

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA

**Laura Marise de Freitas**

**EFEITO SINÉRGICO ENTRE A TERAPIA FOTODINÂMICA E A CISPLATINA:  
UMA NOVA ABORDAGEM PARA O CÂNCER DE COLO UTERINO**

**Araraquara  
2015**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA

**Laura Marise de Freitas**

**EFEITO SINÉRGICO ENTRE A TERAPIA FOTODINÂMICA E A CISPLATINA:  
UMA NOVA ABORDAGEM PARA O CÂNCER DE COLO UTERINO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Profa. Dra. Carla Raquel Fontana Mendonça

Co-orientadora: Profa. Dra. Christiane Pienna Soares

**Araraquara  
2015**

**Ficha Catalográfica**

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
UNESP – Campus de Araraquara

F866e Freitas, Laura Marise de  
Efeito sinérgico entre a terapia fotodinâmica e a cisplatina: uma nova abordagem para o  
câncer de colo uterino / Laura Marise de Freitas. – Araraquara, 2014  
83 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho".  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e  
Biotecnologia aplicadas à Farmácia

Orientador: Carla Raquel Fontana  
Coorientador: Christiane Pienna Soares

1. Terapia fotodinâmica. 2. Cisplatina. 3. Terapia combinada. 4. Câncer cervical. 5. Azul  
de metileno. 6. Photogem. I. Fontana, Carla Raquel, orient. II. Soares, Christiane Pienna,  
coorient. III. Título.

**CAPES: 40300005**

*Dedico este trabalho aos meus pais, que sempre me incentivaram intelectualmente e me ensinaram a nunca desistir dos meus sonhos.*

## AGRADECIMENTOS

*Aos meus pais, pela educação, amor e carinho. À minha mãe, pelas conversas que sempre me mostram o caminho certo. Ao meu pai pelo apoio incondicional, mesmo estando longe.*

*Ao meu irmão Luís, que mesmo com todos os nossos desentendimentos esteve sempre presente para me apoiar.*

*Ao Jorge, a pessoa que torna meus dias melhores, único a presenciar todos os momentos de crise e a me dar apoio total e incondicional para superá-los.*

*À Carla, minha orientadora, por tudo. Sua calma, paciência, orientação, confiança e amizade foram cruciais para a realização deste trabalho.*

*Aos amigos e amigas que apoiaram os momentos difíceis e compartilharam as alegrias e conquistas: Hermano, Diana, Jaqueline, Amine e Elias.*

*Aos colegas de laboratório, pelo convívio e ajuda neste trabalho: Ana Emília, Geovana, Felipe, Juliana Ferreira, Juliana Sorbo, Luís Fernando, Patrícia, Rodolfo e Thaís.*

*Às professoras Christiane e Valéria, pelas discussões científicas e por abrirem as portas de seus laboratórios, permitindo a realização deste trabalho.*

*À todos os funcionários da FCFAr que trabalham diariamente para tornar nosso trabalho mais fácil: às meninas da limpeza, do café, o pessoal da portaria, da administração. Especialmente às funcionárias da seção de pós-graduação: Cláudia, Daniela, Flávia e Joyce.*

*À FCFAr-UNESP, FAPESP (proc. nº 2012/25414-5), e CAPES, pelo apoio institucional e financeiro para a realização desse trabalho.*

*À Deus, por ter colocado em meu caminho tantas pessoas boas e oportunidades.*

*“Sou um grande crente na sorte, e acho que quanto mais eu trabalho, mais sorte eu tenho.”*

*[I am a great believer in luck, and I find the harder I work, the more I have of it.]*

*(Thomas Jefferson)*

## RESUMO

O câncer de colo uterino (ou câncer cervical) é uma neoplasia maligna que tem a infecção pelo HPV como o principal fator de risco para o seu surgimento. As terapias atuais para o tratamento do câncer cervical têm como maior desvantagem a excisão substancial do estroma cervical e muitos efeitos adversos associados aos quimioterápicos, principalmente a cisplatina. Nesse cenário, a terapia fotodinâmica (TFD) vem se mostrando uma alternativa promissora, especialmente se combinada a tratamentos convencionais. A técnica é baseada na administração de um agente fotossensibilizador não tóxico ao paciente com posterior exposição a uma fonte de luz de comprimento de onda específico, resultando em resposta citotóxica via dano oxidativo. Diante disso, o presente estudo teve como objetivo avaliar, *in vitro*, a citotoxicidade, o tipo de morte induzido e os efeitos genotóxicos e mutagênicos da TFD em monoterapia e associada à cisplatina sobre as linhagens SiHa, C-33 A e HaCaT, utilizando os fotossensibilizadores Photogem e azul de metileno.

Observou-se que tanto a terapia fotodinâmica mediada por azul de metileno (AMTFD) quanto a terapia mediada pelo Photogem (PGTFD) foram eficazes em reduzir o número de células viáveis, com a citotoxicidade sendo dependente da dose de luz. A cisplatina teve menor eficácia sobre as três linhagens quando comparada à TFD. Porém, a combinação cisplatina + TFD apresentou efeito sinérgico intenso e provocou maior morte celular em todas as condições testadas. A sequência de aplicação dos tratamentos (cisplatina + TFD ou TFD + cisplatina) demonstrou-se importante e dependente do fotossensibilizador. Com relação ao tipo de morte celular provocado, tanto a AMTFD quanto a PGTFD induziram morte independente de caspases, mas a AMTFD induziu morfologia típica de necrose, enquanto a PGTFD induziu morfologia mais similar à apoptose. A cisplatina induziu predominantemente apoptose e as terapias combinadas induziram maior taxa de morte similar à necrose ou apoptose de acordo com a linhagem celular, mas sempre com maior porcentagem de células mortas que as monoterapias. AMTFD, tanto em monoterapia quanto combinada com a cisplatina, foi a única terapia avaliada a induzir danos significativos ao DNA (quebras de fita dupla) das três linhagens. Entretanto, não foi observado potencial mutagênico dos danos induzidos pela AMTFD, dado que as poucas células que conseguiram sobreviver ao tratamento perderam sua capacidade clonogênica. Ainda, observou-se que a presença de bactérias da microbiota cervical aderidas às células no momento da terapia fotodinâmica pode reduzir a eficácia do tratamento.

Palavras-chave: câncer cervical; HPV; terapia fotodinâmica; azul de metileno; Photogem; cisplatina; terapia combinada.

## ABSTRACT

Cervical cancer is a malignant tumor that has HPV infection as the main risk factor for its emergence. Current therapies for the treatment of cervical cancer have as major disadvantage substantial excision of cervical stroma and many adverse effects associated with chemotherapy, especially cisplatin. In this scenario, photodynamic therapy (PDT) has proven to be a promising alternative, specially if combined with conventional treatments. The technique is based on the administration of a non-toxic photosensitizing agent to the patient with subsequent exposure to a light source of a specific wavelength, resulting in cytotoxic response by oxidative damage. Thus, the present study intended to evaluate *in vitro* cytotoxicity, the type of induced death and the genotoxic and mutagenic effects of PDT alone and associated with cisplatin on the cell lines SiHa, C-33 A and HaCaT, using the photosensitizers Photogem and methylene blue.

It was observed that both the photodynamic therapy mediated by methylene blue (MBPDT) and Photogem mediated therapy (PGPDT) were effective in reducing cell viability with cytotoxicity being dependent on the light dose. Cisplatin was less effective over the three lines compared to PDT. However, the combination cisplatin + PDT had a greater synergistic effect and caused greater cell death in all conditions tested. The sequence of treatment application (PDT + cisplatin or cisplatin + PDT) was important and depended on the photosensitizer. Regarding the type of induced cell death, both AMPDT and PGPDT induced caspase-independent death, but AMPDT induced the typical morphology of necrosis, while PGPDT induced morphology was most similar to apoptosis. Cisplatin predominantly induced apoptosis; and combination therapy induced greater apoptosis- or necrosis-like rate according to the cell line, but always with a higher percentage of dead cells than monotherapies. MBPDT, either as monotherapy or in combination with cisplatin was the only therapy to induce significant damage to DNA (double strand breaks) in the three cell lines. However, there was no mutagenic potential observed for the damage induced by MB-PDT, given that the few cells that survived the treatment lost their clonogenic capacity. Furthermore, it was observed that the presence of bacteria from cervical flora adhered to the cells at the time of photodynamic therapy can reduce the effectiveness of the treatment.

Keywords: cervical cancer; HPV; photodynamic therapy; methylene blue; Photogem; cisplatin; combination therapy.



**LISTA DE FIGURAS**

	PÁGINA
FIGURA 1.....	17
FIGURA 2.....	19
FIGURA 3.....	20
FIGURA 4.....	34
FIGURA 5.....	35
FIGURA 6.....	36
FIGURA 7.....	37
FIGURA 8.....	42
FIGURA 9.....	43
FIGURA 10.....	44
FIGURA 11.....	45
FIGURA 12.....	46
FIGURA 13.....	52/53
FIGURA 14.....	54
FIGURA 15.....	58
FIGURA 16.....	61
FIGURA 17.....	63
FIGURA 18.....	64
FIGURA 19.....	67

**LISTA DE TABELAS E QUADROS**

	PÁGINA
QUADRO 1.....	40
TABELA 1.....	65

**LISTA DE ABREVIATURAS**

Ac-DMQD-AMC	Acetil-Asp-Met-Gln-Asp-amino-4-metilcumarina
AM	azul de metileno
AMC	7-amino-4-metilcumarina
CI50	Concentração inibitória de 50%
CPT	cisplatina
CUR	curcumina
DAF	diacetato de fluoresceína
DMEM	Meio de Eagle modificado por Dulbelco ( <i>Dulbeco's Modified Eagle's Medium</i> )
DOX	doxorrubicina
DTT	ditiotreitól [(2S,3S)-1,4-bis(sulfanil)butano-2,3-diol]
EDTA	ácido etilenodiaminotetraacético
EROS	Espécies reativas de oxigênio
FITC	isotiocianato de fluoresceína
FS	Fotossensibilizador
F10	Mistura de nutrientes F10 de Ham ( <i>Ham's F10 Nutrient mixture</i> )
HO	Hoechst 33342
HPV	Papilomavírus humano
IP	Iodeto de propídeo
LED	Diodo emissor de luz
MCIC	Morte celular independente de caspase
MN	Micronúcleo
MTT	brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-Difeniltetrazólio
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
PBS	Salina tamponada com fosfato
PG	Photogem
SFB	Soro Fetal Bovino
TFD	Terapia Fotodinâmica
TSB	Caldo triptona de soja ( <i>Tryptic Soy Broth</i> )

## SUMÁRIO

CAPÍTULO I.....	12
1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1. HPV e câncer de colo de útero.....	13
1.2. Terapia Fotodinâmica.....	16
2. OBJETIVOS.....	22
2.1. Objetivo Geral.....	22
2.2. Objetivos Específicos.....	22
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1. Linhagens celulares.....	23
3.2. Cultura de células.....	23
3.3. Terapia Fotodinâmica e tratamento com cisplatina.....	23
3.4. Avaliação de citotoxicidade pelo método de redução do MTT.....	24
3.5. Ensaio de morte celular.....	25
3.5.1. Hoechst e iodeto de propídeo.....	25
3.5.2. Ensaio de atividade de caspase-3.....	26
3.6. Ensaio de genotoxicidade.....	27
3.6.1. Citometria de fluxo utilizando anti- $\gamma$ H2AX.....	27
3.6.2. Ensaio do micronúcleo.....	28
3.7. Sobrevivência clonogênica.....	28
3.8. Terapia Fotodinâmica de células tumorais em presença de bactérias.....	29
3.9. Análises estatísticas.....	30
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
4.1. Citotoxicidade.....	31
4.1.1. Terapia Fotodinâmica com azul de metileno e Photogem.....	31
4.1.2. Cisplatina.....	37
4.1.3. Cisplatina e terapia fotodinâmica (terapia combinada).....	41
4.2. Perfil de morte celular.....	47

	11
4.2.1. Ensaio de exclusão de fluorocromos: Hoechst e iodeto de propídeo.....	47
4.2.2. Atividade de caspase-3.....	55
4.3. Genotoxicidade.....	59
4.3.1. Citometria de fluxo utilizando anti- $\gamma$ H2AX.....	59
4.3.1. Micronúcleo.....	62
4.4. Terapia Fotodinâmica em presença de bactérias.....	65
5. CONCLUSÕES.....	66
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69
CAPÍTULO II.....	74
Synesgistic effect of photodynamic therapy and cisplatin: a novel approach for cervical cancer.....	75

## **CAPÍTULO I**

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. HPV e Câncer de Colo de Útero

Os papilomavírus humanos (HPV) são pequenos vírus não envelopados constituídos por uma única molécula de ácido desoxirribonucleico (DNA) circular duplo, contendo em média 7.900 pares de base e pertencentes à família *Papillomaviridae*, que infectam exclusivamente as células basais epiteliais da pele ou mucosas, adentrando o epitélio através de microlesões. Existem mais de 100 tipos de HPV conhecidos, dentre os quais aproximadamente 40 tipos infectam os tratos respiratório e digestivo superiores e a mucosa anogenital (RODEN; WU, 2006; SOUTO, 2005; WOLSCHICK *et al.*, 2007). De acordo com seu potencial de induzir a transformação celular, os diferentes tipos de HPV são classificados como vírus de baixo risco (6, 11, 42, 43 e 44) ou de alto risco oncogênico (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 e 70). Os tipos de HPV de alto risco são conhecidos como os principais causadores de lesões intraepiteliais escamosas e diversos tipos de câncer, dentre eles o câncer do canal anal, cânceres de cabeça e pescoço e o câncer de colo do útero (também chamado câncer cervical). Os tipos 16 e 18 causam juntos aproximadamente 70% (o tipo 16 responde por cerca de 50% e o tipo 18 por cerca de 20% dos casos) de todos os casos de câncer cervical em todo o mundo, enquanto que os tipos 6 e 11 causam a maioria das verrugas genitais tanto em homens quanto em mulheres (Estimativa INCa, [2013]; RODEN; WU, 2006; WOLSCHICK *et al.*, 2007).

O câncer cervical é o terceiro tipo de câncer mais comum entre as mulheres no mundo e no Brasil, com 530.232 novos casos diagnosticados mundialmente a cada ano e 15.590 novos casos estimados entre as brasileiras para o ano de 2014 (DE SANJOSÉ *et al.*, 2012; Estimativa INCa, [2013]); é a quinta causa de morte por câncer entre as mulheres no mundo, com 275.008 mortes por ano, das quais 88% ocorrem em regiões subdesenvolvidas (DE SANJOSÉ *et al.*, 2012). O câncer cervical é uma neoplasia maligna diretamente associada ao vírus HPV que se inicia com transformações intraepiteliais e apresenta caráter insidioso e progressivo, podendo haver um lapso temporal de cerca de 20 anos entre a infecção por um tipo viral de alto risco e o surgimento do carcinoma (LINARD, 2002). A infecção pelo HPV é considerada o fator central e causal do câncer de colo uterino, com o DNA viral sendo detectado em 99,7% dos casos (FRANCO *et al.*, 2001). Entretanto, apesar de ser considerada uma condição necessária, a presença do vírus por si só não representa uma causa suficiente para o surgimento do câncer cervical. Além de

aspectos relacionados à própria infecção pelo HPV (tipo e carga viral; infecção única ou múltipla; e natureza, intensidade e duração do contato), outros fatores ligados à imunidade, à genética e ao comportamento sexual da mulher (relação com múltiplos parceiros, por exemplo) parecem influenciar os mecanismos ainda incertos que determinam a regressão ou a persistência da infecção e também a progressão para lesões precursoras ou câncer. A idade também é fator importante, pois a maioria das infecções por HPV em mulheres com menos de 30 anos regride espontaneamente, ao passo que, acima dessa idade, a persistência é mais frequente (BRAUN-FALCO *et al.*, 1997; Estimativa INCa, [2013]).

As infecções por HPV, juntamente com as infecções por clamídia e herpes simplex, são as mais comuns entre as doenças sexualmente transmissíveis (WASF *et al.*, 2005). A prevalência é alta entre mulheres jovens (principalmente com idade entre 20 e 25 anos), decrescendo nos grupos de meia idade e aumentando nos grupos com idade acima de 60 anos (BURCHELL *et al.*, 2006). Diversos estudos associam a presença da infecção pelo HPV à maior incidência de infecções provocadas por outros microrganismos, indicando que uma infecção pode favorecer a instalação de outra (MELO *et al.*, 2003; PLATZCHRISTENSEN; SUNDSTROM; LARSSOM, 1994; SOBEL *et al.*, 1993)

A incidência do câncer de colo do útero ocorre a partir dos 20 anos, aumentando em passo acelerado até atingir o pico etário entre 50 e 60 anos; são reconhecidas maiores taxas de incidência em países em desenvolvimento, o que poderia ser explicado pela inexistência ou pouca eficiência dos programas de rastreamento. (Estimativa INCa, [2013]). O teste de Papanicolaou convencional constitui o principal método utilizado para detecção precoce das lesões que podem levar ao câncer de colo uterino. O exame é realizado na rotina ginecológica de mulheres sexualmente ativas e permite detectar lesões cervicais em estágios iniciais, possibilitando prevenir a evolução do quadro. Estudos demonstram que rastreamentos efetivos por Papanicolaou reduzem a incidência do câncer cervical em até 80% e que lesões detectadas precocemente apresentam até 100% de chance de cura (RODEN; WU, 2006).

Foi aprovada em 2006 a vacina contra o HPV, uma promissora ferramenta preventiva no combate ao câncer causado por esse vírus. A vacina profilática foi idealizada para proteger mulheres de 9 a 26 anos e é composta por partículas semelhantes ao vírus, formadas pela proteína L1 do capsídeo do HPV, o que confere proteção restrita ao tipo viral. Embora tenha sido concebida para uma ampla

faixa etária, os estudos demonstraram que a vacinação antes da iniciação sexual produz melhores resultados (CUTTS et al., 2007). Duas vacinas estão no mercado: as vacinas quadrivalente (HPV tipos 6,11,16 e 18: Gardasil<sup>®</sup> - MSD) e bivalente (HPV tipos 16 e 18: Cervarix<sup>®</sup> - GSK). Isso significa que, embora seja uma alternativa promissora e valiosa para reduzir a taxas de incidência de câncer de colo de útero e outras lesões provocadas pelo HPV, a vacinação não elimina os programas de rastreamento e detecção precoce de lesões cervicais através do Papanicolaou. Ainda, a vacina apresenta custo elevado e é sensível ao calor e, dado que a maior incidência de câncer cervical está nos países em desenvolvimento, essas características podem se mostrar um inconveniente importante e tornar a vacinação em massa uma prática distante da realidade de países subdesenvolvidos (RODEN; WU, 2006). A vacina contra o HPV foi incorporada ao Programa Nacional de Imunizações do Brasil em 2014, sendo distribuída pelo Sistema Único de Saúde (SUS) para meninas de 11 a 13 anos inicialmente; a partir de 2015 a vacinação passará a abranger também meninas de 9 a 11 anos.

As opções terapêuticas disponíveis atualmente para o tratamento da infecção por HPV e do câncer cervical envolvem métodos cirúrgicos e não cirúrgicos, de acordo com a gravidade da lesão e o estadiamento do tumor maligno. Em geral, lesões intraepiteliais não invasivas identificadas apenas microscopicamente são tratadas com procedimentos ablativos superficiais como a crioterapia (custo baixo e tem boa indicação nas pequenas lesões vulvares e cervicais) e a vaporização a laser de CO<sub>2</sub> (permite o perfeito controle da profundidade da destruição tecidual e rápida cicatrização). Técnicas excisionais, das quais a conização é a mais comum, são consideradas o tratamento padrão para as neoplasias malignas cervicais intraepiteliais (NIC; lesão precursora do carcinoma cervical invasivo); o procedimento pode ser realizado através de bisturi de lâmina fria, laser e, mais modernamente, pela cirurgia de alta frequência. A histerectomia (remoção cirúrgica do útero) tem sido utilizada nos estágios finais do carcinoma invasivo (WOLSCHICK *et al.*, 2007).

Na dependência do estágio e das características do tumor maligno, pode-se empregar mais de uma técnica ou ainda associá-las com radioterapia e/ou quimioterapia (BOARDMAN, 2011; WOLSCHICK *et al.*, 2007). A cisplatina é o quimioterápico mais empregado no tratamento dos tumores malignos em estadiamento intermediário a avançado (IB, IIA, IIB, IIIA, IIIB e IVA), frequentemente



associada à radioterapia e/ou a outros quimioterápicos, como a 5-fluoruracila (BOARDMAN, 2011), além da cirurgia. A cisplatina é um agente que forma adutos com o DNA, resultando em ligações intra e intercadeia que bloqueiam os processos de replicação e transcrição e ativam os mecanismos de reparo do DNA, que devem culminar na morte da célula por apoptose uma vez que o dano causado é irreversível (CRESCENZI *et al.*, 2004). Essa característica faz da cisplatina um ótimo fármaco anticâncer, porém sua alta toxicidade aos sistemas renal, nervoso e sanguíneo e a grande resistência à sua ação apresentada por muitos tumores limitam seu uso clínico, forçando o uso de associações com outras terapias para reduzir a dose de cisplatina administrada ao paciente (GE *et al.*, 2011).

As terapias descritas tem se mostrado satisfatoriamente eficazes, porém a maior desvantagem comum a todos os métodos de tratamento das neoplasias malignas intraepiteliais é a excisão substancial do estroma cervical, que pode causar insuficiência cervical (com parto prematuro ou bebês com baixo peso, dentre outras complicações, em uma futura gestação) ou estenose cicatricial cervical. Uma modalidade de tratamento que preserve o colo do útero é, portanto, desejável. A terapia fotodinâmica tem se mostrado uma alternativa de tratamento promissora nesse aspecto (SOERGEL *et al.*, 2010).

## **1.2. Terapia Fotodinâmica**

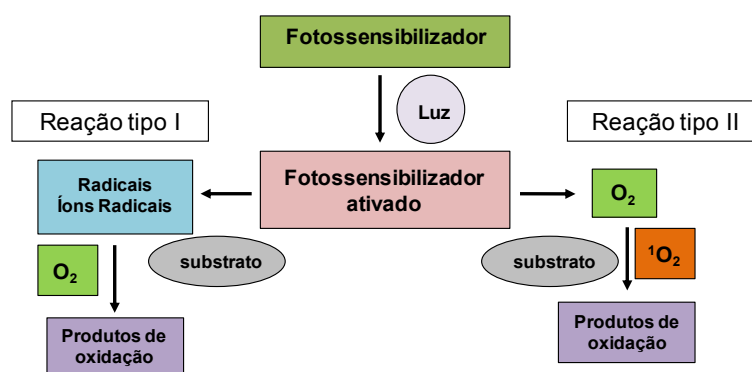
A terapia fotodinâmica (TFD) vem se mostrando uma alternativa interessante aos tratamentos atuais contra diversos tipos de câncer. Essa técnica é baseada na administração de um agente fotossensibilizador não tóxico ao paciente, por via tópica ou parenteral, com posterior exposição a uma fonte de luz de comprimento de onda pré-determinado (MROZ *et al.*, 2011). O fotossensibilizador (FS) acumula seletivamente nas células tumorais malignas e na vasculatura associada e torna o tecido sensível ao comprimento de onda específico absorvido pelo FS, resultando em resposta fototóxica, via dano oxidativo (LIM *et al.*, 2012; MROZ *et al.*, 2011). Assim sendo, três fatores atuam concomitantemente na TFD: o fotossensibilizador, a fonte de luz e o oxigênio. Isoladamente, nem o FS nem a fonte de luz devem ter a capacidade de produzir efeito deletério ao tecido (LIM *et al.*, 2012).

A interação do FS no estado excitado com o meio pode ocorrer de duas formas, chamadas reações tipo I e II (Figura 1). Na reação tipo I, o FS no estado tripleto excitado reage com substratos oxidáveis (por exemplo, lipídios e proteínas da membrana plasmática) transferindo átomos de hidrogênio por via radicalar para

dar origem a radicais e íons radicais que então reagem com o oxigênio molecular e geram os produtos de oxidação. Já na reação tipo II, o FS tripleto excitado transfere energia diretamente ao oxigênio em seu estado tripleto fundamental, em um fenômeno chamado aniquilação tripleto-triplete, formando oxigênio singleto, altamente reativo e citotóxico. Ambas as reações ocorrem ao mesmo tempo e a relação entre esses dois processos depende do fotossensibilizador utilizado, das concentrações de substrato e oxigênio e também da afinidade de ligação do FS com o substrato (DOLMANS; FUKUMURA; JAIN, 2003; MACHADO, 2000; RIBEIRO *et al.*, 2011).

As subsequentes reações das espécies reativas de oxigênio (ERO) no meio biológico resultam na inativação das células-alvo através de reações de óxido-redução com lipídeos de membrana, ácidos nucleicos e proteínas, o que provoca a indução de apoptose, necrose ou ambas e pode levar à formação de um ambiente imunológico favorável ao desenvolvimento de uma imunidade tumoral duradoura. Acredita-se que a indução de morte celular mista, isto é, com características necróticas e apoptóticas concomitantes, tenha maior potencial para induzir uma resposta imunológica antitumoral; entretanto, o tipo de morte celular induzido pela TFD depende da localização do FS na célula no momento da irradiação, o que é reflexo da natureza química dessa substância, da dose de luz, do tipo celular e também do protocolo de incubação empregado (DELLINGER *et al.*, 1996; PENG *et al.*, 1996; CHAN *et al.*, 2000; ROUSSET *et al.*, 2000; FABRIS *et al.*, 2001; WYLD; REED; BROWN, 2001).

**FIGURA 1 – Reações tipo I e tipo II na Terapia Fotodinâmica.**



Após a absorção de luz o fotossensibilizador passa a seu estado excitado, podendo sofrer dois tipos de reação: pode reagir diretamente com um substrato oxidável (por exemplo, a membrana plasmática) ou com uma molécula, transferindo um átomo de hidrogênio para formar radicais, os quais reagem com o oxigênio para formar produtos oxigenados (reação tipo I). De forma alternativa, o fotossensibilizador ativado por transferir sua energia diretamente ao oxigênio para formar oxigênio singleto, que oxida vários substratos (reação tipo II). [Modificado de: Dolmans, Fukumura e Jain *Nature Reviews Cancer* 3, 380–387 (Maio 2003) | doi:10.1038/nrc1071]

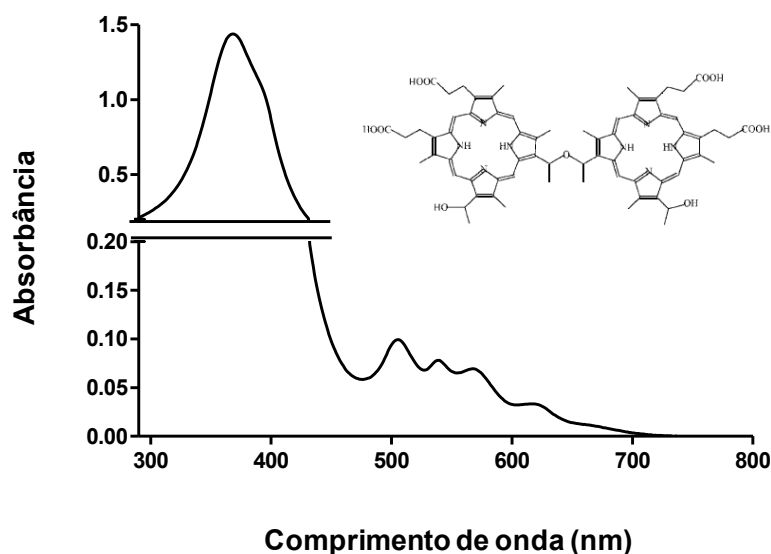
Por suas características, a TFD apresenta várias vantagens no tratamento do câncer: não apresenta efeitos colaterais de longo prazo quando devidamente utilizada; é menos invasiva que procedimentos cirúrgicos; geralmente dura pouco tempo e é mais frequentemente feita em ambulatório; pode ser direcionada de forma muito precisa porque apresenta dupla seletividade (a iluminação precisa da área-alvo aumenta a seletividade da terapia, uma vez que somente na área irradiada ocorre o efeito fotodinâmico); pode ser repetida várias vezes em um mesmo local se necessário, ao contrário da radiação; há pouca ou nenhuma cicatriz após a cura e geralmente custa menos que outros tratamentos contra o câncer (BROWN, S.B.; BROWN, E.A.; WALKER, I., 2004). Como toda terapia, porém, apresenta algumas limitações: funciona apenas no local irradiado pela luz, independente de o FS ter atingido várias regiões do corpo, o que a impossibilita de ser utilizada em metástases porque a tecnologia atual não permite a irradiação do corpo todo com a dose de luz apropriada; e alguns FS utilizados atualmente deixam o paciente sensível à luz por algum tempo (BROWN, S.B.; BROWN, E.A.; WALKER, I., 2004).

Para o sucesso da Terapia Fotodinâmica, a escolha do fotossensibilizador é crucial. O FS deve ser preferencialmente excitado por luz no comprimento de onda na região do espectro visível e, em geral, utiliza-se a janela terapêutica de 600 a 700 nm, onde há maior capacidade de penetração tecidual; não pode ser tóxico para a célula (ou seja, não pode provocar morte celular na ausência de luz); deve ser seletivamente captado e/ou retido pelas células-alvo e deve induzir morte celular imunogênica (definida por alterações na composição da superfície celular com liberação de mediadores solúveis e ativação de células dendríticas e linfócitos T) para favorecer o desenvolvimento de uma resposta imunológica contra o tumor maligno (DOUGHERTY; MARCUS, 1992; MROZ *et al.*, 2011; RIBEIRO *et al.*, 2011). O azul de metileno e o Photogem são dois fotossensibilizadores que, a princípio, atendem a esses quesitos.

O Photogem (éter di-hematoporfirínico) foi o primeiro derivado hematoporfirínico produzido e testado na TFD e é o mais utilizado até hoje, sendo aprovado para uso clínico em diversos países, como Canadá, Estados Unidos e Japão (sob o nome comercial Photofrin). Seu espectro de absorção mostra uma banda intensa a 400 nm e uma mais discreta a 630 nm (Figura 2), esta última representando o comprimento de onda utilizado para excitá-lo na TFD. É geralmente administrado por via endovenosa aos pacientes e tem como principal reação adversa a fotossensibilidade por algumas semanas após a administração. Devido à sua baixa absorção de luz na janela terapêutica e a indução de fotossensibilidade

prolongada, derivados hematoporfirínicos de segunda geração foram desenvolvidos, com melhores características de absorção e menores efeitos adversos. Entretanto, o Photogem ainda é o mais utilizado na prática clínica (MACHADO, 2000). O Photogem ocorre sempre na forma de dímeros ou oligômeros e, por ser um derivado porfirínico, tenderia a se acumular na mitocôndria das células-alvo, favorecendo a morte por apoptose. Entretanto, estudos revelaram que o Photogem pode induzir morte celular por apoptose, necrose ou ambas, resultando num tipo misto de morte, dependendo da localização desse FS nas células (HE *et al.*, 1994; DELLINGER, 1996; FORMIGLI *et al.*, 2000; DELLINGER *et al.*, 2001; HSIEH *et al.*, 2003). Danos na membrana plasmática também foram observados, em sua maioria decorrente de peroxidação lipídica (GIBSON *et al.*, 1988; THOMAS; GIROTTI, 1989; BUETTNER *et al.*, 1993).

**FIGURA 2 – Espectro de absorção UV-VIS do Photogem.**

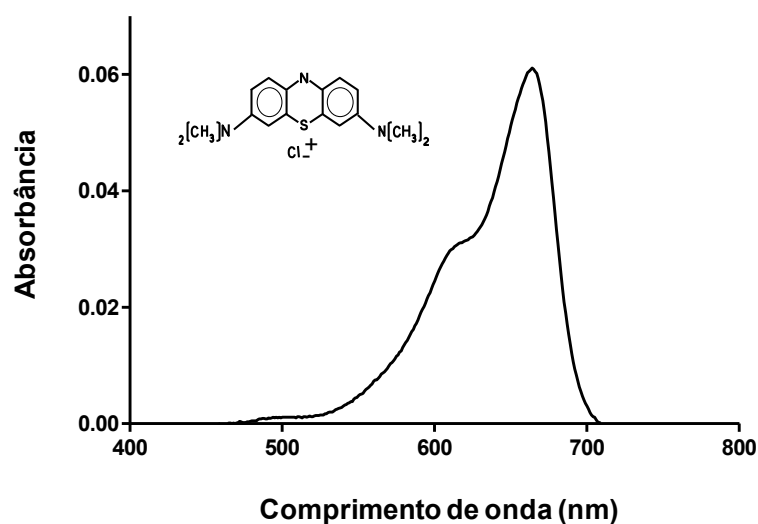


Espectro de absorção Ultravioleta-Visível de solução aquosa diluída de Photogem, obtido com o equipamento multiusuário *Lambda 1050 UV/Vis/NIR spectrophotometer* (PerkinElmer, EUA) do Instituto de Química – UNESP Araraquara. São visíveis a banda de Soret (intensa absorção em 400 nm) e as bandas Q (absorções fracas entre 500 e 650 nm), tipicamente presentes no espectro de absorção de porfirinas.

O azul de metileno é um derivado fenotiazínico de fácil obtenção e baixo custo que absorve luz intensamente na janela terapêutica, em 660 nm (Figura 3), apresenta baixa toxicidade no escuro e apresenta um alto rendimento quântico de formação de oxigênio singleto (GABRIELLI *et al.*, 2004; TARDIVO *et al.*, 2005; BLÁZQUEZ-CASTRO *et al.*, 2009). É muito solúvel em água, o que permite

desenhos experimentais diretos com a incubação do FS diretamente no meio de cultura (BLÁZQUEZ-CASTRO *et al.*, 2009). O seu balanço hidrofílico/lipofílico e sua carga positiva permitem que atravesse facilmente membranas biológicas e se acumule em organelas, especialmente na mitocôndria, que apresenta potencial negativo de cargas (TARDIVO *et al.*, 2005). O emprego do azul de metileno como fotossensibilizador predomina na terapia fotodinâmica antimicrobiana, para eliminação de micro-organismos como *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis* e *Escherichia coli*. Entretanto, seu uso como FS na TFD anticâncer vem crescendo com resultados promissores, como os apresentados por Tardivo e seus colaboradores (TARDIVO *et al.*, 2005) e Wagner e colaboradores (WAGNER *et al.*, 2012), entre outros trabalhos. Assim sendo, estudos que contribuam para os conhecimentos sobre a atividade antitumoral do azul de metileno como fotossensibilizador na TFD podem colaborar para o desenvolvimento de uma terapia anticâncer eficiente e de baixo custo, uma vez que é mais barato e de mais fácil obtenção que os FS convencionais.

**FIGURA 3 – Espectro de absorção UV-VIS do azul de metileno**



Espectro de absorção Ultravioleta-Visível de solução aquosa diluída de azul de metileno, obtido com o equipamento multiusuário *Lambda 1050 UV/Vis/NIR spectrophotometer* (PerkinElmer, EUA) do Instituto de Química – UNESP Araraquara. Vê-se uma absorção intensa ao redor de 660 nm, característica de soluções diluídas de azul de metileno, onde há predominância de monômeros.

A fonte de luz é outro parâmetro importante a ser considerado. Diversas fontes vêm sendo estudadas e aplicadas à TFD, em especial os LEDs e lasers. Ambos apresentam um espectro de emissão monocromático característico e

dependente do material que os compõem, mas os LEDs (do inglês, *Light Emitting Diodes*) vêm ganhando espaço em relação aos lasers graças a algumas vantagens que apresentam, como um custo mais baixo de produção e manutenção, longa vida de duração, facilidade de serem transportados e de serem dispostos em conjunto para irradiar grandes áreas de acordo com o formato desejado (por exemplo, uma placa de 96 poços pode ser irradiada de uma só vez com um conjunto de LEDs, mas teria que ter seus poços irradiados um a um por um laser). Dessa forma, o emprego de LEDs como fonte de luz na terapia fotodinâmica é uma abordagem econômica e simples, tanto na pesquisa quando na prática clínica (BLÁZQUEZ-CASTRO *et al.*, 2009; CHEN *et al.*, 2012).

Vários estudos envolvendo a TFD e o câncer cervical por HPV vêm sendo realizados e demonstram que essa terapia não provoca danos ao tecido cervical normal e não está associada à incompetência cervical característica dos procedimentos cirúrgicos padrão utilizados em pacientes com neoplasia maligna intraepitelial cervical (NIC) (SOERGEL *et al.*, 2012). Diante do exposto, este estudo se propôs a avaliar a eficácia da TFD sobre células cervicais tumorais malignas utilizando azul de metileno ou Photogem como fotossensibilizadores, a associação da TFD à cisplatina e os efeitos genotóxico e mutagênico da TFD isolada e combinada.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral

Avaliar a eficácia *in vitro* da terapia fotodinâmica (TFD) mediada por Photogem ou azul de metileno, a associação da TFD com a cisplatina e os efeitos genotóxicos e mutagênicos da TFD isolada e combinada.

### 2.2. Objetivos Específicos

Avaliar nas linhagens celulares de carcinoma de colo uterino infectadas por HPV16 (SiHa), não infectadas (C-33 A) e a linhagem normal HaCaT:

- Se a TFD isolada e combinada induz citotoxicidade, utilizando o ensaio de redução do MTT;
- O perfil de morte celular induzida pela TFD isolada e combinada, utilizando Hoechst/Iodeto de propídeo (microscopia de fluorescência) e atividade de caspase-3.
- Se a TFD isolada e combinada induz genotoxicidade, utilizando a citometria de fluxo com o anticorpo anti- $\gamma$ H2AX e o ensaio de micronúcleo;
- O efeito da TFD isolada e combinada em presença de bactérias (simulação *in vitro* de um ambiente cervical).

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Linhagens Celulares**

C-33 A (ATCC HTB-31): Células originárias de biópsias de carcinoma do cérvix uterino, negativas para o DNA e RNA do papilomavírus humano, pseudodiploides (70% das células tem 46 cromossomos) e com morfologia epitelial.

HaCaT (CLS 300493): Células originárias de pele histologicamente normal (queratinócitos), transformadas espontaneamente *in vitro*.

SiHa (ATCC HTB-35): Células originárias de carcinoma de células escamosas do cérvix uterino grau II, infectadas com HPV16 (1 a 2 cópias/célula), hipertriploide (69 a 72 cromossomos) e com morfologia epitelial.

#### **3.2. Cultura de células**

As linhagens C-33 A, HaCaT e SiHa, foram cultivadas em uma mistura 1:1 (v/v) DMEM e Ham's F10 (Sigma Co., St. Louis, EUA) acrescido de 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, 0,25 µg/mL de anfotericina B, 0,1 mg/mL de canamicina (Sigma Co., St. Louis, EUA) e 10% de soro fetal bovino (SFB - Cultlab, Campinas, Brasil). As células foram cultivadas em garrafas de cultura, mantidas em atmosfera úmida a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub> até que a monocamada celular estivesse confluenta. Em seguida, as células foram lavadas com 3 mL de solução de Hank (0,4 g de KCl; 0,06 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,04 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,35 g de NaHCO<sub>3</sub>; 1 g de glicose, H<sub>2</sub>O q.s.p. 1.000 mL) e desprendidas da garrafa com 2 mL de Tripsina-EDTA 0,05% (Gibco, Waltham, MA, EUA). Após o desprendimento do tapete celular, as células foram homogeneizadas com 3 mL de DMEM/F10 acrescido de 10% de soro fetal bovino e a suspensão celular obtida foi transferida para outras garrafas. Esse procedimento foi repetido até que houvesse quantidade de células suficiente para os ensaios.

#### **3.3. Terapia Fotodinâmica e tratamento com cisplatina**

As linhagens C-33 A, HaCaT e SiHa foram cultivadas em placas de 6, 12, 24 ou 96 poços por 24h, a uma concentração adequada de células para cada ensaio. Em seguida, o meio de cultura (DMEM/F10 + 10% SFB) foi removido e as células foram tratadas com azul de metileno ou Photogem em concentrações pré-



estabelecidas com base na literatura (ambos solubilizados em DMEM/F10 sem soro). Após o período de incubação com o fotossensibilizador (20 minutos para o azul de metileno e 2 horas para o Photogem), as células foram tratadas ou não com luz (Biotable 660 ou 630 nm) também em várias doses ( $J/cm^2$ ) pré-estabelecidas e incubadas por 24 horas em DMEM/F10 +10% SFB. Todos os procedimentos foram executados na ausência de luz policromática incidente sobre as células.

Para o tratamento com cisplatina (Tecnoptatin®, Zodiac), as linhagens foram cultivadas da mesma forma e receberam concentrações variadas e pré-estabelecidas do quimioterápico por 6, 12 ou 24 horas antes ou após a TFD e na ausência desta.

### **3.4. Avaliação de citotoxicidade pelo método de redução do MTT**

O MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]} (Sigma Co., St. Louis, EUA) é um corante tetrazólico de cor amarela, solúvel em água, que é reduzido pelas células vivas (mas não pelas mortas) a um produto violeta e insolúvel em soluções aquosas. A solubilização desse produto e sua quantificação espectrofotométrica permite determinar a porcentagem de células vivas presentes no meio. Dessa forma, a redução do MTT permite avaliar o potencial citotóxico de uma terapia em estudo.

Para o ensaio, as linhagens C-33 A, HaCaT e SiHa foram cultivadas em placas de 96 poços a uma concentração de  $1,0 \times 10^5$  células/mL por 24h e tratadas conforme descrito no item 3.3. A solução de MTT foi preparada em duas etapas: primeiro, o sal foi dissolvido em PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM,  $Na_2HPO_4$  10,1 mM,  $KH_2PO_4$  1,8 mM pH7,4) a uma concentração de 5 mg/mL; sem seguida, essa solução foi diluída 1:10 em meio de cultura sem soro para uma concentração final de 0,5 mg/mL. Após o período de recuperação, o meio de cultura foi removido das placas e cada poço recebeu a adição de 100  $\mu$ L de MTT a 0,5 mg/mL; a placa foi então incubada a 37°C por 3 horas. A solução de MTT foi removida e 100  $\mu$ L de isopropanol acidificado (HCl 0,04 M) foram adicionados para solubilizar os cristais violeta, e a placa levada para leitura espectrofotométrica em 570 nm em leitor de placas Bio-Tek Powerwave X (BioTek Instruments, Inc.,EUA), com agitação prévia de 2 minutos em baixa velocidade. A porcentagem de células vivas em relação ao controle negativo, representando a citotoxicidade de cada tratamento, foi calculada em relação ao controle negativo, de acordo com a fórmula a seguir:

$$\% \text{ de células vivas em relação ao controle negativo} = \frac{(\text{média absorvância do teste} - \text{média absorvância do branco})}{(\text{média absorvância do controle negativo} - \text{média absorvância do branco})} \times 100$$

### **3.5. Ensaios de morte celular**

#### **3.5.1. Hoechst e iodeto de propídeo**

O ensaio citomorfológico de marcação com Hoechst 33342 (HO) e iodeto de propídeo (PI) permite a diferenciação entre apoptose precoce, tardia e necrose, utilizando o método de exclusão de fluorocromos. Este método foi realizado de forma semiautomatizada no IN Cell Analyzer 2000 (GE Healthcare Life Sciences, Pittsburgh, PA, EUA), nas dependências do Núcleo de Proteômica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara - UNESP.

Para o ensaio no IN Cell Analyzer 2000 (GE Healthcare Life Sciences, Pittsburgh, PA, EUA), as células foram cultivadas em placa de 96 poços a uma concentração de 5.000 células por poço ( $5,0 \times 10^4$  cél/mL) e tratadas conforme descrito no item 3.3. Ao completar o tempo de incubação do tratamento, a placa foi centrifugada a 2.500 rpm por 5 minutos a 4°C, para sedimentar as células que estivessem desprendidas. O meio com tratamento foi removido com cuidado, e 100 µL de PBS 1X gelado foram adicionados a cada poço; a placa foi novamente centrifugada a 2.500 rpm por 5 minutos a 4°C. O PBS foi removido e, no escuro, foram adicionados 100 µL da solução de corantes (HO 1 mg/mL – 15%; IP 1 mg/mL 25%, DAF 1 mg/mL 35%. O volume final foi obtido pela adição de PBS 1X gelado) a cada poço. A placa foi envolta em papel alumínio e incubada por 10 minutos à temperatura ambiente. O equipamento INCell Analyzer 2000 foi programado para capturar 12 campos de imagem por poço, em cada um dos filtros, utilizando a objetiva de 20X. As imagens obtidas foram fundidas através do software IN Cell Analyzer 1000 Workstation 3.7 (GE HealthCare, Pittsburgh, PA, EUA) e as células foram contadas manualmente. Foram contadas 500 células por poço e a apoptose foi avaliada qualitativa e quantitativamente, através da determinação da porcentagem de células em apoptose precoce, tardia e em necrose, levando-se em consideração a morfologia e coloração celular.

### 3.5.2. Atividade de caspase-3

As caspases são proteases que atuam como mediadores cruciais da morte celular por apoptose. São categorizadas em caspases iniciadoras ou efetoras, de acordo com o seu papel na via apoptótica. Dentre elas está a caspase-3, uma caspase efetora que pode ser ativada pelas caspases 8 ou 9 (combinadas a outros fatores apoptóticos). Uma vez ativada, a caspase-3 promove a clivagem de PARP1 (poli (ADP-ribose) polimerase 1) e a fragmentação internucleossomal do DNA, uma das marcas registradas da apoptose (PORTER; JÄNICKE, 1999). A detecção de caspases ativas na célula é um forte indício de está ocorrendo morte celular por apoptose. A detecção da atividade catalítica da caspase-3 pode ser realizada utilizando-se substratos que consistem de uma sequência peptídica rica em ácido aspártico (por exemplo, Asp-Met-Gln-Asp [DMQD]) acoplada uma molécula como a aminometilcumarina (AMC), que gera o grupo repórter fluorescente 7-amino-4-metilcumarina após ser clivada do peptídeo pela ação da protease. A fluorescência é quantificada e reflete a quantidade de caspase-3 ativa nas células.

Para este ensaio, as células foram plaqueadas a uma concentração de  $2 \times 10^5$  cél./mL em placa de 96 poços de fundo preto, própria para leitura fluorimétrica, e foram incubadas por 24 horas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> em atmosfera úmida. As células foram tratadas conforme descrito no item 3.3 e, imediatamente ao término do tratamento, a placa foi colocada em gelo. O meio contendo as substâncias de tratamento foi removido e cada poço recebeu 100 µL de tampão de lise (50 mM Tris pH 7,4; 150 mM NaCl; 0,5% Triton X-100; EDTA 2 mM; DTT 5 mM). A placa foi então incubada em gelo por 20 minutos e, em seguida, cada poço recebeu 100 µL do substrato Ac-DMQD-AMC a 20 µM, preparado no mesmo tampão. Durante o tempo de incubação foi preparada a curva padrão de AMC, com concentrações decrescentes em 50% partindo de 4 µM. A placa foi levada para leitura *top* em fluorímetro (FLx800™ *Fluorescence Reader*, BioTek - Winooski, VT, EUA; excitação 360/40 nm e emissão 460/40 nm) e agitada automaticamente pelo equipamento antes do início da leitura de fluorescência, que foi feita a 37°C. Os resultados foram expressos em concentração de AMC, com base na curva padrão. Este ensaio foi realizado em colaboração com o Laboratório de Bioquímica Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP.

### 3.6. Ensaios de genotoxicidade

#### 3.6.1. Citometria de fluxo utilizando anti- $\gamma$ H2AX

H2AX é uma variante específica da família de histonas H2A que sofre rápida fosforilação na serina 139 de sua porção C-terminal em resposta à danos na dupla fita do DNA (ROGAKOU et al, 1998). A proteína fosforilada é conhecida por  $\gamma$ H2AX (gama-H2AX). A detecção de  $\gamma$ H2AX por citometria de fluxo tem se tornado uma alternativa mais rápida e robusta ao clássico ensaio do cometa (WATTERS et al, 2009).

Para o ensaio, as células foram plaqueadas a uma concentração de  $2 \times 10^5$  cél./poço ( $4 \times 10^5$  cél./mL), em placa de 24 poços. Após 24 horas de incubação a  $37^\circ\text{C}$  e 5% de  $\text{CO}_2$  em atmosfera úmida, as células foram tratadas conforme descrito no item 3.3. Finalizado o tratamento, as células foram tripsinizadas e centrifugadas a 2.500 rpm por 10 minutos. O *pellet* de células foi suspenso em 1 mL de paraformaldeído a 4% (em PBS1X) e incubado por 10 minutos à temperatura ambiente, sendo em seguida centrifugado a 2.500 rpm por 10 minutos. Após lavagem com PBS1X, cada *pellet* foi suspenso em 1 mL de metanol 70% (70% metanol e 30% PBS 1X) e armazenado a  $-20^\circ\text{C}$  até o dia da citometria. Na etapa seguinte, as células foram centrifugadas a 2.200 rpm por 5 minutos e lavadas com PBS 1X. Para a permeabilização, as células foram suspensas em 0,025% de Triton-X-100 e incubadas por 5 minutos, sendo na sequência centrifugadas a 2.200 rpm por 5 minutos e lavadas com PBS 1X novamente. Em temperatura ambiente, as células foram incubadas durante 1 hora (sem agitação) com anticorpo anti-  $\gamma$ H2AX na diluição 2,5: 1.000. Novamente, as células foram centrifugadas a 2.200 rpm por 5 minutos e lavadas com PBS 1X. Em seguida, foram incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente com anticorpo secundário conjugado com AlexaFluor®488 (diluição 2,5:1000), sem agitação. Uma vez mais, as suspensões celulares foram centrifugadas a 2.200 rpm por 5 minutos e lavadas com PBS 1X, sendo por fim suspensas em 60  $\mu\text{L}$  de PBS 1X e analisadas por citometria de fluxo em equipamento FACSCanto (BD - Becton, Dickinson and Company, New Jersey, EUA), nas dependências da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP.

### 3.6.2. Ensaio do micronúcleo

A indução de micronúcleos é a principal característica de compostos genotóxicos e a análise de formação de micronúcleos resultantes de quebras no DNA ou interferência com a segregação cromossômica é um componente importante do *screening* toxicológico de novos candidatos a fármacos. Este ensaio foi realizado de forma semiautomatizada no equipamento IN Cell Analyzer 2000 (GE Healthcare Life Sciences, Pittsburgh, PA, EUA).

Para o ensaio, foram plaqueadas 5.000 células por poço em placa de 96 poços. Após 24 horas de incubação a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> em atmosfera úmida, as células foram tratadas conforme descrito no item 3.3, o meio contendo o tratamento foi substituído por meio completo (DMEM/F10 suplementado com 10% soro fetal bovino) e as células foram deixadas em recuperação por 24 horas. Em seguida, foi adicionado a cada poço 100 µL de meio completo contendo 6 µg/mL de citocalasina-B e as células foram incubadas por mais 24h nas mesmas condições. Após esse período, as células foram fixadas com etanol absoluto por 30, em temperatura ambiente, e coradas com 1 µg/mL de isotiocianato de fluoresceína (FITC) por 30 minutos e 10 µg/mL de Hoechst 33342 por 15 minutos, ambos em temperatura ambiente protegidos da luz. O equipamento INCell Analyzer 2000 foi programado para capturar 12 campos de imagem por poço, em cada um dos filtros, utilizando a objetiva de 20X. As imagens obtidas foram fundidas através do software IN Cell Analyzer 1000 Workstation 3.7 (GE HealthCare, Pittsburgh, PA, EUA) e as células foram analisadas manualmente.

### 3.7. Sobrevivência clonogênica

Ensaio de sobrevivência clonogênica ou ensaio de formação de colônias é um teste *in vitro* baseado na capacidade de uma única célula de crescer e formar uma colônia. A colônia é definida como consistindo de ao menos 50 células. O ensaio avalia cada célula na população por sua habilidade de sofrer divisões “ilimitadas”, permitindo avaliar a morte reprodutiva da célula após um tratamento (FRANKEN, et al., 2006).

Para a avaliação do potencial clonogênico, as linhagens foram plaqueadas (em duplicatas) a uma concentração de 150 células por poço de placa de 6 poços e incubadas até sua adesão ao plástico (cerca de 3 horas a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>; adesão confirmada com observação ao microscópio). Uma vez aderidas, as células

foram tratadas conforme o item 3.3 e, após o tempo estipulado para cada tratamento, o meio contendo o tratamento foi removido e substituído por meio completo (DMEM/F10 suplementado com 10% SFB) e as placas foram incubadas a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> em atmosfera úmida por 7-10 dias. Após os dias de incubação, o meio foi removido e as células foram lavadas com PBS, fixadas com uma mistura metanol/ácido acético/água, na proporção 1: 1: 8, por 30 minutos e coradas com cristal violeta por 15 minutos. As colônias formadas para cada placa foram analisadas com o auxílio de lupa (aumento 16x). Colônias contendo < 50 células foram desprezadas. Os resultados foram expressos em eficiência de plaqueamento (EP) e fração de sobrevivência (FS) de acordo com FRANKEN, et al., 2006:

$$EP = (\text{n}^\circ \text{ de colônias contadas}) / (\text{n}^\circ \text{ de células semeadas}) \times 100$$

$$FS = (\text{n}^\circ \text{ de colônias contadas em cultura tratada} / \text{n}^\circ \text{ de células semeadas}) \times (\text{EP controle}/100)$$

### **3.8. Terapia Fotodinâmica de células tumorais em presença de bactérias**

No primeiro dia, as células foram plaqueadas em placas de 24 poços a uma concentração de  $2 \times 10^5$  cél./mL e incubadas por 24 horas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, e as bactérias foram inoculadas em 3 mL de TSB e incubadas por 18 horas a 35±2°C. No dia seguinte, a concentração inicial dos inóculos bacterianos foi determinada através de medida espectrofotométrica a 630 nm (DO<sub>630</sub>) e ajustada para 10<sup>6</sup> UFC/mL em meio DMEM sem antibióticos suplementado com 10% SFB. Essa concentração bacteriana corresponde a uma multiplicidade de infecção (MOI) de 5:1 (bactérias:células). O meio de cultura das células foi removido e cada poço foi lavado com PBS 1X. Os inóculos bacterianos foram adicionados aos respectivos poços e a placa foi centrifugada a 4.000 rpm por 3 minutos para sedimentar as bactérias e sincronizar a infecção. Após incubação por 1 hora a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, o meio de cultura foi removido e os poços foram lavados com PBS 1X para remover as bactérias não aderidas. Em seguida, as células infectadas foram tratadas com AMTFD (19,5 µM + 5,11 J/cm<sup>2</sup>) ou PGTFD (0,5 µM + 2,76 J/cm<sup>2</sup>) conforme descrito no item 3.3. Após o tratamento, a viabilidade celular das células infectadas e não infectadas foi determinada através do método de redução do MTT, descrito no item 3.4. A leitura espectrofotométrica foi realizada no leitor ELx800™ *Absorbance Reader* (BioTek - Winooski, VT, EUA).

### **3.9. Análises Estatísticas**

Para comparar os valores das variáveis contínuas entre os grupos foram utilizados testes de Análise de Variância (ANOVA), quando possível. O pós-teste mais adequado foi utilizado para identificação do grupo significativamente diferente. As análises foram realizadas através do software GraphPad Prism® Version 5.01 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EUA). O nível de significância adotado para os testes estatísticos foi de 5%, ou seja,  $p < 0.05$ . O Coeficiente de Variação máximo aceitável dos ensaios foi estipulado em 25%.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Citotoxicidade

A terapia fotodinâmica (TFD) é uma combinação de três fatores atuando concomitantemente: o fotossensibilizador (FS), a fonte de luz e o oxigênio. Isoladamente, nem o FS nem a fonte de luz devem produzir efeito deletério ao tecido. Assim sendo, os ensaios de citotoxicidade foram realizados com o FS e a luz isoladamente e com ambos combinados, em concentrações variadas.

Os resultados referentes a esses ensaios integram um manuscrito publicado na revista *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, sob o título “*Synergistic effect of photodynamic therapy and cisplatin: a novel approach for cervical cancer*” (DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2014.08.021), o qual encontra-se sob o Capítulo 2 deste trabalho.

#### 4.1.1. Terapia Fotodinâmica com azul de metileno e Photogem

Para selecionar as melhores condições para a terapia fotodinâmica mediada por azul de metileno (AMTFD) e por Photogem (PGTFD), foram avaliados vários tempos de incubação, concentrações dos fotossensibilizadores e doses de luz, com base na literatura pertinente (BLÁZQUEZ-CASTRO et al., 2009; CHEN et al., 2008; LEUNIG et al., 1994; SHARKEY et al., 1993; dados não mostrados). Os melhores tempos de incubação foram 20 minutos para o azul de metileno (AM) e 2 horas para o Photogem (PG). Doses de luz de até 60 J/cm<sup>2</sup> foram avaliadas; morte celular massiva ocorreu acima de 12,9 J/cm<sup>2</sup> para AMTFD e 2,76 J/cm<sup>2</sup> para PGTFD, o que nos levou a estabelecer 12,9 J/cm<sup>2</sup> e 2,76 J/cm<sup>2</sup> como as doses de luz máximas para as respectivas terapias. De maneira semelhante, concentrações de AM maiores que 78,2 µM (25 µg/mL) e concentrações de PG maiores que 8,5 µM (10 µg/mL) também resultaram em um decréscimo acentuado da viabilidade celular. Dessa forma, as condições dos protocolos de tratamento foram escolhidas de tal forma que uma porcentagem significativa de células sobreviva, permitindo assim que os efeitos da terapia fotodinâmica fossem comparados com os diferentes fotossensibilizadores e linhagens celulares.

Inicialmente, as três linhagens foram expostas a uma alta dose de luz (12,9 J/cm<sup>2</sup>, para o LED 660 nm e 13,8 J/cm<sup>2</sup> para o LED 630 nm) para determinar o potencial citotóxico da luz de forma isolada sobre as células. Os dados apresentados nas figuras 4A e 6A nos mostram que a luz não teve efeito tóxico significativo em nenhum dos três tipos celulares.



Em seguida, as células foram tratadas com azul de metileno e Photogem na ausência de luz. A avaliação da toxicidade dos fotossensibilizadores no escuro é crucial, uma vez que, como já dito, o FS não deve causar efeito deletério à célula quando sozinho. No painel B da Figura 4, observamos que o azul de metileno não produziu efeito tóxico significativo sobre as três linhagens na condição estudada, exceto na concentração mais alta (156,4  $\mu\text{M}$ ), onde observamos uma tendência de morte celular mais pronunciada. Essa concentração, então, foi descontinuada. Da mesma forma, o Photogem não apresentou toxicidade celular em nenhuma das concentrações testadas, o que é visto no painel B da Figura 6. A linhagem SiHa mostrou-se ligeiramente mais sensível ao azul de metileno em relação às outras linhagens, mas não foram observadas diferenças de sensibilidade quando as mesmas foram submetidas ao tratamento com Photogem.

A Figura 5 mostra o comportamento das linhagens frente à terapia fotodinâmica pelo azul de metileno e o LED 660 nm nas doses 1,29  $\text{J}/\text{cm}^2$  (painel A); 2,56  $\text{J}/\text{cm}^2$  (painel B); 5,11  $\text{J}/\text{cm}^2$  (painel C); e 12,9  $\text{J}/\text{cm}^2$  (painel D). Conforme a dose de luz é elevada durante a TFD aumenta-se também o efeito fototóxico; ainda, observa-se uma tendência da linhagem SiHa em apresentar-se mais sensível à TFD com azul de metileno (AMTFD) em relação às outras duas linhagens celulares, o que fica mais evidente nos painéis C e D. Para comprovar essa tendência, a CI50 (concentração inibitória de 50%) das células para a linhagem SiHa foi encontrada na dose de 5,11  $\text{J}/\text{cm}^2$  utilizando concentrações de azul de metileno de 9,8 a 39,1  $\mu\text{M}$ . O CI50 para a linhagem HaCaT foi de 12,9  $\text{J}/\text{cm}^2$  e 78,2  $\mu\text{M}$  de azul de metileno. C-33 A foi a única linhagem cujo CI50 para AMTFD não pode ser determinado nas condições testadas, revelando uma resistência dessa linhagem frente à terapia fotodinâmica, em comparação à SiHa e HaCaT.

Para a realização dos ensaios posteriores, então, escolhemos 5,11  $\text{J}/\text{cm}^2$  e 19,5  $\mu\text{M}$  de azul de metileno, condição na qual são mais evidentes as diferenças de resposta à AMTFD das três linhagens.

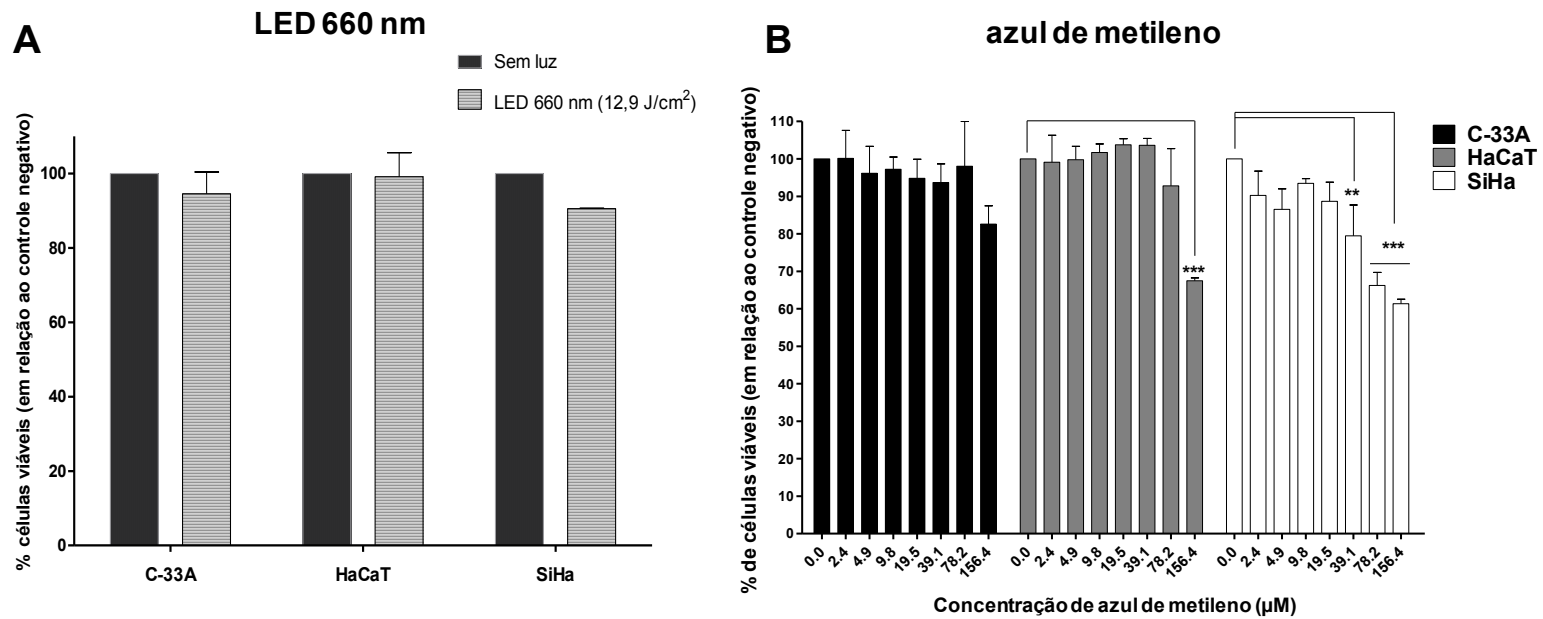
Comparando com os dados obtidos com o azul de metileno, quando a TFD foi mediada pelo Photogem e LED 630 nm (PGTFD) a tendência de maior sensibilidade da linhagem SiHa não foi observada para este fotossensibilizador, como mostram os painéis C e D da Figura 6, mas repetiu-se a dependência da dose de luz no efeito fototóxico. A TFD com Photogem resultou em citotoxicidade muito maior que a observada para o azul de metileno e nas concentrações mais elevadas de Photogem a linhagem mais sensível foi a C-33 A (2,76  $\text{J}/\text{cm}^2$ ), enquanto SiHa e HaCaT apresentaram resultados similares e estatisticamente iguais em praticamente todas

as concentrações avaliadas (de 0,4 a 8,5  $\mu\text{M}$ ). O CI50 para as três linhagens ficou próximo de 2,76  $\text{J}/\text{cm}^2$  e 0,5  $\mu\text{M}$  de Photogem, e esta foi a condição escolhida para a realização dos ensaios seguintes.

Os resultados mostram que, nas condições testadas, ambos os fotossensibilizadores são eficazes na redução da viabilidade das células tumorais. A terapia fotodinâmica com Photogem foi capaz de provocar morte celular em muito baixas concentrações tanto de FS quanto de luz, mas a TFD com azul de metileno demonstrou uma pequena vantagem por ter provocado a morte celular de uma forma aparentemente seletiva, causando maior fototoxicidade na linhagem principal deste estudo, SiHa, e menor fototoxicidade na linhagem considerada normal, HaCaT, mesmo na maior dose de luz empregada. A maior sensibilidade da linhagem SiHa à AMTFD pode ser devida à maior instabilidade genômica provocada pela presença do DNA do vírus HPV16 no genoma da célula (KADAJA et al, 2009), o que pode potencializar o dano genômico provocado pelas espécies reativas de oxigênio geradas pelo tratamento fotodinâmico, culminando então na maior taxa de morte celular observada para as células SiHa tratadas com AMTFD, em comparação com as outras duas linhagens (seção 4.2). Em contraste, a PGTFD não provoca nessa linhagem uma morte celular mais significativa em relação às linhagens C-33 A e HaCaT (seção 4.2).

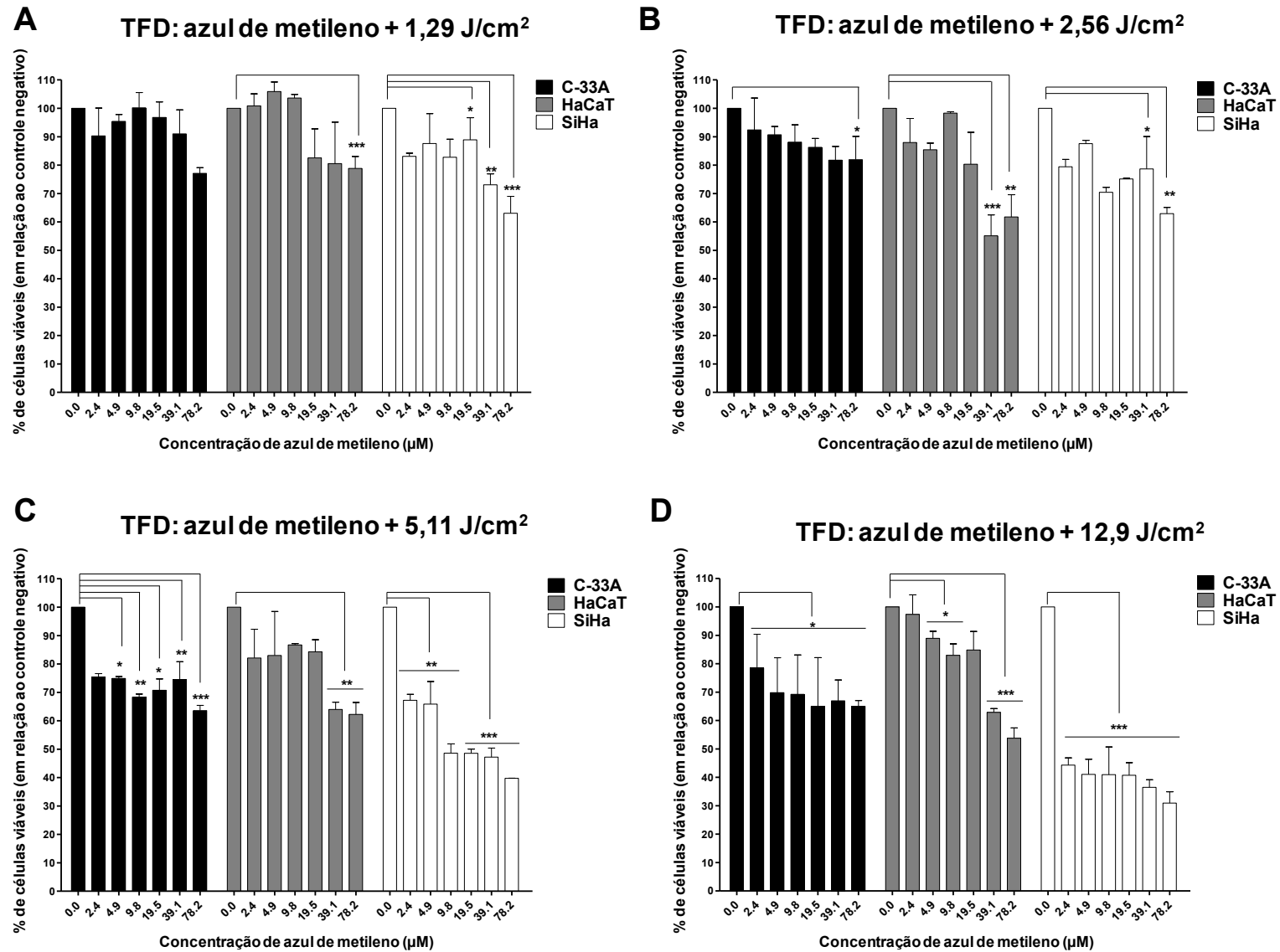
Se considerarmos que virtualmente todos os casos de câncer de colo uterino são provocados por uma infecção por HPV (99,7% dos casos; WALBOOMERS et al., 1999), esse dado torna-se muito interessante.

FIGURA 4 – Determinação do potencial citotóxico do LED 660 nm e do azul de metileno sobre as linhagens C-33A, HaCaT e SiHa.



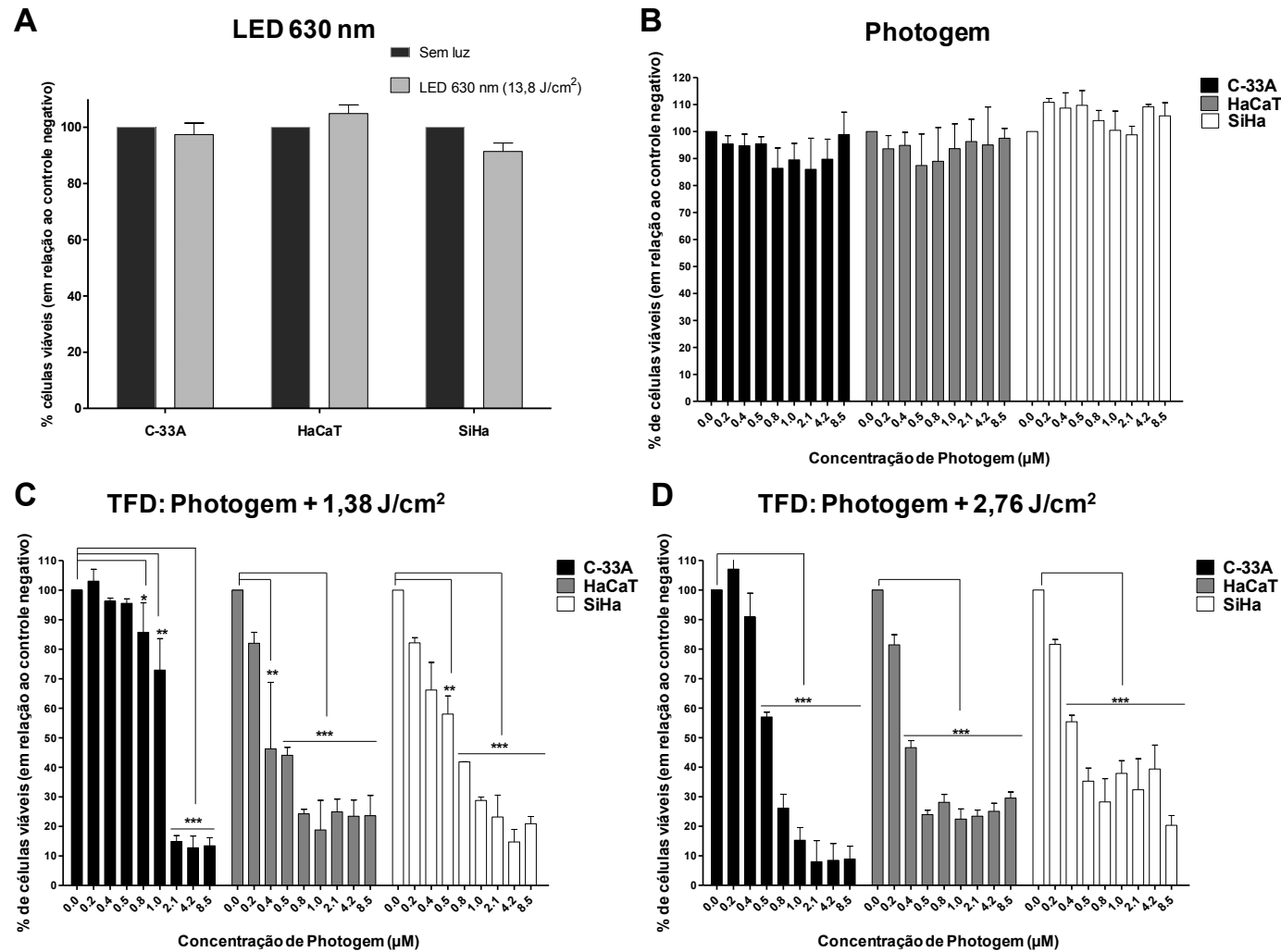
A fonte de luz LED 660 nm não afetou a viabilidade celular na ausência do fotossensibilizador (painel A). O azul de metileno mostrou-se levemente citotóxico apenas na concentração mais elevada (painel B). Os asteriscos indicam onde há diferença estatística. As colunas representam as médias de três quadruplicatas independentes e as barras representam o desvio-padrão. ANOVA one-way, com pós-teste de Tukey. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

FIGURA 5 – Determinação do potencial citotóxico da TFD mediada por azul de metileno e LED 660 nm sobre as linhagens C-33A, HaCaT e SiHa.



Nas doses de luz mais baixas (1,29 J/cm<sup>2</sup> – painel A; 2,56 J/cm<sup>2</sup> – painel B) não foi observada toxicidade celular significativa. Nas doses de luz mais elevadas (5,11 J/cm<sup>2</sup> – painel C; 12,9 J/cm<sup>2</sup> – painel D) a linhagem SiHa mostrou-se significativamente mais sensível à TFD com azul de metileno, comparada às outras duas linhagens. O tempo total de exposição das células à terapia foi 20 minutos. Os asteriscos indicam onde há diferença estatística. As colunas representam as médias de três quadruplicatas independentes (n=12) e as barras representam o desvio-padrão. ANOVA one-way, com pós-teste de Tukey. \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001.

**FIGURA 6 – Determinação do potencial citotóxico do LED 630 nm, do Photogem e da TFD mediada por Photogem e LED 630 nm sobre as linhagens C-33A, HaCaT e SiHa.**



O LED 630 nm não induziu efeito tóxico nas linhagens (painel A). O Photogem não apresentou toxicidade no escuro (painel B). A PG-TFD induziu toxicidade celular significativa independente da dose de luz (painéis C e D). O tempo total de exposição das células à terapia foi 2 horas. Os asteriscos indicam onde há diferença estatística. As colunas representam as médias de três quadruplicatas independentes (n=12) e as barras representam o desvio-padrão. ANOVA one-way, com pós-teste de Tukey. \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001.

#### 4.1.2. Cisplatina

O tratamento convencional do câncer de colo uterino envolve a combinação de quimio e radioterapias, tendo a cisplatina como antineoplásico de escolha (BOARDMAN, 2011). As três linhagens, então, foram tratadas com cisplatina em 8 concentrações e 3 tempos diferentes para avaliar sua suscetibilidade a esse fármaco. A Figura 7 e o Quadro 1 trazem o resultado.

Foram testados os tempos de tratamento de 6, 12 e 24 horas (painéis A, B e C da Figura 7, respectivamente). Excetuando-se a concentração de 166  $\mu\text{M}$  (50  $\mu\text{g/mL}$ ), onde houve significância estatística entre as médias das porcentagens de viabilidade celular obtidas para as linhagens HaCaT e SiHa, não foram observadas diferenças significativas entre os três tempos de tratamento.

A observação de que o tratamento por 6 horas provocou maior morte celular apenas na concentração mais alta (166  $\mu\text{M}$ ) para as linhagens HaCaT e SiHa foi um resultado não esperado. Entretanto, Hermann e colaboradores evidenciam em trabalho de 2013 que a meia-vida da cisplatina fica em torno de 2 horas (HERMANN et. al., 2013). Ainda, Saris e colaboradores mostram que a formação de adutos cisplatina-DNA é rápida, atinge um pico máximo entre 4 e 6 horas após o início da incubação e pode ser revertida (SARIS et. al., 1996).

Levando esses dados em consideração e o fato de que a entrada da cisplatina na célula se dá por difusão passiva (FICHTINGER-SHEPMAN et. al., 1990; GATELY & HOWEL, 1993; HERMANN et. al., 2013) e que, por essa razão, a concentração de cisplatina extracelular tende a se igualar à concentração intracelular, hipotetizamos que em tempos de incubação maiores que 6 horas pode haver um desfavorecimento da ligação da cisplatina ao DNA. Isso pode ser devido à degradação da cisplatina, que resulta em seu deslocamento do núcleo para o citosol e/ou meio extracelular, reduzindo a formação de adutos e, conseqüentemente sua toxicidade à célula.

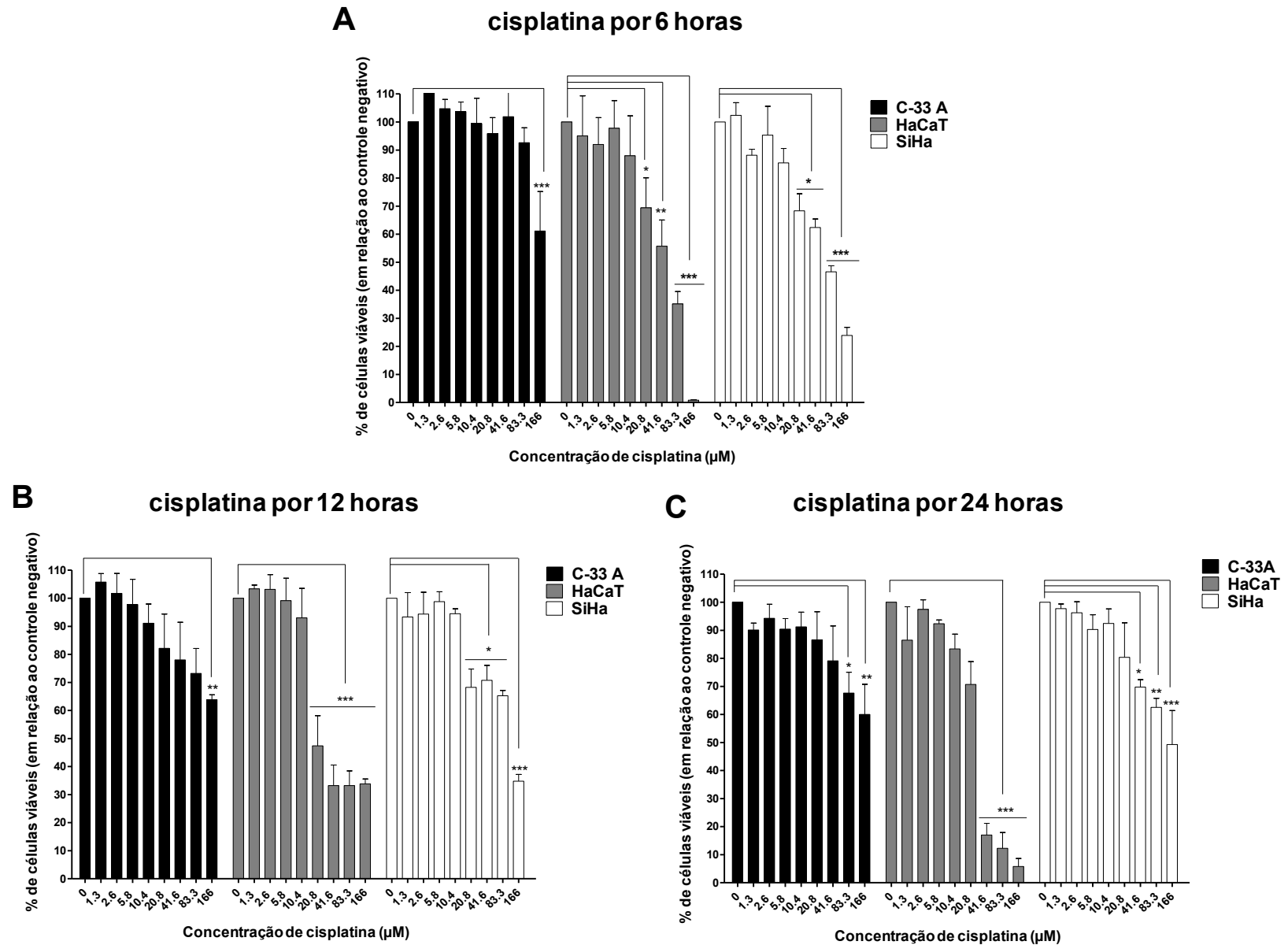
O fato de o resultado obtido neste trabalho ter sido dependente da linhagem celular e da concentração de cisplatina concorda com os resultados obtidos em estudos anteriores (FICHTINGER-SHEPMAN et. al., 1990; SARIS et. al., 1996; HERMANN et. al., 2013).

De acordo com a literatura, as concentrações terapêuticas da cisplatina ficam em torno de 1 a 4  $\mu\text{g/mL}$ , havendo ototoxicidade severa já a partir de 6  $\mu\text{g/mL}$  (SCHULDES et. al., 1997). Nas condições aqui testadas observamos para as linhagens tumorais morte celular significativa apenas acima de 166  $\mu\text{M}$ , que corresponde a 50  $\mu\text{g/mL}$ , uma concentração 12,5 vezes maior que a terapêutica.

Essa necessidade de alta dose para provocar morte celular condiz com a dificuldade de se obter resposta clínica satisfatória no tratamento de tumores malignos com cisplatina, fazendo-se indispensável a associação desse quimioterápico com outros fármacos antineoplásicos e/ou radioterapia.

Embora apresente fatores limitantes, como a alta toxicidade e resistência dos tumores malignos, a cisplatina ainda é um dos antineoplásicos mais potentes disponíveis. Dessa forma, buscar alternativas de sinergismo terapêutico que possam diminuir a dose de cisplatina administrada e elevar sua efetividade, reduzindo seus efeitos adversos, ainda é de grande valia. Assim, a cisplatina foi associada à terapia fotodinâmica mediada por azul de metileno ou Photogem, em várias condições, descritas a seguir.

FIGURA 7 – Determinação do potencial citotóxico da cisplatina sobre as linhagens C-33 A, HaCaT e SiHa, empregando três tempos de tratamento.





**QUADRO 1 – Médias das porcentagens de células vivas encontradas para cada concentração de cisplatina, de acordo com linhagem e tempo de tratamento.**

C-33 A	tempo de tratamento			p<0,05?	HaCaT	tempo de tratamento			p<0,05?	SiHa	tempo de tratamento			p<0,05?
	[cisplatina]	6h	12h			24h	[cisplatina]	6h			12h	24h	[cisplatina]	
<b>1,3 µM</b>	111%	112,40%	96,80%	não	<b>1,3 µM</b>	98,71%	113%	89,82%	não	<b>1,3 µM</b>	99,06%	96,66%	104,40%	não
<b>2,6 µM</b>	105,50%	101,70%	97,63%	não	<b>2,6 µM</b>	94,50%	105%	100,80%	não	<b>2,6 µM</b>	81,50%	101%	99,59%	não
<b>5,8 µM</b>	104,30%	102,80%	93,76%	não	<b>5,8 µM</b>	100,30%	93,68%	95,69%	não	<b>5,8 µM</b>	88,62%	98,81%	93,61%	não
<b>10,4 µM</b>	101,90%	96,11%	94,57%	não	<b>10,4 µM</b>	85,45%	76,42%	83,34%	não	<b>10,4 µM</b>	82,08%	91,17%	92,44%	não
<b>20,8 µM</b>	97,39%	82,13%	86,60%	não	<b>20,8 µM</b>	69,43%	47,99%	70,72%	não	<b>20,8 µM</b>	68,31%	78,22%	80,35%	não
<b>41,6 µM</b>	101,90%	74,68%	79,09%	não	<b>41,6 µM</b>	55,72%	36,12%	30,36%	não	<b>41,6 µM</b>	62,37%	70,75%	69,77%	não
<b>83,3 µM</b>	92,61%	63,20%	67,59%	não	<b>83,3 µM</b>	35,15%	30,12%	18,97%	não	<b>83,3 µM</b>	45,11%	63,90%	62,52%	não
<b>166 µM</b>	61,12%	48,86%	60,01%	não	<b>166 µM</b>	0,36%	1,50%	15,79%	<b>p&lt;0,01</b>	<b>166 µM</b>	21,93%	13,05%	49,29%	<b>p&lt;0,05</b>

As médias de porcentagem de células vivas obtidas para cada concentração em cada tempo de tratamento foram comparadas através do teste estatístico ANOVA *one-way* com pós-teste de Tukey. A análise estatística não encontrou diferenças significativas entre as médias obtidas nos diferentes tempos de tratamento, indicando que não há degradação significativa da cisplatina em meio de cultura mesmo no maior tempo empregado, excetuando-se na maior concentração (166 µM).

#### 4.1.3. Cisplatina e terapia fotodinâmica (terapia combinada)

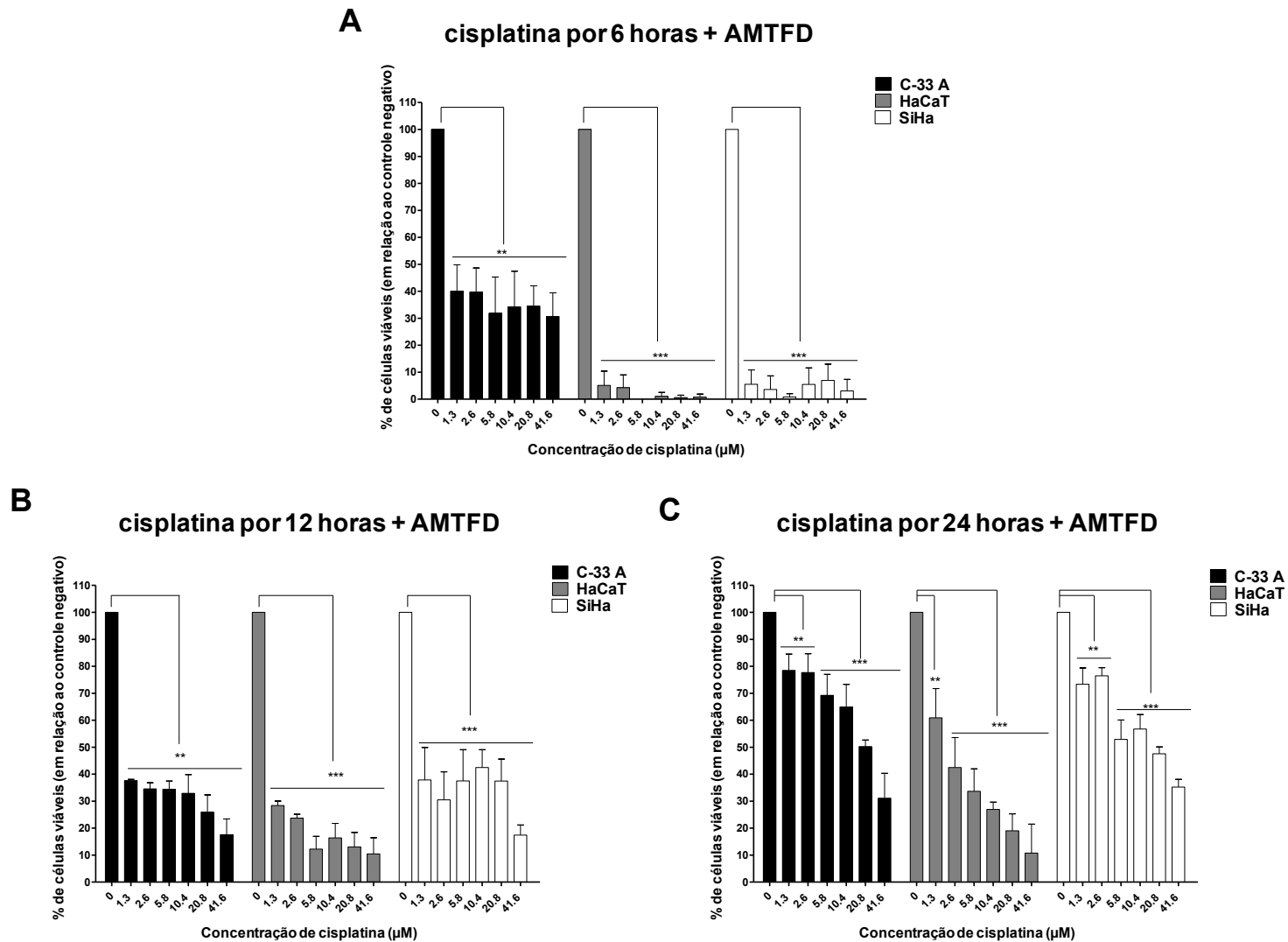
A TFD foi aplicada antes ou após a incubação com cisplatina nas condições escolhidas anteriormente: 19,5  $\mu\text{M}$  de azul de metileno + 5,11  $\text{J}/\text{cm}^2$  e 0,5  $\mu\text{M}$  de Photogem + 2,76  $\text{J}/\text{cm}^2$ . As concentrações de cisplatina testadas foram as que mostraram menor eficácia frente às linhagens tumorais, de 1,3 a 41,6  $\mu\text{M}$ , concentrações onde não foram encontradas diferenças significativas na viabilidade celular para todas as linhagens.

De forma geral, a associação TFD + cisplatina foi altamente eficaz independentemente do protocolo de incubação empregado. Para o azul de metileno, a aplicação da TFD antes da incubação com cisplatina por 12 ou 24h (figuras 9B e 9C, respectivamente) mostrou melhores resultados que a TFD após esse período (Figuras 8B e 8C, respectivamente), mas a ordem de tratamento não resultou em diferença se as células eram tratadas com cisplatina por 6h (Figuras 8A e 9A). Já para o Photogem, observamos menor viabilidade celular quando a TFD foi aplicada após a incubação com cisplatina por 6 ou 12h (Figuras 10A e 10B), quando comparado ao tratamento com cisplatina antes da PGTFD (Figuras 11A e 11B). Para o tratamento com cisplatina por 24h a eficácia foi melhor quando a TFD foi aplicada antes da cisplatina (Figura 11C), em comparação ao tratamento com PGTFD após a incubação com o quimioterápico (Figura 10C).

Os melhores protocolos de incubação foram AMTFD seguida de cisplatina por 24 horas e cisplatina por 6 horas seguida de PGTFD. Nessas condições, doses de cisplatina tão baixas quanto 1,3  $\mu\text{M}$  (0,34  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) foram capazes de eliminar mais de 90% das células tumorais, uma dose 3 vezes menor que a dose terapêutica mínima indicada na literatura (1 a 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; SCHULDES et. al., 1997). Quando as linhagens celulares deste estudo foram incubadas apenas com cisplatina na dose de 1,3  $\mu\text{M}$  obtivemos 100% de células viáveis em 6, 12 e em 24 horas. A Figura 12 mostra a comparação dos resultados obtidos para as monoterapias e terapias combinadas.

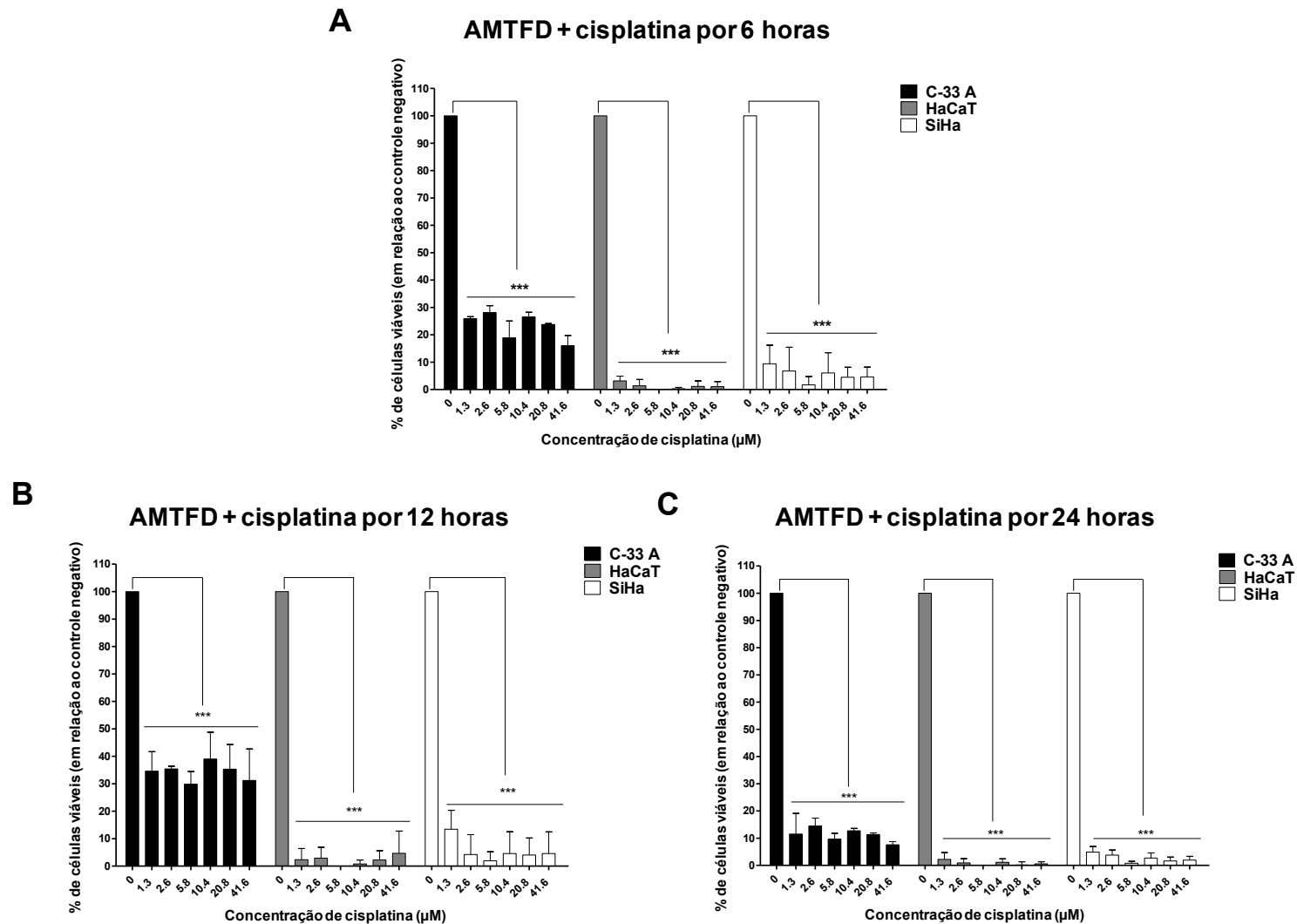
Com isso, nossos resultados indicam que a associação da terapia fotodinâmica com a cisplatina tem grande potencial para ser utilizada na prática clínica, uma vez que leva à eliminação de quase a totalidade das células tumorais em uma só aplicação *in vitro*, empregando baixas doses tanto de cisplatina quanto de fotossensibilizador e luz e, portanto, com baixo potencial de provocar efeitos adversos significativos. A TFD, nesse contexto, pode se tornar uma alternativa mais segura à radioterapia no tratamento do câncer de colo uterino.

**FIGURA 8 – Determinação do potencial citotóxico sinérgico da cisplatina e seguida da terapia fotodinâmica mediada por azul de metileno e LED 660 nm sobre as linhagens C-33A, HaCaT e SiHa.**



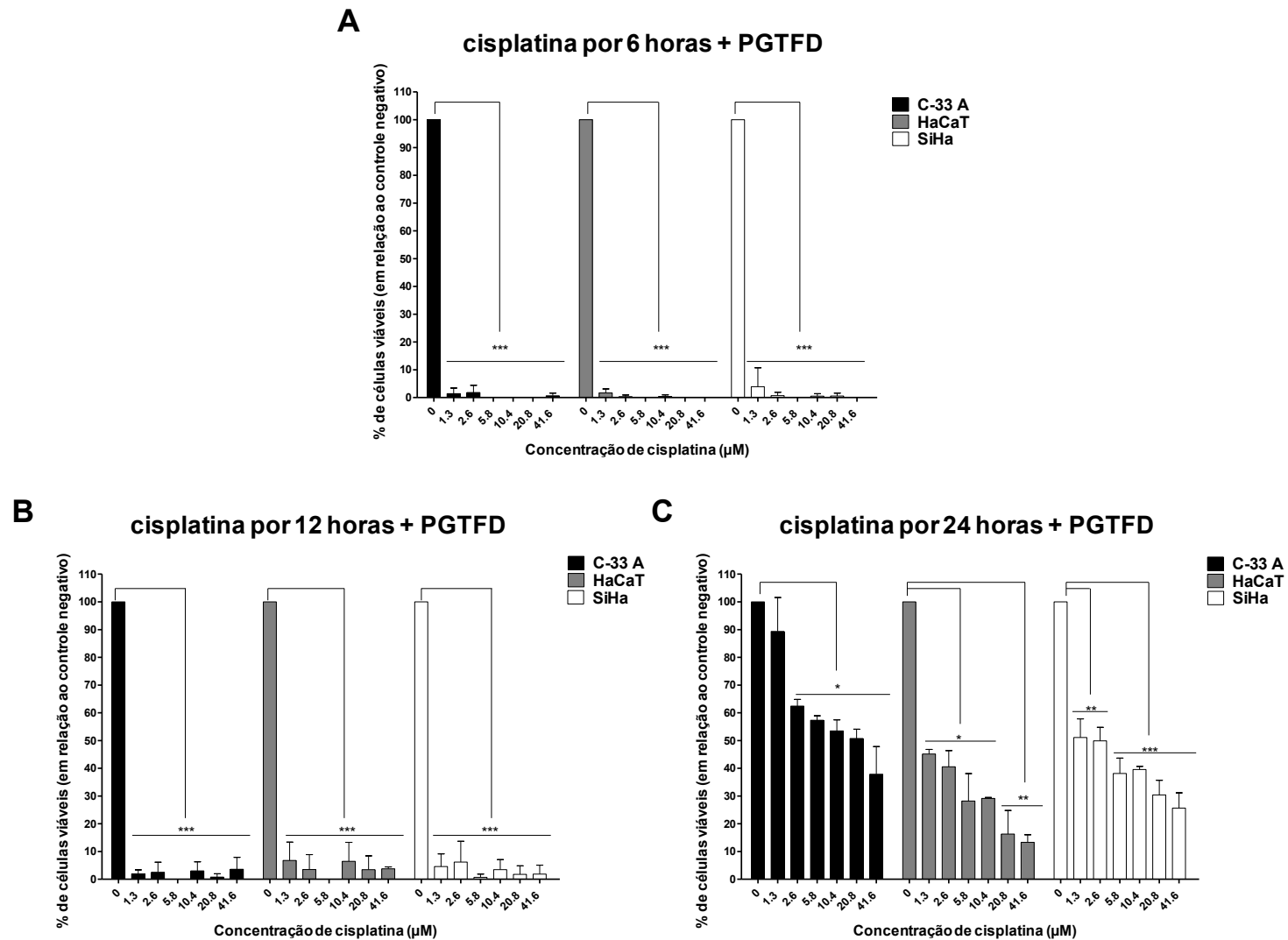
As linhagens foram submetidas ao tratamento com cisplatina por 6 (painel A), 12 (painel B) ou 24 horas (painel C), seguido de terapia fotodinâmica mediada por azul de metileno (19,5 µM; 5,11 J/cm<sup>2</sup>). Os asteriscos indicam onde há diferença estatística. As colunas representam as médias de três quadruplicatas independentes (n=12) e as barras representam o desvio-padrão. ANOVA one-way, com pós-teste de Tukey. \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001.

**FIGURA 9 – Determinação do potencial citotóxico sinérgico da terapia fotodinâmica mediada por azul de metileno seguida de tratamento com cisplatina sobre as linhagens C-33A, HaCaT e SiHa**



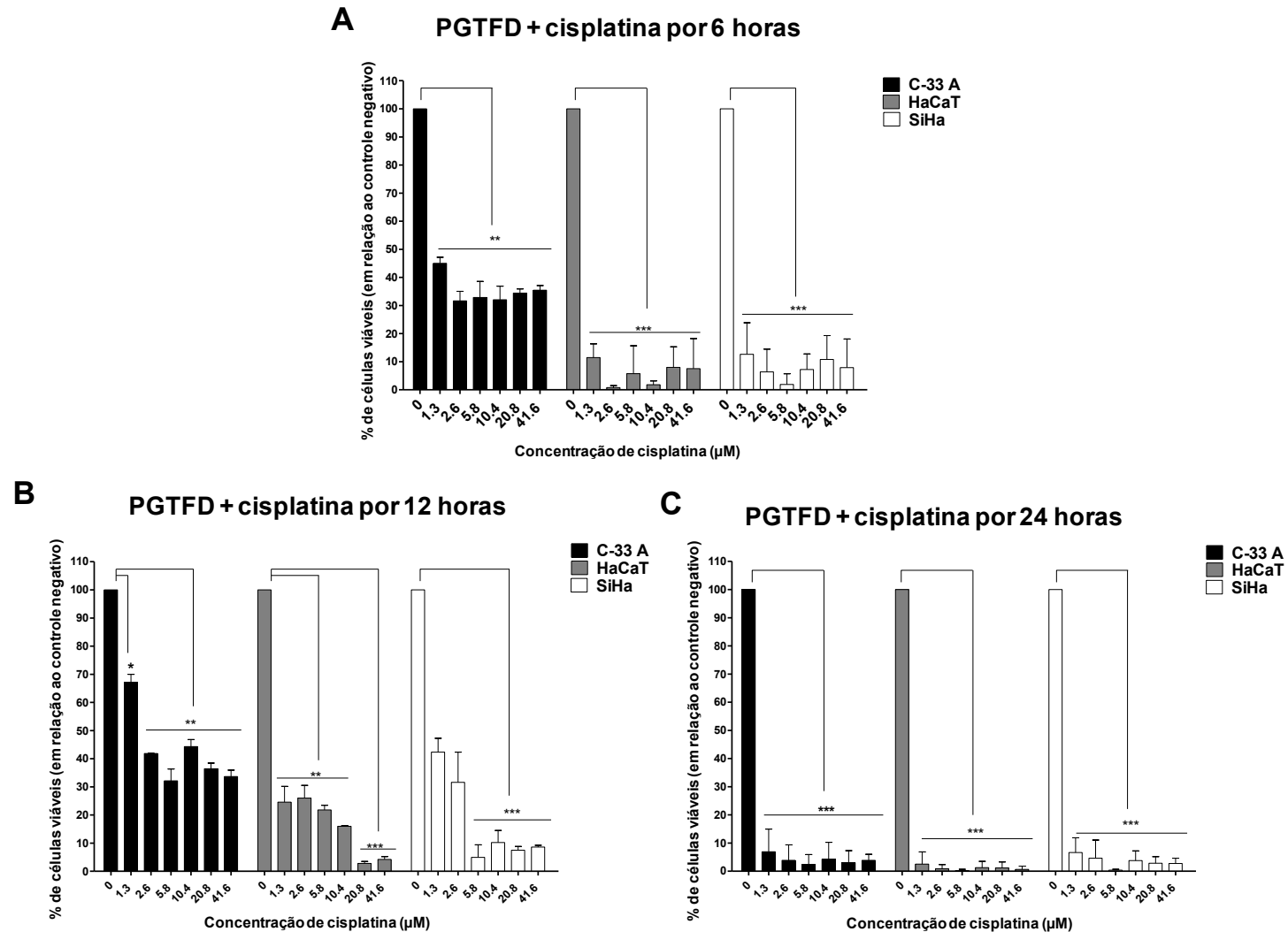
As linhagens foram submetidas à terapia fotodinâmica mediada por azul de metileno ( $19,5 \mu\text{M}$ ;  $5,11 \text{ J}/\text{cm}^2$ ) seguida de tratamento com cisplatina por 6 (painel A), 12 (painel B) ou 24 horas (painel C). Os asteriscos indicam onde há diferença estatística. As colunas representam as médias de três quadruplicatas independentes ( $n=12$ ) e as barras representam o desvio-padrão. ANOVA one-way, com pós-teste de Tukey. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

**FIGURA 10 – Determinação do potencial citotóxico sinérgico da cisplatina seguida da terapia fotodinâmica mediada por Photogem sobre as linhagens C-33A, HaCaT e SiHa**



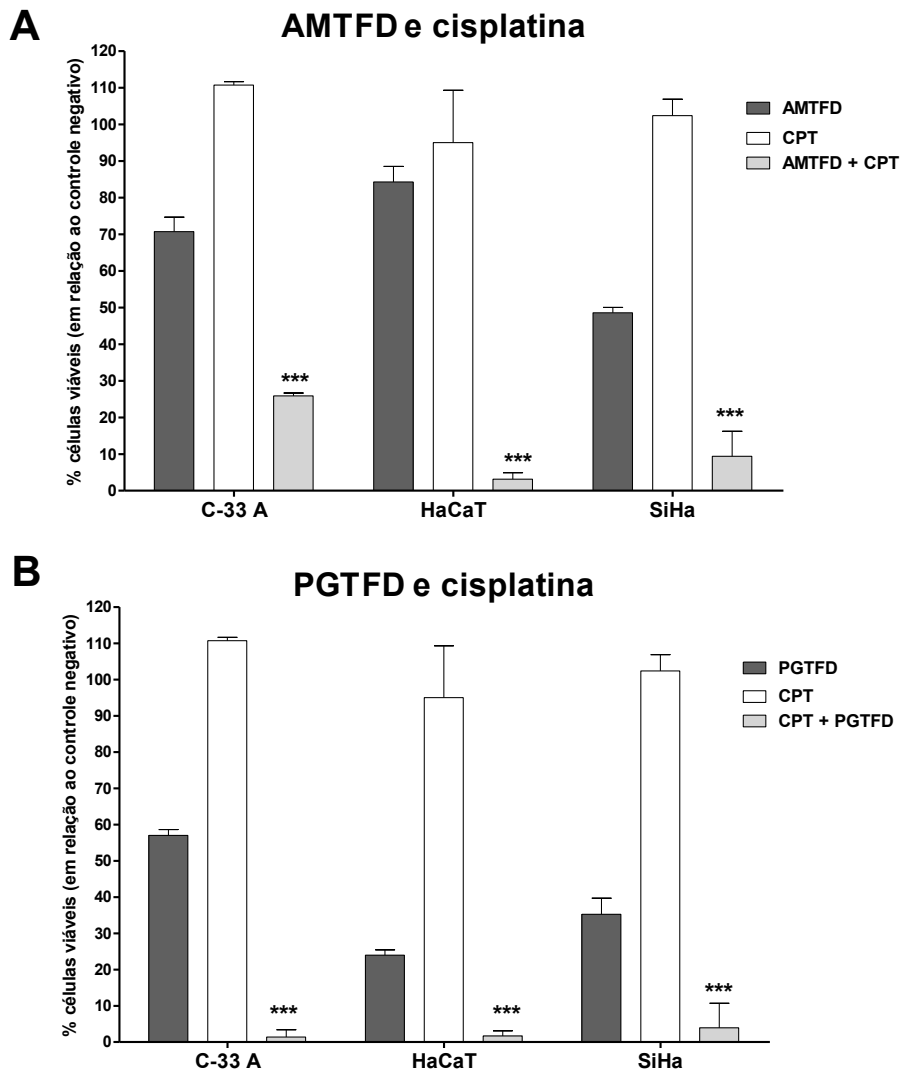
As linhagens foram submetidas ao tratamento com cisplatina por 6 (painel A), 12 (painel B) ou 24 horas (painel C), seguido de terapia fotodinâmica mediada por Photogem ( $0,5 \mu\text{M}$ ;  $2,76 \text{ J/cm}^2$ ). Os asteriscos indicam onde há diferença estatística. As colunas representam as médias de três quadruplicatas independentes ( $n=12$ ) e as barras representam o desvio-padrão. ANOVA one-way, com pós-teste de Tukey. \* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,001$ .

**FIGURA 11 – Determinação do potencial citotóxico sinérgico da terapia fotodinâmica mediada por Photogem seguida de tratamento com cisplatina sobre as linhagens C-33A, HaCaT e SiHa.**



As linhagens foram submetidas à terapia fotodinâmica mediada por Photogem (0,5 µM; 2,76 J/cm<sup>2</sup>) seguida de tratamento com cisplatina por 6 (painel A), 12 (painel B) ou 24 horas (painel C). Os asteriscos indicam onde há diferença estatística. As colunas representam as médias de três quadruplicatas independentes (n=12) e as barras representam o desvio-padrão. ANOVA one-way, com pós-teste de Tukey. \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001.

**FIGURA 12 – Comparação dos efeitos citotóxicos da Terapia Fotodinâmica e cisplatina como monoterapias e combinadas**



A: linhagens tratadas com AMTFD ( $19,5 \mu\text{M}$ ;  $5,11 \text{ J/cm}^2$ ), cisplatina ( $1,3 \mu\text{M}$  por 6 horas) e a terapia combinada (AMTFD + cisplatina, nas mesmas condições das monoterapias); B: linhagens tratadas com PGTFD ( $0,5 \mu\text{M}$ ;  $2,76 \text{ J/cm}^2$ ), cisplatina ( $1,3 \mu\text{M}$  por 6 horas) e a terapia combinada (cisplatina + PGTFD, nas mesmas condições das monoterapias). Observa-se a grande redução da viabilidade celular provocada pelas terapias combinadas em relação às monoterapias. Os asteriscos indicam onde a diferença estatística entre a terapia combinada e as monoterapias em cada contexto. As colunas representam as médias de três quadruplicatas independentes ( $n=12$ ) e as barras representam o desvio-padrão. ANOVA *one-way*, com pós-teste de Tukey. \* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,001$ .

## 4.2. Perfil de morte celular

### 4.2.1. Ensaio de exclusão de fluorocromos: Hoechst 33342 e iodeto de propídeo

Hoechst 33342 (HO) e iodeto de propídeo (IP) são ambos fluoróforos que coram DNA, mas suas propriedades físico-químicas distintas permite distinguir células vivas, células apoptóticas e células necróticas. O Hoechst é um corante supravital permeável às células vivas que se intercala na volta menor da dupla fita de DNA, com preferência para sequências ricas em A-T; é excitado no ultravioleta (350 nm) e emite fluorescência azul (460 nm) (PORTUGAL e WARING, 1988). Já o iodeto de propídeo se intercala entre as bases do DNA, com pouca ou nenhuma preferência por sequências, e é totalmente impermeável às células vivas; emite fluorescência no vermelho (617 nm) ao ser excitado por volta de 535 nm (SUZUKI *et. al.*, 1997).

A técnica de coloração por esses fluoróforos permite distinguir células vivas, células apoptóticas e células necróticas de maneira simples, avaliando-se a morfologia e coloração do núcleo celular. Células vivas apresentam cromatina relaxada e aparecem coradas apenas em azul; células apoptóticas exibem cromatina condensada e/ou fragmentada, além de encolhimento celular, e são permeáveis ao IP apenas nas fases finais do processo de apoptose, quando já há desarranjo da membrana plasmática, podendo então se apresentar coradas apenas em azul ou azul e vermelho. Células necróticas, por sua vez, apresentam grande inchaço celular, bolhas na membrana plasmática e são totalmente permeáveis ao IP, sendo vistas intensamente coradas em vermelho. É também empregado um corante citoplasmático, o diacetato de fluoresceína (DAF): a fluorescência verde do DAF é emitida apenas após sua hidrólise por esterases citoplasmáticas e a célula só é capaz de reter o produto fluorescente em seu citoplasma se a membrana plasmática estiver íntegra. Dessa forma, o DAF atua como um marcador de viabilidade celular e também de integridade de membrana (SARUYAMA *et al*, 2013).

A microscopia de fluorescência convencional é a forma clássica para se avaliar a morfologia celular utilizando HO e PI. Entretanto, é um ensaio laborioso e demorado, exigindo que as amostras sejam coradas uma a uma imediatamente antes de serem levadas ao microscópio, o que restringe o número de amostras que podem ser analisadas num mesmo dia. Levando essa desvantagem em consideração, optamos por padronizar um novo protocolo de coloração e captura de imagens no equipamento INCell Analyzer 2000 (GE Healthcare Life Sciences), disponível como equipamento



multiusuário no Núcleo de Proteômica em nossa instituição. A versão do software de análise que acompanha este INCell Analyzer não dispõe do módulo de apoptose, logo, as imagens foram capturadas pelo equipamento e as células foram contadas e avaliadas manualmente, constituindo uma técnica semiautomatizada.

Como neste ensaio semiautomatizado as células viáveis permanecem aderidas à placa, tornam-se mais evidentes as diferenças morfológicas entre células vivas e células mortas, característica que facilita a análise e contagem das células. Ainda, a manipulação celular nesse novo protocolo é praticamente nula, o que diminui a geração de artefatos e assegura a determinação de uma taxa de morte celular mais fidedigna.

As células foram tratadas com curcumina 20  $\mu\text{M}$  por 6 horas (indutor de apoptose), doxorrubicina 60  $\mu\text{M}$  por 6 horas (indutor de necrose), cisplatina 41,6  $\mu\text{M}$  por 6 horas, azul de metileno por 20 minutos, LED 660 nm (5,11  $\text{J}/\text{cm}^2$ ), AMTFD (exposição total de 20 minutos), AMTFD seguida de cisplatina 1,3  $\mu\text{M}$  por 6 horas, Photogem por duas horas, LED 630 nm (2,76  $\text{J}/\text{cm}^2$ ), PGTFD (exposição total de 2 horas) e cisplatina 1,3  $\mu\text{M}$  por 6 horas seguida de PGTFD, ou não foram tratadas.

De acordo com a literatura, a apoptose induzida pela TFD é geralmente rápida, ocorrendo tão cedo quanto 1 minuto após o tratamento (DELLINGER, 1996; LUO, CHANG; KESSEL, 1996; HE; OLEINICK, 1995; TRAU; SIEBER, 1994). Sendo assim, inicialmente foi determinado o tempo ideal para a coloração das células pós-tratamento com a terapia fotodinâmica. Para isso, as células foram coradas imediatamente, 10 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas e 3 horas após o tratamento das linhagens com AMTFD ou PGTFD. Nos tempos inferiores a 30 minutos foi difícil identificar as células em processo de morte devido às poucas diferenças morfológicas apresentadas em relação às células vivas. A partir de duas horas em diante a fragmentação celular já era pronunciada, o que também dificultava a classificação morfológica das células. Os tempos de 30 minutos e uma hora foram os que melhor permitiram a distinção morfológica das células em processo de morte das células vivas, com o tempo de uma hora tendo se revelado ser o ideal para a execução do protocolo. Dessa forma, as células foram coradas com os fluoróforos sempre uma hora após o tratamento com a TFD.

De maneira similar, os tratamentos com doxorrubicina, curcumina e cisplatina também foram avaliados quando ao tempo pós-tratamento ideal para coloração das células. Foi observado que 6 horas eram o melhor tempo de tratamento para as três substâncias, ponto onde foi possível classificar morfológicamente de maneira precisa o tipo de morte celular induzido por cada uma delas.

As figuras 13 e 14 trazem o resultado. Como esperado, doxorubicina e curcumina induziram preferencialmente necrose e apoptose, respectivamente, com a porcentagem de células necróticas ou apoptóticas variando de acordo com a linhagem celular, tendo a C-33 A como linhagem mais sensível (Figuras 13A e 14A). Quando as células foram tratadas apenas com as fontes de luz LED ou com os fotossensibilizadores no escuro não foi observada morte celular significativa em comparação com o controle negativo (Figuras 13A e 14A-C).

Como esperado, a TFD mediada por azul de metileno induziu maior porcentagem de morte celular na linhagem SiHa, em comparação às linhagens C-33 A e HaCaT, em concordância com os resultados obtidos nos ensaios de citotoxicidade (seção 4.1.1). Entretanto, ao contrário do descrito na literatura (BLÁZQUEZ-CASTRO et al., 2009; CHEN et al., 2008; TARDIVO et al., 2005), a AMTFD provocou morte celular predominantemente com morfologia necrótica, com cerca de 2/3 das células mortas identificadas com morfologia típica de necrose e 1/3 com morfologia típica de apoptose precoce (Figura 13C). Essa diferença encontrada pode ser devida ao tempo de incubação com o fotossensibilizador, visto que a maioria dos trabalhos com cultura de células existentes na literatura emprega protocolos de incubação com azul de metileno por 1 hora (CHEN et al., 2008; LU et al., 2008); a incubação por 20 minutos aqui utilizada pode ter sido insuficiente para que o AM atingisse os alvos celulares necessários para desencadear a morte celular por apoptose. Dessa forma, se o AM ficou restrito às proximidades da membrana plasmática no momento da irradiação é possível que as EROs geradas tenham induzido peroxidação dos lipídeos de membrana (KAMAT; DEVASAGAYAM, 1996), o que pode ter culminado na desestruturação da membrana celular e favorecido a morte celular por necrose (RELLO et al., 2005).

A terapia combinada AMTFD + cisplatina manteve o perfil de morte com predomínio de células tipicamente necróticas similar à monoterapia AMTFD para as linhagens SiHa e HaCaT, mas a porcentagem de células mortas foi significativamente maior tanto em relação à AMTFD quanto à cisplatina como monoterapias (Figuras 13C, 14B e 14C). A linhagem C-33 A também apresentou maior porcentagem de células mortas com a terapia combinada, porém, curiosamente, houve um predomínio de células tipicamente apoptóticas em relação às necróticas, um perfil mais similar à monoterapia com cisplatina (Figuras 13C e 14A). Esses resultados evidenciam o efeito sinérgico entre a AMTFD e a cisplatina e corroboram os resultados obtidos nos ensaios de citotoxicidade. Ainda, os diferentes perfis de tipo de morte celular encontrados entre

as linhagens com a terapia combinada indicam que a combinação dos efeitos citotóxicos de cada terapia individual é dependente do tipo celular.

Quando as linhagens foram tratadas com PGTFD observou-se também a presença de células com morfologia tanto apoptóticas quanto necróticas, porém com predomínio das apoptóticas (Figuras 13C e 14A-C). Diversos estudos têm mostrado que o Photogem pode induzir ambos os tipos de morte celular, sempre de maneira dependente do protocolo de incubação (HSIEH et al, 2012; DELLINGER 1996). Dessa forma, os resultados encontrados eram esperados e estão em acordo com a literatura. Ao contrário do observado para AMTFD + cisplatina, a terapia combinada cisplatina + PGTFD não induziu taxa de morte celular mais significativa quando comparada com a monoterapia PGTFD, exceto para a linhagem C-33 A, que novamente apresentou comportamento distinto das demais. Quando comparada à cisplatina como monoterapia, a terapia combinada foi capaz de induzir maior taxa de morte celular em todas as linhagens.

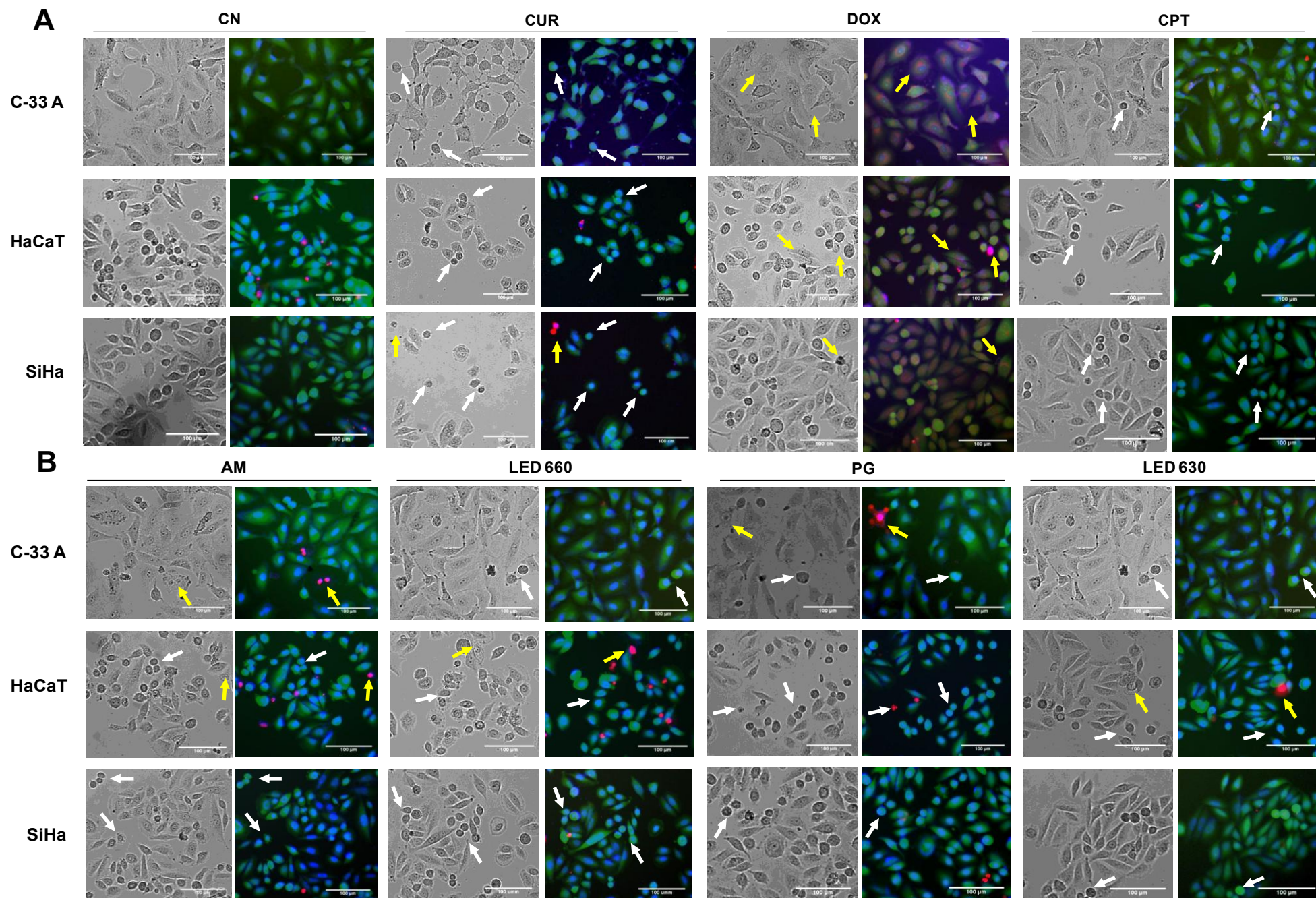
De forma geral, as taxas de morte celular encontradas para a terapia fotodinâmica mediada pelo Photogem, tanto em monoterapia quanto combinada à cisplatina, foram inesperadamente baixas, levando em consideração os resultados obtidos nos ensaios de citotoxicidade. É possível que a PGTFD provoque danos celulares que culminem na morte da célula mais tardiamente, o que pode ter gerado uma baixa estimativa da taxa de morte celular pós-tratamento neste ensaio devido aos tempos de incubação do protocolo empregado.

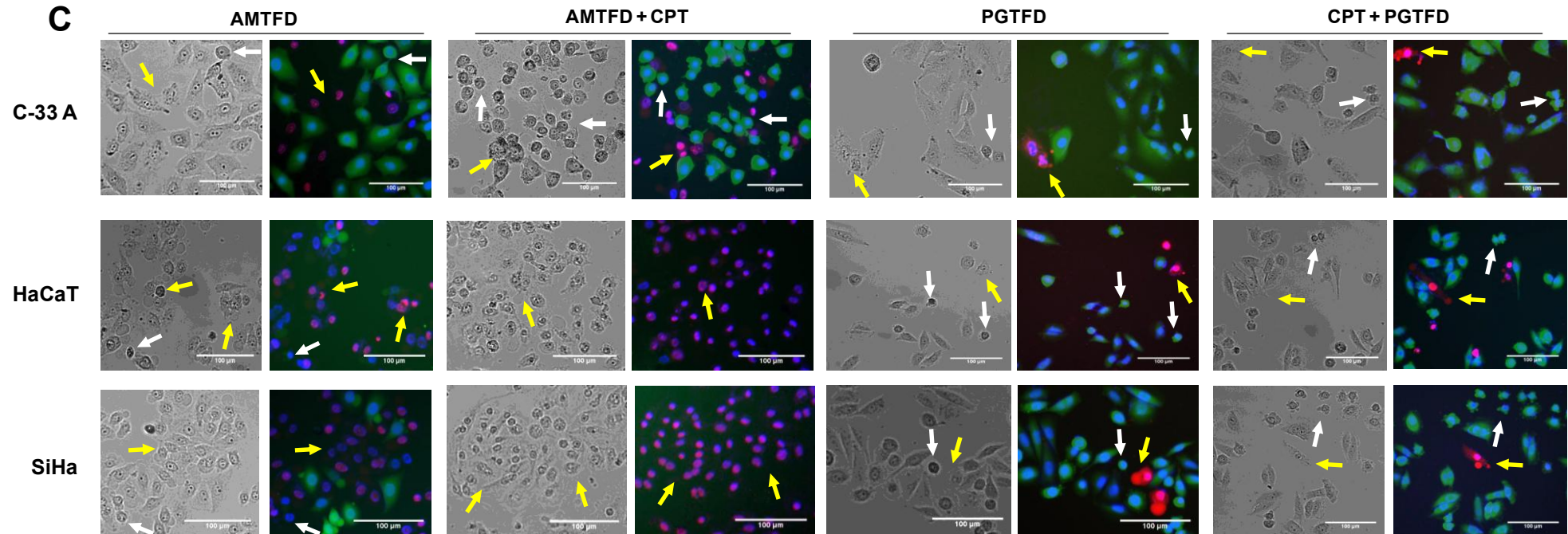
Na literatura especializada há grande discussão a respeito do tipo de morte celular induzido pela terapia fotodinâmica e a resposta imune antitumoral subsequente desencadeada. É comumente aceito que a morte celular via necrose incita resposta inflamatória aguda e, portanto, tem papel imunogênico. Da mesma forma, entendia-se que células apoptóticas eram eliminadas de maneira silenciosa, sem provocar um ambiente inflamatório ou uma resposta imunológica (MELCHER et al., 1998; TESNIERE et al., 2008). Entretanto, a ideia de apoptose imunogênica foi levantada por diversos autores e tem ganhado força nos últimos anos (GOLDSZMID et al., 2014; MROZ et al., 2011; SCHEFFER et al., 2003).

Apesar das ideias conflitantes, há consenso sobre o fato de que a geração de uma resposta inflamatória aguda intensa após a terapia fotodinâmica exerça um papel favorável na ativação do sistema imune e, com isso, dê início ao estabelecimento de uma imunidade antitumoral duradoura e com potencial de controlar possíveis recorrências do tumor maligno primário e micrometástases (MROZ et al., 2011; PANZARINI; INGUSCIO; DINI, 2013).

Nesse sentido, protocolos de tratamento que favoreçam a morte das células tumorais por apoptose e necrose ao mesmo tempo, como os protocolos evidenciados neste trabalho, tem grande potencial para induzir uma resposta imunológica antitumoral: as células necróticas provocariam a resposta inflamatória necessária para atrair as células de defesa, e as células apoptóticas sendo fagocitadas pelas células apresentadoras de antígeno profissionais dariam início ao desenvolvimento da resposta imunológica específica antitumor.

FIGURA 13 – Captura de imagens de fluorescência utilizando Hoechst 33342, iodeto de propídeo e diacetato de fluoresceína no IN Cell Analyzer

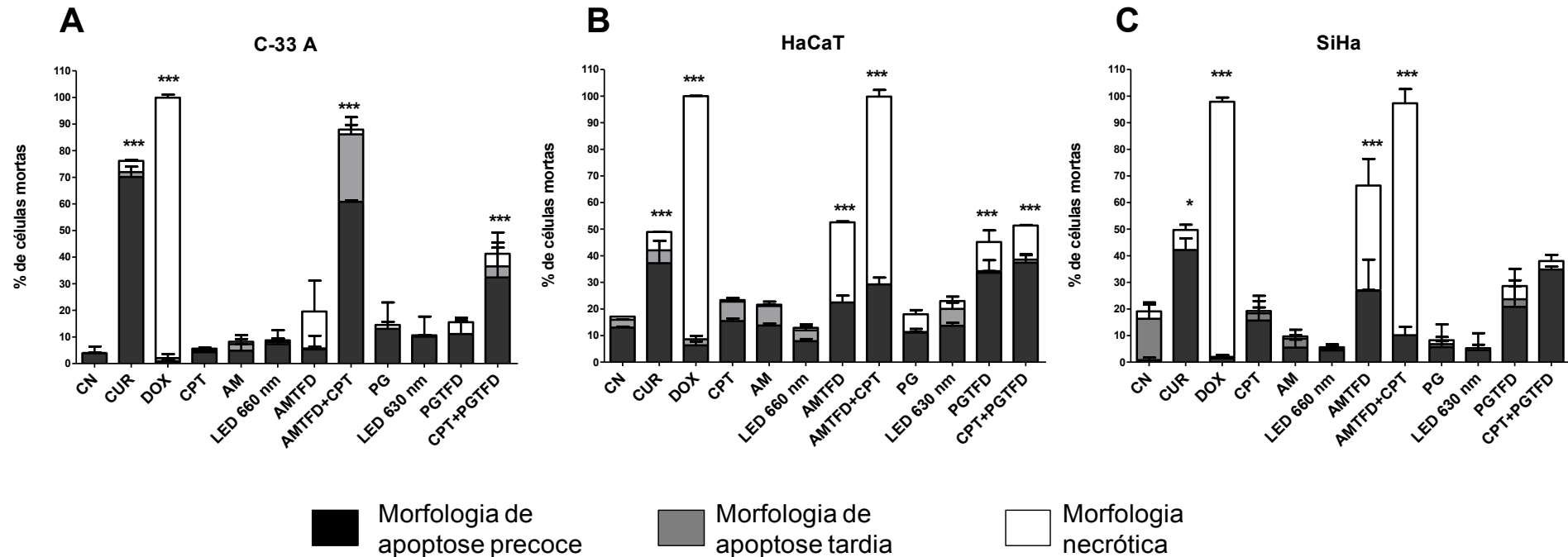




As linhagens C-33 A, HaCaT e SiHa foram submetidas à coloração com Hoechst, iodeto de propídeo e diacetato de fluoresceína após receberem os diversos tratamentos (CUR [25  $\mu\text{M}$  por 6 horas]; DOX [50  $\mu\text{g/mL}$  por 6 horas]; CPT [41,6  $\mu\text{M}$  por 6 horas]; AM [19,5  $\mu\text{M}$  por 20 minutos]; LED 660 nm [5,11  $\text{J/cm}^2$ ]; PG [0,5  $\mu\text{M}$  por 2 horas]; LED 630 nm [2,76  $\text{J/cm}^2$ ]; AMTFD [19,5  $\mu\text{M}$  AM + 5,11  $\text{J/cm}^2$  LED 660 nm]; AMTFD + CPT [19,5  $\mu\text{M}$  AM + 5,11  $\text{J/cm}^2$  LED 660 nm + 0,34  $\mu\text{M}$  CPT por 6 horas]; PGTFD [0,5  $\mu\text{M}$  PG + 2,76  $\text{J/cm}^2$  LED 630 nm]; CPT + PGTFD [0,34  $\mu\text{M}$  CPT por 6 horas + 0,5  $\mu\text{M}$  PG + 2,76  $\text{J/cm}^2$  LED 630 nm]). As setas brancas indicam algumas células apoptóticas e as setas amarelas indicam algumas células necróticas. Objetiva de 20X.

CN: Controle Negativo; CUR: curcumina; DOX: doxorubicina; CPT: cisplatina; AM: azul de metileno; AMTFD: terapia fotodinâmica mediada por AM; PG: Photogem; PGTFD: terapia fotodinâmica mediada por PG.

FIGURA 14 – Perfil de morte celular induzida por cada tratamento, de acordo com a linhagem



As linhagens C-33 A (painel A), HaCaT (painel B) e SiHa (painel C) foram submetidas à coloração com Hoechst 33342, iodeto de propídeo e diacetato de fluoresceína após receberem os diversos tratamentos (CUR [25  $\mu\text{M}$  por 6 horas]; DOX [50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  por 6 horas]; CPT [41,6  $\mu\text{M}$  por 6 horas]; LED 660 nm [5,11  $\text{J}/\text{cm}^2$ ]; AM [19,5  $\mu\text{M}$  por 20 minutos]; AMTFD [19,5  $\mu\text{M}$  AM + 5,11  $\text{J}/\text{cm}^2$  LED 660 nm]; AMTFD + CPT [19,5  $\mu\text{M}$  AM + 5,11  $\text{J}/\text{cm}^2$  LED 660 nm + 0,34  $\mu\text{M}$  CPT por 6 horas]; LED 630 nm [2,76  $\text{J}/\text{cm}^2$ ]; PG [0,5  $\mu\text{M}$  por 2 horas]; PGTFD [0,5  $\mu\text{M}$  PG + 2,76  $\text{J}/\text{cm}^2$  LED 630 nm]; CPT + PGTFD [0,34  $\mu\text{M}$  CPT por 6 horas + 0,5  $\mu\text{M}$  PG + 2,76  $\text{J}/\text{cm}^2$  LED 630 nm]). As colunas representam as médias de três experimentos independentes e as barras indicam o desvio-padrão. Os asteriscos indicam onde há diferença estatística em relação ao controle negativo. Teste de Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunn. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

CN: Controle Negativo; CUR: curcumina; DOX: doxorubicina; CPT: cisplatina; AM: azul de metileno; AMTFD: terapia fotodinâmica mediada por AM; PG: Photogem; PGTFD: terapia fotodinâmica mediada por PG.

#### 4.2.2. Ensaio de atividade de caspase-3

O Comitê para Nomenclatura em Morte Celular (NCCD, da sigla em inglês *Nomenclature Committee on Cell Death*) recomenda que a apoptose, ou outras formas de morte celular, seja demonstrada por mais de uma metodologia como uma forma de eliminar artefatos. Por exemplo, ensaios como o TUNEL e a citometria com anexina-V podem detectar também necrose, e as caspases podem ser ativadas durante outros processos celulares que não a apoptose (KROEMER et al., 2009). Sendo assim, recomenda-se que sempre sejam utilizadas ao menos duas metodologias para a detecção de apoptose ou outras formas de morte celular. (BUCUR et. al., 2012). Para complementar e confirmar os resultados obtidos no ensaio citomorfológico de exclusão de fluorocromos, descrito no item 4.2.1, foi realizado o ensaio de atividade de caspase-3.

Os membros da família de cisteína-proteases caspases desempenham um papel central na coordenação dos eventos estereotipados que ocorrem durante a apoptose (WALSH et. al., 2008). As caspases são ativadas em resposta a diversos estímulos de morte celular e levam ao “desmonte” da célula através da proteólise de centenas de alvos celulares (LÜTHI; MARTIN, 2007; TIMMER; SALVESEN, 2007). De acordo com a etapa do processo apoptótico em que atuam, as caspases são subdivididas em iniciadoras (caspases -8, -9 e -10), que conectam o estímulo de morte intrínseco ou extrínseco às caspases seguintes na via, chamadas efetoras (caspases -3, -6 e -7), que vão ativar outros fatores celulares (WALSH et. al., 2008). A caspase-3, por exemplo, promove a clivagem de PARP1 (poli (ADP-ribose) polimerase 1) e a fragmentação internucleossomal do DNA, uma das marcas registradas da apoptose (PORTER; JÄNICKE, 1999).

Embora tenham especificidades diferentes sobre substratos celulares *in vivo*, *in vitro* as caspases -3 e -7 apresentam atividades similares sobre substratos artificiais, como o Ac-DMQD-AMC (WALSH et. al., 2008). Por essa razão, ensaios bioquímicos empregando esse substrato podem detectar, na verdade, a combinação das atividades das caspases -3 e -7, e não apenas da caspase-3. Porém, estudos demonstraram que a caspase-3 é, além de mais promíscua que a -7, a principal caspase efetora da fase de “demolição” da apoptose (SLEE; ADRIAN; MARTIN, 2001), o que pode ser usado como base para avaliar os resultados descritos a seguir como sendo, principalmente, a detecção da atividade de caspase-3.

A Figura 15 traz o resultado do ensaio realizado nas mesmas condições do ensaio citomorfológico descrito anteriormente (item 4.2.1). É possível observar que,



apenas com exceção do controle positivo (curcumina 75  $\mu$ M por 6 horas), nenhum dos tratamentos induziu ativação da caspase-3 detectável pelo ensaio. No caso de controle negativo, AM, PG, LED 630 e LED 660 nm esse resultado confirma a não indução de morte celular já comprovada; da mesma forma, a doxorubicina não induziu ativação de caspases como era esperado, uma vez que induz morte necrótica (independente de caspase). A cisplatina em monoterapia, embora sabidamente provoque morte por apoptose, tem pouco efeito citotóxico sobre essas linhagens e, portanto, as poucas células apoptóticas dentro do conjunto não produziram sinal suficiente para ser detectado.

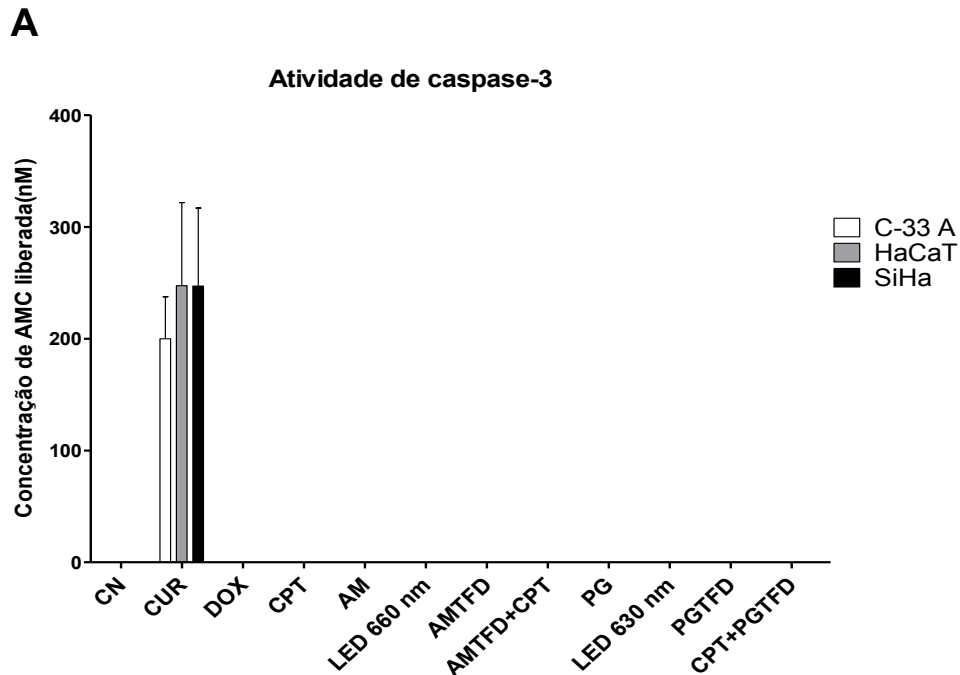
Os tratamentos de terapia fotodinâmica, tanto em monoterapia quanto combinados à cisplatina, não apresentaram ativação de caspase-3 detectável por essa técnica. Esse resultado indica que a morte celular provocada pela TFD nessas condições é independente de caspases, o que concorda com estudos anteriores que associaram a morte celular independente de caspases (MCIC) à suprarregulação de espécies reativas de oxigênio (TAIT; GREEN, 2008; KIM; LEE, 2004; LIN et al., 2003), as espécies responsáveis pelo mecanismo de ação da TFD.

A MCIC é definida por alguns autores como a morte celular que se segue quando um estímulo que normalmente induziria apoptose falha em ativar a cascata de caspases (BRO; KRUYT; GIACCONE, 2005). Embora eventos típicos da ação de caspases não estejam presentes, como a externalização de fosfatidilserina (esta pode ou não estar presente) e a fragmentação nuclear, outras características da MCIC se assemelham à apoptose, como a permeabilização da membrana externa da mitocôndria, a perda da capacidade proliferativa da célula e a condensação nuclear (BRO; KRUYT; GIACCONE, 2005; EKERT et al., 2004). Entretanto, as células sofrendo MCIC podem apresentar uma ampla variedade de características, dependentes principalmente do estímulo inicial e do tipo celular (BRO; KRUYT; GIACCONE, 2005). Na Figura 13C da sessão anterior, os protocolos de tratamento envolvendo AMTFD resultaram em morte celular com morfologia similar à necrose, enquanto aqueles envolvendo a PGTFD resultaram em morfologia mais similar à apoptose, o que demonstra que o estímulo inicial parece ser mais importante que o tipo celular para determinar as características do processo de morte que a célula sofrerá.

O conceito de morte celular independente de caspases é ainda novo e, portanto, existem poucos estudos esclarecedores a esse respeito. Não se sabe qual a resposta do tecido frente a essas células, como são removidas do tecido e nem qual o papel da MCIC no desenvolvimento da imunidade antitumoral (BRO; KRUYT;

GIACCONE, 2005; TAIT; GREEN, 2008). Porém, por apresentar características mistas de apoptose e necrose, é possível que a MCIC tenha um papel importante no desenvolvimento da imunidade antitumoral. De fato, foi observado que algumas linhagens celulares que morrem de maneira independente de caspases são altamente imunogênicas (LARMONIER et al., 2002), porém mais estudos precisam ser realizados para determinar se esse tipo de morte celular, observado para os tratamentos com TFD neste trabalho, seria a chave para que o organismo pudesse estabelecer uma resposta imunológica antitumor efetiva e duradoura.

Figura 15 – Avaliação da atividade de caspase-3

**B**

	[AMC] média liberada		
	C-33 A	HaCaT	SiHa
CN	-37,7727	-32,6161	-27,82463595
CUR	199,9888	247,456	247,1029146
DOX	-29,6746	-19,74	-9,519661928
CPT	-36,6392	-31,4992	-28,10524943
AM	-36,9508	-30,0572	-26,0323357
LED 660 nm	-36,7191	-31,6827	-28,94312265
AMTFD	-37,7944	-20,6002	-28,78053324
AMTFD+CPT	-34,0394	-25,9424	-24,46614265
PG	-39,0991	-30,2805	-25,19377973
LED 630 nm	-30,6373	-20,527	-18,8075605
PGTFD	-15,8537	-23,9932	-15,8038851
CPT+PGTFD	-33,1324	-27,8914	-22,2100829

As linhagens C-33 A, HaCaT e SiHa tiveram a atividade de caspase-3 determinada após receberem os diversos tratamentos (CUR [75  $\mu$ M por 6 horas]; DOX [50  $\mu$ g/mL por 6 horas]; CPT [41,6  $\mu$ M por 6 horas]; LED 660 nm [5,11 J/cm<sup>2</sup>]; AM [19,5  $\mu$ M por 20 minutos]; AMTFD [19,5  $\mu$ M AM + 5,11 J/cm<sup>2</sup> LED 660 nm]; AMTFD + CPT [19,5  $\mu$ M AM + 5,11 J/cm<sup>2</sup> LED 660 nm + 0,34  $\mu$ M CPT por 6 horas]; LED 630 nm [2,76 J/cm<sup>2</sup>]; PG [0,5  $\mu$ M por 2 horas]; PGTFD [0,5  $\mu$ M PG + 2,76 J/cm<sup>2</sup> LED 630 nm]; CPT + PGTFD [0,34  $\mu$ M CPT por 6 horas + 0,5  $\mu$ M PG + 2,76 J/cm<sup>2</sup> LED 630 nm]). A: As colunas representam as médias de três experimentos independentes e as barras indicam o desvio-padrão. Os valores negativos (vide tabela em B) foram considerados zero para a confecção do gráfico.

CN: Controle Negativo; CUR: curcumina; DOX: doxorubicina; CPT: cisplatina; AM: azul de metileno; AMTFD: terapia fotodinâmica mediada por AM; PG: Photogem; PGTFD: terapia fotodinâmica mediada por PG.

### 4.3. Genotoxicidade

#### 4.3.1. Citometria de fluxo com anti- $\gamma$ H2AX

A eletroforese alcalina de célula única em gel (*Single-Cell Gel Electrophoresis*), também conhecida por Ensaio do Cometa, tem sido a metodologia clássica para a detecção de quebras na fita de DNA desde seu estabelecimento por Singh e colaboradores em 1988 (SINGH et al, 1988). Entretanto, essa técnica é trabalhosa, pouco sensível e demorada. Por essa razão, metodologias alternativas têm sido estabelecidas, entre elas a imunohistoquímica e a citometria de fluxo utilizando anticorpos anti- $\gamma$ H2AX (HUANG & DARZYNKIEWICZ, 2006; WATTERS et al, 2009), sendo a última a técnica escolhida para este trabalho por sua maior sensibilidade, rapidez e confiabilidade estatística.

A Figura 16 traz os resultados obtidos para este ensaio para as linhagens C-33 A, HaCaT e SiHa. A intensidade média de fluorescência é diretamente proporcional à frequência de quebras duplas no DNA induzidas pelos tratamentos (HUANG & DARZYNKIEWICZ, 2006; WATTERS et al, 2009). As células tratadas com as fontes de luz, os fotossensibilizadores e a cisplatina não sofreram danos significativos ao DNA nas concentrações empregadas, em comparação ao controle negativo.

Por outro lado, é possível observar nos painéis A, B e C da Figura 16 que, em todas as linhagens celulares, a terapia fotodinâmica mediada pelo azul de metileno (AMTFD) induziu quebras duplas no DNA de maneira pronunciada, ao contrário da terapia fotodinâmica mediada pelo Photogem (PGTFD), a qual resultou em níveis de dano similares ao controle negativo. Da mesma forma, a terapia combinada AMTFD + cisplatina gerou maior número de quebras duplas no DNA que a terapia combinada cisplatina + PGTFD, tendo esta mantido seu índice de dano similar à monoterapia PGTFD e, conseqüentemente, ao controle negativo.

Muitos estudos têm avaliado o potencial genotóxico e mutagênico da terapia fotodinâmica, empregando uma variedade de fotossensibilizadores, fontes de luz e tipos celulares. A indução de danos ao DNA pela TFD foi identificada em todos os trabalhos da literatura, sendo o oxigênio singlete a espécie reativa diretamente relacionada às alterações observadas da molécula de ácido nucleico. O tipo e extensão do dano ao DNA variam de acordo com o FS utilizado e sua concentração, dose de luz e linhagem celular (DAVIES et al., 2007; EPE; PFLAUM; BOITEUX, 1993; MCBRIDE et al., 1992; WOODS et al., 2004).

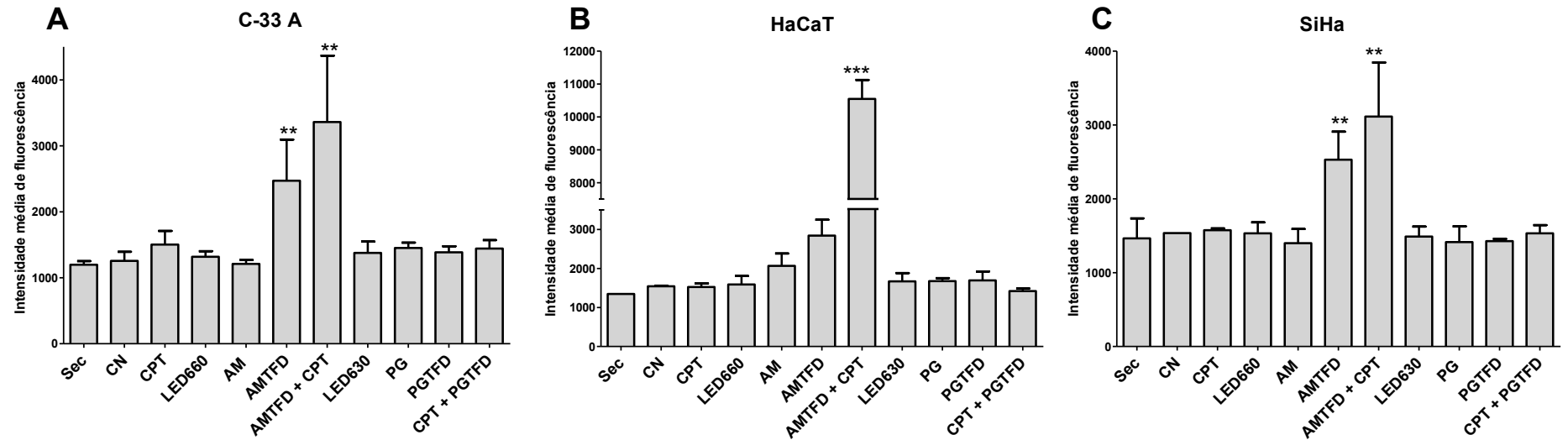
Além das quebras de fita dupla ou fita simples, a TFD pode induzir *cross-linking* de DNA, troca de cromátides-irmãs e oxidação das bases do DNA,

particularmente nos resíduos de guanina; diversos estudos apontam a formação do resíduo de 8-hidroxideoxiguanosina após a TFD mediada por azul de metileno (DAVIES et al., 2007; EPE; PFLAUM; BOITEUX, 1993; MCNAIR et al., 1997; WOODS et al., 2004).

Os resultados obtidos neste ensaio corroboram com os estudos anteriores citados, especialmente com relação à AMTFD. A grande extensão de danos ao DNA provocada por essa terapia foi acompanhada por um perfil de morte celular predominantemente necrótico, tanto na monoterapia quanto na terapia combinada. Estudos anteriores demonstraram que danos extensos ao DNA provocados por estresse oxidativo levam à morte celular por necrose: após os danos genômicos há a ativação de PARP-1 (poli-(ADP-ribose) polimerase-1), que catalisa a hidrólise de NAD<sup>+</sup>, depletando-o do contexto celular e provocando falha energética. Esse processo resulta em morte celular independente de caspases, que apresenta características de morte necrótica (CIPRIANI et al, 2005; SHEN et al, 2004; ALANO et al, 2004; BURKART et al, 1999; ELIASSON et al, 1997; COSI et al, 1994).

Para estabelecer o potencial mutagênico das terapias aqui avaliadas, os tratamentos que provocaram dano ao DNA no ensaio de genotoxicidade foram avaliados quanto à sua capacidade de induzir mutações, o que foi feito através do ensaio de formação de micronúcleos, uma técnica clássica e amplamente utilizada para a detecção de quebras ou perdas cromossômicas, descrito a seguir.

FIGURA 16 – Avaliação da fosforilação de H2AX via citometria de fluxo\*



As linhagens C-33 A (painel A), HaCaT (painel B) e SiHa foram submetidas à citometria de fluxo com anticorpo monoclonal anti- $\gamma$ H2AX após receberem os diversos tratamentos (CPT [41,6  $\mu$ M por 6 horas]; LED 660 nm [5,11 J/cm<sup>2</sup>]; AM [19,5  $\mu$ M por 20 minutos]; AMTFD [19,5  $\mu$ M AM + 5,11 J/cm<sup>2</sup> LED 660 nm]; AMTFD + CPT [19,5  $\mu$ M AM + 5,11 J/cm<sup>2</sup> LED 660 nm + 0,34  $\mu$ M CPT por 6 horas]; LED 630 nm [2,76 J/cm<sup>2</sup>]; PG [0,5  $\mu$ M por 2 horas]; PGTFD [0,5  $\mu$ M PG + 2,76 J/cm<sup>2</sup> LED 630 nm]; CPT + PGTFD [0,34  $\mu$ M CPT por 6 horas + 0,5  $\mu$ M PG + 2,76 J/cm<sup>2</sup> LED 630 nm]). As colunas representam as médias de três experimentos independentes e as barras indicam o desvio-padrão; os asteriscos indicam onde há diferença estatística em relação ao controle negativo. Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn (\* $p$ <0,05, \*\* $p$ <0,01, \*\*\* $p$ <0,001).

Sec: fluorescência basal do anticorpo secundário conjugado com AlexaFluor®488; CN: Controle Negativo; CPT: cisplatina; AM: azul de metileno; AMTFD: terapia fotodinâmica mediada por AM; PG: Photogem; PGTFD: terapia fotodinâmica mediada por PG.

\*Análise realizada na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP.

### 4.3.2. Micronúcleo

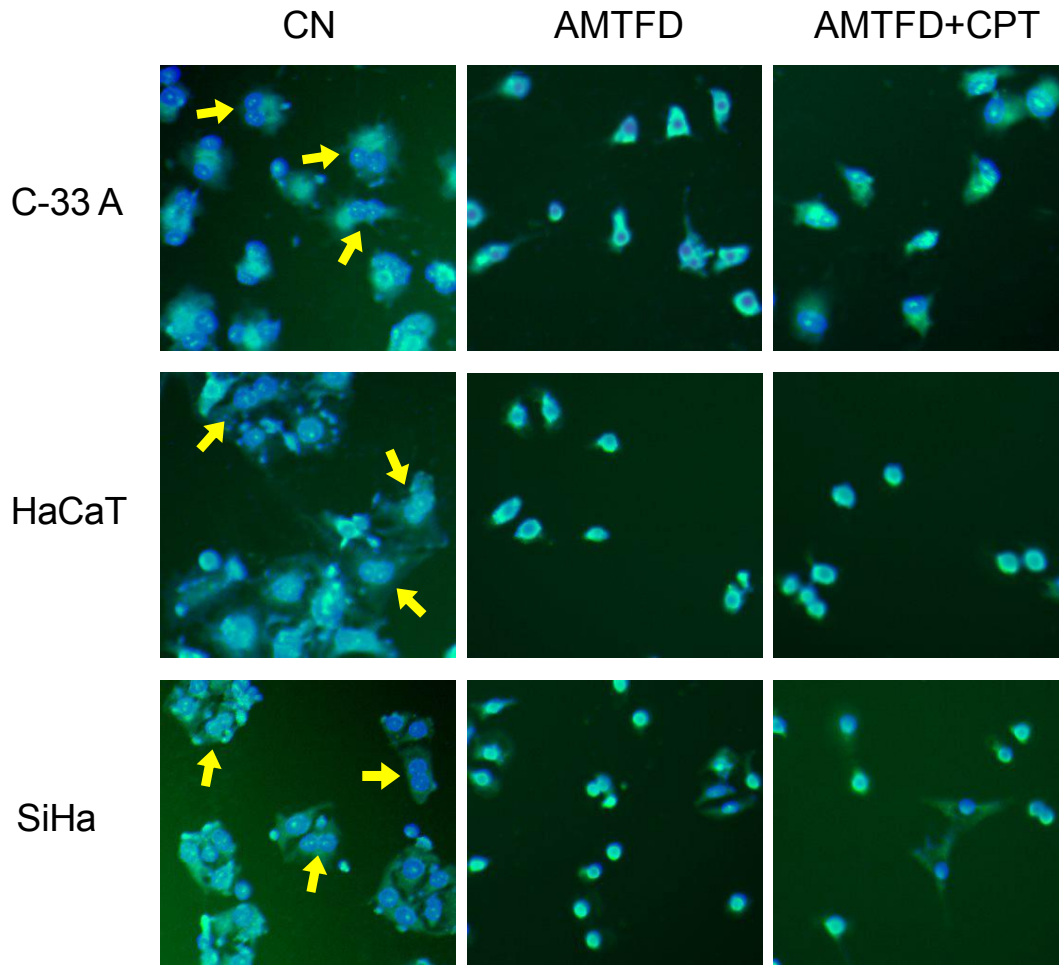
O ensaio do micronúcleo *in vitro* é um teste de genotoxicidade para a detecção de micronúcleos (MN) no citoplasma de células em intérfase. MN podem se originar de fragmentos cromossomais acêntricos (com o centrômero ausente) ou cromossomos inteiros incapazes de migrar para os polos durante o estágio de anáfase da divisão celular. O ensaio detecta a atividade de substâncias clastogênicas (indutoras de quebras cromossômicas) e aneugênicas (indutoras de aneuploidia) em células que passaram por divisão celular durante ou após a exposição à substância teste. Dessa forma, os micronúcleos representam danos que foram transmitidos para as células filhas (OCDE, 2010).

Neste ensaio foram considerados apenas os tratamentos que induziram quebras na dupla fita de DNA detectadas pela citometria de fluxo com anti- $\gamma$ H2AX (seção 4.3.1), ou seja, AMTFD e AMTFD combinada à cisplatina. Entretanto, a análise de MN nas linhagens após esses tratamentos não pôde ser realizada: dado que os MN são danos transmitidos à progênie, é necessário que as células tratadas tenham sua capacidade de divisão celular preservada após o tratamento. Porém, como pode ser observado na Figura 17, não foram encontradas células binucleadas após o tratamento com AMTFD e AMTFD + cisplatina, ao contrário do controle negativo.

Para confirmar que este resultado era realmente resultado da perda de capacidade de divisão das células, e não um erro experimental, foi realizado o ensaio de sobrevivência clonogênica, visto na Figura 18. Através dele ficou confirmado que as células perderam sua capacidade de divisão celular normal (Figura 18A), dado que as poucas células sobreviventes ao tratamento ou não conseguiram se dividir mesmo após quase 10 dias de incubação (Figura 18B).

Diante disso, embora os tratamentos AMTFD e AMTFD + cisplatina induzam grande quantidade de danos ao DNA, as poucas células que sobrevivem ao tratamento não conseguem propagar a possível mutação que adquiriram por perderem sua capacidade clonogênica. Sendo assim, a terapia fotodinâmica mediada pelo azul de metileno como monoterapia ou combinada à cisplatina apresenta baixo potencial mutagênico, o que favorece seu uso seguro na prática clínica do tratamento do câncer de colo uterino.

FIGURA 17 – Ensaio do micronúcleo

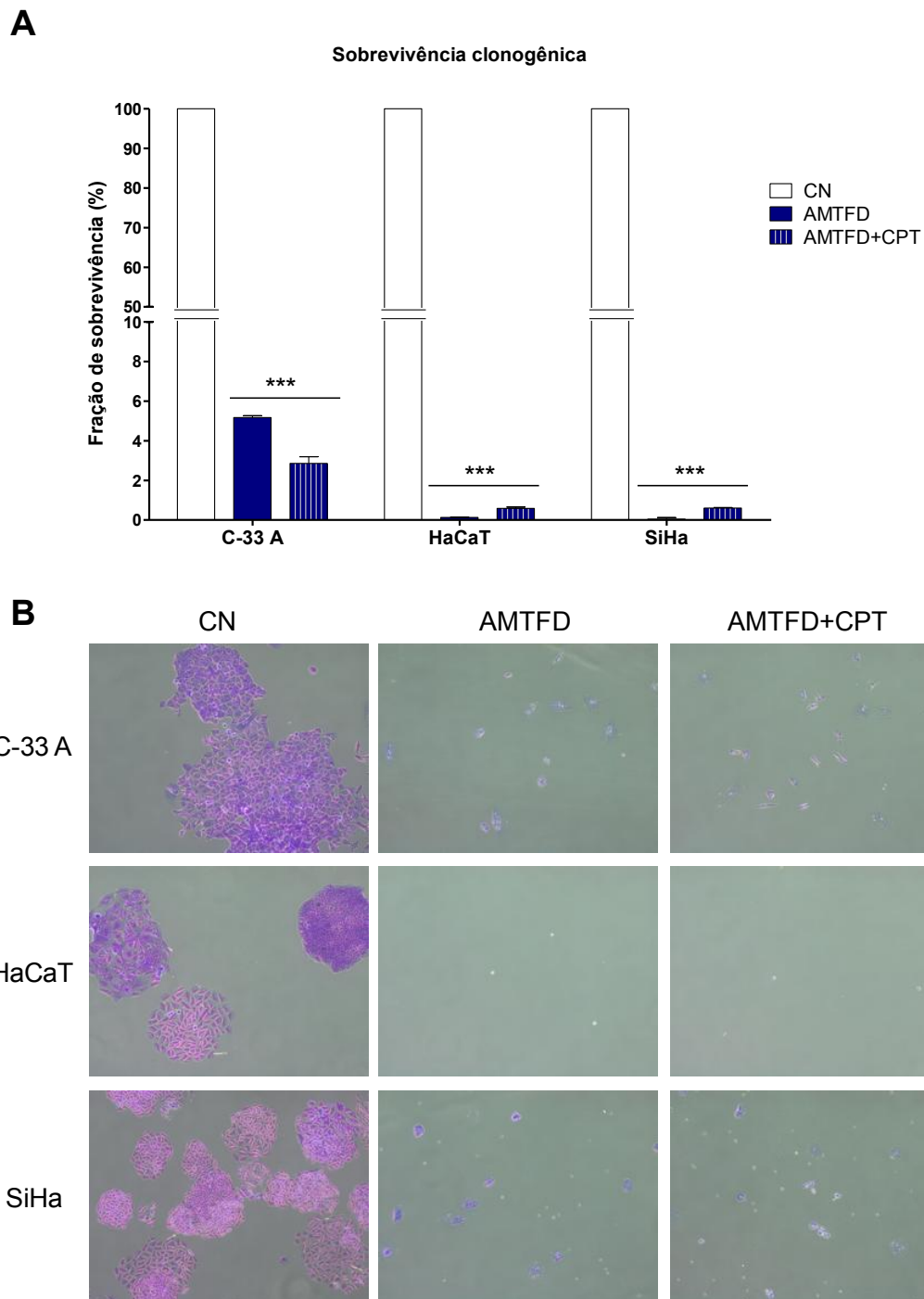


Imagens representativas do ensaio de micronúcleo. As setas amarelas indicam algumas células binucleadas. Imagens capturadas no IN Cell Analyzer 2000 com a objetiva de 20X.

CN: controle negativo; AMTFD: terapia fotodinâmica mediada por azul de metileno ( $19,5 \mu\text{M} + 5,11 \text{ J/cm}^2$ ); AMTFD + CPT: AMTFD seguida de tratamento com cisplatina por 6h ( $1,3 \mu\text{M}$ ).



FIGURA 18 – Sobrevivência clonogênica



A: Fração de sobrevivência das linhagens tratadas ou não no ensaio de sobrevivência clonogênica. As colunas representam o número médio de colônias com >50 células encontrado em cada condição em três experimentos independentes; as barras indicam o desvio-padrão. Os asteriscos indicam onde há diferença estatística em relação ao controle negativo. Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ ). B: Imagens representativas das colônias formadas pelas linhagens em cada condição de tratamento. Coloração com cristal violeta; objetiva de 10X (Microscópio Olympus CKX31)

CN: controle negativo; AMTFD: terapia fotodinâmica mediada por azul de metileno ( $19,5 \mu\text{M} + 5,11 \text{ J/cm}^2$ ); AMTFD + CPT: AMTFD seguida de tratamento com cisplatina por 6h ( $1,3 \mu\text{M}$ ).

#### 4.4. Terapia fotodinâmica em presença de bactérias

A microbiota do trato genital inferior feminino é complexa e dinâmica e sua regulação ainda não é completamente compreendida. Os estudos da microbiota bacteriana normal dessa região são primariamente limitados à caracterização dos tipos bacterianos presente em mulheres sem doença identificável, de forma qualitativa apenas (LARSEN; MONIF, 2001). A tabela 1 traz as principais bactérias isoladas do trato genital feminino inferior.

**Tabela 1 – Espécies bacterianas isoladas do trato genital feminino inferior**

ISOLADO AERÓBIO	ISOLADO ANAERÓBIO
<p><b>Bacilos Gram-positivos</b> <i>Diphtheroids</i> <i>Lactobacilli</i></p> <p><b>Cocos Gram-positivos</b> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> Espécies de <i>Streptococcus</i></p> <p><b>Bacilos Gram-negativos</b> <i>Escherichia coli</i> Espécies de <i>Klebsiella</i> e <i>Enterobacter</i> Espécies de <i>Proteus</i> Espécies de <i>Pseudomonas</i></p>	<p><b>Bacilos Gram-positivos</b> Espécies de <i>Bifidobacterium</i> Espécies de <i>Clostridium</i> Espécies de <i>Lactobacillus</i> Espécies de <i>Propionibacterium</i></p> <p><b>Cocos Gram-positivos</b> Espécies de <i>Gaffkya</i> Espécies de <i>Peptococcus</i> Espécies de <i>Peptostreptococcus</i></p> <p><b>Cocos Gram-negativos</b> Espécies de <i>Veillonella</i></p> <p><b>Bacilos Gram-negativos</b> Espécies de <i>Bacteroides</i> Espécies de <i>Fusobacterium</i> Espécies de <i>Eubacterium</i></p>

Fonte: LARSEN, B.; MONIF, G.R.G. Understanding the Bacterial Flora of the Female Genital Tract. **Clinical Infectious Diseases**, v.32; p.69-77, 2001.

A microbiota cervical tem papel importante na proteção contra infecções por microrganismos patogênicos e qualquer desequilíbrio em sua homeostase pode favorecer a instalação e o desenvolvimento de patógenos, incluindo o HPV (MARTÍN et al., 2008; NOGUERES, 2010). O HPV, por sua vez, é um vírus que uma vez instalado nas células do epitélio cervical provoca um desequilíbrio na microbiota local e favorece o surgimento de outras infecções por microrganismos oportunistas da própria microbiota ou patógenos externos (NOGUERES, 2010).

Nesse sentido, cabe considerar que o carcinoma de colo uterino possa estar associado a uma infecção bacteriana, seja por bactérias da própria microbiota ou bactérias exógenas ao cérvix uterino. Considerando o cálculo da dose adequada para a aplicação clínica, é importante considerar a presença das bactérias no mesmo

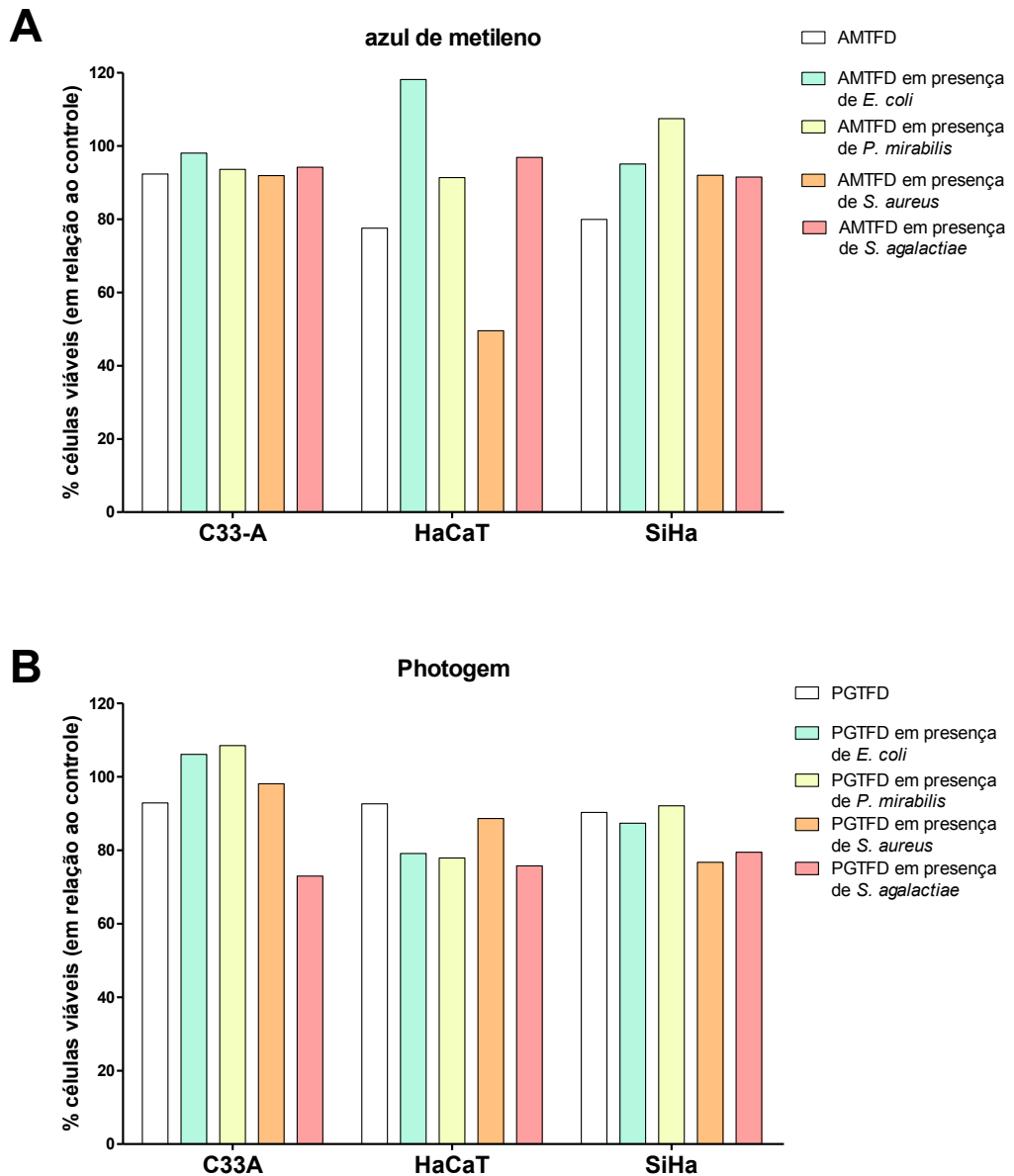
microambiente das células tumorais, dado que a Terapia Fotodinâmica também tem efeito sobre microrganismos e sua seletividade pode ser alterada dependendo da condição clínica e do protocolo de tratamento.

A figura 19 traz o resultado da TFD aplicada às linhagens celulares na ausência e presença de quatro cepas bacterianas normalmente encontradas na microbiota cervical. Embora a análise estatística não tenha encontrado diferença entre os grupos, quando tratadas com AMTFD (Figura 17A) na presença das cepas, as linhagens tiveram uma aparente maior sobrevivência em relação ao mesmo tratamento na ausência das bactérias, exceto a linhagem HaCaT na presença de *Staphylococcus aureus*. Quando foram tratadas com PGTFD (Figura 17B), por outro lado, não houve diferença significativa na sobrevivência na presença e ausência das cepas bacterianas. Essa diferença de resultados pode ser explicada pela seletividade dos fotossensibilizadores por células de mamífero ou por células bacterianas.

A seletividade antimicrobiana da terapia fotodinâmica para células bacterianas em relação às células hospedeiras de mamífero é dependente de alguns fatores que incluem o tempo de incubação, que para redução bacteriana deve ser curto, fornecimento de determinadas doses de luz local e imediatamente na área infectada, além da dependência do tipo de fotossensibilizador utilizado. No caso dos FS derivados de fenotiazínicos, como o azul de metileno, a interação deste FS catiônico com cargas negativas das células bacterianas é um processo rápido (ligação eletrostática) e completa-se dentro de alguns minutos. Ao contrário, a taxa de absorção de compostos catiônicos em células de mamíferos ocorre pelo processo de endocitose e por adsorção (ligação específica ao receptor celular) e é um processo relativamente lento (várias horas) (SOUKOS et al., 1996; ZEINA et al., 2002; ZEINA et al., 2001; GEORGE; KISHEN, 2007). Por outro lado, derivados de hematoporfirinas, como o Photogem, possuem alta afinidade de acumulação em tecidos em proliferação, como em tumores. Assim, de acordo com o fotossensibilizador empregado, a dose de luz escolhida e o tempo de incubação poderemos ter como alvo a redução bacteriana ou danos em tecidos/células de mamíferos (TANAKA et al., 2011; XU et al., 2009).

Com isso, constando-se presença de infecção bacteriana concomitante ao carcinoma faz-se necessária a adequação da dose de TFD a ser aplicada, levando em consideração o FS escolhido para o tratamento, para que a eficiência da terapia não seja comprometida.

FIGURA 19 – Tratamento das linhagens celulares com TFD em presença de cepas bacterianas



As células foram tratadas com AMTFD (A) ou PGTFD (B) na ausência ou presenças de cepas bacterianas aderidas e tiveram sua viabilidade celular determinada pelo método de redução do MTT imediatamente após os tratamentos. As cepas incubadas com o sal MTT foram utilizadas como controle do ensaio. A análise estatística (teste de Kruskal-Wallis) não revelou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ( $p > 0,05$ ). As colunas representam os resultados de um de três experimentos independentes.

## 5. Conclusões

A terapia combinada resultou em maior efeito citotóxico independentemente do protocolo empregado; porém, a sequência de administração das monoterapias quando de sua combinação foi importante. Em suma, este estudo sugere que baixas doses de quimioterápicos e fotossensibilizadores podem ser aplicadas sem a redução da efetividade do tratamento e, ao mesmo tempo, minimizando a probabilidade de ocorrência de efeitos adversos.

Ponto a ponto temos que:

- A Terapia Fotodinâmica (TFD), tanto com azul de metileno quanto com Photogem, teve efeito citotóxico significativo em todas as linhagens avaliadas;
- A TFD mediada por azul de metileno (AMTFD) foi mais seletiva para a linhagem SiHa;
- A cisplatina como monoterapia não induziu citotoxicidade significativa sobre as linhagens avaliadas, exceto na maior concentração testada;
- A terapia combinada cisplatina + TFD resultou em efeito citotóxico muito mais pronunciado em comparação às monoterapias, independente do protocolo de tratamento;
- A sequência de tratamento na terapia combinada é importante e varia de acordo com o fotossensibilizador empregado na TFD: a AMTFD atuou como sensibilizador das células à ação da cisplatina; mas a cisplatina atuou como sensibilizador das células para a ação da TFD mediada por Photogem (PGTFD);
- A AMTFD, no protocolo empregado, induz morte celular preferencialmente por necrose;
- A PGTFD, no protocolo empregado, induz morte celular com morfologia preferencialmente apoptótica, porém com baixa taxa de morte;
- Nenhum dos tratamentos induziu ativação da caspase-3, nas condições estudadas;
- Tanto em monoterapia quanto em terapia combinada com a cisplatina a AMTFD induz quebras na fita dupla de DNA;
- Tanto em monoterapia quanto em terapia combinada com a cisplatina a PGTFD não induz quebras na fita dupla de DNA.
- A AMTFD não é capaz de induzir a formação de micronúcleos e inibe a capacidade de proliferação celular das células que sobrevivem ao tratamento, tendo, portanto, baixo potencial mutagênico, apesar da genotoxicidade.
- A presença de bactérias no mesmo microambiente das células tumorais pode afetar a eficácia da TFD dependendo da espécie bacteriana e do fotossensibilizador.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS\*

ALANO, C.C.; YING, W., SWANSON, R.A. Poly(ADP-ribose) polymerase-1-mediated cell death in astrocytes requires NAD<sup>+</sup> depletion and mitochondrial permeability transition, **Journal of Biological Chemistry**, v.279, p.18895–18902, 2004.

BLÁZQUEZ-CASTRO, A. et al. Differential photodynamic response of cultured cells to methylene blue and toluidine blue: role of dark redox processes. **Photochemical & Photobiological sciences** :, v. 8, n. 3, p. 371–6, 2009.

BOARDMAN, C. H. Cervical Cancer Treatment Protocols. **Medscape Reference WebMD**, LLC v.2, p.13–17, 2011.

BRO, L. E.; KRUYT, F. A. E.; GIACCONE, G. Cell Death Independent of Caspases : A Review. **Clinical Cancer research**. v. 11, n. 9, p. 3155–3163, 2005.

BROWN, S. B.; BROWN, E. A.; WALKER, I. Review The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment Photodynamic therapy. **The Lancet - Oncology**, v. 5, p. 497–508, 2004.

BUCUR, O. et al. Analysis of apoptosis methods recently used in Cancer Research and Cell Death & Disease publications. **Cell Death and Disease**, v.3, e263, p.1-5, 2012.

BURCHELL, A. N. et al. Chapter 6: Epidemiology and transmission dynamics of genital HPV infection. **Vaccine**, v. 24 Suppl 3, n. Suppl 3, p. S3/52–61, 2006.

BURKART, V. et al. Mice lacking the poly(ADP-ribose) polymerase gene are resistant to pancreatic beta-cell destruction and diabetes development induced by streptozocin, **Nature Medicine**, v.5, p.314–319, 1999.

CHEN, D. et al. Light-Emitting Diode-Based Illumination System for In Vitro Photodynamic Therapy. **International Journal of Photoenergy**, v. 2012, p. 1–6, 2012.

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**, v 99, n.10, p.2019–27, 2008.

CIPRIANI, G. et al. Nuclear poly(ADP-ribose) polymerase-1 rapidly triggers mitochondrial dysfunction, **Journal of Biological Chemistry**, v.280, n.17, p.17227–17234, 2005.

CRESCENZI, E. et al. Photodynamic therapy with indocyanine green complements and enhances low-dose cisplatin cytotoxicity in MCF-7 breast cancer cells. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 3, n. 5, p. 537–544, 2004.

COSI, C. et al. Poly(ADP-ribose) polymerase: early involvement in glutamate-induced neurotoxicity in cultured cerebellar granule cells. **Journal of Neuroscience Research**, v.39, p.38–46, 1994.

CUTTS, F. T. et al. Human papillomavirus and HPV vaccines: a review. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 85, n. 9, p. 719–726, 2007.

---

\* Baseadas nas normas NBR 6023 e 10520, de 2002, da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

DAVIES, J. et al. Methylene blue but not indigo carmine causes DNA damage to colonocytes *in vitro* and *in vivo* at concentrations used in clinical chromoendoscopy. **Gut**, v. 56, n. 1, p. 155–6, 2007.

DE SANJOSÉ, S. et al. Human papillomavirus (HPV) and related cancers in the Global Alliance for Vaccines and Immunization (GAVI) countries. A WHO/ICO HPV Information Centre Report. **Vaccine**. 20;30 Suppl 4:D1-83, 2012.

DOLMANS, D. E.; FUKUMURA, D.; JAIN, R. K. Photodynamic Therapy for Cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 5, p. 375–80, 2003.

DOUGHERTY, T. J.; MARCUS, S. L. Feature Articles Photodynamic Therapy. **European Journal of Cancer**, p. 1734–1742, 1992.

ELIASSON, M.J. et al. Poly(ADP-ribose) polymerase gene disruption renders mice resistant to cerebral ischemia, **Nature Medicine**, v.3, p.1089–1095, 1997.

EPE, B.; PFLAUM, M.; BOITEUX, S. DNA damage induced by photosensitizers in cellular and cell-free systems. **Mutation research**, v. 299, n. 3-4, p. 135–45, 1993.

EKERT, P.G. et al. Apaf-1 and caspase-9 accelerate apoptosis, but do not determine whether factor-deprived or drug-treated cells die. **Journal of Cell Biology**, v.165, p.835–842, 2004.

FABRIS, C. et al. Photosensitization with Zinc (II) Phthalocyanine as a Switch in the Decision between Apoptosis and Necrosis. **Cancer Research**, v.61, n.20, p.7495–7500, 2001.

FRANCO, E. L.; DUARTE-FRANCO, E.; FERENCZY, A. Cervical cancer: epidemiology, prevention and the role of human papillomavirus infection. **CMAJ : Canadian Medical Association journal**, v. 164, n. 7, p. 1017–25, 2001.

FRANKEN, N. A. et al. Clonogenic assay of cells *in vitro*. **Nature Protocols**, v.1, n.5, p.2315-9, 2006.

GABRIELLI, D. et al. Binding , Aggregation and Photochemical Properties of Methylene Blue in Mitochondrial Suspensions. **Photochemistry and Photobiology**, v. 79, n. 3, p. 227–232, 2004.

GE, R. et al. An *in vitro* and *in vivo* study of combination therapy with Photogem®-mediated photodynamic therapy and cisplatin on mouse cancer cells (CT-26). **Photomedicine and laser surgery**, v. 29, n. 3, p. 155–60, mar. 2011.

GOLDSZMID, R. S. et al. Dendritic Cells Charged with Apoptotic Tumor Cells Induce Long-Lived Protective CD4 + and CD8 + T Cell Immunity against B16 Melanoma. **Journal of Immunology**, v.171, n.11, p.5940-7, 2003.

HSIEH, Y.-J. et al. Subcellular localization of Photofrin determines the death phenotype of human epidermoid carcinoma A431 cells triggered by photodynamic therapy: when plasma membranes are the main targets. **Journal of cellular physiology**, v. 194, n. 3, p. 363–75, mar. 2003.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Câncer do Colo do Útero. In: Estimativa 2014: incidência de câncer no Brasil, p. 39-40. Rio de Janeiro, Inca, 2013. 124 p.

KAMAT, J. P.; DEVASAGAYAM, T. P. Methylene blue plus light-induced lipid peroxidation in rat liver microsomes: inhibition by nicotinamide (vitamin B3) and other antioxidants. **Chemico-biological interactions**, v. 99, n. 1-3, p. 1–16, 5 jan. 1996.

KIM, H. S.; LEE, M-S. Essential Role of STAT1 in Caspase-Independent Cell Death of Activated Macrophages through the p38 Mitogen-Activated Protein Kinase/STAT1/Reactive Oxygen Species Pathway. **Molecular and Cellular Biology**, v.25, n.15, p.6821-6833, 2005.

KROEMER, G. et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. **Cell Death and Differentiation**, v.16, p.3–11, 2009.

LARMONIER, N. et al. An atypical caspase-independent death pathway for an immunogenic cancer cell line. **Oncogene**, v. 21, n. 39, p. 6091–100, 2002.

LARSEN, B.; MONIF, G. R. Understanding the bacterial flora of the female genital tract. **Clinical Infectious Diseases**, v. 32, n. 4, p. e69–77, 2001.

LEUNIG, A et al. Relation of early Photofrin uptake to photodynamically induced phototoxicity and changes of cell volume in different cell lines. **European Journal of Cancer**, v. 30A, n. 1, p. 78–83, 1994.

LIM et al. Photodynamic inactivation of viruses using upconversion nanoparticles. **Biomaterials**, v. 33, n. 6, p. 1912–1920, fev. 2012.

LIN, Y. et al. Tumor Necrosis Factor-induced Nonapoptotic Cell Death Requires Receptor-interacting Protein-mediated Cellular Reactive Oxygen Species Accumulation. **The Journal of Biological Chemistry**, v.279, p. 10822-10828, 2004.

LINARD, A. G. Mulheres submetidas a tratamento para câncer de colo uterino - percepção de como enfrentam a realidade \* Women submitted to cervix uteri cancer treatment : how they cope with reality. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 48, n. 4, p. 493–498, 2002.

LU, Y. et al. Methylene blue-mediated photodynamic therapy induces mitochondria-dependent apoptosis in HeLa cells. **Journal of cellular biochemistry**, v. 105, n. 6, p. 1451–60, 15 dez. 2008.

LÜTHI, A.U.; MARTIN SJ. The CASBAH: A searchable database of caspase substrates. **Cell Death and Differentiation**, v.14, p.641–650, 2007.

MACHADO, A. D. H. Terapia Fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. **Química Nova**, v. 23, n. 2, p. 237–243, 2000.

MARTÍN, R. et al. La microbiota vaginal: composición , papel protector , patología asociada y perspectivas terapéuticas. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 26, n. 3, p. 160–167, 2008.

MCBRIDE, T. J. et al. Mutations induced by methylene blue plus light in single-stranded M13mp2. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 15, p. 6866–70, 1992.

MCNAIR, F. I. et al. A comet assay of DNA damage and repair in K562 cells after photodynamic therapy using haematoporphyrin derivative, methylene blue and meso-tetrahydroxyphenylchlorin. **British Journal of Cncer**, v. 75, n. 12, p. 1721–9, 1997.



MELCHER, A. et al. Tumor immunogenicity is determined by the mechanism of cell death via induction of heat shock protein expression. **Nature Medicine**, v. 4, n. 5, p. 581–87, 1998.

MELO, V. H. et al. Problemas ginecológicos mais frequentes em mulheres soropositivas para o HIV. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 25, n. 9, p. 661-666, 2003.

MROZ, P. et al. Stimulation of anti-tumor immunity by photodynamic therapy. **Expert Reviews Clinical Immunology**, v. 7, n. 1, p. 75–91, 2011.

NOGUERES, I. B. Associação entre a infecção pelo papilomavírus humano ( HPV ) e outras infecções genitais femininas. **HU Revista**, v.36, n.1, p. 19–28, 2010.

OECD, In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test, Test Guideline No. 487, OECD Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris, 2010. Available at: [www.oecd.org/env/testguidelines]

PANZARINI, E.; INGUSCIO, V.; DINI, L. Immunogenic cell death: can it be exploited in PhotoDynamic Therapy for cancer? **BioMed Research International**, v. 2013, p. 4821-60, 2013.

PLATZ- CHRISTENSEN, J. J.; SUNDSTROM, E.;LARSSOM, P. G. Bacterial vaginosis and cervical intraepithelial neoplasia. **Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica**, v. 73, n. 7 , p. 586-588, 1994.

PORTER, A.G.; JÄNICKE, R.U. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. **Cell Death and Differentiation**, v.6, n.2, p. 99-104, 1999.

RELLO, S. et al. Morphological criteria to distinguish cell death induced by apoptotic and necrotic treatments. **Apoptosis** , v. 10, n. 1, p. 201–8, jan. 2005.

RIBEIRO, M. S. et al. Laser em Baixa Intensidade. In: **Técnicas e Procedimentos Terapêuticos**. [s.l: s.n.]. p. 945–953.

RODEN, R.; WU, T.-C. How will HPV vaccines affect cervical cancer? **Nature Reviews Cancer**, v. 6, n. 10, p. 753–63, 2006.

SCHEFFER, S. R. S. et al. Apoptotic, but not necrotic, tumor cell vaccines induce a potent immune response in vivo. **International Journal of Cancer**, v. 211, n. 2002, p. 205–211, 2003.

SCHULDES, H. et al. Loss of In Vitro Cytotoxicity of Cisplatin after Storage as Stock Solution in Cell Culture Medium at Various Temperatures. **Cancer**, v.79, n.9, p. 1723–1728, 1997.

SHARKEY, S. M. et al. Mitochondrial alterations in photodynamic therapy-resistant cells. **Cancer Research**, v. 53, n. 20, p. 4994-99, 1993.

SHEN, H.M. et al. Essential roles of receptor-interacting protein and TRAF2 in oxidative stress-induced cell death, **Molecular and Cellular Biology**, v.24, p.5914–5922, 2004.

SLEE, E.A.; ADRIAN, C.; MARTIN, S.J. Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p.7320–7326, 2001.

SOBEL, J. D. Candidal vulvovaginitis. **Clinical Obstetrics and Gynecology**, Hagerstown, v. 36, n. 1, p. 153-165, 1993.

SOERGEL, P. et al. Effects of photodynamic therapy using topical applied hexylaminolevulinate and methylaminolevulinate upon the integrity of cervical epithelium. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 42, n. 9, p. 624–630, 2010.

SOERGEL, P. et al. Photodynamic therapy of cervical intraepithelial neoplasia 1-3 and human papilloma virus (HPV) infection with methylaminolevulinate and hexaminolevulinate--a double-blind, dose-finding study. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 44, n. 6, p. 468–74, 2012.

SOUTO, R. O Papilomavírus Humano: um fator relacionado com a formação de neoplasias. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 51, n. 2, p. 155–160, 2005.

TAIT, S. W. G.; GREEN, D. R. Caspase-independent cell death: leaving the set without the final cut. **Oncogene**, v. 27, n. 50, p. 6452–61, 2008.

TARDIVO, J. et al. Methylene blue in photodynamic therapy: From basic mechanisms to clinical applications. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 2, n. 3, p. 175–191, 2005.

TESNIERE, A et al. Molecular characteristics of immunogenic cancer cell death. **Cell death and differentiation**, v. 15, n. 1, p. 3–12, 2008.

TIMMER, J.C.; SALVESEN, G.S. Caspase substrates. **Cell Death and Differentiation**, v.14, p.66–72, 2007.

WAGNER, M. et al. Methylene blue photodynamic therapy in malignant melanoma decreases expression of proliferating cell nuclear antigen and heparanases. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 37, n. 5, p. 527–33, 2012.

WALSH, J. G. et al. Executioner caspase-3 and caspase-7 are functionally distinct proteases. **Proceedings of the National Academy of Sciences-USA**, v.105, n.35, p.12815-9, 2008.

WOLSCHICK, N. M. et al. Câncer do colo do útero: tecnologias emergentes no diagnóstico , tratamento e prevenção da doença. Cervical uterine cancer: emerging technologies on the diagnosis , treatment and disease prevention. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 39, n. 2, p. 123–129, 2007.

WOODS, J. A. et al. The effect of photofrin on DNA strand breaks and base oxidation in HaCaT keratinocytes: a comet assay study. **Photochemistry and Photobiology**, v. 79, n. 1, p. 105–13, 2004.

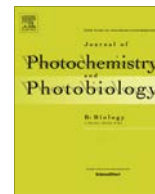
WYLD, L.; REED, M. W. R.; BROWN, N. J. Differential cell death response to photodynamic therapy is dependent on dose and cell type. **British Journal of Cancer**, v. 84, n. 10, p. 1384–1386, 2001.

## **CAPÍTULO II**



Contents lists available at ScienceDirect

## Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jphotobiol](http://www.elsevier.com/locate/jphotobiol)

# Synergistic effect of photodynamic therapy and cisplatin: A novel approach for cervical cancer



Laura Marise de Freitas, Christiane Pienna Soares, Carla Raquel Fontana\*

Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Univ Estadual Paulista (UNESP), Rua Expedicionários do Brasil 1621, Araraquara, São Paulo 14801-902, Brazil

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 27 June 2014

Received in revised form 28 August 2014

Accepted 30 August 2014

Available online 7 September 2014

### Keywords:

Photodynamic therapy

Cisplatin

Cervical cancer

Combined therapy

## ABSTRACT

Cervical cancer is a neoplasia primarily caused by Human papillomavirus (HPV) infection. Current treatment modalities involve cisplatin, a potent chemotherapeutic agent with severe adverse effects. Photodynamic therapy (PDT) is a promising modality for the treatment of cancer and infections, which has been associated with innovative therapeutic approaches, especially for the treatment of neoplasias. This study aimed to investigate the anticancer potential of PDT mediated by methylene blue (MB) or Photogem (PG) individually and combined with cisplatin *in vitro*. SiHa, C-33 A and HaCaT cells were incubated with MB, PG and/or cisplatin and received no further treatment or were irradiated with a 630 or a 660 nm LED light source at energy densities varying according to the photosensitizer (PS). The MTT assay was employed to assess cell viability. Both PS were effective in reducing cell viability with the cytotoxicity being dependent on the light dose. When compared to PDT groups, cisplatin was less effective. The cell viability of the combined therapy groups was significantly lower compared to monotherapies. The sequence of treatments (PDT + cisplatin/cisplatin + PDT) was important and had different results when varying the PS, but combination therapy resulted in an enhanced anticancer effect regardless of treatment protocol.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Cervical cancer is the third most common cancer among women worldwide with 530,232 new cases diagnosed and 275,008 deaths occurring annually, according to 2008 data [1]. HPV infection is considered the causal factor of cervical cancer with viral DNA being detected in 99.7% of cases [2]. The best way to prevent HPV infection is through vaccination, and two vaccines have been commercially available since 2006 [3]. The persistent viral infection leads to intraepithelial transformations of an insidious and progressive nature that culminates in a carcinoma if left untreated [4]. Lesions can be easily treated and completely cured if identified at an early stage [3]. If the lesions are not identified at an early stage, the treatment protocol is dependent on the tumor stage and is usually based on the association of at least two treatment modalities, such as chemotherapy/surgery or chemotherapy/radiotherapy [5,6].

Almost all protocols for cervical cancer treatment are cisplatin-based either as a single drug regimen or associated with radiation

or other antineoplastics [5]. Cisplatin forms DNA adducts resulting in the inhibition of DNA replication, thus activating apoptosis. Cisplatin's mechanism of action makes it a potent chemotherapeutic agent, but the associated adverse effects, such as nephrotoxicity and ototoxicity, as well as the resistance shown by several tumors limit its clinical use; therefore, cisplatin is combined with other therapies to achieve a desirable clinical outcome [7,8].

Photodynamic therapy (PDT) is a treatment modality capable of eliminating fast-proliferating cells that involves the administration of an individually non-toxic photosensitizer (PS) and its activation by light of a specific wavelength in the presence of oxygen, thus leading to cell and tissue toxicity via oxidative damage [9,10]. PDT has been successfully employed in cancer treatment, and it has several advantages, such as few adverse effects, minimal invasiveness and double selectivity [11].

Combining PDT and cisplatin can sum the advantages of each individual treatment, improve cervical cancer treatment and reduce cisplatin toxicity [12,13]. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effect of PDT and cisplatin individually and in combination on cervical carcinoma cells infected and non-infected with HPV16 *in vitro*.

\* Corresponding author. Tel.: +55 16 3301 5727.

E-mail addresses: [lfmarise@gmail.com](mailto:lfmarise@gmail.com) (L.M. de Freitas), [soarescp@fcar.unesp.br](mailto:soarescp@fcar.unesp.br) (C.P. Soares), [fontanacr@fcar.unesp.br](mailto:fontanacr@fcar.unesp.br) (C.R. Fontana).

## 2. Materials and methods

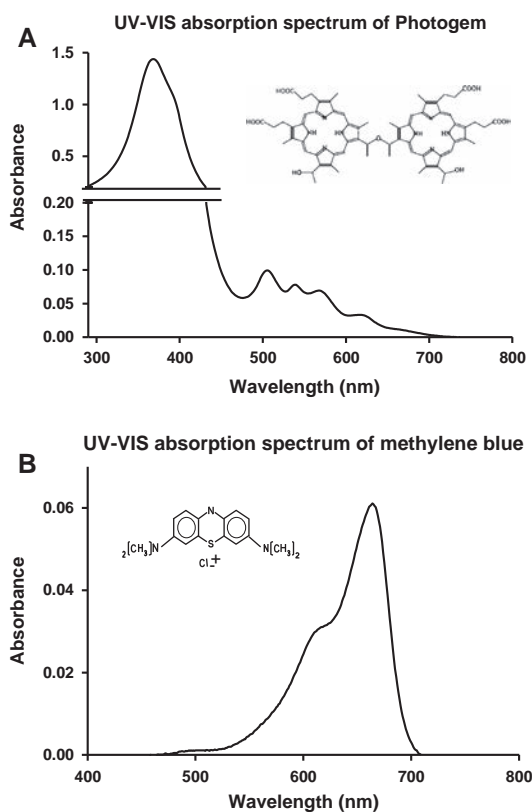
### 2.1. Cell cultures

The cell lines used in this study were SiHa (cervical carcinoma infected with HPV16; ATCC<sup>®</sup> HTB35<sup>™</sup>), C-33 A (cervical carcinoma not infected with HPV; ATCC<sup>®</sup> HTB31<sup>™</sup>), and HaCaT (spontaneously immortalized human keratinocytes). All cell lines were grown in a 1:1 mixture of Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Sigma Co., St. Louis, USA) and Ham's Nutrient Mixture F10 (Sigma Co., St. Louis, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Cultlab, Campinas, Brazil), 1X antibiotic/antimycotic solution (100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, 0.25 µg/mL amphotericin B; Sigma Co., St. Louis, USA) and 0.1 mg/mL kanamycin (Sigma Co., St. Louis, USA), which is referred to as complete medium hereafter. Cells were kept in 5% CO<sub>2</sub> atmosphere, 95% relative humidity and a constant temperature of 37 °C.

### 2.2. Photosensitizers and cisplatin

Photogem (Photogem LLC. Co., Moscow, Russia; Fig. 1A) was dissolved in PBS at a concentration of 5 mg/mL and was stored at –20 °C. Methylene blue (Sigma Co., St. Louis, USA; Fig. 1B) was dissolved in PBS at a concentration of 10 mg/mL and stored at –20 °C. Both PSs were diluted to working concentrations in complete medium prior to use.

Cisplatin was obtained as a 0.5 mg/mL solution (Tecnoplatin, Zodiac Produtos Farmaceuticos S/A, Brazil) and stored protected from light at room temperature, and it was diluted to working concentrations in complete medium prior to use.



**Fig. 1.** Absorption spectra of Photogem (A) and methylene blue (B), obtained from diluted water solutions using a Lambda 1050 UV/Vis/NIR spectrophotometer (PerkinElmer, USA) at the Chemical Institute–UNESP Araraquara.

### 2.3. Light source

Both light sources (630 and 660 nm) consisted of a compact LED array-based illumination system with a homogeneous illumination area and a cooling device, composed of 48 LEDs with variable intensities (IrradLED<sup>®</sup> – biopdi, Sao Carlos, SP, Brazil). The distance between the LED and the plate allowed an even distribution of light on each well. The power density of the incident radiation was measured using a power meter (Coherent<sup>®</sup>, Santa Clara, CA, USA).

### 2.4. Photodynamic and cisplatin treatment

All three cell lines were seeded into 96-well plates ( $1 \times 10^5$  cells/mL) and incubated overnight. In the cisplatin-only group, 8 different cisplatin concentrations were used (from 1.3 to 166 µM). The medium was changed after 6, 12 or 24 h, and cell viability was determined using the MTT assay after an additional 24 h as previously described [14].

Treatment groups are summarized in Table 1.

For the Photogem–photodynamic therapy (PG–PDT) group, the cells were untreated or exposed to 630 nm LEDs at 1.39 or 2.76 J/cm<sup>2</sup> after a 2 h incubation with different PG concentrations (from 0 to 8.5 µM; twofold dilutions). In the methylene blue–photodynamic therapy (MB–PDT) group, the cells were untreated or exposed to 660 nm LEDs at 1.29, 2.56, 5.11 or 12.9 J/cm<sup>2</sup> after a 20 min incubation with different MB concentrations (from 0 to 156.4 µM; twofold dilutions). After each PDT treatment, fresh media was added to the wells. The MTT assay was performed 24 h later.

In the combination group, cisplatin concentrations (from 1.3 to 41.6 µM) were administered 6, 12 or 24 h before or after MB–PDT or PG–PDT. The MTT assay was performed 24 h after each treatment.

For all MTT assays, 100 µL of MTT solution (0.5 mg/mL; in complete medium without serum) was added to each well and incubated for 3 h. The solution was then replaced by 100 µL of acidified isopropanol (4% HCl), and the absorbance was measured at 570 nm (BioTek Powerwave X, BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA). The percentage of cell viability was calculated by dividing the mean absorbance in each treatment group by the mean absorbance in the control group. The assay was performed as three independent quadruplicates.

### 2.5. Statistical analysis

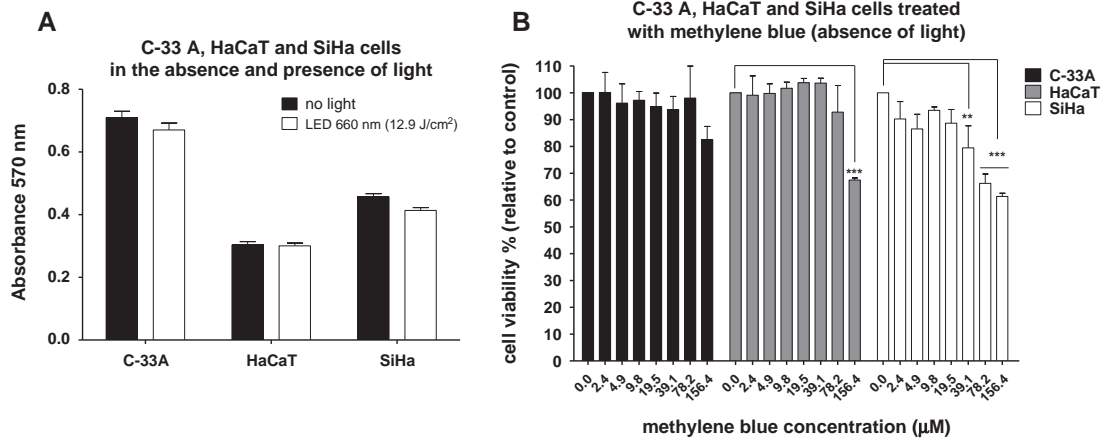
Data were expressed as the mean plus standard deviation (SD) and were analyzed by one-way ANOVA with Tukey's post hoc test using GraphPad Prism<sup>®</sup> Version 5.01 software (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Differences were considered to be significant when  $p < 0.05$ . The acceptable coefficient of variation was less than or equal to 25%.

**Table 1**

Treatment groups for photodynamic therapy and cisplatin monotherapies and combination therapies.

Groups	(PS)	(Cisplatin)	Light dose
Methylene blue (MB)	0.0–156.4 µM	0	0
Photogem (PG)	0.0–8.5 µM	0	0
MB–PDT	0.0–78.2 µM	0	1.29–12.9 J/cm <sup>2</sup>
PG–PDT	0.0–8.5 µM	0	1.39 and 2.76 J/cm <sup>2</sup>
Cisplatin	0	0.0–166 µM	0
Cisplatin + MB–PDT	19.5 µM	1.3–41.6 µM	5.11 J/cm <sup>2</sup>
Cisplatin + PG–PDT	0.5 µM	1.3–41.6 µM	2.76 J/cm <sup>2</sup>

PS: photosensitizer; MB–PDT: methylene blue–mediated photodynamic therapy; PG–PDT: Photogem–mediated photodynamic therapy.



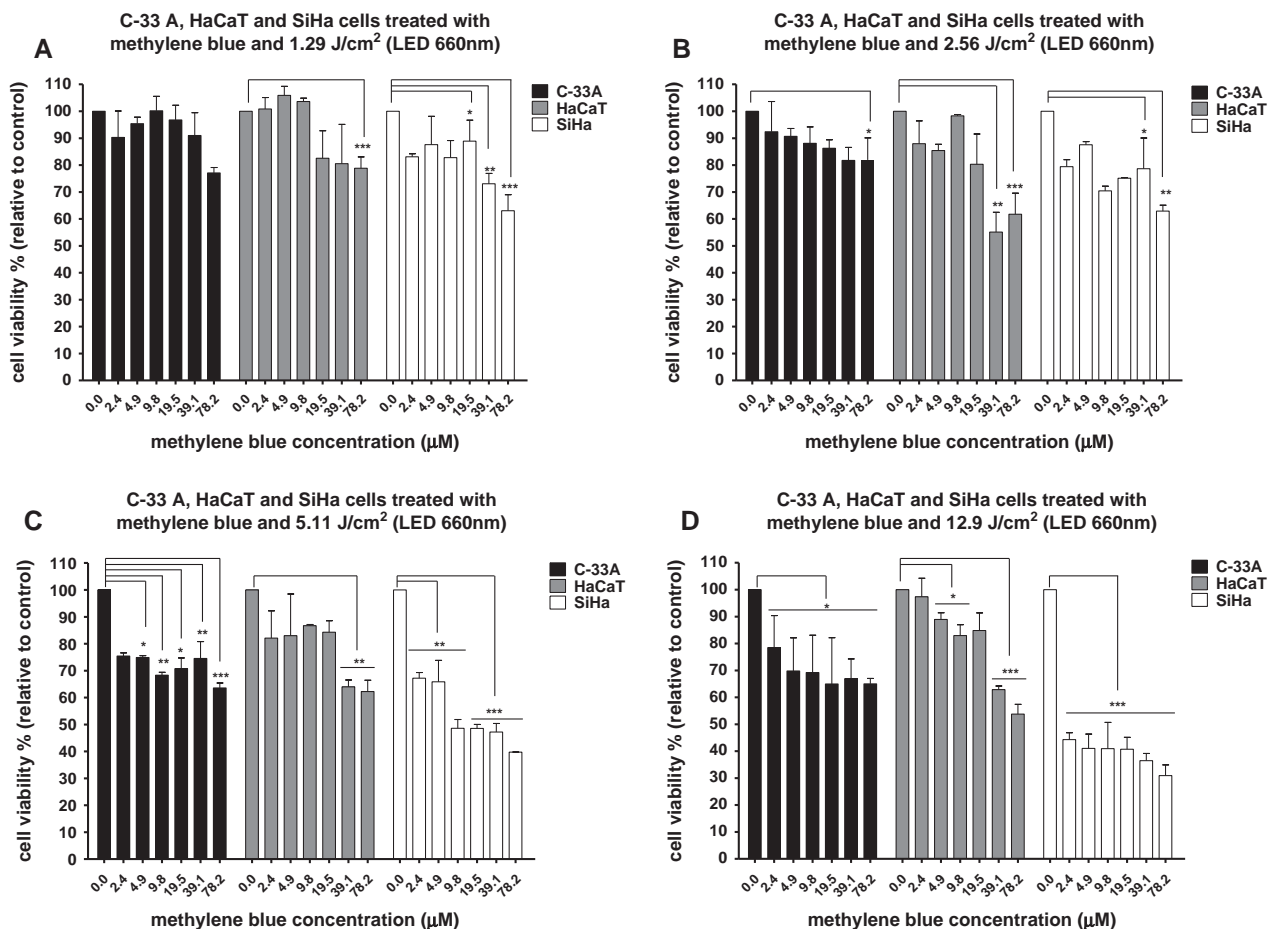
**Fig. 2.** Cytotoxic effect of LED 660 nm source treatment and methylene blue treatment on C-33 A, HaCaT and SiHa cells. The 660 nm LED light source did not have toxic effects on the cell lines (panel A). MB showed no dark toxicity, except at 156.4 µM (panel B). Columns of each color represent three independent quadruplicate samples ( $n = 12$ ), and bars represent standard deviation. Asterisks indicate statistical significance (one-way ANOVA with Tukey's post hoc test). \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .

### 3. Results

#### 3.1. PDT

To select the best conditions to test MB-PDT and PG-PDT, we tested a variety of incubation times, MB and PG concentrations and light doses, based on pertinent literature [15–18; data not

shown]. The best incubation times were 20 min for MB and 2 h for PG. Light doses of up to 60 J/cm<sup>2</sup> were evaluated; massive cell death occurred above 12.9 J/cm<sup>2</sup> for MB-PDT and 2.76 J/cm<sup>2</sup> for PG-PDT, leading us to establish 12.9 J/cm<sup>2</sup> and 2.76 J/cm<sup>2</sup> as the maximum light dose for each therapy. Similarly, MB concentrations greater than 156.4 µM and PG concentrations greater than 8.5 µM also resulted in marked decrease in cell viability. Therefore, the protocol conditions were chosen so that a reasonable percent-



**Fig. 3.** Cytotoxic effect of methylene blue-mediated photodynamic therapy on C-33 A, HaCaT and SiHa cells. Lower light doses (1.29 J/cm<sup>2</sup> – panel A; 2.56 J/cm<sup>2</sup> – panel B) did not result in significant cellular toxicity, but higher light doses (5.11 J/cm<sup>2</sup> – panel C; 12.9 J/cm<sup>2</sup> – panel D) caused the SiHa cells to be significantly more sensitive to MB-PDT compared to the other cell lines. Total exposure time to the therapy was 20 min. Columns of each color represent three independent quadruplicate samples ( $n = 12$ ), and bars represent standard deviation. Asterisks indicate statistical significance (one-way ANOVA with Tukey's post hoc test). \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .

age of cells survived, allowing us to compare the effects of photodynamic therapy with different PSs and cell lines.

All three cell lines were exposed to a high light dose ( $12.9 \text{ J/cm}^2$  for LED 660 nm; and  $13.8 \text{ J/cm}^2$  for LED 630 nm) to determine the potential cytotoxic effect caused by light alone. Figs. 2A and 4A show that both light sources had no significant toxic effect on the three cell lines.

The dark toxicity test was also performed by treating cells with MB or PG in the absence of light as shown in Figs. 2B and 4B. Excluding a MB concentration of  $156.4 \mu\text{M}$  (this concentration was not used in further experiments), no other concentration showed dark toxicity.

Fig. 3A–D display the behavior of cell lines when treated with MB-mediated PDT with the 660 nm LED source (MB–PDT) at  $1.29 \text{ J/cm}^2$  (panel A),  $2.56 \text{ J/cm}^2$  (panel B),  $5.11 \text{ J/cm}^2$  (panel C) and  $12.9 \text{ J/cm}^2$  (panel D). As the light dose increased during PDT, the phototoxic effect was increased, and the SiHa cells were more sensitive as compared to the other two cell lines (panels C and D). To further investigate this trend, the IC<sub>50</sub> (50% inhibitory concentration) of MB–PDT on SiHa cells was estimated to be at  $5.11 \text{ J/cm}^2$  using the MB concentration range from  $9.8$  to  $39.1 \mu\text{M}$ . The IC<sub>50</sub> for HaCaT cells was  $12.9 \text{ J/cm}^2$  and  $78.2 \mu\text{M}$  MB. C-33 A was the only cell line for which the IC<sub>50</sub> for MB–PDT could not be determined in the conditions tested; this finding suggests a resistance of this cell line to MB-mediated PDT as compared to the results obtained for the SiHa and HaCaT cell lines.

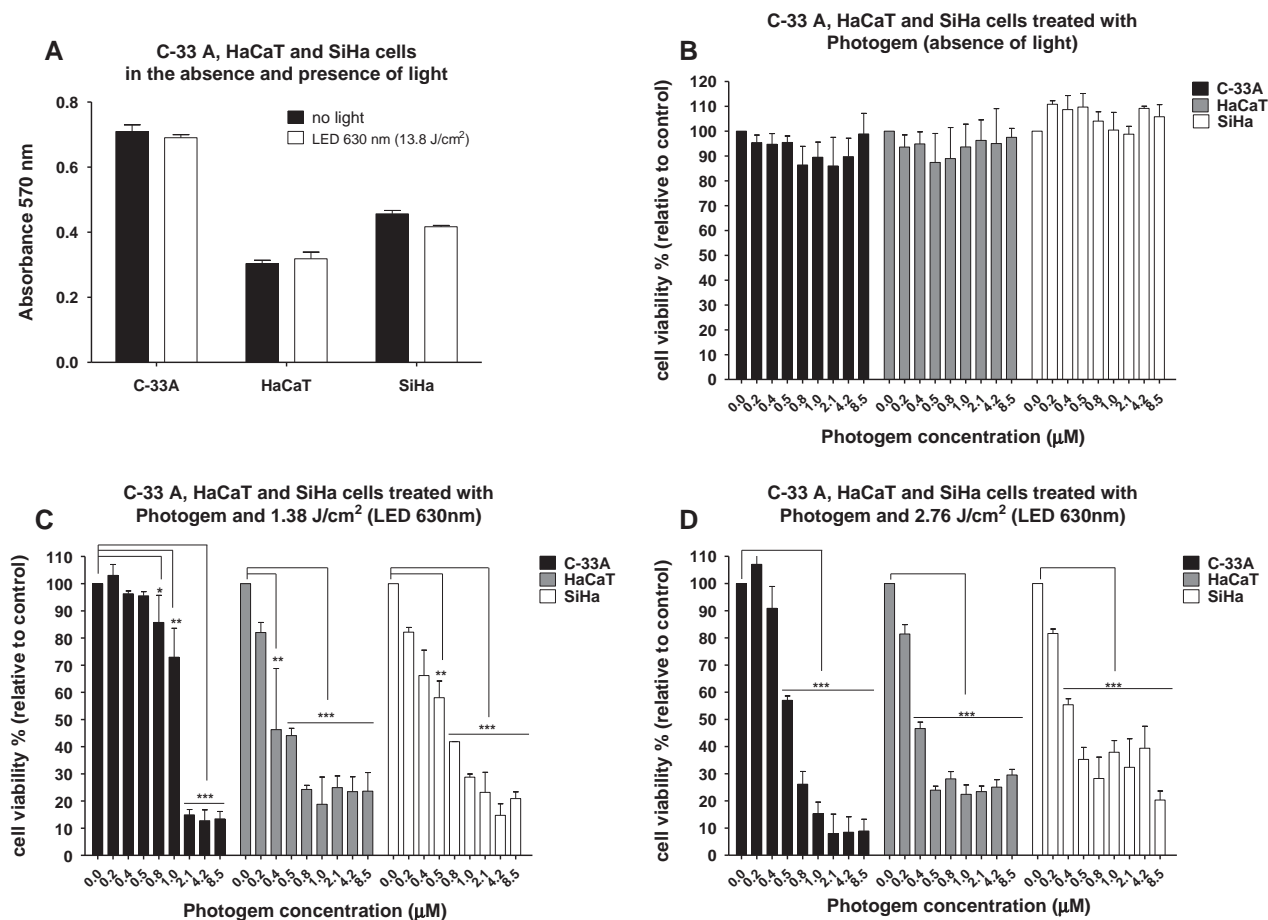
For the following assays, we selected a MB dose of  $19.5 \mu\text{M}$  and light dose of  $5.11 \text{ J/cm}^2$ , which was the condition in which the differences in the response to MB–PDT of the three cell lines were more evident.

Comparing to the data obtained for MB–PDT, the trend of higher sensitivity of the SiHa cells was not observed when PDT was mediated by Photogem and a 630 nm LED light source (PG–PDT) as shown in Fig. 4C and D, but light dose dependency on the phototoxic effect was observed. PG–PDT resulted in higher cytotoxicity than MB–PDT. The most sensitive cell line was C-33 A ( $2.76 \text{ J/cm}^2$ ) at higher concentrations of PG, while SiHa and HaCaT presented similar results. The IC<sub>50</sub> for all three cell lines was close to  $0.5 \mu\text{M}$  PG and  $2.76 \text{ J/cm}^2$ , and this condition was selected for further assays.

### 3.2. Cisplatin

The conventional treatment of cervical cancer involves the combination of chemotherapies and radiotherapies with cisplatin as the main antineoplastic drug [5]. The three cell lines were treated with cisplatin at 8 different concentrations and 3 different incubation times to evaluate their susceptibility to this drug (Fig. 5).

Due to the low stability of cisplatin at pH levels less than 5.5 (culture media has pH 7.4), we tested 6, 12 and 24 h treatment protocols (Fig. 5A–C, respectively). Except for the  $166 \mu\text{M}$  concentration where a statistically significant difference among the



**Fig. 4.** Cytotoxic effect of LED 630 nm source treatment, Photogem treatment and photodynamic therapy mediated by Photogem on C-33 A, HaCaT and SiHa cells. The 630 nm LED light source did not have toxic effects on cell lines (panel A). PG showed no dark toxicity (panel B). PG–PDT induced significant cellular toxicity at  $0.4 \mu\text{M}$  regardless of the light dose (panels C and D). Total exposure time to the therapy was 120 min. Columns of each color represent three independent quadruplicate samples ( $n = 12$ ), and bars represent standard deviation. Asterisks indicate statistical significance (one-way ANOVA with Tukey's post hoc test). \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .

average percentages of cellular viability of HaCaT and SiHa cells in all three incubation times was observed, no significant difference among the treatment protocols was found. This result indicated that even if the stability of cisplatin at pH 7.4 is not ideal, its degradation rate did not compromise the results with the concentrations used. Additionally, concentrations greater than 41.6  $\mu\text{M}$  resulted in a difference in the response among the cell lines as follows: HaCaT was the most sensitive of all three; and SiHa was slightly more sensitive than C-33 A.

### 3.3. PDT plus cisplatin

In this group, we tested PDT in combination with cisplatin in two conditions as follows: MB-PDT or PG-PDT was applied before incubation with cisplatin; and the PDT protocol was applied after incubation with cisplatin. The cisplatin protocol involved concentrations ranging from 1.3 to 41.6  $\mu\text{M}$  for 6, 12 or 24 h. The MB-PDT protocol involved treatment with 19.5  $\mu\text{M}$  MB and 5.11 J/cm<sup>2</sup> light intensity, and the PG-PDT protocol involved treatment with 0.5  $\mu\text{M}$  PG and 2.76 J/cm<sup>2</sup> light intensity.

In general, PDT + cisplatin was highly effective in reducing the IC<sub>50</sub> of the chemotherapeutic agent in all cell lines regardless of the incubation protocol. For MB, performing PDT before the treatment with cisplatin for 12 or 24 h (Fig. 6B and C) produced better results than irradiating the cells after incubation with cisplatin (Fig. 7B and C). However, when cells were incubated with cisplatin

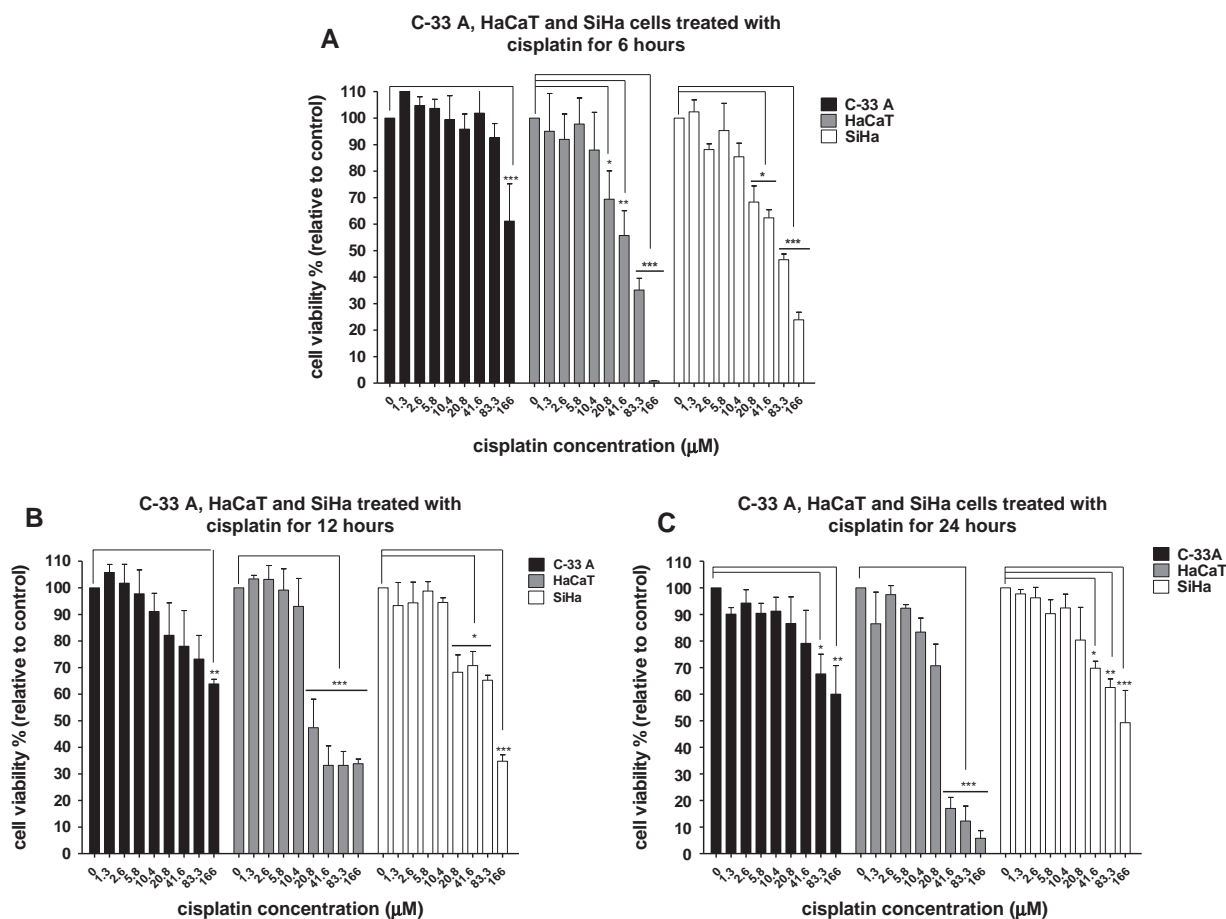
for 6 h, the order of treatment (PDT + cisplatin or cisplatin + PDT) did not result in any differences (Figs. 6A and 7A).

In contrast, when the PS was changed, the incubation time affected the obtained results. Unlike MB, PG-mediated PDT resulted in major cell death after treating cells with cisplatin for 6 or 12 h before PDT (Fig. 9A and B). Nevertheless, for the incubation time of 24 h, the best cellular reduction was observed when PDT was applied before cisplatin (Fig. 8C).

## 4. Discussion

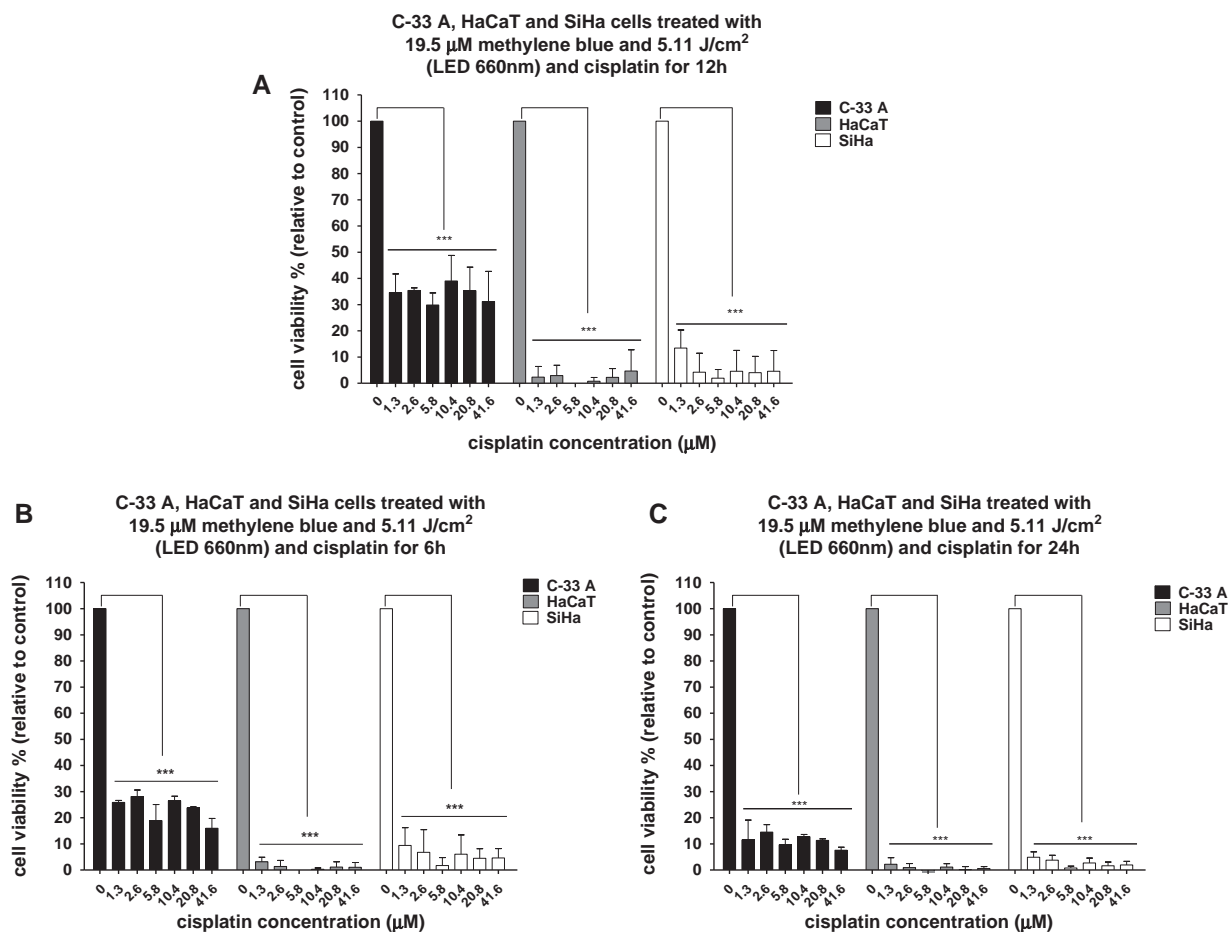
The fundamental rationale for combination therapy in cancer is to use approaches that work through different mechanisms of action. The combination of different approaches may result in the following advantages: targeting of different key signal transduction pathways; more efficient destruction of cancer cells; enhancement in overall therapeutic efficacy; and additive or even synergistic effects so that the dose of the most toxic component can be reduced in order to eliminate or lessen noxious side effects.

The role of PDT as a cancer treatment, either in combination with traditional methods or alone, arises as a non-complex modality with few side effects [19]. There are several factors influencing photodynamic effects, including the type of PS, light dose, incubation protocol, the target cell and oxygen availability [20]. In the present study, we assessed the photodynamic effects of PG, MB and cisplatin alone as well as in combination with PDT. Different



**Fig. 5.** Cytotoxic effect of cisplatin on C-33 A, HaCaT and SiHa cells. Cell lines were subjected to cisplatin treatment for 6 (panel A), 12 (panel B) or 24 h (panel C). Cisplatin induced significant cell death at 20.8  $\mu\text{M}$ , and HaCaT was the most sensitive cell line. Columns of each color represent three independent quadruplicate samples ( $n = 12$ ), and bars represent standard deviation. Asterisks indicate statistical significance (one-way ANOVA with Tukey's post hoc test). \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .





**Fig. 6.** Cytotoxic effect of photodynamic therapy mediated by methylene blue followed by cisplatin on C-33 A, HaCaT and SiHa cells. Cell lines were subjected to MB-PDT followed by cisplatin treatment for 6, 12 or 24 h (panels A, B and C, respectively). MB-PDT followed by cisplatin treatment for 24 h caused higher cytotoxicity. Columns of each color represent three independent quadruplicate samples ( $n = 12$ ), and bars represent standard deviation. Asterisks indicate statistical significance (one-way ANOVA with Tukey's post hoc test). \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .

protocols were tested, and the effect of application order on cellular reduction was also evaluated.

Our results showed that both photosensitizers were effective in reducing cancerous cell viability in the tested conditions. PG-mediated PDT promoted cell death with low PS and light concentrations, but MB-PDT demonstrated a slight advantage by promoting selective cell death causing greater phototoxicity in SiHa cells and lesser phototoxicity in HaCaT cells even with the highest light dose. Considering that most cervical cancer cases are caused by HPV infection, this result is important.

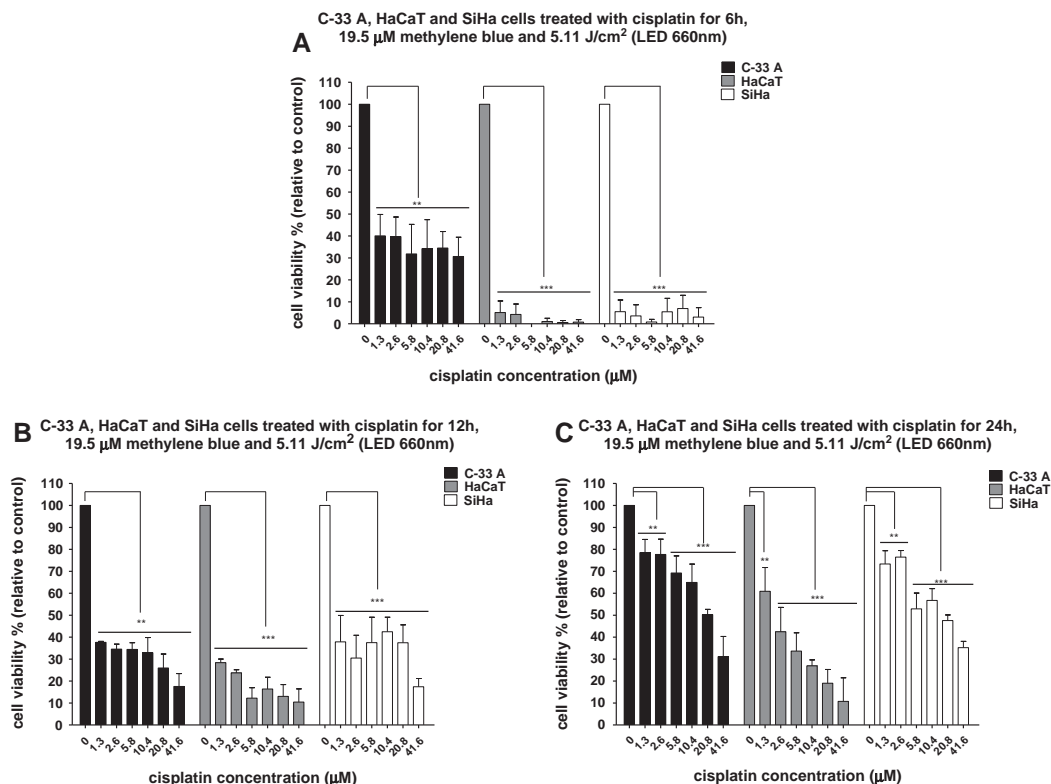
Although we did not elucidate the mechanisms that cause SiHa cells to be more sensitive to MB-PDT, the presence of HPV16 in SiHa cells may cause the cells to be more susceptible to the therapy. This could be due to a greater genomic instability caused by the presence of viral DNA in the cell genome [21], potentiating the genomic damage caused by reactive oxygen species generated by photodynamic treatment and culminating in the higher cell death rate observed for SiHa cells treated with MB-PDT, predominantly by apoptosis (unpublished data). However, PG-PDT did not cause the same effect. We are investigating this issue in an ongoing study; apparently PG-PDT promotes a more aggressive cell death, with a higher percentage of necrotic cells than MB-PDT, which promotes cell death mainly by apoptosis.

Cervical cancer treatment protocols depend on the tumor stage and can involve surgery, chemotherapy, radiation or chemoradia-

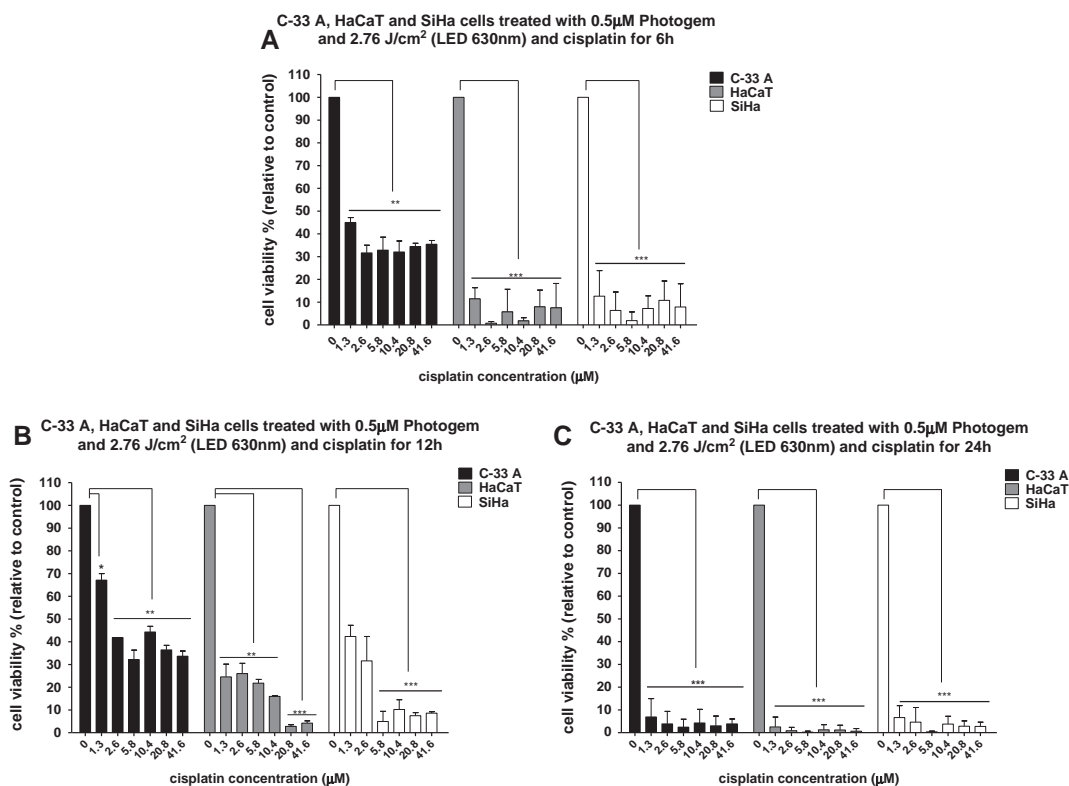
tion, but almost all protocols are cisplatin-based [5]. According to the literature, therapeutic concentrations of cisplatin range from 1 to 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , and a concentration of 6  $\mu\text{g}/\text{mL}$  can cause severe ototoxic effects [22]. In the conditions tested here, we observed significant cell death of cancerous cell lines at concentrations greater than 166  $\mu\text{M}$  corresponding to 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , which is a concentration 12.5-fold higher than the therapeutic one. This result showing that the high cisplatin dose caused cell death is in agreement with the difficulty of obtaining satisfactory clinical response when treating malignant tumors with cisplatin only; thus, the use of cisplatin combined with other drugs and/or radiotherapy is necessary [23].

As observed in the results obtained for cisplatin as monotherapy (Section 3.2), treatment for 6 h resulted in more cell death with the highest concentration (166  $\mu\text{M}$ ) for HaCaT and SiHa cell lines, which was an unexpected result. However, Hermann et al. reported in a recent study that the half-life of cisplatin is approximately 2 h [24]. Moreover, Saris et al. showed that the formation of cisplatin-DNA adducts is fast, reaching a plateau between 4 and 6 h after beginning of incubation, e can be reverted [25].

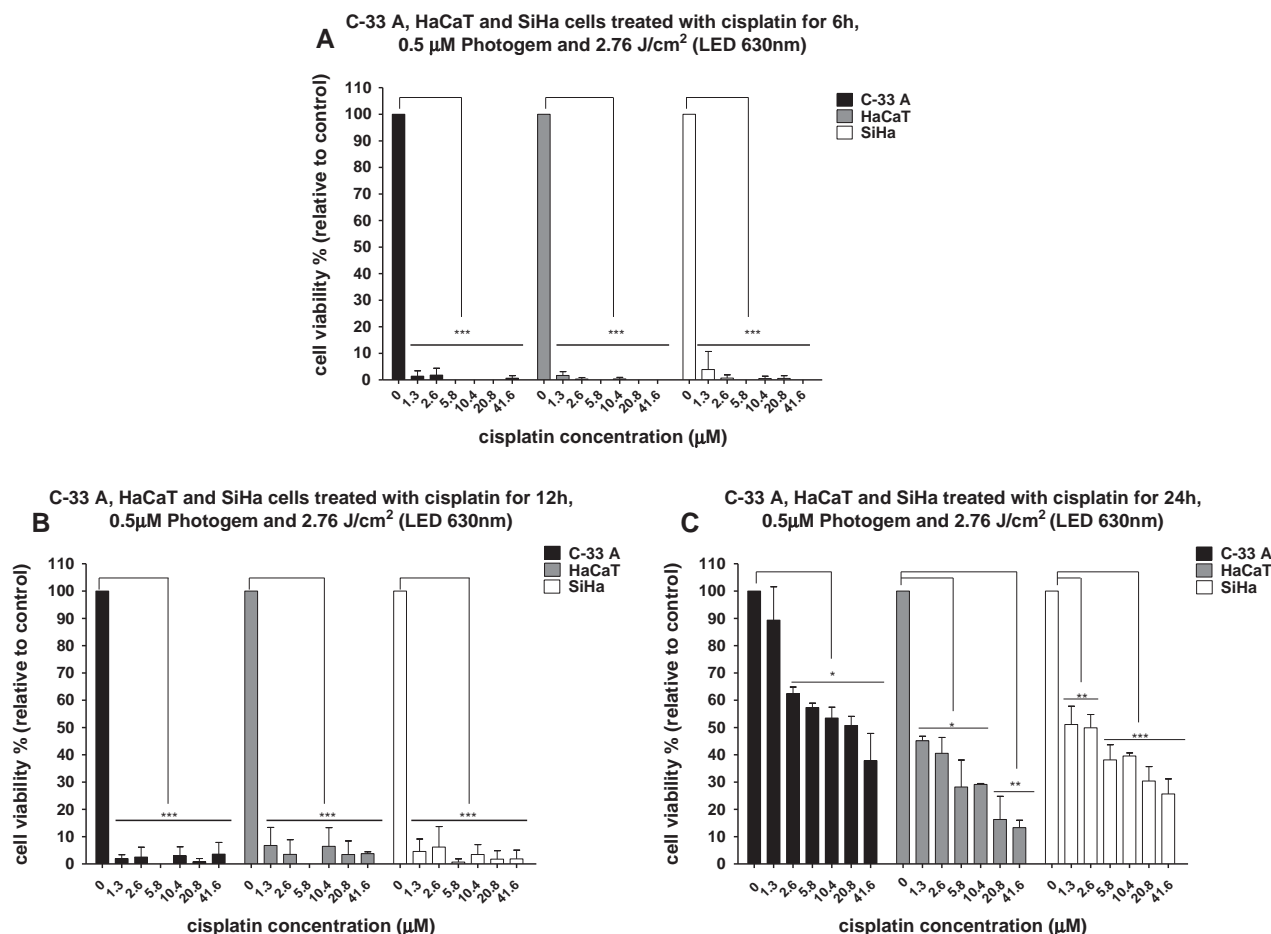
Taking those results together with the fact that cisplatin enters cell by passive diffusion [24,26,27] and that extracellular cisplatin concentration tends to be equal to intracellular cisplatin concentration, we hypothesized that in incubation times longer than 6 h the cisplatin bonding to DNA may be disfavored. This may be a result of cisplatin dislocation from the nucleus to cytosol and/or



**Fig. 7.** Cytotoxic effect of cisplatin followed by photodynamic therapy mediated by methylene blue on C-33 A, HaCaT and SiHa cells. Cell lines were subjected to cisplatin treatment for 6, 12 or 24 h followed by MB-PDT (panels A, B and C, respectively). Cisplatin for 6 h followed by MB-PDT caused higher cytotoxicity. Columns of each color represent three independent quadruplicate samples ( $n = 12$ ), and bars represent standard deviation. Asterisks indicate statistical significance (one-way ANOVA with Tukey's post hoc test). \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .



**Fig. 8.** Cytotoxic effect of photodynamic therapy mediated by Photogem followed by cisplatin on C-33 A, HaCaT and SiHa cells. Cell lines were subjected to PG-PDT followed by cisplatin treatment for 6, 12 or 24 h (panels A, B and C, respectively). PG-PDT followed by cisplatin treatment for 24 h caused higher cytotoxicity. Columns of each color represent three independent quadruplicate samples ( $n = 12$ ), and bars represent standard deviation (one-way ANOVA with Tukey's post hoc test). Asterisks indicate statistical significance (one-way ANOVA with Tukey's post hoc test). \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .



**Fig. 9.** Cytotoxic effect of cisplatin followed by photodynamic therapy mediated by Photogem on C-33 A, HaCaT and SiHa cells. Cell lines were subjected to cisplatin treatment for 6, 12 or 24 h (panels A, B and C, respectively) followed by PG–PDT. Cisplatin treatment for 6 h followed by PG–PDT caused higher cytotoxicity. Columns of each color represent three independent quadruplicate samples ( $n = 12$ ), and bars represent standard deviation (one-way ANOVA with Tukey's post hoc test). Asterisks indicate statistical significance (one-way ANOVA with Tukey's post hoc test).  $p < 0.05$ ;  $^{*}p < 0.01$ ;  $^{***}p < 0.001$ .

extracellular environment, as a consequence of cisplatin degradation. This may in turn reduce the formation of adducts and, consequently, decrease cytotoxicity.

Our results were dependent of both the cell line and concentration of cisplatin, a finding consistent with results obtained in previous studies [24–26].

Although cisplatin presents limiting factors, such as high toxicity and tumor resistance, it remains one of the most powerful antineoplastics available [24,28]. Searching for therapeutic synergistic alternatives that could reduce the administered dose and elevate the effectiveness of cisplatin (reducing its adverse effects) is of great value. Therefore, we combined cisplatin with PDT mediated either by MB or PG in several conditions as described earlier.

The best incubation protocols were MB–PDT followed by cisplatin treatment for 24 h and cisplatin treatment for 6 h followed by PG–PDT. In these conditions, cisplatin doses as low as 1.3 μM (0.34 μg/mL) eliminated more than 90% of the tumor cells, which is a dose 3-fold lower than the minimum therapeutic dose indicated in the literature (1–4 μg/mL; [22]). When the cell lines in this study were treated only with 1.3 μM cisplatin, the viability of the cells was 100% at 6, 12 and 24 h.

We observed that combined therapy (cisplatin + PDT or PDT + cisplatin) was also more effective with an incubation time of 6 h, consistent with data obtained for cisplatin monotherapy.

Therefore, our *in vitro* results indicated that the combination of PDT with cisplatin has great potential to be used in the clinical practice because the tumor cells were almost completely elimi-

nated with just one application of low dose cisplatin, PS and light, thereby resulting in a low potential to induce significant adverse effects. Therefore, PDT could be a safer alternative to radiation in the treatment of cervical cancer.

## 5. Conclusion

Our data showed that the administration sequence of combination therapy presented different results according to the photosensitizer employed, thus revealing that the use of alkylating antineoplastic agents in association with PDT is dependent on variables, such as order of application.

Low doses of cisplatin acted as a sensitizing agent to PG-mediated PDT. In contrast, MB-mediated PDT sensitized the tumor cells for cisplatin action.

In conclusion, the combination therapy resulted in an enhanced anticancer effect regardless of the treatment protocol. Our study suggested that low doses of antineoplastic drugs and PS may be employed without decreasing treatment efficacy and, at the same time, may reduce the likelihood of significant adverse effects.

## Conflict of Interest

The authors indicate that there are no potential conflicts of interest.

## Acknowledgments

Financial support from FAPESP 2012/25414-0 and 2012/21203-4 (Fundacao de Amparo a Pesquisa do Estado de Sao Paulo) is gratefully acknowledged. We also thank Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato and Cristina Kurachi for furnishing the Photogem.

## References

- [1] S. de Sanjosé, B. Serrano, X. Castellsagué, M. Brotons, J. Muñoz, L. Bruni, F.X. Bosch, Human papillomavirus (HPV) and related cancers in the Global Alliance for Vaccines and Immunization (GAVI) countries. A WHO/ICO HPV Information Centre Report, *Vaccine*, 20;30 Suppl 4:D1–83, 2012, doi: 10.1016/S0264-410X(12)01435-1.
- [2] E.L. Franco, E. Duarte-Franco, A. Ferenczy, Cervical cancer: epidemiology, prevention and the role of human papillomavirus infection, *Can. Med. Assoc.* 164 (7) (2001) 1017–1025.
- [3] R. Roden, T.-C. Wu, How will HPV vaccines affect cervical cancer?, *Nat. Rev. Cancer* 6 (10) (2006) 753–763, <http://dx.doi.org/10.1038/nrc1973>.
- [4] A.G. Linard, F.A. Dantas e Silva, R.M. Silva, Mulheres submetidas a tratamento para câncer de colo uterino – percepção de como enfrentam a realidade \* Women submitted to cervix uteri cancer treatment: how they cope with reality, *Rev. Bras. Canc.* 48 (4) (2002) 493–498.
- [5] S.C. Dowdy, C.H. Boardman, T.O. Wilson, K.C. Podratz, L.C. Hartmann, H.J. Long, Multimodal therapy including neoadjuvant methotrexate, vinblastine, doxorubicin, and cisplatin (MVAC) for stage IIB to IV cervical cancer, *Am. J. Obstet. Gynecol.* 186 (6) (2002) 1167–1173, <http://dx.doi.org/10.1067/mob.2002.123820>.
- [6] N.M. Wolschick, M.E.L. Consolaro, L.E. Suzuki, C.G. Boer, Câncer do colo do útero : tecnologias emergentes no diagnóstico, tratamento e prevenção da doença/cervical uterine cancer: emerging technologies on the diagnosis, treatment and disease prevention, *Rev. Bras. Anal. Clin.* 39 (2) (2007) 123–129.
- [7] K.B. Meyer, N.E. Madias, Cisplatin nephrotoxicity, *Miner. Electrolyte Metab.* 20 (1994) 201–213.
- [8] M. Crul, R.C.A. van Waardenburg, J.H. Beijnen, J.H.M. Schellens, DNA-based drug interactions of cisplatin, *Cancer Treat. Rev.* 28 (6) (2002) 291–303, [http://dx.doi.org/10.1016/S0305-7372\(02\)00093-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0305-7372(02)00093-2).
- [9] T.J. Dougherty, S.L. Marcus, Feature articles photodynamic therapy, *Eur. J. Cancer* (1992) 1734–1742.
- [10] D.E. Dolmans, D. Fukumura, R.K. Jain, Photodynamic therapy for cancer, *Nat. Rev. Cancer* 3 (5) (2003) 375–380, <http://dx.doi.org/10.1038/nrc1071>.
- [11] S.B. Brown, E.A. Brown, I. Walker, Review the present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment, *Lancet Oncol.* 5 (2004) 497–508, [http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045\(04\)01529-3](http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045(04)01529-3).
- [12] G. Canti, A. Nicolini, R. Cubeddu, P. Taroni, G. Bandieramonte, G. Valentini, Antitumor efficacy of the combination of photodynamic therapy and chemotherapy in murine tumors, *Cancer Lett.* 125 (1–2) (1998) 39–44, [http://dx.doi.org/10.1016/S0304-3835\(97\)00502-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-3835(97)00502-8).
- [13] D.K. Kelleher, J. Bastian, O. Thews, P. Vaupel, Enhanced effects of aminolaevulinic acid-based photodynamic therapy through local hyperthermia in rat tumours, *Br. J. Cancer* 89 (2003) 405–441, <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjc.6601036>.
- [14] F. Denizot, R. Lang, Rapid colorimetric assay for cell growth and survival modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability, *J. Immunol. Methods* 89 (1986) 271–277, [http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759\(86\)90368-6](http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759(86)90368-6).
- [15] S.M. Sharkey, B.C. Wilson, R. Moorehead, G. Singh, Mitochondria! Alterations in photodynamic therapy-resistant cells, *Cancer Res.* 53 (1993) 4994–4999.
- [16] A. Leunig, F. Staub, J. Peters, A. Heimann, C. Csapo, O. Kempfski, A.E. Goetz, Relation of early photofrin uptake to photodynamically induced phototoxicity and changes of cell volume in different cell lines, *Eur. J. Cancer* 30A (1) (1994) 78–83.
- [17] Y. Chen, W. Zheng, Y. Li, J. Zhong, J. Ji, P. Shen, Apoptosis induced by methylene-blue-mediated photodynamic therapy in melanomas and the involvement of mitochondrial dysfunction revealed by proteomics, *Cancer Sci.* 99 (10) (2008) 2019–2027, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1349-7006.2008.00910.x>.
- [18] A. Blázquez-Castro, J.C. Stockert, F. Sanz-Rodríguez, A. Zamarrón, A. Juarranza, Differential photodynamic response of cultured cells to methylene blue and toluidine blue: role of dark redox processes, *Photochem. Photobiol. Sci.* 8 (3) (2009) 371–376, <http://dx.doi.org/10.1039/b818585a>.
- [19] I. Postiglione, A. Chiaviello, G. Palumbo, Enhancing photodynamic therapy efficacy by combination therapy: dated, current and oncoming strategies, *Cancers* 3 (2011) 2597–2629, <http://dx.doi.org/10.3390/cancers3022597>.
- [20] A.E. O'Connor, W.M. Gallagher, A.T. Byrne, Porphyrin and nonporphyrin photosensitizers in oncology: preclinical and clinical advances in photodynamic therapy, *Photochem. Photobiol.* 85 (2009) 1053–1074, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1751-1097.2009.00585.x>.
- [21] M. Kadaja, H. Isok-Paas, T. Laos, E. Ustav, M. Ustav, Mechanism of genomic instability in cells infected with the high-risk human papillomaviruses, *PLoS Pathog.* 5 (4) (2009) 1–16, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1000397>.
- [22] H. Schuldes, S. Bade, J. Knobloch, D. Jonas, Loss of *in vitro* cytotoxicity of cisplatin after storage as stock solution in cell culture medium at various temperatures, *Cancer* 79 (9) (1997) 1723–1728, [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0142\(19970501\)79:9<1723::AID-CNCR13>3.0.CO;2-#](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1097-0142(19970501)79:9<1723::AID-CNCR13>3.0.CO;2-#).
- [23] C.J. Kao, G.T. Wurz, A.M. Monjzab, D.P. Vang, T.B. Cadman, S.M. Griffey, M. Wolf, M.W. Degregorio, Antitumor effects of cisplatin combined with tecemotide immunotherapy in a human MUC1 transgenic lung cancer mouse model, *Cancer Immunol. Res.* 2 (6) (2014) 581–589, <http://dx.doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-13-0205>.
- [24] G. Hermann, P. Heffeter, T. Falta, W. Berger, S. Hanna, G. Koellensperger, *In vitro* studies on cisplatin focusing on kinetic aspects of intracellular chemistry by LC-ICP-MS, *Metallomics* 5 (2013) 636–647, <http://dx.doi.org/10.1039/c3mt20251h>.
- [25] C.P. Saris, P.J.M. van de Vaart, R.C. Rietbroek, F.A. Bloramaert, *In vitro* formation of DNA adducts by cisplatin, lobaplatin and oxaliplatin in calf thymus DNA in solution and in cultured human cells, *Carcinogenesis* 17 (12) (1996) 2763–2769.
- [26] A.M.J. Fichtinger-Schepman, S.D. Van der Yelde-Visser, H.C.M. Van Dijk-Knijnenburg, A.T. van Oosterom, R.A. Baan, F. Berends, Kinetics of the formation and removal of cisplatin-DNA adducts in blood cells and tumor tissue of cancer patients receiving chemotherapy: comparison with *in vitro* adduct formation, *Cancer Res.* 50 (1990) 7887–7894.
- [27] D.P. Gately, S.B. Howell, Cellular accumulation of the anticancer agent cisplatin: a review, *Br. J. Cancer* 67 (6) (1993) 1171–1176.
- [28] E. Shaili, Platinum anticancer drugs and photochemotherapeutic agents: recent advances and future developments, *Sci. Prog.* 97 (2014) 20–40, <http://dx.doi.org/10.3184/003685014X13904811808460>.