

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

CURSO BIOTECNOLOGIA

Uso da Terapia Laser Fotodinâmica Associada ao Azul de Metileno (PDT-MB) em Células Tumorais de Próstata Humanas (PC3).

Laura Calazans de Melo Gomes

Monografia apresentada à  
Coordenação do Curso de  
Biotecnologia, da Universidade  
Federal de Uberlândia, para  
obtenção do grau de Bacharel em  
Biotecnologia.

Uberlândia – MG

Novembro – 2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

CURSO BIOTECNOLOGIA

Uso da Terapia Laser Fotodinâmica Associada ao Azul de Metileno (PDT-MB) em Células Tumerais de Próstata Humanas (PC3).

Laura Calazans de Melo Gomes

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Daniele Lisboa Ribeiro

Monografia apresentada à  
Coordenação do Curso de  
Biotecnologia, da Universidade  
Federal de Uberlândia, para  
obtenção do grau de Bacharel em  
Biotecnologia.

Uberlândia – MG

Novembro – 2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

CURSO BIOTECNOLOGIA

Uso da Terapia Laser Fotodinâmica Associada ao Azul de Metileno (PDT-MB) em Células  
Tumorais de Próstata Humanas (PC3).

Laura Calazans de Melo Gomes

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Daniele Lisboa Ribeiro

Instituto de Ciências Biomédicas

Homologado pela coordenação do Curso  
de Biotecnologia em / /

Prof. Dr. Nilson Nicolau Júnior

Uberlândia – MG

Novembro – 2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

CURSO BIOTECNOLOGIA

Uso da Terapia Laser Fotodinâmica Associada ao Azul de Metileno (PDT-MB) em Células  
Tumorais de Próstata Humanas (PC3).

Laura Calazans de Melo Gomes

Aprovado pela Banca Examinadora em: 04/11/2021 Nota: 100



Prof. Dra. Daniele Lisboa Ribeiro

Uberlândia, 04 de dezembro de 2021

## Agradecimentos

Primeiramente, gostaria de agradecer aos meus pais, Stella Maris e José Wilson, por todo apoio e incentivo aos estudos e em especial durante a graduação de Biotecnologia na Universidade Federal de Uberlândia. Com certeza, caminhar até aqui só foi possível graças à vocês.

Agradeço também aos meus demais familiares e amigos que estiveram presentes durante esses cinco anos, tornando a caminhada mais leve.

A minha orientadora Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Daniele Lisboa Ribeiro, que teve papel essencial para o meu crescimento acadêmico, pessoal e profissional. Obrigada por acender a paixão pela ciência e pesquisa, obrigada pelos ensinamentos, conselhos e todo o acolhimento.

Agradeço imensamente a Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Flávia de Paoli, a Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Renata Zanon e suas alunas Nathalia e Táríka, ao Prof. Dr. Marcelo José Barbosa Silva, as minhas companheiras de laboratório Isabella e Amanda, por todo auxílio e incentivo durante a realização desta pesquisa.

A Universidade Federal de Uberlândia por me acolher e ceder espaço para realização dos meus estudos e a todo o corpo docente do curso de Biotecnologia que me permitiu vivenciar a vida acadêmica.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) por financiar este projeto.

Aos membros da Banca de Avaliação, Nilson Nicolau Júnior, Guilherme Henrique Tamarindo e Tatiana Carla Tomiosso, pela disponibilidade e compromisso.

Por fim, agradeço a Deus por me dar forças e me permitir chegar até aqui.

## RESUMO

O câncer prostático é uma das principais desordens do sistema genital masculino após os 50 anos. Dado isso, pesquisadores tem buscado tratamentos que tenham eficácia, poucos efeitos colaterais e baixo custo. Este trabalho avaliou a terapia fotodinâmica (PDT) associada ao azul de metileno (MB) em células tumorais prostáticas humanas (PC3). As células foram cultivadas em meio DMEM (controle) e submetidas a três diferentes tratamentos: azul de metileno (MB, 25 $\mu$ M, 30min), laser nas condições de 660nm/ 100mW/ 100J/cm<sup>2</sup>, 28s (laser); e MB seguido de aplicação de laser (PDT). Após 24 hrs, realizou-se MTT; migração; caspase; imunofluorescência para BCL-2 e LC3; citometria de fluxo e coloração laranja de acridina. O PDT diminuiu a viabilidade e migração celular, mas não alterou a expressão de caspase-3 e BCL-2, sugerindo que não há o aumento significativo da morte apoptótica, que por sua vez, é um dos tipos de morte mais citado na terapia PDT. Além disso, a citometria de fluxo demonstrou que não há diferença quanto ao tipo de morte entre os grupos. Ainda, o PDT aumentou o conteúdo de vacúolos autofágicos nas células tumorais. Tais dados revelam que o PDT é capaz de reduzir a viabilidade das células PC3 e que o principal mecanismo de morte não é a apoptose clássica.

**Palavras-chave:** terapia fotodinâmica; azul de metileno; câncer prostático.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1 Câncer prostático .....	1
1.2 Uso de lasers de baixa potência e a terapia fotodinâmica .....	2
1.3 PDT: mecanismos celulares e uso em células tumorais .....	6
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	8
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	9
3.1 Cultura de células epiteliais prostáticas .....	9
3.2 Tratamento das culturas de PC3 .....	9
3.3 Ensaio de proliferação celular por MTT .....	10
3.4 Ensaio de migração e invasão celular .....	10
3.5 Ensaio de Imunofluorescência para Bcl-2 e LC3 .....	11
3.6 Determinação de apoptose por meio da ativação de caspase-3 ativa. ....	12
3.7 Citometria de fluxo para avaliação de apoptose e necrose. ....	12
3.8 Quantificação de vesículas ácidas por coloração laranja de acridina .....	13
3.9 Análise Estatística .....	14
<b>4. RESULTADOS</b> .....	14
4.1 MTT .....	14
4.2 Migração celular .....	15
4.3 Imunofluorescência para Bcl-2 .....	18
4.4 Ensaio de apoptose .....	19

4.5 Citometria de fluxo para avaliação de necrose e apoptose .....	20
4.6 Coloração laranja de acridina para marcação de vacúolos autofágicos.....	22
4.7 Imunocitoquímica para LC3 .....	24
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>26</b>
<b>6. LIMITAÇÕES.....</b>	<b>34</b>
<b>7. PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>	<b>34</b>
<b>8. CONCLUSÃO .....</b>	<b>35</b>
<b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>36</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>45</b>



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Diagrama de Jablonski: reações do tipo I e tipo II na terapia fotodinâmica.....	5
<b>Figura 2:</b> Representação gráfica do ensaio de MTT.....	15
<b>Figura 3:</b> Representação gráfica do ensaio de migração.....	16
<b>Figura 4:</b> Imagens capturadas do ensaio de migração.....	17
<b>Figura 5:</b> Representação gráfica do ensaio de imunofluorescência para Bcl-2.....	18
<b>Figura 6:</b> Imagens representativas do ensaio de imunofluorescência para Bcl-2.....	19
<b>Figura 7:</b> Representação gráfica do ensaio de apoptose.....	20
<b>Figura 8:</b> Representação gráfica dos valores obtidos na citometria de fluxo.....	21
<b>Figura 9:</b> Imagens representativas da citometria de fluxo.....	22
<b>Figura 10:</b> Representação gráfica do ensaio coloração laranja de acridina.....	23
<b>Figura 11:</b> Imagens representativas do ensaio de coloração laranja de acridina.....	24
<b>Figura 12:</b> Representação gráfica do ensaio imunofluorescência para LC3. ....	25
<b>Figura 13:</b> Imagens representativas da imunomarcação para LC. ....	26

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>AO</b>	Laranja de acridina / <i>Acridine Orange</i>
<b>BCL-2</b>	Linfoma de células B2 / <i>B-cell lymphoma 2</i>
<b>CLO</b>	Cloroquina
<b>EROs</b>	Espécies reativas de oxigênio
<b>FS</b>	Fotossensibilizador
<b>LC3</b>	Cadeia leve 3 da proteína 1 associada a microtúbulos
<b>MB</b>	Azul de metileno / <i>Methylene Blue</i>
<b>PC3</b>	Células epiteliais tumorais de próstata humana
<b>PDT</b>	Terapia fotodinâmica

# 1.INTRODUÇÃO

## 1.1 Câncer prostático

No Brasil, a expectativa de vida da população é em média 76,3 anos, de acordo com dados do IBGE de 2018. É evidente que a tendência desta expectativa de vida seja crescente, entretanto, tem-se como consequência direta, uma maior ocorrência de doenças relacionadas ao envelhecimento. Tendo-se como foco a população masculina, as alterações na próstata são frequentes durante o envelhecimento dos indivíduos (MARCELLI; CUNNINGHAM,1999). Dado isso, tem-se estudado as alterações morfológicas, hormonais e o crescimento prostático na tentativa de compreender os mecanismos por trás da doença e no mais tardar propor soluções alternativas para prevenir a sua incidência ou propor terapias eficientes. Ainda, no Brasil o câncer prostático é o segundo mais frequente entre os homens (em primeiro, tem-se o câncer de pele não-melanoma), sendo a taxa de incidência ainda maior nos países desenvolvidos, segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA). A Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC), segundo dados presentes em sua plataforma online denominada de Observatório Global de Câncer (GCO), estima que a incidência de casos de câncer prostático aumente de 1.276.106 (2018) para 2.292.818 (2040) no futuro. Além disso, o INCA estima no Brasil que para cada ano do triênio 2020-2022 haja 65.840 novos casos de câncer prostático.

Segundo Sung e Chung (2002), o desenvolvimento do câncer e a hiperplasia prostática são os principais distúrbios observados no trato genital masculino após os 50 anos de idade. Ainda, alguns fatores podem influenciar no desenvolvimento e progresso da doença, como as inflamações crônicas, as síndromes metabólicas, o histórico familiar do indivíduo e a obesidade mórbida, além do que, a dependência a hormônios andrógenos inicialmente pode favorecer esse tipo de câncer (FIBBI et al.,2010; VIGNOZZI et al.,2014; HO et al., 2004;

LEITZMANN; ROHRMANN, 2012).

Desta forma, é possível presumir e compreender o porquê os casos de câncer, em especial, o câncer de próstata, esteja em amplo crescimento na população, tendo em vista os maus hábitos da sociedade moderna. Sendo assim, diversos estudos têm sido executados com o objetivo de criar terapias e formas de prevenção que sejam eficazes em proporcionar uma melhor qualidade de vida ao paciente, e consequentemente, aumentar sua longevidade (HAYWARD et al., 1997; HSING et al., 2002).

Os tratamentos convencionais existentes para o câncer de próstata têm sido substancialmente eficazes e estão disponíveis na clínica médica, são eles: radioterapia, quimioterapia e remoção tumoral cirúrgica. Apesar disso, a terapia a laser tem ganhado destaque, visto que, é pouco invasiva e de custo acessível no tratamento de lesões benignas, malignas e pré-malignas (BARAN et al., 2010).

### *1.2 Uso de lasers de baixa potência e a terapia fotodinâmica*

O laser (sigla em inglês para *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*), segundo Young (1998), trata-se de um dispositivo composto por um material com capacidade de emissão de luz, quando este é estimulado numa cavidade óptica composta por dois espelhos. Os seus feixes de luz se distinguem dos emitidos pelas lâmpadas convencionais por serem colimados, monocromáticos, coerentes e de alta densidade de energia. Ainda, podem ser classificados pelo modo de emissão (forma contínua ou pulsada), pelo comprimento de onda ou frequência emitida, e por sua potência podendo ser de baixa, média ou alta potência (NIEMZ, 2007).

Os lasers de baixa potência têm sido utilizados como um método terapêutico de sucesso em aplicações clínicas (REDDY, 2004). Ainda, encontra-se na bibliografia estudos acerca dos efeitos biológicos desta categoria de laser quando utilizados em cultura de células, em humanos e em animais (HUANG et al., 2011; ESLASMIAN et al., 2012). Apesar disso, ainda não está claro e compreensível a relação dose-resposta e os mecanismos por trás dos resultados obtidos quando há administração de laser em dose terapêutica.

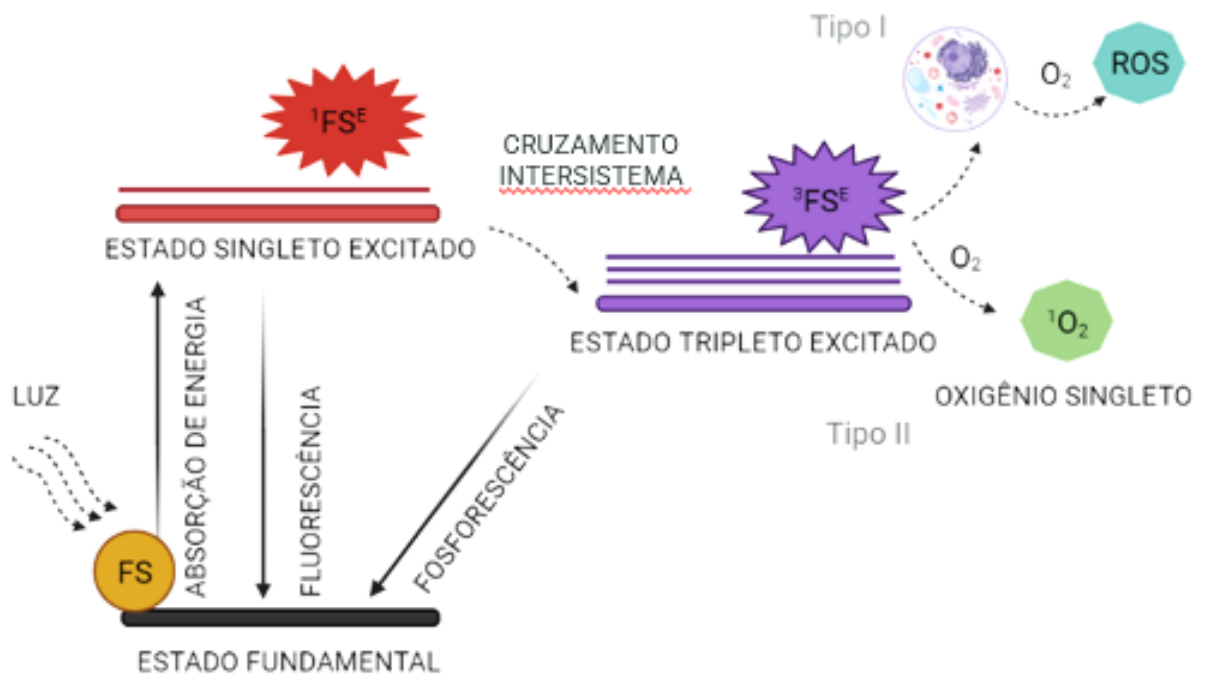
Os resultados clínicos positivos observados na terapia laser, podem ser atribuídos a uma série de eventos de nível molecular e celular, em que o comprimento de onda, a intensidade, a dose, a concentração de cromóforos ativos, as propriedades ópticas do tecido tratado em questão e o estado fisiológico serão fatores determinantes da resposta fotoquímica, fotofísica e/ou fotobiológica a ser obtida (KARU, 1998; 2003). A utilização de lasers também se estende a terapias alternativas de aceleração na cicatrização/regeneração de feridas em tecidos moles, de lesões na cavidade oral e de fraturas ósseas (AMARRILAS-ESCOBAR et al., 2010; KAZEM, 2010; ANTUNES et al., 2007). Entretanto, os seus efeitos biológicos e fisiológicos carecem de maiores investigações para que suas aplicações terapêuticas sejam mais seguras e eficazes para a população. As informações a respeito do efeito do laser em sistemas biológicos ainda são inconclusivas, dado que, a maioria dos resultados são relatos de casos clínicos e/ou observações de pouco embasamento teórico. Além do mais, ainda nos estudos de cunho científico, a grande variação de protocolos utilizados, as diversas condições de irradiação empregadas e a divergência quanto ao comprimento de onda, inviabiliza a comparação e conclusão dos resultados.

Apenas no século passado, a Terapia Fotodinâmica (em inglês, *Photodynamic Therapy* – PDT) foi desenvolvida através da observação de que a luz associada a determinados

compostos químicos poderia levar a morte celular, apesar da utilização da luz como um método terapêutico já ser conhecido e estabelecido há milhares de anos (DOLMANS et al., 2003). Esta terapia tem como princípio dois componentes não tóxicos, que quando associados, produzem efeitos celulares e teciduais por um processo que depende de oxigênio. Um desses componentes é o fotossensibilizador (FS), que consiste em uma molécula capaz de transferir energia da luz (fóton) para o oxigênio molecular, produzindo então as espécies reativas de oxigênio, também conhecidas como EROs. O outro componente, é a administração de luz em um comprimento de onda específico para ativação do fotossensibilizador, citado anteriormente. Quando ocorre a absorção da luz e a respectiva ativação do fotossensibilizador, observa-se respostas biológicas em locais e tecidos específicos, que são determinados pela presença do fotossensibilizador e pela região irradiada (DOLMANS et al., 2003).

Quando o fotossensibilizador é ativado, ele passa para um estado denominado de excitação, podendo levar à dois tipos de reações intracelulares (Figura 1). A reação do tipo I, consiste no fotossensibilizador reagir com um substrato (membrana celular, entre outras moléculas), transferindo um átomo de hidrogênio, formando radicais. Tais radicais interagem com o oxigênio gerando produtos oxigenados. De forma alternativa, na reação do tipo II, o fotossensibilizador pode transferir energia de forma direta ao oxigênio, formando o oxigênio singleto, um potente ERO (HENDERSON; DOUGHERTY, 1992). É importante ressaltar que tais reações acontecem concomitantemente, e as proporções delas dependerão do tipo de fotossensibilizador, bem como da concentração do substrato, oxigênio e da afinidade de ligação do fotossensibilizador ao substrato. Ademais, as EROs possuem alta reatividade e curta meia vida e por isso, apenas células próximas da localização do fotossensibilizador, onde há a efetiva produção de EROs, serão diretamente afetadas pelo PDT (MOAN; BERG, 1991). Os danos gerados pelo PDT e sua toxicidade dependerão da localização do FS (seja

intra ou extracelular), sua concentração, dose de irradiação, disponibilidade de oxigênio e intervalo de tempo entre a administração do fotossensibilizador e exposição ao laser (DOLMANS et al.,2003).



Created in BioRender.com 

**Figura 1:** Diagrama de Jablonski: reações do tipo I e tipo II na terapia fotodinâmica. O FS quando ativado/excitado após absorção de energia proveniente da luz, alcança o estado singleto excitado, que por sua vez, sofre cruzamento intersistema (inversão do spin do elétron) alcançando o estado tripleto excitado, resultando nas reações do tipo I e do tipo II. FS: fotossensibilizador;  $^1\text{FS}^{\text{E}}$ : estado singleto;  $^3\text{FS}^{\text{E}}$ : estado tripleto;  $^1\text{O}_2$ : oxigênio singleto;  $\text{O}_2$ : oxigênio molecular; ROS: espécies reativas de oxigênio. Adaptado de CALIXTO et al., (2016). Criado em BioRender.com.

Há várias classes de fotossensibilizadores que podem ser utilizadas na PDT, por exemplo, as porfirinas consideradas a primeira geração de fotossensibilizadores e as mais empregadas. São eficientes, porém onerosas, de baixa absorção de luz e de fotossensibilização cutânea, além de apresentar efeitos colaterais quando utilizados *in vivo* (O'CONNOR et al.,

2009). Por isso, a procura por novos fotossensibilizadores tem sido empregada, a fim de proporcionar uma PDT acessível, pouco invasiva e eficiente. O fármaco azul de metileno (methylene blue – MB) é um fotossensibilizador da classe fenotiazínicos que absorve luz em 660 nm. Além disso, é um corante aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) e pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e tem sido empregado como corante *in vivo* de metaplasia intestinal e para guiar biópsias de tecido como esôfago e estômago (ORMOND; FREEMAN, 2013). É de custo acessível, presente na rotina de hospitais e após seu uso, é bioquimicamente metabolizado para uma forma incolor, tornando mínima ou inexistente uma fotossensibilidade sistêmica que possa causar efeitos em órgãos não-alvo. Tais características evidenciam o seu grande potencial como agente terapêutico considerando outros fotossensibilizadores.

Cabe destacar que o FS pode ser administrado no paciente via intravenosa, intraperitoneal ou de forma tópica nas células de interesse (VAN DONGEN GA et al., 2004; MOAN; PENG, 2003). E por isso, é grandemente empregado para o tratamento de lesões bucais, em práticas odontológicas e atualmente em pesquisas com células tumorais (TORATANI et al., 2016; LIM et al., 2013; YAMAUCHI et al., 2015; BERNDT-PAETZ et al., 2017).

### *1.3 PDT: mecanismos celulares e uso em células tumorais*

A pesquisa científica tem se voltado para o estudo da terapia fotodinâmica em células tumorais, devido ao seu potencial como tratamento alternativo de alta seletividade, baixa toxicidade e com resultados positivos de substancial redução de tumores (ORTH et al., 2000).



Alguns benefícios gerados pela PDT são: morte de células tumorais diretamente pelas EROs; ativação da resposta imune contra o tumor (gerando uma “memória” contra o aparecimento de novos tumores) e a indução de danos aos vasos presentes no tumor (infarto tumoral). Além disso, esses três mecanismos podem influenciar um ao outro, e a associação de todos eles é necessária para controlar o crescimento tumoral a longo prazo (DOUGHERTY et al., 1998; HASAN et al., 2003).

A morte de células tumorais pelo PDT, na maioria das vezes, acontece tanto por apoptose quanto por necrose. O mecanismo de apoptose se dá pelo acúmulo de fotossensibilizadores localizados na mitocôndria, proporcionando um dano imediato aos componentes mitocondriais (proteínas Bcl-2, Bcl-xL e outras proteínas presentes na cascata de apoptose), levando a indução de caspases iniciadoras (HENDRICKX et al., 2003). Fotossensibilizadores que se acumulam nos lisossomos e/ou nas mitocôndrias irradiadas podem também induzir a ativação de caspases mediada por proteína Bax (KUSHIBIKI et al., 2013). Enquanto, no processo de necrose há um dano irreversível provocado pelas EROs nas membranas e organelas intracelulares (mitocôndria, lisossomos, complexo de Golgi e retículo endoplasmático) (KUSHIBIKI et al., 2013).

O PDT apresenta inúmeras vantagens sendo a sua principal, a possibilidade de atuação em qualquer espécie de tumor. Além disso, é uma terapia que pode ser repetida inúmeras vezes dado que, não possui efeitos tóxicos que se acumulam; pode atuar como adjuvante intraoperatório (auxiliando na eliminação de células tumorais residuais, evitando metástases); em associação com métodos convencionais (quimioterapia e radioterapia) pode potencializar a prevenção de metástase; e pode ser utilizado em pacientes de terceira idade e pacientes inaptos a cirurgia (VAN HILLEGERSBERG et al., 1995; HADDAD et al., 1999; TARDIVO

et al., 2004).

Em relação ao câncer de próstata, há poucos estudos na literatura avaliando a utilização de PDT em células *in vitro* e ainda menos estudos *in vivo*. Resultados positivos do uso de PDT tem sido descritos em células tumorais, especificamente em células do tipo PC3 e LNCaP (FAN et al.,2014; INAI, M. et al.,2015; KIM; GAITAS, 2015; HAYASHIDA et al., 2016). Apesar desses estudos revelarem sucesso quanto ao uso de PDT, houve a utilização de fotossensibilizadores diferentes ou em conjunto a outras substâncias químicas ou térmicas a fim de aumentar a eficácia, conseqüentemente, aumentando o custo do tratamento. Ainda, em nenhum dos estudos envolvendo PDT houve a investigação quanto ao uso de MB como um possível fotossensibilizador de células tumorais de próstata, dado suas inúmeras vantagens tanto biológicas quanto econômicas já descritas anteriormente.

É importante destacar que a bibliografia sobre o PDT já é conhecida de longa data, principalmente sobre as suas aplicações biológicas. Entretanto, no que diz respeito ao uso da terapia PDT no câncer o conhecimento ainda é incipiente em comparação a outras terapias existentes. Considerando o uso do MB, a bibliografia fica ainda mais escassa. É possível encontrar poucos trabalhos, todos atuais, notando-se uma lacuna de trabalhos entre os primeiros conhecimentos do PDT e o avanço nas pesquisas envolvendo a terapia PDT-MB nos últimos 4 anos.

## **2. OBJETIVOS**

De modo geral, o presente trabalho visou avaliar o efeito do uso da terapia laser

associada com o fotossensibilizador azul de metileno em células epiteliais tumorais de próstata humana (PC3), negativas para o receptor androgênico negativo (independentes de andrógeno, provenientes de câncer metastático, representando um tipo agressivo de câncer).

Ainda, de modo específico, tal projeto buscou:

- Mensurar taxa de morte celular após o uso de terapia laser associada com MB em PC3;
- Avaliar se a terapia PDT-MB tem influência acerca da proliferação e viabilidade celular em PC3;
- Estudar um possível efeito redutor na migração de células PC3 após terapia PDT-MB.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Cultura de células epiteliais prostáticas**

Utilizou-se células epiteliais tumorais (PC3) de próstata humana nos tratamentos descritos abaixo. Tais células foram cultivadas em meio DMEM suplementado com soro fetal bovino (FBS) 10% e penicilina/estreptomicina 1%, e foram mantidas sob temperatura de 37°C e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> em incubadora.

#### **3.2 Tratamento das culturas de PC3**

As culturas celulares de PC3 foram tratadas com azul de metileno (MB) 25 µm (concentração determinada em estudos prévios) diluído em DMEM por 30 min a 37°C. Após esse período, foram lavadas com PBS e acrescidas de meio DMEM suplementado (**grupo MB**). Parte dessas células foram tratadas com terapia laser (**grupo PDT**), imediatamente. Outra porção de

células cultivadas recebeu apenas a aplicação da luz laser na ausência do fotossensibilizador MB (**grupo LASER**). Por último, o **grupo controle** recebeu apenas meio DMEM suplementado pelo mesmo período experimental. A aplicação da luz laser nos devidos grupos foi realizada nas condições de 660 nm/ 100 mW/ 100J/cm<sup>2</sup> por 28 segundos, utilizando-se uma ponteira para aplicação. As células foram avaliadas 24hrs após os diferentes tratamentos.

### **3.3 Ensaio de proliferação celular por MTT**

A viabilidade das células PC3 foi avaliada após os devidos tratamentos através do kit MTT based cell titer 96 Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (MTT G4000, Promega, Madison, WI) que contém o composto brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl) -2,5-difenil tetrazolium] - MTT. Em síntese, as células foram cultivadas em placas de 96 poços de fundo chato em uma concentração de 15x10<sup>3</sup>/por poço. Após o período de 24hrs de tratamento, as células foram tratadas com MTT. A intensidade do composto formazan, produto proveniente da redução do MTT após sua reação com mitocôndrias ativas das células vivas, foi quantificada pela absorbância em comprimento de onda de 570 nm. A absorbância em questão é diretamente proporcional ao número de células vivas presentes na cultura. Foram realizados 3 repetições do experimento, contendo leituras em triplicatas das amostras.

### **3.4 Ensaio de migração e invasão celular**

A capacidade de migração das células PC3 sob os devidos tratamentos foi avaliada através do ensaio cell scratch/wound healing. Portanto, as células foram cultivadas em placas de 12 poços (4 poços por grupo) e mantidas na incubadora até chegarem próximo à completa confluência. Com o auxílio de uma ponteira de 100 ul, foi realizado um risco no fundo de todos os poços, bem no centro do poço, em forma de cruz, para remover as células desse local. Em seguida, os tratamentos foram aplicados e imediatamente (0 h), 24 horas e 48 horas

após os tratamentos, os poços foram fotografados através de microscópio de luz invertido. Foram documentadas cinco regiões de um mesmo poço para cada tempo de exposição em objetiva de 10x. Posteriormente, as imagens documentadas foram analisadas pelo software TScratch em relação à área percorrida pelas células PC3 devido a movimentos migratórios.

### **3.5 Ensaio de Imunofluorescência para Bcl-2 e LC3**

O ensaio de imunocitoquímica avaliou o perfil de morte celular através da análise de expressão da proteína Bcl-2 (proteína de resistência apoptótica). Sendo assim, as células tumorais foram devidamente tratadas, como mencionado anteriormente, em placas de 6 poços contendo ao fundo uma lamínula para adesão celular. As lamínulas contendo as células tumorais foram fixadas em metanol 4%. Após fixação por 20 minutos em metanol, e a realização das devidas lavagens em tampão TBS-T, realizou-se o bloqueio de interações inespecíficas por meio de albumina 3% (em água destilada) durante o período de 1 hora. Em seguida, o anticorpo primário Rabbit anti-Bcl-2 (Cell Signaling #3498) ou Mouse Anti-LC3 (Cell Signaling #43566) (1:500 em albumina 3%) foi incubado nas culturas em período overnight, seguindo as recomendações do próprio fabricante. No próximo dia, aplicou-se o anticorpo secundário conjugado a Texas Red (Jackson Laboratory) (1:1000 em albumina 3%) e deixou-se por 1 hora incubando. Ainda, as culturas foram lavadas e receberam o marcador YO-PRO-1 ou TOPRO (Thermo Scientific) para contracoloração dos núcleos nas imunomarcações de Bcl-2 e LC3, respectivamente. Por fim, foram mantidas e montadas em lâminas através do uso de glicerol e a reação foi analisada em microscópio confocal (**LSM 510 Meta, ZEISS**). Foram analisados 10 campos microscópicos diferentes/lâmina; 3 lâminas por grupo, totalizando 30 áreas de quantificação/grupo. As células positivas foram quantificadas por meio da análise de intensidade de fluorescência (normalizada pelo número de célula em cada imagem) utilizando-se o programa ImageJ (HARTIG, 2013).

### **3.6 Determinação de apoptose por meio da ativação de caspase-3 ativa.**

A quantificação de caspase-3 ativa foi realizada através do uso do kit EnzChek® Caspase-3 Assay Kit #1 \*Z-DEVD-AMC Substrate (Thermo Scientific), seguindo as instruções do fabricante. Desta maneira, as células PC3 foram cultivadas em placas de 12 poços na densidade de  $1 \times 10^6$ /poço nos devidos tratamentos. Após 24 horas de aplicação dos tratamentos, o pellet de células obtido de cada amostra foi ressuspensionado em 50  $\mu$ l de cell lysis buffer 1x (Sigma Aldrich) e permaneceu por 30 minutos. Em seguida, o substrato Z-DEVD-AMC diluído em buffer foi adicionado em cada poço da placa e deixou-se incubar no escuro durante 30 minutos. Ao final da reação, a fluorescência foi medida (excitação/emissão  $\sim 342/441$  nm) em fluorímetro, onde a fluorescência é uma mensuração direta da quantidade de caspase ativa nas amostras. Foram realizadas 2 repetições do ensaio, com as leituras em triplicata para cada grupo.

### **3.7 Citometria de fluxo para avaliação de apoptose e necrose.**

A morte apoptótica e necrótica foi avaliada através de ensaio de citometria de fluxo das culturas. Sendo assim, utilizou-se o kit PE Annexin V Apoptosis Detection (BD Biosciences), de acordo com as instruções do fabricante. A anexina V conjugada ao fluorocromo conhecido como ficoeritrina (PE) tem alta afinidade por fosfatidilserinas que são expostas durante o processo apoptótico enquanto o marcador 7-amino-actinomicina D (7-AAD) é permeável a membrana de células danificadas ou mortas. Desta maneira, para realização do ensaio as células foram cultivadas em garrafas de  $25\text{cm}^2$  na densidade de  $1 \times 10^6$  células/por garrafa. Após 24 horas dos devidos tratamentos, as garrafas foram tripsinizadas, as células transferidas para tubos eppendorfs e centrifugadas (1500 rpm por 5 minutos). O sobrenadante foi descartado e o pellet de células foi ressuspensionado e homogeneizado em PBS. Realizou-se outra centrifugação e o pellet foi ressuspensionado em 100  $\mu$ l de tampão binding 1X Anexina.

Adicionou-se 5 uL de cada um dos marcadores (Anexina V e 7-AAD) em todos os tratamentos, excetuando-se entre os controles do próprio experimento (células marcadas só com Anexina; células marcadas só com 7-AAD e células sem marcação) e permaneceram incubadas por 15 minutos no escuro e na geladeira. A população de células marcadas somente com 7-AAD foram previamente permeabilizadas com formol 3% durante 30 minutos. Após os 15 minutos de incubação citados anteriormente, adicionou-se 400 ul de tampão binding à todas as amostras e a reação foi analisada através de citometria de fluxo para ambos os marcadores nos devidos canais de fluorescência (Anexina PE ~ 575 nm - laranja; 7-AAD ~ 650 nm- vermelho). O experimento foi feito em triplicata para cada grupo.

### **3.8 Quantificação de vesículas ácidas por coloração laranja de acridina**

O laranja de acridina (AO), é um marcador que contém característica de metacromasia, ou seja, quando se liga a diferentes moléculas têm a capacidade de fluorescer em espectros diferentes. Desta maneira, ao se ligar a componentes ácidos vesiculares fluorescerá em vermelho (640 nm) e nas demais regiões celulares fluorescerá em verde (530 nm). Assim, a quantificação de vesículas ácidas, e a quantificação da intensidade do vermelho é capaz de fornecer dados sobre a autofagia. Para a realização do ensaio, as células foram cultivadas em placas de 6 poços contendo ao fundo uma lamínula para adesão celular. Em seguida, após 24 horas do recebimento dos devidos tratamentos, as lamínulas foram lavadas com PBS e receberam o corante laranja de acridina (Sigma Aldrich, 5ug/mL por 10 minutos no escuro). Para controle positivo de autofagia, as células foram tratadas com um inibidor da autofagia, a cloroquina (5 uM diluída em DMEM) durante e após o tratamento PDT. Por fim, o corante foi retirado e as lamínulas fixadas em lâminas para serem observadas em microscópio confocal para ambos os filtros (vermelho e verde). A quantificação da marcação vermelha foi realizada pelo software ImageJ (HARTIG, 2013) usando 10 campos histológicos diferentes/lâmina; 3

lâminas/grupo capturadas em objetiva de 10X. A intensidade de fluorescência vermelha foi normalizada pelo número de células em cada imagem.

### **3.9 Análise Estatística**

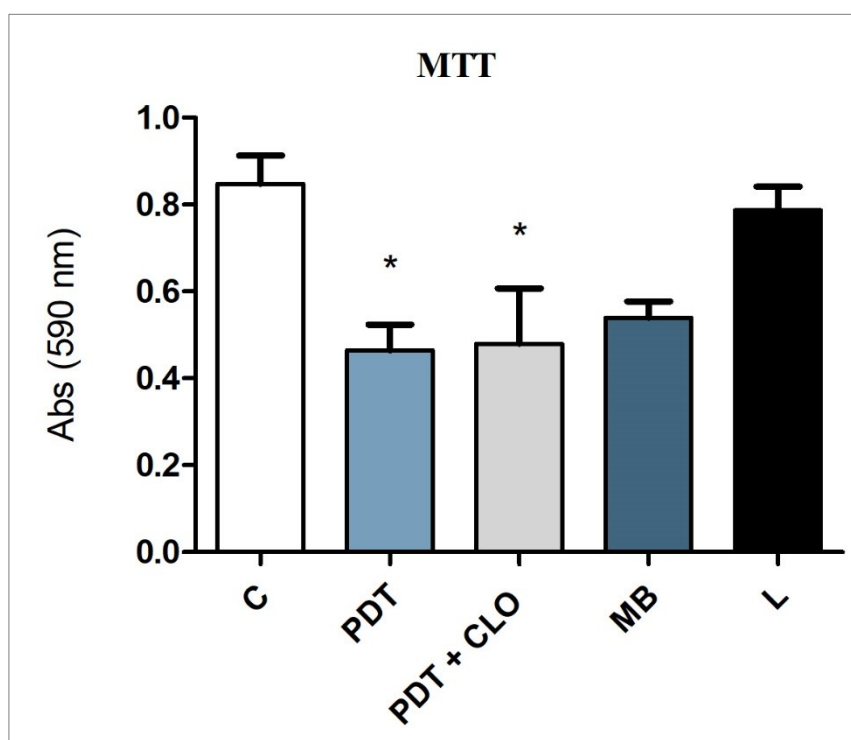
Todos os valores numéricos obtidos nos ensaios foram submetidos a avaliações estatísticas. Inicialmente, os dados foram avaliados quanto à distribuição normal das amostras. Em seguida realizou-se uma ANOVA seguido de teste de Tukey (teste paramétrico) para comparações múltiplas, ou teste t-Student para comparações entre controle e tratamento (PDT). Todas as avaliações estatísticas foram realizadas através do software Instat.

## **4. RESULTADOS**

### **4.1 MTT**

A viabilidade celular das culturas de células PC3 foi avaliada através do ensaio de MTT (**figura 2**). Desta maneira, o ensaio demonstrou que há uma diminuição significativa da viabilidade celular no grupo tratado com PDT em comparação ao grupo controle. Nos demais grupos (laser e MB), apesar de demonstrar variação quanto à viabilidade celular, não apresentaram significância estatística. O uso do inibidor da autofagia, cloroquina, não reverte os efeitos negativos na viabilidade celular causados pelo PDT, demonstrando também significância estatística em relação ao grupo controle.

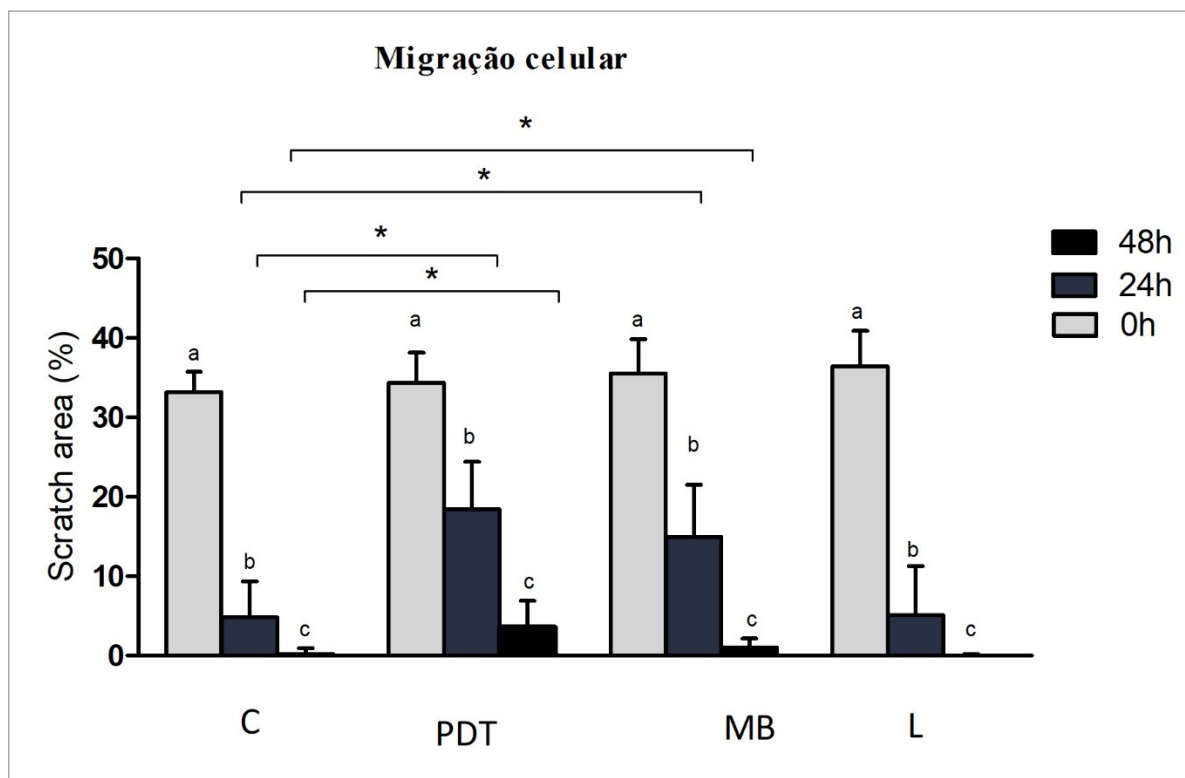




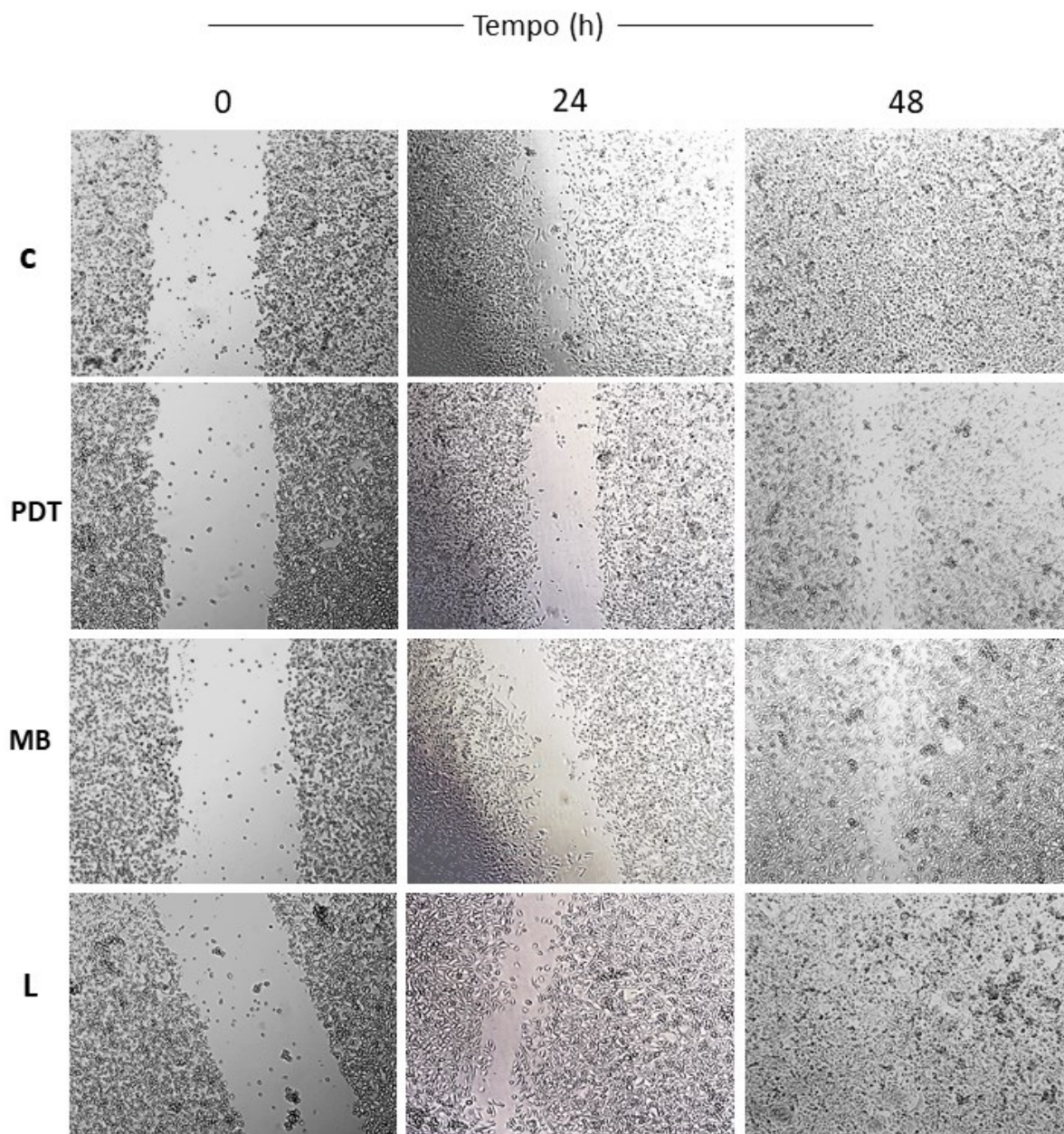
**Figura 2:** Representação gráfica do ensaio de MTT, 24 horas após o cultivo de células PC3 nos meios de cultura controle (C), laser associado ao azul de metileno (PDT), laser associado ao azul de metileno + cloroquina (PDT + CLO), azul de metileno (MB) e laser (L). \*: Representa diferença estatística em relação ao grupo controle ( $p < 0.001$ ). Todos os valores estão sendo representados como média  $\pm$  SD.

## 4.2 Migração celular

A capacidade migratória das células PC3 foi observada através do ensaio de migração sob diferentes tempos de exposição aos tratamentos. Tanto o MB quanto o PDT diminuíram a taxa de migração celular em comparação ao controle em 24 ou 48 hrs de tratamento. Entretanto, nota-se que a migração celular é mais significativamente reduzida no grupo PDT, que ainda manteve cerca de 5% de área aberta em comparação aos demais grupos que praticamente fecharam a área de scratch após 48 hrs (Figura 3 e 4).



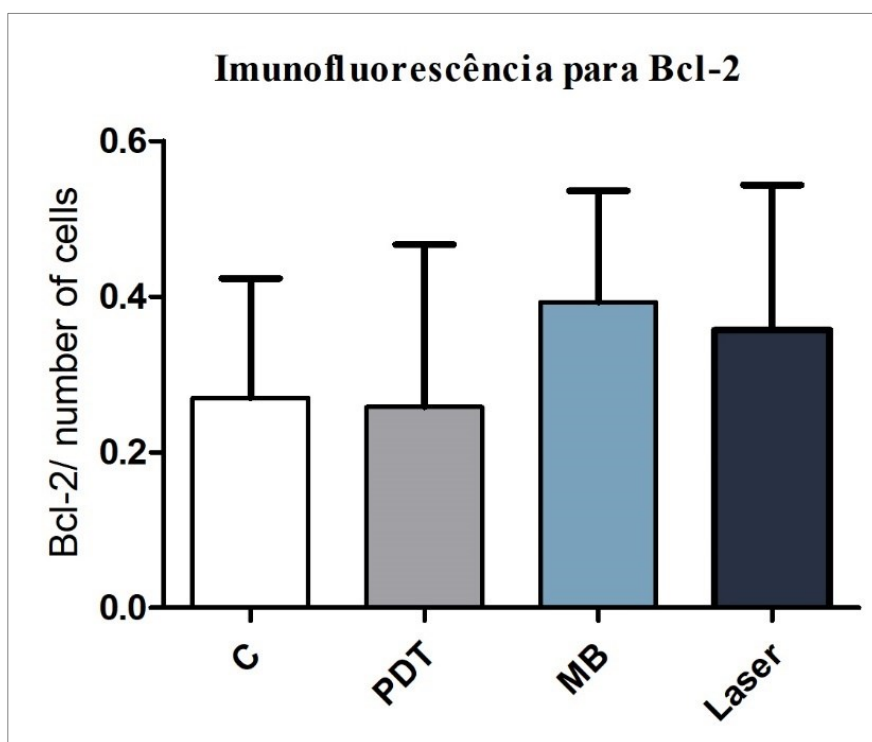
**Figura 3:** Representação gráfica do ensaio de migração, após o cultivo de células PC3 nos grupos controle (C), laser associado a azul de metileno (PDT), azul de metileno (MB) e laser (L) nos tempos de exposição de 0h, 24h e 48h. O gráfico mostra a área absoluta do traço/risco. a, b, c: representa diferença estatística entre diferentes tempos de exposição em um mesmo grupo. \*: representa diferença estatística em relação ao grupo controle nos tempos de 24h e 48 h ( $p < 0.001$ ;  $p < 0.05$ ). Todos os valores estão sendo representados como média  $\pm$  SD.



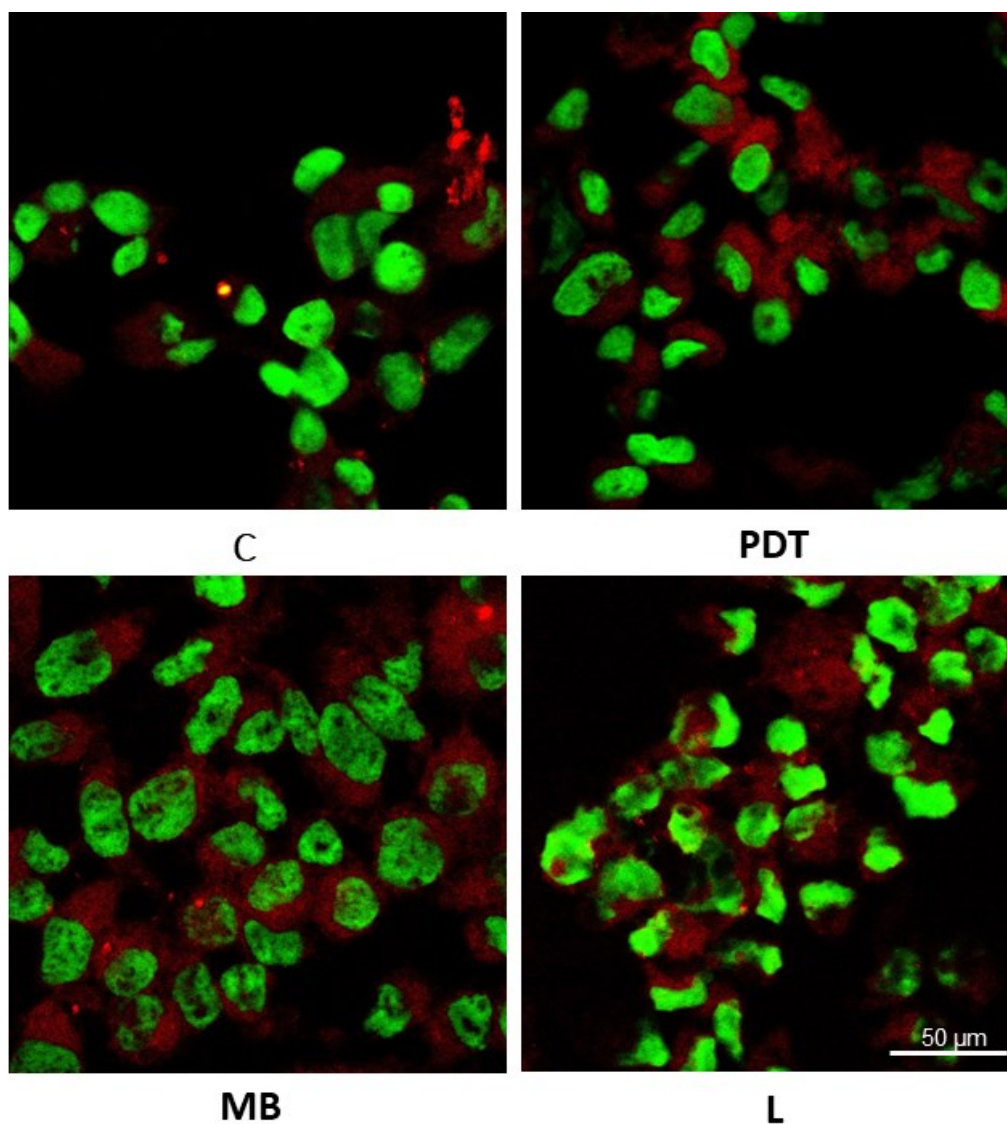
**Figura 4:** Imagens capturadas do ensaio de migração através de microscópio de luz invertido em objetiva de 10x, após o cultivo de células PC3 nos meios controle (C), laser associado a azul de metileno (PDT), azul de metileno (MB) e laser (L) nos tempos de exposição de 0h, 24h e 48h.

### 4.3 Imunofluorescência para Bcl-2

Foi realizada a imunomarcção de Bcl-2, do inglês, *B-cell lymphoma 2*, uma proteína diretamente associada à resistência apoptótica. Desta maneira, a sua quantificação possibilita um estudo sobre a via de morte por apoptose nos cultivos de PC3. Os dados obtidos da quantificação da intensidade de marcação da proteína Bcl-2 indicam que não houve diferença significativa na expressão desta proteína entre os grupos estudados.



**Figura 5:** Representação gráfica do ensaio de imunofluorescência para Bcl-2, 24 horas após o cultivo de PC3 nos meios controle (C), laser associado a azul de metileno (PDT, azul de metileno (MB) e laser (L). Não há diferença estatística entre os tratamentos. Todos os valores estão sendo representados como média  $\pm$  SD.

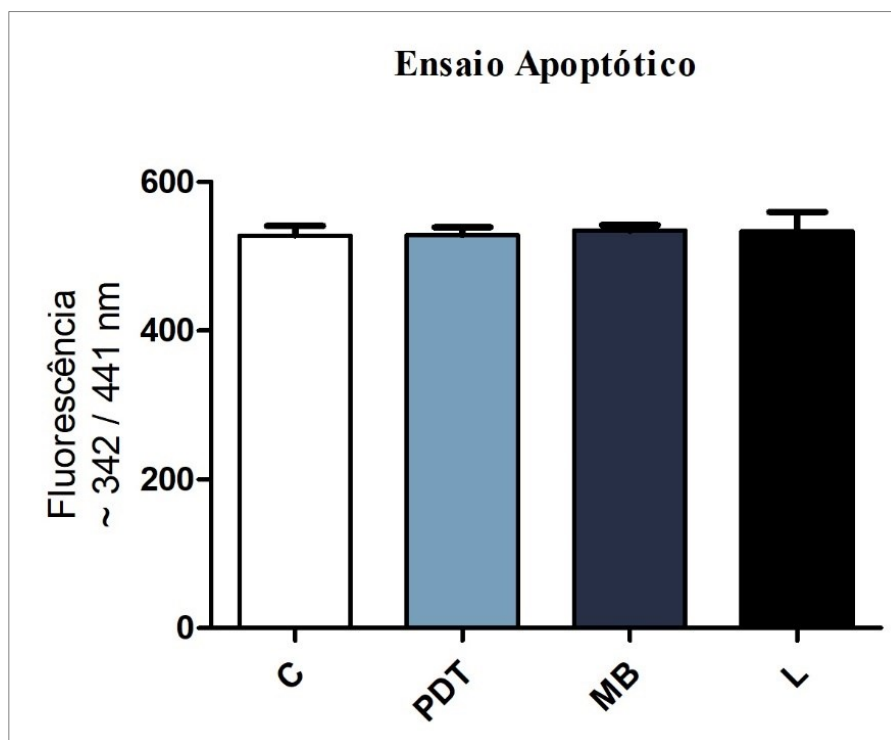


**Figura 6:** Imagens representativas do ensaio de imunofluorescência para Bcl-2, 24 horas após o cultivo das células PC3 nos meios controle (C), laser associado a azul de metileno (PDT), azul de metileno (MB) e laser (L). Imagens capturadas em microscópio confocal.

#### 4.4 Ensaio de apoptose

A morte por apoptose também foi avaliada através da quantificação de caspases-3 ativas (caspase efetora do processo apoptótico) nas culturas de PC3. Todavia, os resultados (**figura 7**) demonstraram que não houve diferença na ativação de caspase-3 entre os grupos

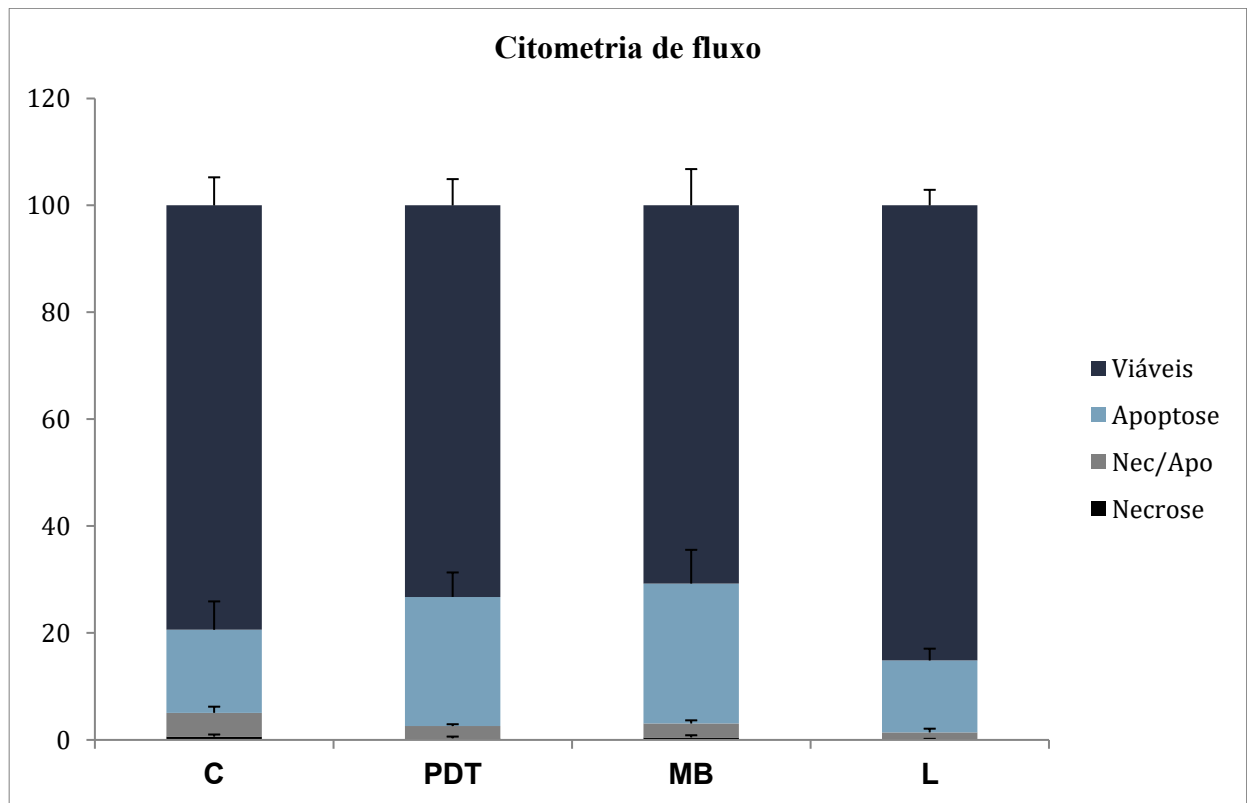
tratados.



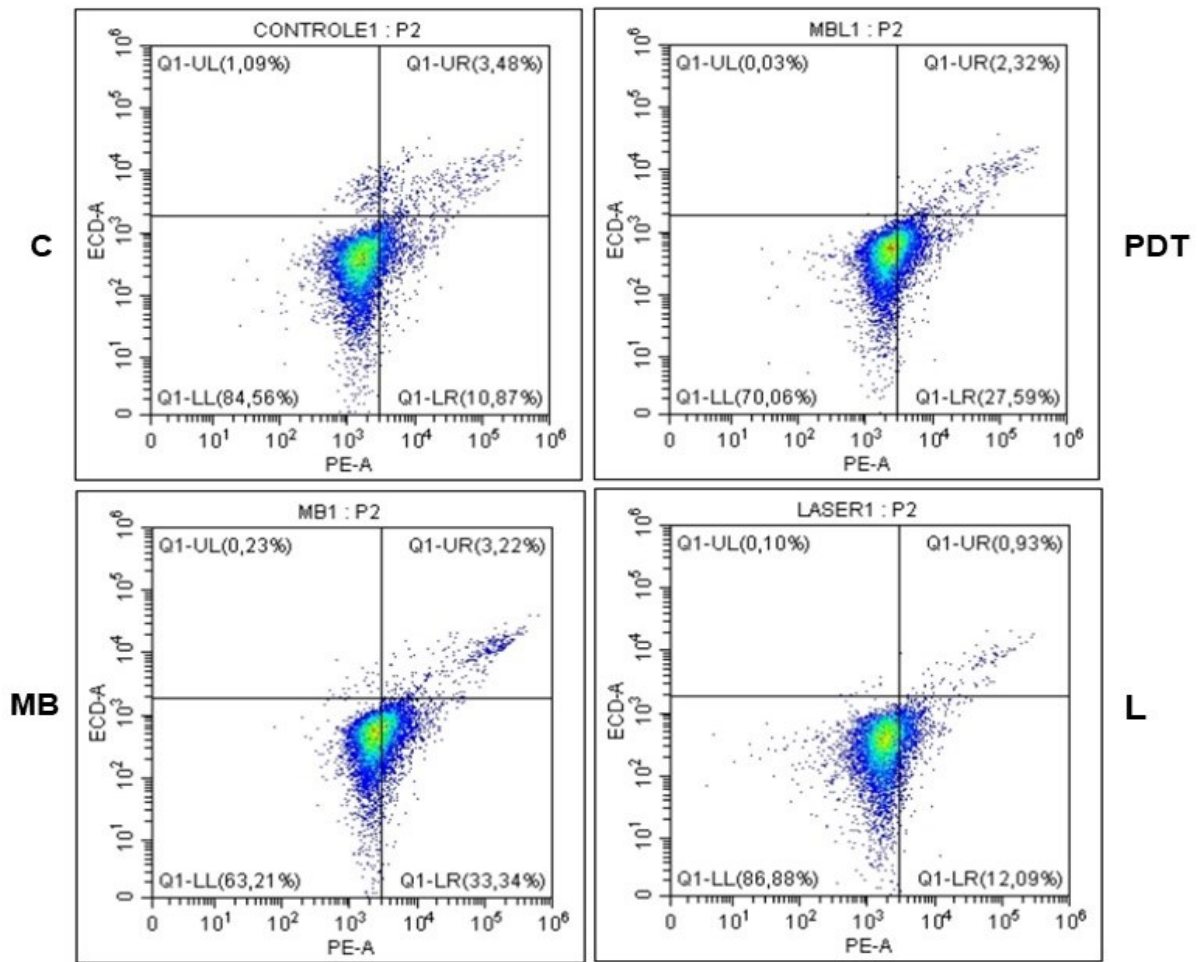
**Figura 7:** Representação gráfica do ensaio de apoptose, 24 horas após o cultivo das células PC3 nos meios controle (C), laser associado a azul de metileno (PDT), azul de metileno (MB) e laser (L). Não há diferença estatística significativa entre os grupos estudados. Todos os valores estão sendo representados como média  $\pm$  SD.

#### 4.5 Citometria de fluxo para avaliação de necrose e apoptose

A morte apoptótica e necrótica foi estudada também através do uso da citometria de fluxo. Dado isso, observam-se (**figura 8 e 9**) variações quanto à presença de células apoptóticas entre os grupos tratados e também observa-se baixíssima quantidade de morte necrótica nas culturas celulares. Todavia, não houve diferença estatística significativa nas variações observadas.



**Figura 8:** Representação gráfica dos valores obtidos na citometria de fluxo, 24 horas após o cultivo das células PC3 nos meios controle (C), laser associado a azul de metileno (PDT), azul de metileno (MB) e laser (L). Os valores obtidos para cada grupo estão empilhados na coluna para visualização dinâmica. Não há diferença estatística significativa entre os grupos estudados. Todos os valores estão sendo representados como média.

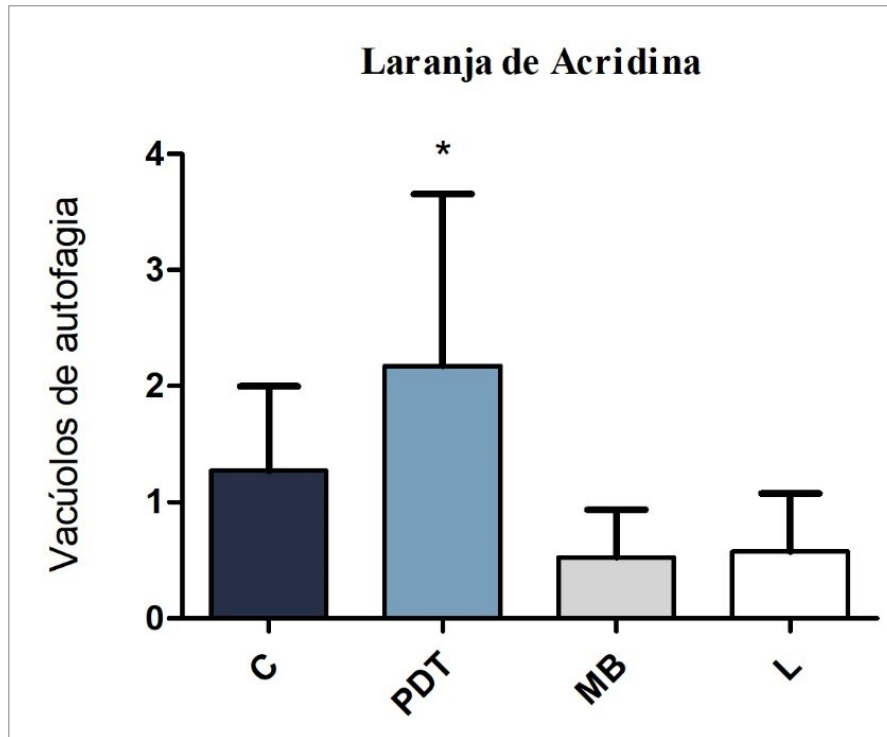


**Figura 9:** Imagens representativas da citometria de fluxo, 24 horas após o cultivo das células PC3 nos meios controle (C), laser associado a azul de metileno (PDT), azul de metileno (MB) e laser (L). **Q1-UL:** Necrose; **Q1-UR:** Nec/apoptose tardia; **Q1-LR:** Apoptose; **Q1-LL:** Viáveis.

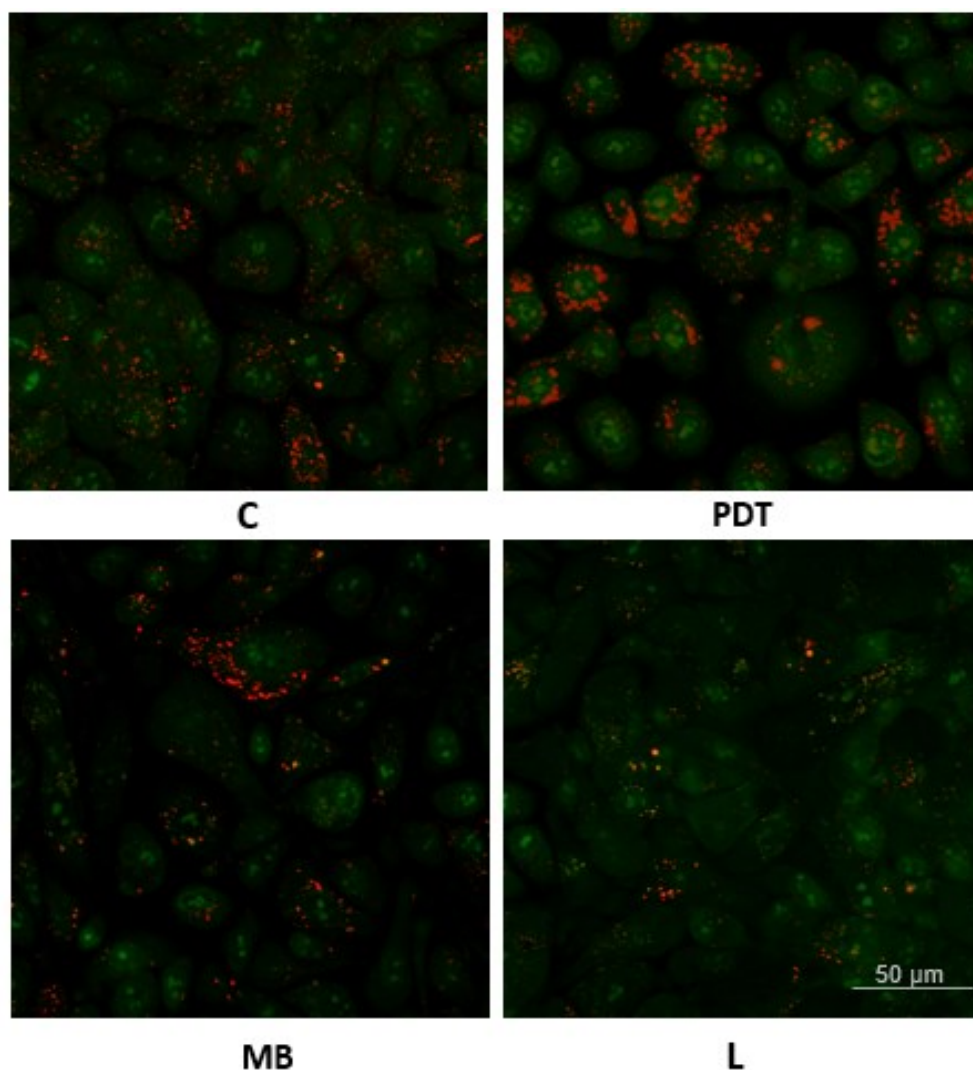
#### 4.6 Coloração laranja de acridina para marcação de vacúolos autofágicos

Além da morte celular apoptótica e necrótica, a possível morte celular autofágica também foi avaliada. Portanto, através da intensidade da marcação AO em vacúolos autofágicos, é possível mensurar variações quanto ao processo autofágico. De acordo com os dados obtidos (**Figura 10 e 11**), há um aumento significativo de vacúolos de autofagia somente nas células que receberam a terapia PDT em relação às células do controle.





**Figura 10:** Representação gráfica do ensaio coloração laranja de acridina, 24 horas após o cultivo das células PC3 nos meios controle (C), laser associado a azul de metileno (PDT), azul de metileno (MB) e laser (L). \*: representa diferença estatística entre o grupo controle e PDT ( $p < 0.001$ ). Todos os valores estão sendo representados como média  $\pm$  SD.

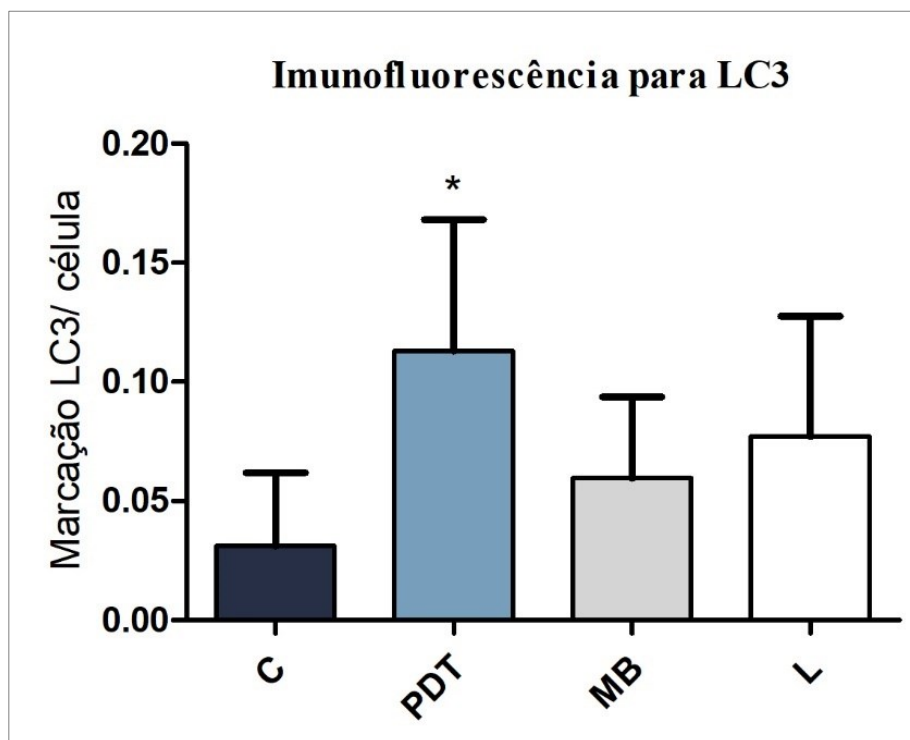


**Figura 11:** Imagens representativas do ensaio de coloração laranja de acridina, 24 horas após o cultivo das células PC3 nos meios controle (C), laser associado a azul de metileno (PDT), azul de metileno (MB) e laser (L). Imagens capturadas em microscópio confocal.

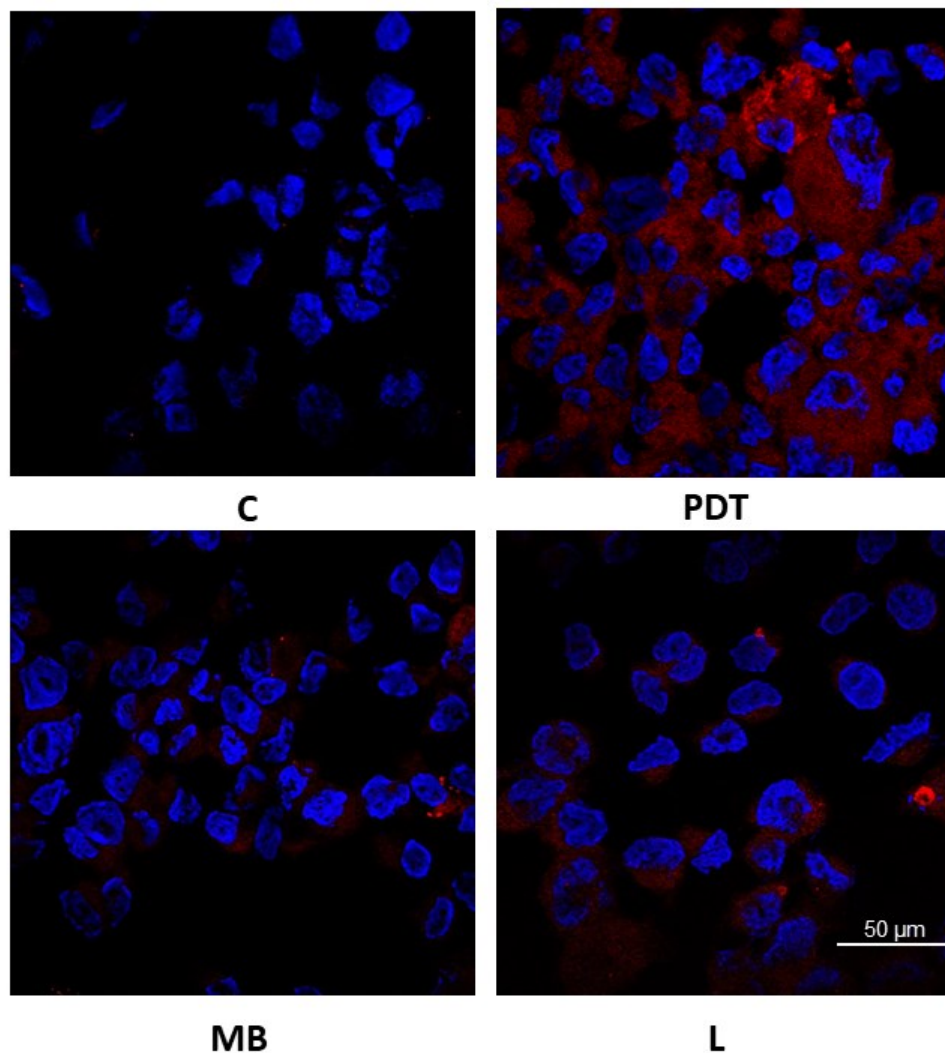
#### 4.7 Imunocitoquímica para LC3

Também avaliou-se a imunomarcação da proteína LC3, do inglês, *microtubule-associated protein light chain 3*, um importante monitorador da atividade autofágica. Portanto, os dados obtidos demonstraram (**Figura 12**) um aumento estatisticamente

significativo da expressão da proteína LC3 nas células tratadas com a terapia PDT, em relação às células do controle.



**Figura 12:** Representação gráfica do ensaio imunofluorescência para LC3, 24 horas após o cultivo das células PC3 nos meios controle (C), laser associado a azul de metileno (PDT), azul de metileno (MB) e laser (L). \*: representa diferença estatística entre o grupo controle e o grupo PDT ( $p < 0.001$ ). Todos os valores estão sendo representados como média  $\pm$  SD.



**Figura 13:** Imagens representativas da imunomarcação para LC3, 24 horas após o cultivo das células PC3 nos meios controle (C), laser associado a azul de metileno (PDT), azul de metileno (MB) e laser (L). Imagens capturadas em microscópio confocal.

## 5. DISCUSSÃO

Na literatura, a citotoxicidade da terapia fotodinâmica associada ao azul de metileno já foi descrita por alguns pesquisadores: BELLIN et al., (1961), observou diminuição da viabilidade de células 6C3HED (células de linfoma de Gardner). Ainda, segundo Bellin, a citotoxicidade do azul de metileno e de outros fotossensibilizadores não se restringe a tumores

específicos, uma vez que, observou-se também diminuição da viabilidade de células provenientes de tumor de Ehrlich. Além disso, a citotoxicidade da terapia PDT-MB é também demonstrada em outros linhagens, incluindo células de câncer de mama (DOS SANTOS et al., 2017), células tumorais da bexiga (GILL et al., 1987), células HeLa (LU et al., 2008) entre outras. Portanto, esse é o primeiro estudo envolvendo o uso desse fotossensibilizador em células prostáticas e confirma que a terapia PDT-MB também é capaz de causar citotoxicidade e diminuir a viabilidade de células tumorais de próstata humana (PC3), levando assim a novas perspectivas no tratamento do câncer prostático.

A terapia PDT-MB também influenciou na capacidade migratória das células PC3. A capacidade das células tumorais gerarem metástases, está intimamente relacionada às células adquirirem fenótipos que lhe dão propriedades migratórias e por isso, é um dos grandes desafios que envolvem a busca por novas terapias para o câncer. O processo metastático envolve uma sequência de passos, sendo eles: (1) a dissociação das células tumorais do tumor primário, (2) invasão e migração em torno do tecido alvo, (3) penetração nos vasos sanguíneos ou nos vasos linfáticos locais, (4) disseminação na corrente sanguínea ou ainda no sistema linfático, (5) associação a capilares ou vasos de outros órgãos, (6) adaptação ao novo ambiente colonizado e por fim (7) proliferação a fim de formar um novo tumor (BACAC; STAMENKOVIC, 2008; BOZZUTO et al., 2010). Para que o processo metastático aconteça ou, ainda, o processo migratório, moléculas de adesão ou CAMs (do inglês, *cell-cell adhesion molecules*), como integrinas, caderinas, imunoglobulinas, selectinas, entre outras, desempenham grande papel na modulação da interação de células tumorais com outras células e também com a matriz extracelular (BACAC; STAMENKOVIC, 2008; BOZZUTO et al., 2010; ROBERTSON et al., 2009). Apesar do presente projeto não avaliar de modo específico alterações quanto a expressão de proteínas de adesão, a capacidade migratória foi avaliada e

constatou-se que a nossa proposta de tratamento causou diminuição da migração das células PC3, enfatizando a vantagem e importância da terapia PDT-MB, considerando que a metástase é uma das principais causas de morte por câncer.

De forma geral, os principais mecanismos de morte estudados na terapia fotodinâmica são a via apoptótica, necrótica e autofágica, podendo um mesmo fotossensibilizador ser capaz de desencadear os três mecanismos de morte, de acordo com o protocolo e o tipo celular utilizado (DONOHOE et al 2019). A morte apoptótica, comumente chamada de morte programada, possui duas vias denominadas via **intrínseca** e via **extrínseca** (para mais informações, veja anexo 1). A via intrínseca é ativada quando há estímulos intracelulares ou extracelulares que levam à permeabilização da membrana mitocondrial externa, liberando o citocromo C e ativação da caspase iniciadora 9 e, conseqüentemente, as efetoras, como por exemplo a caspase-3, que foi quantificada no presente estudo (ALMEIDA et al., 2004; DONOHOE et al., 2019; GLOWACKI; SYNOWIEC; BLASIAK, 2013). A via extrínseca é ativada, quando há ativação do receptor de morte Fas (entre outros receptores) desencadeando atração da molécula FADD (do inglês, *FAS-associated death domain protein*) e também de caspase iniciadora 8, que por sua vez, ativa caspases efetoras (GLOWACKI et al., 2013; OUYANG et al., 2012). Além disso, a caspase-8 pode ativar a proteína pró-apoptótica BID (do inglês, *BH3 Interacting Domain Death Agonist*) que promoverá a permeabilização da membrana mitocondrial e culminará na conexão/interação entre ambas as vias (GLOWACKI; SYNOWIEC; BLASIAK, 2013).

Na literatura, mudanças nos níveis de proteínas envolvidas no processo apoptótico e proteínas da família Bcl-2 (pró-apoptóticas e anti-apoptóticas) após utilização da terapia PDT-MB já foram descritas. CAMPOS et al., (2020) observaram o aumento da expressão de

citocromo C e Fas-L, e aumento na razão BAX/BCL-2 e na razão BAD/BCL-2 em células NIH/3T3 (fibroblastos de camundongo) quando submetidas à terapia PDT-MB, sugerindo um aumento na morte celular apoptótica. DOS SANTOS et al., (2017) descrevem exatamente o oposto, uma vez que observaram que a utilização de inibidores de caspases em linhagens celulares MCF-7 e MDA-MB-231 (adenocarcinoma de mama humano) submetidas à terapia PDT-MB resulta em um certo efeito protetor a curto prazo, entretanto, após 24 horas os inibidores não são capazes de diminuir ou ainda prevenir a morte celular. Além disso, DOS SANTOS e colaboradores também relatam que não houve diminuição da razão BCL-2/BAX quando tratadas com a terapia PDT-MB. Assim como encontrado por DOS SANTOS, os resultados do presente estudo demonstraram que apesar de haver uma diminuição na viabilidade celular, não há alteração na ativação de caspase-3 e no conteúdo de BCL-2 nas células tumorais de próstata após aplicação da terapia PDT-MB. Esses dados sugerem que muito provavelmente o tipo de morte celular desencadeada pelo tratamento, neste caso, também não é a morte celular apoptótica clássica.

A necrose possui aspectos morfológicos que se diferem da morte apoptótica, sendo suas características predominantes: **(1)** aumento do volume citoplasmático, **(2)** destruição de organelas, **(3)** rompimento ou perda da integridade da membrana plasmática, **(4)** extravasamento do conteúdo intracelular e *in vivo*, possui também a característica de **(5)** inflamação (DUPREZ et al., 2009; ROBERTSON; EVANS; ABRAHAMSE, 2009), sendo essa última característica um fator indesejado se tratando de uma terapia para o câncer. Dado isso, a morte necrótica pode ser desencadeada por situações de estresse físico e/ou químico que tenham sido fortes e agudos, sendo representada ainda por ser um tipo de morte rápida e desregulada (DONOHOE et al., 2019).

Geralmente, compreende-se que baixa concentração do fotossensibilizador e/ou baixa dose de luz contribui para o aparecimento da morte celular apoptótica, enquanto altas doses de ambos favorecem morte celular necrótica. Nesse sentido, LUO et al., (2015) ao utilizar terapia fotodinâmica associada ao fotossensibilizador clorina e6 em células Tca8114 (carcinoma de células escamosas da língua) observou que em baixa concentração de clorina e6 houve indução significativa de morte apoptótica enquanto altas doses de clorina e6 demonstrou o aumento significativo de necrose. A citometria de fluxo do presente estudo proporcionou uma noção da razão apoptose/necrose, sendo perceptível que a utilização do MB à uma concentração de 25  $\mu\text{m}$  não é capaz de induzir a morte necrótica significativa nas culturas de PC3, uma vez que o percentual necrótico das células tratadas com a terapia PDT é menor que 1%. Trabalhos com PDT-MB em outras linhagens de células também demonstraram o mesmo, LU et al., (2008) observou baixa porcentagem de células necróticas em células HeLa tratadas com azul de metileno à uma concentração de 20  $\mu\text{m}$  associada a luz de diodo laser. CHEN et al., (2008), observou percentual em torno de 3% de necrose em células B16F1 (células de câncer de melanoma) após tratamento com terapia PDT-MB utilizando MB nas concentrações de 0  $\mu\text{m}$  – 20  $\mu\text{m}$  e luz de diodo laser.

Ainda, se tratando da morte apoptótica estudada na citometria de fluxo, o grupo tratado com a terapia PDT-MB demonstrou porcentagem de 24,17% de morte apoptótica enquanto o grupo controle demonstra apenas 15,5% de morte apoptótica. Apesar desse dado numérico, esse aumento não é significativo estatisticamente. Dado isso, frente aos dados discutidos até o momento e, considerando que é indiscutível a redução na viabilidade celular causada pelo PDT-MB e que os dados de apoptose não respondem a esse resultado, optamos por avaliar autofagia como possível mecanismo de morte.



O processo autofágico representa um fenômeno catabólico que acontece em todas as células eucarióticas, sendo considerado um importante mecanismo para a produção de energia e para o reciclo de moléculas citoplasmáticas permitindo a homeostase intracelular (DUPREZ et al., 2009; ELMORE, 2007). Todo o processo autofágico (em síntese pode ser representado por etapas (anexo 2), são elas: (a) indução do processo autofágico, (b) formação do autofagossomo, (c) fusão do autofagossomo com o lisossomo e por fim (d) degradação dos componentes celulares (DONOHOE et al., 2019; ELMORE, 2007). De maneira simplificada (anexo 3), o processo autofágico pode ser induzido durante privação/falta de qualquer nutriente ou fator de crescimento que seja essencial para o metabolismo celular, ocasionando a inibição da proteína mTOR (do inglês, *mammalian target of rapamycin*) e a ativação do complexo proteico denominado ULK-AtgG3-FIP200. Em seguida, inicia-se o processo de nucleação das vesículas autofágicas, seguido da ativação da enzima fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K). Além disso, na etapa de nucleação ocorre a fosforilação da molécula de fosfatidilinositol através da enzima PI3K, gerando o produto fosfatidilinositol-3-fosfato (PI3P) que favorece a atração das proteínas Atg12, Atg5 e Atg 16, iniciando o processo de alongação das vesículas autofágicas. Ainda, a proteína citosólica LC3-I citoplasmática se liga à uma molécula de fosfatidiletanolamina (PE) se tornando então LC3-II associada à membrana dos autofagossomos. Por fim, o autofagossomo se funde ao lisossomo, onde acontecerá a degradação dos componentes presentes na vesícula (DUPREZ et al., 2009; GALLAGHER; WILLIAMSON; CHAN, 2016; MARTINS et al., 2021; MIZUSHIMA, 2007).

Além de estar associada à manutenção do equilíbrio celular a autofagia também desempenha funções em outros processos, podendo assim realizar dois papéis ou mecanismos: **mecanismo de sobrevivência** ou **mecanismo de morte**, dependendo do dano causado pela terapia fotodinâmica (DONOHOE et al., 2019; DUPREZ et al., 2009). De modo

geral, a atuação da autofagia como um mecanismo de morte celular é um tópico que ainda divide pesquisadores e que também não está bem esclarecido na terapia fotodinâmica, uma vez que não está claro se a mesma é capaz de induzir a morte celular (DUPREZ et al., 2009; ELMORE, 2007; REINERS et al., 2010).

Na bibliografia a indução de autofagia associada ao uso da terapia fotodinâmica já foi relatada por REINERS et al., (2010) que observaram em linhagem celular 1c1c7 (células derivadas de fígado de rato) o aumento da conversão de LC3-I em LC3-II e de autofagossomos após uso de terapia PDT associada ao fotossensibilizador mTHPC. A indução de autofagia também já foi descrita para o PDT associado ao azul de metileno como fotossensibilizador (DOS SANTOS et al., 2017). Tais autores descreveram uma elevação nos vacúolos autofágicos em células tumorais MDA-MB-231 nas horas iniciais após o uso de PDT-MB, além do aumento na conversão de LC3-I em LC3-II. Assim como observado por esses autores os dados obtidos nessa investigação demonstraram o aumento expressivo de vacúolos autofágicos e também do conteúdo de LC3-II em células PC3, indicando um possível aumento da atividade autofágica após terapia PDT associada ao MB. Ressalta-se que, os ensaios realizados (coloração laranja de acridina e imunomarcção para LC3) são técnicas complementares e apontam a formação de autolisossomos e não da atividade autofágica em si. Nesse sentido, a utilização de mais de uma metodologia para o estudo da autofagia é recomendada (KLIONSKY et al., 2021), e uma futura avaliação acerca do influxo autofágico está em andamento no nosso grupo de pesquisa.

Para avaliar precisamente se a maior presença de vacúolos autofágicos é um indicativo do mecanismo de morte celular por autofagia, realizou-se o ensaio de viabilidade celular das células PC3 após terapia PDT com inibição da autofagia utilizando cloroquina (CLO). O

ensaio de MTT demonstrou que a inibição da via autofágica não foi capaz de restaurar a viabilidade celular de modo significativo, sugerindo duas hipóteses acerca dos resultados obtidos: **(1)** a autofagia está atuando como um mecanismo de morte celular nas células tumorais de próstata após terapia PDT-MB, todavia, não é o único tipo de morte celular que a terapia está desencadeando; **(2)** a autofagia está atuando como um mecanismo de sobrevivência e precede outro/outros tipos de morte celulares.

A literatura descreve casos em que a autofagia precede outras mortes celulares, por exemplo, KESSEL & ARROYO, (2007) observaram inicialmente uma onda autofágica que antecede a apoptose, que por sua vez, permanece ativa pelas horas seguintes após o tratamento de células L1210 (células leucêmicas de camundongo) com a terapia PDT-CPO (9-caproniloxi-tetrakis (metiioxietil) porfirceno). Todavia, este não é o caso da terapia PDT-MB em células PC3, apesar de ocorrer aumento de vacúolos autofágicos não observa-se aumento da morte apoptótica nos ensaios realizados. Esses dados indicam que a atividade autofágica deve ocorrer independentemente da apoptose e que ambas não são os únicos tipos de morte celular desencadeada por essa metodologia da terapia fotodinâmica em células tumorais de próstata.

Ainda, a autofagia tem sido associada não só com a presença de morte apoptótica, mas também relacionada à necroptose, um tipo de morte celular regulada (DONOHOE et al., 2019), como FETTWEIS et al., (2017) que descrevem um mecanismo de sobrevivência autofágico em células de glioblastoma submetidas a terapia PDT-5-ALA que é dependente da fosforilação da proteína TSC2 (*do inglês, tuberous sclerosis 2*). Tais autores também descrevem que após 4 horas da terapia PDT-5-ALA, a proteína RIP3 é ativada (*do inglês, receptor interacting protein kinase 3*), uma quinase que desempenha papel importante na

necroptose, e desfosforila a proteína TSC2, diminuindo a sua capacidade de ativação do mecanismo de sobrevivência autofágico e desencadeando o mecanismo de morte necroptótica. Dado isso, considerando a possível associação entre a autofagia e outras mortes celulares na PDT, faz-se útil o estudo da terapia PDT-MB em células PC3 e a correlação do possível aumento da autofagia com outras mortes celulares, bem como a **necroptose**.

Considerando que os resultados comprovaram que a terapia PDT-MB causa citotoxicidade às células PC3, além de que os testes apoptóticos não demonstraram alterações de Bcl-2 e Caspase-3 ativa e que a análise por citometria de fluxo não revelou aumento de morte necrótica e apoptótica, muito provavelmente o aumento de vacúolos autofágicos é um indicativo de que a citotoxicidade da terapia PDT-MB desencadeia a morte celular por autofagia, mesmo que ela não seja o principal tipo de morte.

## **6. LIMITAÇÕES**

Devido a crise sanitária mundial iniciada no ano de 2020 (Covid-19) e que perdura até os dias de hoje, houve atraso nos experimentos e também não foi possível a realização de todas as técnicas previstas (western blotting e pcr quantitativa), bem como a repetição de técnicas que apresentaram grande variação (ensaio apoptótico e citometria de fluxo).

## **7. PERSPECTIVAS FUTURAS**

Objetiva-se a realização de ensaios complementares para avaliação do influxo autofágico quanto ao seu mecanismo de ação (sobrevivência ou morte), bem como o estudo da morte necroptótica. Em uma etapa posterior, objetiva-se a avaliação da terapia PDT-MB *in*

*vivo*.

## **8. CONCLUSÃO**

- A terapia PDT-MB nas condições utilizadas é capaz de causar morte celular nas células tumorais de próstata humana, além de diminuir a capacidade migratória das células PC3.

- A terapia PDT-MB induz o aumento de vacúolos autofágicos, indicando um possível aumento da autofagia.

- Esses resultados abrem novas perspectivas e possibilidades para o tratamento do câncer prostático, uma vez que ainda não há estudos do uso da terapia PDT-MB para o câncer de próstata.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, RAMIRO D. et al. Intracellular signaling mechanisms in photodynamic therapy. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer**, v. 1704, n. 2, p. 59-86, 2004.

AMARILLAS-ESCOBAR ED, TORANZO-FERNÁNDEZ JM, MARTÍNEZ-RIDER R, NOYOLA-FRÍAS MA, HIDALGO-HURTADO JA, SERNA VM, GORDILLO-MOSCOSO A, POZOS-GUILLÉN AJ. Use of therapeutic laser after surgical removal of impacted lower third molars. **J Oral Maxillofac Surg.** 2010 ;68(2):319-24.

ANTUNES HS, DE AZEVEDO AM, DA SILVA BOUZAS LF, ADÃO CA, PINHEIRO CT, MAYHE R, PINHEIRO LH, AZEVEDO R, D'AIUTO DE MATOS V, RODRIGUES PC, SMALL IA, ZANGARO RA, FERREIRA CG. Low-power laser in the prevention of induced oral mucositis in bone marrow transplantation patients: a randomized trial. **Blood.** 2007;109(5):2250-5

BACAC, M.; STAMENKOVIC, I. Metastatic Cancer Cell. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 3, n. 1, p. 221–247, fev. 2008.

BARAN TM, GIESSELMAN BR, HU R, BIEL MA, FOSTER TH. Factors influencing tumor response to photodynamic therapy sensitized by intratumoradministration of methylene blue. **Lasers Surg Med.** 2010 42(8):728-35.

BERNDT-PAETZ M, WEIMANN A, SIEGER N, SCHASTAK S, RIYAD YM, GRIEBEL J, ARTHANAREESWARAN VK, STOLZENBURG JU, NEUHAUS J. Tetrahydroporphyrin-Tetratosylat (THPTS): A near-infrared photosensitizer for targeted and efficient photodynamic therapy (PDT) of human bladder carcinoma. An in vitro study. **Photodiagnosis**

**Photodyn Ther.** 2017. pii: S1572-1000(16)30141-7.

BELLIN, JU. S.; MOHOS, S.; GERALDOSTER, A. Dye-sensitized Photoinactivation of Tumor Cells in Vitro. **Cancer Research**, p. 8, 1961.

BOZZUTO, G.; RUGGIERI, P.; MOLINARI, A. Molecular aspects of tumor cell migration and invasion. p. 15, 2010.

CALIXTO, G.; BERNEGOSSI, J.; FREITAS, L.; FONTANA, C.; CHORILLI, M. Nanotechnology-Based Drug Delivery Systems for Photodynamic Therapy of Cancer: A Review. **Molecules**, v. 21, n. 3, p. 342, 2016

CAMPOS CHAVES LAMARQUE, G. et al. Cytotoxic effect and apoptosis pathways activated by methylene blue-mediated photodynamic therapy in fibroblasts. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 29, p. 101654, mar. 2020.

CHEN, Y. et al. Apoptosis induced by methylene-blue-mediated photodynamic therapy in melanomas and the involvement of mitochondrial dysfunction revealed by proteomics. **Cancer Science**, out. 2008.

DER MARK, K. VON; SCHÖBER, S.; GOODMAN, S. L. Integrins in Cell Migration. In: HOWLETT, A. R. (Ed.). . **Integrin Protocols**. New Jersey: Humana Press, 1999. v. 129p. 219–230.

DOLMANS DE, FUKUMURA D, JAIN RK. Photodynamic therapy for cancer. **Nat Rev Cancer**. 2003, 3(5):380-7

DONOHUE, C. et al. Cell death in photodynamic therapy: From oxidative stress to anti-tumor immunity. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer**, v. 1872, n. 2, p.

188308, dez. 2019.

DOS SANTOS, A. F. et al. Methylene blue photodynamic therapy induces selective and massive cell death in human breast cancer cells. **BMC Cancer**, v. 17, n. 1, p. 194, dez. 2017.

DUPREZ, L. et al. Major cell death pathways at a glance. **Microbes and Infection**, v. 11, n. 13, p. 1050–1062, nov. 2009.

ELMORE, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. **Toxicologic Pathology**, v. 35, n. 4, p. 495–516, jun. 2007.

ESLAMIAN, F. et al. Effects of low-level laser therapy in combination with physiotherapy in the management of rotator cuff tendinitis. **Lasers in medical science**, v. 27, n. 5, p. 951-958, 2012.

FAN Z, DAI X, LU Y, YU E, BRAHMBATT N, CARTER N, TCHOUWOU C, SINGH AK, JONES Y, YU H, RAY PC. Enhancing targeted tumor treatment by near IR light-activatable photodynamic-photothermalsynergistic therapy. **Mol Pharm**. 2014. 7;11(4):1109-16.

FETTWEIS, G. et al. RIP3 antagonizes a TSC2-mediated pro-survival pathway in glioblastoma cell death. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1864, n. 1, p. 113–124, jan. 2017.

FIBBI B.et. al. Chronic inflammation in the pathogenesis of benign prostatic hyperplasia. **Int. J. Androl**, 2010, 33, 475–488.

GALLAGHER, L.; WILLIAMSON, L.; CHAN, E. Advances in Autophagy Regulatory Mechanisms. **Cells**, v. 5, n. 2, p. 24, 13 maio 2016.

GILL, W. B. et al. Inactivation of Bladder Tumor Cells and Enzymes by Methylene Blue Plus



Light. **Journal of Urology**, v. 138, n. 5, p. 1318–1320, nov. 1987.

GLOWACKI, S.; SYNOWIEC, E.; BLASIAK, J. The Role of Mitochondrial DNA Damage and Repair in the Resistance of BCR/ABL-Expressing Cells to Tyrosine Kinase Inhibitors. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 8, p. 16348–16364, 7 ago. 2013.

HADDAD, R. et al. Effect of photodynamic therapy on normal fibroblasts and colon anastomotic healing in mice. **Journal of Gastrointestinal Surgery**, 1999; 3(6), 602-606.

HARTIG, Sean M. Basic image analysis and manipulation in ImageJ. **Current protocols in molecular biology**, v. 102, n. 1, p. 14.15. 1-14.15. 12, 2013.

HASAN, T. et al. Photodynamic therapy of cancer. **Cancer medicine**, 2003; 7, 537-48.

HAYASHIDA Y, IKEDA Y, SAWADA K, KAWAI K, KATO T, KAKEHI Y, ARAKI N. Invention of a novel photodynamic therapy for tumors using a photosensitizing PI3K inhibitor. **Int J Cancer**. 2016. 1;139(3):700-11.

HAYWARD, S.W.; ROSEN, M.A.; CUNHA, G.R. Stromal-epithelial interactions in the normal and neoplastic prostate. **Br. J. Urol**, 1997, 2:18-26.

HENDERSON BW, DOUGHERTY TJ. How does photodynamic therapy work? **Photochem Photobiol**. 1992;55(1):145-57

HENDRICKX, N. et al. Up-regulation of cyclooxygenase-2 and apoptosis resistance by p38 MAPK in hypericin-mediated photodynamic therapy of human cancer cells. **Journal of Biological Chemistry**, 2003; 278(52), 52231-52239.

HSING, A.N.; SAKODA, L.C.; JR, S.C.C. Obesity, metabolic syndrome, and prostate cancer 1– 4. **Am J Clin Nutr**, 2007, 86(suppl):843S–57S

HO, E.; BOILEAU, T.W.; BRAY, T.M. Dietary influences on endocrineinflammatory interactions in prostate cancer development. **Arch. Biochem. Biophys**, 2004, 428:109-117.

HUANG TH, LU YC, KAO CT. Low-level diode laser therapy reduces lipopolysaccharide (LPS)-induced bone cell inflammation. **Lasers Med Sci**. 2012;27(3):621-7

IARC. **Câncer Tomorrow**, 2018. Disponível em: <[http://gco.iarc.fr/tomorrow/graphic-isotype?type=0&population=900&mode=population&sex=1&cancer=39&age\\_group=value&apc\\_male=0&apc\\_female=0](http://gco.iarc.fr/tomorrow/graphic-isotype?type=0&population=900&mode=population&sex=1&cancer=39&age_group=value&apc_male=0&apc_female=0)>. Acesso em: 06 nov. 2019.

IBGE. Diário Oficial da União. **Tábua completa da mortalidade**, 2019. Disponível em: <<http://www.in.gov.br/web/dou/-/resolucao-n-pr-06-de-26-de-novembro-de-2019-230170699inheritRedirect=true&redirect=%2Fweb%2Fguest%2Fsearch%3FqSearch%3Dt%25C3%25A1bua%2520completa%2520da%2520mortalidade>>. Acesso em: 07 nov. 2019.

INAI, M. et al. Hemagglutinatingvirus of Japan envelope (HVJ-E) allows targeted and efficient delivery of photosensitizer for photodynamic therapy against advanced prostate cancer. In *Optical Molecular Probes, Imaging and Drug Delivery* (pp. OM2D-3). Optical Society of America, 2015.

INCA. **Câncer de próstata**, 2019. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-prostata>>. Acesso em: 07 nov. 2019.

INCA. **Estimativa 2020**, 2020. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf>>. Acesso em: 18 out. 2021.

KARU T. **Gordon and Breach Science Publishers**, 1998.

KARU TI. **CRC Press, Boca Raton, 2003.**

KAZEM SHAKOURI S, SOLEIMANPOUR J, SALEKZAMANI Y, OSKUIE MR. Effect of low-level laser therapy on the fracture healing process. **Lasers Med Sci.** 2010;25(1):73-7.

KESSEL, D.; ARROYO, A. S. Apoptotic and autophagic responses to Bcl-2 inhibition and photodamage. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 6, n. 12, p. 1290, 2007.

KIM, G.; GAITAS, A. Extracorporeal photo-immunotherapy for circulating tumor cells. **PloS one**, 2015; 10(5), e0127219.

KLIONSKY, D. J. et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition) <sup>1</sup>. **Autophagy**, v. 17, n. 1, p. 1–382, 2 jan. 2021.

KUSHIBIKI, T. et al. Regulation of miRNA expression by low-level laser therapy (LLLT) and photodynamic therapy (PDT). **International journal of molecular sciences**, 2003; 14(7), 13542-13558.

LEITZMANN, M. F. & ROHRMANN, S. Risk factors for the onset of prostatic cancer: age, location, and behavioral correlates. **Clin Epidemiol**, 2012; 4, 1-11.

LIM EJ, OAK CH, HEO J, KIM YH. Methylene blue-mediated photodynamic therapy enhances apoptosis in lung cancer cells. **Oncol Rep.** 2013;30(2):856-62

LU, Y. et al. Methylene blue-mediated photodynamic therapy induces mitochondria-dependent apoptosis in HeLa Cell. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 105, n. 6, p. 1451–1460, 15 dez. 2008.

LUO, W. et al. Subcellular location and photodynamic therapeutic effect of chlorin e6 in the human tongue squamous cell cancer Tca8113 cell line. **Oncology Letters**, v. 9, n. 2, p. 551–

556, fev. 2015.

MARCELLI, M.; CUNNINGHAM, G.R. Hormonal signaling in prostatic hyperplasia and neoplasia. **J. of Clinical Endoc. & Metabol**, 1999, 84:3463-3468.

MARTINS, W. K. et al. Autophagy Regulation and Photodynamic Therapy: Insights to Improve Outcomes of Cancer Treatment. **Frontiers in Oncology**, v. 10, p. 610472, 20 jan. 2021.

MIZUSHIMA, N. Autophagy: process and function. **Genes & Development**, v. 21, n. 22, p. 2861–2873, 15 nov. 2007.

MOAN J, BERG K. The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen. **Photochem Photobiol**. 1991; 53(4):549-53.

MOAN, J., PENG, Q. An outline of the hundred-year history of PDT. **Anticancer research**, 2003; 23(5A), 3591-3600.

MROZ, P. et al. Cell Death Pathways in Photodynamic Therapy of Cancer. **Cancers**, v. 3, n. 2, p. 2516–2539, 3 jun. 2011.

NIEMZ MH. **Springer-Verlag, Berlin**, 2007.

O’CONNOR, A. E.; GALLAGHER, WILLIAM M.; BYRNE, ANNETTE T. Porphyrin and nonporphyrin photosensitizers in oncology: preclinical and clinical advances in photodynamic therapy. **Photochemistry and photobiology**, v. 85, n. 5, p. 1053-1074, 2009.

ORMOND, A. B., FREEMAN, H. S. Dye sensitizers for photodynamic therapy. **Materials**, 2013, 6(3), 817-840.

ORTH, K. et al. Methyleneblue mediated photodynamic therapy in experimental colorectal

tumors in mice. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, 2000; 57(2-3), 186-192.

OUYANG, L. et al. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. **Cell Proliferation**, v. 45, n. 6, p. 487–498, dez. 2012.

REDDY GK. **Photobiological basis and clinical role of low-intensity lasers in biology and medicine**. J Clin Laser Med Surg 2004 22: 141-150.

REINERS, J. J. et al. Assessing autophagy in the context of photodynamic therapy. **Autophagy**, v. 6, n. 1, p. 7–18, jan. 2010.

RIDLEY, A. J. et al. Cell Migration: Integrating Signals from Front to Back. **Science**, v. 302, n. 5651, p. 1704–1709, 5 dez. 2003.

ROBERTSON, C. A.; EVANS, D. H.; ABRAHAMSE, H. Photodynamic therapy (PDT): A short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 96, n. 1, p. 1–8, jul. 2009.

STAFF, A. C. An introduction to cell migration and invasion. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**, v. 61, n. 4, p. 257–268, jan. 2001.

SUNG, S.Y.; CHUNG, W. Prostate tumor-stroma interaction: molecular mechanism and opportunities for therapeutic targeting. **Differentiation**, 2002, 70: 506-521.

TARDIVO, J. P. et al. Treatment of melanoma lesions using methylene blue and RL50 light source; **Photodiagnosis Photodynamic Therapy**, 2004; 1 345–346

TORATANI S, TANI R, KANDA T, KOIZUMI K, YOSHIOKA Y, OKAMOTO T. Photodynamic therapy using Photofrin and excimer dye laser treatment for superficial oral

squamous cell carcinomas with long-term follow up. **Photodiagnosis Photodyn Ther.** 2016;14:104-10.

VAN DONGEN GA , VISSER GW , VROUENRAETS MB . Photosensitizer-antibody conjugates for detection and therapy of cancer. **Adv Drug Deliv Rev.** 2004;56(1):31-52.

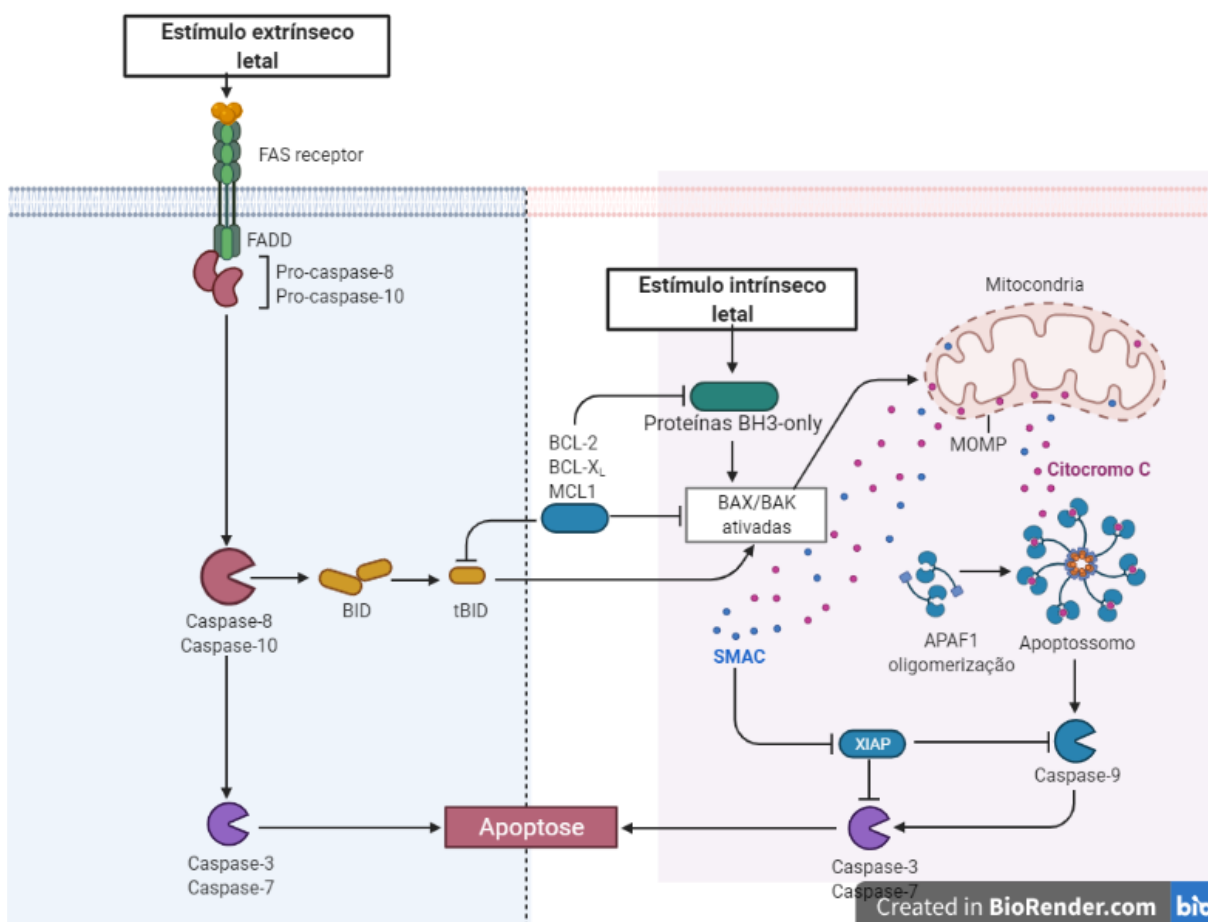
VAN HILLEGERSBERG, R. et al. Adjuvant intraoperative photodynamic therapy diminishes the rate of local recurrence in a rat mammary tumour model. **British journal of cancer**,1995; 71(4), 733.

VIGNOZZI, L. et al. Testosterone protects from metabolic syndrome-associated prostate inflammation: an experimental study in rabbit. **J. Endocrinol**, 2014, 212: 71

YAMAUCHI M, HONDA N, HAZAMA H1, TACHIKAWA S, NAKAMURA H, KANEDA Y, AWAZU K. Effective photodynamic therapy in drug-resistant prostate cancer cells utilizing a non-viral antitumor vector (a secondary publication). **Laser Ther.** 2016. 31;25(1):55-62.

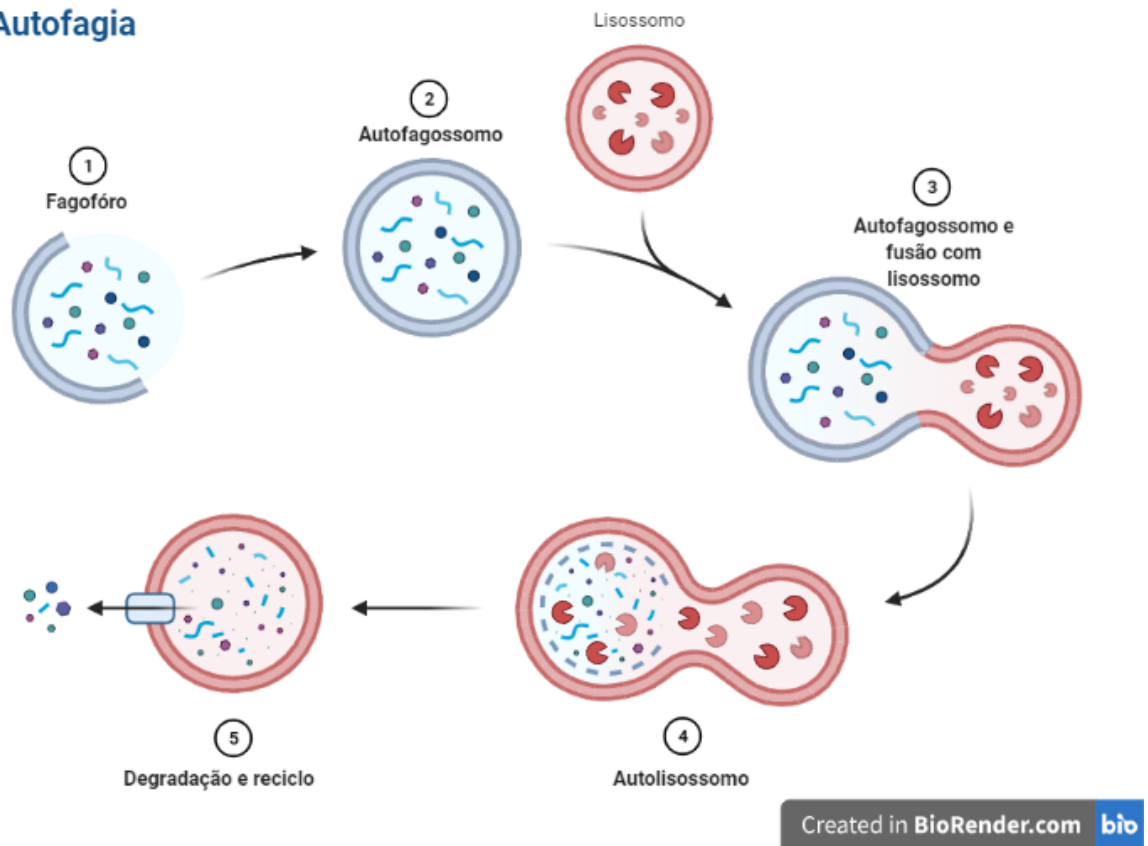
YOUNG M. **Editora da Universidade de São Paulo**, São Paulo, 1998.

## ANEXOS



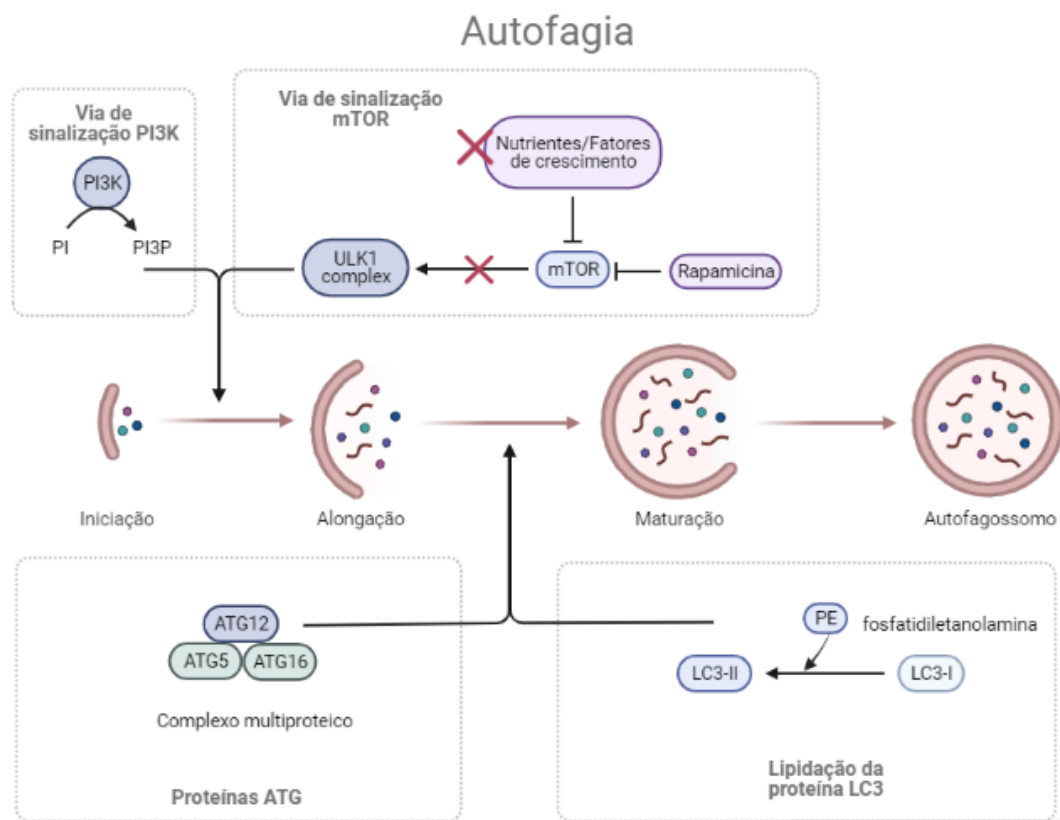
Anexo 1: Ilustração da via intrínseca e extrínseca da morte apoptótica. Adaptada em BioRender.com.

## Autofagia



Anexo 2: Ilustração das etapas do processo autofágico. Adaptada em BioRender.com.





Created in **BioRender.com** **bio**

**Anexo 3:** Ilustração da via autofágica. Adaptada em BioRender.com.