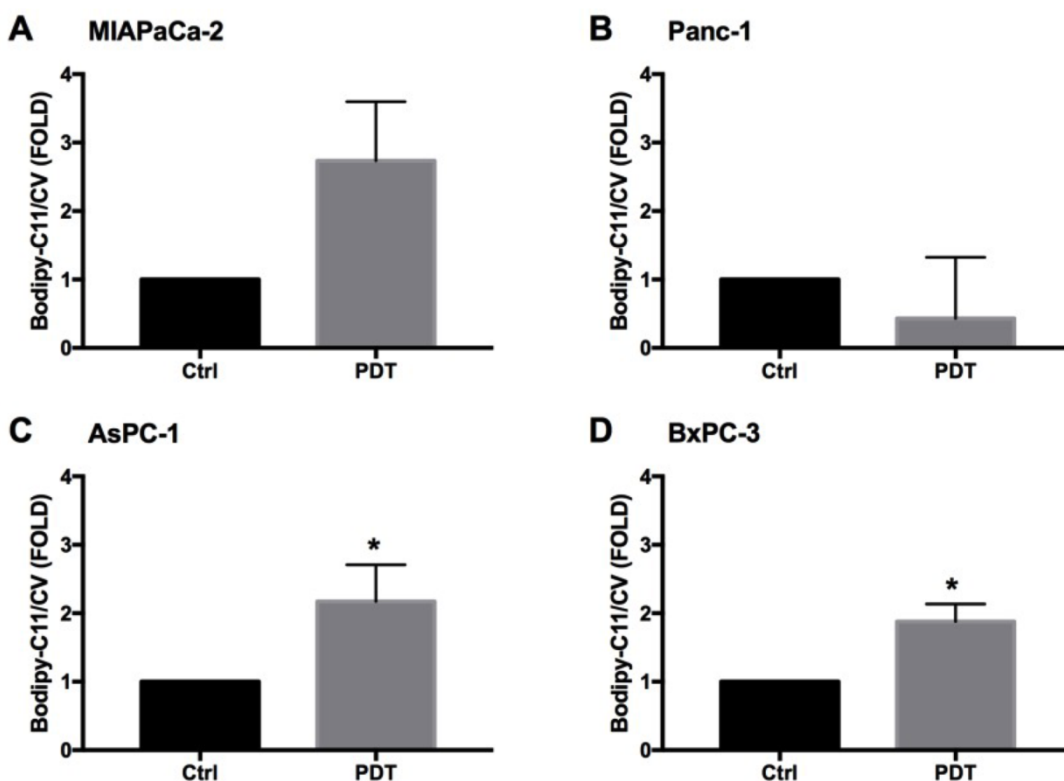


Figura 13. MB-PDT induz um aumento de peroxidação lipídica em células de PDAC. Histogramas das quantificações das intensidades de fluorescência de oxi-Bodipy-C11, normalizada pela incorporação de cristal violeta (CV), nas células MIAPaCa-2 (A), Panc-1 (B), AsPC-1 (C) e BxPC-3 (D) 1 h após o tratamento com MB-PDT. * $p < 0.05$ vs o respectivo controle. Dados são apresentados \pm SEM.

4.7. Suplementação com lipídeos deuterados inibe a morte induzida por MB-PDT em BxPC-3

Os ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) são os principais alvos de peroxidação durante a ferroptose. Já foi demonstrado que a substituição dos hidrogênios alílicos por átomos de deutério resulta em moléculas lipídicas mais resistentes à oxidação (Yang et al., 2016).

A fim de avaliar a importância dos PUFAs na citotoxicidade induzida por MB-PDT, foram realizados ensaios de viabilidade celular por microscopia de fluorescência 24 h após a fototerapia sobre a linhagem BxPC-3, por ser aquela que apresentou a maior sensibilidade à inibição da morte celular por Fer-1 (Fig. 11), submetidas, ou não, ao enriquecimento prévio (24 h antes da irradiação) com 11,11-D2-Lin (D2 PUFA) ou 11,11,14,14- α -D4-Lin (D4 PUFA), contendo dois ou quatro átomos de deutério, respectivamente.

Os resultados apresentados no histograma da parte superior da figura 14 mostram uma menor proporção de morte induzida pelo tratamento naquelas células contendo os lipídeos deuterados quando comparadas às células que não contém lipídeos modificados. Em particular, observou-se que o pré-tratamento com D2 PUFAs protegeu a célula BxPC-3 da morte induzida pela MB-PDT em aproximadamente 33% (MB-PDT: 78% \pm 2; MB-PDT + D2 PUFA: 52% \pm 2, $p < 0,0001$) e, em 43%, no caso do pré-tratamento com D4 PUFAs (MB-PDT: 78% \pm 2 *versus* MB-PDT + D4 PUFA: 44% \pm 3, $p < 0,0001$). Não foram observadas diferenças significativas na porcentagem de células mortas após a modificação nos lipídeos realizada com qualquer dos tipos de compostos deuterados.

No painel interior da figura 14 estão apresentadas as imagens representativas dos núcleos das células marcados com os fluoróforos HO e PI, 24 h após MB-PDT. Nelas, pode ser observada a diminuição da proporção dos núcleos corados com PI (marcando células com permeabilização das membranas celulares) em relação ao número de células coradas com HO (mostrando o número total de células no campo), no caso das células submetidas ao pré-tratamento com D2-PUFAs ou D4-PUFAs

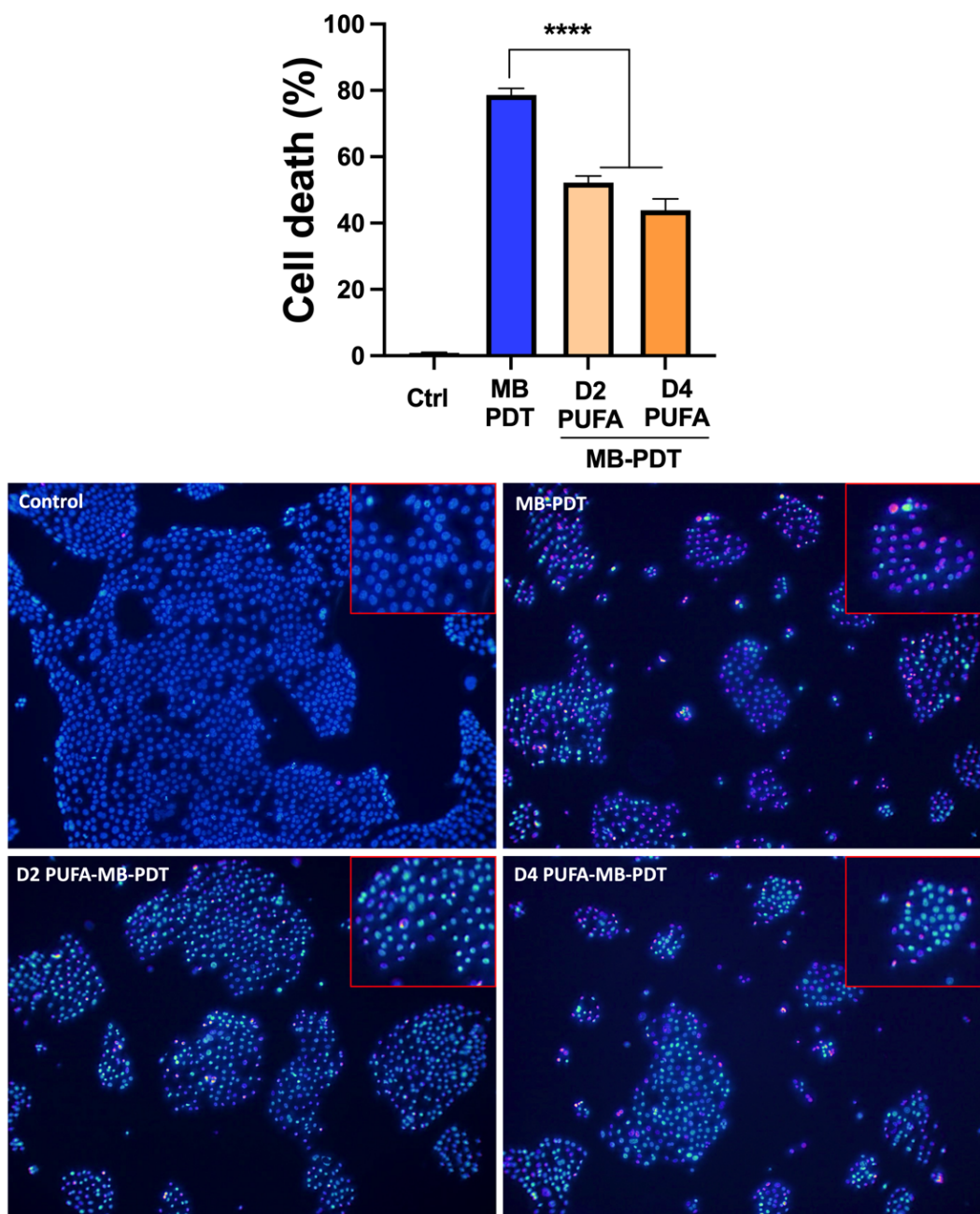


Figura 14. O tratamento com lipídeos deuterados inibe a morte celular induzida por MB-PDT. Histograma (parte superior), e imagens representativas (painel inferior) com as porcentagens de mortes obtidas 24 h após a MB-PDT sobre as células BxPC-3, pré-tratadas, ou não, com lipídeos contendo 2 ou 4 átomos de deutérios por 24 h. **** $p < 0,0001$. Escala = 20 μ M. $n = 3$ experimentos independentes. Dados são apresentados \pm SEM.

4.8. Associação entre sobrevida global de pacientes com PDAC e a expressão de genes envolvidos na resposta antioxidante

A fim de avaliar a possível relevância clínica da morte celular por ferroptose em PDAC, investigamos a associação entre os níveis de expressão de mRNAs que

codificam para proteínas diretamente envolvidas em mecanismos importantes para essa via de morte, como os que codificam para proteínas que tem função na manutenção da homeostase redox dentro das células, como: GPx4, ACSL4, FTH1, SLC7A11, SOD1 e GSR, com a sobrevida global de pacientes com câncer de pâncreas (Fig. 15).

Para isso, foram realizadas análises de correlação de Kaplan-Meier, usando dados de expressão e clínicos do ICGC (PACA-AU). Os dados obtidos mostraram uma significância estatística ($p < 0,05$) apenas para o caso dos genes SLC7A11, SOD1 e GSR. Foi observado que existe uma associação entre menor tempo de sobrevida e valores altos de SLC7A11 (Fig. 15B) e baixos de SOD1 (Fig. 15E) e GSR (Fig. 14F).

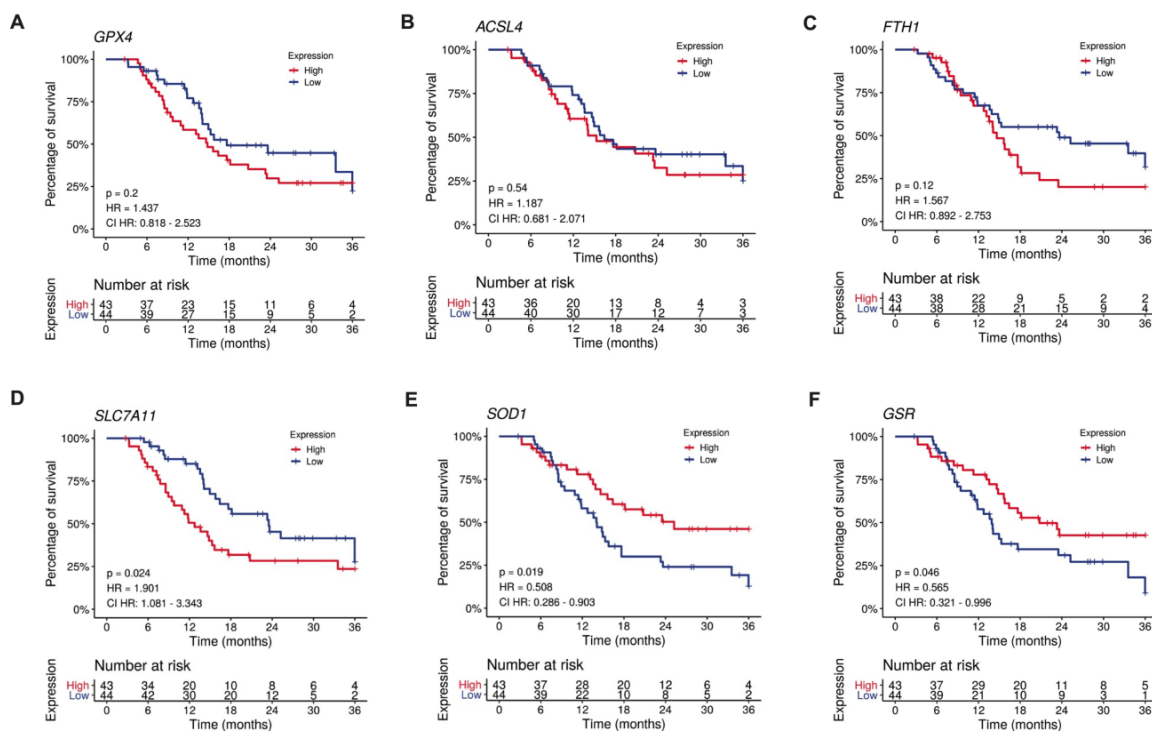


Figura 15: Expressão de genes relacionados com função redox e ferroptose e sua correlação com a sobrevida de pacientes com PDAC. Curvas de Kaplan-Meier de sobrevida de pacientes de PDAC de acordo com a expressão de GPX4 (A), ACSL4 (B), FTH1 (C), SLC7A11 (D), SOD1 (E) e GSR (F), a partir de dados clínicos de pacientes e de expressão gerados a partir de dados do consórcio público ICGC (PACA-AU, $n = 87$). O teste log-rank foi utilizado para verificar a diferença estatística entre as curvas de sobrevida dos casos com alta (“high” acima da mediana) ou baixa (“low”, abaixo da mediana) expressão de cada um dos genes. As razões de risco (HR) foram calculadas em relação ao grupo de expressão “alta” (ou seja, HR > 1 indica que o grupo de expressão mais alta está em maior risco) usando regressão de Cox e um intervalo de confiança de 95%. Valores de $P \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4.9. Análise de dados de RNAseq para a avaliação da expressão de mRNA codificantes de enzimas envolvidas na ferroptose em células componentes de tumores de PDAC e pâncreas normal

A fim de aprofundar o conhecimento sobre a expressão de enzimas importantes no contexto da ferroptose ou com atividades envolvidas em processos redox em subtipos celulares específicos de tumores de pâncreas, nós avaliamos os níveis de mRNA de GPX4, SLC7A11, FTH1, G6PD, GSR e GSS, em 10 tipos celulares detectados no microambiente e integrantes do PDAC e pâncreas normal, usando dados de RNAseq de célula única de 57.530 células de 24 PDACs e 11 pâncreas de controle (41.986 e 15.544, respectivamente), a partir de dados relatados por Peng e colaboradores (Peng et al., 2019).

Os resultados apresentados na figura 16 mostram a presença de genes como GPX4, G6PD, GSR, GSS e SLC7A11, os quais codificam para proteínas envolvidas no contexto da ferroptose, em diferentes subtipos celulares que compõe tanto os tumores, quanto amostras de pâncreas normal. É importante ressaltar que esses transcritos estão menos expressos em outros grupos de células que fornecem suporte e fazem parte do estroma tumoral, como fibroblastos e células estreladas.

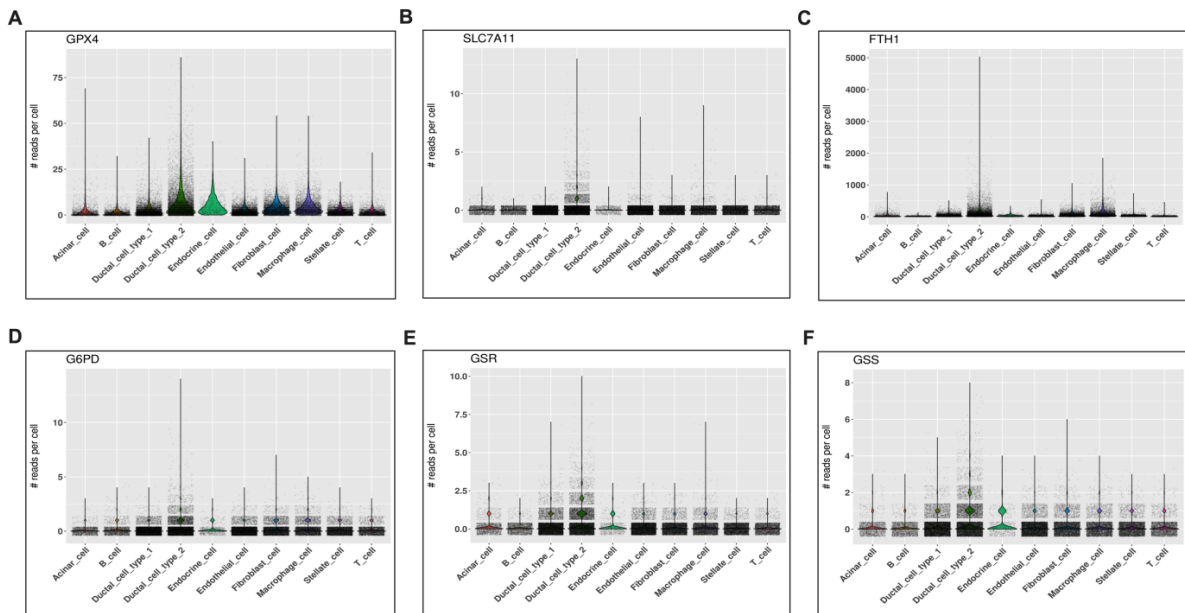


Figura 16: Expressão de genes relacionados com atividade anti-ferroptose e resposta antioxidante em pâncreas normal e em células transformadas dos PDAC humanos. Gráficos de violino mostrando a expressão de GPX4 (A), SLC7A11 (B), FTH1 (C), G6PD (D), GSR (E) e GSS (F) em 10 tipos de células componentes de PDAC ou pâncreas normal (eixo x) relatados na análise de RNA-seq de célula única de 57.530 células de 24 PDAC e 11 amostras pancreáticas não tumoral.

O eixo y mostra a contagem de leitura normalizada/por célula em cada tipo de célula. Os dados de scRNA-seq foram recuperados de GSA (acesso CRA001160).

4.10. A combinação com MB-PDT melhora a eficiência de quimioterápicos no tratamento de PDACs em organoides derivados de pacientes

A fim de avaliar a eficácia da terapia fotodinâmica com o azul de metileno como fotossensibilizador em modelos mais robustos de adenocarcinoma de ducto pancreático, foram utilizados sistemas de organoides derivados de amostras de pacientes com PDAC (PDOs) do hospital da Universidade de Ulm, na Alemanha. Esses modelos apresentam capacidade de fornecer uma estrutura tridimensional (3D) que mimetiza órgãos complexos, oferecendo algumas vantagens em relação ao cultivo em monocamada, incluindo o fornecimento de um cenário que melhor recria o microambiente tumoral *in vivo*, quando comparado ao cultivo em 2D (Frappart et al., 2020).

Durante esta fase do projeto, foram realizados experimentos de viabilidade celular por microscopia de fluorescência após o tratamento com diferentes quimioterápicos utilizados para o tratamento do paciente, combinados, ou não, com a MB-PDT. A influência das vias na morte induzida pela PDT nesses organoides foi avaliada mediante o uso de inibidores farmacológicos de apoptose (z-VAD), necroptose (NSA) e ferroptose (Fer-1) previamente ao tratamento.

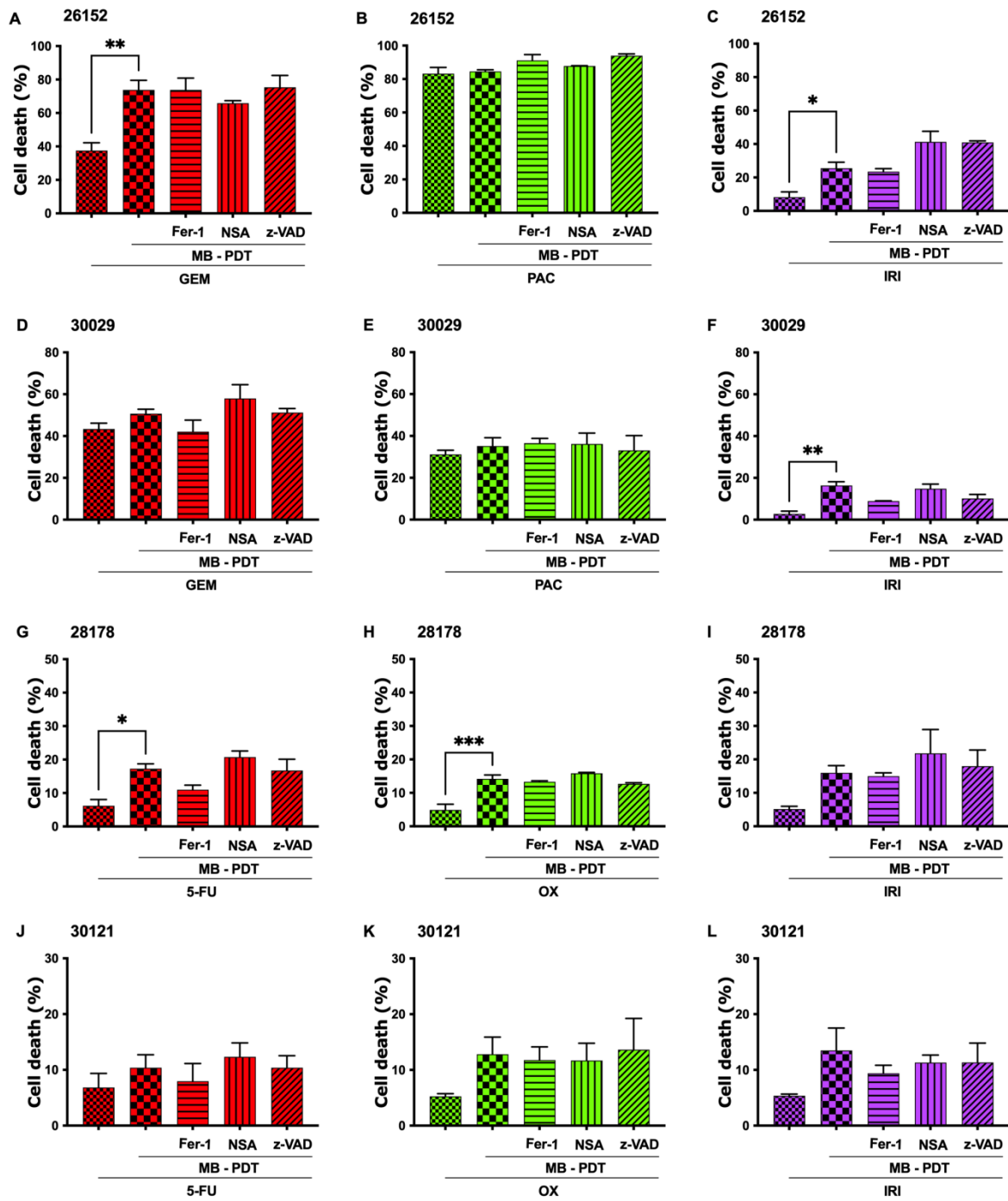
A escolha dos organoides que foram testados nesse estudo se deu com base nos perfis de resposta a diferentes quimioterápicos rotineiramente utilizados para o tratamento do PDAC, os quais foram previamente estabelecidos (Frappart et al., 2020). Um grupo de quatro organoides de pacientes resistentes à quimioterapia foram selecionados com o intuito de avaliar um possível efeito cooperativo entre a MB-PDT e essas drogas. Nesse sentido, foram utilizadas as menores concentrações testadas na caracterização prévia estabelecida por Frappart e colaboradores (2020) para os diferentes quimioterápicos utilizados, a fim de estudar a atuação sinérgica entre as diferentes drogas e a MB-PDT. Os resultados obtidos estão apresentados na figura 17.

Para o organoide 26152, o tratamento combinado com MB-PDT aumentou significativamente a morte celular induzida por gemcitabina (MB-PDT+GEM: 74% ± 6 vs. GEM: 37% ± 5, $p < 0,01$) (Fig. 17A) e irinotecano (MB-PDT+IRI: 25% ± 3 vs. MB-

PDT: $8\% \pm 3$, $p < 0,05$) (Fig. 17C), sem modificar significativamente a resposta observada frente ao tratamento com paclitaxel (Fig. 17B). Imagens representativas desse organoide são fornecidas na figura 17M. Além disso, neste modelo, os tratamentos com Fer-1, NSA ou z-VAD não apresentaram efeito inibitório significativo sobre a morte induzida pela PDT combinada com os fármacos (Fig. 17A-C).

Adicionalmente, a combinação com MB-PDT aumentou significativamente a porcentagem de morte induzida por IRI sobre o organoide 30029 (MB-PDT+IRI: $16,39\% \pm 1,75$ vs. IRI: $2,70\% \pm 1,35$, $p < 0,005$), o qual apresentou resistência ao tratamento com esse quimioterápico isoladamente (Fig. 17D-F). O pré-tratamento com Fer-1 só apresentou uma tendência de diminuição da morte induzida pelo tratamento com MB-PDT+IRI (Fig. 17F), mas não em MB-PDT+GEM (Fig. 16D) ou MB-PDT+PAC (Fig. 17D). Adicionalmente, os pré-tratamentos com NSA ou z-VAD não modificaram a morte induzida pela PDT combinada com nenhum dos três quimioterápicos testados nesse modelo (Fig. 17D-F).

Sobre o terceiro organoide, 28178, a combinação com a MB-PDT promoveu um aumento significativo da morte celular quando foi combinada com 5-FU e OX (MB-PDT+5-FU: $17\% \pm 1$; 5-FU: $6\% \pm 1$, $p < 0,05$) (Fig. 17G) e MB-PDT+OXA (MB-PDT+OXA: $14\% \pm 1$ vs. OXA: $5\% \pm 1$, $p < 0,0005$) (Fig. 17H). Nesse modelo, o tratamento com Fer-1 apresentou uma tendência à inibição da morte induzida por MB-PDT+5-FU (Fig. 17G), mas não pela combinação da MB-PDT+OX (Fig. 17H) ou por MB-PDT+IRI (Fig. 17I). Mais condições deveriam ser testadas para corroborar este resultado.



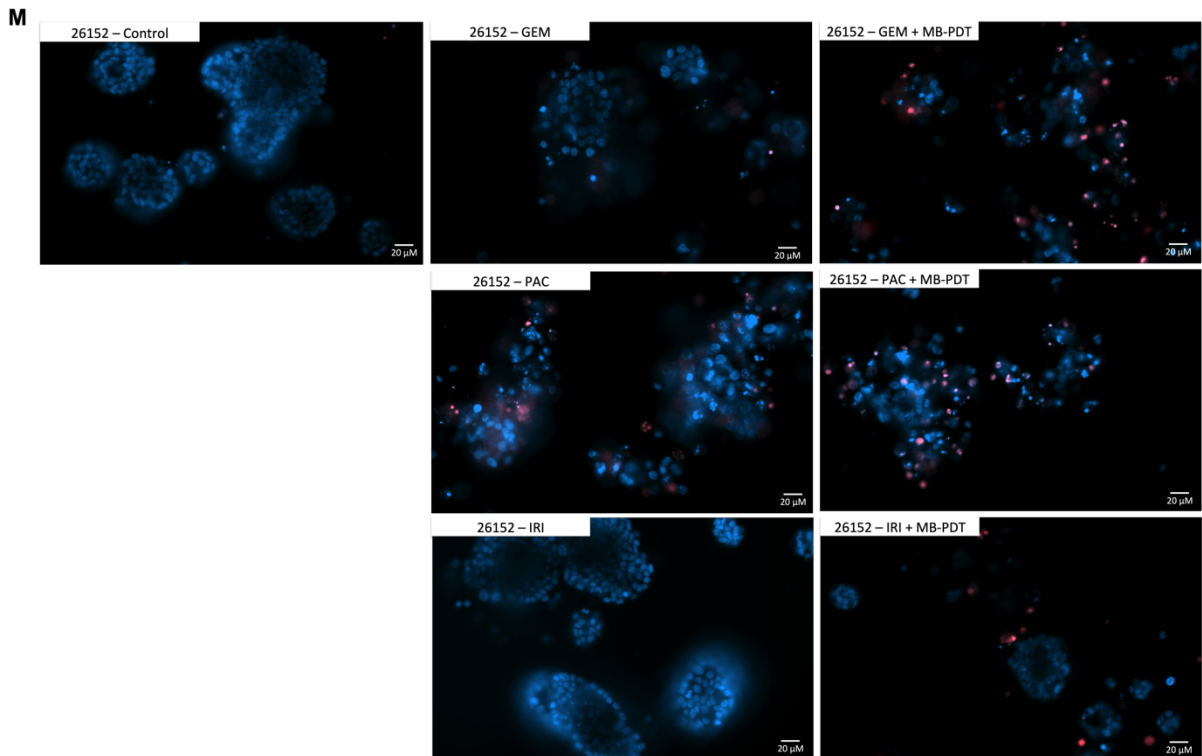


Figura 17. Combinação com MB-PDT aumenta a eficácia de quimioterápicos na indução de morte celular sobre organoides derivados de PDAC humanos. Os histogramas mostram as porcentagens de morte celular (razão entre células positivas para PI e células positivas para HO) obtidas por microscopia de fluorescência 24 h após os tratamentos de organoides derivados das amostras (A-C) 26152, (D-F) 30029, (G-I) 28178 e (J-L) 30121, com (A; D) gemcitabina (GEM), (B; E) paclitaxel (PAC) ou (C; F; I; L) irinotecano (IRI), (G; J) 5-fluorouracil (5-FU) ou (H; K), oxaliplatina (OX) (combinados, ou não, com MB-PDT e pré-tratados, ou não, com Fer-1, NSA ou z-VAD). ***, **; *: $p < 0,0001$; 0,01 e 0,05 respectivamente. $n = 3$ experimentos independentes. (M) Imagens representativas dos organoides 26152 sem tratamento ou tratados apenas com GEM ou GEM+MB-PDT, PAC ou PAC+MB-PDT ou IRI ou IRI+MB-PDT. Escala: 20 μ M. Dados são apresentados \pm SEM.

Adicionalmente, em outro organoide, derivado de um quarto paciente, 30121, o tratamento combinado com MB-PDT não alterou significativamente a morte celular induzida por 5-fluorouracil, oxaliplatina ou irinotecano. Além disso, as porcentagens de morte observadas pela combinação de qualquer das três drogas com a terapia fotodinâmica não sofreram alterações significativas pelos pré-tratamentos com Fer-1, NSA ou z-VAD (Fig. 17J-L).

Em conjunto, os resultados obtidos com a utilização do PDOs confirmam a MB-PDT como uma terapia com potencial para melhorar o tratamento de PDAC e, considerando que as variações nos parâmetros do protocolo de irradiação podem potencializar seus efeitos em linhagens de PDAC (de Almeida et al., 2022), testes com diferentes protocolos de irradiação, poderiam fornecer as condições para potencializar ainda mais a ação da MB-PDT e podem ser exploradas em trabalhos futuros.

5. Discussão

O estudo e desenvolvimento de terapias capazes de induzir diferentes mecanismos de morte celular podem contribuir para melhorar o cenário de tratamento do PDAC, uma vez que aumentam a possibilidade de serem efetivas contra diferentes subpopulações de células (Mishchenko et al., 2022). Nosso grupo mostrou que a MB-PDT é capaz de induzir diferentes vias de morte em tumorais de mama (Dos Santos et al., 2020), além da necroptose em modelos de PDAC (de Almeida et al., 2022). Além disso, nós identificamos, previamente, a localização lisossomal do azul de metileno nessas linhagens de tumores de pâncreas (de Almeida et al., 2022). Considerando-se a meia-vida muito curta das espécies oxidantes geradas pela MB-PDT (Bacellar et al., 2015), é razoável especular que no processo de fotossensibilização os danos oxidativos devem atingir inicialmente essa organela e seu conteúdo ser liberado para o citosol dessas células.

Os lisossomos desempenham um papel fundamental na homeostase e no tráfego celular de ferro. Por serem as primeiras organelas a receber o ferro extracelular importado pela via endocítica e as responsáveis pela sua redução a ferro ferroso (Fe^{2+}), formato no qual esse metal sofre translocação intracelular, transporte inter-membranar e incorporação em proteínas das quais participa da estrutura. O dano lisossomal pode desencadear um aporte de ferro no seu estado redox ativo para o citoplasma, o qual pode causar sérios danos oxidativos às células e culminar com a ativação da ferroptose nesses sistemas (Rizzollo et al., 2021). No presente trabalho, nós mostramos que o conteúdo basal de ferro lábil é significativamente menor em Panc-1, linhagem onde não se observou aumento de peroxidação lipídica e inibição da morte celular por Fer-1. Em contrapartida, nas células BxPC-3, nas quais foram observados os mais altos níveis de ferro lábil, a MB-PDT induziu aumento da peroxidação lipídica e o pré-tratamento com Fer-1 foi capaz de inibir a morte celular pós-tratamento.

É interessante ressaltar que, em função de sua reatividade, o ferro que está transitoriamente presente no citoplasma precisa ser quelado pelo grupo tiol livre da glutathiona na sua forma reduzida (GSH) (Hider & Kong, 2011). Além disso, a formação de um complexo de quelação envolvendo Fe^{2+} e a GSH (Fe(II)-GSH) é necessária para a atuação da metalochaperona PCBP-1, proteína que incorpora o ferro à ferritina (para seu armazenamento seguro) e a outras enzimas citoplasmáticas contendo esse metal em sua estrutura (Patel et al., 2019; Philpott et al., 2017). No cenário pós-MB-PDT, no qual há uma depleção dos níveis de GSH disponíveis (de Almeida et al.,

2022), todo esse mecanismo envolvido na homeostase do ferro pode estar comprometido, o que pode favorecer o desencadeamento da ferroptose.

No presente estudo, mostramos que a citotoxicidade da MB-PDT é mediada, ao menos em parte, pela indução de ferroptose em três linhagens de PDAC humanas, MIAPaCa-2, AsPC-1 e BxPC-3. Estes resultados foram confirmados pela análise do conteúdo de ferro lábil intracelular nas diferentes linhagens de PDAC. Além disso, mostramos não só que a MB-PDT foi capaz de modular a expressão de enzimas antioxidantes, favorecendo um cenário de indução da morte celular por ferroptose, exceto em Panc-1 (linhagem com menor conteúdo de LIP intracelular), mas também que o fenômeno pode ser inibido por Fer-1 ou pelo pré-tratamento das células com lipídeos poli-insaturados deuterados. Finalmente, ao avaliarmos a eficiência da terapia em modelos mais complexos e que melhor mimetizassem o cenário tumoral *in vivo*, foi observado que a ação da MB-PDT combinada com diferentes quimioterápicos sobre organoides derivados de pacientes com PDAC pode promover um maior efeito citotóxico do que o quimioterápico isoladamente.

Diversos estudos têm mostrado que a utilização de indutores clássicos de ferroptose, como erastina e RSL-3, ou outras estratégias moleculares que desencadeiem essa via de morte, podem melhorar a eficiência e contornar a barreira de resistência de diferentes tumores à quimioterapia ou radioterapia (Daher et al., 2019; L. Jiang et al., 2015). Nesse sentido, a busca por terapias que sejam capazes de desencadear essa via em células resistentes a outros mecanismos clássicos de morte pode representar uma alternativa interessante para o estabelecimento de estratégias mais eficientes para eliminar células tumorais.

Neste cenário, a terapia fotodinâmica tem sido pouco explorada, estando as poucas abordagens disponíveis na literatura atualmente focadas em utilizar esta terapia como terapia adjuvante, visto que ela apresenta como característica principal a capacidade de induzir estresse oxidativo, para potencializar a ação de indutores canônicos de ferroptose (erastina, por exemplo) em modelos tumorais (Du et al., 2021; Zhu et al., 2019). Assim, explorar a capacidade da terapia fotodinâmica em ativar a morte celular por ferroptose pode criar novas oportunidades mais efetivas de tratamentos para essa doença. Aqui, nós mostramos que MB-PDT é capaz, mesmo na ausência de ativadores clássicos da ferroptose, de induzir essa via de morte em diferentes linhagens de tumores de pâncreas. Esses resultados apontam que a terapia fotodinâmica com o azul de metileno poderia ser utilizada como ferramenta para

induzir ferroptose em PDAC, o que representa uma vantagem visto que esses tumores são, em sua maioria, resistentes à apoptose (Campani et al., 2001; Song et al., 2017).

A ferroptose é entendida como um processo que envolve elementos de intersecção entre o metabolismo do ferro, lipídeos e aminoácidos (Stockwell et al., 2017; Stockwell & Jiang, 2020). Nosso grupo mostrou, em trabalho anterior, que a MB-PDT é capaz de modular a expressão de proteínas antioxidantes, de interferir no conteúdo de GSH e induzir ferroptose em modelos tumorais de mama (Dos Santos et al., 2020). Em modelos de PDAC, nós havíamos mostrado que a MB-PDT induz um aumento do estresse oxidativo, e é capaz de depletar os níveis de GSH em diferentes linhagens (de Almeida et al., 2022). Uma vez que a diminuição no pool de GSH nas células é um parâmetro largamente correlacionado com a morte celular ferroptótica (Stockwell et al., 2017), as observações prévias feitas por nosso grupo representaram um importante indício de que essa via de morte pudesse estar sendo acionada pela MB-PDT nas linhagens de PDAC. Com base nisso, nós avaliamos os níveis proteicos de diferentes enzimas antioxidantes ou envolvidas no metabolismo do ferro e de lipídeos em dois cenários: em condições basais, e após o tratamento com a MB-PDT.

A depleção das defesas antioxidantes sensibiliza células à ferroptose. Nesse sentido, a expressão de GPx4 tem sido evidenciada como outro importante fator para a determinação da morte por ferroptose (Stockwell et al., 2017). Nossos resultados indicaram que Panc-1 apresenta o menor nível de expressão basal dessa enzima, dentre as quatro linhagens de PDAC estudadas. Esse resultado poderia ser um indicativo de uma maior pré-disposição dessa linhagem à morte por ferroptose. Contrariamente ao esperado, a morte celular induzida pela MB-PDT não foi inibida pelo tratamento com Fer-1 nestas células. Assim, reforça-se a ideia de que o somatório dos fatores que envolvem o contexto molecular basal e suas modificações após o foto-tratamento, o que inclui desde a modulação da expressão de diferentes proteínas com funções relacionadas a processos antioxidantes após a MB-PDT, até os níveis de ferro lábil intracelular e de enzimas envolvidas no metabolismo desse íon sobre esta linhagem, seriam os responsáveis pela sua resistência à essa via de morte.

Todas as células precisam manter a homeostase redox como requisito para a manutenção da sua viabilidade e da apropriada execução de suas funções. Nas células tumorais, tal requerimento também é válido, e o equilíbrio redox é imprescindível para promover processos como crescimento, invasão e metástase (Cao et al., 2021; Y. Zhang et al., 2022). A G6PD desempenha um importante papel

nesse processo de manutenção da homeostase redox nas células, por meio de uma intrincada rede de mecanismos moleculares. Nossos resultados mostraram que a linhagem Panc-1, a qual não teve a morte celular induzida pela MB-PDT inibida por Fer-1, apresentou elevados níveis de G6PD em condições basais e tem a expressão dessa enzima aumentada a partir da terceira hora pós-irradiação, com pico máximo de expressão 24 h após o tratamento.

Em termos mecanísticos, a terapia fotodinâmica induz à produção de espécies pro-oxidantes, as quais podem reagir com diferentes classes de biomoléculas como DNA, proteínas e lipídeos, oxidando-as, à expensa de alterações que comprometem estrutural e funcionalmente essas macromoléculas (Donohoe et al. 2019; Dos Santos et al. 2019). Em trabalho prévio, nosso grupo mostrou que a MB-PDT aumenta a geração de espécies oxidantes em linhagens de PDAC (de Almeida et al., 2022). A geração de estresse oxidativo intracelular pode induzir um aumento da razão $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$, como resultado do consumo do NAPH pelos sistemas antioxidantes (a atividade da GR, por exemplo) (Jiang et al., 2014). Quando em maior concentração no citosol, o NADP^+ estimula a atividade de G6PD, uma vez que compete com o NADPH pelo sítio ativo desta enzima, passando a ocupá-lo (Jiang et al., 2014). Nesse sentido, a ausência de aumento da peroxidação lipídica observada nas células Panc-1, assim como o alto nível proteico basal de G6PD, aliada a um aumento da expressão desta enzima após a MB-PDT, sugerem que essa linhagem deve ser capaz de acionar uma resposta antioxidante eficiente e, portanto, com melhor capacidade para evitar o aumento da peroxidação lipídica, uma característica típica nas células que morrem por ferroptose (Stockwell et al., 2017).

O papel da G6PD no contexto da ferroptose tem sido explorado em diferentes cenários, e sua função dúbia tem sido reportada na literatura (Zheng & Conrad, 2020). Essa enzima tem sido associada à modulação positiva da ferroptose em contextos nos quais são utilizados indutores clássicos dessa vida de morte, erastina e (1S, 3R)-RSL3 (RSL3), moléculas que inibem o sistema antiporte x_c^- e a atividade de GPx4, respectivamente (Dixon et al., 2012; M. Gao et al., 2016). Nesse cenário, quando um dos principais sistemas antioxidantes inibidores da ferroptose está inibido, o NADPH produzido na via das pentoses-fosfato, em células com maior expressão de G6PD, aumentaria a produção de radicais ânions superóxidos pelas enzimas da família NOX (*NADPH oxidases*), impulsionando a morte ferroptótica (Dixon et al., 2012; M. Gao et al., 2016). Por outro lado, a função anti-ferroptose da G6PD tem sido explorada em

diferentes células tumorais (Dos Santos et al., 2020; Cao et al., 2021). No contexto da PDT, a participação da G6PD no cenário de mortes celulares não-apoptóticas permanece ainda pouco explorada. No presente trabalho, nós mostramos que, em um cenário onde se fornece uma fonte abundante de ROS, formados como produtos da ação da PDT, o aumento de G6PD se correlaciona com uma melhor capacidade antioxidante que pode ser decisiva para a evasão da morte por ferroptose em modelos de PDAC. Assim, nesse contexto de utilização da MB-PDT sobre o PDAC, nossos resultados apontam, de forma pioneira, uma função anti-ferroptótica da G6PD.

Como mencionado anteriormente, o aumento da peroxidação lipídica é um evento característico na ferroptose. Esse fenômeno tem sido largamente observado quando se induz essa via de morte, e a presença de ACSL4 tem sido determinante para que o processo ocorra (Zheng e Conrad 2020; Dos Santos et al., 2020). No presente trabalho, nós mostramos que a MB-PDT induz um aumento significativo da peroxidação lipídica em células AsPC-1 e BxPC-3 em concordância com a maior expressão de ASCL4 nessas linhagens. De fato, essa enzima é identificada como uma reguladora positiva da ferroptose, uma vez que o aumento da sua expressão sensibiliza células à morte ferroptótica, ao passo que a diminuição (*knockdown*) dessa enzima confere resistência à essa via de morte por células tumorais (Yuan et al., 2016).

Mecanicamente, ASCL4 atua ativando ácidos graxos de cadeia longa $\omega 6$ poli-insaturados, etapa necessária para a posterior esterificação destes em lipídeos componentes das membranas biológicas. O aumento deste tipo de ácidos graxos poli-insaturados está correlacionado com o aumento da propensão à peroxidação e, como consequência, à morte das células por ferroptose (Doll et al., 2017). De acordo com este parâmetro, linhagens com maiores níveis proteicos desta enzima, deveriam apresentar maior sensibilidade às terapias que induzem ferroptose. Nossos resultados mostraram que AsPC-1 e BxPC-3 são altamente sensíveis ao tratamento com MB-PDT, via ativação da ferroptose. Este efeito pode ser inibido significativamente pelo pré-tratamento com Fer-1 nas duas linhagens celulares. É importante pontuar, no entanto, que a análise do perfil lipídico das membranas celulares e dos produtos de oxidação dessas moléculas, após a terapia, por lipidômica e oxilipidômica, respectivamente, pode fornecer informações adicionais que auxiliariam em uma caracterização molecular mais robusta da ação da MB-PDT via ferroptose nesses modelos.

A substituição de PUFA's por ácidos graxos poli-insaturados que apresentam deutério, substituindo os átomos de hidrogênio das posições bis-álílica (D-PUFA's) nesses lipídeos, é capaz de inibir a morte por ferroptose induzida por erastina em células tumorais (Yang et al., 2016) e proteger outros modelos de doenças neurodegenerativas contra os efeitos danosos da peroxidação lipídica (Cotticelli et al., 2013; Shchepinov et al., 2011). No presente estudo, a suplementação com os lipídeos deuterados inibiu em até 43% a morte desencadeada pela PDT, um efeito semelhante à ação do inibidor clássico da ferroptose, Fer-1, reforçando a importância desta via de morte na ação dessa terapia sobre esses modelos de PDAC.

A resistência às vias clássicas de morte celular é uma característica frequentemente reportada no câncer e um dos grandes desafios no desenvolvimento de terapias efetivas (Hanahan, 2022). Ao longo das últimas décadas, um número crescente de pesquisas focadas na compreensão das peculiaridades moleculares do PDAC tem apontado para um número considerável de potenciais alvos para o desenho de diferentes intervenções terapêuticas (Russell et al., 2015). Entretanto, esse maior número de opções pouco refletiu em mudanças no cenário de tratamento dessa doença nas últimas décadas (Mueller et al., 2018). É importante ressaltar que, no presente trabalho, também foram avaliadas, por meio de inibição farmacológica, a participação de outras vias de morte celular no contexto da PDT sobre as linhagens de PDAC. Interessantemente, foi observado que a morte celular induzida por MB-PDT nas células da linhagem Panc-1 não se deve à indução de ferroptose, apoptose ou morte celular dependente da permeabilização do lisossomo. Dessa forma, fica evidenciado que, em alguns casos, os efeitos citotóxicos da MB-PDT são outros, diferentes dos estudados neste trabalho. Além das vias descritas até aqui, outras modalidades de morte celular têm sido associadas à PDT sobre células tumorais, catástrofe mitótica e parthanatos, são exemplos dessas vias de morte (Mishchenko et al., 2022). Assim, mais investigações seriam necessárias para se definir qual, ou quais, outro(s) mecanismo(s), estão sendo ativados pela MB-PDT nessas células.

Uma das principais razões para as limitações no tratamento do PDAC é a considerável heterogeneidade intra e intertumoral, visto que esses tumores englobam dezenas de subclones que apresentam resistência e escapam dos tratamentos, normalmente alvo específicos ou que afetam a replicação do DNA e ativam apoptose, limitando os resultados e colaborando para o prognóstico desfavorável dessa doença (Juiz et al., 2020; Mueller et al., 2018). Além disso, a exposição a diferentes

quimioterápicos pode selecionar subpopulações resistentes que são mais agressivas e com maior capacidade de invasão, as quais são responsáveis por eventos de recidiva tumoral e metástases. Dessa forma, o desenho de novas terapias deve considerar a necessidade de abranger diferentes subtipos clonais, considerando suas variações moleculares, fenotípicas e de marcadores de resistência à vias de morte (Santofimia-Castaño & Iovanna, 2021). No presente trabalho, nós mostramos a participação da ferroptose, alternativamente à apoptose, na morte causada pela MB-PDT nas células de PDAC.

Diversas abordagens, considerando critérios morfológicos e moleculares, têm sido utilizadas para estabelecer classificações de subtipos de PDAC, a fim de possibilitar diagnósticos e prognósticos mais precisos e, potencialmente, melhorar a personalização dos tratamentos direcionados a subgrupos específicos. Com base em análise transcriptômica, estudos recentes têm classificado o PDAC em dois tipos principais: “*classical-like*”, com alta expressão de marcadores epiteliais, maior diferenciação celular e associado aos prognósticos mais favoráveis, ou, “*basal-like*”, com mais marcadores mesenquimais, pouca diferenciação e associado à menor sobrevida global dos pacientes (Martens et al., 2019).

É importante pontuar que, tanto no presente trabalho quanto em trabalho anterior, nós temos utilizado diferentes linhagens de PDAC cultivadas em monocamada. Seguindo esses critérios moleculares de análises de transcriptoma, as linhagens AsPC-1 e BxPC-3 têm sido classificadas como “*classical-like*”, enquanto MIAPaCa-2 e Panc-1 são identificadas como “*basal-like*” em diferentes estudos (Dijk et al., 2020; Schmidtlein et al., 2021).

No presente trabalho, nós observamos que a expressão de pelo menos um importante componente pró-ferroptose, ACSL4, é distinta entre os dois grupos celulares, sendo maior sua expressão nas células “*basal-like*”, BxPC-3 e AsPC-1. Interessantemente, como nós havíamos mostrado anteriormente, a expressão proteica basal de componentes de outra via de necrose regulada, a necroptótica, seguiu um padrão distinguível entre os dois grupos de células: mais expressas nas células “*classical-like*” e menos expressas nas “*basal-like*” (de Almeida et al., 2022). No contexto da MB-PDT, quando submetidas a protocolos de irradiação com menores taxas de fluência de energia, esses dois grupos de células também respondem de forma diferencial à terapia, tendo sido as células “*classical-like*” (AsPC-1 e BxPC-3)

mais susceptíveis, enquanto as “*basal-like*” (MIAPaCa-2 e Panc-1) foram menos responsivas ao tratamento.

Dessa forma, é possível especular a existência de uma relação entre o padrão de expressão de marcadores de diferentes vias de morte celular, além da apoptose, e os subtipos de PDAC, sendo as células “*basal-like*” mais deficientes na expressão da maquinaria de morte, o que as torna menos sensíveis aos tratamentos. Estudos que explorem de forma aprofundada essa possibilidade podem ajudar a estabelecer novas abordagens direcionadas aos subtipos específicos e a estabelecer protocolos de PDT mais eficientes para cada subgrupo, considerando seus perfis de marcadores para vias de morte celular.

Em pacientes, GPX4, G6PD, GSR, GSS e SLC7A11 estão expressos em diferentes células do microambiente tumoral e do pâncreas normal. A baixa expressão de genes que apresentam função anti-ferroptótica, por exemplo em células que fornecem suporte ao tumor, poderia implicar em vantagens para o tratamento testado e contribuir para uma maior efetividade de terapias que desencadeiem a ferroptose. Dessa forma, a utilização de modelos mais sofisticados e com maior proximidade com o cenário real dos tumores pode oferecer uma perspectiva mais sólida do que a PDT poderia representar em um cenário clínico.

In vivo, a heterogeneidade intratumoral do PDAC e a complexa rede de sinalização parácrina entre as células cancerosas e células componentes do estroma, como os CAFs (*cancer-associated fibroblasts*), as PSCs (*pancreatic stellate cells*) e células do sistema imune, por exemplo, criam um microambiente que dá suporte e favorece o crescimento tumoral, influenciando no fornecimento das condições que possibilitam eventos de quimioresistência, de invasão e metástases (Shinkawa et al., 2022). Nesse sentido, deve-se considerar que a utilização de modelos progressivamente mais complexos e que melhor recapitulem esse microambiente tumoral pode fornecer evidências pré-clínicas mais robustas e mais próximas do cenário de resposta às potenciais terapias por organismos complexos, devendo essa abordagem preceder a translação de qualquer intervenção terapêutica para prática médica.

O cultivo de células em 3D, em organoides derivados de amostras tumorais obtidas de pacientes com PDAC, tem sido identificado como uma plataforma eficiente para a predição de respostas a quimioterápicos, por mimetizar o microambiente tumoral e recapitular características morfológicas e a assinatura de expressão de

proteínas correspondentes aos tumores de origem *in vivo* (Frappart et al., 2020). Utilizando essa plataforma de cultivo de PDOs (*pancreatic derived organoids*), nós identificamos que a combinação com a MB-PDT potencializa o desempenho de diferentes quimioterápicos na indução de morte dos organoides. Entretanto, a morte celular induzida pela combinação da MB-PDT com os diferentes quimioterápicos testados não foi inibida pelo pré-tratamento com inibidores de necroptose, ferroptose ou apoptose. Esses resultados sugerem que outros mecanismos de morte podem estar envolvidos na citotoxicidade da MB-PDT sobre PDAC quando combinada com outros agentes citotóxicos nesses modelos mais complexos, que incluem componentes de matriz.

Além disso, é importante ressaltar que as imagens obtidas por microscopia de fluorescência revelaram uma alteração na arquitetura dos organoides, 24 h após o tratamento com a MB-PDT combinada com os diferentes quimioterápicos. Nessas imagens foram observadas células individuais e ausência de formação das estruturas esféricas em organoides após o tratamento. Considerando-se que, *in vivo*, o estroma rico e desmoplásico do PDAC é fundamental para dar suporte ao tumor e impulsionar eventos de quimioresistência, e que agentes que desestabilizam a arquitetura do estroma apresentam efeitos anti-tumorais importantes (Bazan-Peregrino et al., 2021), os dados aqui apresentados podem indicar que a MB-PDT, por alterar a arquitetura tumoral, apresentaria impacto adicional na desestabilização do PDAC, favorecendo a ação de quimioterápicos sobre esses tumores, o que reforça o potencial da MB-PDT como adjuvante no tratamento dessa doença.

Estudo recente em modelos de camundongos de carcinoma de células escamosas, SCC (no formato de lesões ortotópicas induzidas por UV e tumores subcutâneos A431 e 4T1), mostrou que o pré-tratamento com 5-FU por 3 dias, seguido de tratamento com ALA (5-aminolevulínico, um precursor para a síntese de protoporfirina IX – PpIX –) por 4 horas, levou ao aumento significativo nos níveis de PpIX no tumor e a citotoxicidade pós-irradiação. Os autores observaram que a combinação com o quimioterápico modulou a expressão de enzimas-chave na via de síntese do grupo heme, incluindo a regulação positiva da coproporfirinogênio oxidase e negativa de ferroquelatase. No mesmo estudo, foi reportado um aumento nos níveis de p53 em tumores pré-tratados com 5-FU, e que mesmo nos modelos de A431, que apresenta uma forma mutante p53, o efeito neoadjuvante de 5-FU foi significativo. Além disso, o pré-tratamento com 5-FU mesmo em células que são completamente

deficientes de p53, tumores 4T1, levou ao aumento significativo da morte celular nesses modelos (Anand et al., 2017). Aqui, nós mostramos que a MB-PDT foi capaz de modular a expressão de diferentes proteínas com função redox e que há uma sinergia da MB-PDT com diferentes quimioterápicos, a qual aumenta a susceptibilidade de diferentes organoides derivados de PDAC à morte.

A combinação da PDT com quimioterápicos, incluindo o 5-FU, tem sido explorada no contexto de tratamento de outros tumores do trato gastrointestinal (GI). Um estudo piloto em 140 pacientes com câncer esofagocárdico avançado utilizando um fotossensibilizador da classe das porfirinas (fotocarcinorina) mostrou que a taxa de remissão tumoral no grupo PDT combinado com a quimioterapia local com 5-FU foi significativamente maior do que no grupo PDT sozinho. A combinação dos tratamentos também melhorou o tempo médio de sobrevivência dos pacientes, que foi mais de 6 meses maior no grupo que recebeu a combinação do que no do grupo que recebeu a PDT sozinha. Esse estudo clínico confirmou resultados prévios *in vitro* e em modelos animais pré-clínicos que indicavam que o pré-tratamento com 5-FU melhorava a eficiência da PDT sobre esses tumores (Zhang et al. 2007). Dentre os efeitos adversos reportados no estudo, entretanto, estão problemas de pele decorrentes da exposição ao sol nas semanas seguintes ao tratamento com a PDT, um dos problemas dos fotossensibilizadores já utilizados na clínica atualmente e que apresentam meia-vida longa e metabolização lenta (Zhang et al., 2007). Aqui, nós mostramos que a combinação da terapia fotodinâmica com o azul de metileno como fotossensibilizador com quatro, dos cinco quimioterápicos testados, GEM, IRI, OX e 5-FU melhora a efetividade das quimioterapias sobre organoides de pacientes com PDAC. É importante ressaltar que o MB não apresenta citotoxicidade no escuro, mesmo quando aplicado sistemicamente; é de rápida metabolização e aprovado pela FDA e outras agências regulamentadoras para uso clínico no tratamento de outras patologias.

Adicionalmente, diversos trabalhos têm explorado a combinação da PDT com outras terapias para o tratamento de diferentes tipos de cânceres, incluindo o câncer de pâncreas. Dentre elas, o desenvolvimento de nano-complexos que tornem os fotossensibilizadores mais específicos para as células tumorais, metodologias para viabilizar o aumento do aporte de oxigênio nos tumores durante a aplicação da PDT ou no desenvolvimento de dispositivos mais eficientes para o delivery de luz em tumores sólidos, como os PDAC (Kim et al., 2021; H. Yang et al., 2021).

Uma vez que o uso clínico da PDT não compromete a possibilidade de aplicação de outras terapias, a investigação de seus efeitos quando combinada com diferentes abordagens terapêuticas, inclusive sobre modelos animais, pode melhorar a possibilidade de eliminação desses tumores de difícil tratamento e fornecer as evidências necessárias para justificar sua translação futura para testes clínicos. Esse cenário é uma das perspectivas que ganha ainda mais robustez a partir deste trabalho. Nesse sentido, o uso da MB-PDT pode ser explorado em combinação com terapias alvo-específicas. Diferentes inibidores de AURKA (Aurora quinase A), por exemplo, estão sendo avaliados em ensaios clínicos que incluem pacientes com PDAC (NCT01924260, NCT04085315, NCT04555837 e NCT04479306) (Chen et al., 2021). Essa enzima encontra-se superexpressa nesses tumores (Gomes-Filho et al., 2020) e pode atuar regulando negativamente a necroptose, via fosforilação do glicogênio sintase quinase 3 β (GSK3 β) em resíduo de Ser9 que previne a ativação do complexo RIPK3–MLKL e a formação do necrossomo em células de PDAC (Xie et al., 2017). Visto que a MB-PDT é capaz de ativar a necroptose em diferentes modelos de PDAC, como mostramos em trabalho prévio (de Almeida et al., 2022), sua combinação com AURKA poderia potencializar a destruição dessas células.

Os dados aqui apresentados ampliam o entendimento sobre o leque de mecanismos moleculares que são desencadeados pela terapia fotodinâmica sobre modelos de adenocarcinoma pancreáticos, e reforçam seu potencial como adjuvante no tratamento dessa doença, visto que ela foi capaz de eliminar diferentes subpopulações celulares, incluindo aquelas resistentes à apoptose. Além disso, nossos resultados indicam que a atuação da MB-PDT é capaz de ativar diferentes mecanismos de morte celular simultaneamente, o que parece ser decisivo para sua maior efetividade e citotoxicidade sobre esses tumores. Além disso, uma vez que o uso clínico da PDT não compromete a possibilidade de aplicação de outras terapias, investigar seus efeitos combinados com diferentes abordagens terapêuticas, inclusive sobre modelos mais complexos, como em animais, pode melhorar a efetividade para a eliminação desses tumores de difícil tratamento e fornecer as evidências necessárias para justificar sua elegibilidade para translação futura para testes clínicos. Nesse sentido, todo o nosso esforço está focado em prover alternativas terapêuticas que possam impactar positivamente tanto na sobrevida quanto na qualidade de vida do paciente portador de PDAC.

6. CONCLUSÃO

Os tumores do tipo PDAC apresentam escassez de tratamentos efetivos, crescente incidência e alta mortalidade associada. No presente trabalho, nós investigamos a capacidade da MB-PDT, uma alternativa de tratamento promissora, de baixo custo, pouco invasiva e ainda pouco explorada no contexto do câncer de pâncreas, em ativar a ferroptose em linhagens de PDAC de diferentes subtipos moleculares. Além disso, nós avaliamos o potencial efeito sinérgico da MB-PDT com diferentes quimioterápicos utilizados para o tratamento clínico dessa doença em modelos de organoides derivados de pacientes com PDAC. Por meio de ensaios de viabilidade celular em monocamada ou em 3D e inibição farmacológica de diferentes vias de morte, foi possível concluir que a MB-PDT é eficiente em eliminar células de PDAC de diferentes subtipos, ativando múltiplos mecanismos de morte celular simultaneamente, especialmente mecanismos não-apoptóticos, com destaque para a ferroptose e a necroptose. Além disso, apontamos, de forma inédita, que a MB-PDT aumenta a susceptibilidade de organoides derivados de pacientes com PDAC à morte, por meio de sua atuação sinérgica com diferentes quimioterápicos, o que sugere que a terapia pode fornecer uma possibilidade de reduzir as altas doses de quimioterápicos utilizadas atualmente e, assim, minimizar os efeitos colaterais desencadeados por essas drogas nos pacientes. Em conjunto, os dados aqui apresentados fornecem evidências moleculares da participação da ferroptose na citotoxicidade da MB-PDT sobre o PDAC, de formar célula dependente e apontam seu potencial como adjuvante à quimioterapia. Esses resultados sugerem que, na clínica, a MB-PDT poderia contribuir para melhorar o tratamento dos pacientes com PDAC. Finalmente, no âmbito da pesquisa básica sobre os efeitos da PDT, nosso estudo aprofunda a compreensão sobre as respostas intracelulares moleculares desencadeadas pela MB-PDT em modelos de PDAC e abre uma nova possibilidade para desenvolver aplicações *in vivo* visando ampliar as opções disponíveis para os pacientes, incluindo aqueles que não são elegíveis para o tratamento padrão.

REFERÊNCIAS

- Agostinis, P., Berg, K., Cengel, K. A., Foster, T. H., Girotti, A. W., Gollnick, S. O., Hahn, S. M., Hamblin, M. R., & Juzeniene, A. (2011). Photodynamic therapy of cancer: an update. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *61*(4), 250–281. <https://doi.org/10.3322/caac.20114.PHOTODYNAMIC>
- Anand, S., Rollakanti, K. R., Brankov, N., Brash, D. E., Hasan, T., & Maytin, E. v. (2017). Fluorouracil enhances photodynamic therapy of squamous cell Carcinoma via a p53-independent mechanism that increases protoporphyrin IX levels & tumor cell death. *Molecular Cancer Therapeutics*, *16*(6), 1092–1101. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-16-0608>
- Ansari, D., Gustafsson, A., & Andersson, R. (2015). Update on the management of pancreatic cancer: Surgery is not enough. *Em World Journal of Gastroenterology* (Vol. 21, Issue 11, p. 3157–3165). WJG Press. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i11.3157>
- Bacellar, I. O. L., Tsubone, T. M., Pavani, C., & Baptista, M. S. (2015). Photodynamic efficiency: From molecular photochemistry to cell death. *International Journal of Molecular Sciences*, *16*(9), 20523–20559. <https://doi.org/10.3390/ijms160920523>
- Bailey, P., Chang, D. K., Nones, K., Johns, A. L., Patch, A., Gingras, M., Miller, D. K., Christ, A. N., Bruxner, T. J. C., Quinn, M. C., Nourse, C., Murtaugh, L. C., Harliwong, I., Idrisoglu, S., Manning, S., Nourbakhsh, E., Wani, S., Fink, L., Holmes, O., ... Andrew, V. (2016). *Genomic analyses identify molecular subtypes of pancreatic cancer*. <https://doi.org/10.1038/nature16965>
- Bazan-Peregrino, M., Garcia-Carbonero, R., Laquente, B., Álvarez, R., Mato-Berciano, A., Gimenez-Alejandre, M., Morgado, S., Rodríguez-García, A., Maliandi, M. v., Riesco, M. C., Moreno, R., Ginestà, M. M., Perez-Carreras, M., Gornals, J. B., Prados, S., Perea, S., Capella, G., Alemany, R., Salazar, R., Hidalgo, M. (2021). VCN-01 disrupts pancreatic cancer stroma and exerts antitumor effects. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, *9*(11). <https://doi.org/10.1136/jitc-2021-003254>
- Bersuker, K., Hendricks, J. M., Li, Z., Magtanong, L., Ford, B., Tang, P. H., Roberts, M. A., Tong, B., Maimone, T. J., Zoncu, R., Bassik, M. C., Nomura, D. K., Dixon, S. J., & Olzmann, J. A. (2019). The CoQ oxidoreductase FSP1 acts parallel to GPX4 to inhibit ferroptosis. *Nature*, *575*(7784), 688–692. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1705-2>
- Beutel, A. K., Schütte, L., Scheible, J., Roger, E., Müller, M., Perkhofer, L., Kestler, A. M. T. U., Kraus, J. M., Kestler, H. A., Barth, T. F. E., Lemke, J., Kornmann, M., Ettrich, T. J., Gout, J., Seufferlein, T., & Kleger, A. (2021). A prospective feasibility trial to challenge patient-derived pancreatic cancer organoids in predicting treatment response. *Cancers*, *13*(11). <https://doi.org/10.3390/cancers13112539>
- Broekgaarden, M., Weijer, R., Gulik, T. M. van, Hamblin, M. R., & Heger, M. (2015). Tumor cell survival pathways activated by photodynamic therapy: a molecular framework for inhibition strategies. *Cancer Metastasis Reviews*, 643–690. <https://doi.org/10.1007/s10555-015-9588-7>
- Campani, D., Esposito, I., Boggi, U., Cecchetti, D., Menicagli, M., de Negri, F., Colizzi, L., Chiaro, M. del, Mosca, F., Fornaciari, G., & Bevilacqua, G. (2001). Bcl-2 expression in pancreas development and pancreatic cancer progression. *Journal of Pathology*, *194*(4), 444–450. <https://doi.org/10.1002/path.925>
- Campbell, S. L., Khosravi-far, R., Rossman, K. L., Clark, G. J., & Der, C. J. (1998). *Increasing complexity of Ras signaling*.
- Cao, F., Luo, A., & Yang, C. (2021). G6PD inhibits ferroptosis in hepatocellular carcinoma by targeting cytochrome P450 oxidoreductase. *Cellular Signalling*, 87. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2021.110098>

- Chan-Seng-Yue, M., Kim, J. C., Wilson, G. W., Ng, K., Figueroa, E. F., O’Kane, G. M., Connor, A. A., Denroche, R. E., Grant, R. C., McLeod, J., Wilson, J. M., Jang, G. H., Zhang, A., Dodd, A., Liang, S. ben, Borgida, A., Chadwick, D., Kalimuthu, S., Lungu, I., Notta, F. (2020). Transcription phenotypes of pancreatic cancer are driven by genomic events during tumor evolution. *Nature Genetics*, *52*(2), 231–240. <https://doi.org/10.1038/s41588-019-0566-9>
- Chen, X., Zeh, H. J., Kang, R., Kroemer, G., & Tang, D. (2021). Cell death in pancreatic cancer: from pathogenesis to therapy. Em *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* (Vol. 18, Issue 11, p. 804–823). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41575-021-00486-6>
- Chuvin, N., Vincent, D. F., Pommier, R. M., Alcaraz, L. B., Gout, J., Caligaris, C., Yacoub, K., Cardot, V., Roger, E., Kaniewski, B., Martel, S., Cintas, C., Goddard-Léon, S., Colombe, A., Valantin, J., Gadot, N., Servoz, E., Morton, J., Goddard, I., ... Bartholin, L. (2017). Acinar-to-Ductal Metaplasia Induced by Transforming Growth Factor Beta Facilitates KRASG12D-driven Pancreatic Tumorigenesis. *CMGH*, *4*(2), 263–282. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2017.05.005>
- Collisson, E. A., Sadanandam, A., Olson, P., Gibb, W. J., Truitt, M., Gu, S., Cooc, J., Weinkle, J., Kim, G. E., Jakkula, L., Feiler, H. S., Ko, A. H., Olshen, A. B., Danenberg, K. L., Tempero, M. A., Spellman, P. T., Hanahan, D., & Gray, J. W. (2011). Subtypes of pancreatic ductal adenocarcinoma and their differing responses to therapy. *Nature Medicine*, *17*(4), 500–503. <https://doi.org/10.1038/nm.2344>
- Cotticelli, M. G., Crabbe, A. M., Wilson, R. B., & Shchepinov, M. S. (2013). Insights into the role of oxidative stress in the pathology of friedreich ataxia using peroxidation resistant polyunsaturated fatty acids. *Redox Biology*, *1*(1), 398–404. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2013.06.004>
- Daher, B., Parks, S. K., Durivault, J., Cormerais, Y., Baidarjad, H., Tambutte, E., Pouysségur, J., & Vučetić, M. (2019). Genetic ablation of the cystine transporter xCT in PDAC cells inhibits mTORC1, growth, survival, and tumor formation via nutrient and oxidative stresses. *Cancer Research*, *79*(15), 3877–3890. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-3855>
- de Almeida, D. R. Q., dos Santos, A. F., Wailemann, R. A. M., Terra, L. F., Gomes, V. M., Arini, G. S., Bertoldi, E. R. M., Reis, E. M., Baptista, M. S. & Labriola, L (2022). Necroptosis activation is associated with greater methylene blue-photodynamic therapy-induced cytotoxicity in human pancreatic ductal adenocarcinoma cells. *Photochem Photobiol Sci*. <https://doi.org/10.1007/s43630-022-00347-4>.
- Degterev, A., Huang, Z., Boyce, M., Li, Y., Jagtap, P., Mizushima, N., Cuny, G. D., Mitchison, T. J., Moskowitz, M. A., & Yuan, J. (2005). Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nature Chemical Biology*, *1*(2), 112–119. <https://doi.org/10.1038/nchembio711>
- Delbridge, A. R. D., Valente, L. J., & Strasser, A. (2012). The role of the apoptotic machinery in tumor suppression. Em *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* (Vol. 4, Issue 11). Cold Spring Harbor Laboratory Press. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008789>
- di Mascio, P., Martinez, G. R., Miyamoto, S., Ronsein, G. E., Medeiros, M. H. G., & Cadet, J. (2019). Singlet Molecular Oxygen Reactions with Nucleic Acids, Lipids, and Proteins. Em *Chemical Reviews* (Vol. 119, Issue 3, p. 2043–2086). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00554>
- Dijk, F., Veenstra, V. L., Soer, E. C., Dings, M. P. G., Zhao, L., Halfwerk, J. B., Hooijer, G. K., Damhofer, H., Marzano, M., Steins, A., Waasdorp, C., Busch, O. R., Besselink, M. G., Tol, J. A., Welling, L., van Rijssen, L. B., Klomp maker, S., Wilmink, H. W., van Laarhoven, H. W., ... Bijlsma, M. F. (2020). Unsupervised class discovery in pancreatic ductal adenocarcinoma reveals cell-intrinsic mesenchymal features and high concordance

- between existing classification systems. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56826-9>
- Dixon, S. J., Lemberg, K. M., Lamprecht, M. R., Skouta, R., Eleina, M., Gleason, C. E., Patel, D. N., Bauer, A. J., Cantley, A. M., Yang, W. S., Iii, B. M., & Stockwell, B. R. (2012). *NIH Public Access*. 149(5), 1060–1072. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.042>. Ferroptosis
- Doll, S., Freitas, F. P., Shah, R., Aldrovandi, M., da Silva, M. C., Ingold, I., Grocin, A. G., Xavier da Silva, T. N., Panzilius, E., Scheel, C. H., Mourão, A., Buday, K., Sato, M., Wanninger, J., Vignane, T., Mohana, V., Rehberg, M., Flatley, A., Schepers, A., ... Conrad, M. (2019). FSP1 is a glutathione-independent ferroptosis suppressor. *Nature*, 575(7784), 693–698. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1707-0>
- Doll, S., Proneth, B., Tyurina, Y. Y., Panzilius, E., Kobayashi, S., Ingold, I., Imler, M., Beckers, J., Aichler, M., Walch, A., Prokisch, H., Trümbach, D., Mao, G., Qu, F., Bayir, H., Füllekrug, J., Scheel, C. H., Wurst, W., Schick, J. A., ... Conrad, M. (2017). ACSL4 dictates ferroptosis sensitivity by shaping cellular lipid composition. *Nature Chemical Biology*, 13(1), 91–98. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2239>
- Donohoe, C., Senge, M. O., Arnaut, L. G., & Gomes-da-Silva, L. C. (2019). Cell death in photodynamic therapy: From oxidative stress to anti-tumor immunity. In *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer* (Vol. 1872, Issue 2). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2019.07.003>
- dos Santos, A. F., de Almeida, D. R. Q., Terra, L. F., Baptista, M. S., & Labriola, L. (2019). Photodynamic therapy in cancer treatment - an update review. *Journal of Cancer Metastasis and Treatment*, 2019. <https://doi.org/10.20517/2394-4722.2018.83>
- dos Santos, A. F., Inague, A., Arini, G. S., Terra, L. F., Wailemann, R. A. M., Pimentel, A. C., Yoshinaga, M. Y., Silva, R. R., Severino, D., de Almeida, D. R. Q., Gomes, V. M., Bruni-Cardoso, A., Terra, W. R., Miyamoto, S., Baptista, M. S., & Labriola, L. (2020). Distinct photo-oxidation-induced cell death pathways lead to selective killing of human breast cancer cells. *Cell Death and Disease*, 11(12). <https://doi.org/10.1038/s41419-020-03275-2>
- Driehuis, E., van Hoeck, A., Moore, K., Kolders, S., Francies, H. E., Can Gulersonmez, M., Stigter, E. C. A., Burgering, B., Geurts, V., Gracanin, A., Bounova, G., Morsink, F. H., Vries, R., Boj, S., van Es, J., Johan, G., Offerhaus, A., Kranenburg, O., Garnett, M. J., ... Clevers, H. ([s.d.]). *Pancreatic cancer organoids recapitulate disease and allow personalized drug screening*. <https://doi.org/10.1073/pnas.1911273116/-/DCSupplemental>
- Du, J., Wan, Z., Wang, C., Lu, F., Wei, M., Wang, D., & Hao, Q. (2021). Designer exosomes for targeted and efficient ferroptosis induction in cancer via chemo-photodynamic therapy. *Theranostics*, 11(17), 8185–8196. <https://doi.org/10.7150/THNO.59121>
- Duprez, L., Wirawan, E., Vanden, T., & Vandenabeele, P. (2009). Major cell death pathways at a glance. *Microbes and Infection*, 11(13), 1050–1062. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2009.08.013>
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495–516. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>
- Flowers, B. M., Xu, H., Mulligan, A. S., Hanson, K. J., Seoane, J. A., Vogel, H., Curtis, C., Wood, L. D., & Attardi, L. D. (2021). Cell of origin influences pancreatic cancer subtype. *Cancer Discovery*, 11(3), 660–677. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-20-0633>
- Fokas, E., Neill, E. E. O., Gordon-weeks, A. N., Mckenna, W. G., Neill, E. O., Gordon-weeks, A., Mukherjee, S., Mckenna, W. G., & Muschel, R. J. (2014). Pancreatic Ductal Adenocarcinoma : From Genetics to Biology to Radiobiology to Oncoimmunology And All the Way Back to the radiobiology to oncoimmunology and all the way back to the

clinic. *Biochimica et Biophysica Acta Journal*, July.
<https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2014.12.001>

- Frappart, P.-O., Walter, K., Gout, J., Beutel, A. K., Morawe, M., Arnold, F., Breunig, M., Barth, T. F., Marienfeld, R., Schulte, L., Ettrich, T., Hackert, T., Svinarenko, M., Roßler, R., Wiese, S., Wiese, H., Perkhofer, L., Müller, M., Lechel, A., Kleger, A. (2020). *Pancreatic cancer-derived organoids-a disease modeling tool to predict drug response | Enhanced Reader*.
- Fulda, S., & Debatin, K.-M. (2006). Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene*, 25, 4798–4811. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209608>
- Galluzzi, L., Vitale, I., ABRAMS, J. M., ALNEMRI, E. S., BAEHRECKE, E. H., BLAGOSKLONNY, M. v, DAWSON, T. M., DAWSON, V. L., EL-DEIRY, W. S., FULDA, S., GOTTLIEB, E., GREEN, D. R., HENGARTNER, M. O., KEPP, O., KNIGHT, R. a, KUMAR, S., LIPTON, S. a, LU, X., MADEO, F., ... NUÑEZ, G. (2018). Molecular mechanisms of cell death : recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death & Differentiation*. <https://doi.org/10.1038/s41418-017-0012-4>
- Gao, C., Quan, M. Y., Chen, Q. J., Yang, R., Wu, Y., Liu, J. Y., Lin, Z. Y., Li, X., Cai, J. T., Jiang, T. F., Xu, L., Mossahebi-Mohammadi, M., Guo, Q., & Zhang, J. S. (2021). Yap1-2 Isoform Is the Primary Mediator in TGF-β1 Induced EMT in Pancreatic Cancer. *Frontiers in Oncology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.649290>
- Gao, M., Monian, P., Pan, Q., Zhang, W., Xiang, J., & Jiang, X. (2016). Ferroptosis is an autophagic cell death process. *Cell Research*, 26(9), 1021–1032. <https://doi.org/10.1038/cr.2016.95>
- Garg, A. D., & Agostinis, P. (2014). immune responses. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 3, 474–487. <https://doi.org/10.1039/c3pp50333j>
- Garrido-Laguna, I., & Hidalgo, M. (2015). Pancreatic cancer: from state-of-the-art treatments to promising novel therapies. *Nature Reviews. Clinical Oncology*, 12(6), 319–334. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2015.53>
- Gomes-Filho, S. M., dos Santos, E. O., Bertoldi, E. R. M., Scalabrini, L. C., Heidrich, V., Dazzani, B., Levantini, E., Reis, E. M., & Bassères, D. S. (2020). Aurora A kinase and its activator TPX2 are potential therapeutic targets in KRAS-induced pancreatic cancer. *Cellular Oncology*, 43(3), 445–460. <https://doi.org/10.1007/s13402-020-00498-5>
- Grasso, C., Jansen, G., & Giovannetti, E. (2017). Critical Reviews in Oncology / Hematology Drug resistance in pancreatic cancer: Impact of altered energy metabolism. *Critical Reviews in Oncology / Hematology*, 114, 139–152. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2017.03.026>
- Hajatdoost, L., Sedaghat, K., Walker, E. J., Thomas, J., & Kosari, S. (2018). Chemotherapy in pancreatic cancer: A systematic review. *Medicina (Lithuania)*, 54(3), 1–17. <https://doi.org/10.3390/medicina54030048>
- Hanahan, D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Em Cancer Discovery* (Vol. 12, Issue 1, p. 31–46). American Association for Cancer Research Inc. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>
- Hider, R. C., & Kong, X. L. (2011). Glutathione: A key component of the cytoplasmic labile iron pool. *BioMetals*, 24(6), 1179–1187. <https://doi.org/10.1007/s10534-011-9476-8>
- Hruban, R. H., Maitra, A., & Goggins, M. (2008). Update on Pancreatic Intraepithelial Neoplasia. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 306–316.
- Huang, Z., Xu, H., Meyers, A. D., Musani, A. L., Wang, L., Tagg, R., Barqawi, A. B., Chen, Y. K., Barqawi, A. B., & Chen, Y. K. (2008). Photodynamic therapy for treatment of solid tumors – potential and technical challenges. *Technology in Cancer Research & Treatment*, 7(4), 309–320.

- Jiang, L., Kon, N., Li, T., Wang, S. J., Su, T., Hibshoosh, H., Baer, R., & Gu, W. (2015). Ferroptosis as a p53-mediated activity during tumour suppression. *Nature*, *520*(7545), 57–62. <https://doi.org/10.1038/nature14344>
- Jiang, P., Du, W., & Wu, M. (2014). Regulation of the pentose phosphate pathway in cancer. *Protein and Cell*, *5*(8), 592–602. <https://doi.org/10.1007/s13238-014-0082-8>
- Jiang, X., Stockwell, B. R., & Conrad, M. (2021). Ferroptosis: mechanisms, biology and role in disease. Em *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 22, Issue 4, p. 266–282). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-00324-8>
- Juiz, N., Elkaoutari, A., Bigonnet, M., Gayet, O., Roques, J., Nicolle, R., Iovanna, J., & Dusetti, N. (2020). Basal-like and classical cells coexist in pancreatic cancer revealed by single-cell analysis on biopsy-derived pancreatic cancer organoids from the classical subtype. *FASEB Journal*, *34*(9), 12214–12228. <https://doi.org/10.1096/fj.202000363RR>
- Kapałczyńska, M., Kolenda, T., Przybyła, W., Zajączkowska, M., Teresiak, A., Filas, V., Ibbs, M., Bliźniak, R., Łuczewski, Ł., & Lamperska, K. (2018). 2D and 3D cell cultures – a comparison of different types of cancer cell cultures. *Archives of Medical Science*, *14*(4), 910–919. <https://doi.org/10.5114/aoms.2016.63743>
- Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H., & Currie, A. R. (1972). APOPTOSIS : A BASIC BIOLOGICAL PHENOMENON WITH WIDE-. *British Journal of Cancer*, 239–257.
- Kim, S. Y., Cho, E. A., Bae, S. M., Kim, S. Y., & Park, D. H. (2021). The effect of a newly developed mini-light-emitting diode catheter for interstitial photodynamic therapy in pancreatic cancer xenografts. Em *Journal of Translational Medicine* (Vol. 19, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12967-021-02900-8>
- Koikawa, K., Kibe, S., Suizu, F., Sekino, N., Kim, N., Manz, T. D., Pinch, B. J., Akshinthala, D., Verma, A., Gaglia, G., Nezu, Y., Ke, S., Qiu, C., Ohuchida, K., Oda, Y., Lee, T. H., Wegiel, B., Clohessy, J. G., London, N., ... Lu, K. P. (2021). Targeting Pin1 renders pancreatic cancer eradicable by synergizing with immunochemotherapy. *Cell*, *184*(18), 4753–4771.e27. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.07.020>
- Kraft, V. A. N., Bezjian, C. T., Pfeiffer, S., Ringelstetter, L., Müller, C., Zandkarimi, F., Merl-Pham, J., Bao, X., Anastasov, N., Kössl, J., Brandner, S., Daniels, J. D., Schmitt-Kopplin, P., Hauck, S. M., Stockwell, B. R., Hadian, K., & Schick, J. A. (2020). GTP Cyclohydrolase 1/Tetrahydrobiopterin Counteract Ferroptosis through Lipid Remodeling. *ACS Central Science*, *6*(1), 41–53. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.9b01063>
- Krajewska, M., Krajewski, S., Epstein, J. I., Shabaik, A., Sauvageot, J., Song, K., Kitada, S., & Reed, J. C. (1996). Address reprint requests to Dr. J. C. Reed, The Burnham Institute, 10901 N. Em *American Journal of Pathology* (Vol. 148, Issue 5).
- Li, W., Ma, Q., & Wu, E. (2012). *Perspectives on the Role of Photodynamic Therapy in the Treatment of Pancreatic Cancer. 2012*. <https://doi.org/10.1155/2012/637429>
- Liot, S., Balas, J., Aubert, A., Prigent, L., Mercier-Gouy, P., Verrier, B., Bertolino, P., Hennino, A., Valcourt, U., & Lambert, E. (2021). Stroma Involvement in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: An Overview Focusing on Extracellular Matrix Proteins. Em *Frontiers in Immunology* (Vol. 12). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.612271>
- Luo, Y., Yan, B., Liu, L., Yin, L., Ji, H., An, X., Gladkich, J., Qi, Z., de La Torre, C., & Herr, I. (2021). Sulforaphane inhibits the expression of long noncoding rna h19 and its target apobec3g and thereby pancreatic cancer progression. *Cancers*, *13*(4), 1–23. <https://doi.org/10.3390/cancers13040827>
- Malumbres, M., & Barbacid, M. (2003). RAS oncogenes : the first 30 years. *Nature Reviews Cancer*, *3*(June).
- Martens, S., Lefesvre, P., Nicolle, R., Biankin, A. v., Puleo, F., van Laethem, J. L., & Rooman, I. (2019). Different shades of pancreatic ductal adenocarcinoma, different paths towards

- precision therapeutic applications. *Annals of Oncology*, 30(9), 1428–1436. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdz181>
- Maurer, C., Holmstrom, S. R., He, J., Laise, P., Su, T., Ahmed, A., Hibshoosh, H., Chabot, J. A., Oberstein, P. E., Sepulveda, A. R., Genkinger, J. M., Zhang, J., Iuga, A. C., Bansal, M., Califano, A., & Olive, K. P. (2019). Experimental microdissection enables functional harmonisation of pancreatic cancer subtypes. *Gut*, 68(6), 1034–1043. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2018-317706>
- Mishchenko, T., Balalaeva, I., Gorokhova, A., Vedunova, M., & Krysko, D. v. (2022). Which cell death modality wins the contest for photodynamic therapy of cancer? *Em Cell Death and Disease* (Vol. 13, Issue 5). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s41419-022-04851-4>
- Modi, S., Kir, D., Banerjee, S., & Saluja, A. (2016). Control of Apoptosis in Treatment and Biology of Pancreatic Cancer. *Journal of Cellular Biochemistry*, 117(2), 279–288. <https://doi.org/10.1002/jcb.25284>
- Moffitt, R. A., Raoud Marayati, E. L., Flate, K. E., Volmar, S., Gabriela Herrera Loeza, Katherine A. Hoadley, Naim U. Rashid, Lindsay A. Williams, Samuel C. Eaton, Alexander H. Chung, Jadwiga K. Smyla, Judy M. Anderson, Hong Jin Kim, David J. Bentrem, Mark., Talamonti, C. A., Iacobuzio-Donahue, M., A. Hollingsworth, & Jen Jen Yeh. (2015). Virtual microdissection identifies distinct tumor-and stroma-specific subtypes of pancreatic ductal adenocarcinoma HHS Public Access Author manuscript. *Nat Genet*, 47(10), 1168–1178. <https://doi.org/10.1038/ng.3398>
- Monberg, M. E., Geiger, H., Lee, J. J., Sharma, R., Semaan, A., Bernard, V., Swartzlander, D. B., Stephens, B. M., Chen, K., Katz, M. H., Robine, N., Guerrero, P. A., & Maitra, A. ([s.d.]). *Occult polyclonality of preclinical pancreatic cancer models drives in vitro evolution. Brief Title: Intratumoral heterogeneity of PDAC preclinical models.* <https://doi.org/10.1101/2021.04.13.439717>
- Montero, J., & Letai, A. (2018). Why do BCL-2 inhibitors work and where should we use them in the clinic? *Cell Death and Differentiation*, 25(1), 56–64. <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.183>
- Mueller, S., Engleitner, T., Maresch, R., Zukowska, M., Lange, S., Kaltenbacher, T., Konukiewicz, B., Öllinger, R., Zwiebel, M., Strong, A., Yen, H. Y., Banerjee, R., Louzada, S., Fu, B., Seidler, B., Götzfried, J., Schuck, K., Hassan, Z., Arbeiter, A., ... Rad, R. (2018). Evolutionary routes and KRAS dosage define pancreatic cancer phenotypes. *Nature*, 554(7690), 62–68. <https://doi.org/10.1038/nature25459>
- Obeng, E. (2021). Apoptosis (Programmed cell death) and its signals-a review. *Em Brazilian Journal of Biology* (Vol. 81, Issue 4, p. 1133–1143). Instituto Internacional de Ecologia. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.228437>
- Ormond, A. B., & Freeman, H. S. (2013). Dye Sensitizers for Photodynamic Therapy. *Materials*, 817–840. <https://doi.org/10.3390/ma6030817>
- Patel, S. J., Frey, A. G., Palenchar, D. J., Achar, S., Bullough, K. Z., Vashisht, A., Wohlschlegel, J. A., & Philpott, C. C. (2019). A PCBP1–BclA2 chaperone complex delivers iron for cytosolic [2Fe–2S] cluster assembly. *Nature Chemical Biology*, 15(9), 872–881. <https://doi.org/10.1038/s41589-019-0330-6>
- Peng, J., Sun, B. F., Chen, C. Y., Zhou, J. Y., Chen, Y. S., Chen, H., Liu, L., Huang, D., Jiang, J., Cui, G. S., Yang, Y., Wang, W., Guo, D., Dai, M., Guo, J., Zhang, T., Liao, Q., Liu, Y., Zhao, Y. L., ... Wu, W. (2019). Single-cell RNA-seq highlights intra-tumoral heterogeneity and malignant progression in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cell Research*, 29(9), 725–738. <https://doi.org/10.1038/s41422-019-0195-y>
- Peter, M. E., Heufelder, A. E., & Hengartner, M. O. (1997). *Advances in apoptosis research* (Vol. 94). www.pnas.org

- Philpott, C. C., Ryu, M. S., Frey, A., & Patel, S. (2017). Cytosolic iron chaperones: Proteins delivering iron cofactors in the cytosol of mammalian cells. *Em Journal of Biological Chemistry* (Vol. 292, Issue 31, p. 12764–12771). American Society for Biochemistry and Molecular Biology Inc. <https://doi.org/10.1074/jbc.R117.791962>
- Pinto, J. G., Martins, J. F. de S., Pereira, A. H. C., Mittmann, J., Raniero, L. J., & Ferreira-Strixino, J. (2017). Evaluation of methylene blue as photosensitizer in promastigotes of *Leishmania major* and *Leishmania braziliensis*. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 18, 325–330. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2017.04.009>
- Principe, D. R., Underwood, P. W., Korc, M., Trevino, J. G., Munshi, H. G., & Rana, A. (2021). The Current Treatment Paradigm for Pancreatic Ductal Adenocarcinoma and Barriers to Therapeutic Efficacy. *Em Frontiers in Oncology* (Vol. 11). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.688377>
- Rahib, L., Smith, B. D., Aizenberg, R., Rosenzweig, A. B., Fleshman, J. M., & Matrisian, L. M. (2014). Projecting Cancer Incidence and Deaths to 2030 : The Unexpected Burden of Thyroid , Liver , and Pancreas Cancers in the United States. *Cancer Research*, 2913–2921. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-0155>
- Raquel Queiroz Almeida, D. de. (2022). Necroptosis activation is associated with greater methylene blue-photodynamic therapy-induced cytotoxicity in human pancreatic ductal adenocarcinoma cells. *Photochem Photobiol Sci*. <https://doi.org/10.1007/s43630-022-00347-4>.
- Reginato, E., Wolf, P., & Hamblin, M. R. (2014). Immune response after photodynamic therapy increases anti- cancer and anti-bacterial effects. *World Journal of Immunology*, 4(1), 1–11. <https://doi.org/10.5411/wji.v4.i1.1.Immune>
- Rizzollo, F., More, S., Vangheluwe, P., & Agostinis, P. (2021). The lysosome as a master regulator of iron metabolism. *Em Trends in Biochemical Sciences* (Vol. 46, Issue 12, p. 960–975). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2021.07.003>
- Russell, R., Perkhof, L., Liebau, S., Lin, Q., Lechel, A., Feld, F. M., Hessmann, E., Gaedcke, J., Güthle, M., Zenke, M., Hartmann, D., von Figura, G., Weissinger, S. E., Rudolph, K. L., Möller, P., Lennerz, J. K., Seufferlein, T., Wagner, M., & Kleger, A. (2015). Loss of ATM accelerates pancreatic cancer formation and epithelial-mesenchymal transition. *Nature Communications*, 6. <https://doi.org/10.1038/ncomms8677>
- Samulitis, B. K., Pond, K. W., Pond, E., Cress, A. E., Patel, H., Wisner, L., Patel, C., Dorr, R. T., & Landowski, T. H. (2015). Gemcitabine resistant pancreatic cancer cell lines acquire an invasive phenotype with collateral hypersensitivity to histone deacetylase inhibitors. *Cancer Biology & Therapy*, 16(January), 43–51.
- Santofimia-Castaño, P., & Iovanna, J. (2021). Combating pancreatic cancer chemoresistance by triggering multiple cell death pathways. *Em Pancreatology* (Vol. 21, Issue 3, p. 522–529). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.pan.2021.01.010>
- Santos, A. F., Terra, L. F., Wailemann, R. A. M., Oliveira, T. C., Gomes, V. D. M., Mineiro, M. F., Meotti, F. C., Bruni-cardoso, A., Baptista, M. S., & Labriola, L. (2017). Methylene blue photodynamic therapy induces selective and massive cell death in human breast cancer cells. *BMC Cancer*, 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12885-017-3179-7>
- Schmidlein, P. M., Volz, C., Hackel, A., Thürling, I., Castven, D., Braun, R., Wellner, U. F., Konukiewitz, B., Riemekasten, G., Lehnert, H., Marquardt, J. U., & Ungefroren, H. (2021). Activation of a ductal-to-endocrine transdifferentiation transcriptional program in the pancreatic cancer cell line PANC-1 is controlled by Rac1 and RAC1b through antagonistic regulation of stemness factors. *Cancers*, 13(21). <https://doi.org/10.3390/cancers13215541>
- Seo, J., Nam, Y. W., Kim, S., Oh, D. B., & Song, J. (2021). Necroptosis molecular mechanisms: Recent findings regarding novel necroptosis regulators. *Em Experimental and Molecular*

- Medicine* (Vol. 53, Issue 6, p. 1007–1017). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s12276-021-00634-7>
- Shchepinov, M. S., Chou, V. P., Pollock, E., Langston, J. W., Cantor, C. R., Molinari, R. J., & Manning-Boğ, A. B. (2011). Isotopic reinforcement of essential polyunsaturated fatty acids diminishes nigrostriatal degeneration in a mouse model of Parkinson's disease. *Toxicology Letters*, *207*(2), 97–103. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2011.07.020>
- Shinkawa, T., Ohuchida, K., Mochida, Y., Sakihama, K., Iwamoto, C., Abe, T., Ideno, N., Mizuuchi, Y., Shindo, K., Ikenaga, N., Moriyama, T., Nakata, K., Oda, Y., & Nakamura, M. (2022). Subtypes in pancreatic ductal adenocarcinoma based on niche factor dependency show distinct drug treatment responses. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, *41*(1). <https://doi.org/10.1186/s13046-022-02301-9>
- Siegel, R. L., & Miller, K. D. (2020). *Cancer Statistics*, 2020. *70*(1), 7–30. <https://doi.org/10.3322/caac.21590>
- Song, S., Wang, B., Gu, S., Li, X., & Sun, S. (2017). Expression of Beclin 1 and Bcl-2 in pancreatic neoplasms and its effect on pancreatic ductal adenocarcinoma prognosis. *Oncology Letters*, *14*(6), 7849–7861. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.7218>
- Stockwell, B. R., Angeli, J. P. F., Bayir, H., Bush, A. I., Conrad, M., Dixon, S. J., Fulda, S., Gasco, S., Hatzios, S. K., Kagan, V. E., Noel, K., Jiang, X., Park, J., Ran, Q., Rosenfeld, C. S., Salnikow, K., Tang, D., Torti, F. M., Torti, S. v, ... Zhang, D. D. (2017). Primer Ferroptosis : A Regulated Cell Death Nexus Linking Metabolism , Redox Biology , and Disease. *Cell*, *171*, 273–285. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.09.021>
- Stockwell, B. R., & Jiang, X. (2020). The Chemistry and Biology of Ferroptosis. *Cell Chemical Biology*, *27*(4), 365–375. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2020.03.013>
- Tardivo, J. P., Giglio, A. del, Oliveira, C. S. de, Gabrielli, D. S., Junqueira, H. C., Tada, D. B., Severino, D., Turchiello, R. de T., & Baptista, M. S. (2005). Methylene blue in photodynamic therapy : From basic mechanisms to clinical applications Rozane de F ´. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, *1000*, 175–191. [https://doi.org/10.1016/S1572-1000\(05\)00097-9](https://doi.org/10.1016/S1572-1000(05)00097-9)
- Vandenabeele, P., Galluzzi, L., Berghe, T. vanden, & Kroemer, G. (2010). Molecular mechanisms of necroptosis : an ordered cellular explosion. *Nature Publishing Group*, *11*(10), 700–715. <https://doi.org/10.1038/nrm2970>
- Wang, S., Zheng, Y., Yang, F., Zhu, L., Zhu, X. Q., Wang, Z. F., Wu, X. L., Zhou, C. H., Yan, J. Y., Hu, B. Y., Kong, B., Fu, D. L., Bruns, C., Zhao, Y., Qin, L. X., & Dong, Q. Z. (2021). The molecular biology of pancreatic adenocarcinoma: translational challenges and clinical perspectives. *Em Signal Transduction and Targeted Therapy* (Vol. 6, Issue 1). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00659-4>
- Wang, Y., Wang, H., Zhou, L., Lu, J., Jiang, B., Liu, C., & Guo, J. (2020). Photodynamic therapy of pancreatic cancer: Where have we come from and where are we going? *Em Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* (Vol. 31). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2020.101876>
- Wartenberg, M., Cibin, S., Zlobec, I., Vassella, E., Eppenberger-Castori, S., Terracciano, L., Eichmann, M. D., Worni, M., Gloor, B., Perren, A., & Karamitopoulou, E. (2018). Integrated genomic and immunophenotypic classification of pancreatic cancer reveals three distinct subtypes with prognostic/ predictive significance. *Clinical Cancer Research*, *24*(18), 4444–4454. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-3401>
- Weinlich, R., Oberst, A., Beere, H. M., & Green, D. R. (2017). Necroptosis in development, inflammation and disease. *Em Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 18, Issue 2, p. 127–136). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.149>
- Xie, Y., Zhu, S., Zhong, M., Yang, M., Sun, X., Liu, J., Kroemer, G., Lotze, M., Zeh, H. J., Kang, R., & Tang, D. (2017). Inhibition of Aurora Kinase A Induces Necroptosis in

- Pancreatic Carcinoma. *Gastroenterology*, 153(5), 1429-1443.e5. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.07.036>
- Xu, Z., Hu, K., Bailey, P., Springfield, C., Roth, S., Kurilov, R., Brors, B., Gress, T., Buchholz, M., An, J., Wei, K., Peccerella, T., Büchler, M. W., Hackert, T., & Neoptolemos, J. P. (2021). Clinical Impact of Molecular Subtyping of Pancreatic Cancer. Em *Frontiers in Cell and Developmental Biology* (Vol. 9). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.743908>
- Yang, H., Liu, R., Xu, Y., Qian, L., & Dai, Z. (2021). Photosensitizer Nanoparticles Boost Photodynamic Therapy for Pancreatic Cancer Treatment. Em *Nano-Micro Letters* (Vol. 13, Issue 1). Springer Science and Business Media B.V. <https://doi.org/10.1007/s40820-020-00561-8>
- Yang, W. S., Kim, K. J., Gaschler, M. M., Patel, M., Shchepinov, M. S., & Stockwell, B. R. (2016). Peroxidation of polyunsaturated fatty acids by lipoxygenases drives ferroptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(34), E4966–E4975. <https://doi.org/10.1073/pnas.1603244113>
- Ying, H., Dey, P., Yao, W., Kimmelman, A. C., Draetta, G. F., Maitra, A., & Depinho, R. A. (2016). Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes & Development*, 355–385. <https://doi.org/10.1101/gad.275776.115.well-differentiated>
- Yuan, H., Li, X., Zhang, X., Kang, R., & Tang, D. (2016). Identification of ACSL4 as a biomarker and contributor of ferroptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 478(3), 1338–1343. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.08.124>
- Zhang, N. Z., Zhu, Y., Pan, W., Ma, W. Q., & Shao, A. L. (2007). Photodynamic therapy combined with local chemotherapy for the treatment of advanced esophagocardiac carcinoma. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 4(1), 60–64. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2006.12.002>
- Zhang, Y., Xu, Y., Lu, W., Li, J., Yu, S., Brown, E. J., Stanger, B. Z., Rabinowitz, J. D., & Yang, X. (2022). G6PD-mediated increase in de novo NADP + biosynthesis promotes antioxidant defense and tumor metastasis. Em *Sci. Adv* (Vol. 8).
- Zheng, J., & Conrad, M. (2020). The Metabolic Underpinnings of Ferroptosis. Em *Cell Metabolism* (Vol. 32, Issue 6, p. 920–937). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.10.011>
- Zhu, T., Shi, L., Yu, C., Dong, Y., Qiu, F., Shen, L., Qian, Q., Zhou, G., & Zhu, X. (2019). Ferroptosis promotes photodynamic therapy: Supramolecular photosensitizer-inducer nanodrug for enhanced cancer treatment. *Theranostics*, 9(11), 3293–3307. <https://doi.org/10.7150/thno.32867>

ANEXOS

ANEXO A

Súmula Curricular

Nome: Daria Raquel Queiroz de Almeida

1) Formação Acadêmica

Ano	Título ou atividade	Instituição
2005-2008	Graduação Licenciatura em Biologia	Universidade Estadual Vale do Acaraú – UVA
2010-2015	Graduação Bacharelado em Ciências Biológicas	Universidade do Estado do Rio Grande do Norte – UERN
2016-2018	Pós-Graduação Mestrado em Ciências Biológicas – Bioquímica	Universidade de São Paulo – USP

2) Iniciação científica/Estágios

Prêmio: “*Journal of Cancer Metastasis and Treatment 2019 Best Paper Award*” pelo paper: DOS SANTOS; **DE ALMEIDA**; TERRA; BAPTISTA; LABRIOLA . Photodynamic therapy in cancer treatment - an update review. *Journal of Cancer Metastasis and Treatment*, v. 2019, p. 25, 2019.

Estágio (2021-2022)

Research Group: Pancreatic Development, Stem Cell Differentiation and Cancer – Ulm University – Germany

Supervisor: Professor Dr. Alexander Kleger

Projeto: “Assessing the efficiency of photodynamic therapy in organoids derived from human pancreatic tumors”

Bolsista Doutrado Sandwiche – CAPES/PrInt/USP

Estágio (2014),

Research Group: Molecular Recognition in Confined Environments - University of Alberta – Canadá

Supervisora: Professora Dra. Juli Gibbs-Davis;

Participou no Projeto: "Reverse Transcription Lesion-Induced DNA Amplification for point-of-care";

Bolsista CAPES - Ciência sem Fronteiras

Iniciação Científica (2011-2012)

Laboratório de Biologia Funcional - UERN

Professor: José Hélio de Araújo Filho

Desenvolvimento do projeto intitulado "Efeito hipoglicemiante do extrato aquoso da raiz da Bauhinia forficata em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina", aprovado pelo edital n 001/2011-DP/PROPEG/UERN-RN. Bolsista CNPq

3) Histórico profissional, serviços e distinções acadêmicas e prêmios.

2018 - Atual: Universidade de São Paulo - Vínculo: Estudante de Doutorado do Programa de Pós-graduação em Bioquímica. Bolsista CAPES.

2016 - 2018: Mestrado em Bioquímica - Universidade de São Paulo – USP
Bolsista CAPES.

2017: Monitoria – XII Curso de Inverno: Temas Avançados de Bioquímica e Biologia Molecular. Instituto de Química – Universidade de São Paulo – USP.

2017: Monitoria – XII Curso de Verão em Bioquímica e Biologia Molecular. Instituto de Química – Universidade de São Paulo – USP.

2016: Monitoria – XI Curso de Inverno: Temas Avançados de Bioquímica e Biologia Molecular. Instituto de Química – Universidade de São Paulo – USP.

2010-2015: Universidade do Estado do Rio Grande do Norte – UERN – Vínculo: Estudante de Graduação. Bolsista de Iniciação Científica - CNPq.

2013-2014: *Scholarship*, University of Alberta (UofA) – Graduação Sanduiche – Programa Ciência Sem Fronteiras – CAPES. Edmonton, Canadá.

2013: Curso de curta duração em Sistemas Antioxidantes e Sinalização Redox em Plantas. (Carga horária: 12h), Universidade do Estado do Rio Grande do Norte, UERN, Brasil.

2013: Curso de curta duração em Princípios Cromatografia de Proteínas. (Carga horária: 8h). Universidade do Estado do Rio Grande do Norte, UERN, Brasil.

2012-2013: Universidade do Estado do Rio Grande do Norte – UERN – Vínculo: Bolsista monitora de Bioquímica Molecular do Programa Institucional de Monitorias.

2012: Curso de curta duração em Fundamentos da Experimentação em Bioquímica. (Carga horária: 8h). Universidade do Estado do Rio Grande do Norte, UERN, Brasil.

4) **Lista de até 10 resultados de pesquisa mais relevantes**

4.1) *Resumos apresentados em congresso:*

DE ALMEIDA, D. R. Q.. Energy fluency rate as a key parameter for modulating the efficacy of methylene blue photodynamic therapy against pancreatic cancer cells. In: São Paulo school of advanced science on modern topics in biophotonics, 2019, São Carlos - SP. Cancer, 2019.

GOMES, V. M. ; WAILEMANN, R. A. M. ; TERRA, L. F. ; **DE ALMEIDA, D. R. Q.** ; SANTOS, A. F. ; LABRIOLA, L. . HSPB1 is essencial for inducing resistance to proteotoxic stress in beta-cell. In: World congress of the international pancreas & islet transplant association, 2019, Lyon. Diabetes, 2019.

GOMES,V.M.;MANSANO,R.A.W.;TERRA,L.F.;OLIVEIRA,T.C.;**DEALMEIDA,D.R.Q.**;
SANTOS,A.F.; LABRIOLA, L. . HSPB1 is a key mediator of prolactin (PRL) inhibition
of ER stress-induced beta-cell death. In: Fourth South American Symposium in Signal
Transduction and Molecular Medicine, 2018, Bariloche. Diabetes, 2018.

DE ALMEIDA, D. R. Q.; SANTOS, A. F. ; TERRA, L. F. ; WAILEMANN, R. A. M. ;
RAVAGNANI, F. G. ; BAPTISTA, M. S. ; LABRIOLA, L. . Methylene blue-photodynamic
therapy (MB-PDT) efficacy in pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) depends on
necroptosis induction. In: Fourth South American Symposium in Signal Transduction
and Molecular Medicine, 2018, Bariloche. Cancer, 2018.

ALMEIDA, D. R. Q.; dos Santos, A.F.; WAILEMANN, R. A. M.; TERRA, L. F.;
OLIVEIRA, T. C.; GOMES, V. M.; BAPTISTA, M. S.; LABRIOLA, L. Photodynamic
Therapy Induces Significant Cell Death of Human Pancreatic Cancer Cells. In: XLVI
Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2017,
Águas de Lindóia. XLVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e
Biologia Molecular, 2017.

Ancély F. dos Santos; Leticia F. Terra; **Daria Raquel Q. de Almeida**; Rosângela A.
M. Wailemann; Talita C. Oliveira; Vinícius M. Gomes; André C. Pimentel; Walter R.
Terra; Maurício S. Baptista and Leticia Labriola. Photodynamic Therapy Using
Methylene Blue: One Shot and Many ways to Die. 25th ECDO - Euroconference on
Apoptosis: "Cell death and immunity in disease; from molecules to translational
medicine" Leuven, Belgium, 2017.

MOTA, T. R., MIRANDA, C. B. F., OLIVEIRA, F. F. M., ALBUQUERQUE, C.
C., VERAS, D. M., **ALMEIDA, D. R. Q.**, ARAÚJO-FILHO, J. H. , MARTINS, T.
F.; In Vitro Antibacterial Effect of Essential Oils Against *Staphylococcus*
aureus. In: XIII Reunião Regional do Nordeste da SBBq - VI International
Symposium in Biochemistry of Macromolecules and Biotechnology, 2016,
Fortaleza-CE.

4.1) Artigos completos publicados em periódicos:

GOMES, V. M. ; WALLEMANN, R. A. M. ; ARINI, GABRIEL S. ; OLIVEIRA, T. C. ; ALMEIDA, D. R. Q. ; SANTOS, A. F. ; TERRA, L. F. ; LORTZ, S. ; LABRIOLA, L. . HSPB1 Is Essential for Inducing Resistance to Proteotoxic Stress in Beta-Cells. *Cells*, v. 10, p. 2178, 2021.

DOS SANTOS, ANCELY FERREIRA ; ARINI, GABRIEL SANTOS ; DE ALMEIDA, DARIA RAQUEL QUEIROZ; LABRIOLA, LETICIA . Nanophotosensitizers for cancer therapy: a promising technology?. *Journal of Physics:Materials*, v. x, p. x-2021, 2021.

SANTOS, A. F. ; INAGUE, A. ; ARINI, GABRIEL S. ; TERRA, L. F. ; WALLEMANN, R. A. M. ; PIMENTEL, A. C. ; YOSHINAGA, M. Y. ; SILVA, R. R. ; SEVERINO, D. ; DE ALMEIDA, D. R. Q. ; GOMES, V. M. ; BRUNI-CARDOSO, A. ; TERRA, W. R. ; MIYAMOTO, S. ; BAPTISTA, M. S. ; LABRIOLA, L. . Distinct photo-oxidation-induced cell death pathways lead to selective killing of human breast cancer cells. *Cell Death & Disease*, v. 11, p. 1058-1070, 2020.

ALLADIN-MUSTAN, B. S. ; LIU, Y. ; LI, Y. ; DE ALMEIDA, D. R. Q. ; YUZYK, J. ; MENDES, C. F. ; GIBBS, J.M. . Reverse transcription lesion-induced DNA amplification: An instrument-free isothermal method to detect RNA. *ANALYTICACHIMICA ACTA(ONLINE)*,v.1149,p.238130,2020.

DOS SANTOS, ANCELY FERREIRA ; DE ALMEIDA, DARIA RAQUEL QUEIROZ ; TERRA, LETICIA FERREIRA ; BAPTISTA, MAURICIO S. ; LABRIOLA, LETICIA . Photodynamic therapy in cancer treatment - an update review. *Journal of Cancer Metastasis and Treatment*, v. 2019, p. 25, 2019.


DOS SANTOS, ANCÉLY F. ; DE ALMEIDA, DARIA RAQUEL Q. ; TERRA, LETÍCIA F. ; WAILEMANN, ROSANGELA A.M. ; GOMES, VINÍCIUS M. ; ARINI, GABRIEL S. ; RAVAGNANI, FELIPE G. ; BAPTISTA, MAURÍCIO S. ; LABRIOLA, LETICIA . Fluence Rate Determines PDT Efficiency in Breast Cancer Cells Displaying Different GSH Levels. PHOTOCHEMISTRY AND PHOTOBIOLOGY

ANEXO B

- *Papers de colaboração publicados durante o Doutorado*



IOP Publishing *J. Phys. Mater.* 4 (2021) 032006 <https://doi.org/10.1088/2515-7639/abf7dd>

Journal of Physics: Materials

 CrossMark

TOPICAL REVIEW

Nanophotosensitizers for cancer therapy: a promising technology?

Ancély Ferreira dos Santos , Gabriel S Arini, Daria Raquel Queiroz de Almeida and Leticia Labriola* 

Biochemistry Department, Chemistry Institute, University of São Paulo, São Paulo, Brazil
* Author to whom any correspondence should be addressed.
E-mail: labriola@iq.usp.br

Keywords: photodynamic therapy, nanophotosensitizers, nanomaterials, cancer


RECEIVED
28 December 2020

REVISED
25 March 2021

ACCEPTED FOR PUBLICATION
14 April 2021

PUBLISHED
7 May 2021

Original content from this work may be used under the terms of the [Creative Commons Attribution 4.0 licence](#).
Any further distribution of this work must maintain attribution to the author(s) and the title of the work, journal citation and DOI.



Abstract
Photodynamic therapy (PDT) has been clinically applied to cure various diseases including cancer. Indeed, photoporphyrin (porfimer sodium, Axcan Pharma, Montreal, Canada), a heterogenous mixture of porphyrins, was the first photosensitizer (PS) approved for the treatment of human bladder cancer in 1993 in Canada. Over the past 10 years the use of PDT in the treatment of benign and malignant lesions has increased dramatically. However, PDT is still considered as an adjuvant strategy due to its limitations, primarily including low tissue penetration by light and inaccurate lesion selectivity by the PSs. To overcome this scenario, new technologies and approaches including nanotechnology have been incorporated into the concept of PS formulations as PS delivery systems, as PSs per se or as energy transducers. The ideal nanophotosensitizer (NPS) for cancer therapy should possess the following characteristics: biocompatibility and biodegradability without toxicity, stability in physiological conditions, tumor specific targeting, strong near infrared absorption for efficient and sufficient light absorbance and large singlet oxygen quantum yield for PDT. To fulfill these requirements, several nanoscale delivery platforms and materials have been developed. In this review we will focus on the state of the art of nanotechnology contributions to the optimization of PDT as a therapeutic alternative to fight against cancer. For this purpose we will start from the basic concepts of PDT, discuss the versatility in terms of NPS formulations and how to tackle the deficiencies of the current therapy. We also give our critical view and suggest recommendations for improving future research on this area.

HSPB1 Is Essential for Inducing Resistance to Proteotoxic Stress in Beta-Cells

Vinicius M. Gomes ¹, Rosangela A. M. Wailemann ¹, Gabriel S. Arini ¹, Talita C. Oliveira ¹,
Daria R. Q. Almeida ¹, Ancély F. dos Santos ¹, Leticia F. Terra ¹, Stephan Lortz ^{2,*} and Leticia Labriola ^{1,*}

¹ Biochemistry Department, Chemistry Institute, University of São Paulo, São Paulo 05508000, Brazil; vinickjp@gmail.com (V.M.G.); rosangelawailemann@gmail.com (R.A.M.W.); gabrielbio19@gmail.com (G.S.A.); talita.c.oliveira@gmail.com (T.C.O.); queirozd@ualberta.ca (D.R.Q.A.); ancelybqi@gmail.com (A.F.d.S.); leterra@gmail.com (L.F.T.)

² Institute of Clinical Biochemistry, Hannover Medical School (MHH), Carl-Neuberg-Straße, 1, 30625 Hannover, Germany

* Correspondence: lortz.stephan@mh-hannover.de (S.L.); labriola@iq.usp.br (L.L.)



Citation: Gomes, V.M.; Wailemann, R.A.M.; Arini, G.S.; Oliveira, T.C.; Almeida, D.R.Q.; dos Santos, A.F.; Terra, L.F.; Lortz, S.; Labriola, L. HSPB1 Is Essential for Inducing Resistance to Proteotoxic Stress in Beta-Cells. *Cells* **2021**, *10*, 2178. <https://doi.org/10.3390/cells10092178>

Academic Editor: Alexander E. Kabakov

Received: 7 July 2021

Accepted: 17 August 2021

Published: 24 August 2021

Abstract: During type 1 diabetes mellitus (T1DM) development, beta-cells undergo intense endoplasmic reticulum (ER) stress that could result in apoptosis through the failure of adaptation to the unfolded protein response (UPR). Islet transplantation is considered an attractive alternative among beta-cell replacement therapies for T1DM. To avoid the loss of beta-cells that will jeopardize the transplant's outcome, several strategies are being studied. We have previously shown that prolactin induces protection against proinflammatory cytokines and redox imbalance-induced beta-cell death by increasing heat-shock protein B1 (HSPB1) levels. Since the role of HSPB1 in beta cells has not been deeply studied, we investigated the mechanisms involved in unbalanced protein homeostasis caused by intense ER stress and overload of the proteasomal protein degradation pathway. We tested whether HSPB1-mediated cytoprotective effects involved UPR modulation and improvement of protein degradation via the ubiquitin-proteasome system. We demonstrated that increased levels of HSPB1 attenuated levels of pro-apoptotic proteins such as CHOP and BIM, as well as increased protein ubiquitination and the speed of proteasomal protein degradation. Our data showed that HSPB1 induced resistance to proteotoxic stress and, thus, enhanced cell survival via an increase in beta-cell proteolytic capacity. These results could contribute to generate strategies aimed at the optimization of beta-cell replacement therapies.

Keywords: heat-shock proteins; diabetes mellitus; beta-cells; endoplasmic reticulum stress; proteostasis; HSPB1; cytoprotection; apoptosis

ARTICLE

Open Access

Distinct photo-oxidation-induced cell death pathways lead to selective killing of human breast cancer cells

Ancély F. Dos Santos¹, Alex Inague¹, Gabriel S. Arini¹, Letícia F. Terra¹, Rosangela A. M. Wailemann¹, André C. Pimentel¹, Marcos Y. Yoshinaga¹, Ricardo R. Silva², Divinomar Severino¹, Daria Raquel Q. de Almeida¹, Vinícius M. Gomes¹, Alexandre Bruni-Cardoso¹, Walter R. Terra¹, Sayuri Miyamoto¹, Maurício S. Baptista¹ and Leticia Labriola¹

Abstract

Lack of effective treatments for aggressive breast cancer is still a major global health problem. We have previously reported that photodynamic therapy using methylene blue as photosensitizer (MB-PDT) massively kills metastatic human breast cancer, marginally affecting healthy cells. In this study, we aimed to unveil the molecular mechanisms behind MB-PDT effectiveness and specificity towards tumor cells. Through lipidomics and biochemical approaches, we demonstrated that MB-PDT efficiency and specificity rely on polyunsaturated fatty acid-enriched membranes and on the better capacity to deal with photo-oxidative damage displayed by non-tumorigenic cells. We found out that, in tumorigenic cells, lysosome membrane permeabilization is accompanied by ferroptosis and/or necroptosis. Our results also pointed at a cross-talk between lysosome-dependent cell death (LDCD) and necroptosis induction after photo-oxidation, and contributed to broaden the understanding of MB-PDT-induced mechanisms and specificity in breast cancer cells. Therefore, we demonstrated that efficient approaches could be designed on the basis of lipid composition and metabolic features for hard-to-treat cancers. The results further reinforce MB-PDT as a therapeutic strategy for highly aggressive human breast cancer cells.



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Analytica Chimica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/aca

Reverse transcription lesion-induced DNA amplification: An instrument-free isothermal method to detect RNA



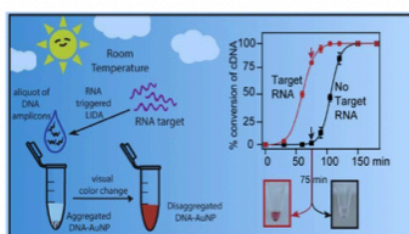
B. Safeenaz Alladin-Mustan, Yuning Liu, Yimeng Li, Daria R.Q. de Almeida, Jesse Yuzik, Camilla F. Mendes, Julianne M. Gibbs*

Department of Chemistry, University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada, T6E 2G2

HIGHLIGHTS

- Room temperature RNA transcription followed by cDNA amplification and detection.
- Amplification was achieved by reverse transcription lesion-induced DNA amplification.
- Amplicons without prior separation from the LIDA primers or enzyme were detected by the rapid.
- Disaggregation of DNA-modified gold nanoparticles.
- This method exhibits a detection limit of ~100 amoles target RNA in the presence of 4 μ g cellular RNA.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 April 2020

Received in revised form

1 December 2020

Accepted 4 December 2020

Available online 17 December 2020

Keywords:

Lesion induced DNA amplification (LIDA)

DNA modified gold nanoparticles (DNA-AuNP)

RNA detection

colorimetric method

room temperature amplification and

detection

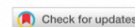
ABSTRACT

One challenge in point-of-care (POC) diagnostics is the lack of room-temperature methods for RNA detection based on enzymatic amplification and visualization steps. Here we perform reverse transcription lesion-induced DNA amplification (RT-LIDA), an isothermal amplification method that only requires T4 DNA ligase. RT-LIDA involves the RNA-templated ligation of DNA primers to form complementary DNA (cDNA) followed by toehold-mediated strand displacement of the cDNA and its exponential amplification via our isothermal ligase chain reaction LIDA. Each step is tuned to proceed at 28 °C, which falls within the range of global room temperatures. Using RT-LIDA, we can detect as little as ~100 amol target RNA and can distinguish RNA target from total cellular RNA. Finally, we demonstrate that the resulting DNA amplicons can be detected colorimetrically, also at room temperature, by rapid, target-triggered disassembly of DNA-modified gold nanoparticles. This integrated amplification/detection platform requires no heating or visualization instrumentation, which is an important step towards realizing instrument-free POC testing.

© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

Review

Open Access



Photodynamic therapy in cancer treatment - an update review

Ancély Ferreira dos Santos, Daria Raquel Queiroz de Almeida, Leticia Ferreira Terra, Maurício S. Baptista, Leticia Labriola

Department of Biochemistry, Chemistry Institute, University of São Paulo, São Paulo 05508-000, Brazil.

Correspondence to: Prof. Leticia Labriola, Department of Biochemistry, Chemistry Institute, University of São Paulo, São Paulo 05508-000, Brazil. E-mail: labriola@iq.usp.br; Prof. Maurício S. Baptista, Department of Biochemistry, University of São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes 748, São Paulo 05508-900, Brazil. E-mail: baptista@iq.usp.br

How to cite this article: dos Santos AF, de Almeida DRQ, Terra LF, Baptista MS, Labriola L. Photodynamic therapy in cancer treatment - an update review. *J Cancer Metastasis Treat* 2019;5:25. <http://dx.doi.org/10.20517/2394-4722.2018.83>

Received: 30 Nov 2018 **First Decision:** 22 Dec 2018 **Revised:** 1 Feb 2019 **Accepted:** 12 Feb 2019 **Published:** 29 Mar 2019

Science Editor: William P. Schiemann **Copy Editor:** Cai-Hong Wang **Production Editor:** Huan-Liang Wu

Abstract

Cancer remains a worldwide health problem, being the disease with the highest impact on global health. Even with all the recent technological improvements, recurrence and metastasis still are the main cause of death. Since photodynamic therapy (PDT) does not compromise other treatment options and presents reduced long-term morbidity when compared with chemotherapy or radiotherapy, it appears as a promising alternative treatment for controlling malignant diseases. In this review, we set out to perform a broad up-date on PDT in cancer research and treatment, discussing how this approach has been applied and what it could add to breast cancer therapy. We covered topics going from the photochemical mechanisms involved, the different cell death mechanisms being triggered by a myriad of photosensitizers up to the more recent-on-going clinical trials.

Keywords: Photodynamic therapy, breast cancer, photosensitizers, cell death

Special Issue Research Article

Fluence Rate Determines PDT Efficiency in Breast Cancer Cells Displaying Different GSH Levels[†]

Ancély F. dos Santos, Daria Raquel Q. de Almeida, Letícia F. Terra, Rosangela A.M. Wailemann, Vinícius M. Gomes, Gabriel S. Arini, Felipe G. Ravagnani, Maurício S. Baptista ✉, Leticia Labriola ✉

First published: 19 November 2019 | <https://doi.org/10.1111/php.13182> | Citations: 12

[†] This article is part of a Special Issue dedicated to Dr. Thomas Dougherty.

[Read the full text >](#)

 PDF  TOOLS  SHARE

Abstract

Photodynamic therapy (PDT) appears as a promising alternative in the treatment of breast cancer since it can be highly effective in curing cancer while preserving normal tissue. However, predicting outcomes in PDT still constitutes a great challenge. One of the parameters that are usually empirically determined is the rate of photon flux delivered to the tissue (light fluence rate). In the present study, we intended to understand why monolayers of human cells derived from mammary adenocarcinomas (MDA-MB-231 and MCF-7) respond quite differently to fluence rates (cells were irradiated either for 6 or for 16 min) at a fixed light dose (4.5 J cm^{-2}) delivered with an array of LEDs in a typical methylene blue PDT protocol. While death rates of MDA-MB-231 cells were insensitive to the fluence rate, MCF-7 cells showed a quite impressive (three times) decrease in cell death levels in the shorter irradiation protocol. Independent on cell type cell death was invariably correlated with the depletion of reduced glutathione intracellular levels and consequently with widespread redox misbalance. Our data show the potential to optimize fluence rates to provide exhaustion of the cell antioxidant responses in order to circumvent therapy resistance of breast tumors.

ANEXO C

- *Paper de primeira autoria publicado durante o Doutorado*

Photochemical & Photobiological Sciences
<https://doi.org/10.1007/s43630-022-00347-4>

ORIGINAL PAPERS



Necroptosis activation is associated with greater methylene blue-photodynamic therapy-induced cytotoxicity in human pancreatic ductal adenocarcinoma cells

Daria R. Q. de Almeida¹ · Ancély F. dos Santos¹ · Rosangela A. M. Wailemann¹ · Letícia F. Terra¹ · Vinícius M. Gomes¹ · Gabriel S. Arini¹ · Ester R. M. Bertoldi¹ · Eduardo M. Reis¹ · Maurício S. Baptista¹ · Leticia Labriola¹ 

Received: 8 July 2022 / Accepted: 23 November 2022

© The Author(s), under exclusive licence to European Photochemistry Association, European Society for Photobiology 2022

Abstract

Pancreatic ductal adenocarcinomas (PDAC) are the fourth leading cause of death due to neoplasms. In view of the urgent need of effective treatments for PDAC, photodynamic therapy (PDT) appears as a promising alternative. However, its efficacy against PDAC and the mechanisms involved in cell death induction remain unclear. In this study, we set out to evaluate PDT's cytotoxicity using methylene blue (MB) as a photosensitizer (PS) (MB-PDT) and to evaluate the contribution of necroptosis in its effect in human PDAC cells. Our results demonstrated that MB-PDT induced significant death of different human PDAC models presenting two different susceptibility profiles. This effect was independent of MB uptake or its subcellular localization. We found that the ability of triggering necroptosis was determinant to increase the treatment efficiency. Analysis of single cell RNA-seq data from normal and neoplastic human pancreatic tissues showed that specific necroptosis proteins RIPK1, RIPK3 and MLKL presented significant higher expression levels in cells displaying a transformed phenotype providing further support to the use of approaches that activate necroptosis, like MB-PDT, as useful adjunct to surgery of PDAC to tackle the problem of microscopic residual disease as well as to minimize the chance of local and metastatic recurrence.

