

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

Raphael Guimarães Lopes

Investigação da morte de células B16F10 *in vitro* com associação de
radioterapia e terapia fotodinâmica

São Carlos
2024

RAPHAEL GUIMARAES LOPES

Investigação da morte de células B16F10 *in vitro* com associação de radioterapia e terapia fotodinâmica

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

Área de concentração: Física Biomolecular

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Natalia Mayumi Inada

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

São Carlos
2024

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.

Lopes, Raphael Guimarães

Investigação da morte de células B16F10 in vitro com associação de radioterapia e terapia fotodinâmica / Raphael Guimarães Lopes; orientadora Natalia Mayumi Inada - versão corrigida -- São Carlos, 2024.

86 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Física Biomolecular) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2024.

1. Terapia fotodinâmica. 2. Radioterapia. 3. Melanoma. 4. Apoptose. I. Inada, Natalia Mayumi, orient. II. Título.

Dedico este trabalho à minha família e ao meu amor, Nayra, que me apoiaram tornando esta conquista possível.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por me conceder a conclusão de mais uma etapa da minha vida e por fazer-se presente todo tempo.

Aos meus familiares. Aqui agradeço minha mãe: mulher guerreira, meu espelho e fortaleza. Meus avós, pelo amor incondicional. Meu irmão, pela parceria e apoio. Meus tios Rogério e João Carlos sempre estiveram prontos para ajudar, não importa a dificuldade em que eu me encontrasse.

À Ma. Nayra, meu amor e companheira de vida, agradeço por me ajudar por todo o mestrado com revisões e sugestões, me apoiando em todos os momentos principalmente nos momentos mais críticos e sempre acreditando em mim.

À Dr^a Natalia Inada, minha orientadora e amiga, por ter aberto as portas mim no IFSC. Obrigado por seus ensinamentos, seus conselhos e conversas, sua atenção, ajuda e por construir junto comigo esse caminho.

Ao Giancarlo, meu ex companheiro de laboratório. Obrigado por seu apoio e pela amizade que começou no IFSC e continua fora dele.

Ao Johan, pela amizade, conselhos e as piadas que deixaram os dias mais leves.

À Claudinha, pelas conversas divertidas e sempre estar disposta a dividir um cafezinho.

À Letícia, minha “mãe de laboratório”, obrigado pelas dicas, ajudas e ensinamentos dentro laboratório. Pelas sugestões e revisões no texto

Às amigas, Camilla Costa, Bretas, Malu, Camila Antunes e Lorraine, obrigado pela amizade, pelos “rolês”, pelas conversas e trocas e sempre me incentivarem.

Aos amigos da sala 35, Tiago, Maju, Rebeca, Gabriel, AnaJu, Loraine, obrigado pelas conversas, pelos bandecos e pela hora da cachaça.

À professora Cristina Kurachi, pela amizade, conselhos e conversas durante o café.

À Neusa e a toda equipe da Biblioteca Prof. Bernhard Gross, do IFSC, não apenas pelo excelente suporte nas formatações, mas também pela atenção e cuidado em me tranquilizar.

Aos funcionários da secretaria, Adriane, Benê, Cristiane e Wagner, pelo excepcional suporte administrativo. A disponibilidade e atenção foram fundamentais para que eu pudesse conduzir minha pesquisa de forma tranquila.

Ao Prof Dr Vanderlei Salvado Bagnato, pelas discussões científicas, ideias, motivações e todo imprescindível apoio financeiro.

À Prof^a Dr^a Alexandra Ivo de Medeiros e seu aluno Breno Vilas Boas Raimundo, por me instruírem com os experimentos de detecção de morte celular.

Ao Instituto de Física de São Carlos, pela oportunidade de realização do mestrado em Física Biomolecular, por toda infraestrutura de laboratórios, de sala de aula, biblioteca.

À FAPESP, CEPOF, CAPES, FAPESP, EMBRABII FAFQ e CNPq, que me forneceram suporte financeiro para a realização desta pesquisa.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

RESUMO

LOPES, R. G. **Investigação da morte de células B16F10 *in vitro* com associação de radioterapia e terapia fotodinâmica.** 2024. 86 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2024.

O melanoma, um carcinoma cutâneo que afeta os melanócitos produtores de melanina, é notório por sua elevada propensão à metástase, resultando em baixa sobrevida aos pacientes. Terapias convencionais como cirurgia, quimioterapia, radioterapia e imunoterapia, enfrentam desafios devido à resistência tumoral. A radioterapia (RT) e a terapia fotodinâmica (TFD) são modalidades médicas voltadas para a eliminação de tumores primários e sabe-se que associadas com a imunoterapia, podem potencializar a resposta tumoral através de mecanismos de morte celular imunogênica. Esta pesquisa avaliou a morte de células de melanoma murino B16F10 *in vitro* após aplicação isolada e/ou combinada de RT e TFD. Utilizou-se a clorina comercial Photoditazine® (PDZ) como fotossensibilizador (FS) irradiada em 660 nm. Fluências de 2, 6 e 20 J/cm² foram testadas na fase de padronização dos grupos submetidos à TFD, com as concentrações de PDZ de 1, 5, 10 e 20 µg/ml com 1 hora de incubação no escuro e avaliadas pelo ensaio de atividade metabólica 24 horas. Os parâmetros dos grupos experimentais para a associação de RT e TFD foram: dose de RT de 4 Gy, TFD com fluência de 2 J/cm² e PDZ na concentração de 5 µg/ml com 1 hora de incubação prévia no escuro. Os intervalos testados entre terapias foram de 1, 4, 24 e 48 horas para as análises da atividade metabólica relativa e os tempos de 24 e 48 horas após a última terapia para a análise da morte celular por citometria de fluxo. Foi observado que a combinação das terapias em intervalos mais longos favoreceu o sinergismo, sendo o grupo RT+TFD com 48 horas de intervalo entre as terapias e análise 24 horas após o mais eficiente, com taxa de morte celular por apoptose de 37,02%. A ordem de aplicação das terapias também demonstrou ser um fator determinante, com a sequência RT+TFD demonstrando maior eficácia na indução de morte celular apoptótica no mesmo protocolo de tempos entre terapias e análise, comparando com a ordem inversa (TFD+RT), que apresentou uma taxa apoptótica de apenas 11,22%. O presente estudo revelou avanços significativos na busca por estratégias terapêuticas eficazes contra o melanoma, destacando a combinação da Radioterapia e Terapia Fotodinâmica como uma abordagem especialmente promissora para o intervalo de 48 horas. O protocolo RT e TFD, com intervalo 48 horas, destaca potencial imunogênico ao induzir importante morte apoptótica, sugerindo estimulação da resposta imunológica. Apesar dos avanços, há necessidade de investigações adicionais para compreender os mecanismos subjacentes, especialmente na relação entre TFD, ciclo celular e resposta imunogênica. A continuidade da pesquisa visa contribuir para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas inovadoras contra o melanoma.

Palavras-chave: Terapia Fotodinâmica, radioterapia, melanoma, apoptose.

ABSTRACT

LOPES, R. G. **Investigation of the death of B16F10 cells in vitro with the association of radiotherapy and photodynamic therapy.** 2024. 86 p. Dissertation (Master in Science) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2024.

Melanoma, a skin carcinoma that affects melanin-producing melanocytes, is notorious for its high propensity to metastasize, resulting in low patient survival. Conventional therapies such as surgery, chemotherapy, radiotherapy and immunotherapy face challenges due to tumor resistance. Radiotherapy (RT) and photodynamic therapy (PDT) are medical modalities aimed at eliminating primary tumors and it is known that, associated with immunotherapy, they can enhance the tumor response through mechanisms of immunogenic cell death. This research evaluated the death of B16F10 murine melanoma cells *in vitro* after isolated and/or combined application of RT and PDT. The commercial chlorin Photoditazine® (PDZ) was used as a photosensitizer (FS) irradiated at 660 nm. Fluencies of 2, 6 and 20 J/cm² were tested in the standardization phase of the groups subjected to PDT, with PDZ concentrations of 1, 5, 10 and 20 µg/ml with 1 hour of incubation in the dark and evaluated by the 24-hour metabolic activity. The parameters of the experimental groups for the association of RT and PDT were: RT dose of 4 Gy, PDT with a fluence of 2 J/cm² and PDZ at a concentration of 5 µg/ml with 1 hour of prior incubation in the dark. The intervals tested between therapies were 1, 4, 24 and 48 hours for the analysis of relative metabolic activity and the times of 24 and 48 hours after the last therapy for the analysis of cell death by flow cytometry. It was observed that the combination of therapies at longer intervals favored synergism, with the RT+PDT group with a 48-hour interval between therapies and analysis 24 hours later being the most efficient, with a rate of cell death due to apoptosis of 37.02%. The order of application of therapies also proved to be a determining factor, with the RT+PDT sequence demonstrating greater efficacy in inducing apoptotic cell death in the same protocol of times between therapies and analysis, compared to the reverse order (PDT+RT), which showed an apoptotic rate of only 11.22%. The present study revealed significant advances in the search for effective therapeutic strategies against melanoma, highlighting the combination of Radiotherapy and Photodynamic Therapy as an especially promising approach for the 48-hour interval. The RT and PDT protocol, 48 hours apart, improves immunogenic potential by inducing significant apoptotic death, suggesting stimulation of the immune response. Despite advances, there is a need for additional investigations to understand the underlying mechanisms, especially in the relationship between PDT, cell cycle and immunogenic response. Continuing research aims to contribute to the development of innovative therapeutic strategies against melanoma.

Keywords: Photodynamic therapy, radiotherapy, melanoma, apoptosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Classificação global de morte prematura por câncer para o ano de 2020.....	21
Figura 2 -	Representação de diferentes cânceres de pele e sua localização da pele.....	25
Figura 3 -	Via de sinalização RAS/RAF/MEK/ERK. RTK (receptor tirosina quinase), RAS (sarcoma de rato), RAF (oncogene viral do sarcoma murino v-raf), MEK (proteína quinase ativadora da MAP) e ERK (quinase regulada por sinal extracelular)	28
Figura 4 -	Funcionamento simplificado da TFD. O FS é excitado por comprimento de onda específico, transfere energia para o oxigênio para que a terapia possa causar toxicidade celular.....	31
Figura 5 -	Diagrama simplificado de Jablonski.....	32
Figura 6 -	Estrutura química do Photodithazine.....	35
Figura 7 -	Espectro de absorção do Photodithazine a 5 µg/ml em DMEM e pH = 7.4.....	35
Figura 8 -	Representação dos mecanismos de morte celular: Necrose, caracterizada pelo colapso e degradação da célula; Apoptose, um processo programado de morte celular; e Autofagia, um mecanismo de reciclagem celular. Esses processos desempenham papéis distintos na homeostase e na patologia celular.....	37
Figura 9 -	Imagem da Biotable, sistema de iluminação para placas de cultura de 96 poços contendo LEDs com emissão no comprimento de onda 660 nm. Em A, Biotable com a fonte de alimentação. Em B, mostra a placa sendo iluminada pela Biotable (no experimento a porta do equipamento é fechada).....	47
Figura 10 -	Equipamento pré-clínico gerador de raios X. Em A, imagem mostrando todo o equipamento; B, imagem do painel, que indica os ajustes da energia, a corrente e a dose de raio X; C, imagem ilustrando a posição da placa de 96 poços dentro do gerador de raio X.....	48
Figura 11 -	Viabilidade celular de células B16F10 após o tratamento da Terapia fotodinâmica para as fluências investigadas de: A) 2 J/cm ² , B) 6 J/cm ² , C) 20/cm ² . Todos os grupos foram iluminados, sendo o controle não recebendo PDZ. Os ensaios foram realizados em triplicada com n=5 para cada grupo a cada	56

repetição. As letras representam diferença estatística entre os grupos, considerando o nível de significância de 99%, $p < 0,01$

- Figura 12 - Viabilidade celular da linhagem B16F10 após o tratamento de Radioterapia e Terapia fotodinâmica, com diferentes intervalos de tempo entre a aplicação das terapias: A) intervalo de 1 hora, B) intervalo de 4 horas C) 24 horas e D) 48 horas. O grupo Controle, representa células sem tratamento; RT, tratado com radioterapia isolada, PDZ, fotossensibilizador no escuro; TFD, terapia fotodinâmica isolada e RT+TFD, combinação de terapias. Os ensaios foram realizados em triplicada com $n=10$ 58
- Figura 13 - Análise de morte celular apoptótica por citometria de fluxo após tratamento com radioterapia e terapia fotodinâmica aplicando intervalo de 24 horas entre terapias. Controle: grupo não tratado; RT: radioterapia 4Gy; TFD: terapia fotodinâmica 2J/cm²; RT+TFD: associação das terapias. A análise foi realizada após 24 horas da TFD..... 61
- Figura 14 - Análise de morte celular necrótica por citometria de fluxo após tratamento com radioterapia e terapia fotodinâmica aplicando intervalo de 24 horas entre terapias. Controle: grupo não tratado; RT: radioterapia 4Gy; TFD: terapia fotodinâmica 2J/cm²; RT+TFD: associação das terapias. A análise foi realizada após 24 horas da TFD..... 62
- Figura 15 - Análise de morte celular apoptótica por citometria de fluxo após tratamento com radioterapia e terapia fotodinâmica aplicando intervalo de 24 horas entre terapias. Controle: grupo não tratado; RT: radioterapia 4Gy; TFD: terapia fotodinâmica 2J/cm²; RT+TFD: associação das terapias. A análise foi realizada após 48 horas da TFD..... 63
- Figura 16 - Análise de morte celular necrótica por citometria de fluxo após tratamento com radioterapia e terapia fotodinâmica aplicando intervalo de 24 horas entre terapias. Controle: grupo não tratado; RT: radioterapia 4Gy; TFD: terapia fotodinâmica 2J/cm²; RT+TFD: associação das terapias. A análise foi realizada após 48 horas da TFD..... 64
- Figura 17 - Análise de morte celular apoptótica por citometria de fluxo após tratamento com radioterapia e terapia fotodinâmica aplicando intervalo de 48 horas entre terapias. Controle: grupo não tratado; RT: radioterapia 4Gy; TFD: terapia fotodinâmica 2J/cm²; RT+TFD: associação das terapias. A análise foi realizada após 24 horas da TFD..... 67
- Figura 18 - Análise de morte celular necrótica por citometria de fluxo após tratamento com radioterapia e terapia fotodinâmica aplicando intervalo de 48 horas entre terapias. Controle: grupo não tratado; 68

RT: radioterapia 4Gy; TFD: terapia fotodinâmica 2J/cm²;
RT+TFD: associação das terapias. A análise foi realizada após
24 horas da TFD.....

Figura 19 - Análise de morte celular apoptótica por citometria de fluxo após
tratamento com radioterapia e terapia fotodinâmica aplicando
intervalo de 48 horas entre terapias. Controle: grupo não tratado;
RT: radioterapia 4Gy; TFD: terapia fotodinâmica 2J/cm²;
TFD+RT: associação das terapias. A análise foi realizada após
24 horas da TFD..... 70

Figura 20 - Análise de morte celular necrótica por citometria de fluxo após
tratamento com terapia fotodinâmica e radioterapia e aplicando
intervalo de 48 horas entre terapias. Controle: grupo não tratado;
RT: radioterapia 4Gy; TFD: terapia fotodinâmica 2J/cm²;
TFD+RT: associação das terapias. A análise foi realizada após
24 horas da TFD..... 71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estimativas de Incidência e Mortalidade para o câncer de pele no Brasil para o ano de 2023. Dados obtidos do INCA.....	22
Tabela 2 - Condições experimentais para padronização da Terapia Fotodinâmica.....	46
Tabela 3 - Condições experimentais para associação das terapias submetidas a análise por MTT.....	49
Tabela 4 - Grupos experimentais da associação de terapias submetidos a análise por citometria de fluxo.....	49
Tabela 5 - Protocolo de marcação para os grupos experimentais submetidos a citometria de fluxo.....	51
Tabela 6 - Síntese dos resultados de morte apoptótica e necrótica dos grupos dos experimentais.....	72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
APAF 1	Fator apoptótico de ativação de protease 1
ATCC	American Type Culture Collection
B-RAF	V-raf sarcoma murino oncogene viral homólogo B
BSA	Albumina Sérica Bovina
CASPASE	Cisteíno proteases de ácido aspartico
CBC	Carcinoma Basocelular
CEC	Carcinoma Espinocelular
CO ₂	Gás carbônico
CPNM	Câncer de Pele Não Melanoma
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
EGFR	Receptor de Fator de Crescimento Epitelial
ERK	Quinase Regulada por Sinal Extracelular
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
FS	Fotossensibilizador
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
ICG	Indocianina verde
INCA	Instituto Nacional de Câncer
MAPK	Proteína Quinase Ativada por Mitogeno
MCF-7	Michigan Cancer Foundation-7, câncer de mama
MEK	Proteína quinase ativadora da MAP
mg/mL	Miligramas por mililitro
MTT	brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
mW/cm ²	Miliwatts por centímetro quadrado
MX	Mitoxantrona
µL	Microlitro
nm	nanometro
¹ O ₂	Oxigenio singleto
O ₂ ^{·-}	Radical Superóxido
OCA	Agentes clareadores ópticos
OCT	Coerência óptica
·OH	Hidroxil
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBM	terapia de fotobiomodulação
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PDZ	Photodithazine
RAF	Vraf Sarcoma Murino Oncogene Viral
RAS	Sarcoma de Rato
RT	Radioterapia
RTK	Receptor Tirosina Quinase
SFB	Sorofetal Bovino
SUS	Sistema Único de Saúde
TFD	Terapia Fotodinâmica
TNF	Fator de Necrose Tumoral
Trail	Receptor de ligamento indutor de apoptose relacionado a TNF
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
2.1 Câncer de pele	25
2.2 Radioterapia (RT)	28
2.3 Terapia Fotodinâmica (TFD).....	30
2.2.1 Clorina	34
2.4. Tipos de morte celular.....	36
2.5 Terapias combinadas.....	39
3 OBJETIVOS	43
3.1 Objetivo geral.....	43
3.2 Objetivo específico	43
4 METODOLOGIA	45
4.1 Cultivo celular	45
4.2 Padronização do protocolo de TFD	45
4.3 Radioterapia	47
4.4 Protocolo TFD para de Associação das terapias	48
4.5 Ensaio de viabilidade celular pelo método do MTT.....	49
4.6 Detecção do tipo de morte celular por citometria de fluxo	50
4.7 Análise estatística.....	52
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
5.1 Padronização do protocolo de TFD em células da linhagem <i>in vitro</i>	55
5.2 Intervalo de aplicação entre as terapias RT e TFD	57
5.3 Avaliação de morte celular apoptótica e necrótica por citometria de fluxo .	60
6 CONCLUSÃO	75
REFERÊNCIAS	77

1 INTRODUÇÃO

Cânceres surgem com a proliferação e a disseminação desordenada de células transformadas, tendo sua letalidade dependendo de sua atividade de proliferação desregulada, da resistência ao sistema imune e da capacidade de invadir tecidos e metastatizar para locais distantes do hospedeiro.¹ O câncer é firmemente estabelecido como um dos principais desafios de saúde global e é uma das principais razões para mortes precoces em muitos países. Conforme as estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2020, em 112 dos 183 países investigados, o câncer foi identificado como a primeira ou segunda causa de morte antes dos 70 anos, e, em outros 23 países, ficou entre a terceira ou a quarta causa de morte do país, segundo ilustra a Figura 1.²

Estatísticas Globais do Câncer 2020

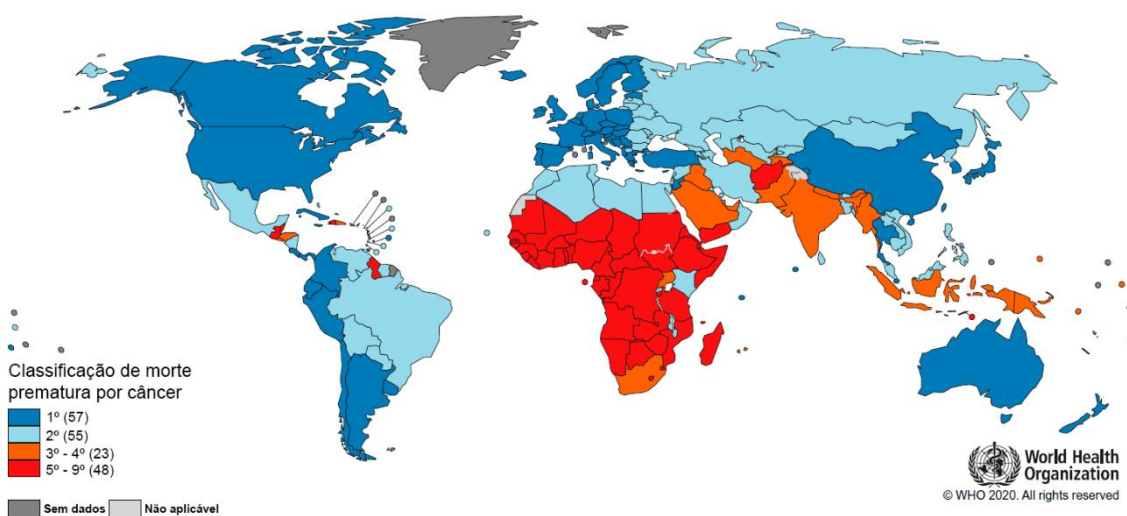


Figura 1 - Classificação global de morte prematura por câncer para o ano de 2020.
Fonte: Adaptada de OMS.²

No Brasil, segundo o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), o câncer de pele é o tipo mais frequente. Considerando todos seus subtipos, soma 32,6% de toda incidência de neoplasias no país como mostrado na Tabela 1. O câncer de pele do tipo melanoma possui uma incidência no Brasil de cerca de 1,28%, afetando cerca de 8.980 brasileiros, sendo sua taxa de mortalidade a mais alta dentre

os subtipos de câncer de pele, chegando a 21,4%, enquanto o câncer de pele não melanoma apresenta uma mortalidade de 1,2%.³

Tabela 1 - Estimativas de Incidência e Mortalidade para o câncer de pele no Brasil para o ano de 2023. Dados obtidos do INCA.

Neoplasias	Incidência (nº de casos)	Razão Incidência/total de Neoplasias (%)	Mortalidade (nº de casos)	Razão Mortalidade/ Incidência (%)
Pele não melanoma	220.490	31,32%	2653	1,20%
Pele melanoma	8.980	1,28%	1923	21,41%
Todas as Neoplasias	704.080	-	-	-

Fonte: Elaborada pelo autor.

A principal causa do câncer de pele é a exposição à radiação ultravioleta, que danifica o DNA de forma acumulativa. No caso do melanoma, também é relevante a exposição a fontes artificiais de radiação ultravioleta (UV), como lâmpadas e camas solares. Já para o câncer de pele não melanoma, fatores como idade, gênero, ocupações específicas (como indústria de vidro e eletrônicos, manuseio de substâncias químicas) e o uso de medicamentos imunossupressores, antifúngicos e diuréticos em combinação com exposição solar aumentam o risco.³

Os tratamentos padrão do câncer incluem a ressecção cirúrgica de tumores sólidos, radioterapias (RT) e quimioterapias.⁴ No entanto, com as altas taxas de reincidência dos tumores e os efeitos colaterais proporcionado pelas intervenções, há um aumento na procura pelo desenvolvimento de terapias mais eficazes e que sejam menos invasivas e debilitantes, como por exemplo, o desenvolvimento de terapias baseadas em luz ou laser.⁵⁻⁷

A Terapia fotodinâmica (TFD) surge como uma modalidade de tratamento alternativa, onde uma molécula fotoativável, fotossensibilizador (FS), é excitada com luz de comprimento de onda específico em presença de oxigênio molecular. O intuito é gerar espécies reativas de oxigênio (EROs) ou radicais livres, que reagem com o microambiente local causando a morte celular.⁸ A TFD já apresentou resultados clínicos satisfatórios nos tratamentos de alguns tipos de câncer, como de esôfago,^{9,10} pulmão,^{11,12} gástrico,^{13,14} mama,¹⁵⁻¹⁷ cabeça e pescoço,¹⁸⁻²¹ pâncreas,^{22,23} com

melhor eficácia na camada superficial de tecidos, como pele,²⁴ retina²⁵ e outros de fácil acesso.¹⁹ A aplicação da TFD para o tratamento de tumores em tecidos profundos é limitada, sobretudo, pela profundidade finita da luz nos tecidos.^{6, 26-28} Porém, a TFD também já se provou capaz de ativar uma resposta imune direcionada ao tumor, provocando morte das células cancerígenas por via apoptótica por meio de células do sistema imunológico.²⁹

A teoria da imunovigilância, proposta por Burnet e Thomas, previu que o sistema imunológico desempenha um papel crucial na prevenção e na eliminação do câncer, sendo capaz de erradicar células transformadas antes que elas evoluam para tumores.³⁰ O sistema imune interage com a célula tumoral não só na sua formação, mas também no seu desenvolvimento influenciando o fenótipo tumoral ao longo do tempo. Esse processo é caracterizado por três fases distintas: eliminação, equilíbrio e escape.^{31,32} Durante a fase de eliminação, a maioria das células tumorais é destruída pelo sistema imunológico. Algumas delas podem entrar na fase de equilíbrio, na qual fatores regulatórios mantêm as células tumorais inativas. No entanto, sob a pressão seletiva exercida por linfócitos e citocinas, determinadas variantes tumorais adquirem mutações que as tornam resistentes e avançam para a "fase de escape". Nesse estágio, essas células crescem de forma descontrolada, não enfrentando mais restrições imunológicas, o que leva à criação de um ambiente tumoral imunossupressor e, conseqüentemente, ao desenvolvimento de tumores clinicamente detectáveis. Essas variantes tumorais costumam ser resistentes às terapias convencionais e representam a principal causa de mortalidade em pacientes com câncer.^{33,34}

É cada vez mais necessário que a próxima geração de terapias contra o câncer compreenda abordagens combinatórias que superem as dificuldades de resistência tumoral por meio de mecanismos sinérgicos para que melhorem a sobrevida global e reduzam as taxas de recorrência do câncer.³⁵

A RT é uma ferramenta poderosa no tratamento do câncer, capaz de destruir células de câncer. No entanto, seus efeitos adversos podem ser significativos, incluindo reações cutâneas, fadiga e outros sintomas decorrentes da exposição dos tecidos normais à radiação. Esses efeitos podem ter um impacto substancial na qualidade de vida dos pacientes, especialmente devido a reações agudas e tardias. Diante dessas limitações da RT, a TFD surge como uma abordagem promissora, para

induzir a morte celular de forma mais localizada e específica. Ao combinar RT com TFD, é possível reduzir os danos aos tecidos saudáveis circundantes, minimizando assim os efeitos adversos associados à radioterapia convencional. Essa abordagem integrada busca melhorar a eficácia terapêutica mitigando os impactos negativos no paciente, representando uma alternativa promissora no tratamento do câncer. Portanto, a TFD e a RT podem não apenas matar tumores primários diretamente, como também induzir a morte celular imunogênica ativando uma resposta imune. A aplicação dos atuais avanços terapêuticos em conjunto com a terapia imunológica pode ser uma excelente estratégia para aumentar as chances de cura do câncer. Apenas um entendimento mais detalhado dos mecanismos moleculares pode nortear a implementação de modalidades de terapias combinadas.^{36,37}

Em busca de novas terapias e alternativas contra o câncer é que o presente estudo foi idealizado. Por isso, elucidar os efeitos de uma combinação entre terapias e sua interação com uma possível resposta imune eficaz contra o câncer se faz importante para futuras pesquisas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Câncer de pele

O câncer de pele é uma condição de alta prevalência global, com dois principais tipos: melanoma e não melanoma. Ambos afetam as células da pele, porém os agrupados sob a denominação de cânceres de pele não melanoma (CPNM), originam-se de células epiteliais queratinizadas, constituindo a maioria dos casos. Dentre os CPNM incluem o carcinoma basocelular (CBC) e espinocelular (CEC), que juntos representam 99% dos CPNMs.³⁸ A Figura 3 ilustra os tipos de câncer de pele.

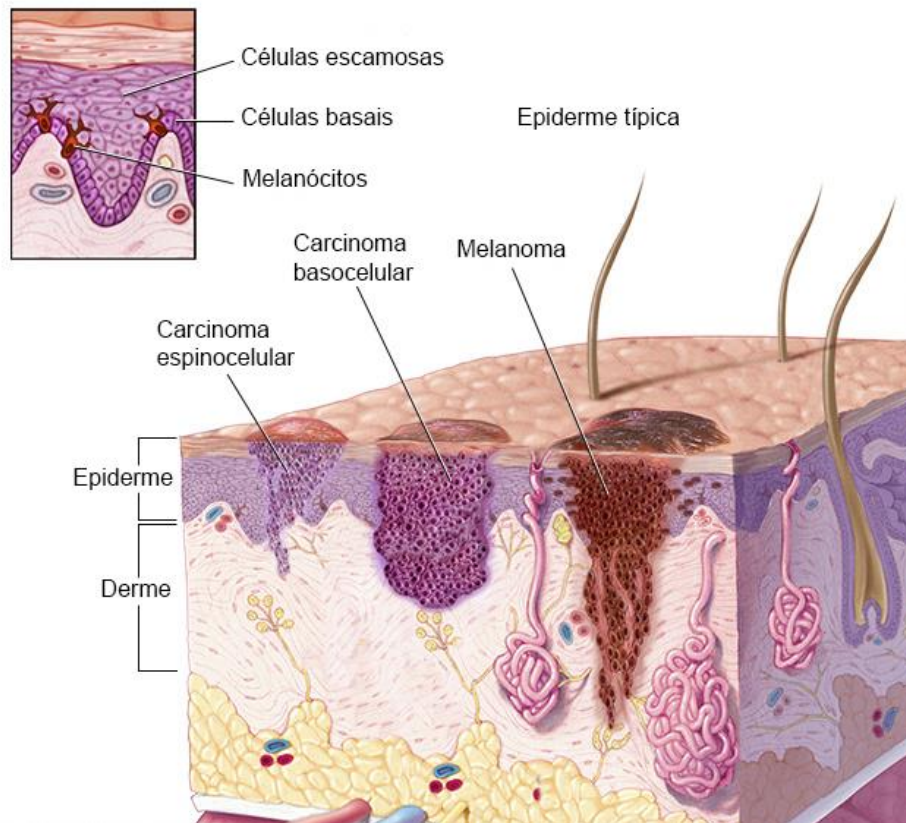


Figura 2 - Representação de diferentes cânceres de pele e sua localização da pele
 Fonte: Adaptada de MAYO FOUNDATION ...³⁹

Já o câncer de pele melanoma atinge o melanócito, célula especializada na produção de melanina, um pigmento de cor escura que confere proteção contra os raios UV do sol. O melanoma maligno pode ser pigmentado (melanótico) com lesões

escuras devido à melanina ou não pigmentado (amelanótico) com menos melanina devido à menor diferenciação dos melanócitos. Ambos possuem alta capacidade metastática, diminuindo a taxa de sobrevivência dos pacientes.^{40,41}

Os tumores metastáticos originados do melanoma demonstram uma taxa de sobrevivência global notavelmente baixa, abrangendo somente de 5 a 10% em 5 anos pós diagnóstico, com média de vida que oscila entre 6 e 10 meses, dependendo da localização das metástases.⁴² O melanoma tem a habilidade de disseminar-se para diversos órgãos e tecidos do corpo, com metástases iniciais ocorrendo na pele, tecido subcutâneo e linfonodos em 42% a 59% dos casos. As áreas mais comuns para as metástases viscerais compreendem o pulmão, fígado, cérebro, ossos e intestino, refletindo a natureza agressiva do melanoma metastático.⁴³

A análise dos locais de metástase à distância, com base nos dados do American Joint Committee on Cancer (AJCC) relacionados ao melanoma, revela a existência de três grupos de pacientes com diferentes prognósticos. O primeiro grupo apresenta metástases na pele, tecido subcutâneo e linfonodos distantes, com uma sobrevida média de 18 meses. O segundo grupo engloba pacientes com metástases pulmonares, cuja sobrevida média é de 12 meses. Por fim, o terceiro grupo consiste em pacientes com metástases viscerais, excluindo as pulmonares, que têm uma sobrevida média de 7 meses.⁴⁴

A mutação nos genes BRAF (v-Raf sarcoma murino oncogene viral homólogo B) desempenha um papel significativo na proliferação das células de melanoma, alterando o controle da apoptose e a sobrevivência celular, o que, por sua vez, desencadeia a proliferação associada ao câncer.⁴⁵ Essas mutações BRAF são identificadas em aproximadamente 40%-50% dos casos de melanoma, destacando sua relevância clínica no entendimento e tratamento dessa forma específica de câncer.⁴⁶⁻⁴⁸

O tratamento do melanoma é guiado pelo estágio da doença e, em alguns casos, pela presença da mutação no gene BRAF. Nos estágios iniciais, como o Estágio 0 e Estágio I, a excisão cirúrgica é a principal opção, e a biópsia do linfonodo sentinela pode ser considerada. Para o Estágio II, a excisão é seguida da mesma abordagem, incluindo a biópsia do linfonodo. Para o Estágio III, onde ocorre a disseminação para linfonodos, é necessária a excisão do tumor primário e dissecação dos linfonodos, com tratamento adjuvante, incluindo terapias direcionadas,

radioterapia e acompanhamento. No estágio avançado (Estágio IV), com metástases em órgãos distantes, a cirurgia, radioterapia e várias terapias, como imunoterapia e terapia alvo (incluindo aquelas direcionadas ao gene BRAF), podem ser utilizadas, dependendo do caso do paciente.⁴⁹

Ao considerar o contexto molecular do melanoma, é fundamental compreender a interconexão entre as mutações BRAF e a via da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK). Proteínas quinases são enzimas que modificam outras proteínas ao adicionar grupos fosfato, processo chamado de fosforilação. Elas desempenham um papel essencial na regulação de processos celulares, incluindo crescimento, diferenciação e sobrevivência celular, sendo frequentemente alvos terapêuticos importantes em doenças como o câncer.

A quinase BRAF, desempenha um papel crucial nessa via, mais especificamente na sequência RAS-RAF-MEK-ERK. Esta cascata regula a proliferação e sobrevivência celular, sendo ativada em resposta ao estímulo do receptor do fator de crescimento epitelial (EGFR) (Figura 4).⁵⁰ Em condições normais, a BRAF é inibida por feedback negativo, mas as mutações BRAF podem desregular essa inibição, resultando na persistência da ativação da via RAS-RAF-MEK-ERK e promovendo o crescimento celular descontrolado.⁵¹

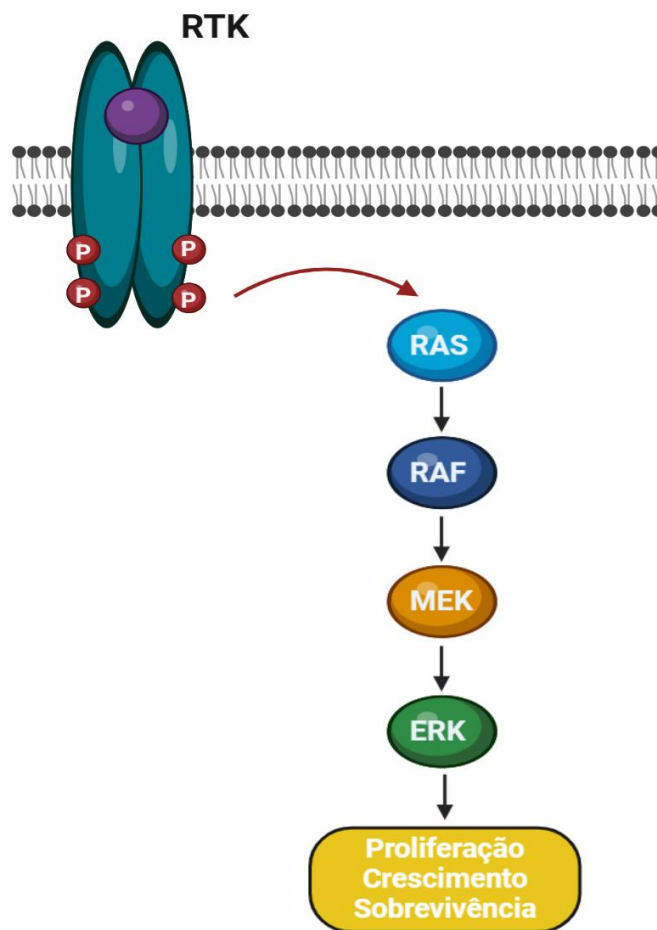


Figura 3 - Via de sinalização RAS/RAF/MEK/ERK. RTK (receptor tirosina quinase), RAS (sarcoma de rato), RAF (oncogene viral do sarcoma murino v-raf), MEK (proteína quinase ativadora da MAP) e ERK (quinase regulada por sinal extracelular).

Fonte: Elaborada pelo autor.

2.2 Radioterapia (RT)

Após a descoberta dos raios X por Wilhelm Conrad Röntgen em 1895 e as contribuições de Marie Curie, por suas pesquisas sobre o rádio, a RT se tornou uma disciplina médica essencial no tratamento do câncer. Segundo Delaney *et al.*, aproximadamente 50% dos pacientes com câncer, independentemente da fase do tratamento, serão submetidos à RT, isoladamente ou em combinação com outras modalidades terapêuticas.⁵² A terapia continua a evoluir rapidamente devido a melhorias nas técnicas de imagem, sistemas de planejamento de tratamento assistido

e máquinas de tratamento de radiação mais eficazes, acompanhadas de um avanço no entendimento da Radiobiologia.⁵³

A RT é uma abordagem terapêutica que utiliza radiação ionizante de alta energia para danificar o material genético das células cancerosas. Isso tem o efeito de bloquear a capacidade dessas células de se dividirem e proliferarem. Embora a radiação afete tanto células saudáveis quanto cancerosas, a eficácia da radioterapia é baseada na diferença entre a sensibilidade à radiação das células cancerosas e das células normais, além da capacidade de entrega localizada de energia no tumor, buscando preservar o tecido saudável.⁵³

As radiações ionizantes, caracterizadas por frequências superiores à luz visível e comprimentos de onda menores, abrangem uma ampla faixa que vai desde a ordem de magnitude de picômetros (10^{-12} metros) até a ordem de magnitude de nanômetros (10^{-9} metros). Este intervalo inclui desde os raios gama de alta energia, com comprimentos de onda extremamente curtos, até a radiação ultravioleta de baixa energia, que pode ter comprimentos de onda na faixa de centenas de nanômetros.

Elas são geradas por meio de diversas fontes, incluindo radioisótopos, aceleradores lineares, tubos de raios-X e instalações de síncrotron. Nos radioisótopos e aceleradores lineares, a energia é fornecida diretamente às partículas subatômicas eletricamente carregadas. Já nos tubos de raios-X, elétrons são acelerados e atingem alvos de metal para produzir raios-X, enquanto nas instalações de síncrotron, os elétrons são acelerados a velocidades próximas à da luz e, ao serem desviados, emitem radiação X. Esses processos resultam na produção de radiações ionizantes.⁵⁴

Essas radiações interagem com a matéria através de três processos principais: efeito fotoelétrico, espalhamento Compton e produção de pares. No efeito fotoelétrico, fótons transferem toda a sua energia para elétrons orbitais, resultando na ejeção desses elétrons e na formação de íons. No espalhamento Compton, parte da energia do fóton é transferida para um elétron, mudando a direção do fóton e produzindo um elétron livre. Na produção de pares, fótons de alta energia produzem pares elétron-pósitron ao interagir com o campo elétrico do núcleo atômico. Esses processos resultam em ionização e podem causar danos ao DNA, morte celular e desenvolvimento de câncer.⁵⁵

A ação biológica da radiação ionizante ocorre de duas maneiras: diretamente, causando quebras nas ligações do DNA, e indiretamente, ao gerar espécies reativas

durante a interação com o oxigênio molecular e água. Essa interação resulta em danos às cadeias de DNA, incluindo quebras simples e duplas, modificações em açúcares e bases, bem como ligações cruzadas entre DNA e proteínas. Se essas alterações não forem reparadas, levam à morte celular por apoptose e anomalias mitóticas.⁵⁶

As células cancerígenas podem apresentar diferentes graus de sensibilidade à radiação ionizante, e essa resposta está intrinsecamente relacionada à fase específica do ciclo celular em que se encontram. Durante a fase S (síntese de DNA), caracterizada pela duplicação do material genético, há uma tendência à maior resistência, enquanto nas fases M (mitose) e G2, a célula exibe maior sensibilidade. Células indiferenciadas, como as células tumorais, com taxas mitóticas elevadas, mostram-se mais sensíveis à radiação ionizante, contrastando com células com taxas mais baixas de divisão celular, predominantemente na fase G1, que apresentam uma relativa resistência aos efeitos da radiação.^{57,58}

Os efeitos adversos da radioterapia constituem sua principal limitação. Esses efeitos são classificados em reações agudas, que ocorrem durante ou entre 2 a 6 meses após a exposição à radiação, e reações tardias, que se manifestam meses após o término do tratamento devido à ultrapassagem da dose de tolerância dos tecidos saudáveis. A natureza e a severidade dos efeitos adversos variam conforme características individuais do paciente, dosagem e frequência da radiação. Entretanto, é frequente que a maioria dos pacientes submetidos a esse tratamento apresente alterações na pele e fadiga.⁵⁹

2.3 Terapia Fotodinâmica (TFD)

A luz tem sido usada terapêuticamente por milênios, desde civilizações antigas, como egípcios, indianos e chineses, que a empregavam no tratamento de várias doenças, incluindo psoríase, raquitismo, vitiligo e câncer de pele.⁶⁰ Niels Finsen, no final do século XIX, avançou o campo da "fototerapia" ao usar luz vermelha para tratar varíola e luz UV solar na tuberculose cutânea, recebendo um Prêmio Nobel em 1903. Paralelamente, mais de cem anos atrás, pesquisadores notaram a capacidade de combinação de luz e produtos químicos para induzir a morte celular. Oscar Raab, estudante de medicina alemão em 1900, identificou que alguns comprimentos de onda eram letais para infusórios na presença de acridina, enquanto Von Tappeiner e A.

Jesionek no ano 1907, usaram eosina como agente fotossensível em tumores de pele com luz artificial, denominando o fenômeno de "ação fotodinâmica".⁶¹

O composto responsável por essa ação é conhecido como fotossensibilizador (FS). Na atualidade, diversos tipos de FSs estão disponíveis, incluindo os derivados de porfirinas e clorinas.^{62,63} A TFD, gera espécies reativas de oxigênio quando os FSs são excitados, conforme ilustrado na Figura 5. Essas substâncias altamente reativas desempenham um papel crucial na indução da morte celular em vários organismos, já que provocam danos nas estruturas celulares, prejudicando seus processos e, conseqüentemente, levando-as à morte.⁶⁴ O processo em detalhes será explicado a seguir.

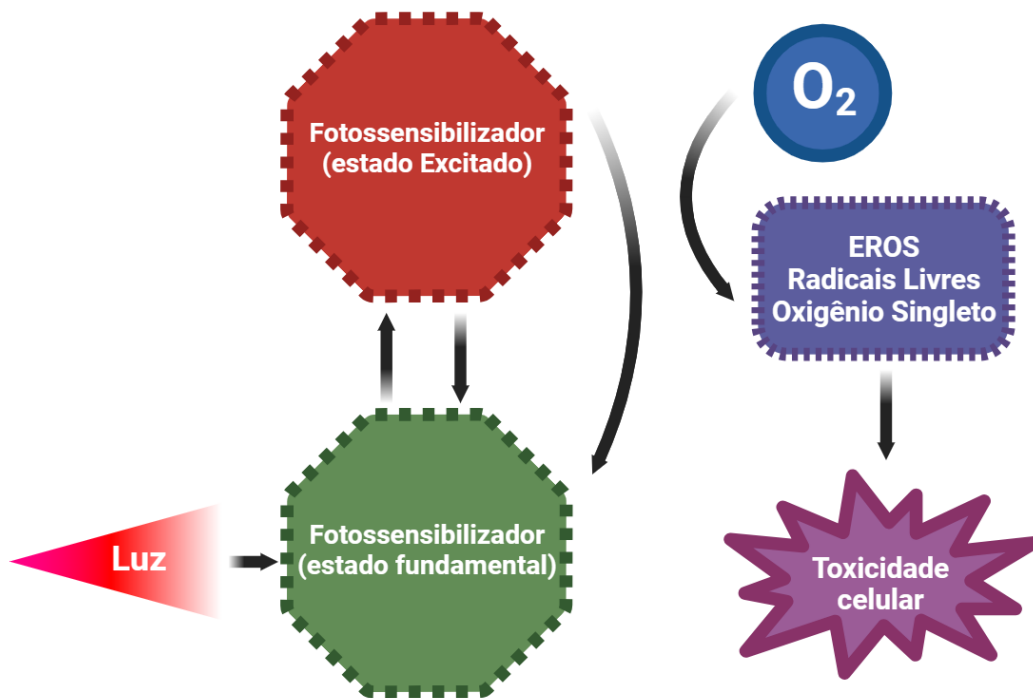


Figura 4 - Funcionamento simplificado da TFD. O FS é excitado por comprimento de onda específico, transfere energia para o oxigênio para que a terapia possa causar toxicidade celular.
Fonte: Elaborada pelo autor.

O mecanismo de ação da TFD baseia-se na transferência de energia para o oxigênio, ilustrado pelo diagrama de Jablonski (Figura 6). Quando a luz de comprimento de onda e intensidade adequados incide sobre o FS, desencadeia uma série de reações fotoquímicas. A energia luminosa modifica o FS inerte por meio da transferência de energia do fóton de luz para o FS ativado. Esse FS ativado, então, pode dissipar sua energia de várias maneiras, incluindo a emissão de luz. Em outra

possibilidade, o fotossensibilizador pode passar para um estado excitado tripleto, mais duradouro, por meio de uma transição intersistema.^{63,65}

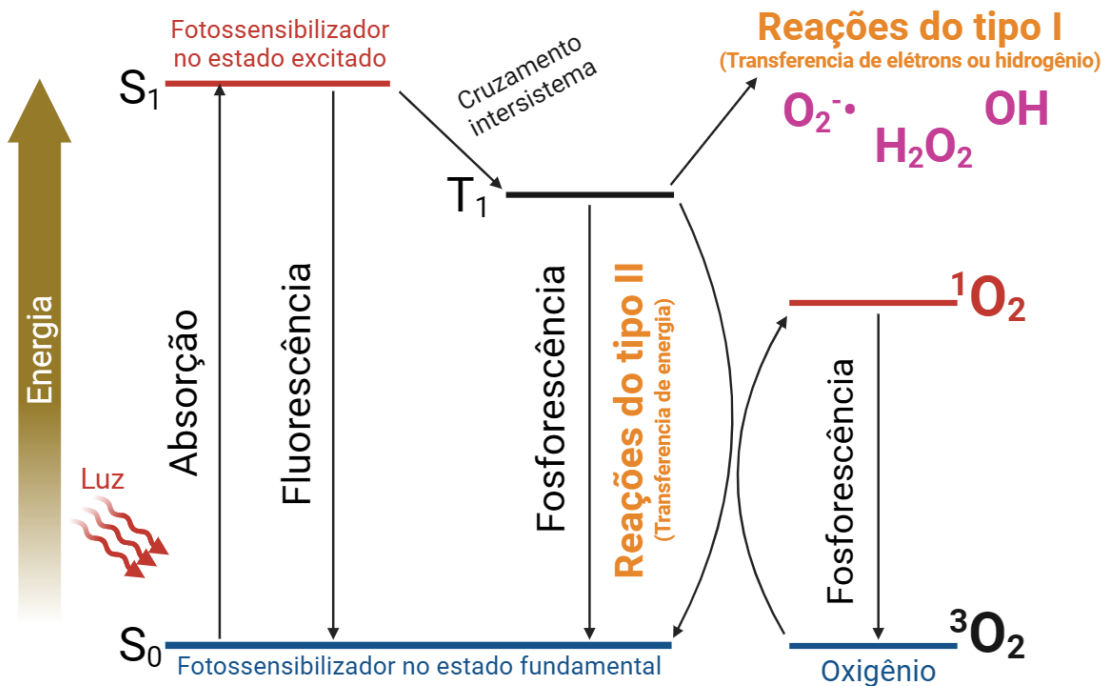


Figura 5 - Diagrama simplificado de Jablonski.
Fonte: Elaborada pelo autor.

Quando o fotossensibilizador retorna ao estado fundamental pode resultar na emissão de fosforescência ou na realização de reações do tipo I ou II. A reação do tipo I promove a oxidação de biomoléculas por meio da geração das espécies reativas de oxigênio (EROs), como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e hidroxil ($\cdot OH$).⁶⁴ Radical superóxido, gerado durante a primeira redução do oxigênio molecular, está presente em células aeróbicas, embora considerado pouco reativo em soluções aquosas pode causar lesões biológicas em sistemas geradores de $O_2^{\cdot-}$ de origem enzimática, fagocítica ou química. Por outro lado, o radical hidroxila, é a ERO mais ativa em sistemas biológicos, exibe extrema reatividade, resultando em modificações no DNA, inativação de proteínas e oxidação de ácidos graxos nas membranas celulares.⁶⁶

No entanto, o mecanismo mais relevante na TFD clínica é a reação fotoquímica do tipo II, na qual o FS interage com o oxigênio molecular (O_2) para criar oxigênio singleto (1O_2). O oxigênio singleto é uma forma excitada e reativa do oxigênio que contém dois elétrons desemparelhados em órbitas diferentes, é altamente reativo e citotóxico, causando a oxidação de estruturas celulares, incluindo mitocôndrias e

membranas. Sua média é da ordem de 40 nanossegundos, o que resulta em um alcance médio de 20 nanômetros. Surpreendentemente, esse volume extremamente reduzido tem se revelado suficiente para alcançar o sucesso clínico na TFD.⁶⁵

A TFD tem sido empregada em diversas áreas, como no tratamento de diversos tipos de cânceres. Além disso, vem sendo utilizada na inativação de micro-organismos causadores de cáries dentárias,⁶⁷ onicomicoses^{68,69} e outros tipos de infecções.⁷⁰⁻⁷² Atualmente, o Ministério da Saúde incorporou no Sistema Único de Saúde (SUS) a TFD para tratar pacientes com câncer de pele, especificamente os tipos CBC e nodular, que são os mais comuns no Brasil.⁷³

Porém, TFD no tratamento do melanoma apresenta algumas dificuldades principalmente da interferência óptica causada pela melanina e da capacidade das bombas de efluxo dos melanossomas em expulsar fotossensibilizadores. A melanina, pigmento presente nas células melanocíticas, limita a penetração da luz na TFD, restringindo-a às camadas superficiais do tumor.⁴⁰ Além disso, a melanina atua como antioxidante, neutralizando espécies reativas de oxigênio geradas durante a TFD.⁷⁴

As bombas de efluxo dos melanossomas representam outro desafio, expulsando fotossensibilizadores e reduzindo sua concentração intracelular. Esse processo compromete a eficácia da TFD ao diminuir a disponibilidade dos fotossensibilizadores para a geração de espécies reativas de oxigênio.⁷⁵ A complexa interação entre as propriedades da melanina e a atividade das bombas de efluxo destaca a necessidade de estratégias inovadoras para superar esses obstáculos no tratamento efetivo do melanoma.

O emprego de agentes clareadores ópticos (OCA) surge como estratégia para otimizar a TFD no tratamento de melanoma. Compostos hiperosmóticos não tóxicos, como glicerol, polietilenoglicol 400 (PEG-400) e sacarose, possuem índice de refração semelhante ao da pele, proporcionando benefícios significativos. Esses clareadores óticos buscam melhorar as características ópticas do melanoma, otimizando a distribuição e penetração da luz na lesão. A aplicação desses agentes induz desidratação osmótica local, facilitando a saída rápida de água das células.⁷⁶ Martineli *et al.* (2020), investigaram as modificações nos tecidos associadas à melhoria na eficácia da TFD ao empregar o Photoditahzine (derivado da clorina e6) como fotossensibilizador em combinação com OCA no tratamento de melanoma cutâneo em camundongos. Os resultados indicaram que os tumores tratados com OCA

apresentaram maior homogeneidade óptica, resultando em uma resposta aprimorada à TFD. Análises Raman demonstraram que a combinação de TFD com OCA proporcionou uma resposta mais uniforme até 725 μm de profundidade na espessura dos tecidos.⁷⁷

O Clorina e6, um agente fotossensibilizante de segunda geração derivado de clorina natural, apresenta absorção significativa na região do vermelho do espectro luminoso, dentro da chamada janela "terapêutica" (600–800 nm). Além disso, possui eficiente cruzamento intersistemas, possibilitando a geração efetiva de oxigênio singlete ($1O^2$), um fator crucial para a indução da morte celular tumoral na Terapia Fotodinâmica (TFD).⁷⁸

Estudos recentes destacam o potencial terapêutico significativo deste fotossensibilizador na TFD do melanoma.⁷⁹ Além disso, alguns autores relatam a eficácia do tratamento de metástase de câncer de pele com a administração endovenosa de clorina e6.⁸⁰ No entanto, há poucos estudos clínicos sobre terapia fotodinâmica em melanoma, e mais pesquisas são necessárias, especialmente em casos avançados da doença.⁸¹

2.2.1 Clorina

Photodithazine (PDZ) é o nome comercial de um fotossensibilizador (FS) derivado da clorina e6 fabricado pela VETA-GRAND Co. (Moscou, Rússia), é composto por uma mistura de complexos de Clorina e6 conjugada com di-N-metil-D-glucosamina (60%), Clorina p6 e purpurinas.⁸² Sua estrutura química (figura 7) apresenta um substituinte glucosamina carregado positivamente e absorção máxima em torno de 401 nm (Banda Soret), com menores absorções nos comprimentos de onda de 505, 600 e 670 nm (Bandas Q; figura 8).⁸³

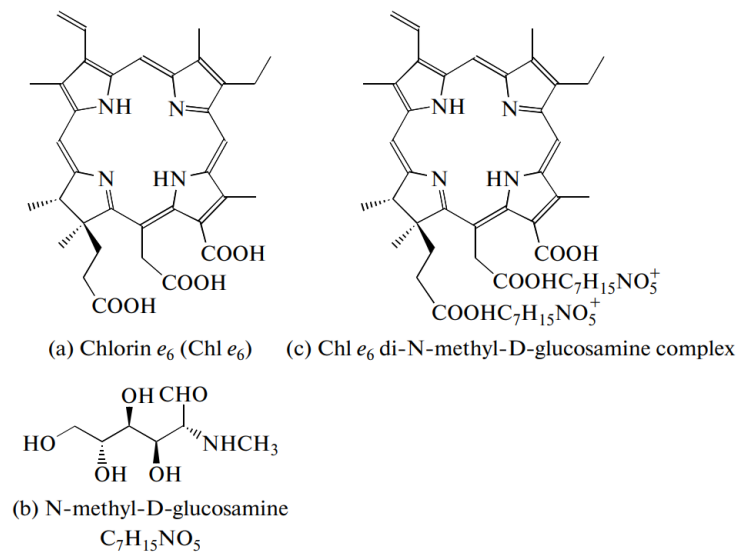


Figura 6 - Estrutura química do Photodithazine.
Fonte: CORREA. *et al.*⁸⁴

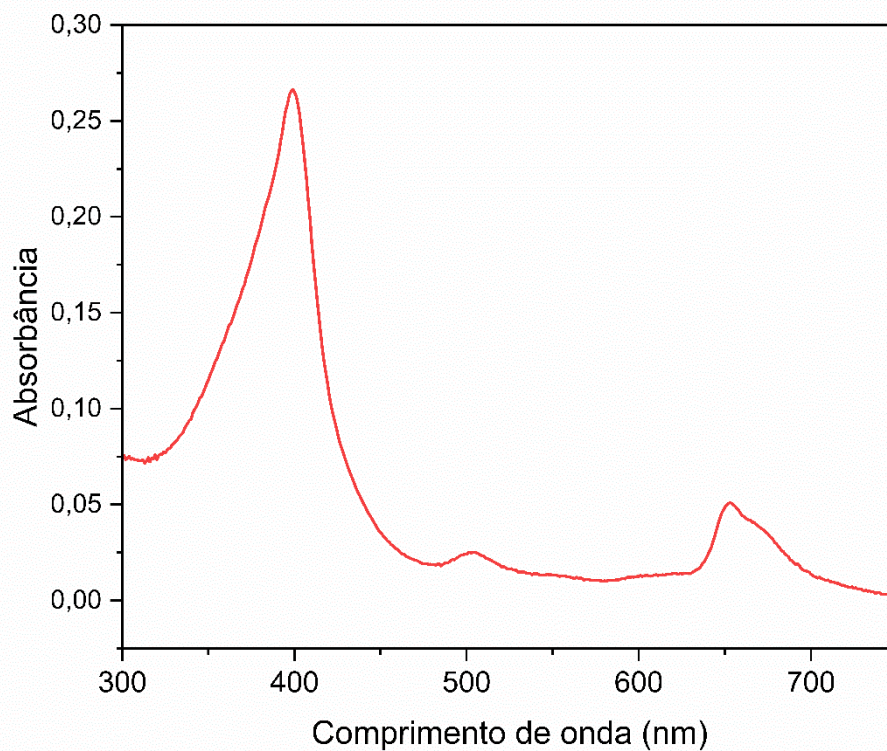


Figura 7 - Espectro de absorção do Photodithazine a 5 $\mu\text{g/ml}$ em DMEM e pH = 7,4.
Fonte: Elaborada pelo autor.

Este FS foi submetido a ensaios clínicos para tratar diversos tipos de tumores. Resultados revelaram que 53,7% dos pacientes atingiram remissão completa do tumor, enquanto 46,3% apresentaram remissão parcial.⁸⁴ Turubanova *et al.* (2019)

demonstraram que a TFD com uso de PDZ induziu eficientemente a morte celular imunogênica em células de glioma e fibrossarcoma.⁸⁵

PDZ foi utilizado na terapia fotodinâmica Antimicrobiana (TFDa), sendo evidenciado potencial terapêutico, observando completa inativação em cepas clínicas de *S. aureus*, incluindo as cepas de MRSA, com a implementação da aPDT com PDZ.⁸⁶

PDZ possui uma fototoxicidade cutânea de curto prazo, permitindo um tratamento de TFD entre 2 à 3 horas, o que é particularmente benéfico para pacientes que podem ser tratados em um ambiente ambulatorial. Os estudos envolvendo TFD com PDZ estão em fase inicial, mas essa combinação é altamente promissora. No entanto, são necessárias mais pesquisas para determinar as doses adequadas de fármaco e luz para diferentes tipos de tumores.⁸³

2.4. Tipos de morte celular

Existem três principais modos de morte celular: necrose, apoptose e autofagia. Cada um tem implicações específicas para o câncer (figura 9). A necrose está associada a uma resposta inflamatória que pode favorecer ou inibir o desenvolvimento tumoral. A autofagia pode ter efeitos contraditórios nas células tumorais, promovendo ou dificultando a sobrevivência. A apoptose é uma forma ordenada de morte celular que minimiza a inflamação, sendo eficaz na eliminação de células tumorais indesejadas. A escolha do método terapêutico depende do contexto e das estratégias terapêuticas.⁵⁶

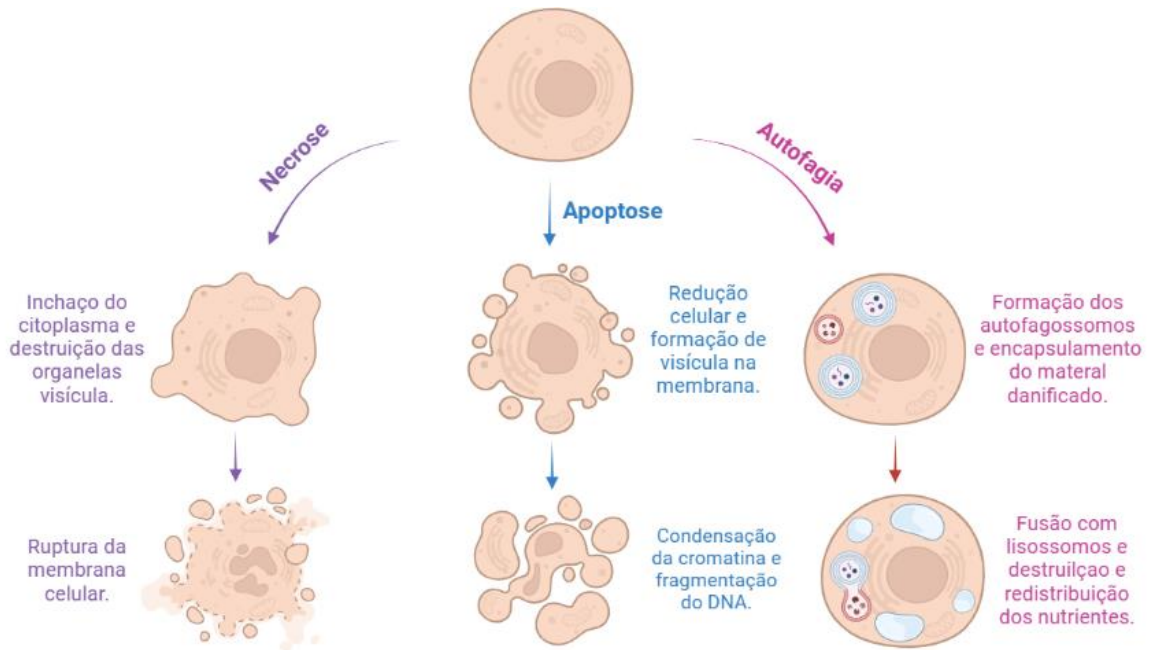


Figura 8 - Representação dos mecanismos de morte celular: Necrose, caracterizada pelo colapso e degradação da célula; Apoptose, um processo programado de morte celular; e Autofagia, um mecanismo de reciclagem celular. Esses processos desempenham papéis distintos na homeostase e na patologia celular.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A necrose é, inicialmente, um processo desordenado que resulta na ruptura da célula, muitas vezes considerado como morte "acidental". Geralmente é desencadeado por fatores externos, como lesões físicas ou exposição a substâncias químicas. Isso leva ao entumescimento do citoplasma, destruição das organelas e, eventualmente, à ruptura da membrana celular. Como resultado, o conteúdo celular vaza para o entorno, provocando uma resposta inflamatória e, em casos graves, danos nos tecidos que podem ser fatais.⁸⁷

A apoptose, também conhecida como morte celular programada, é um processo bem compreendido em nível molecular e é a principal forma de morte celular em mamíferos. O termo "apoptose" foi cunhado em 1972 para descrever um método controlado de morte celular, distinto da necrose. A apoptose é caracterizada por encolhimento celular, formação de vesículas na membrana celular, condensação da cromatina e fragmentação do DNA.⁸⁸ Os fragmentos celulares resultantes, chamados de corpos apoptóticos, são fagocitados por macrófagos após a exposição de fosfatidilserinas em suas membranas externas. Isso evita o vazamento de conteúdo celular e, conseqüentemente, a ativação de respostas imunes ou inflamatórias, como ocorre na necrose.⁸⁷

A apoptose envolve duas vias principais: a via extrínseca, que é iniciada por ligantes específicos que se ligam a receptores na superfície celular, e a via intrínseca, que envolve a permeabilização da membrana externa da mitocôndria. Ambas as vias ativam caspases, enzimas que desencadeiam a degradação celular, levando à morte da célula. Na via extrínseca, receptores como Fas, TRAIL e TNF são envolvidos, culminando na ativação de caspases efetoras.⁸⁹ A via intrínseca envolve a liberação de proteínas mitocondriais, como o citocromo C, que forma o apoptossomo com Apaf-1 e caspase-9. A ativação de caspases executoras, como caspase-3, -6 ou -7, resulta na morte celular. Em alguns casos, a via extrínseca amplifica a via intrínseca.⁹⁰

Já a autofagia é um mecanismo de proteção celular que permite a reciclagem de conteúdo citoplasmático, especialmente quando há organelas danificadas. No entanto, sua superativação pode levar à morte celular, geralmente desencadeada por sinais externos, como falta de oxigênio, nutrientes e estresse oxidativo. Isso envolve a formação de estruturas de dupla membrana, chamadas autofagossomos, que encapsulam o material a ser reciclado e, em seguida, se fundem com lisossomos, onde ocorre a degradação, permitindo que a célula redistribua nutrientes a partir dos componentes não mais necessários.⁹¹

Tanto a TFD quanto a RT podem desencadear diferentes modalidades de morte celular. A TFD tem a capacidade de induzir vários tipos de morte celular, como apoptose, necrose e ativação da autofagia, dependendo da localização do fotossensibilizador, da intensidade da luz e do tipo celular envolvido.⁹² Por sua vez, a radiação ionizante utilizada na RT induz outro tipo de morte celular chamada catástrofe mitótica, um mecanismo de controle para células incapazes de completar adequadamente a mitose. Isso pode resultar em morte celular regulada (RCD) ou senescência, frequentemente culminando em apoptose intrínseca. As células afetadas podem ativar outras vias de morte celular ou escapar desse estado.⁹³ Disfunções nos pontos de checagem do ciclo celular, comuns em células cancerosas, permitem que células danificadas entrem prematuramente na mitose, levando à catástrofe mitótica. Os mecanismos precisos e o destino dessas células ainda não estão completamente compreendidos, o que contribui para a resposta tardia dos tumores sólidos à radioterapia.⁹³

Embora a radioterapia e a terapia fotodinâmica tenham potencial para induzir a morte celular, compreender as nuances desses mecanismos é essencial para desenvolver estratégias terapêuticas mais eficazes no tratamento do câncer.

2.5 Terapias combinadas

À medida que as doenças neoplásicas continuam a impactar a população, é fundamental direcionar esforços consideráveis para estabelecer abordagens combinadas que melhorem a eficácia e os resultados terapêuticos na luta contra o câncer.⁹⁴ A RT geralmente causa danos no DNA, predominantemente levando à deficiência mitótica e apoptose nas células tumorais. No entanto, mutações genéticas específicas podem tornar algumas células resistentes à RT, pois são incapazes de iniciar a apoptose em resposta a danos no DNA irreparáveis.⁹⁵ Por outro lado, a TFD concentra seu efeito em locais subcelulares onde FS se acumulam, principalmente nas membranas celulares e mitocondriais. Isso resulta em danos nessas áreas, levando à morte celular por necrose, no caso de danos na membrana celular, ou por apoptose, desencadeada pela liberação do citocromo C, quando há danos na membrana mitocondrial.⁹⁶

Devido a essa distinção nos alvos de ação, a combinação de TFD e RT pode demonstrar um sinergismo na indução da morte celular, o que pode aprimorar o controle do câncer. Efeitos sinérgico, aditivo e antagônico são conceitos fundamentais na avaliação de interações entre substâncias ou tratamentos. O efeito sinérgico é caracterizado por uma resposta maior dos tratamentos combinados do que a soma dos efeitos dos tratamentos individuais ($A + B = D$, onde $D > A + B$). Já o efeito aditivo equivale a um resultado dos tratamentos combinados igual à soma dos efeitos dos tratamentos individuais ($A + B = A+B$). Por fim, o efeito antagônico resulta em uma resposta menor que a soma dos efeitos dos tratamentos individuais ($A + B = C$, onde $C < A + B$).⁹⁷

Estudos anteriores realizados pelo nosso grupo de pesquisa buscaram investigar a eficácia da RT em conjunto com outras terapias. Andrade (2016) investigou os efeitos da combinação da TFD com RT em comparação com cada terapia isoladamente, visando determinar a estratégia terapêutica mais eficaz.⁹⁸

Os resultados demonstraram maior necrose tecidual com a combinação TFD+24h+RT, em comparação com RT+24h+TFD, devido à ineficiência na produção de PpIX em tecido previamente irradiado, confirmada por espectroscopia de fluorescência. Grupos com maior dano foram selecionados para análise de dano vascular por refletância, revelando informações sobre parâmetros como saturação de oxigênio, concentrações de meta-hemoglobina e bilirrubina, fração de volume sanguíneo e raio do vaso, em tecido saudável de ratos Wistar e em tumores cutâneos (linhagem A431) de camundongos Nude. O recrescimento dos tumores foi avaliado, mostrando que as análises ópticas foram eficazes na pele normal, porém limitadas na combinação de terapias devido à natureza da RT. Para os tumores, as análises ópticas não foram eficazes na monitoração do dano. A curva de crescimento tumoral indicou que a combinação TFD+24h+RT foi mais eficaz que as outras combinações de TFD e RT.⁹⁸

De Faria *et al.* (2021), avaliou a eficácia da terapia de fotobiomodulação (PBM) em tumores e sua capacidade como radiosensibilizador quando associada à radioterapia. Foram conduzidos ensaios *in vitro* utilizando carcinoma epidermóide humano (A431) para analisar a proliferação celular e o ciclo celular após a aplicação de PBM. Além disso, foram realizados ensaios clonogênicos e empregada imunomarcagem H2AX-gama para quantificar quebras de dupla fita resultantes da combinação de PBM e radiação. Os resultados observados por De Faria *et al.*, indicaram que a PBM não causou proliferação *in vitro*, mas ocasionou um aumento na fração G2/M 24 horas após a iluminação. Essa elevação na fase G2/M resultou em um significativo aumento de 30% no efeito da radiação no ensaio clonogênico.⁹⁹

Além disso, foram realizados experimentos *in vivo* com xenoenxertos em camundongos da linhagem Balb/c, analisando a sobrevida pelo método de Kaplan-Meier, tomografia de coerência óptica (OCT) e avaliação histológica. Na análise de sobrevida de Kaplan-Meier em xenoenxertos, o grupo PBM-RT apresentou um aumento de 4 dias na sobrevida média em comparação com a radioterapia isolada.⁹⁹

Montazerabadi *et al.* (2012) conduziram estudos em células de câncer de mama humano MCF-7 submetidas ao tratamento combinado de RT e TFD utilizando a indocianina verde (ICG) como FS. Os resultados revelaram que uma combinação de baixas doses (concentração de ICG, fluência empregada e dose ionizante), resultou na morte de células cancerosas causando a morte de cerca de 96% em

relação ao controle.⁹⁴ Resultados semelhantes foram obtidos por Sazgarnia *et al.* (2013) ao utilizar mitoxantrona (MX) como FS em combinação com RT e TFD nas células MCF-7, indicando um efeito citotóxico substancial e dose-dependente.¹⁰⁰ As descobertas de Ghodarzi *et al.* (2016), ao examinar os efeitos da Radaclorina como FS em terapia fotodinâmica e radioterapia na linhagem celular de câncer de mama humano MCF-7, corroboraram com as descobertas acima.¹⁰¹ Em resumo, esse novo paradigma de tratamento combinado apresenta avanços promissores no tratamento do câncer.¹⁰²

Diante desses achados promissores da combinação da RT com a TFD, e os resultados positivos encontrados pelo nosso grupo de pesquisa com Andrade (2016) e De Faria *et al.* (2021), torna-se de grande interesse investigar os efeitos antitumorais dessa combinação de terapia, uma vez que a possível redução da dose de radiação ionizante é um aspecto crucial a ser considerado.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar a morte celular *in vitro* de células B16F10 após Radioterapia e Terapia Fotodinâmica, associadas ou não.

3.2 Objetivo específico

- Avaliar os tipos de morte celular envolvidos em todos os protocolos;
- Investigar se a RT associada à TFD é uma estratégia interessante para a morte de células B16F10, avaliando qual condição experimental é a mais eficaz.
- Investigar se realizar RT antes da TFD induz mais morte apoptótica do que no protocolo de TFD antes da RT.

4 METODOLOGIA

4.1 Cultivo celular

A linhagem celular tumoral murino, B16F10 (CRL-6575), foi obtida do banco de células *American Type Culture Collection* (ATCC). As células B16F10, originárias de melanoma murino altamente metastático, foram obtidas de tumores secundários nos pulmões de ratos C57BL. Inicialmente derivadas da linhagem B16, após repetidos cultivos e seleções, a cultura celular B16F10 foi estabelecida, revelando um aumento na capacidade metastática a cada repetição.¹⁰³

As células foram cultivadas em garrafas de cultivo celular a temperatura de 37 °C em ambiente umidificado, contendo 5% de CO₂ (Estufa Sanyo MCO 17AC) em meio DMEM (do inglês, *Dulbecco's modified Eagle's medium*) contendo vermelho de fenol e suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino e 0,1% de uma solução de antibióticos (Penicilina 10.000 U.I. e Estreptomicina 10 mg/ml).

A troca completa do meio de cultura foi realizada a cada 48 horas. A linhagem em questão cresce aderida na forma de monocamada, ao atingirem a confluência de 80%, as amostras são tripsinizadas e distribuídas em novas garrafas de cultivo celular e o restante das células foram congeladas em nitrogênio líquido (-196 °C) em uma solução crioprotetora de 5% de DMSO e 95% de DMEM completo. Todos os experimentos foram realizados com cultivo celular até no máximo 25 passagens. Observado macroscopicamente que a produção de melanina estava reduzida, era iniciada nova cultura celular.

4.2 Padronização do protocolo de TFD

O ponto inicial para realização experimental foi estabelecer um protocolo de TFD com o uso do fotossensibilizador derivado de clorina e6, mais especificamente PDZ. Buscamos encontrar uma taxa de morte em torno de 45 a 60%, na qual, o protocolo de TFD pudesse ser associado a RT nas etapas seguintes.

Para isso, as células aderidas nas garrafas foram lavadas com 5 ml de tampão PBS (do inglês, *Phosphate-Buffered Saline*) e descoladas com solução de tripsina. Depois da contagem e determinação da viabilidade celular com azul de tripan, foram

plaqueados 100 μ L de células com densidade de 2×10^4 células por poço em DMEM com vermelho de fenol e 10% SFB (soro fetal bovino) em placas de 96 poços. Para ocorrer a aderência das células nas placas, estas foram mantidas por 24 horas na incubadora de CO_2 a 37 °C. Decorrido esse tempo, o meio DMEM foi retirado e as células foram incubadas em diferentes concentrações de PDZ por poço para padronização do protocolo (1, 5, 10 e 20 $\mu\text{g/ml}$). As soluções de PDZ foram preparadas a partir da solução-estoque de Clorina e6 (5 mg/ml) e diluídas em DMEM sem fenol e sem SFB.

Após incubação no escuro com PDZ por uma hora, as soluções contendo o FS foram descartadas, e adicionado aos poços 100 μ L DMEM 10% SFB e sem fenol para iniciar a irradiação das placas. Cada concentração de PDZ foi submetida a fluências distintas (2, 6 e 20 J/cm^2), conforme tabela 2. Os grupos que não receberam luz foram irradiados de forma simulada em todos os experimentos para padronização do protocolo.¹⁰⁴

Tabela 2 - Condições experimentais para padronização da Terapia Fotodinâmica.

	Fluência		
	Grupo A 2 J/cm^2	Grupo B 6 J/cm^2	Grupos C 20 J/cm^2
Concentração Photodithazine	Controle	Controle	Controle
	1 $\mu\text{g/ml}$	1 $\mu\text{g/ml}$	1 $\mu\text{g/ml}$
	5 $\mu\text{g/ml}$	5 $\mu\text{g/ml}$	5 $\mu\text{g/ml}$
	10 $\mu\text{g/ml}$	10 $\mu\text{g/ml}$	10 $\mu\text{g/ml}$
	20 $\mu\text{g/ml}$	20 $\mu\text{g/ml}$	20 $\mu\text{g/ml}$

Fonte: Elaborada pelo autor.

As amostras foram irradiadas utilizando o sistema desenvolvido pelo Instituto de Física de São Carlos (Laboratório de Apoio Tecnológico – LAT), denominado “Biotable” (figura 10), que possui iluminação homogênea para placas de cultura de 24 e 96 poços contendo LEDs com emissão no comprimento de onda 660 nm e intensidade de 26 mW/cm^2 .

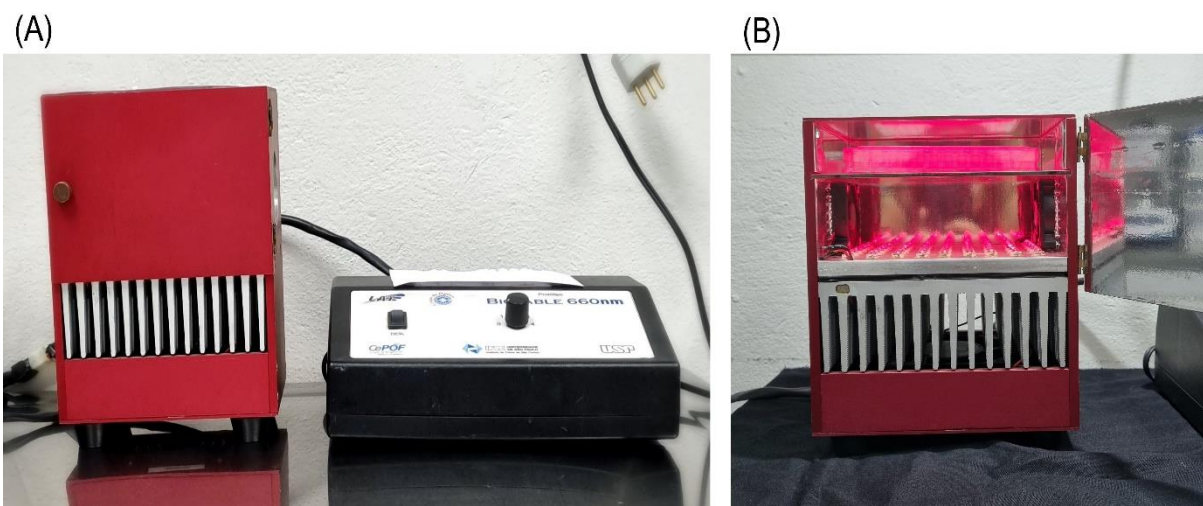


Figura 9 – Imagem da Biotable, sistema de iluminação para placas de cultura de 96 poços contendo LEDs com emissão no comprimento de onda 660 nm. Em A, Biotable com a fonte de alimentação. Em B, mostra a placa sendo iluminada pela Biotable (no experimento a porta do equipamento é fechada).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Após irradiação, as células foram novamente incubadas por 24 horas na estufa de CO₂ com meio de cultura DMEM com 10% de SFB. Foi realizado o ensaio de viabilidade celular pelo método do MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio, Sigma-Aldrich), cujo protocolo detalhado será descrito no item 4.5 deste estudo. Cada grupo experimental foi realizado em triplicata.

4.3 Radioterapia

A irradiação foi realizada em sistema pré-clínico gerador de raios X XRAD 225x (Precision X-ray Inc., EUA), a 225 kV e 13,3 mA para todas as condições. Experimentos *in vitro* foram realizados em SSD de 33 cm e filtração de alumínio de 2,0 mm, produzindo uma taxa de dose de 4 Gy/min. Essa dose está dentro de uma faixa de dose utilizadas na literatura.^{94,100,105} Os grupos que não receberam radiação ionizante foram irradiados de forma simulada em todos os experimentos.

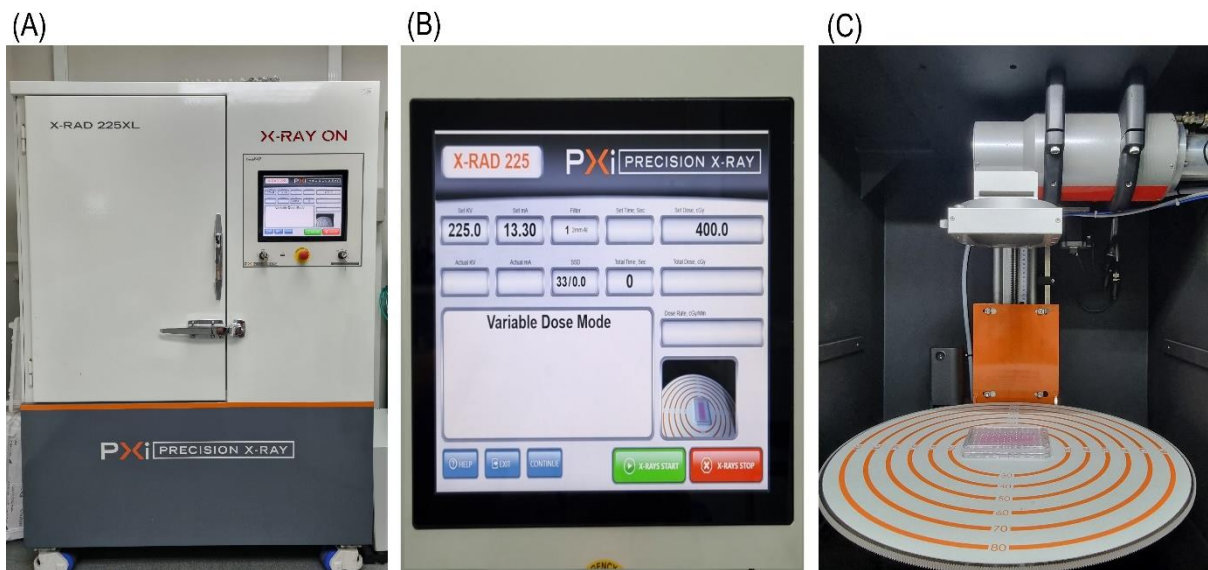


Figura 10 – Equipamento pré-clínico gerador de raios X. Em A, imagem mostrando todo o equipamento; B, imagem do painel, que indica os ajustes de energia, a corrente e a dose de raio X; C, imagem ilustrando a posição da placa de 96 poços dentro do gerador de raio X.

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.4 Protocolo TFD para de Associação das terapias

Para realização dos ensaios de associação das terapias seguimos os mesmos passos de plaqueamento e aderência mencionados no item 4.2.

Decorrido as 24 horas para aderência, as placas de 96 poços foram submetidas ao protocolo de RT (item 4.3). Após a RT, aplicamos diferentes intervalos de tempo antes da realização da TFD, 1, 4, 24 e 48 horas (tabela 3). Esperado o devido intervalo de tempo de cada grupo experimental, o meio DMEM foi retirado e as células foram incubadas por uma hora com 5 $\mu\text{g/ml}$ de PDZ por poço. Passado o tempo de incubação do PDZ, o meio foi descartado e adicionado DMEM sem fenol contendo 10% SFB para a irradiação da TFD com fluência de 2 J/cm^2 .

Tabela 3 - Condições experimentais para associação das terapias submetidas a análise por MTT.

	Grupo experimental			
Tratamento	Grupo A	Grupo B	Grupo C	Grupo D
Controle	Não tratado			
RT	Tratado com radioterapia			
PDZ	Fotossensibilizador no escuro			
TFD	Tratado com terapia fotodinâmica			
RT + TFD	Tratado com radioterapia e terapia fotodinâmica			
	Intervalo de 1h entre as terapias	Intervalo de 4h entre as terapias	Intervalo de 24h entre as terapias	Intervalo de 48h entre as terapias

Fonte: Elaborada pelo autor.

Foram realizadas duas diferentes técnicas para análise dos resultados, MTT e citometria de fluxo. As análises realizadas por MTT ocorreram 24 horas após a TFD nos quatro grupos experimentais. As análises realizadas por citometria de fluxo foram realizadas 24 horas ou 48 horas após a última terapia (tabela 4).

As análises realizadas por citometria de fluxo estão detalhadas no item 4.5, abaixo segue tabela com os grupos experimentais aos quais foram submetidos para análise.

Tabela 4 - Grupos experimentais da associação de terapias submetidos a análise por citometria de fluxo.

Grupo experimental	Ordem da terapia	Intervalo entre tratamentos	Tempo de espera para análise
Grupo 1	RT_TFD	24h	24h
Grupo 2	RT_TFD	24h	48h
Grupo 3	RT_TFD	48h	24h
Grupo 4	TFD_RT	48h	24h

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.5 Ensaio de viabilidade celular pelo método do MTT

O ensaio de viabilidade celular foi feito pelo método do MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio, Sigma-Aldrich), um método indireto para quantificar a viabilidade celular que mede o metabolismo mitocondrial, onde células com o metabolismo ativo convertem o sal tetrazolium, com coloração amarela, em

cristais de formazan, cor roxa. Os cristais de formazan, gerados após a incubação das células com o reagente MTT, são solubilizados em DMSO e quantificados por meio da absorbância medida em dois comprimentos de onda específicos: 570 nm e 690 nm. Essas leituras são realizadas utilizando um espectrofotômetro de leitura de placas (Multiskan GO, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). O comprimento de onda de 570 nm é usado para determinar a quantidade de formazan produzido, refletindo a viabilidade celular. Por sua vez, o comprimento de onda de 690 nm é empregado para corrigir possíveis interferências e leituras de fundo, garantindo a precisão na quantificação do formazan. Células não viáveis ou com comprometimento mitocondrial não conseguem converter o MTT em formazan, resultando em menor absorbância nos comprimentos de onda mencionados.¹⁰⁶

A solução de MTT foi preparada na concentração de 0,5 mg/ml, em tampão fosfato salino, pH 7,4 e armazenada em congelador a -20 °C. Antes dos ensaios, a solução é colocada em banho térmico, a 38 °C, por 3 minutos. O MTT é preparado em solução contendo 10% de MTT em meio de cultura DMEM, sem fenol e sem SFB. Retira-se o meio celular de incubação e 100 µl da solução de MTT é adicionado a cada poço da placa de 96 poços. Após esta etapa, a placa é levada para a incubadora de CO₂, por 3 horas. Decorrido o tempo de incubação, acontece a etapa de lise celular. O MTT é retirado dos poços, e adiciona-se 100 µl de DMSO para a solubilização dos cristais de formazan. Após 10 minutos é realizada a leitura de fluorescência pelo leitor de microplacas. O cálculo de viabilidade celular é realizado subtraindo-se o valor de absorbância de 570 nm do valor da absorbância de 690 nm, sempre considerando o valor da absorbância dos grupos controle como 100% de viabilidade (específicos para cada estudo).

4.6 Detecção do tipo de morte celular por citometria de fluxo

Os ensaios de morte celular foram realizados no grupo de pesquisa de Imunidade Celular nas Infecções Pulmonares, da Universidade Estadual de São Paulo (UNESP) campus Araraquara – SP, sob a responsabilidade da Prof^a Dr^a Alexandra Ivo de Medeiros e conduzidos pelo doutorando Breno VilaBoas.

Após realização dos tratamentos propostos conforme a tabela 4, as células foram separadas em tubos para serem marcadas. A identificação foi realizada segundo a tabela 5:

Tabela 5 – Protocolo de marcação para os grupos experimentais submetidos a citometria de fluxo.

Tubos	Identificação	Descrição
1	Célula	Sem tratamento ou marcação
2	Controle Secundário	Marcado apenas com anticorpo secundário Caspase'3
3	FVS	Controle positivo de necrose
4	Controle	Sem tratamento e marcado com Viability e Caspase'3
5	RT	Submetido a radioterapia e marcado com Viability e Caspase'3
6	PDZ	Fotossensibilizador sem luz e marcado com Viability e Caspase'3
7	TFD	Submetido a terapia fotodinâmica e marcado com Viability e Caspase'3
8	Terapias Associadas	Submetido a radioterapia e a terapia fotodinâmica e e marcado com Viability e Caspase'3

Fonte: Elaborada pelo autor

As células B16F10 foram tripsinizadas e centrifugadas a 1700 rpm por 5 min a 4 °C. Descartou-se o sobrenadante dos tubos e as células foram ressuspensas com o corante *Invitrogen™ eBioscience™ Fixable Viability Dye eFluor™ 450* (*Viability*; catálogo: 15331988), com exceção dos tubos 1, 2 e 3. Os tubos 1 e 2 receberam 50 µl de PBS e no tubo 3 foi adicionado 50 µl de BD *Cytofix/Cytoperm* (catálogo: 554714).

O *Invitrogen™ eBioscience™ Fixable Viability Dye eFluor™ 450* é um corante de viabilidade usado em citometria de fluxo para identificar e excluir células não viáveis. Este corante é fixável, o que significa que pode ser aplicado antes da fixação das células e mantém o sinal fluorescente após o processo de fixação. O *eFluor™ 450* é excitado por luz com comprimento de onda de cerca de 405 nm e emite fluorescência na região azul do espectro, com pico em torno de 450 nm. Ele permite a detecção precisa de células não viáveis durante a citometria de fluxo, facilitando a análise de células viáveis em estudos experimentais.

Para a aquisição das células marcadas positivamente (tubos 4,5, 6,7 e 8), uma alíquota de 50 µl da suspensão celular de cada condição foi tratada com *Viability* na concentração de 1:2000, durante 10 min, no escuro. Após este período foi adicionado

PBS para lavagem e centrifugado nas condições citadas acima, depois o sobrenadante foi descartado e adicionado 100 µl de *BD Cytotfix/Cytoperm* em todos os grupos com exceção do tubo FVS, onde foi adicionado 50 µl de *Viability*, ressuspendido e encubado por 20 min. Adicionou-se 300 µl de PBS para lavagem e nova centrifugação foi realizada. Foi preparado a solução de bloqueio de ligações inespecíficas contendo BSA a 2% em PBS, e adicionado 200 µl da solução a todos os tubos, com exceção dos tubos células e FVS, onde foi adicionado 200 µl PBS. As placas foram deixadas no escuro em temperatura ambiente por 1h para descanso e em seguidas lavadas com PBS e centrifugadas. Para marcação da caspase-3, após a centrifugação e descartado o sobrenadante, foi preparada uma solução de *BD Perm/Wash™* (catálogo: 554723), nove partes de água miliQ e uma parte de *BD Perm/Wash™*. Em seguida, aos tubos 4 a 8 foi adicionado 100 µl da solução de *permwash* contendo anticorpo primário (anti-coelho/anti-caspase'3) na proporção de 1:800, enquanto os tubos 1 a 3 receberam 200 µl PBS. Então as células foram ressuspendidas e deixadas para descanso no escuro em temperatura ambiente por 1 hora.

Passado tempo de descanso, foi adicionado 300 µl de PBS aos tubos, centrifugando-os para lavagem e descartando-se o sobrenadante. Foi iniciada então a marcação do anticorpo secundário (Anti-coelho/fluocromo APC). Os tubos 2, 4 a 8 receberam 100 µl da solução contendo *permwash* + anticorpo secundário na proporção de 1:2500. Os demais tubos (1 e 3), receberam 200 µl de PBS. As células foram ressuspendidas e incubadas por 30 minutos em temperatura ambiente no escuro. Após este tempo, foram lavadas adicionando 300 µl PBS e centrifugando.

O sobrenadante foi descartado e foi adicionado aos tubos 200 µl PBS, ressuspendendo as células para a realização da citometria de fluxo pelo citômetro *CytoFLEX System B5-R3-V5, Beckman-Coulter*, O referido equipamento faz parte de uma rede de laboratórios multidisciplinares do Departamento de Diagnóstico e Cirurgia da Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAr-UNESP).

4.7 Análise estatística

Os resultados representam a média \pm desvio do erro da média (SEM) de pelo menos três experimentos realizados em dias diferentes pelo programa ORIGIN,

versão 2022. Para comparação de médias foi utilizado o teste de Tukey, considerando o nível de significância quando $p < 0,01$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Padronização do protocolo de TFD em células da linhagem *in vitro*

Para padronização da TFD buscamos uma condição que provocasse uma diminuição da viabilidade em torno de 40 a 60%, na qual o protocolo de TFD pudesse ser associado a RT nas etapas seguintes.

Para isso, utilizamos os parâmetros experimentais demonstrados por Ono (2016) em sua dissertação, que teve como objetivo avaliar a resposta fotodinâmica empregando o Photodithazine em células de melanoma murino (B16F10).¹⁰⁴ Ono tratou células de melanoma murino com terapia fotodinâmica utilizando PDZ, investigando concentrações de PDZ de 0, 1, 20, 40, 60, 80 e 100 µg/ml e empregou diferentes fluências 2, 4, 6, 8, 10 e 20 J/cm². Foi observado uma severa taxa de morte celular, em torno de 90% para todas as condições investigadas, com exceção das fluências com concentração de 1 µg/ml, que apresentaram uma diminuição menos severa da viabilidade celular.¹⁰⁴ Porém, observa-se uma lacuna entre as concentrações 1 µg/ml e 20 µg/ml que não foi investigada pelo autor e na qual poderíamos encontrar uma janela com concentração de FS e fluência que satisfizesse nossa busca pela taxa de morte celular moderada desejada.

Levando isso em consideração, foram testadas fluências de 2, 6 e 20 J/cm², variando a concentração de PDZ em 0, 1, 5, 10 e 20 µg/ml, (figura 12).

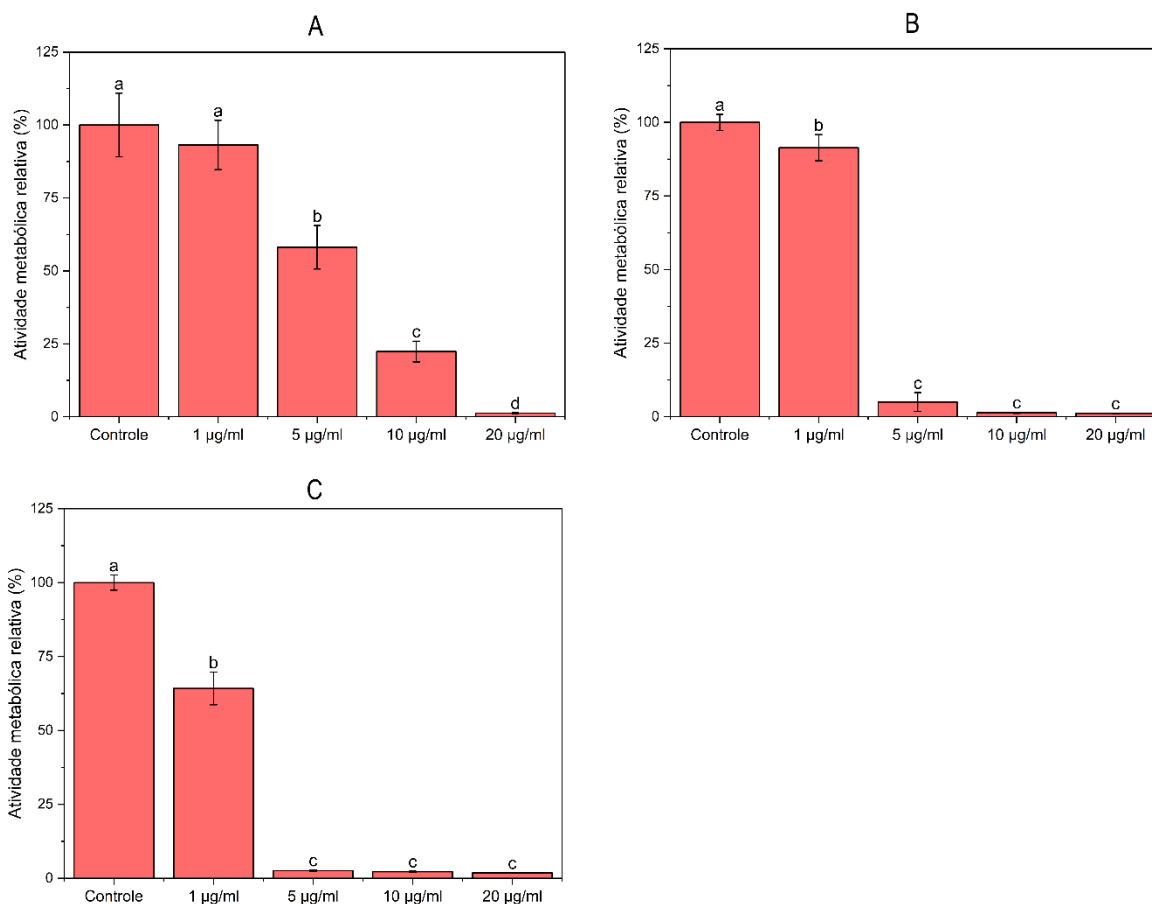


Figura 11 - Viabilidade celular de células B16F10 após o tratamento da Terapia fotodinâmica para as fluências investigadas de: A) 2 J/cm², B) 6 J/cm², C) 20 J/cm². Todos os grupos foram iluminados, sendo o controle não recebendo PDZ. Os ensaios foram realizados em triplicada com n=5 para cada grupo a cada repetição. As letras representam diferença estatística entre os grupos, considerando o nível de significância de 99%, p<0,01.

Fonte: Elaborada pelo autor.

No gráfico A, que representa os resultados encontrados para a fluência de 2 J/cm², a concentração de 5 µg/ml demonstrou a taxa de morte celular desejada para ser utilizada no protocolo de associação, apresentando 41,91% de morte celular, baixando a viabilidade em quase 50%. A concentração de 1 µg/ml, foi ineficiente em causar morte nas células, apresentando uma viabilidade de 93,16%. Já para as concentrações 10 e 20 µg/ml a taxa de morte celular foi de 77,63% e 98,77%, respectivamente, demonstrando que concentrações de PDZ acima de 10 µg/ml causam uma severa morte das células.

Analisando os gráficos B e C, é possível observar que fluências de 6 e 20 J/cm², com concentrações maiores que 5 µg/ml de PDZ, causaram uma taxa de morte celular maior que 90%. Já na concentração de 1 µg/ml, observou-se uma viabilidade de 91,42% e 64,22%, em fluências 6 e 20 J/cm², respectivamente, o que se diferenciou

dos resultados do Ono, que encontrou uma viabilidade em torno de 72% e 18%, respectivamente.

Wen, L *et al.* (2012), trataram a linhagem celular de linfoma B/leucemia murina A20 com TFD utilizando PDZ como FS e constataram que o aumento na concentração e na fluência resultou em um declínio na viabilidade celular, medido pelo ensaio de viabilidade celular EZ-CyTox (Daeillab, Coreia). Esse achado é congruente com os resultados observados na linhagem B16F10, conforme documentado por Ono *et al.* (2018) e analisado pelo ensaio de MTT, bem como corroborado pelo presente estudo.^{107,108}

Com base nos resultados acima, foi estabelecido o protocolo com uma fluência de 2 J/cm² com uma concentração de 5 µg/ml de PDZ, que melhor contemplou a faixa de morte celular desejada entre 40 e 60%, conforme evidenciado no gráfico A da figura 10. Portanto, essa condição foi estabelecida para ser utilizada no protocolo de associação, alcançando uma viabilidade celular próxima a 50%.

5.2 Intervalo de aplicação entre as terapias RT e TFD

Foram investigados os efeitos de quatro abordagens terapêuticas distintas na viabilidade celular pelo ensaio de MTT, RT isolada, TFD isolada, PDZ (FS sem Luz) e a combinação de RT e TFD (RT+TFD), explorando diferentes intervalos entre suas aplicações.

Na figura 13, o gráfico A demonstra o intervalo de 1 hora entre a aplicação da RT e TFD, onde a RT apresentou 90,37% de viabilidade celular. O grupo TFD teve 85,99% de viabilidade, enquanto o grupo combinado RT+TFD, apresentou uma viabilidade de 82,83%. Em números percentuais, a associação das terapias teve um impacto maior na morte tumoral, com os seguintes valores: RT+TFD (17,17%), RT (9,63%) e TFD (14,01%), quando comparamos as terapias aplicadas de forma isoladas. Porém, não houve diferença significativa entre os grupos TFD e RT+TFD, demonstrando que a combinação com intervalo de 1 hora possui uma certa interação, mas sem um efeito aditivo ou sinérgico. Este resultado difere dos resultados obtidos por Luksiene, Kalvelyte e Supino (1999), que examinou o crescimento do carcinoma de ascite de Ehrlich e o dano celular após RT, TFD e tratamento combinado. A combinação de RT + TFD produziu um efeito aditivo quando uma janela de tempo de

1 h foi usada, não dependente da sequência em que os dois tratamentos haviam sido administrados.¹⁰⁹ No entanto, esta divergência nos resultados pode ser atribuída não apenas ao tipo celular, mas também à energia dos fótons da radiação ionizante utilizada pelos autores, que difere entre raios X (225 kV) e radiação γ (1.25 MeV). Ao ampliar o intervalo para 4 horas entre as terapias (Gráfico B), o grupo da RT apresentou 85,73% de viabilidade celular e o grupo PDZ apresentou 96,76%. O grupo TFD teve 93,98% de viabilidade, enquanto o grupo combinado RT+TFD, apresentou uma viabilidade de 73,10%. A RT+TFD teve um percentual de morte maior do que as terapias isoladas (RT+TFD: 26,90%, RT: 14,27% e TFD: 6,02%), no entanto a diferença não é significativa quando comparado com o grupo RT. Quando comparamos o grupo TFD isolado com o grupo RT+TFD, observa-se que houve uma potencialização da TFD, tendo em vista que ela apresentou um melhor resultado ao receber a RT anteriormente no grupo RT+TFD. Esta potencialização não foi aditiva ou sinérgica, porém, observa uma interação que causou uma morte celular mais acentuada no grupo combinado.

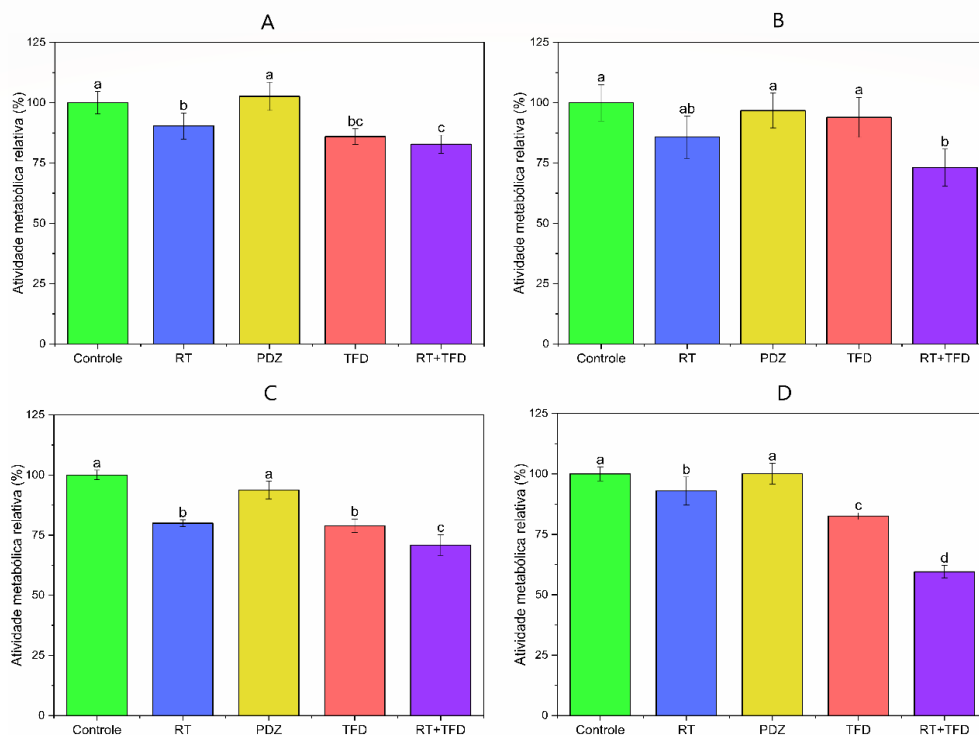


Figura 12 - Viabilidade celular da linhagem B16F10 após o tratamento de Radioterapia e Terapia fotodinâmica, com diferentes intervalos de tempo entre a aplicação das terapias: A) intervalo de 1 hora, B) intervalo de 4 horas C) 24 horas e D) 48 horas. O grupo Controle, representa células sem tratamento; RT, tratado com radioterapia isolada, PDZ, fotossensibilizador no escuro; TFD, terapia fotodinâmica isolada e RT+TFD, combinação de terapias. Os ensaios foram realizados em triplicada com n=10 para cada grupo a cada repetição. As letras representam diferença estatística entre os grupos, considerando o nível de significância de 99%, $p < 0,01$.

Fonte: Elaborada pelo autor.

No Gráfico C, que representa o protocolo de 24h de intervalo entre as terapias, a RT apresentou 79,39% de viabilidade celular e o grupo PDZ apresentou 93,67%. O grupo TFD teve 78,89% de viabilidade, enquanto o grupo combinado RT+TFD, apresentou uma viabilidade de 70,87%. Com 24 horas de intervalo observamos que a RT+TFD teve um percentual de morte maior do que as terapias isoladas (RT+TFD: 29,13%, RT: 20,61% e TFD: 21,11%), possuindo diferença significativa em relação aos demais grupos observados, demonstrando uma interação entre as terapias, mas sem um efeito sinérgico ou até aditivo.

No Gráfico D, com um intervalo de 48 horas entre terapias, a RT apresentou 92,96% de viabilidade celular e o grupo PDZ apresentou 100,10%. O grupo TFD teve 82,53% de viabilidade, enquanto o grupo combinado RT+TFD, apresentou uma viabilidade de 59,50%. Após 48 horas de intervalo entre terapias observamos que a RT+TFD teve um percentual de morte significativamente maior do que as terapias isoladas (RT+TFD: 40,50%, RT: 7,04% e TFD: 17,47%), demonstrando uma sinergia nos efeitos combinados, obtendo percentual de morte celular maior que a soma dos efeitos das terapias isoladas (RT: 7,04% + TFD: 17,47% = 24,51). O grupo RT+TFD mostrou diferença significativa entre os grupos, destacando a eficácia da combinação com o intervalo mais extenso.

Berg *et al.* (1995), ao avaliarem a resposta das células de adenocarcinoma do cólon humano ao tratamento combinado de RT e fotossensibilização pela protoporfirina IX, observaram que após um intervalo entre as terapias de 0-4 horas obteve-se um ligeiro efeito antagônico. No entanto, quando a combinação das terapias teve intervalo maior de 12-48 horas, obtiveram um efeito sinérgico.¹¹⁰ Esse resultado está de acordo com o presente trabalho que apresentou melhores resultados de morte celular em intervalos de tempo maiores.

Notavelmente, o grupo PDZ não apresentou diferença significativa em relação ao controle em nenhum dos intervalos testados, confirmando a ausência de citotoxicidade no escuro para PDZ em baixas concentrações como demonstrada por Ono *et al.* (2016).¹⁰⁸ Os resultados forneceram percepções significativas sobre a eficácia dessas terapias e a influência do intervalo de aplicação nas respostas celulares.

5.3 Avaliação de morte celular apoptótica e necrótica por citometria de fluxo

Dentre as condições analisadas por MTT, os grupos com intervalo de 24 e 48 horas, que tiveram resultados mais significativos na associação das terapias, foram investigados por citometria de fluxo a fim de caracterizar o perfil de morte celular. Devido sua especificidade maior em detectar a morte tipo apoptótica utilizou a caspase-3 como marcador fluorescente nos experimentos de citometria de fluxo, e não, a clássica anexina V, que poderia estar correlacionada com muitos eventos de marcações “falso-positivo”.

A partir desses dois ensaios, foram criados 4 grupos experimentais. Cabe ressaltar que a análise citométrica foi realizada em uma única ocasião, com aquisição de 10 mil eventos por amostra.

No primeiro grupo, onde a RT precedeu a TFD com um intervalo de 24 horas entre as terapias e 24h para análise dos resultados, não há sugestão de uma resposta celular significativa. Ao analisar a apoptose (Figura 14), notamos que a RT isolada apresentou uma taxa de 2,24%, a TFD mostrou 1,88%, enquanto a combinação de RT+TFD, 3,01%. Em comparação, o grupo controle apresentou uma taxa basal de apoptose de 1,40%. Quanto à necrose (Figura 15), a RT isolada teve uma taxa de 0,14%, a TFD apresentou 0,27%, e a combinação RT+TFD registrou 0,45%. O grupo controle manteve uma baixa taxa basal de necrose, apenas 0,08%.

O grupo experimental não apresentou uma morte celular expressiva, levantando a hipótese de perda de células durante o processo de manipulação. Este fenômeno pode estar relacionado ao protocolo de marcação para citometria, que envolve mais etapas de tripsinação e centrifugação em comparação com o protocolo de MTT. Quando avaliado pelo ensaio de MTT, o grupo demonstrou uma morte celular, especialmente no tratamento combinado RT+TFD. Esses resultados sugerem a possibilidade de subestimação da resposta celular efetiva devido à metodologia mais complexa adotada para a citometria em comparação com o ensaio de MTT, que envolve menos manipulações.

GRUPO 1

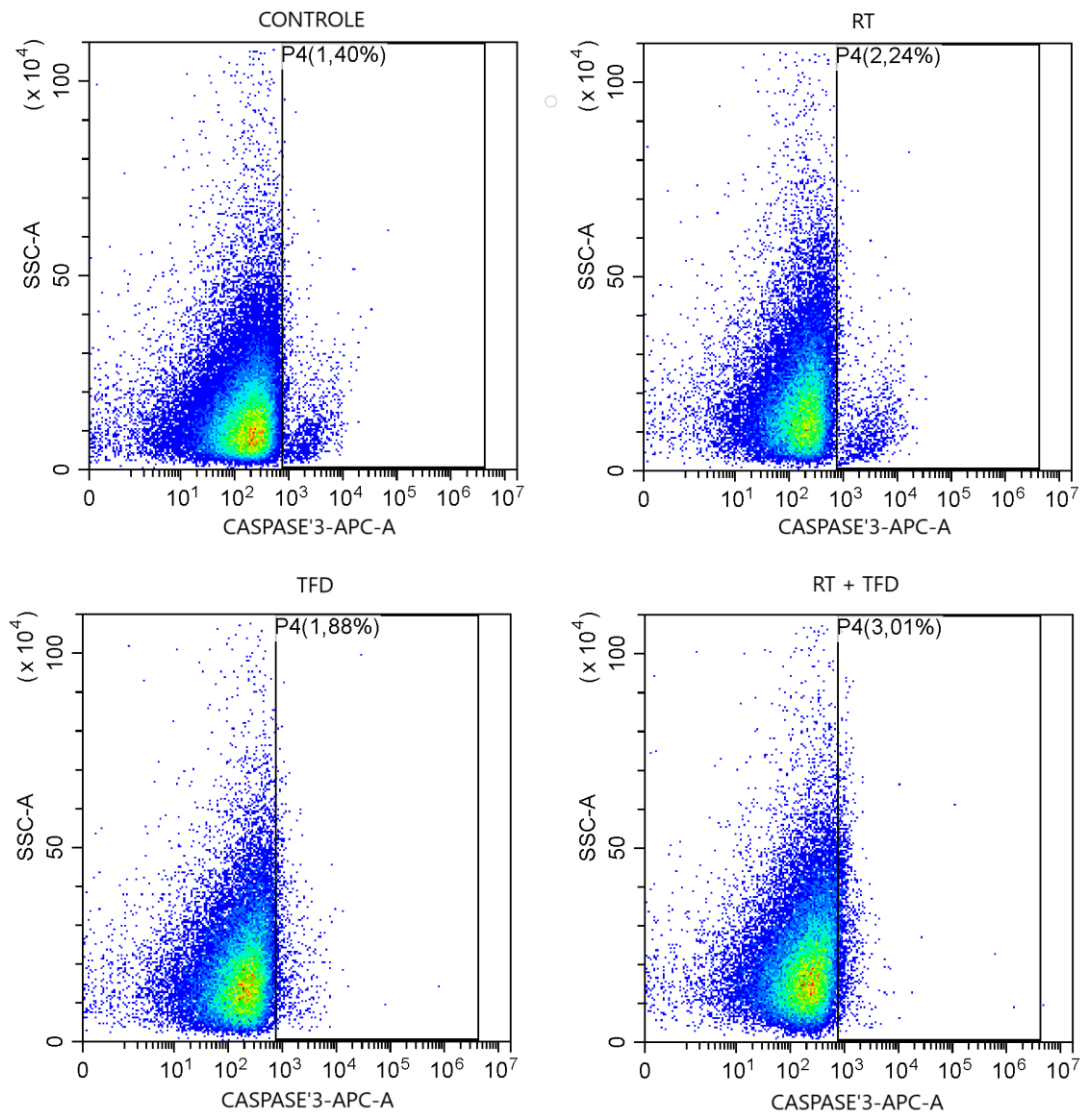


Figura 13 – Análise de morte celular apoptótica por citometria de fluxo após tratamento com radioterapia e terapia fotodinâmica aplicando intervalo de 24 horas entre terapias. Controle: grupo não tratado; RT: radioterapia 4Gy; TFD: terapia fotodinâmica 2J/cm²; RT+TFD: associação das terapias. A análise foi realizada após 24 horas da TFD.

Fonte: Elaborada pelo autor.

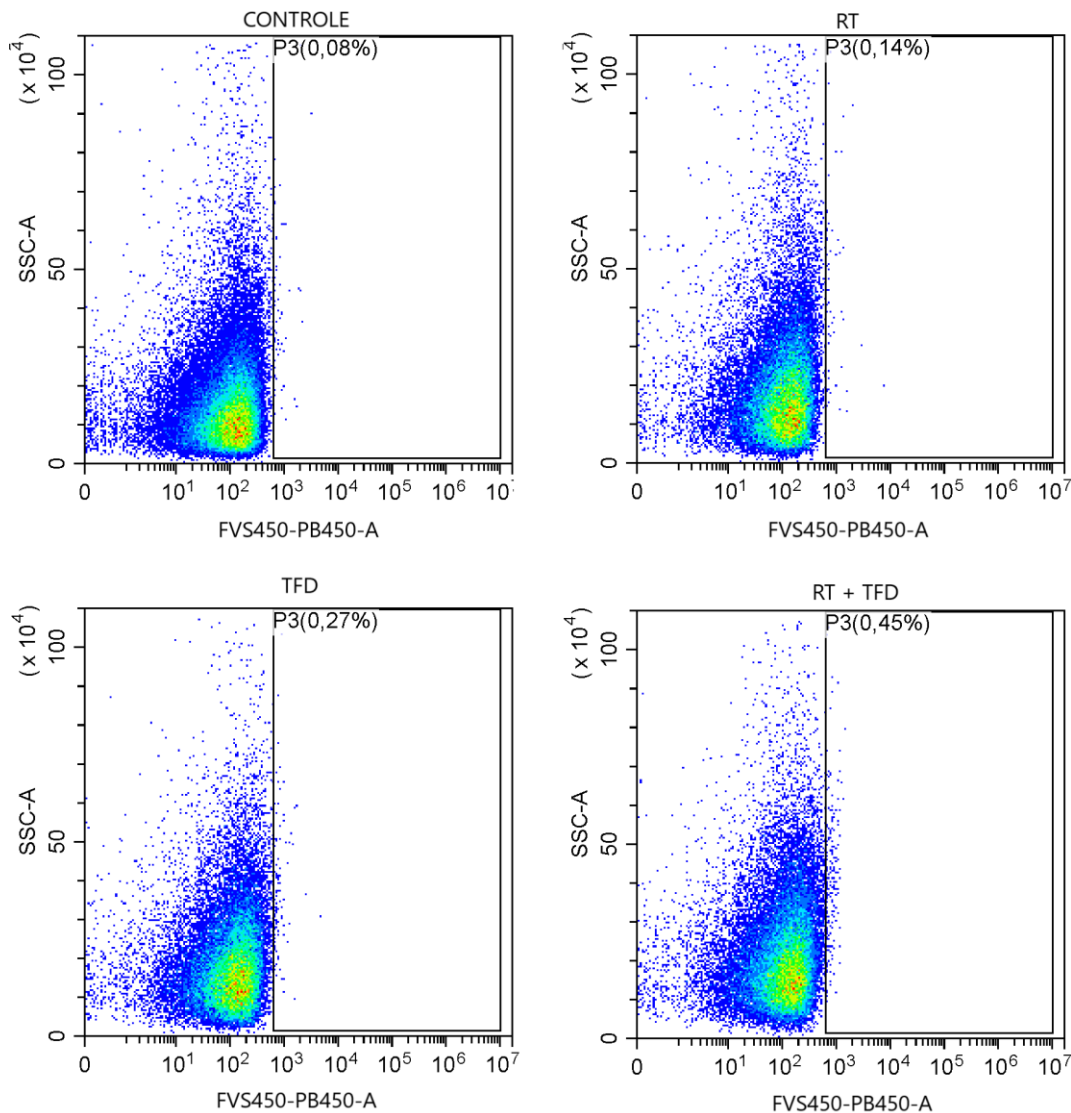


Figura 14 - Análise de morte celular necrótica por citometria de fluxo após tratamento com radioterapia e terapia fotodinâmica aplicando intervalo de 24 horas entre terapias. Controle: grupo não tratado; RT: radioterapia 4Gy; TFD: terapia fotodinâmica 2J/cm²; RT+TFD: associação das terapias. A análise foi realizada após 24 horas da TFD.

Fonte: Elaborada pelo autor.

No segundo grupo experimental, o protocolo de tratamento consistiu em manter a administração da RT como na primeira abordagem, seguida pela TFD, com o intervalo de aplicação de 24 horas entre as terapias, porém, com análise realizada 48 horas após a última aplicação.

Os resultados deste grupo revelaram diferenças na resposta celular comparado com o grupo anterior. Ao examinar a apoptose (Figura 16), observou-se que a RT isolada apresentou uma taxa de 2,20%, a TFD isolada mostrou 1,59%, enquanto a combinação de RT+TFD registrou uma taxa significativa de 13,97%. Em

comparação, o grupo controle apresentou uma taxa basal de apoptose de 0,83%. O grupo RT+TFD com 27,48% de necrose (Figura 17) apresentou um aumento significativo em comparação com os outros grupos isolados (TFD: 5,08% e RT: 9,52%). Isso sugere que, apesar do aumento na apoptose, a necrose desempenhou um papel mais proeminente na resposta global das células B16F10 a esse protocolo específico. Estes achados levantam a hipótese de que a predominância de necrose pode ser explicada pelo maior tempo para análise, permitindo que células em estado de apoptose tardia tenham tido tempo para se transformar em células necróticas.

GRUPO 2

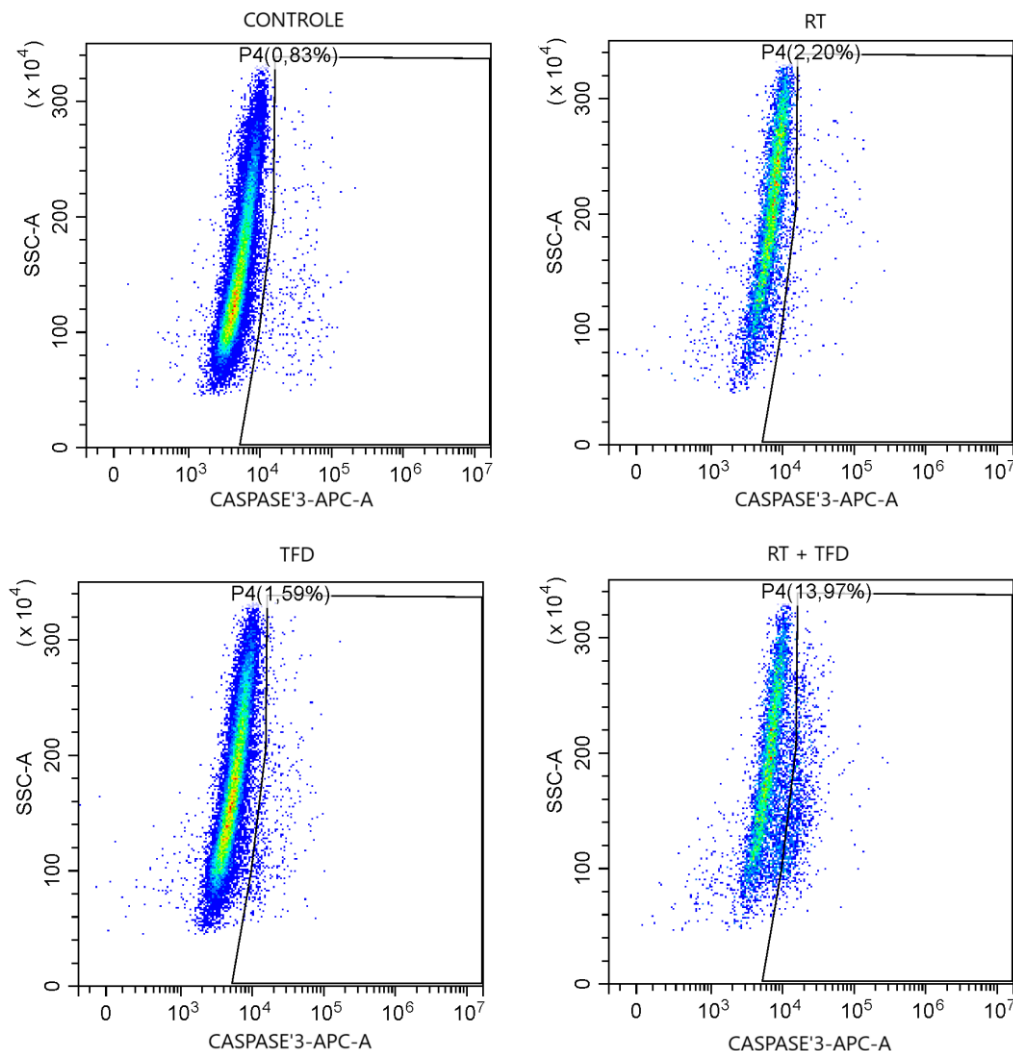


Figura 15 - Análise de morte celular apoptótica por citometria de fluxo após tratamento com radioterapia e terapia fotodinâmica aplicando intervalo de 24 horas entre terapias. Controle: grupo não tratado; RT: radioterapia 4Gy; TFD: terapia fotodinâmica 2J/cm²; RT+TFD: associação das terapias. A análise foi realizada após 48 horas da TFD.

Fonte: Elaborada pelo autor.

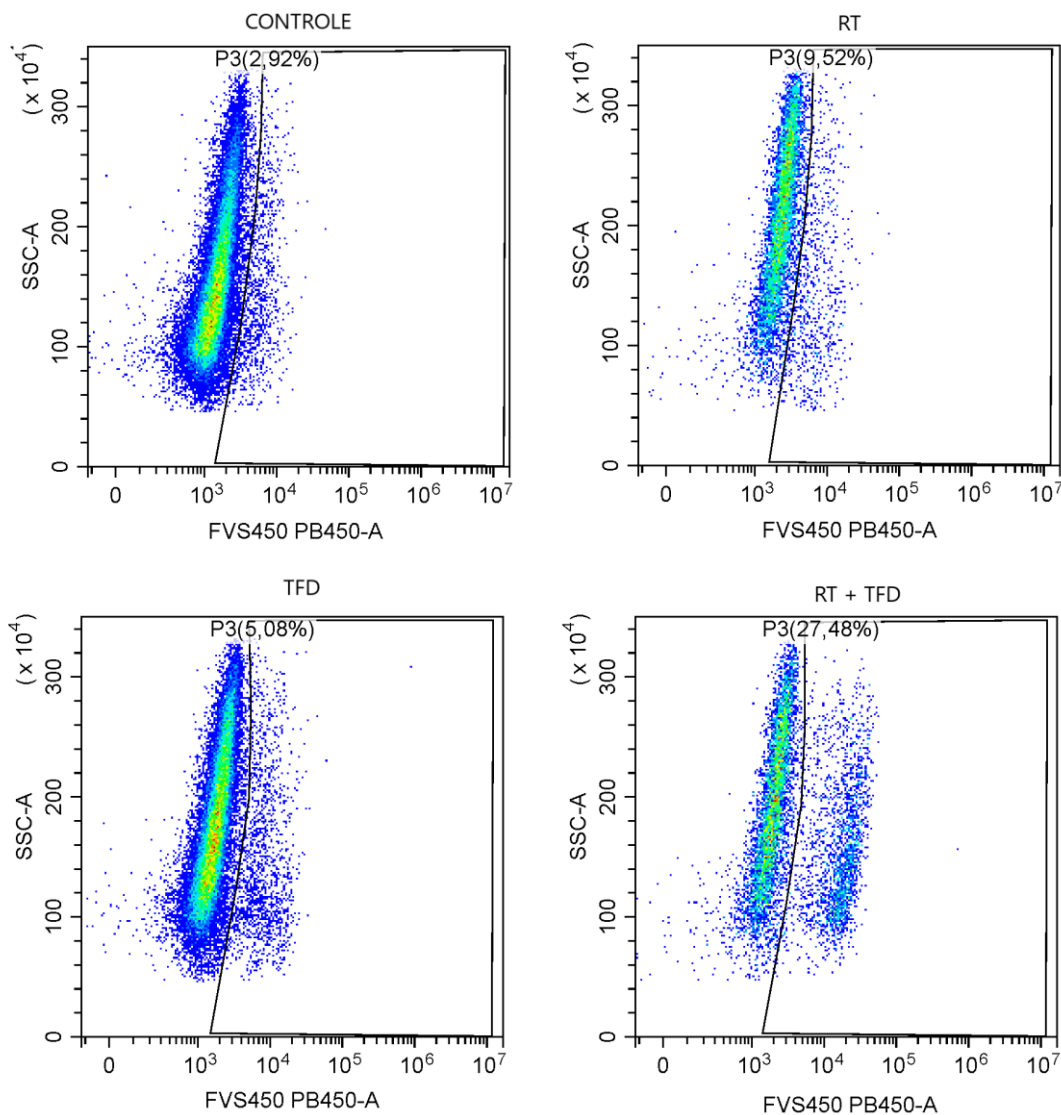


Figura 16 - Análise de morte celular necrótica por citometria de fluxo após tratamento com radioterapia e terapia fotodinâmica aplicando intervalo de 24 horas entre terapias. Controle: grupo não tratado; RT: radioterapia 4Gy; TFD: terapia fotodinâmica 2J/cm²; RT+TFD: associação das terapias. A análise foi realizada após 48 horas da TFD.

Fonte: Elaborada pelo autor.

No terceiro grupo experimental, o protocolo de tratamento foi configurado com a RT como a primeira intervenção, seguida pela TFD após um intervalo ampliado de 48 horas entre as aplicações. A análise foi realizada 24 horas após a última aplicação. Este grupo apresentou padrões distintos em comparação com os grupos anteriores. Ao examinar a apoptose (Figura 18), observou-se que a RT isolada apresentou uma taxa de 3,38%, a TFD isolada mostrou 12,68%, enquanto a combinação de RT+TFD registrou uma taxa de apoptose de 37,05%. Em comparação, o grupo controle apresentou uma taxa basal de apoptose de 0,79%. Esses resultados indicam um

aumento significativo na taxa de apoptose quando utilizamos um intervalo estendido de 48 horas entre as aplicações. Além disso, ao analisar a necrose (Figura 19), observou-se que o grupo associado (RT+TFD) também apresentou uma resposta significativa, com uma taxa de necrose de 19,49%, em comparação com as taxas de necrose de 0,26% para RT isolada, 0,58% para TFD isolada e 0,09% no grupo controle.

Werthmöller *et al.* (2016) realizaram uma combinação de radiação ionizante por raio X e hipertermia em células da linhagem B16F10, adotando um intervalo de 4 horas entre as aplicações terapêuticas. Os resultados evidenciaram um incremento tanto na apoptose quanto na necrose, indicando a possibilidade de uma morte imunogênica.¹¹¹ Em nosso estudo, também foi observado um aumento significativo em ambas as vias de morte celular no grupo com intervalos de 24h e 48 horas entre as terapias, ressaltando a influência do tempo na resposta celular. No entanto, encontramos resultados significativos com intervalos maiores entre as terapias, quando comparado ao intervalo adotado por Werthmöller *et al.* (2016), essa diferença pode ser atribuída a diversos parâmetros, incluindo a aplicação adjuvante da radioterapia (RT) e a escolha de avaliação da morte celular por caspase, em contraste com a utilização de Anexina V, que poderá estar envolvida em muitos eventos de “positividade falsa” para apoptose, e foi o marcador de escolha no estudo de Werthmöller *et al.* (2016). Além disso, cabe destacar que nossa pesquisa empregou uma dose menor de radiação ionizante, especificamente 4 Gy.

Alguns autores relataram que a associação entre RT e TFD, tiveram melhores resultados quando foram aplicadas concomitantemente^{94,100} ou imediatamente a outra,¹⁰¹ demonstrando que dessa forma as células não teriam tempo para se recuperarem, indicando que em intervalos maiores as células conseguiriam se recuperar do dano causado. No entanto, no presente estudo os resultados da associação foram mais significativos em intervalos maiores de 24h e 48h entre as terapias. Isso pode ser explicado devido ao estresse causado pela radioterapia que favoreceria a sincronia e a parada de células em uma determinada fase do ciclo celular podendo melhorar a eficácia da próxima dose de terapia aplicada.

Nossa hipótese é que a RT promoveu um aumento de células na fase do ciclo G2/M após 24 horas, comparado com células não irradiadas, como mostrado por Lonati *et al.* (2021), que observou um aumento de células em fase G2 para amostras

irradiadas com raio x em doses 2 Gy e 5 Gy.¹¹² Segundo Moloudi, Abrahamse e George (2023) a fase G2/M é a mais sensível do ciclo celular para ser interrompida para aplicação terapêutica contra o câncer.¹¹³ A sensibilidade à TFD na fase G2/M do ciclo celular está de acordo com o observado em estudos anteriores utilizando diversos fotossensibilizadores incluindo 5-ALA,¹¹⁴ ATX-S10(Na)¹¹⁵ e uma ftalocianina modificada que denominaram como “Photocyanine”.¹¹⁶ Este último estudo de Shao *et al.* (2012) concluiu que a “Photocyanine” excitada em 670 nm induziu células hepatocarcinoma HepG2 à morte pelas vias apoptótica e necrótica por meio da ação na membrana mitocondrial diminuindo o potencial e membrana da organela ($\Delta\Psi_m$), produzindo EROs, ativando caspase-3 e causando parada celular no estágio G2/M. A TFD utilizando o PDZ como fotossensibilizador pode ter seu efeito potencializado devido ao estágio do ciclo celular em G2/M, aumentando a expressão de ciclina A, e consequentemente, aumentar a caspase-3 e morte apoptótica.^{117,118} Essa hipótese é reforçada por Nan *et al.* (2015) que quando analisaram a expressão da ciclina A em diferentes fases do ciclo celular, notaram uma maior expressão da ciclina A nas fases S e G2/M quando comparado a fase G1, esse aumento na expressão da ciclina A se correlaciona com a ativação da caspase-3 e o aumento da taxa apoptótica.¹¹⁹

Para uma compreensão mais aprofundada dos mecanismos subjacentes aos resultados alcançados com a combinação das técnicas, é imprescindível a realização da quantificação de EROs, análises do ciclo celular e avaliação da sobrevivência celular por meio de ensaios clonogênicos após a irradiação.

Por fim, o grupo 3 sugere um potencial sinérgico entre essas abordagens terapêuticas quando o intervalo é prolongado. A resposta apoptótica proeminente demonstra a eficácia dessa mudança na dinâmica temporal das terapias, destacando o terceiro grupo como um dos mais promissores em termos de indução de morte celular.

GRUPO 3

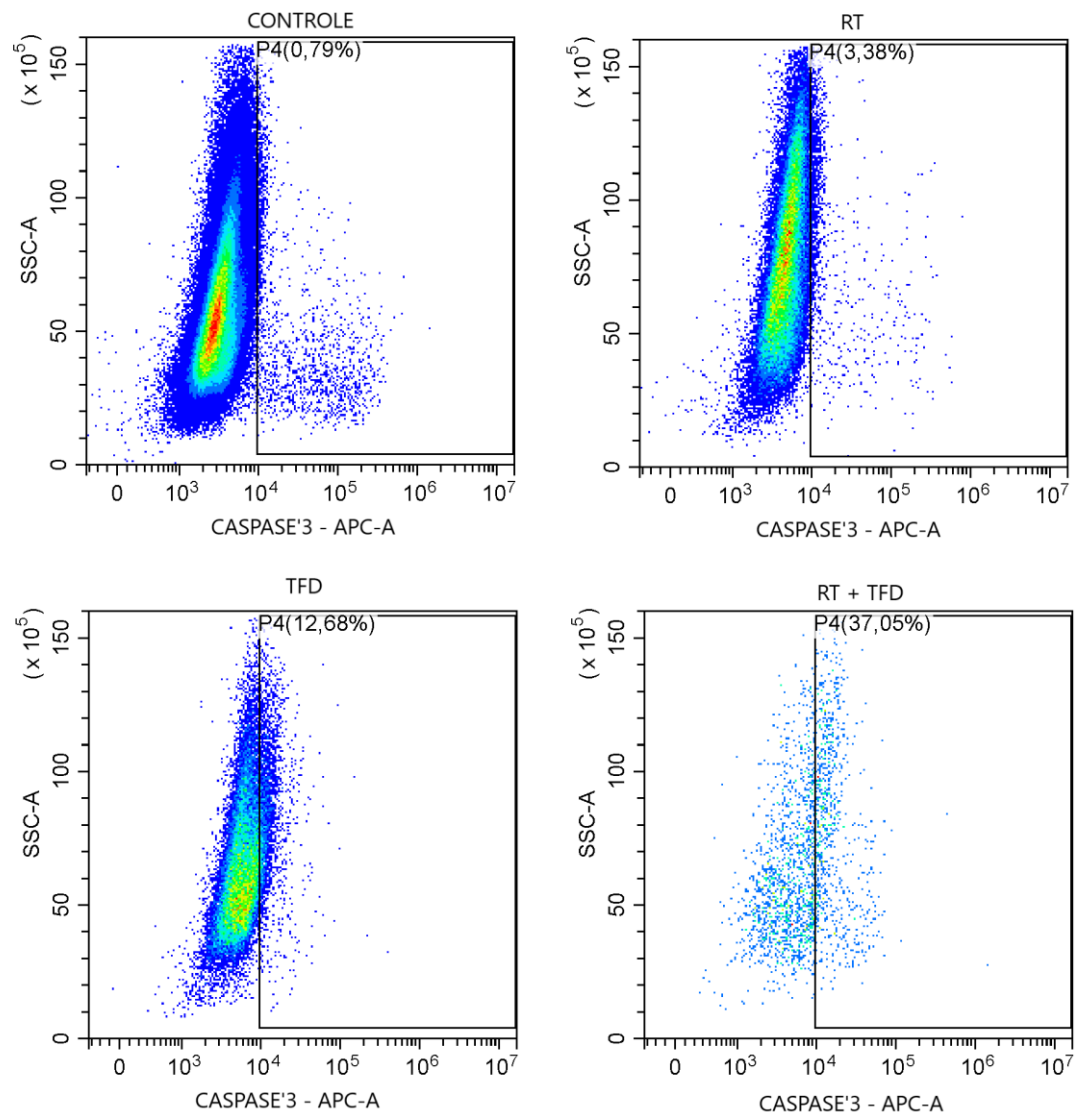


Figura 17 - Análise de morte celular apoptótica por citometria de fluxo após tratamento com radioterapia e terapia fotodinâmica aplicando intervalo de 48 horas entre terapias. Controle: grupo não tratado; RT: radioterapia 4Gy; TFD: terapia fotodinâmica 2J/cm²; RT+TFD: associação das terapias. A análise foi realizada após 24 horas da TFD.

Fonte: Elaborada pelo autor.

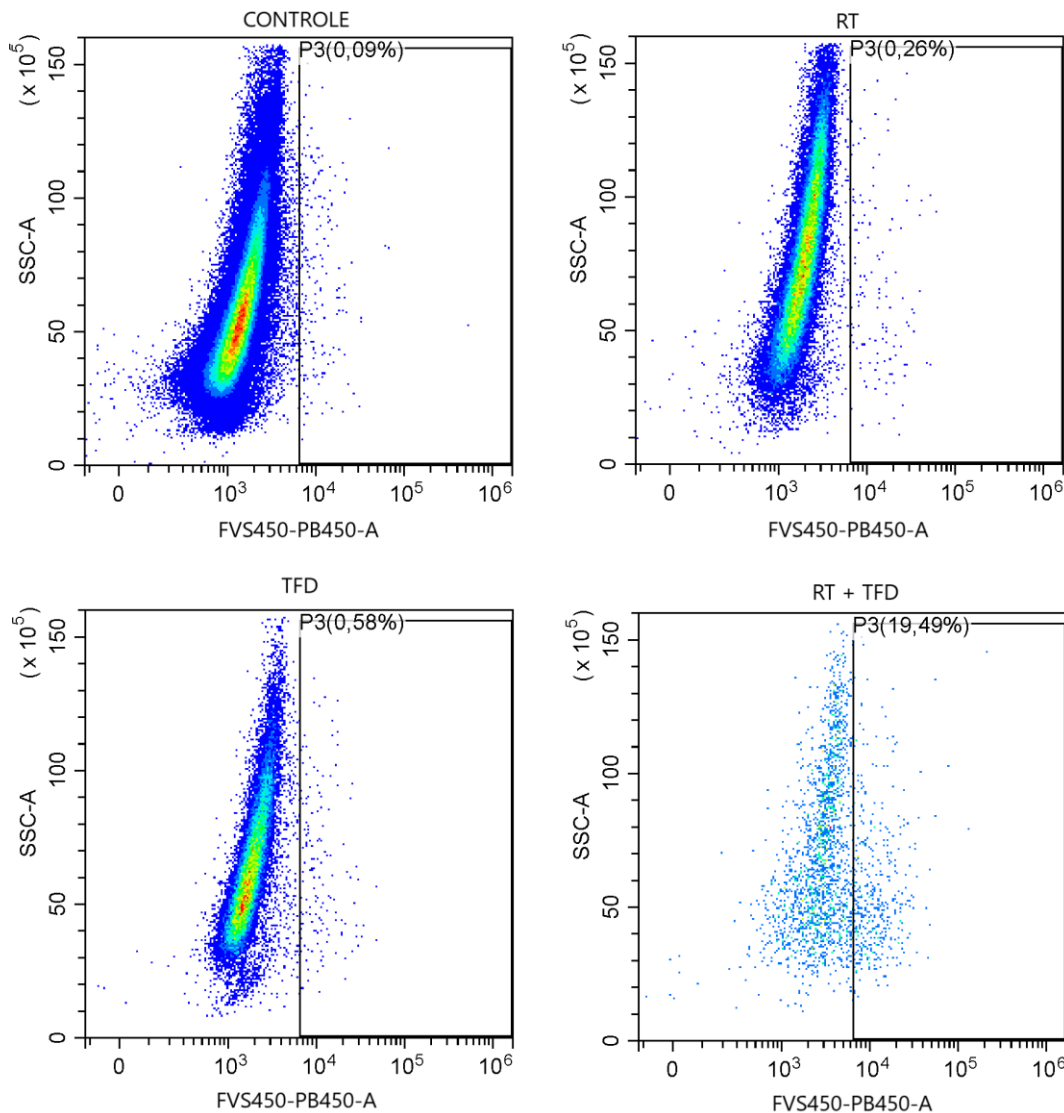


Figura 18 - Análise de morte celular necrótica por citometria de fluxo após tratamento com radioterapia e terapia fotodinâmica aplicando intervalo de 48 horas entre terapias. Controle: grupo não tratado; RT: radioterapia 4Gy; TFD: terapia fotodinâmica 2J/cm²; RT+TFD: associação das terapias. A análise foi realizada após 24 horas da TFD.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Após os achados do grupo 3, investigamos se a inversão na ordem de aplicação das terapias, mantendo o intervalo de 48 horas, influenciaria na morte celular apoptótica e necrótica. Então, no quarto grupo de tratamento, a ordem das terapias foi invertida, aplicando a TFD antes da RT, mantendo os demais parâmetros utilizados no grupo 3. Ao analisar a apoptose (Figura 20), observamos que a TFD isolada apresentou uma taxa de 6,15%, a RT mostrou 0,74%, enquanto a combinação de TFD+RT registrou uma taxa de apoptose de 11,22%. Em contraste, o grupo controle apresentou uma taxa basal de apoptose de 0,70%.

Esses resultados sugerem que a ordem inversa das terapias, com a aplicação inicial da TFD, pode influenciar a taxa de apoptose. A combinação de TFD+RT demonstrou uma taxa maior de apoptose em comparação com as terapias isoladas, indicando uma possível potencialização dos efeitos terapêuticos quando a TFD precede a RT. Porém, quando comparamos com o grupo 3, onde a RT precede a TFD, este último apresentou melhores resultados, principalmente na porcentagem de morte por apoptose com 37,05% para o grupo RT+TFD (Grupo 3, figura 18), e 11,22% de apoptose para o grupo TFD+RT (Grupo 4, Figura 20).

No que diz respeito à necrose (Figura 21), o grupo associado (TFD+RT) apresentou uma porcentagem de 10,39%, indicando um perfil considerável de morte celular por necrose. Embora a necrose também tenha aumentado nos grupos tratados individualmente (TFD: 3,81% e RT: 5,88%), a combinação de TFD e RT demonstrou uma maior influência nesse tipo de morte celular em comparação com os grupos TFD e RT isolados. No entanto, quando comparada com a combinação inversa (RT+TFD), apresentou uma taxa de necrose menor. Em parâmetros gerais, a associação com a RT sendo a terapia que precede a TFD se mostrou mais eficiente na morte celular, apresentando maior sinergismo da combinação das técnicas quando comparado com a troca da ordem da associação.

GRUPO 4

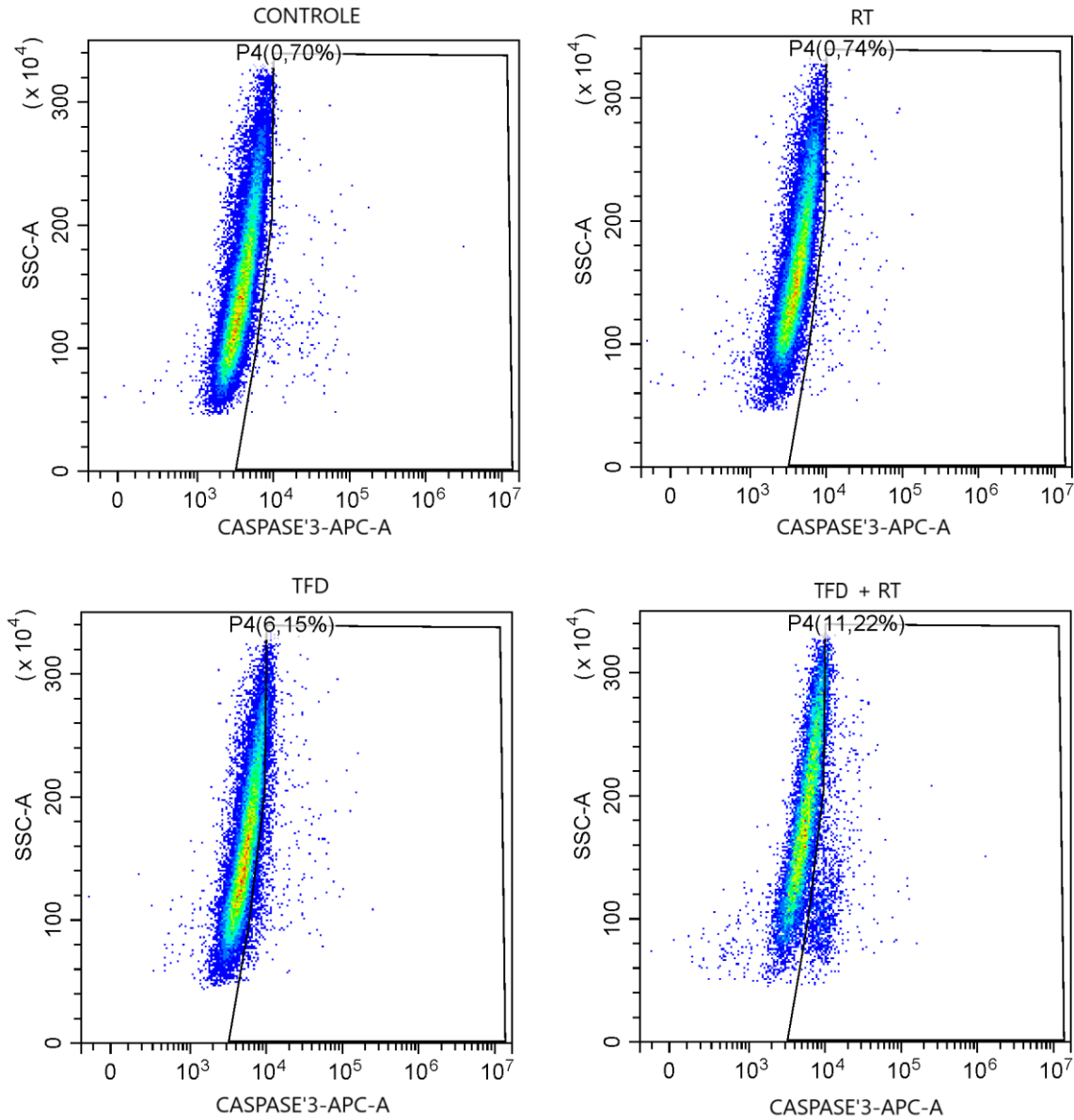


Figura 19 - Análise de morte celular apoptótica por citometria de fluxo após tratamento com radioterapia e terapia fotodinâmica aplicando intervalo de 48 horas entre terapias. Controle: grupo não tratado; RT: radioterapia 4Gy; TFD: terapia fotodinâmica 2J/cm²; TFD+RT: associação das terapias. A análise foi realizada após 24 horas da TFD.

Fonte: Elaborada pelo autor.

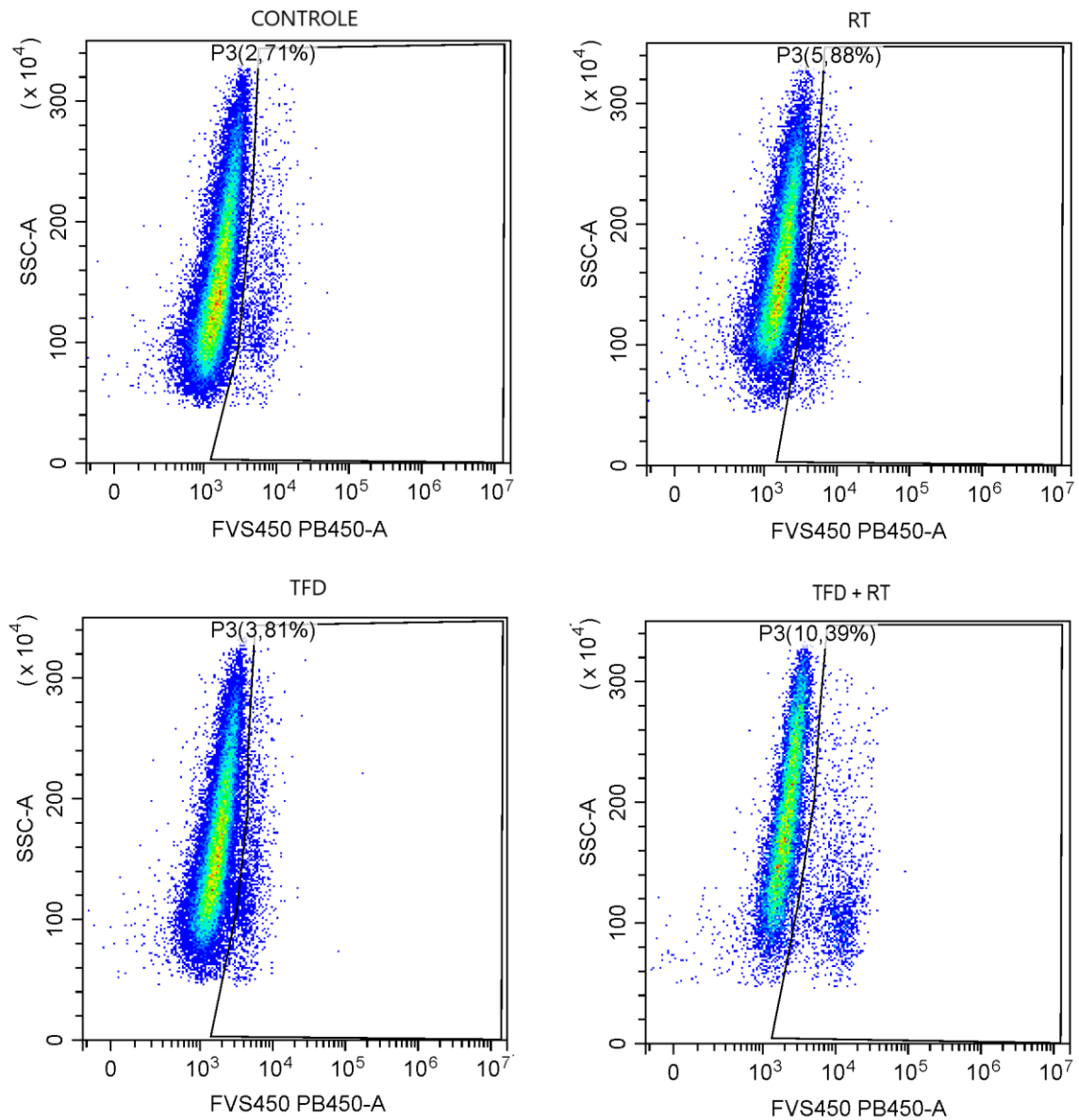


Figura 20 -Análise de morte celular necrótica por citometria de fluxo após tratamento com terapia fotodinâmica e radioterapia e aplicando intervalo de 48 horas entre terapias. Controle: grupo não tratado; RT: radioterapia 4Gy; TFD: terapia fotodinâmica 2J/cm²; TFD+RT: associação das terapias. A análise foi realizada após 24 horas da TFD.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 6 – Síntese dos resultados de morte apoptótica e necrótica dos grupos dos experimentais.

Grupos Experimentais	Grupos de tratamento	Apoptose	Necrose
Grupo 1 (24 horas/24 horas)	Controle	1,40%	0,08%
	RT	2,24%	0,14%
	TFD	1,88%	0,27%
	RT+TFD	3,01%	0,45%
Grupo 2 (24 horas/48 horas)	Controle	0,83%	2,92%
	RT	2,20%	9,52%
	TFD	1,59%	5,08%
	RT+TFD	13,97%	27,48%
Grupo 3 (48 horas/24 horas)	Controle	0,79%	0,09%
	RT	3,38%	0,26%
	TFD	12,68%	0,58%
	RT+TFD	37,05%	19,49%
Grupo 4 (48 horas/24 horas)	Controle	0,70%	2,71%
	RT	0,74%	5,88%
	TFD	6,15%	3,81%
	TFD+RT	11,22%	10,39%

Fonte: Elaborada pelo autor.

Esses resultados destacam a sensibilidade da resposta celular às mudanças na ordem das terapias. Ao compararmos a eficácia entre os grupos 3 e 4, com foco nos grupos associados (RT+TFD versus TFD+RT), observamos que o terceiro grupo (RT+TFD) exibiu uma resposta apoptótica mais proeminente em comparação com o quarto grupo (TFD+RT). Essa diferença destaca a importância da sequência de aplicação das terapias na indução de respostas celulares específicas.

À luz dos resultados obtidos nos grupos experimentais, emerge uma perspectiva sobre a potencial ativação de uma resposta imune antitumoral. O terceiro grupo, que se destacou como o mais promissor, revelou uma significativa taxa de apoptose (37,05%), indicando uma resposta apoptótica significativa. Essa observação sugere a possibilidade de que o protocolo adotado, com a RT seguida pela terapia TFD com um intervalo prolongado de 48 horas, pode ter desencadeado uma morte celular que favorece a ativação do sistema imunológico contra as células tumorais.

Essa hipótese se fortalece ao compararmos com o quarto grupo, onde a inversão da ordem das terapias (TFD+RT) resultou em uma menor taxa de apoptose em relação ao terceiro grupo. Embora tenha havido uma resposta apoptótica (11,22%), a diferença sugere que a sequência de aplicação das terapias pode

influenciar a natureza da morte celular e, conseqüentemente, o potencial imunogênico.

É crucial ressaltar que, embora a apoptose seja frequentemente associada à imunogenicidade, outros parâmetros também desempenham papéis fundamentais na resposta imune. Dessa forma, análises mais aprofundadas, incluindo marcadores específicos relacionados à imunogenicidade, são necessárias para uma compreensão abrangente. Considerar a expressão de moléculas associadas à apresentação de antígenos, como o complexo principal de histocompatibilidade (MHC), e a liberação de sinais imunomoduladores são aspectos relevantes para avaliar a capacidade do tratamento em despertar uma resposta imune antitumoral.

Essa discussão aponta para a necessidade de explorar além das métricas de morte celular, buscando integrar marcadores específicos que caracterizam a resposta imune. Investigações futuras devem se concentrar em elucidar como as modificações nos protocolos terapêuticos podem otimizar não apenas a morte celular programada, mas também a ativação de mecanismos imunológicos capazes de combater eficazmente as células tumorais. Essa abordagem integrada é essencial para impulsionar o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficazes e orientadas à resposta imune antitumoral.

6 CONCLUSÃO

O presente estudo revelou avanços significativos na busca por estratégias terapêuticas eficazes contra o melanoma, destacando a combinação da Radioterapia e Terapia Fotodinâmica como uma abordagem especialmente promissora. A análise da linhagem B16F10 revelou que a combinação dessas terapias superou, de maneira notável, os efeitos alcançados por cada tratamento isolado, evidenciando uma sinergia que potencializa a indução de morte celular.

Além disso, os resultados apontaram que o intervalo entre a aplicação das terapias desempenha um papel crucial na viabilidade celular, com um tempo mais extenso (48 horas entre terapias) revelando resultados mais positivos. Esses achados ressaltam a importância da compreensão do efeito do momento em realizar uma intervenção (seja RT, como a TFD), que estaria associado à fase da divisão celular e consequentemente, causando impactos na eficácia do tratamento combinado.

No que diz respeito ao potencial imunogênico, o protocolo de combinação RT e TFD, com um intervalo estratégico de 48 horas, mostrou-se particularmente promissor ao causar morte apoptótica. Esse aspecto ressalta não apenas a eficácia na indução de morte celular, mas também uma possível capacidade de estimular uma resposta imunológica, sugerindo um impacto positivo na ativação do sistema imune.

A ordem de aplicação das terapias também demonstrou ser um fator determinante, com a sequência RT + TFD demonstrando maior eficácia na indução de morte celular em comparação com a abordagem inversa (TFD + RT). Essa observação destaca a importância da ordem de aplicação na otimização dos efeitos terapêuticos.

Apesar dos avanços alcançados neste estudo, reconhecemos a necessidade de investigações adicionais para aprofundar a compreensão dos mecanismos subjacentes, especialmente na determinação de qual fase do ciclo celular a TFD está promovendo uma alta taxa de morte por apoptose após RT, fator essencial para desencadear uma resposta imunogênica eficaz e contribuir ainda mais para a morte de células do tipo melanoma. Além disso, a realização de estudos clonogênicos será fundamental para avaliar a sobrevivência celular e validar os resultados obtidos em termos de eficácia terapêutica. Mais investigações devem ser conduzidas para expandir e aprimorar nossos conhecimentos, estabelecendo bases sólidas para

futuras aplicações clínicas neste contexto. A continuidade dessa pesquisa visa contribuir significativamente para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas inovadoras no combate ao melanoma.

REFERÊNCIAS

- 1 ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2019
- 2 SUNG, H. *et al.* Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209–249, May 2021.
- 3 3 BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Estimativa 2023**: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2022.
- 4 DAMYANOV, C. A. *et al.* Conventional treatment of cancer realities and problems. **Annals of Complementary and Alternative Medicine**, v. 1, n. 1, p. 1002, 2018.
- 5 ROZANOVA, N.; ZHANG, J. Photothermal ablation therapy for cancer based on metal nanostructures. **Science in China Series B: chemistry**, v. 52, n. 10, p. 1559–1575, 18 Oct. 2009.
- 6 CELLI, J. P. *et al.* Imaging and photodynamic therapy: mechanisms, monitoring, and optimization. **Chemical Reviews**, v. 110, n. 5, p. 2795–2838, 12 May 2010.
- 7 RAI, P. *et al.* Development and applications of photo-triggered theranostic agents. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 62, n. 11, p. 1094–1124, 30 Aug. 2010.
- 8 TRIESSCHEIJN, M. *et al.* Photodynamic therapy in oncology. **Oncologist**, v. 11, n. 9, p. 1034–1044, 1 Oct. 2006.
- 9 MCCAUGHAN JR, J. S. *et al.* Palliation of esophageal malignancy with photoradiation therapy. **Cancer**, v. 54, n. 12, p. 2905–2910, 1984.
- 10 TAMAOKI, M. *et al.* Repeated talaporfin sodium photodynamic therapy for esophageal cancer: safety and efficacy. **Esophagus**, v. 18, n. 4, p. 817–824, 1 Oct. 2021.
- 11 BALCHUM, O. J.; DOIRON, D. R.; HUTH, G. C. Photoradiation therapy of endobronchial lung cancers employing the photodynamic action of hematoporphyrin derivative. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 4, n. 1, p. 13–30, 1 Jan. 1984.
- 12 EL-HUSSEIN, A. *et al.* A review of chemotherapy and photodynamic therapy for lung cancer treatment. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 2, p. 149–161, 3 Apr. 2020.
- 13 HAYATA, Y. *et al.* Photodynamic therapy with hematoporphyrin derivative in cancer of the upper gastrointestinal tract. **Seminars in Surgical Oncology**, v. 1, n. 1, p. 1–11, 1 Jan. 1985.

- 14 TANAKA, M. *et al.* Combination of talaporfin photodynamic therapy and Poly (ADP-Ribose) polymerase (PARP) inhibitor in gastric cancer. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 539, p. 1–7, Feb. 2021.
- 15 MANG, T. S. *et al.* A phase II/III clinical study of tin ethyl etiopurpurin (Purlytin)-induced photodynamic therapy for the treatment of recurrent cutaneous metastatic breast cancer. **Cancer Journal from Scientific American**, v. 4, n. 6, p. 378–384, Nov. 1998.
- 16 GUSTALIK, J.; AEBISHER, D.; BARTUSIK-AEBISHER, D. Photodynamic therapy in breast cancer treatment. **Journal of Applied Biomedicine**, v. 20, n. 3, p. 98–105, 2022.
- 17 PAN, W. L. *et al.* Microenvironment-driven sequential ferroptosis, photodynamic therapy, and chemotherapy for targeted breast cancer therapy by a cancer-cell-membrane-coated nanoscale metal-organic framework. **Biomaterials**, v. 283, p. 121449, Apr. 2022.
- 18 BIEL, M. Advances in photodynamic therapy for the treatment of head and neck cancers. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 38, n. 5, p. 349–355, June 2006.
- 19 BIEL, M. A. Photodynamic therapy of head and neck cancers. **Methods in Molecular Biology**, v. 635, p. 281–293, 2010.
- 20 MEULEMANS, J.; DELAERE, P.; VANDER POORTEN, V. Photodynamic therapy in head and neck cancer: Indications, outcomes, and future prospects. **Current Opinion in Otolaryngology and Head and Neck Surgery**, v. 27, n. 2, p. 136–141, Apr. 2019.
- 21 SCHWEITZER, V. G. Photodynamic therapy for treatment of head and neck cancer. **Otolaryngology: head and neck surgery**, v. 102, n. 3, p. 225–232, Mar. 1990.
- 22 YANG, H. *et al.* Photosensitizer nanoparticles boost photodynamic therapy for pancreatic cancer treatment. **Nano-Micro Letters**, v. 13, n. 1, 2021. DOI: 10.1007/s40820-020-00561-8.
- 23 BOWN, S. G. Traitement photodynamique du cancer du pancreas. **Acta Endoscopica**, v. 33, p. 531-538, 2003.
- 24 DE ROSA, F. S.; BENTLEY, M. V. L. B. Photodynamic therapy of skin cancers: sensitizers, clinical studies and future directives. **Pharmaceutical Research**, v. 17, n. 12, p. 1447–1455, 2000.
- 25 MENNEL, S. *et al.* Ocular photodynamic therapy – standard applications and new indications (part 1). **Ophthalmologica**, v. 221, n. 4, p. 216–226, June 2007.
- 26 BROWN, S. B.; BROWN, E. A.; WALKER, I. The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment. **Lancet Oncology**, v. 5, n. 8, p. 497–508, Aug. 2004.

27 AGOSTINIS, P. *et al.* Photodynamic therapy of cancer: an update. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 61, n. 4, p. 250–281, July 2011.

28 ALLISON, R. R. Photodynamic therapy: oncologic horizons. **Future Oncology**, v. 10, n. 1, p. 123–142, 11 Dec. 2013. DOI: 10.2217/fon.13.176

29 HAMBLIN, M. R.; ABRAHAMSE, H. Factors affecting photodynamic therapy and anti-tumor immune response. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 2, p. 123-136, 2021.

30 BURNET, M.; WALTER, F. R. S.; HALL, E. Cancer: a biological approach: I. the processes of control. II. the significance of somatic mutation. **British Medical Journal**, v. 1, n. 5022, p. 779, Apr. 1957.

31 DUNN, G. P.; OLD, L. J.; SCHREIBER, R. D. The three es of cancer immunoediting. **Annual Review of Immunology**, v. 22, p. 329–360, Mar. 2004. DOI: 10.1146/annurev.immunol.22.012703.104803.

32 MITTAL, D. *et al.* New insights into cancer immunoediting and its three component phases - elimination, equilibrium and escape. **Current Opinion in Immunology**, v. 27, n. 1, p. 16–25, Apr. 2014.

33 KOEBEL, C. M. *et al.* Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. **Nature**, v. 450, n. 7171, p. 903–907, Nov. 2007.

34 VESELY, M. D.; SCHREIBER, R. D. Cancer immunoediting: antigens, mechanisms, and implications to cancer immunotherapy. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1284, n. 1, p. 1–5, May 2013.

35 MALLIDI, S. *et al.* Beyond the barriers of light penetration: strategies, perspectives and possibilities for photodynamic therapy. **Theranostics**, v. 6, n. 13, p. 2458, 2016.

36 DURANTE, M.; REPPINGEN, N.; HELD, K. D. Immunologically augmented cancer treatment using modern radiotherapy. **Trends in Molecular Medicine**, v. 19, n. 9, p. 565–582, Sept. 2013.

37 DUAN, X.; CHAN, C.; LIN, W. Nanoparticle-mediated immunogenic cell death enables and potentiates cancer immunotherapy. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 58, n. 3, p. 670–680, Jan. 2019.

38 FAHRADYAN, A. *et al.* Updates on the management of non-melanoma skin cancer (NMSC). **Healthcare**, v. 5, n. 4, p. 82, Nov. 2017.

39 MAYO CLINIC. **Melanoma**: symptoms and causes. Disponível em: <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/melanoma/symptoms-causes/syc-20374884>. Acesso em: 16 nov. 2023.

40 HAMBLIN, M. R. *et al.* Melanoma resistance to photodynamic therapy: new insights. **Biological Chemistry**, v. 394, n. 2, p. 239–250, Feb. 2013.

41 GIULIANO, A. E.; COCHRAN, A. J.; MORTON, D. L. Melanoma from unknown primary site and amelanotic melanoma. **Seminars in Oncology**, v. 9, n. 4, p. 442–447, Dec. 1982.

42 RASTRELLI, M. *et al.* Melanoma m1: diagnosis and therapy. **In Vivo**, v. 28, n. 3, p. 273-285, 2014.

43 PANASITI, V. *et al.* Metastatic volume: an old oncologic concept and a new prognostic factor for stage IV melanoma patients. **Dermatology**, v. 227, n. 1, p. 55–61, Oct. 2013.

44 BALCH, C. M. *et al.* Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. **Journal of Clinical Oncology**, v. 27, n. 36, p. 6199, Dec. 2009.

45 ASCIERTO, P. A. *et al.* The role of BRAF V600 mutation in melanoma. **Journal of Translational Medicine**, v. 10, n. 1, p. 1–9, May 2012.

46 DAVIES, H. *et al.* Mutations of the BRAF gene in human cancer. **Nature**, v. 417, n. 6892, p. 949–954, June 2002.

47 CURTIN, J. A. *et al.* Distinct sets of genetic alterations in melanoma. **New England Journal of Medicine**, v. 353, n. 20, p. 2135–2147, Nov. 2005.

48 JAKOB, J. A. *et al.* NRAS mutation status is an independent prognostic factor in metastatic melanoma. **Cancer**, v. 118, n. 16, p. 4014–4023, Aug. 2012.

49 FERREIRA, M. G. *et al.* Opções de tratamento não cirúrgico do melanoma e suas indicações. **International Journal of Health Management Review**, v. 7, n. 1, Jan. 2021.

50 LEONETTI, A. *et al.* BRAF in non-small cell lung cancer (NSCLC): pickaxing another brick in the wall. **Cancer Treatment Reviews**, v. 66, p. 82–94, May 2018.

51 YAN, N. *et al.* BRAF-mutated non-small cell lung cancer: current treatment status and future perspective. **Frontiers in Oncology**, v. 12, p. 863043, Mar. 2022.

52 DELANEY, G. *et al.* The role of radiotherapy in cancer treatment. **Cancer**, v. 104, n. 6, p. 1129–1137, Sept. 2005.

53 BASKAR, R. *et al.* Cancer and radiation therapy: current advances and future directions. **International Journal of Medical Sciences**, v. 9, n. 3, p. 193, Feb. 2012.

54 SALGADO, N. A Radioterapia no tratamento oncológico: prática clínica e sensibilidade cultural. **Interações: sociedade e as novas modernidades**, v. 12, n. 22, Nov. 2013.

55 KHAN, F. M. **The physics of radiation therapy**. Minnesota: Lippincott Williams & Wilkins, 2003.

56 ZIMMERMAN, M. A. *et al.* Cell death–stimulated cell proliferation: a tissue regeneration mechanism usurped by tumors during radiotherapy. **Seminars in Radiation Oncology**, v. 23, n. 4, p. 288–295, Oct. 2013.

57 SINCLAIR, W. K.; MORTON, R. A. X-ray sensitivity during the cell generation cycle of cultured Chinese hamster cells. **Radiation Research**, v. 29, n. 3, p. 450–474, 1966.

58 MEHTA, S. R. *et al.* Radiotherapy: basic concepts and recent advances. **Medical Journal Armed Forces India**, v. 66, n. 2, p. 158–162, 1 abr. 2010.

59 CÓRDOBA, E. E.; LACUNZA, E.; GÜERCI, A. M. Clinical factors affecting the determination of radiotherapy-induced skin toxicity in breast cancer. **Radiation Oncology Journal**, v. 39, n. 4, p. 315, 2021.

60 SPIKES, J. D. The historical development of ideas on applications of photosensitized reactions in the health sciences. *In*: BENSASSON, R. V. *et al.* (ed.). **Primary photo-processes in biology and medicine**. Boston: Springer, 1985. p. 209–227.

61 DOLMANS, D. E. J. G. J.; FUKUMURA, D.; JAIN, R. K. Photodynamic therapy for cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 5, p. 380–387, May 2003.

62 ZHANG, L. J. *et al.* Photosensitizing effectiveness of a novel chlorin-based photosensitizer for photodynamic therapy in vitro and in vivo. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 140, n. 9, p. 1527–1536, 2014.

63 ALLISON, R. R.; MOGHISSI, K. Photodynamic therapy (PDT): PDT mechanisms. **Clinical Endoscopy**, v. 46, n. 1, p. 24–29, 2013.

64 TOMANKOVA, K. *et al.* Production of reactive oxygen species after photodynamic therapy by porphyrin sensitizers. **General Physiology and Biophysics**, v. 27, n. 2, p. 101–105, 2008.

65 MOAN, J.; BERG, K. The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen. **Photochemistry and Photobiology**, v. 53, n. 4, p. 549–553, 1 Apr. 1991.

66 FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61–68, mar. 1997.

67 NAGATA, J. Y. *et al.* Antibacterial photodynamic therapy for dental caries: Evaluation of the photosensitizers used and light source properties. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 9, n. 2, p. 122–131, 1 June 2012.

68 SILVA, A. P. *et al.* Fast elimination of onychomycosis by hematoporphyrin derivative-photodynamic therapy. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 10, n. 3, p. 328–330, 1 Sept. 2013.

69 SIMMONS, B. J. *et al.* An update on photodynamic therapies in the treatment of onychomycosis. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 29, n. 7, p. 1275–1279, July 2015.

70 DIAS, L. D.; BLANCO, K. C.; BAGNATO, V. S. COVID-19: beyond the virus. the use of photodynamic therapy for the treatment of infections in the respiratory tract. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 31, p. 101804, Sept. 2020.

71 VINAGREIRO, C. S. *et al.* Antibacterial photodynamic inactivation of antibiotic-resistant bacteria and biofilms with nanomolar photosensitizer concentrations. **ACS Infectious Diseases**, v. 6, n. 6, p. 1517–1526, June 2020.

72 DIAS, L. D. *et al.* Curcumin as a photosensitizer: From molecular structure to recent advances in antimicrobial photodynamic therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology C: photochemistry reviews**, v. 45, p. 100384, Dec. 2020.

73 BRASIL. Ministério da Saúde. Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no Sistema Único de Saúde – CONITEC. **Usuários do SUS com câncer de pele basocelular serão tratados com inovação 100% nacional.** Disponível em: <https://www.gov.br/conitec/pt-br/assuntos/noticias/2023/julho/usuarios-do-sus-com-cancer-de-pele-basocelular-serao-tratados-com-inovacao-100-nacional>. Acesso em: 11 nov. 2023.

74 WANG, Z.; DILLON, J.; GAILLARD, E. R. Antioxidant properties of melanin in retinal pigment epithelial cells. **Photochemistry and Photobiology**, v. 82, n. 2, p. 474–479, Mar. 2006.

75 RAMACHANDRAN, C. *et al.* Doxorubicin resistance in human melanoma cells: MDR-1 and glutathione S-transferase π gene expression. **Biochemical Pharmacology**, v. 45, n. 3, p. 743–751, Feb. 1993.

76 LARIN, K. V. *et al.* Optical clearing for OCT image enhancement and in-depth monitoring of molecular diffusion. **IEEE Journal on Selected Topics in Quantum Electronics**, v. 18, n. 3, p. 1244–1259, 2012.

77 MARTINELLI, L. P. *et al.* Optical clearing agent increases effectiveness of photodynamic therapy in a mouse model of cutaneous melanoma: an analysis by Raman microspectroscopy. **Biomedical Optics Express**, v. 11, n. 11, p. 6516, Nov. 2020.

78 KULBACKA, J. *et al.* Investigating the photodynamic efficacy of chlorin e6 by millisecond pulses in metastatic melanoma cells. **Bioelectrochemistry**, v. 138, p. 107728, 2021.

79 BAZYLIŃSKA, Urszula *et al.* Polymer-free cubosomes for simultaneous bioimaging and photodynamic action of photosensitizers in melanoma skin cancer cells. **Journal of colloid and interface science**, v. 522, p. 163-173, 2018.

80 SHELEG, S. V. *et al.* Photodynamic therapy with chlorin e6 for skin metastases of melanoma. **Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine**, v. 20, n. 1, p. 21–26, Feb. 2004.

81 BALDEA, I.; FILIP, A. G. Photodynamic therapy in melanoma - an update. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 63, n. 2, p. 109–118, 2012.

82 UZDENSKY, A. B. *et al.* Photodynamic effect of novel chlorin e6 derivatives on a single nerve cell. **Life Sciences**, v. 74, n. 17, p. 2185–2197, Mar. 2004.

83 STRANADKO, E. *et al.* First experience of photodithazine clinical application for photodynamic therapy of malignant tumors. **Proceedings of SPIE**, v. 3909, n. 29, p. 138–144, Mar. 2000.

84 CORREA, J. C. *et al.* Previous illumination of a water soluble chlorine photosensitizer increases its cytotoxicity. **Laser Physics**, v. 22, n. 9, p. 1387–1394, Sept. 2012.

85 TURUBANOVA, V. D. *et al.* Immunogenic cell death induced by a new photodynamic therapy based on photosens and photodithazine. **Journal for ImmunoTherapy of Cancer**, v. 7, n. 1, p. 1–13, Dec. 2019.

86 SOUZA, B. M. N. *et al.* Efficiency of Antimicrobial Photodynamic Therapy with Photodithazine® on MSSA and MRSA Strains. **Antibiotics**, v. 10, n. 7, p. 869, 17 July. 2021.

87 GOLSTEIN, P.; KROEMER, G. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 32, n. 1, p. 37–43, Jan. 2007.

88 KERR, J. F. R.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. **British Journal of Cancer**, v. 26, n. 4, p. 239–257, 1972.

89 BEYAERT, R. *et al.* Signaling to gene activation and cell death by tumor necrosis factor receptors and fas. **International Review of Cytology**, v. 214, p. 225–272, Jan. 2002.

90 SAELENS, X. *et al.* Toxic proteins released from mitochondria in cell death. **Oncogene**, v. 23, n. 16, p. 2861–2874, Apr. 2004.

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

92 BUYTAERT, E.; DEWAELE, M.; AGOSTINIS, P. Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)** - reviews on cancer, v. 1776, n. 1, p. 86–107, Sept. 2007.

93 SIA, J. *et al.* Molecular mechanisms of radiation-induced cancer cell death: a primer. **Frontiers in cell and developmental biology**, v. 8, p. 41, 2020.

94 MONTAZERABADI, A. R. *et al.* The effects of combined treatment with ionizing radiation and indocyanine green-mediated photodynamic therapy on breast cancer cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: biology**, v. 109, p. 42–49, Apr. 2012.

95 VISWANATH, D.; WON, Y. Y. Combining radiotherapy (RT) and photodynamic therapy (PDT): clinical studies on conventional RT-PDT approaches and novel nanoparticle-based RT-PDT approaches under preclinical evaluation. **ACS Biomaterials Science and Engineering**, v. 8, n. 9, p. 3644–3658, Sept. 2022.

96 SKVORTSOVA, I. *et al.* Radiation resistance: cancer stem cells (CSCs) and their enigmatic pro-survival signaling. **Seminars in Cancer Biology**, v. 35, p. 39-44, Dec. 2015. DOI: 10.1016/j.semcancer.2015.09.009

97 OLIVEIRA, D. S. de. Interação medicamentosa: parte II. **Caderno de Farmácia ds UFRGS**, v. 2, n. 2, p. 97–110, 1986.

98 ANDRADE, C. T. **Evaluation of vascular and tissue effects in an animal model of skin by applying photodynamic therapy combined with radiotherapy**. 2016. 135 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

99 DE FARIA, C. M.G. *et al.* Tumor radiosensitization by photobiomodulation. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: biology**, v. 225, p. 112349, 2021.

100 SAZGARNIA, A. *et al.* In vitro survival of MCF-7 breast cancer cells following combined treatment with ionizing radiation and mitoxantrone-mediated photodynamic therapy. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 10, n. 1, p. 72–78, Feb. 2013.

101 GHOODARZI, R. *et al.* Assessing of integration of ionizing radiation with radachlorin-PDT on MCF-7 breast cancer cell treatment. **Lasers in Medical Science**, v. 31, n. 2, p. 213–219, Feb. 2016.

102 XU, J.; GAO, J.; WEI, Q. Combination of photodynamic therapy with radiotherapy for cancer treatment. **Journal of Nanomaterials**, v. 2016, n. 10, p. 1-7, 2016. DOI:10.1155/2016/8507924.

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

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

105 DANESHVAR, F. *et al.* Combined X-ray radiotherapy and laser photothermal therapy of melanoma cancer cells using dual-sensitization of platinum nanoparticles. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: biology**, v. 203, p. 111737, 1 Jan. 2020.

106 RISS, T. L.; MORAVEC, R. A. Use of multiple assay endpoints to investigate the effects of incubation time, dose of toxin, and plating density in cell-based cytotoxicity assays. **ASSAY and Drug Development Technologies**, v. 2, n. 1, p. 51–62, July 2004.

107 WEN, L. Y. *et al.* Therapeutic effects of systemic photodynamic therapy in a leukemia animal model using A20 cells. **Lasers in Medical Science**, v. 27, n. 2, p. 445–452, Mar. 2012.

108 ONO, B. A. *et al.* Subcellular localization and photodynamic activity of photodithazine (glucosamine salt of chlorin e6) in murine melanoma B16-F10: an in vitro and in vivo study. **Proceedings of the SPIE**, v. 10476, p. 138–147, Feb. 2018. DOI: 10.1117/12.2283241.

109 LUKSIENE, Z.; KALVELYTE, A.; SUPINO, R. On the combination of photodynamic therapy with ionizing radiation. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: biology**, v. 52, n. 1–3, p. 35–42, Oct. 1999.

110 BERG, K. *et al.* Combined treatment of ionizing radiation and photosensitization by 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX. **Radiation Research**, v. 142, n. 3, p. 340–346, June. 1995.

111 WERTHMÖLLER, N. *et al.* Combination of ionising radiation with hyperthermia increases the immunogenic potential of B16-F10 melanoma cells in vitro and in vivo. **International Journal of Hyperthermia**, v. 32, n. 1, p. 23–30, 2 Jan. 2016.

112 LONATI, L. *et al.* Radiation-induced cell cycle perturbations: a computational tool validated with flow-cytometry data. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1–14, 13 Jan. 2021.

113 MOLOUDI, K.; ABRAHAMSE, H.; GEORGE, B. P. Photodynamic therapy induced cell cycle arrest and cancer cell synchronization: review. **Frontiers in Oncology**, v. 13, 2023. DOI: 10.3389/fonc.2023.1225694.

114 WYLD, L. *et al.* Cell cycle phase influences tumour cell sensitivity to aminolaevulinic acid-induced photodynamic therapy in vitro. **British Journal of Cancer**, v. 78, n. 1, p. 50–55, 1998.

115 SANO, M. *et al.* Cell-cycle-dependent efficacy of photodynamic therapy with ATX-S10(Na). **Lasers in Medical Science**, v. 20, n. 1, p. 1–5, 24 July 2005.

116 SHAO, J. *et al.* Inhibition of human hepatocellular carcinoma HepG2 by phthalocyanine photosensitiser PHOTOCYANINE: ROS production, apoptosis, cell cycle arrest. **European Journal of Cancer**, v. 48, n. 13, p. 2086–2096, Sept. 2012.

117 EKBERG, J.; PERSSON, J. L. Post-translational modification of cyclin A1 is associated with staurosporine and TNF α induced apoptosis in leukemic cells. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 320, n. 1–2, p. 115–124, 12 Jan. 2009.

118 HIROMURA, K. *et al.* The subcellular localization of cyclin dependent kinase 2 determines the fate of mesangial cells: role in apoptosis and proliferation. **Oncogene**, v. 21, n. 11, p. 1750–1758, 8 Mar. 2002.

119 NAN LI *et al.* **Effect of cell cycle phase on the sensitivity of SAS cells to sonodynamic therapy using low intensity ultrasound combined with 5 aminolevulinic acid in vitro.** Disponível em: <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/mmr.2015.3747#b26-mmr-12-02-3177>. Acesso em: 16 jan. 2024.