



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de São José do Rio Preto

Tairine Zara Lopes

**Estudo da ação da berberina associada à terapia fotodinâmica em células
de carcinoma renal**

São José do Rio Preto
2019

Tairine Zara Lopes

**Estudo da ação da berberina associada à terapia fotodinâmica em células
de carcinoma renal**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biociências, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marília de Freitas Calmon

São José do Rio Preto
2019

L864e

Lopes, Tairine Zara

Estudo da ação da berberina associada à terapia fotodinâmica em células de carcinoma renal / Tairine Zara Lopes. -- São José do Rio Preto, 2019

86 p. : il., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto

Orientadora: Marília de Freitas Calmon

1. Autofagia. 2. Apoptose. 3. Berberina. 4. Carcinoma de células renais. 5. Terapia fotodinâmica. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp.
Biblioteca do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Tairine Zara Lopes

Estudo da ação da berberina associada à terapia fotodinâmica em células de carcinoma renal

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biociências, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Marília de Freitas Calmon

Comissão examinadora

Prof^ª. Dr^ª. Marília de Freitas Calmon
UNESP – São José do Rio Preto
Orientadora

Prof^ª. Dr^ª. Ana Elizabete Silva
UNESP – São José do Rio Preto

Prof^ª. Dr^ª. Patrícia Simone Leite Vilamaior
UNESP – São José do Rio Preto

Prof^ª. Dr^ª. Paola Jocelan Scarin Provazzi Trabulsi
Instituto Municipal de Ensino Superior - IMES Catanduva

Prof^ª. Dr^ª. Graziella Anselmo Joanitti
Universidade de Brasília (UnB)

São José do Rio Preto
13 de novembro de 2019

DEDICATÓRIA

Aos meus amados pais, que sempre me apoiaram, estiveram presentes e nunca mediram esforços para que meus sonhos se concretizassem.

Obrigada por sempre me ensinar os valores da vida e caminho do bem.

Não há palavras para descrever o que sinto por vocês!

Ao meu querido esposo, que com muito amor torna os meus dias mais leves.

Que sempre me incentiva a continuar e perseverar na realização dos meus sonhos.

Por me fazer acreditar que Deus é o diferencial em nossas vidas.

Obrigada pela sua dedicação, paciência e companheirismo.

À minha irmã, pelo forte incentivo e apoio em todos os momentos da minha vida.

Pela amizade, carinho e otimismo.

AGRADECIMENTOS

Deus, pelo dom da vida, pela fé e força proporcionada ao longo deste desafio. Pelos constantes cuidados, pela sua presença incomparável e seu impressionante amor. Obrigada por ser a motivação dos meus dias e por dar sentido a eles, pois tudo vem de Ti!

Aos meus pais, pelo constante apoio e orações dedicadas a mim. Minha gratidão ao amor e carinho será eterna. Sem vocês nada tem sentido. Obrigada por simplesmente existirem em minha vida.

Ao meu esposo, por simplesmente fazer parte dos meus dias e torná-los mais alegres. Por sempre acreditar no meu potencial e me incentivar nos dias mais difíceis. Obrigada por tudo! Amo-te!

À Dr^a. Marília de Freitas Calmon agradeço pela grande oportunidade a mim concedida, pelo acolhimento e apoio. Obrigada por contribuir com a minha evolução profissional, por compartilhar seus conhecimentos e experiências. Agradeço por todas as orientações concedidas.

À Prof^a. Dr^a. Paula Rahal, pelo acolhimento em seu laboratório, por me proporcionar crescimento pessoal e profissional. Obrigada por toda a dedicação e preocupação ao longo do projeto.

Aos Membros da banca examinadora, por aceitarem o convite e pela disponibilidade em analisar e contribuir com o meu trabalho.

Aos meus amigos do Laboratório de Estudos Genômicos do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas: Ágata, Ana Emília, Bárbara (B1), Bárbara (B2), Cíntia, Dayla, Gabriela, Guilherme, Hariel, Lenira, Maria Letícia, Nayara, Pâmela, Ricardo e Tamara, obrigada pela amizade e companheirismo, vocês tornam os meus dias mais alegres!

Ao Prof. Dr. Raghuvir Krishnaswamy Arni e Dr. Fábio Rogério de Moraes pela colaboração com o trabalho.

À Universidade Estadual Paulista – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (UNESP-IBILCE) pela oportunidade de adquirir conhecimentos. Pelo suporte durante todo o desenvolvimento do trabalho.

A todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos e gratidão.

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

RESUMO

O carcinoma renal ou carcinoma de células renais (CCR) é o tipo mais comum de câncer de rim, correspondendo ao décimo quarto tipo de câncer mais prevalente no mundo. Apesar de perfazer cerca de 2-3% de todos os tipos de tumores, este tipo de câncer é de caráter altamente agressivo sendo considerada a lesão maligna urológica mais letal e com índices de mortalidade crescentes. O aumento da incidência vem sendo observado ao longo dos anos devido aos recentes avanços da detecção precoce dos tumores renais, proporcionada através de técnicas de imagem como ultrassonografias, imagens de ressonância magnética e tomografias computadorizadas. A cirurgia constitui a base de tratamento, porém as taxas de recidivas são muito altas, além disso, os tratamentos sistêmicos como a quimioterapia e imunoterapia além de não serem eficazes neste tipo tumoral, induzem a efeitos colaterais severos. Dessa forma, existe uma necessidade de desenvolvimento de novas drogas e modalidades terapêuticas mais efetivas e minimamente invasivas. A berberina possui um grande espectro de aplicações clínicas, e sua atividade anticâncer já foi relatada em diversas linhagens tumorais. Sua natureza fluorescente e seu potencial fototóxico são condições para um eficiente fotossensibilizador para uso em processos fotodinâmicos. Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos da Terapia Fotodinâmica usando a berberina como agente fotossensibilizante, em linhagens de carcinoma renal. A berberina apresentou citotoxicidade dose e tempo dependente e eficiente internalização em todas as linhagens. O efeito anticâncer da berberina foi potencializado quando associado à terapia fotodinâmica, diminuindo consideravelmente a viabilidade celular, além disso, as espécies reativas de oxigênio geradas induziram morte celular por autofagia e apoptose. Foi observada diminuição da expressão dos genes *FIGF* e *TERT* que estão relacionados aos processos de angiogênese e regulação da atividade da telomerase, respectivamente. Ao contrário do gene *PLK3*, considerado um supressor tumoral, houve aumento da expressão após o tratamento. Neste estudo, o tratamento proposto foi capaz de alterar metabólitos que estão relacionados à proliferação e migração celular, além da angiogênese. Assim, é possível concluir que a berberina tem potencial promissor como agente fotossensibilizante em um sistema de terapia fotodinâmica, pois induziu efeitos anticâncer significativos em células de carcinoma renal.

Palavras-chave: Autofagia; Apoptose; Berberina; Carcinoma de células renais; Terapia fotodinâmica

ABSTRACT

Renal carcinoma or renal cell carcinoma (RCC) is the most common type of kidney cancer, corresponding to the 14th most prevalent type of cancer in the world. Despite it accounts for about 2-3% of all types of tumors, this type of cancer is highly aggressive and is considered the most lethal malignant urologic lesion with increasing mortality rates. Increased incidence has been observed over the years due to recent advances in the early detection of renal tumors, provided by imaging techniques such as ultrasonography, magnetic resonance imaging and computed tomography. Surgery is the basis for treatment, but relapse rates are very high. In addition, systemic treatments such as chemotherapy and immunotherapy, besides not being effective in this tumor type, induce severe side effects. Thus, there is a need for development of new drugs and more effective and minimally invasive therapeutic modalities. Berberine has a wide spectrum of clinical applications, and its anticancer activity has been reported in several tumor lines. Its fluorescent nature and its phototoxic potential is a condition for an efficient photosensitizer for use in photodynamic processes. Thus, this work aimed to evaluate the effects of Photodynamic Therapy using berberine as a photosensitizing agent in renal carcinoma cell lines. Berberine presented dose and time dependent cytotoxicity and efficient internalization in all cell lines. The anticancer effect of berberine was potentiated when associated with photodynamic therapy, considerably reducing cell viability, and the reactive oxygen species generated induce cell death by autophagy and apoptosis. We observed decreased expression of FIGF and TERT genes which are related to angiogenesis processes and regulation of telomerase activity, respectively. Unlike the PLK3 gene, considered a tumor suppressor, expression increased after treatment. In this study, the proposed treatment was able to alter metabolites that are related to cell proliferation, migration and angiogenesis. Thus, it is possible to conclude that berberine has promising potential as a photosensitizing agent in a photodynamic therapy system, because it induced significant anticancer effects on renal carcinoma cells.

Keywords: *Autophagy; Apoptosis; Berberine; Photodynamic therapy; Renal cell carcinoma*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Estrutura química da berberina.....	24
Figura 2. Terapia fotodinâmica: reações tipo I e tipo II.....	26

Lista de Ilustrações Artigo Científico

Figure 1: Cytotoxicity of berberine on ACHN, 786-O and HK-2 cells.....	58
Figure 2: Fluorescence microscopy images of cells incubated with berberine.....	59
Figure 3: Phototoxicity assay in ACHN, 786-O and HK-2 cells.....	60
Figure 4: ROS generation was induced by berberine associated PDT.....	61
Figure 5: Autophagy was induced by berberine associated PDT.....	62
Figure 6: Apoptosis was induced by berberine associated PDT.....	63
Figure 7: ¹ H-NMR spectra from cell lines 786-O after treatment.....	65
Figure S1: PCA, PLS-DA and OPLS-DA score plots for 786-O cell culture medium metabolites.....	67
Figure S2: Alanine, arginine and asparagine levels from 786-O cell culture medium after 30 minutes, 3 hours and 6 hours.....	68
Figure S3: Aspartate, carnitine and cystine levels from 786-O cell culture medium after 30 minutes, 3 hours and 6 hours.....	69
Figure S4: Valine, formate and fumarate levels from 786-O cell culture medium after 30 minutes, 3 hours and 6 hours.....	70
Figure S5: Glucose, glutamine and histidine levels from 786-O cell culture medium after 30 minutes, 3 hours and 6 hours.....	71
Figure S6: Hypoxanthine, isoleucine and lactate levels from 786-O cell culture medium after 30 minutes, 3 hours and 6 hours.....	72
Figure S7: Leucine, lysine and niacinamide levels from 786-O cell culture medium after 30 minutes, 3 hours and 6 hours.....	73
Figure S8: Phenylalanine, proline and pyridoxine levels from 786-O cell culture medium after 30 minutes, 3 hours and 6 hours.....	74
Figure S9: Sarcosine, succinate and tyrosine levels from 786-O cell culture medium after 30 minutes, 3 hours and 6 hours.....	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Grupos de estadiamento.....	21
--	----

Lista de Tabelas Artigo Científico

Table I: Differential expression of target genes of anticancer drugs in 786-O cells after treatment with berberine associated PDT.....	64
Table II: Differential metabolites in 786-O cells after treatment with berberine associated PDT compared with control.....	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus celcius
¹ O ₂	Oxigênio singlete
786-O	Linhagem celular derivada de carcinoma de células renais
ACHN	Linhagem celular derivada de carcinoma de células renais metastático
ANOVA	Análise de variância
AUC	<i>Area under the curve</i> (Área sob a curva)
BBR	Berberina
BLC-2	<i>B-celleukemia/lymphoma-2 genes</i> (Linfoma de células B2)
ccCCR	Carcinoma renal de células claras
CCR	Carcinoma de células renais
cDNA	DNA complementar
cm²	Centímetros quadrados
CO₂	Dióxido de Carbono
CPMG	Call-Pursell-Meiboom-Gill
D.O	Densidade óptica
D₂O	Água deuterada
DCF	2'-7'- Diclorodihidrofluoresceína
DCFDA	2'-7'- Diclorodihidrofluoresceína-diacetato
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DSS	Ácido 4,4-dimetil-4-silapentano-1-sulfônico
DTT	Ditiotreitol
ERO	Espécie reativa de oxigênio
FBS	Fetal bovine serum (Soro fetal bovino)
FIDs	Decaimentos de indução livre
FIGF	<i>Vascular endothelial growth factor – D</i> (Fator de crescimento endotelial vascular)
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i> (Isotiocianato de fluoresceína)
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
HCT116	Linhagem celular derivada de carcinoma de colon
HK-2	Linhagem celular derivada de túbulos proximais de rim
HSQC	<i>Heteromolecular single quantum coherence</i> (Coerência quântica única)

	heteromolecular)
IFN-α	Interferon- α
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina 1
IL-2	Interleucina 2
IMC	Índice de massa corporal
INCA	Instituto Nacional do Câncer
J/cm²	Joules por centímetro quadrado
K	Kelvin
KSF-M	<i>Keratinocyte serum free medium</i> (Meio para queratinócitos livre de soro)
LN229	Linhagem celular derivada de glioblastoma
MEMα	<i>Minimum Essential Medium Eagle α</i> (Meio essencial mínimo α)
mg	Miligrama
MHz	Mega-hertz
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MMP-2	Metaloproteinase - 2
MMP-9	Metaloproteinase - 9
MMPs	Metaloproteinases
MTHFDL-1	<i>Methylenetetrahydrofolate dehydrogenase-1</i> (Metilenotetrahidrofolato dehidrogenase-1)
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina
mW	Milliwatt
NCH601	Linhagem celular derivada de glioblastoma
nm	Nanômetro
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i> (Ressonância Magnética Nuclear)
O₂⁻	Radical superóxido
OH	Hidroxila
OPLS-DA	<i>Orthogonal Partial Least Square Discriminant Analysis</i> (Análise discriminante parcial pelo menor quadrado ortogonal)
PBS	<i>Phosphate Buffered saline</i> (Tampão salino de fosfato)
PCA	<i>Principal component analysis</i> (Análise de componentes principais)
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Reação em cadeia da polimerase)
PDT	<i>Photodynamic Therapy</i> (Terapia Fotodinâmica)
PLK-3	<i>Polo-likekinase 3</i> (Polo likequinase 3)

PLS-DA	<i>Partial Least Square Discriminant Analysis</i> (Análise discriminante parcial pelo menor quadrado)
ppm	Partes por milhão
PS	<i>Photosensitizer</i> (fotossensibilizador)
PS es	<i>Photosensitizer</i> excited singlet (Fotossensibilizador no estado singlete excitado)
PS et	<i>Photosensitizer</i> excited triplet (Fotossensibilizador no estado singlete excitado)
RCC	<i>Renal cell carcinoma</i> (Carcinoma de células renais)
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RNA	Ácido ribonucleico
ROC	<i>Receiver Operating Characteristic</i> (Característica de operação do receptor)
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> (Espécies Reativas de Oxigênio)
rpm	Rotações por minuto
RPMI 1640	<i>Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium</i> (Meio de cultura Roswell Park Memorial Instituto 1640)
RT-PCR	<i>Real time-PCR</i> (Reação em cadeia da Polimerase em tempo real)
SVM	<i>Support vector machine</i> (Máquina de vetores de suporte)
TBHP	Terc-butilhidroperóxido
TCE	Tricloroetileno
TERT	Trascriptase reversa da telomerase
TFD	Terapia Fotodinâmica
TGF-β2	<i>Transforming growth factor-beta 2</i> (Fator de crescimento de transformação bet-2)
TOCSY	<i>Total correlation spectroscopy</i> (Espectroscopia de correlação total)
TSA	Tricostatina A
U	Unidades
U87	Linhagem celular derivada de glioblastoma
UVA	Ultravioleta A
v/v	Volume/volume
VEGFD	<i>Vascular endothelial growth factor – D</i> (Fator de crescimento endotelial vascular - D)
VEGFD-3	<i>Vascular endothelial growth factor - D3</i> (Fator de crescimento endotelial vascular – D3)
VHL	<i>Von Hippel-Lindau tumor supressor</i> (Ubiquitinaligase3)
µg	Micrograma

μL

Microlitro

μM

Micromolar

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1 Carcinoma de células renais.....	16
1.1.1 Epidemiologia.....	16
1.1.2 Classificação e caracterização.....	17
1.1.3 Fatores de risco.....	18
1.1.4 Diagnóstico e fatores prognósticos.....	20
1.1.5 Tratamento.....	21
1.2 Berberina.....	23
1.3 Terapia fotodinâmica.....	25
2. OBJETIVOS	29
2.1 Objetivos específicos.....	29
3. MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1 Preparação da berberina.....	30
3.2 Cultivo e manutenção das linhagens celulares.....	30
3.3 Ensaio de viabilidade celular.....	30
3.4 Microscopia de fluorescência para análise de captação de berberina.....	31
3.5 Ensaio de fototoxicidade.....	31
3.6 Ensaio de quantificação de espécies reativas de oxigênio (ERO's).....	32
3.7 Ensaio de Autofagia.....	33
3.8 Ensaio de Apoptose.....	33
3.9 PCR Array.....	34
3.10 Análise metabolômica.....	34
3.10.1 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	35
3.11 Análise estatística.....	35
4. ARTIGO CIENTÍFICO	
Berberine associated photodynamic therapy promotes autophagy and apoptosis via ROS generation in renal carcinoma cells	37
Abstract	38
1. Introduction	39
2. Material and methods	40
2.1 Preparation of the berberine.....	40

2.2 Cell lines and culture conditions.....	40
2.3 Cell viability assay.....	41
2.4 Cellular uptake of the BBR.....	41
2.5 Cellular viability and phototoxicity.....	41
2.6 Measurement of Reactive Oxygen Species (ROS) assay.....	42
2.7 Autophagy assay.....	42
2.8 Apoptosis assay.....	43
2.9 PCR Array.....	43
2.10 Metabolite footprinting analysis.....	43
2.11 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy.....	44
2.12 Statistical analysis.....	44
3. Results.....	45
3.1 Effects of the BBR on cell viability.....	45
3.2 Cellular uptake of BBR.....	45
3.3 Effects of the phototoxicity of the BBR.....	45
3.4 BBR associated PDT induces ROS generation.....	46
3.5 BBR associated PDT induces autophagy.....	46
3.6 BBR associated PDT induces apoptosis.....	46
3.7 Expression of Target Genes of Anti-Cancer Drugs in 786-O cells treated with BBR associated PDT.....	47
3.8 Metabolic changes induced by BBR associated PDT.....	47
4. Discussion.....	48
Acknowledgments.....	52
Conflict of interest.....	52
References.....	53
SUPPLEMENTARY MATERIAL.....	67
CONCLUSÕES.....	76
REFERÊNCIAS.....	77

1. INTRODUÇÃO

1.1 Carcinoma de células renais

1.1.1 Epidemiologia

O câncer é considerado uma doença de alta complexidade decorrente de falhas nos mecanismos que geralmente controlam o crescimento e a proliferação celular (LODISH, 2000). O acúmulo progressivo de alterações genéticas e epigenéticas como a acetilação, metilação, fosforilação, ubiquinação, carbonilação e a regulação por microRNAs favorece uma célula cancerosa (BENNETT; LICHT, 2018). Esta é capaz de reproduzir-se desobedecendo aos limites normais da divisão celular e invadir regiões normalmente destinadas a outras células (ALBERTS, 2017).

A invasividade é uma característica primordial das células cancerosas, onde ocorre o despreendimento da célula no tecido com posterior penetração na corrente sanguínea ou vasos linfáticos formando tumores secundários (metástases) em sítios mais distantes do organismo (THOMPSON E THOMPSON, 2002; ALBERTS, 2017).

Considerado um grave problema de saúde pública, o câncer afeta a população mundial tanto em países desenvolvidos como em condições de subdesenvolvimento (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2016). Atualmente constitui a segunda principal causa de morte no mundo e a estimativa mais recente é de 18,1 milhões de novos casos no ano de 2018, provocando 9,6 milhões de óbitos (WHO, 2018). No Brasil, segundo a projeção do Instituto Nacional do Câncer (INCA), serão diagnosticados 640 mil novos casos de câncer no biênio 2018-2019 (INCA, 2017).

O carcinoma renal ou carcinoma de células renais (CCR) é o tipo mais comum de câncer de rim, correspondendo ao décimo quarto tipo de câncer mais prevalente no mundo e estimativas mundiais mais recentes são de aproximadamente 338.000 novos casos diagnosticados e 175.000 óbitos para o ano de 2018 (FERLAY et al., 2015). As maiores taxas são observadas na Europa, América do Norte e Austrália e em regiões em condições de subdesenvolvimento como África e ilhas do Pacífico os índices são menores (FERLAY et al., 2015). No Brasil, os dados mais recentes são de 6.270 novos casos, sendo 3.760 em homens e 2.510 em mulheres para o biênio 2018/2019 (ONCOGUIA, 2018). Apesar de perfazer cerca de 2-3% de todos os tipos de tumores, este tipo de câncer é de caráter altamente agressivo sendo considerada a lesão maligna urológica mais letal, com índices de mortalidade crescentes (LI et al., 2016). O aumento da incidência vem sendo observado ao longo dos anos

devido aos recentes avanços da detecção precoce dos tumores renais, proporcionada através de técnicas de imagem como ultrassonografias, imagens de ressonância magnética e tomografias computadorizadas (ZHAO et al., 2013).

O CCR acomete principalmente indivíduos do sexo masculino, e o pico de incidência ocorre a partir dos 50 anos de idade (CHOW; DONG; DEVESA, 2010).

1.1.2 Classificação e caracterização

A determinação dos diversos tipos histológicos do CCR é de extrema relevância, pois, tem implicação na conduta terapêutica a ser adotada, bem como no prognóstico do paciente (LOPEZ-BELTRAN et al., 2009; MUGLIA; PRANDO, 2015). O CCR se apresenta como uma doença de acentuada heterogeneidade, com variados padrões morfológicos, características moleculares e clínicas, que são divididos em vários subtipos histológicos (JONASCH et al., 2012; MUGLIA; PRANDO, 2015). Os subtipos são o carcinoma renal de células claras, papilífero, cromóforo, cístico sólido, ductos coletores, medular, translocação Xp11, mucinoso tubular, associado a neuroblastoma e carcinomas não classificados (LOPEZ-BELTRAN et al., 2009; MUGLIA; PRANDO, 2015).

O carcinoma renal de células claras (ccCCR) é o subtipo histológico mais comum de câncer renal, representando cerca de 70% - 80% dos casos (MUGLIA; PRANDO, 2015). O ccCCR origina-se a partir das células do epitélio tubular proximal e em geral apresenta crescimento expansivo. Apresenta-se como uma lesão sólida, de cor amarelada e diferentes graus de necrose e hemorragia (MUGLIA; PRANDO, 2015). Histologicamente, é caracterizado por células claras devido aos depósitos abundantes de glicogênio e lipídeos no citoplasma que são dissolvidos durante os métodos de preparação histológica deixando o citoplasma claro (RINI; CAMPBELL; ESCUDIER, 2009). O diagnóstico geralmente é tardio com quadro metastático em um quinto dos pacientes e os sítios metastáticos mais comuns são fígado, glândula adrenal, pele, pulmões e linfonodos, além disso, a taxa de mortalidade é de 40% em cinco anos (DAGHER et al., 2017). A mutação no gene supressor tumoral Von Hippel-Lindau (*VHL*), localizado no cromossomo 3p25-p26 está presente em 50-70% dos carcinomas renais de células claras e esta alteração causa a perda de função supressora que está associada à transcrição de fatores pró-angiogênicos (KIM et al., 2017).

O carcinoma papilífero é o segundo tipo histológico mais comum, representando cerca de 10% dos casos, tem crescimento lento e habitualmente o curso clínico é menos agressivo do que o carcinoma renal de células claras, apresentando assim um melhor prognóstico

(LOPEZ-BELTRAN et al., 2009). Este tumor apresenta porções variáveis de papilas onde as células estão organizadas em arranjos fusiformes podendo apresentar áreas de hemorragia e necrose principalmente nas lesões maiores e, além disso, está subdividido em tipo 1 e 2 (LOPEZ-BELTRAN et al., 2009; MUGLIA; PRANDO, 2015). No tipo 1 as lesões geralmente são multifocais pequenas, contendo células de citoplasma basofílico e núcleos ovais uniformes, enquanto o tipo 2 é mais heterogêneo, contendo papilas recobertas por citoplasma eosinofílico e grandes núcleos esféricos com nucléolos proeminentes (CANCER GENOME ATLAS RESEARCH et al., 2016).

O carcinoma cromóforo tem uma incidência de 5% a 10% de todos os subtipos histológicos de carcinoma renal e é considerado de baixa agressividade, apresentando um melhor prognóstico em relação aos demais subtipos histológicos (MUGLIA; PRANDO, 2015). Macroscopicamente são lesões sólidas, bem delimitadas e altamente lobuladas, além disso, a superfície apresenta cor bege, marrom e castanho claro (VERA-BADILLO; CONDE; DURAN, 2012). Microscopicamente as células são grandes, poligonais com abundante citoplasma, membrana plasmática proeminente, núcleos irregulares, sendo a binucleação muito comum neste tipo tumoral (VERA-BADILLO; CONDE; DURAN, 2012).

Os carcinomas císticos sólidos, ductos coletores, medulares, translocações Xp11 e mucinosos tubulares representam 1% de todos os subtipos histológicos, sendo considerados raros e com prognósticos variáveis (LOPEZ-BELTRAN et al., 2009). Os subtipos ducto coletor e medular apresentam prognóstico ruim, pois 30% dos pacientes apresentam metástases no momento do diagnóstico (MUGLIA; PRANDO, 2015). Com prognóstico mais favorável, o cístico sólido, translocação Xp11 e mucinoso são de baixa agressividade e em alguns casos a patologia é totalmente curável (MUGLIA; PRANDO, 2015).

1.1.3 Fatores de risco

Considera-se fator de risco qualquer característica que aumente ou afete a probabilidade de vir a contrair uma determinada doença (ACS, 2017). Embora existam alguns fatores de risco que aumentam a chance de desenvolver o CCR, ainda não está completamente elucidado como esses fatores transformam as células renais em células malignas (ACS, 2017). Existem diversos fatores, genéticos e ambientais, que têm sido apontados como possíveis causas do CCR, sendo os mais estabelecidos o consumo de tabaco, a obesidade e hipertensão arterial (CHOW; DONG; DEVESA, 2010). Outros fatores de risco como consumo de álcool e

exposição profissional a agentes químicos também foram implicados, mas as evidências ainda permanecem inconclusivas e controversas (KABARIA; KLAASSEN; TERRIS, 2016).

O consumo de tabaco é considerado o maior fator de risco para o CCR (FAJKOVIC et al., 2016). O risco é 50% maior em homens e 20% em mulheres quando comparado a indivíduos que nunca fumaram (CHOW; DONG; DEVESA, 2010). Tabagistas ativos ou que tiveram uma história de exposição ao tabaco desenvolvem formas mais agressivas da doença e apresentam menor sobrevida global (TSIVIAN et al., 2011). Existem algumas hipóteses que tentam elucidar os mecanismos pelos quais o tabaco induz ao carcinoma renal, dentre elas está a de que a fumaça produzida causa estresse oxidativo e lesiona os rins, promovendo insuficiência renal, além disso, a nicotina presente no tabaco tem demonstrado estimular processos angiogênicos acelerando o crescimento do tumor (KABARIA; KLAASSEN; TERRIS, 2016).

O sobrepeso e a obesidade são fatores de risco bem estabelecidos para o desenvolvimento de CCR e a proporção de casos atribuídos a esses fatores é estimada em 30 - 40% tanto em homens como em mulheres (CHOW; DONG; DEVESA, 2010; MCGUIRE; FITZPATRICK, 2011; WILSON; CHO, 2016). Os mecanismos que correlacionam obesidade e risco de CCR ainda não estão bem compreendidos. O tecido adiposo é capaz de secretar moléculas como a leptina que dão suporte ao crescimento tumoral, em contrapartida, pacientes obesos tem baixos níveis de adiponectina que pode atuar como supressor tumoral (CHOW; DONG; DEVESA, 2010; KABARIA; KLAASSEN; TERRIS, 2016; WILSON; CHO, 2016).

A associação entre hipertensão arterial e risco para o CCR tem sido objeto de inúmeros estudos e mostra uma correlação dose-dependente, maiores níveis de pressão sanguínea e tempo de exposição a este quadro clínico, implicando em risco aumentado para o CCR (KABARIA; KLAASSEN; TERRIS, 2016). Um estudo mostrou que 31,8% dos pacientes com CCR eram hipertensos e que a pressão arterial foi normalizada após procedimento de nefrectomia, levantando desta forma o questionamento de que o CCR também possa induzir aumento de pressão sanguínea (STOJANOVIC; GOLDNER; IVKOVIC, 2009; COLT et al., 2011). Semelhante a indivíduos com IMC elevado, pacientes com hipertensão também apresentam aumento da peroxidação lipídica, que tem sido implicado na patogênese do CCR (KABARIA; KLAASSEN; TERRIS, 2016).

Apesar de o consumo de álcool estar associado ao desenvolvimento de diversos tipos de câncer como mama, fígado, laringe, cólon e esôfago, um risco reduzido tem sido reportado para o CCR (LEW et al., 2011). Um grande estudo de corte com 100 mil americanos observou

relação inversa entre o consumo de álcool e risco de CCR, tanto para homens quanto para mulheres e em diferentes tipos de bebidas incluindo vinho, cerveja, entre outras (KARAMI; DAUGHERTY; PURDUE, 2015). O mecanismo pelo qual o consumo moderado de álcool diminui o risco de CCR pode estar ligado ao aumento da sensibilidade à insulina, que diminui o risco de diabetes do tipo 2 e aumenta a produção de IGF-1 (fator de crescimento semelhante à insulina 1) (CHENG; XIE, 2011; SONG et al., 2012).

O CCR geralmente não é considerado uma doença relacionada à exposição ocupacional, mas este risco tem sido associado ao contato com vários agentes químicos industriais (CHOW; DONG; DEVESA, 2010). Diversos autores tem reportado significativa associação da exposição ao tricloroetileno (TCE) e aumento do risco para CCR; trata-se de um solvente orgânico usado como desengordurante e aditivo químico, considerado altamente carcinogênico (CHOW; DEVESA, 2008; ALANEE et al., 2015). Vários metais como arsênio, cádmio, chumbo e urânio, hidrocarbonetos poliaromáticos e amianto são considerados fatores de risco ocupacionais para o desenvolvimento de CCR (KIM et al., 2014).

1.1.4 Diagnóstico e fatores prognósticos

Cerca de 50% dos tumores renais são diagnosticados incidentalmente (ESCUDIER et al., 2019). Nos estágios iniciais, esta doença se apresenta completamente assintomática e à medida que o tumor se avança surgem os sintomas clássicos locais, como hematúria, dor abdominal e massa palpável no flanco, todos esses com implicações prognósticas negativas (RINI; CAMPBELL; ESCUDIER, 2009; ESCUDIER et al., 2019). Sintomas sistêmicos como síndromes febris, prostração, anorexia e perda de peso significativa, podem ser evidências de um quadro possivelmente metastático (ESCUDIER et al., 2019).

Tumores diagnosticados incidentalmente têm aumentado consideravelmente através da disseminação e melhoria das técnicas de diagnóstico, especificamente as técnicas de imagem como ultrassonografias, tomografias computadorizadas e ressonância magnética (NG et al., 2008; RINI; CAMPBELL; ESCUDIER, 2009). A biópsia percutânea de tumor renal pode revelar a histologia de massas renais radiologicamente indeterminadas a fim de evitar procedimentos cirúrgicos de lesões benignas, além disso, possui alta eficiência e especificidade, em torno de 98-100% (LJUNGBERG et al., 2015).

Um dos parâmetros morfológicos patológicos que apresenta melhores resultados e indica as variáveis mais utilizadas como fator prognóstico é o sistema de classificação TNM. Este se baseia na observação do estadiamento da extensão tumoral (T1-T4),

comprometimento de linfonodos (N0-N2) e ausência ou presença de metástases (M0 ou M1) (DUNNICK, 2016; TANEJA; WILLIAMSON, 2018). Após a identificação de cada variável é feita uma classificação do grupo de estadiamento que varia do estágio I a IV (EDGE; COMPTON, 2010; DUNNICK, 2016; TANEJA; WILLIAMSON, 2018). Pacientes com estadios clínicos baixos (I e II) possuem melhor prognóstico quando comparados aqueles com estadios clínicos mais avançados (III e IV) (HUTSON, 2005).

Um segundo parâmetro utilizado é o grau nuclear ou grau de Fuhrman, que é dividido em quatro graus nucleares (G1 - G4) e são definidos em ordem crescente de tamanho, irregularidade e proeminência nucleolar (HUTSON, 2005). Estudos atuais mostram que o grau da classificação de Fuhrman está intimamente relacionado com a taxa de crescimento dos tumores e o prognóstico dos pacientes, tumores de alto grau (G3 e G4) tem maior capacidade invasiva, maior possibilidade de metástase e pior prognóstico (FENG et al., 2019).

Portanto, a detecção incidental, a extensão da lesão, a invasão de linfonodos e a ausência ou presença de metástase compõem fatores prognósticos independentes e muito importantes que influenciam na sobrevida dos pacientes com CCR (HUTSON, 2005; DUNNICK, 2016; TANEJA; WILLIAMSON, 2018).

Tabela 1: Grupos de estadiamento de tumores renais.

Estágio	T	N	M
I	T1	N0	M0
II	T2	N0	M0
III	T1-2	N1	M0
III	T3	N0-1	M0
IV	T4	Nx	M0
IV	Tx	Nx	M1

Fonte: (TANEJA; WILLIAMSON, 2018)

1.1.5 Tratamento

O tratamento do CCR é determinado pelo estágio em que a doença se encontra (PENTICUFF; KYPRIANOU, 2015). A cirurgia constitui a base para o tratamento dos tumores clinicamente localizados, sendo a nefrectomia radical usualmente indicada em

tumores mais avançados ou múltiplos tumores pequenos, nesse caso ocorrendo a remoção completa do rim e órgãos adjacentes, como a glândula supra renal (HSIEH et al., 2017).

A nefrectomia radical expõe o paciente à insuficiência renal crônica, cardiopatias e consequente aumento da taxa de mortalidade devido às complicações (RINI; CAMPBELL; ESCUDIER, 2009; PENTICUFF; KYPRIANOU, 2015). A nefrectomia parcial é utilizada em pacientes com tumores pequenos (inferiores a 4 cm de diâmetro) ou tumores bilaterais, permitindo assim preservar parcialmente o parênquima renal evitando complicações pós-cirúrgicas como a insuficiência renal crônica (HUTSON, 2005; HSIEH et al., 2017; ESCUDIER et al., 2019).

Apesar do aumento na detecção de pequenas massas renais e subsequente remoção com nefrectomia, a mortalidade aumentou. As taxas de recidiva local ou sistêmica após ressecção do tumor primário são em torno de 59% em 12 meses, 83% em 24 meses e 93% em 36 meses (HUTSON, 2005; RINI; CAMPBELL; ESCUDIER, 2009; MAKHOV et al., 2018). Esse achado sugere que a extirpação cirúrgica de todas as pequenas massas renais pode não reduzir a mortalidade (RINI; CAMPBELL; ESCUDIER, 2009; PENTICUFF; KYPRIANOU, 2015). Pacientes com recorrência após nefrectomia tem prognóstico ruim e são candidatos à terapia sistêmica (HUTSON, 2005).

A base da terapia sistêmica para o CCR metastático tem sido historicamente a imunoterapia com interleucina-2 (IL-2) e interferon- α (IFN- α). Altas doses de IL-2 produzem consistentemente uma taxa de remissão completa de 6-8% e taxa de cura de aproximadamente 5%, no entanto, é uma estratégia bastante tóxica (NG et al., 2008; PENTICUFF; KYPRIANOU, 2015). O tratamento com altas doses de IL-2 geralmente produz uma síndrome de extravasamento capilar em pacientes e requer monitoramento frequente da pressão arterial (PENTICUFF; KYPRIANOU, 2015). O IFN- α proporcionou melhores benefícios em relação à sobrevida, um perfil de toxicidade mais favorável e é mais facilmente administrado que a IL-2 (PENTICUFF; KYPRIANOU, 2015).

Inibidores de angiogênese podem ser usados como uma alternativa terapêutica, visto que a angiogênese é um processo muito importante para desenvolvimento do carcinoma renal (RINI; CAMPBELL; ESCUDIER, 2009).

A quimioterapia, principal linha de tratamento para tumores sólidos em estágios avançados não possui qualquer atividade sobre o CCR, bem como protocolos de hormonioterapia e radioterapia (DRUCKER, 2005; MAKHOV et al., 2018). Além disso, os efeitos secundários são diversos, incluindo neutropenia, leucopenia, alopecia, transtornos

gastrointestinais e alterações cardiovasculares, expondo o paciente à debilitação física e emocional (BELENKOV et al., 2018).

Com isso, existe uma necessidade significativa e não satisfeita de novas estratégias terapêuticas que possam superar as desvantagens dos tratamentos convencionais disponíveis atualmente, com maior seletividade, especificidade e menor toxicidade para o paciente, fazendo com que o tratamento apresente poucos efeitos secundários adversos (ARAVIND; KRISHNAN, 2016).

Assim, a pesquisa por tratamentos com a utilização de drogas derivadas de plantas tem ganhado interesse e vários estudos têm relatado diferentes propriedades terapêuticas dos compostos naturais, que podem atuar em diferentes vias metabólicas afetando as células tumorais (GALI-MUHTASIB et al., 2015; WANG et al., 2015; SHANMUGAM et al., 2017; DUTTA et al., 2019).

Nesse sentido, explorar e descrever os mecanismos pelos quais esses compostos atuam, em relação às vias específicas que levam a inibição da proliferação, migração, invasão e morte celular é de grande relevância para o futuro (GALI-MUHTASIB et al., 2015).

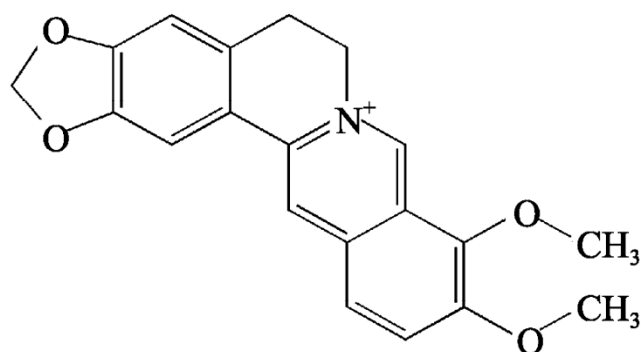
1.2 Berberina

A utilização de plantas com finalidade terapêutica remonta os tempos antigos na história da humanidade e, apesar do enorme aperfeiçoamento e desenvolvimento da indústria química, cerca de 60% dos quimioterápicos disponíveis atualmente são produtos naturais ou derivados desses (CRAGG; NEWMAN, 2013). As plantas aparecem como um excelente recurso para o desenvolvimento de potenciais fármacos, principalmente contra o câncer, doença que ainda apresenta altos índices de mortalidade (MONDAL et al., 2012).

Uma ampla gama de produtos naturais, como terpenóides, flavonoides, alcalóides, polifenóis e outros metabólitos mostraram propriedades anticancerígenas promissoras (BHAUMIK et al., 2019).

Nesse contexto, a berberina é um alcaloide isoquinolínico natural, de cor amarela, com uma longa história na medicina chinesa (WANG et al., 2015). Pode ser encontrada e extraída de rizomas, raízes e caules de diversas espécies de plantas incluindo *Berberis vulgaris*, *Berberis aristata*, *Hydrastis canadenses*, *Coptis chinensis*, *Arcangelisia flava*, *Berberis aquifolium* (SUN et al., 2009; WANG et al., 2015).

Figura 1: Estrutura química da berberina.



Fonte: (SUN et al., 2009).

Possui um grande espectro de aplicações clínicas, sendo utilizada como antidiarreica, antimicrobiana, anti-inflamatória, anti-hipertensiva, antidiabética, antioxidante e antiproliferativa/antitumoral (ABD EL-WAHAB et al., 2013; PIERPAOLI et al., 2015).

Recentemente, diversos estudos *in vitro* utilizando diversas linhagens celulares tem mostrado que a berberina atua em várias fases do desenvolvimento do câncer, inibindo a proliferação e migração celular, além de induzir o processo de morte celular por autofagia e apoptose (ORTIZ et al., 2014; PARK et al., 2015; PARK et al., 2016; SENGUPTA et al., 2017; DAI et al., 2019). A atividade anticâncer da berberina já foi demonstrada em diversos tipos tumorais, incluindo mama (BARZEGAR et al., 2015), pulmão (BALAKRISHNA; KUMAR, 2015), cólon (LI et al., 2015), próstata (HUANG et al., 2015), melanoma (SONG et al., 2015), hepatocelular (TSANG et al., 2015), bexiga (YAN et al., 2013), entre outros.

A berberina é capaz de interagir diretamente ao DNA induzindo quebras e mudando a conformação molecular, assim consegue suprimir os processos de transcrição genética (ORTIZ et al., 2014). Além disso, atua na inibição da telomerase, no potencial de membrana mitocondrial, regulação de proteínas membro da família Bcl-2 e de ciclinas, além de outras proteínas envolvidas na sinalização celular, dessa forma a parada do ciclo celular constitui um importante mecanismo induzido por este alcaloide (ZOU et al., 2017).

Philogene e colaboradores (1984) relataram sobre a natureza fluorescente da berberina e seu potencial fototóxico, sendo considerado um bom agente fotossensibilizador para uso em processo fotodinâmicos. A ligação eletrostática com o DNA leva a formação de um complexo intermolecular altamente fluorescente (HIRAKAWA; HIRANO, 2008).

Estudos de Andrezza e cols. (2016) e de Bhattacharyya, Saha e cols. (2017), demonstraram resultados promissores sobre a utilização da berberina para aplicação na terapia fotodinâmica, porém os mecanismos dos possíveis danos foto oxidativos ainda não estão completamente esclarecidos (LUIZA ANDREAZZA et al., 2016; BHATTACHARYYA et al., 2017).

1.3 Terapia fotodinâmica

Atualmente, a pesquisa médica básica tem buscado se concentrar e desenvolver alternativas terapêuticas minimamente invasivas, seguras, potentes e com relação custo-eficácia acessíveis (LUCKY; SOO; ZHANG, 2015).

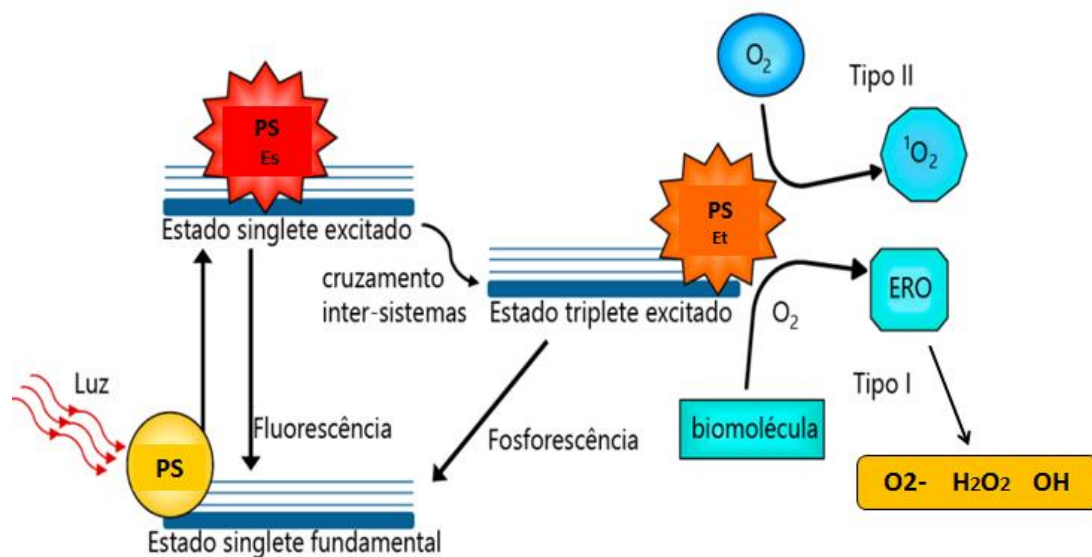
A história da terapia fotodinâmica remonta os anos de 1900 quando Oscar Raab demonstrou que o corante acridina na presença de luz visível gerava toxicidade e destruía microrganismos como o protozoário *Paramecium*, a esse evento denominou ‘Terapia Fotodinâmica’ (DANIELL; HILL, 1991; KATO, 1996; KESSEL, 2006). A partir disso, a terapia fotodinâmica (TFD) tem sido explorada e aplicada na área das ciências médicas para o tratamento de diversas patologias, inclusive o câncer (DOUGHERTY et al., 1978; DOUGHERTY, 1989).

Em 1978, Dougherty e colaboradores, fizeram o primeiro estudo clínico envolvendo diversos tipos de carcinomas e aplicação da TFD em seres humanos. Este trabalho incluiu pacientes com câncer de mama, cólon, próstata, melanoma, condrossarcoma, angiossarcoma, células endometriais, basais e escamosas, todos estes apresentavam resistência a tratamentos convencionais da época. Foi utilizado um fotossensibilizador derivado da hematoporfirina por via endovenosa com posterior irradiação local do tumor, obtendo uma resposta satisfatória em 87% das lesões, mostrando pela primeira vez a possibilidade de tratamento com TFD em tumores resistentes a outras terapias (DOUGHERTY et al., 1978).

A TFD constitui uma modalidade de tratamento alternativa minimamente invasiva, que requer a administração sistêmica ou tópica de um fotossensibilizador (PS), seguido por irradiação do local da doença com uma luz de comprimento de onda específico para ativar e/ou excitar o PS (SHIRASU; NAM; KUROKI, 2013; NAIDOO; KRUGER; ABRAHAMSE, 2018). Os mecanismos de ação da terapia fotodinâmica envolvem três elementos fundamentais, sendo eles: um agente fotossensibilizante ou fotossensibilizador, uma fonte de luz específica e moléculas de oxigênio (CASTILHO-FERNANDES et al., 2017). Nenhum

desses elementos é individualmente tóxico, mas juntos desencadeiam reações fotoquímicas que resultam na geração de moléculas reativas que causam danos oxidativos que podem levar a morte celular por apoptose, necrose ou autofagia (AGOSTINIS et al., 2011). Estas reações fotoquímicas podem ocorrer através de dois mecanismos distintos denominados reação tipo I e II:

Figura 2: Terapia fotodinâmica: reações tipo I e tipo II. Após a emissão e absorção da luz, o PS atinge o estado singlete excitado. Após o cruzamento intersistemas, o PS pode reagir em duas vias: reagir com biomoléculas através da transferência de um átomo de hidrogênio (elétron) para formar radicais, que reagem com o oxigênio molecular para gerar ERO (reação do tipo I); ou o PS no estado triplete pode reagir diretamente com o oxigênio através de transferência de energia, gerando o oxigênio singlete (Reação do tipo II). PS: fotossensibilizador; PS Es: fotossensibilizador no estado singlete excitado; PS Et: fotossensibilizador no estado triplete excitado; ERO: espécie reativa de oxigênio; $^1\text{O}_2$: oxigênio singlete; O_2^- : radical superóxido; H_2O_2 : peróxido de hidrogênio; OH: radical hidroxila.



Fonte: Adaptado de (CALIXTO et al., 2016)

Na reação do tipo I, o PS no estado triplete excitado pela luz reage com biomoléculas (lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos) transferindo elétrons, e gerando radicais livres ou íons radicais e, ao reagir com o oxigênio intra-molecular, esses radicais levam a formação de espécies reativas de oxigênio, como superóxidos, radicais de hidroxilas e peróxido de hidrogênio, que por sua vez causam danos biológicos irreparáveis (TAKASAKI et al., 2009; AGOSTINIS et al., 2011; DAI et al., 2012; NAIDOO; KRUGER; ABRAHAMSE, 2018; SHI

et al., 2018). Quanto à reação tipo II, ocorre transferência direta de energia para o oxigênio molecular, que se encontra em seu estado triplete levando a formação de oxigênio singlete excitado ($^1\text{O}_2$), molécula altamente reativa e citotóxica (TAKASAKI et al., 2009). Ambas as reações, podem ocorrer simultaneamente, e a proporção entre estes processos, depende do tipo de fotossensibilizador, assim como, das concentrações de oxigênio molecular e do substrato local (LUCKY; SOO; ZHANG, 2015; SHI et al., 2018). Os fármacos fotossensíveis utilizados em TFD são compostos que absorvem a energia luminosa em comprimentos de ondas específicos induzindo a produção de espécies reativas de oxigênio e outras espécies ativas no processo fotodinâmico (NUNES; SGUILLA; TEDESCO, 2004; SOBOLEV; ROZENKRANTS; GILIAZOVA, 2004).

Os mecanismos que promovem a destruição irreversível do tecido tumoral incluem a produção de espécies reativas de oxigênio; efeitos antivasculares levando à morte das células neoplásicas por privação de oxigênio e nutrientes, além da ativação da resposta imune contra as células tumorais por meio do processo de inflamação aguda e liberação de citocinas no tumor, resultando num influxo de macrófagos e leucócitos que podem contribuir para a destruição tumoral (KESSEL, 2006; KESSEL; OLEINICK, 2018).

A TFD tem auxiliado no tratamento de diversos tipos de tumores sólidos, como cabeça e pescoço, carcinoma basocelular, câncer cervical, esôfago, bexiga e gástrico (LUO et al., 2017). Primeiramente foi utilizada no tratamento superficial de lesões de pele, no entanto, desde o seu desenvolvimento original, houve avanços tecnológicos que permitem o uso de TFD no tratamento de uma gama mais ampla de tumores sólidos, incluindo mama (CUENCA et al., 2004), cérebro (MULLER; WILSON, 2006), pulmão (SIMONE; CENGEL, 2014), pâncreas (PEREIRA, 2012) e próstata (PERERA et al., 2016). Para o carcinoma de células renais, por enquanto, esse método é considerado uma alternativa para pequenas lesões e uma opção eficaz preservadora de néfrons (KROEZE et al., 2012).

O elevado potencial de destruição do tecido tumoral, preservando o tecido saudável circundante é uma das características principais da TFD, sendo reconhecida como uma das suas maiores vantagens comparando a outras opções de tratamento. Para este elevado nível de seletividade contribuem dois fatores críticos, a capacidade intrínseca de muitos fotossensibilizadores se acumularem preferencialmente no tecido tumoral, e a aplicação da luz exclusivamente na área de tratamento (LUO et al., 2017).

A utilização da TFD como alternativa paliativa tem sido explorada como forma de melhoria da qualidade de vida e prolongamento da sobrevida do paciente (PARK; PARK, 2016).

A possibilidade de a berberina ser um agente fotossensível foi relatada, pois quando combinada à radiação UVA provocou danos ao DNA de linhagem de queratinócitos (CHIGNELL et al., 2007). Efeitos similares foram observados em células de câncer de pulmão, onde o tratamento com radiação ionizante potencializou o efeito da berberina levando a morte celular das células tumorais (PENG et al., 2008).

Embora avaliada em vários tipos de câncer, os mecanismos moleculares de ação da berberina não estão completamente elucidados, pois há evidências de interação com várias vias de morte celular em diferentes tipos tumorais, além disso, os seus efeitos como agente fotossensibilizador na TFD ainda é pouco explorado. Desse modo, os trabalhos relacionados com a berberina tem contribuído para um maior entendimento da ação deste alcaloide no processo tumorigênico e estudos são necessários para estabelecer o efeito desse alcaloide na terapia fotodinâmica em células de carcinoma renal.

2. OBJETIVOS

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo geral avaliar os efeitos da Terapia Fotodinâmica usando a berberina como agente fotossensibilizador em cultura de linhagens de carcinoma renal (ACHN, 786-O) e linhagem não tumoral de túbulos proximais de rim (HK-2).

2.1 Objetivos específicos

- Avaliar a citotoxicidade da berberina nas linhagens ACHN, 786-O e HK-2;
- Avaliar a captação intracelular da berberina nas linhagens ACHN, 786-O e HK-2;
- Avaliar a fototoxicidade da berberina quando associada à terapia fotodinâmica nas linhagens ACHN, 786-O e HK-2;
- Quantificar os níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO's) geradas nas linhagens celulares após o tratamento com berberina associada à terapia fotodinâmica;
- Analisar o índice de morte celular por autofagia após o tratamento proposto;
- Analisar o índice de morte celular por apoptose (caspase 3), após o tratamento proposto;
- Analisar a expressão diferencial de genes alvos de drogas anticâncer na linhagem 786-O após o tratamento proposto;
- Avaliar alterações de metabólitos na linhagem 786-O após o tratamento proposto.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Preparação da berberina

A berberina (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) foi diluída em dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) a uma concentração de 50 mM para realização de todos os experimentos deste estudo.

3.2 Cultivo e manutenção das linhagens celulares

As linhagens celulares de carcinoma renal ACHN (metastática), 786-O (primária) e a linhagem não tumoral de túbulos proximais de rim (HK-2) foram obtidas da American Type Culture Collection.

A linhagem ACHN foi mantida em meio essencial mínimo alpha (MEM α ; Gibco Life Technologies, Grand Island, NY, USA) e para a linhagem 786-O foi utilizado o meio Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640; Gibco Life Technologies, Grand Island, NY, USA). Ambos os meios foram suplementados com 100U de penicilina por mL, 100 μ g de estreptomicina por mL, 1% (v/v) e 10% (v/v) de soro fetal bovino inativado (Cultlab, Campinas, São Paulo, Brasil). A linhagem HK-2 foi mantida em meio de cultura para queratinócitos (KSF-M; Gibco Life Technologies, Grand Island, NY, USA) suplementado com 5% (v/v) de soro fetal bovino inativado (Cultlab, Campinas, São Paulo, Brasil), 25 mg de extrato de pituitária bovina e 2,5 μ g de fator de crescimento epitelial recombinante. Durante o cultivo as linhagens foram mantidas a 37°C em atmosfera úmida e 5% de CO₂. O cultivo foi realizado em garrafa de poliestireno de 75cm² com dispositivo de aeração acoplado à tampa com filtro, sendo que as células foram submetidas à tripsinização conforme a necessidade.

Para isso, o meio de cultura foi desprezado e a monocamada celular lavada com PBS. Adicionou-se 2ml de tripsina e as garrafas foram incubadas na estufa a 37°C por 3 a 5 minutos. Posteriormente, foi adicionado meio de cultura e houve homogeneização da suspensão para desprendimento total das células. Parte da solução resultante foi devolvida à garrafa e o volume foi completado com meio de cultura fresco. Finalmente, a garrafa foi incubada novamente em estufa para posterior utilização nos experimentos.

3.3 Ensaio de viabilidade celular

Para determinar a citotoxicidade da berberina nas linhagens derivadas de carcinoma renal e linhagem normal de rim foi realizado o ensaio de viabilidade celular (MTT). Esta técnica avalia a atividade metabólica celular, quantificando a redução metabólica no MTT (3-

(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenilbrometo de tetrazolina). Enzimas mitocondriais das células viáveis clivam os anéis de tetrazólio, resultando em cristais de formazan que são dissolvidos em solventes orgânicos como o DMSO. A solução roxa resultante é medida por espectrofotometria com absorção em 570 nm.

Para este ensaio as linhagens foram semeadas na densidade de $1,5 \times 10^4$ em placas de 96 poços e incubadas por 24 horas para adesão das mesmas. As células foram tratadas com diferentes concentrações de berberina (5 μ M, 10 μ M, 20 μ M, 40 μ M, 80 μ M, 160 μ M e 320 μ M) por 24 e 48 horas. Após estes períodos, o meio contendo berberina foi retirado e adicionado 100 μ l/poço de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazoliumbromide (MTT, Sigma-Aldrich, MO, EUA) (1mg/mL) diluído em meio de cultura próprio para a linhagem. Após, as placas foram incubadas por 30 minutos a 37°C. Em seguida, o meio contendo MTT foi aspirado e adicionou-se 100 μ l/poço de DMSO (Sigma-Aldrich, MO, EUA) para diluição dos cristais de formazan. A placa foi agitada por 5 minutos e em seguida foi realizada a leitura em leitor de placas (FluOstar Omega – BMG Labtech, Baden-Württemberg, Alemanha) em comprimento de ondas de 570 nm. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e em três ensaios independentes para análise estatística. Os valores obtidos foram normalizados com o controle, que são as células que foram submetidas às mesmas condições do ensaio e sem a adição de berberina e expressos em porcentagem de viabilidade, calculados de acordo com a seguinte relação: Células viáveis = (D.O. amostra/D.O. controle) \times 100%

3.4 Microscopia de fluorescência para análise de captação intracelular de berberina

Para analisar a captação da berberina as células ACHN, 786-O e HK-2 foram semeadas em placas de 6 poços na densidade de 3×10^5 células por poço, permitindo o crescimento a níveis subconfluentes. Após 24 horas de adesão, as células foram incubadas com berberina à concentração de 20 μ M previamente selecionada por meio do ensaio de MTT. Após 3, 6, 12, 24 e 48 horas de incubação as células foram visualizadas sem fixação em microscópio de fluorescência (Zeiss, VERT. A1, Baden-Württemberg, Alemanha) em canal para FITC (espectro de excitação 495nm).

3.5 Ensaio de fototoxicidade

Foi avaliado o efeito da terapia fotodinâmica nas linhagens derivadas de carcinoma renal (ACHN e 786-O) e sob a cultura celular não neoplásica (HK-2) na presença de berberina como agente fotossensibilizante. Tendo em vista que a concentração de 20 μ M de berberina

apresentou baixa citotoxicidade no escuro, adotou-se esse valor para os ensaios com fotoestímulo. As linhagens foram semeadas em placas de 96 poços na densidade de $1,5 \times 10^4$ células por poço e após 24 horas de adesão foram incubadas por 3 horas com berberina na concentração de $20 \mu\text{M}$. Após as 3 horas de incubação, o meio contendo berberina foi aspirado e as células foram lavadas cuidadosamente com PBS e em seguida foram adicionados $100 \mu\text{L}$ /poço de meio de cultura sem soro fetal bovino e sem vermelho fenol. Em seguida a cultura foi submetida à irradiação de laser na dose de 80 J/cm^2 por 4 minutos. Para irradiação foi utilizado o sistema laser diodo Eagle modelo Heron (Quantum Tech, São Carlos, Brasil) no comprimento de onda de emissão em 447 nm acoplado a uma fibra ótica.

No término da irradiação, o meio foi aspirado e adicionado meio de culturas em vermelho fenol e com 10% de soro fetal bovino. Após 24 horas foi realizado o ensaio de viabilidade celular por meio de MTT para a avaliação da viabilidade celular. Para efeito de comparação e para determinar se as reduções nas taxas de viabilidade celular foram em decorrência do dano fotooxidativo, foram realizados tratamentos com: células sem tratamento (controle); berberina; laser; e berberina associada ao laser.

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e em três ensaios independentes para análise estatística. Os valores obtidos foram normalizados com o controle e expressos em valor de porcentagem de viabilidade.

3.6 Ensaio de quantificação de espécies reativas de oxigênio (ERO's)

A produção intracelular de espécies reativas de oxigênio (ERO's) foi quantificada utilizando o kit *Cellular Reactive Oxygen Species Detection Assay Kit* (ab113851, Abcam, Cambridge, UK) com modificações. O kit contém 2'-7'-diclorofluorescina diacetato (DCFDA), um corante fluorogênico que mede a atividade de hidroxila, peroxila e outras ERO's intracelulares. Na presença de ERO's, este composto é oxidado dentro da célula e produz um composto, o 2', 7'-diclorofluoresceína (DCF) que é altamente fluorescente.

Para este ensaio as linhagens ACHN, 786-O e HK-2 foram semeadas em placas de 96 poços de parede preta na densidade de $1,5 \times 10^4$ células por poço conforme recomendações do fabricante. Após 24 horas de adesão, as linhagens foram incubadas com berberina ($20 \mu\text{M}$) por 3 horas e posteriormente receberam irradiação por 4 minutos. Após 24 horas de irradiação, as células foram incubadas com meio de cultura contendo $25 \mu\text{M}$ de DCFDA por 45 minutos a 37°C . Em seguida, o nível de ERO's foi determinado pela medida da intensidade da fluorescência utilizando um leitor de microplacas (Fluostaromega, BMG Labtech, Baden-Württemberg, Alemanha) com comprimentos de onda de excitação e emissão definidos em

485 e 535nm, respectivamente. O peróxido de hidrogênio (TBHP) foi usado como controle positivo para detecção de fluorescência, células controle (sem tratamento) foram utilizadas para fins de cálculo de porcentagem de ERO's. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e em três ensaios independentes para análise estatística.

3.7 Ensaio de Autofagia

O ensaio de autofagia por meio da detecção de autofagossomos em células ACHN, 786-O e HK-2 foi realizado após o tratamento com berberina e associada terapia fotodinâmica.

Para este ensaio foi utilizado o kit *Autophagy Assay Kit* (MAK138, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). As linhagens ACHN, 786-O e HK-2 foram semeadas em placas de 96 poços de parede preta na densidade de $1,5 \times 10^4$ células por poço conforme recomendações do fabricante. Após 24 horas de adesão, as linhagens foram incubadas com berberina (20 μ M) por 3 horas e posteriormente receberam irradiação por 4 minutos. Depois de 24 horas de irradiação incubou-se as linhagens com o reagente de detecção de autofagossomo por 1 hora a 37°C. Em seguida, as linhagens foram cuidadosamente lavadas com tampão próprio para posterior leitura da intensidade de fluorescência dos autofagossomos intracelulares, com excitação e emissão de 360 e 520 nm, respectivamente. A tricostatina A (TSA) considerada um indutor de autofagia foi utilizado como controle positivo neste experimento.

Os valores obtidos foram normalizados com o controle que são células sem algum tipo de tratamento, para fins de cálculo da porcentagem de autofagia. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e em três ensaios independentes para análise estatística.

3.8 Ensaio de Apoptose

O ensaio colorimétrico de apoptose por meio da detecção da atividade enzimática da Caspase 3 em células ACHN, 786-O e HK-2 foi realizado após o tratamento com berberina e associada à terapia fotodinâmica. Para este ensaio foi utilizado o kit *Caspase 3 Assay Kit Colorimetric* (ab39401, Abcam, Cambridge, UK) com algumas modificações. As linhagens ACHN, 786-O e HK-2 foram semeadas em placas de 6 poços na densidade de 3×10^5 células por poço, após a adesão das mesmas foi realizada a incubação por 3 horas com berberina com posterior irradiação por 4 minutos. Após 24 horas de tratamento, as células foram tripsinizadas e transferidas para um tubo de 15ml, deste modo, houve incubação das células em 50 μ l de tampão para lise celular. Após 10 minutos de incubação, o lisado de células foi transferido para um microtubo submetido à centrifugação a 10.000 rpm por 1 minuto para

coleta das proteínas totais contidas no sobrenadante. A quantificação das proteínas totais foi realizada pelo equipamento ND-2000 *Nanodrop* (Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA).

A normalização da concentração das proteínas foi realizada utilizando uma solução tamponante de diluição. Conforme instrução do fabricante, um mix contendo 25µl das amostras de proteínas, 25µl de tampão de reação, 0,25µL de ditionitrotol (DTT) e 2,5µL do substrato de caspase 3 (DEVD-pNA) foi adicionado a uma placa convencional de 96 poços. Esta foi incubada por 2 horas em estufa a 37°C. Após o período de incubação, foi realizada a leitura da absorbância a 405 nm em leitor de microplacas.

O controle com células sem tratamento foi utilizado para o cálculo de porcentagem da atividade de caspase 3. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e em três ensaios independentes para análise estatística.

3.9 PCR Array

O RNA total da linhagem 786-O foi extraído após 1 hora de tratamento com berberina associada à terapia fotodinâmica, descrito no item 3.5. Para obtenção do RNA utilizou-se o *mini kit RNeasy* de acordo com as instruções do fabricante (Qiagen, Alemanha).

Um total de 2µg de RNA de cada grupo (células tratadas e não tratadas) foi transcrito reversamente usando *first-strand cDNA synthesis kit* para RT-PCR (Qiagen, Alemanha), seguindo as instruções do fabricante. Utilizou-se água isenta de nuclease para diluir o cDNA amplificado e adicionou-se ao RT²qPCR SYBR (Qiagen, Alemanha). Depois, 25µl do coquetel experimental foram adicionados a cada poço da matriz *Human Cancer Drug Targets RT² Profiler PCR* (Qiagen, Alemanha).

A qPCR foi realizada no sistema de *PCR em tempo real Applied Biosystems 7300* (Applied Biosystems, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Todos os dados da PCR foram coletados e a expressão diferencial dos genes foi analisada pelo Qiagen Web Portal (<https://www.qiagen.com/br/shop/genes-and-pathways/data-analysis-center-overview-page/>).

3.10 Análise Metabólica

Para este ensaio a linhagem 786-O foi semeada na densidade de 1×10^6 células em placas de 60mm de diâmetro e tratadas com berberina associada à terapia fotodinâmica; células controle (sem tratamento) foram incluídas para análise estatística. Após 30 minutos, 3 horas e 6 horas de tratamento, os respectivos meios de cultura foram coletados para análise dos metabólitos extracelulares. Como referência externa, foram adicionados 500µM de ácido

4,4-dimetil-4-silapentano-1-sulfônico (DSS) para medir as concentrações relativas dos metabólitos. Neste ensaio as amostras foram analisadas em quintuplicata.

3.10.1 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de RMN foram obtidos em um espectrofotômetro Bruker AVANCE III HD de 600 MHz (Bruker Biospin, Alemanha), localizado no Centro Multiusuário de Inovação Biomolecular (CMIB) - Departamento de Física do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – IBILCE/UNESP. Todo o experimento e análises foram realizadas por um técnico especializado.

Para isso, o meio de cultura celular foi transferido para tubos de RMN de 5mm de diâmetro e adicionada 10% de água deuterada (D₂O) para os procedimentos de correspondência. Todos os espectros foram adquiridos a uma temperatura de 298 K utilizando a sequência de pulso de pré-saturação de Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG). Foi escolhida uma janela deslizante de 14 ppm, com um atraso de relaxamento de 5 segundos. O atraso do eco de rotação foi ajustado para 400 μ s com o filtro T2 de loop 400. Foram adquiridas um total de 64 varreduras. Os decaimentos de indução livre (FIDs) foram multiplicados por uma função exponencial com uma ampliação de linha de 1 Hz antes da transformação de Fourier. O Topspin 3.5 (Bruker Biospin, Alemanha) foi usado para corrigir manualmente a fase e a linha de base. A espectroscopia de correlação total (TOCSY) e a espectroscopia heteronuclear de coerência quântica única (HSQC) foram realizadas usando sequências de pulso padrão Bruker para amostras selecionadas, a fim de auxiliar na atribuição de metabólitos.

3.11 Análise estatística

Os dados foram expressos em médias \pm desvio padrão. A análise estatística foi realizada utilizando o software *GraphPad Prism 7* (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA) e a significância estatística foi determinada pela análise de variância (ANOVA) seguida do pós-teste de Tukey para comparações múltiplas. $p \leq 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo neste estudo.

Os dados de RMN foram atribuídos a diferentes metabólitos usando o software Chenomx (Chenomxs Inc. Alberta, Canadá) e o Human Metabolome Database (WISHART et al., 2013). Após a atribuição do metabólito, o MetaboAnalyst 4.0 (CHONG et al., 2018) foi utilizado com as concentrações relativas de cada metabólito, conforme a concentração de DSS. A mesma escala e normalização foram repetidas. A análise estatística foi realizada usando Análise de componentes principais (PCA), Análise Discriminante Parcial pelo Menor

Quadrado (PLS-DA) e sua versão ortogonal (OPLS-DA) e submetida ao teste T de Welch, conforme disponível no MetaboAnalyst.

A avaliação dos metabólitos selecionados para discriminar alterações metabólicas na cultura de células foi realizada por algoritmos de classificação de Máquina de Vetor de Suporte (SVM), acessíveis no módulo Análise de Biomarcador no MetaboAnalyst. O SVM usa combinações de níveis de metabólitos, selecionadas pelo ranking interno de recursos e pela validação cruzada de exclusão única (usada para repetir várias vezes o treinamento e a avaliação do SVM). Se houver diferenças nos níveis medidos entre as populações, espera-se que o método tenha uma área alta sob a curva (AUC) nas curvas ROC (Receiver Operating Characteristic). A frequência de aparecimento de cada metabolito para compor a classificação na SVM é uma indicação da relevância para os metabólitos.

ARTIGO CIENTÍFICO
(SUBMETIDO À *BIOMEDICINE & PHARMACOLOGY*)

Berberine associated photodynamic therapy promotes autophagy and apoptosis via ROS generation in renal carcinoma cells

Tairine Zara Lopes ^a, Fabio Rogério de Moraes^{b,c}, Raghuvir Krishnaswamy Arni^{b,c}, Paula Rahal ^a, Marília Freitas Calmon ^a

^a. Laboratory of Genomics Studies, São Paulo State University, São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil.

^b. Physics Department, São Paulo State University, São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil.

^c. Multiuser Center for Biomolecular Innovation, São Paulo State University, São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil.

• Corresponding author: Marília de Freitas Calmon, PhD, Department of Biology, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – IBILCE/ UNESP, Street: Cristóvão Colombo, 2265, Zip/Postal Code: 15054-000 – City: São José do Rio Preto, SP, Brazil. E-mail address: macal131@gmail.com, Phone: +55 17 3221-2852, Fax: +55 17 3221-2390

Abstract: Renal cell carcinoma (RCC) consists of the most lethal common urological cancer and the clinical practice has shown that resistant RCC to commons therapies is extremely high. Berberine is an isoquinoline alkaloid, present in different kinds of plants and it has long been used in Chinese medicine. It has several properties, such as antioxidant, anti-inflammatory, anti-diabetic, anti-microbial and anti-cancer. Moreover, berberine has photosensitive characteristics and its association with photodynamic therapy (PDT) is effective against tumor cells. This study aimed to evaluate the effects of berberine associated PDT in renal carcinoma cell lines. The cellular viability assay showed increased cytotoxicity in concentration and time-dependent manner. Berberine presented efficient internalization in all cell lines analyzed. In addition, after treatment with berberine associated PDT, it was observed a high phototoxicity effect with less than 20% of viable cells. In this study we observed that the increase of reactive oxygen species (ROS) levels was accompanied by an increase of autophagy levels and apoptosis by caspase 3 activity, suggesting cell death by both mechanisms. Additionally, three target genes of anti-cancer drugs were differentially expressed in 786-O cells, being that Vascular Endothelial Growth Factor-D(*FIGF*) and Human Telomerase Reverse Transcriptase (*TERT*) gene presented low expression and Polo Like Kinase 3 (*PLK3*) presented overexpression after treatment with berberine associated PDT. In this study, the proposed treatment was able to alter metabolites that are related to cell proliferation, migration and angiogenesis. Thus, it is possible to conclude that berberine has promising potential as a photosensitizing agent in a photodynamic therapy system, because it induced significant anticancer effects on renal carcinoma cells.

Keywords: Berberine, Cell death; Photodynamic therapy; Renal cell carcinoma

1. Introduction

Renal cell carcinoma (RCC) is the 9th most common cancer in men and 14th most common in women worldwide and consists in the most lethal common urological cancer, with mortality of 30-40% [1, 2]. RCC accounts for 2 – 3% of all cancers and worldwide more than 338,000 new cases are diagnosed each year [3]. Usually, the surgery is the mainstay for curative treatment for RCC, followed by adjuvant therapies such as radiotherapy and chemotherapy. Clinical practice has shown that the percentage of resistant RCC to common therapies is extremely high [1, 4]. Despite the surgery is the main treatment, more than 40% of patients develop metastatic disease after nephrectomy with poor prognosis and low survival rate [5]. Additionally, the side effects are several, including hematological toxicity, gastrointestinal disorders, cardiovascular alterations, chemoresistance, and moreover emotional debilitation [6, 7]. Thus, there is a high demand for other locally targeted therapeutics strategies and new protocols that increase treatment efficacy, to improve patient life quality and survival. In this context, the use of phytochemicals extracted from various vegetables, fruits, herbs, and medicinal plants has attracted great attention and has been extensively investigated for anticancer properties[8].

Berberine (BBR) is an isoquinoline alkaloid presents in roots, rhizome, and stem bark of many kinds of plants and it has long been used in Chinese medicine [9]. It has antioxidant, anti-inflammatory, anti-diabetic, anti-microbial and anti-cancer properties [10]. Previous studies showed that berberine directly binds to DNA in a pH-dependent manner, establishing a DNA-berberine complex [11]. Moreover, several mechanisms have been involved in the antitumor activity of berberine, including induction of cell cycle arrest, inhibition of cell proliferation and migration and stimulation of apoptosis in various cancer cell lines [12-15], but the molecular mechanisms are not completely elucidated for each type of cancer [16].

The fluorescent nature of berberine is a good indicator for the photodynamic process [17], thus it might be used as a new type of photodynamic therapeutic agent [18]. Some authors have reported that berberine is a photosensitive agent with the ability to generate reactive oxygen species and other radicals in the presence of light source [19, 20]. Therefore, berberine can be considered as a photosensitizer candidate in Photodynamic Therapy (PDT), potentializing treatment efficiency and minimizing the side effects.

In this context, photodynamic therapy (PDT) is a noninvasive treatment method with a local target that has been presented as a potential approach for oncological diseases [21, 22].

PDT involves three essential components – photosensitizing agent, a visible light source and molecular oxygen. These components together are able to initiate a photochemical reaction that results in the generation of reactive oxygen species (ROS) (e.g., singlet oxygen, superoxide anion radical, hydrogen peroxide, etc.), which are highly cytotoxic [23, 24]. The production of ROS at mitochondrial, lysosomal or endoplasmic reticulum loci can lead to an irreversible damage of tumor cells and initiate cell death by several mechanisms [25]. Both autophagy and apoptosis have previously been reported to be the response of oxidative stress and energy privation [26]. After a stress stimulus, ROS can lead to the formation of autophagosome, and previous studies demonstrated that ROS play an important role in promoting autophagy [27].

Generally, apoptosis is the main type of cell death in PDT occurring quite rapidly after photodamage, characterized by fragmentation of DNA and condensation of chromatin [28]. The localization of photosensitizer (PS) is essential to determine the type of cell death and apoptosis can occur when PS is located mitochondrially [29].

Therefore, this present research evaluated the effect of berberine associated PDT in renal carcinoma cell lines.

2. Material and methods

2.1. Preparation of the berberine

Berberine chloride was purchased from Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA). Berberine was dissolved in Dimethyl sulfoxide – DMSO (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) to perform all of the experiments of this study.

2.2. Cell lines and culture conditions

Human RCC cell lines (ACHN, 786-O) and human renal tubular epithelial cells derived from normal kidneys (HK-2) were obtained from American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA). ACHN cells were cultured in a Mem Alpha Medium (Gibco by Life Technologies, Grand Island, NY, USA), 786-O cells were cultured in RPMI1640 medium (Gibco by Life Technologies, Grand Island, NY, USA) and HK-2 cells were cultured in keratinocyte serum-free medium (K-SFM) (Gibco by Life Technologies, Grand Island, NY, USA). The Mem Alpha and RPMI1640 medium were supplemented with 10% fetal bovine

serum (FBS; Cultlab, Campinas, Sao Paulo, Brazil), 100U/mL penicillin (Gibco, Life Technologies, Carlsbad, California, USA), and 100mg/mL streptomycin (Gibco, Life Technologies, Carlsbad, California, USA) and K-SFM were supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS; Cultlab, Campinas, Sao Paulo, Brazil), 25mg bovine pituitary extract and 2,5µg recombinant epithelial growth factor per ml. All cells were cultured at 37°C in a humid atmosphere with 5% CO₂.

2.3. Cell viability assay

The cell lines were seeded at the density of $1,5 \times 10^4$ cells/well in 96-well plates for 24h. The cells were treated with several concentrations of BBR (5µM, 10µM, 20µM, 40µM, 80µM, 160µM, and 320µM). After 24 and 48 hours of treatment, 1 mg/mL of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) was diluted to 100µL of the medium in each well and incubated for 30 min at 37°C. Then, the MTT was removed and 100µL of DMSO (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) added to solubilize the formazan crystals and the absorbance was read using a microplate reader (Fluostar Omega, BMG Labtech, Ortenberg, Germany) at a wavelength of 570 nm. All experiments were performed in triplicate and in three independent assays.

2.4. Cellular uptake of the BBR

To analyze the intracellular uptake of BBR 3×10^5 cells/well were seeded in 6-well plates. The ACHN, 786-O, and HK-2 cells were treated with 20 µM of BBR. After 3, 6, 12, 24 and 48 hours of incubation the cells were washed with PBS, then viewed and photographed using a fluorescence microscope (Zeiss Axio, Vert. A1) with a FITC filter (excitation spectra: 489 nm, blue laser). The fluorescence of the BBR is detected by excitation at 421 nm and emission at 555 nm [30].

2.5. Cell viability and phototoxicity

ACHN, 786-O, and HK-2 were seeded at the density of $1,5 \times 10^4$ cells/well in 96-well plates for 24 h and incubated for 3 h with BBR (20µM). After the incubation time, the cells were washed with PBS and 100µL of fresh culture medium without phenol red and FBS was added to each well. To irradiation it was used a laser (Vet Light - DMC Enterprise, Sao Carlos, Sao Paulo, Brazil), operating at 447 nm and 80 J/cm² of fluency, set at 4 minutes for application. After irradiation, 100µL of fresh culture medium with 10% FBS was added to

each well. Then, cell viability was measured after 24 hours of irradiation by MTT assay. In this experiment four types of treatment were established: cells without treatment (control), cells treated with BBR but not exposed to laser; cells exposed to laser only and cells treated with BBR and exposed to the laser. All experiments were performed in triplicate and in three independent assays.

2.6. Measurement of Reactive Oxygen Species (ROS) assay

The intracellular ROS generation was measured using a 2'-7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFDA) - *Cellular Reactive Oxygen Species Detection Assay Kit* (ab113851, Abcam, Cambridge, UK) with slight modifications. DCFDA is a fluorogenic dye that measures hydroxyl, peroxy and other ROS activity within the cell. In the presence of ROS, this compound is oxidized within the cell and produces a fluorescent compound, 2', 7'-dichlorofluorescein (DCF), which remains intracellular. Briefly, ACHN, 786-O, and HK-2 cell lines were seeded in 96-well plates. On the following day, cells were incubated with BBR (20 μ M) associated PDT. After 24 hours of treatment, cells were incubated with culture medium containing 25 μ M DCFDA for 45 minutes at 37°C. Then, the ROS level was determined by measuring the fluorescence intensity using a microplate reader (Fluostar Omega, BMG Labtech, Ortenberg, Germany) with excitation and emission wavelengths set at 485 and 535 nm, respectively. Tert-butyl hydrogen peroxide (TBHP), which induces ROS activity to reduce DCFDA to DCF, was used as the positive control. All experiments were performed in triplicate and in three independent assays.

2.7. Autophagy assay

Autophagy was analyzed using an *Autophagy Assay Kit* (MAK138, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) according to the manufacturer's protocol. Briefly, ACHN, 786-O, and HK-2 cell lines were seeded in 96-well plates and treated with BBR associated PDT. After 24 hours of treatment, cells were incubated with Autophagosome Detection Reagent diluted in Stain buffer for 1 hour at 37°C. Next, wells were washed with wash buffer and following it was performed a reading of fluorescence intensity of intracellular autophagosomes with excitation and emission wavelengths set at 360 and 520 nm, respectively. Trichostatin A (TSA), which induces autophagy process, was used as the positive control. All experiments were performed in triplicate and in three independent assays.

2.8. Apoptosis assay

The caspase 3 activity in ACHN, 786-O, and HK-2 cells were measured using a *Caspase 3 Assay Kit Colorimetric* (ab39401, Abcam, Cambridge, UK) with slight modifications. Briefly, 3×10^5 cells in 6-well plates were seeded and treated with BBR associated PDT. After 24 hours of treatment, cells were resuspended in 50 μ l of Cell Lysis Buffer, cell supernatant was isolated and measurement of protein concentration was performed by ND-2000 *Nanodrop* (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA). Then, 25 μ l of 2 \times Reaction Buffer (containing 10 mM DTT) and 2,5 μ l of 4 mM DEVD-p-NA substrate were added into 25 μ l of each sample and the cells were incubated for 2 hours at 37°C. The absorbance was detected at the wavelength of 405 nm. The caspase 3 activity was determined to compare treated cells results with the untreated control. All experiments were performed in triplicate and in three independent assays.

2.9. PCR array

Total RNA from 786-O cells after 1 hour of treatment with BBR associated PDT and 786-O cells without treatment were isolated using the RNeasy mini kit according to the manufacturer's instructions (Qiagen, Germany). Total RNA (2 μ g) from each group of 786-O cells was reverse transcribed using the first-strand cDNA synthesis kit for RT-PCR (Qiagen, Germany), following the manufacturer's instructions. Nuclease-free water was used to dilute the amplified cDNA and was added to the RT²qPCR SYBR green Master Mix (Qiagen, Germany). After, 25 μ l of the experimental cocktail was added to each well of the *Human Cancer Drug Targets RT² Profiler PCR array* (Qiagen, Germany). Real-time PCR was performed on the Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA) according to the manufacturer's instructions (Qiagen, Germany). All data from the PCR was collected and differential expression of genes was analyzed by Qiagen Web Portal (<https://www.qiagen.com/br/shop/genes-and-pathways/data-analysis-center-overview-page/>).

2.10. Metabolite footprinting analysis

Intracellular and extracellular metabolite levels are correlated as intake and secretion are controlled events by several cytosolic and transmembrane proteins [31, 32]. Therefore, the culture medium of 786-O cells controls (without treatment) and treated was used to assess metabolic changes. Briefly, 1×10^6 cells were seeded in dishes (60mm) and treated with BBR associated PDT. After 30 minutes, 3 hours and 6 hours of treatment, the culture medium was

collected for analyses of extracellular metabolites. As external reference, DSS was added to 500 μM in order to measure relative concentrations.

2.11. Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy

Cell medium was transferred to NMR 5mm tubes and added 10% D_2O for tune and match procedures. Data were collected at 298 K in a 600 MHz Bruker AVANCE III HD magnet. All ^1H NMR measurements were performed by a pre-saturated Call-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) pulse sequence. A 14 ppm (parts per million) slide window was chosen, with a relaxation delay of 5 s. Spin-echo delay was set to 400 μs with 400 loop T_2 filter. A total of 64 scans were acquired. Free induction decays (FIDs) were multiplied by an exponential function with a 1 Hz line broadening prior to Fourier transformation. Topspin 3.5 (Bruker Biospin, Germany) was used to manually phase and baseline correction. Total correlation spectroscopy (TOCSY) and heteronuclear single quantum coherence (HSQC) spectroscopy were performed using Bruker standard pulse sequences for selected samples, in order to assist metabolite assignment.

2.12. Statistical analysis

Data were expressed as mean \pm standard deviation. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 7 Software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) and the statistical significance of differences between the results was determined by analysis of variance (ANOVA) followed by post-test Tukey's test for multiple comparisons. $p \leq 0.05$ was considered statistically significant in this study.

NMR data was assigned to different metabolites using Chenomx software (Chenomx Inc. Alberta, Canada) and the Human Metabolome Database [33]. After metabolite assignment, MetaboAnalyst 4.0 [34] was used with the relative concentrations of each metabolite, as referred to DSS concentration. The same scaling and normalization was repeated. Statistical analysis was performed by using PCA, Partial Least Square Discriminant Analysis (PLS-DA) and its orthogonal version (OPLS-DA), and subjected to Welch T-test as available in MetaboAnalyst.

Evaluation of the selected metabolites for discriminating metabolic changes in cell culture was carried out by a Support Vector Machine (SVM) classification algorithm accessible at the Biomarker Analysis module in MetaboAnalyst. SVM uses combinations of metabolite levels, selected by built-in feature ranking, and by leave-one-out cross validation (used to repeat multiple times SVM training and evaluation). If there are differences in the

measured levels between populations, it is expected the method to have high area under the curve (AUC) in Receiver Operating Characteristic (ROC) curves. The frequency of appearance of each metabolite to compose the classification in SVM is indication of the relevance for the metabolites.

3. Results

3.1. Effects of the BBR on cell viability

To investigate the effects of BBR on ACHN, 786-O, and HK-2 cell lines, we first evaluated the cytotoxicity of BBR in different concentrations (5, 10, 20, 40, 80, 160 and 320 μM) after 24 and 48 hours of incubation by MTT assay.

The cell viability was affected by BBR in a dose-dependent manner (Figure 1). All the cell lines presented high cellular viability (>80%) in the concentration until 40 μM in 24 hours, however, the HK-2 cells treated with 40 μM of BBR presented viability <80% in 48 hours. For this reason, it was chosen the concentration of 20 μM to perform the next experiments. In general, BBR showed low cytotoxicity in the dark in the cell lines being considered a good photosensitizer for photodynamic therapy.

3.2. Cellular uptake of BBR

Fluorescence microscopy was used to evaluate the cellular uptake of BBR after 3, 6, 12, 24 and 48 hours of incubation. The cells ACHN, 786-O, and HK-2 were able to internalize 20 μM of BBR after 3 hours cells. On the other side, the fluorescence decreases for all cell lines after 24 and 48 hours of BBR incubation (Figure 2). The results showed that BBR is dispersed by the cytosol and nucleus in all the cell lines evaluated.

3.3. Effects of the phototoxicity of the BBR

Cell lines treated with BBR presented high cellular viability being 91.6% for ACHN, 78.9% for 786-O and 88.8% for HK-2 cells. ACHN, 786-O, and HK-2 treated with BBR associated PDT showed a significant decrease in the cellular viability: observed 16.26% of cellular viability for ACHN cells ($p<0.0001$), 16.33% for 786-O cells ($p<0.0001$) and 15.89% for HK-2 cells ($p<0.001$) (Figure 3). On the other hand, cell lines treated only with the laser without BBR showed high cellular viability. ACHN cell presented 90.64% of viability, 87.80% for 786-O cells and 93% for HK-2 cells. This result demonstrated the promising

phototoxic effect of BBR associated PDT for the all renal carcinoma cell lines evaluated. It was observed that HK-2 cells showed greater sensibility in relation to ACHN and 786-O cells. The treatment with PDT is locally targeted decreasing the effects over non-tumoral cells.

3.4. BBR associated PDT induces ROS generation

Accumulation of ROS in ACHN, 786-O, and HK-2 cells was analyzed by DCFDA staining. Levels of ROS in the cell treated only with BBR alone were similar to control. In contrast, cells treated with BBR associated PDT showed a significant increase in the ROS generation, being that ACHN, 786-O, and HK-2 cells presented an increase of 180.03% ($p<0.0001$), 152.65% ($p<0.0001$), 156.65% ($p<0.0001$) respectively (Figure 4).

3.5. BBR associated PDT induces autophagy

Autophagosome detection was analyzed by fluorescence intensity. It was shown that BBR associated PDT induced autophagic processes in all cell lines analyzed. All cell lines treated with BBR alone showed levels of autophagy slightly more than 115%. On the other hand, cells treated with BBR associated PDT presented a significant increase in the levels of autophagy. The cells ACHN, 786-O, and HK-2 presented 173.2% ($p<0.0001$), 175% ($p<0.0001$) and 169% ($p<0.0001$) of autophagy respectively (Figure 5).

These results suggest that BBR photoactivation leads to autophagosome formation and consequently, cell death by autophagy.

3.6. BBR associated PDT induces apoptosis

Caspase 3 activity in ACHN, 786-O, and HK-2 cells were measured using a *Caspase 3 Assay Kit Colorimetric* after BBR and PDT treatment. The caspase 3 activity similar to the control group were observed in the cells treated only with BBR. In contrast, we observed that renal carcinoma cells showed a significant increase of caspase 3 activity after treatment with BBR and PDT (141.8% in ACHN cells, $p<0.05$) and 190.64% in 786-O cells, $p<0.001$). The caspase-3 activity in non-tumoral cells (HK-2) was similar in comparison with the control group ($p=0.07$) (Figure 6). These results showed that BBR associated PDT in renal carcinoma cells are able to active caspase 3 leading cell death by apoptosis.

3.7. Expression of Target Genes of Anti-Cancer Drugs in 786-O cells treated with BBR associated PDT

To evaluate possible target genes of anti-cancer drugs and its gene expression profile of the 786-O cells without treatment and BBR associated PDT was used RT² Profiler PCR arrays. Target genes of anti-cancer drugs with differential expression between 786-O cells are represented in Table I. We can observe that *FIGF* ($p=0.02$) and *TERT* ($p=0.05$) genes presented reduced expression, while the *PLK3* was upregulated ($p<0.001$) after BBR associated PDT treatment.

3.8. Metabolic changes induced by BBR associated PDT

Nuclear magnetic resonance spectroscopy successfully identified several signals from the metabolite 786-O (Table II) cell line. As shown in figure 7 and respective table, 24 different metabolites were identified and quantified in NMR spectra for each time period. Relative concentrations are shown as box plots for each individual metabolite after 30 minutes, 3 hours and 6 hours post treatment (Figures S2-S9).

PCA score plots indicate that metabolic changes are not notable for up to 3 hours post treatment for 786-O (Figure S1). Nevertheless, after 6 hours post treatment, cells seem to have metabolic changes that are measured by the NMR-based metabolomics approach used. In addition, PCA is not a supervised approach and, as such, distances between control and treated samples are not optimized. On the other hand, PLS-DA and OPLS-DA are better in discriminating control and treated groups, as they use this information to maximize the distances between groups. OPLS-DA score plots are able to distinguish the metabolic signature between control and treated samples after only 30 minutes following treatment (Figures S1). In order to check which metabolites and, thus, their corresponding metabolic pathway is mainly affected by treatment with berberine associated PDT, a support vector machine (SVM) classification system was set, using MetaboAnalyst. As it could be expected from OPLS-DA score plots, it is found that SVM has good accuracy in discriminant metabolite levels between control and berberine associated photodynamic therapy treated samples. MetaboAnalyst SVM approach uses a subset of metabolites for each run and, consequently, the frequency of usage for each metabolite in top scoring models are an indicative of most affected metabolites (and pathways), as they would have more different concentrations between control and treated samples.

In this study, several metabolites statistically significant were detected in 786-O cells after treatment with BBR associated PDT and are represented in Table II.

We can highlight some metabolites with statistical significance that may be related to the processes of cell proliferation and tumorigenesis. Metabolite analyzes showed that the level lysine had a significant increase 3 hours after the treatment ($p=0.0014$). Furthermore, it was also observed that the formate levels decreased significantly 6 hours after the treatment ($p<0.0001$). Similarly, the lactate levels were decrease significantly after 6 hours of treatment ($p=0.0079$), this metabolite performs very important functions involved in cancer.

4. Discussion

RCC is considered a malignancy with high mortality and despite the great advances in the diagnosis and treatment, the survival remains poor yet. The chemotherapy resistance and metastatic potential are the main causes of poor prognosis of patients [33, 34]. Thus, there is an urgent need to develop a novel therapeutic approach for the RCC. In this context, mounting evidence has demonstrated that PDT is significantly effective against several types of cancer [35]. In this study, we evaluate the effect of berberine associated with PDT in ACHN, 786-O, and HK-2 cell lines. Recent studies reported that berberine has characteristics that make it fluorescent [36, 37]. Thus, berberine can be used as a photosensitizer agent for PDT, increasing the treatment efficiency and reducing the side effects.

In this study, we observed that berberine showed low cytotoxicity in the dark until 40 μM in tumoral cells. The low cytotoxicity of natural products extract has an advantage over conventional chemotherapeutic that produces strong side effects and decreases the patient quality of life [38]. Fluorescence microscopy images showed an efficient internalization of berberine for all cell lines after 3 hours of incubation. Moreover, it was observed presence in cytoplasm and nucleus. A study with glioblastoma and pancreatic carcinoma observed that at 10 μM concentration, berberine is mainly distributed in the cytoplasm and at higher concentrations (50 μM or 150 μM), the signal is clearly visualized both in cytoplasm and nucleus [39].

A good photosensitizer agent for PDT should have excellent photochemical reactivity, low dark toxicity and only be cytotoxic in the presence of light [40, 41]. Osteosarcoma, skin carcinoma and lung carcinoma cells treated with only 5 μM of berberine in the absence of light showed 100% of viability whereas berberine associated with UVA radiation generated 60% survival after 72 hours [42]. In this study, berberine presented high activity against RCC cell lines when associated with PDT. The cellular viability decreases significantly after 24 hours of irradiation in all cell lines used in this study, thus we can infer that this treatment is effective against RCC. Although HK-2 has been shown to be more sensitive compared to

renal carcinoma cell lines, the damage caused by photodynamic therapy is greatly reduced and limited, directing the light source only to tumor sites [43].

The cellular damage caused by oxidative stress in the intracellular biomolecules, such as protein, lipid, RNA/DNA and reactive species oxygen (ROS) has an important function in the PDT used for cancer treatment; the synergism of photosensitizer agent with a laser causes ROS generation leading to cellular death [44]. Our results demonstrated that there was no ROS production in the berberine alone, but the treatment with berberine and PDT resulted in a significant increase of ROS levels.

In this context, ROS regulate autophagy and apoptosis by interaction with specific signaling molecules [45]. Autophagy is a natural process, where cytoplasmic components are degraded in the lysosome; besides studies have inferred that PDT can induce autophagy, the role of autophagy played in PDT is unclear, depending on the context the autophagy process promotes or inhibits cell death by drugs, however, it is quite established that massive ROS production upon treatment can stimulate autophagic cell death [46]. In addition, high levels of autophagy may lead to cell death due to expressive degradation of cytoplasm components [47].

It has been previously reported that apoptosis is the major cell death mechanism in the cellular response to PDT, which is associated with characteristic morphological and biochemical modifications [28]. Production of ROS produced induces oxidative stress in mitochondria and pro-apoptotic proteins are released in cytosol activating caspases; when apoptosis is triggered, the nucleases degrade the chromosomal DNA [28, 48]. The activation of caspase 3 is one of the most interesting hallmarks of anticancer of berberine. Berberine induces caspase 3 dependent apoptosis in bladder carcinoma [49], glioblastoma [50], breast carcinoma [51]. Our results showed that an increase of caspase-3 after treatment with berberine and PDT, thus, we can conclude that apoptosis also is modality cell death induced by this treatment. Caspase-3 activation represents the irreversible of execution stage of apoptosis [21].

FIGF gene, also known as *VEGFD*, which presented low expression in 786-O cells after treatment is a member of the vascular endothelial growth factor (*VEGF*) family; these proteins promote angiogenesis and lymphangiogenesis [52]. *VEGF-D* induces growth of the lymphatic vessels via activation of *VEGFR-3* localized on the lymphatic endothelial cells; clinic pathological characteristics have shown that in several human cancers there is a strong correlation between *VEGFR-3* and lymph node metastasis [53]. In addition, *VEGFD*

overexpression is correlated with a poor prognosis in ovarian cancer, lung cancer, esophageal squamous cancer and papillary renal carcinoma [53-56].

The human telomerase reverse transcriptase (*TERT*) gene which also presented low expression in the treated 786-O cells is essential for the reconstitution of telomerase activity and its expression is highly regulated, being absent or only present in low levels in somatic cells [57]. Up to 90% of human malignancies have expressive levels of TERT RNA expression, and consequently high TERT enzyme activity [58]. The telomerase activity contributes to their growth advantage and survival of tumor cells [59]. Previous studies demonstrated a strong association with therapy resistance and telomerase expression in breast and gastric cancer patients, in contrast, the low levels of telomerase activity is able to resensitize cell lines to various chemotherapeutics [60].

On the other hand, *PLK3* gene presented high expression in treated 786-O cells. The polo-like kinases family are important regulators of cellular function and it was associated with cellular responses to DNA damage [61]. *PLK3* gene is downregulated in many human cancers and some studies suggest that it is tumor suppressor [62]. A study observed that *PLK3* null mice are more susceptible to developing tumors in some organs and that low expression is the main mechanism that involves *PLK3* with increased tumorigenesis process [63].

Altogether, disturb in protein expression levels impact a diversity of metabolic pathways. Thus, metabolomics aims to explore the wide range of metabolites that are present in cell lines and biological samples [64]. Currently, it is widely applied in drug discovery, clinical diagnosis, food science and any other fields of human health, moreover, some studies have investigated whether metabolite biomarkers could be used to predict the response to cancer treatment [65, 66]. In this study, we observed changes in several metabolites in 786-O cells after treatment with berberine associated PDT.

The levels of Lysine increased significantly 3 hours after the treatment. Lysine is an essential amino acid with several antitumor properties as tumor growth supressor, suggesting it has potential as an anticancer agent [67]. One study evaluated a specific nutrient mixture containing lysine on human renal carcinoma cell line 786-0 and showed significant decrease and complete inhibition of invasion at 1000 µg/ml concentration due to inhibition of matrix metalloproteinases (MMPs). The inhibition of MMP-2 and MMP-9 secretion demonstrated potent antimetastatic action [68]. MMP-2 overexpression detected in cancer tissue is significantly related to larger tumor size and silencing of MMP-9 decreased the migration and invasion in glioma cells [69]. This way it is known that MMPs can influence the tumor environment by promoting angiogenesis, tumor growth and metastasis [70]. Another study,

concluded that L-arginine and L-lysine solutions affected the splenic sympathetic nerve activity and the proliferation of HCT116 cells (human colon carcinoma) implanted into the subcutaneous space of athymic nude mice [71].

The formate levels decreased significantly after the treatment with BBR and PDT. It is known that the formate is an important molecule whose carbon is incorporated into nucleic acids and into the amino acid serine [72]. A relevant study reported that the formate is a promoter of cancer cell invasion in glioblastoma cells. The cell lines U87, LN229 and NCH601 treated with formate increased cell invasion in a concentration-dependent manner, indicating that formate promotes glioma cell invasion. Subsequently, it was performed knockdown for *MTHFD1L*, the gene encoding for the mitochondrial enzyme responsible for formate production resulting in a significant reduction of invasion relative to control [73].

The levels of lactate also decreased significantly 6 hours after the treatment. The relationship between high lactate levels and promotion of cellular malignancy has long been reported [74, 75]. The lactate is one of the major metabolites involved and necessary for carcinogenesis, angiogenesis, cell migration and metastasis [74, 75]. One of the classical observations of Otto Warburg was the high lactate production rate in malignant cells [76]. A study involving 40 patients with renal cell carcinoma reported high levels of urine lactate before nephrectomy compared to healthy controls. In addition, the levels of lactate and glucose (from which lactate derived) were more abundant in urine samples before nephrectomy than in after ones [77]. The impact of high lactate levels on cell motility is not yet fully elucidated, but there are data showing involvement with signaling protein, such as TGF- β 2, that can be a mediator of the lactate-associated effects on migration of cancer cells in glioma cells [75, 78]. It is also known that lactate plays an important role in angiogenesis stimulating VEGF protein expression in endothelial cells [79]. Inhibitors of lactate dehydrogenase, enzyme responsible for lactate production, greatly reduced angiogenesis [80].

In summary, we observed that berberine presented low dark cytotoxicity and efficient cellular internalization. The treatment with berberine associated with photodynamic therapy was able to generate ROS and it induces autophagy and apoptosis activating caspase 3. Additionally, three target genes of anti-cancer drugs were differentially expressed and we found metabolites changes related to inhibition of cell proliferation, migration and angiogenesis.

In addition, it was observed and it suggests that berberine is a good photosensitizer and that the association with photodynamic therapy may be a potential anticancer treatment modality for renal cancer.

Acknowledgments

The authors acknowledge the financial support of the FAPESP (2009/53989-4) and CAPES (Scholarship). Also, they would like to thank the DMC Equipamentos LTDA (São Carlos, Brazil) for developing the LED system used in this study.

Conflict of interest

The authors declare that they have no competing interests.

References

- [1] J.R. Bhatt, A. Finelli, Landmarks in the diagnosis and treatment of renal cell carcinoma, *Nature reviews. Urology* 11(9) (2014) 517-25.
- [2] S.H. Rossi, T. Klatte, J. Usher-Smith, G.D. Stewart, Epidemiology and screening for renal cancer, *World journal of urology* 36(9) (2018) 1341-1353.
- [3] J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. Dikshit, S. Eser, C. Mathers, M. Rebelo, D.M. Parkin, D. Forman, F. Bray, Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012, *International journal of cancer* 136(5) (2015) E359-86.
- [4] Y. Zhao, H. Tang, X. Zeng, D. Ye, J. Liu, Resveratrol inhibits proliferation, migration and invasion via Akt and ERK1/2 signaling pathways in renal cell carcinoma cells, *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* 98 (2018) 36-44.
- [5] Z. Li, P. Hao, Q. Wu, F. Li, J. Zhao, K. Wu, C. Qu, Y. Chen, M. Li, X. Chen, A. Stucky, J. Zhong, L. Li, J.F. Zhong, Genetic mutations associated with metastatic clear cell renal cell carcinoma, *Oncotarget* 7(13) (2016) 16172-9.
- [6] D.P. Nguyen, E.A. Vertosick, R.B. Corradi, A. Vilaseca, N.E. Benfante, K.A. Touijer, D.D. Sjoberg, P. Russo, Histological subtype of renal cell carcinoma significantly affects survival in the era of partial nephrectomy, *Urologic oncology* 34(6) (2016) 259 e1-8.
- [7] D. Soulieres, Side-effects associated with targeted therapies in renal cell carcinoma, *Current opinion in supportive and palliative care* 7(3) (2013) 254-7.
- [8] E. Rajesh, L.S. Sankari, L. Malathi, J.R. Krupaa, Naturally occurring products in cancer therapy, *Journal of pharmacy & bioallied sciences* 7(Suppl 1) (2015) S181-3.
- [9] Y. Sun, K. Xun, Y. Wang, X. Chen, A systematic review of the anticancer properties of berberine, a natural product from Chinese herbs, *Anti-cancer drugs* 20(9) (2009) 757-69.
- [10] L.M. Ortiz, P. Lombardi, M. Tillhon, A.I. Scovassi, Berberine, an epiphany against cancer, *Molecules* 19(8) (2014) 12349-67.
- [11] P. Jabbarzadeh Kaboli, A. Rahmat, P. Ismail, K.H. Ling, Targets and mechanisms of berberine, a natural drug with potential to treat cancer with special focus on breast cancer, *European journal of pharmacology* 740 (2014) 584-95.
- [12] Z.H. Huang, H.F. Zheng, W.L. Wang, Y. Wang, L.F. Zhong, J.L. Wu, Q.X. Li, Berberine targets epidermal growth factor receptor signaling to suppress prostate cancer proliferation in vitro, *Molecular medicine reports* 11(3) (2015) 2125-8.
- [13] E. Barzegar, S. Fouladdel, T.K. Movahhed, S. Atashpour, M.H. Ghahremani, S.N. Ostad, E. Azizi, Effects of berberine on proliferation, cell cycle distribution and apoptosis of human breast cancer T47D and MCF7 cell lines, *Iranian journal of basic medical sciences* 18(4) (2015) 334-42.
- [14] C.M. Tsang, K.C. Cheung, Y.C. Cheung, K. Man, V.W. Lui, S.W. Tsao, Y. Feng, Berberine suppresses Id-1 expression and inhibits the growth and development of lung metastases in hepatocellular carcinoma, *Biochimica et biophysica acta* 1852(3) (2015) 541-51.
- [15] S.H. Park, J.H. Sung, E.J. Kim, N. Chung, Berberine induces apoptosis via ROS generation in PANC-1 and MIA-PaCa2 pancreatic cell lines, *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas* 48(2) (2015) 111-9.
- [16] J. Li, L. Gu, H. Zhang, T. Liu, D. Tian, M. Zhou, S. Zhou, Berberine represses DAXX gene transcription and induces cancer cell apoptosis, *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 93(3) (2013) 354-64.
- [17] B.J. Philogene, J.T. Arnason, G.H. Towers, Z. Abramowski, F. Campos, D. Champagne, D. McLachlan, Berberine: A naturally occurring phototoxic alkaloid, *Journal of chemical ecology* 10(1) (1984) 115-23.
- [18] L.L. Cheng, M. Wang, H. Zhu, K. Li, R.R. Zhu, X.Y. Sun, S.D. Yao, Q.S. Wu, S.L. Wang, Characterization of the transient species generated by the photoionization of Berberine: a laser flash photolysis study, *Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy* 73(5) (2009) 955-9.
- [19] S. Jantova, S. Letasiova, V. Brezova, L. Cipak, J. Labaj, Photochemical and phototoxic activity of berberine on murine fibroblast NIH-3T3 and Ehrlich ascites carcinoma cells, *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology* 85(3) (2006) 163-76.

- [20] J.J. Inbaraj, B.M. Kukielczak, P. Bilski, S.L. Sandvik, C.F. Chignell, Photochemistry and photocytotoxicity of alkaloids from Goldenseal (*Hydrastis canadensis* L.) 1. Berberine, *Chemical research in toxicology* 14(11) (2001) 1529-34.
- [21] A. Castilho-Fernandes, T.G. Lopes, F.L. Primo, M.R. Pinto, A.C. Tedesco, Photodynamic process induced by chloro-aluminum phthalocyanine nanoemulsion in glioblastoma, *Photodiagnosis and photodynamic therapy* 19 (2017) 221-228.
- [22] T. Osaki, I. Yokoe, K. Takahashi, K. Inoue, M. Ishizuka, T. Tanaka, K. Azuma, Y. Murahata, T. Tsuka, N. Itoh, T. Imagawa, Y. Okamoto, Metformin enhances the cytotoxicity of 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy in vitro, *Oncology letters* 14(1) (2017) 1049-1053.
- [23] P. Agostinis, K. Berg, K.A. Cengel, T.H. Foster, A.W. Girotti, S.O. Gollnick, S.M. Hahn, M.R. Hamblin, A. Juzeniene, D. Kessel, M. Korbelik, J. Moan, P. Mroz, D. Nowis, J. Piette, B.C. Wilson, J. Golab, Photodynamic therapy of cancer: an update, *CA: a cancer journal for clinicians* 61(4) (2011) 250-81.
- [24] W. Kuzyniak, J. Schmidt, W. Glac, J. Berkholz, G. Steinemann, B. Hoffmann, E.A. Ermilov, A.G. Gurek, V. Ahsen, B. Nitzsche, M. Hopfner, Novel zinc phthalocyanine as a promising photosensitizer for photodynamic treatment of esophageal cancer, *International journal of oncology* 50(3) (2017) 953-963.
- [25] D. Kessel, N.L. Oleinick, Cell Death Pathways Associated with Photodynamic Therapy: An Update, *Photochemistry and photobiology* 94(2) (2018) 213-218.
- [26] B.S. Erikstein, H.R. Hagland, J. Nikolaisen, M. Kulawiec, K.K. Singh, B.T. Gjertsen, K.J. Tronstad, Cellular stress induced by resazurin leads to autophagy and cell death via production of reactive oxygen species and mitochondrial impairment, *Journal of cellular biochemistry* 111(3) (2010) 574-84.
- [27] P. Tu, Q. Huang, Y. Ou, X. Du, K. Li, Y. Tao, H. Yin, Aloe-emodin-mediated photodynamic therapy induces autophagy and apoptosis in human osteosarcoma cell line MG63 through the ROS/JNK signaling pathway, *Oncology reports* 35(6) (2016) 3209-15.
- [28] T.J. Dougherty, C.J. Gomer, B.W. Henderson, G. Jori, D. Kessel, M. Korbelik, J. Moan, Q. Peng, Photodynamic therapy, *Journal of the National Cancer Institute* 90(12) (1998) 889-905.
- [29] A. Oniszczuk, K.A. Wojtunik-Kulesza, T. Oniszczuk, K. Kasprzak, The potential of photodynamic therapy (PDT)-Experimental investigations and clinical use, *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* 83 (2016) 912-929.
- [30] M.S. Diaz, M.L. Freile, M.I. Gutierrez, Solvent effect on the UV/Vis absorption and fluorescence spectroscopic properties of berberine, *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology* 8(7) (2009) 970-4.
- [31] D.B. Kell, M. Brown, H.M. Davey, W.B. Dunn, I. Spasic, S.G. Oliver, Metabolic footprinting and systems biology: the medium is the message, *Nature reviews. Microbiology* 3(7) (2005) 557-65.
- [32] G.A. Pope, D.A. MacKenzie, M. Defernez, M.A. Aroso, L.J. Fuller, F.A. Mellon, W.B. Dunn, M. Brown, R. Goodacre, D.B. Kell, M.E. Marvin, E.J. Louis, I.N. Roberts, Metabolic footprinting as a tool for discriminating between brewing yeasts, *Yeast* 24(8) (2007) 667-79.
- [33] Q. Zhang, J. Shi, F. Yuan, H. Wang, W. Fu, J. Pan, Y. Huang, J. Yu, J. Yang, Z. Chen, Higher expression of XPF is a critical factor in intrinsic chemotherapy resistance of human renal cell carcinoma, *International journal of cancer* 139(12) (2016) 2827-2837.
- [34] C. Yang, Y. Li, L. Fu, T. Jiang, F. Meng, Betulinic acid induces apoptosis and inhibits metastasis of human renal carcinoma cells in vitro and in vivo, *Journal of cellular biochemistry* (2018).
- [35] Z. Zhou, J. Song, L. Nie, X. Chen, Reactive oxygen species generating systems meeting challenges of photodynamic cancer therapy, *Chemical Society reviews* 45(23) (2016) 6597-6626.
- [36] L. Xu, S. Hong, N. Sun, K. Wang, L. Zhou, L. Ji, R. Pei, Berberine as a novel light-up i-motif fluorescence ligand and its application in designing molecular logic systems, *Chemical communications* 52(1) (2016) 179-82.
- [37] C.Q. Zhou, J.W. Yang, C. Dong, Y.M. Wang, B. Sun, J.X. Chen, Y.S. Xu, W.H. Chen, Highly selective, sensitive and fluorescent sensing of dimeric G-quadruplexes by a dimeric berberine, *Organic & biomolecular chemistry* 14(1) (2016) 191-7.

- [38] M. Li, M. Zhang, Z.L. Zhang, N. Liu, X.Y. Han, Q.C. Liu, W.J. Deng, C.X. Liao, Induction of Apoptosis by Berberine in Hepatocellular Carcinoma HepG2 Cells via Downregulation of NF-kappaB, *Oncology research* 25(2) (2017) 233-239.
- [39] A. Agnarelli, M. Natali, M. Garcia-Gil, R. Pesì, M.G. Tozzi, C. Ippolito, N. Bernardini, R. Vignali, R. Batistoni, A.M. Bianucci, S. Marracci, Cell-specific pattern of berberine pleiotropic effects on different human cell lines, *Scientific reports* 8(1) (2018) 10599.
- [40] H. Abrahamse, M.R. Hamblin, New photosensitizers for photodynamic therapy, *The Biochemical journal* 473(4) (2016) 347-64.
- [41] J. Zhang, C. Jiang, J.P. Figueiro Longo, R.B. Azevedo, H. Zhang, L.A. Muehlmann, An updated overview on the development of new photosensitizers for anticancer photodynamic therapy, *Acta pharmaceutica Sinica. B* 8(2) (2018) 137-146.
- [42] R. Bhattacharyya, B. Saha, M. Tyagi, S.K. Bandyopadhyay, B.S. Patro, S. Chattopadhyay, Differential modes of photosensitisation in cancer cells by berberine and coralyne, *Free radical research* 51(7-8) (2017) 723-738.
- [43] B. Karakullukcu, K. van Oudenaarde, M.P. Copper, W.M. Klop, R. van Veen, M. Wildeman, I. Bing Tan, Photodynamic therapy of early stage oral cavity and oropharynx neoplasms: an outcome analysis of 170 patients, *European archives of oto-rhino-laryngology : official journal of the European Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies* 268(2) (2011) 281-8.
- [44] P.H. Tu, W.J. Huang, Z.L. Wu, Q.Z. Peng, Z.B. Xie, J. Bao, M.H. Zhong, Induction of cell death by pyropheophorbide-alpha methyl ester-mediated photodynamic therapy in lung cancer A549 cells, *Cancer medicine* 6(3) (2017) 631-639.
- [45] Z. Zou, H. Chang, H. Li, S. Wang, Induction of reactive oxygen species: an emerging approach for cancer therapy, *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 22(11) (2017) 1321-1335.
- [46] L. Poillet-Perez, G. Despouy, R. Delage-Mourroux, M. Boyer-Guittaut, Interplay between ROS and autophagy in cancer cells, from tumor initiation to cancer therapy, *Redox biology* 4 (2015) 184-92.
- [47] V. Inguscio, E. Panzarini, L. Dini, Autophagy Contributes to the Death/Survival Balance in Cancer PhotoDynamic Therapy, *Cells* 1(3) (2012) 464-91.
- [48] W. Li, Q. Xie, L. Lai, Z. Mo, X. Peng, E. Leng, D. Zhang, H. Sun, Y. Li, W. Mei, S. Gao, In vitro evaluation of ruthenium complexes for photodynamic therapy, *Photodiagnosis and photodynamic therapy* 18 (2017) 83-94.
- [49] K. Yan, C. Zhang, J. Feng, L. Hou, L. Yan, Z. Zhou, Z. Liu, C. Liu, Y. Fan, B. Zheng, Z. Xu, Induction of G1 cell cycle arrest and apoptosis by berberine in bladder cancer cells, *European journal of pharmacology* 661(1-3) (2011) 1-7.
- [50] J. Wang, Q. Qi, Z. Feng, X. Zhang, B. Huang, A. Chen, L. Prestegarden, X. Li, J. Wang, Berberine induces autophagy in glioblastoma by targeting the AMPK/mTOR/ULK1-pathway, *Oncotarget* 7(41) (2016) 66944-66958.
- [51] Y. Pan, F. Zhang, Y. Zhao, D. Shao, X. Zheng, Y. Chen, K. He, J. Li, L. Chen, Berberine Enhances Chemosensitivity and Induces Apoptosis Through Dose-orchestrated AMPK Signaling in Breast Cancer, *Journal of Cancer* 8(9) (2017) 1679-1689.
- [52] S.A. Stacker, M.G. Achen, Emerging Roles for VEGF-D in Human Disease, *Biomolecules* 8(1) (2018).
- [53] S. Bierer, E. Herrmann, T. Kopke, J. Neumann, E. Eltze, L. Hertle, C. Wulfing, Lymphangiogenesis in kidney cancer: expression of VEGF-C, VEGF-D and VEGFR-3 in clear cell and papillary renal cell carcinoma, *Oncology reports* 20(4) (2008) 721-5.
- [54] X. Qi, L. Du, X. Chen, L. Chen, T. Yi, X. Chen, Y. Wen, Y. Wei, X. Zhao, VEGF-D-enhanced lymph node metastasis of ovarian cancer is reversed by vesicular stomatitis virus matrix protein, *International journal of oncology* 49(1) (2016) 123-32.
- [55] J. Ming, Q. Zhang, X. Qiu, E. Wang, Interleukin 7/interleukin 7 receptor induce c-Fos/c-Jun-dependent vascular endothelial growth factor-D up-regulation: a mechanism of lymphangiogenesis in lung cancer, *European journal of cancer* 45(5) (2009) 866-73.
- [56] Z. Yang, Y.G. Wang, K. Su, VEGF-C and VEGF-D expression and its correlation with lymph node metastasis in esophageal squamous cell cancer tissue, *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP* 16(1) (2015) 271-4.

- [57] A. Pestana, J. Vinagre, M. Sobrinho-Simoes, P. Soares, TERT biology and function in cancer: beyond immortalisation, *Journal of molecular endocrinology* 58(2) (2017) R129-R146.
- [58] J. Casuscelli, M.F. Becerra, B.J. Manley, E.C. Zabor, E. Reznik, A. Redzematovic, M.E. Arcila, D.M. Tennenbaum, M. Ghanaat, M. Kashan, C.G. Stief, M. Carlo, M.H. Voss, D.R. Feldman, R.J. Motzer, Y. Chen, V.E. Reuter, J.A. Coleman, P. Russo, J.J. Hsieh, A.A. Hakimi, Characterization and Impact of TERT Promoter Region Mutations on Clinical Outcome in Renal Cell Carcinoma, *European urology focus* (2017).
- [59] M. Gay-Bellile, L. Veronese, P. Combes, E. Eymard-Pierre, F. Kwiatkowski, M.M. Dauplat, A. Cayre, M. Privat, C. Abrial, Y.J. Bignon, M.A. Mouret-Reynier, P. Vago, F. Penault-Llorca, A. Tchirkov, TERT promoter status and gene copy number gains: effect on TERT expression and association with prognosis in breast cancer, *Oncotarget* 8(44) (2017) 77540-77551.
- [60] Y. Xu, A. Goldkorn, Telomere and Telomerase Therapeutics in Cancer, *Genes* 7(6) (2016).
- [61] M. Bahassi el, C.W. Conn, D.L. Myer, R.F. Hennigan, C.H. McGowan, Y. Sanchez, P.J. Stambrook, Mammalian Polo-like kinase 3 (Plk3) is a multifunctional protein involved in stress response pathways, *Oncogene* 21(43) (2002) 6633-40.
- [62] C. Helmke, M. Raab, F. Rodel, Y. Matthes, T. Oellerich, R. Mandal, M. Sanhaji, H. Urlaub, C. Rodel, S. Becker, K. Strebhardt, Ligand stimulation of CD95 induces activation of Plk3 followed by phosphorylation of caspase-8, *Cell research* 26(8) (2016) 914-34.
- [63] D. Xu, W. Dai, C. Li, Polo-like kinase 3, hypoxic responses, and tumorigenesis, *Cell cycle* 16(21) (2017) 2032-2036.
- [64] Y. Nan, X. Zhou, Q. Liu, A. Zhang, Y. Guan, S. Lin, L. Kong, Y. Han, X. Wang, Serum metabolomics strategy for understanding pharmacological effects of ShenQi pill acting on kidney yang deficiency syndrome, *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* 1026 (2016) 217-226.
- [65] A. Zhang, H. Sun, G. Yan, P. Wang, X. Wang, Metabolomics for Biomarker Discovery: Moving to the Clinic, *BioMed research international* 2015 (2015) 354671.
- [66] T. Iemoto, S. Nishiumi, T. Kobayashi, S. Fujigaki, T. Hamaguchi, K. Kato, H. Shoji, Y. Matsumura, K. Honda, M. Yoshida, Serum level of octanoic acid predicts the efficacy of chemotherapy for colorectal cancer, *Oncology letters* 17(1) (2019) 831-842.
- [67] M.W. Roomi, V. Ivanov, T. Kalinovsky, A. Niedzwiecki, M. Rath, Effect of ascorbic acid, lysine, proline, and green tea extract on human osteosarcoma cell line MNNG-HOS xenografts in nude mice: evaluation of tumor growth and immunohistochemistry, *Medical oncology* 23(3) (2006) 411-7.
- [68] M.W. Roomi, V. Ivanov, T. Kalinovsky, A. Niedzwiecki, M. Rath, Anticancer effect of lysine, proline, arginine, ascorbic acid and green tea extract on human renal adenocarcinoma line 786-0, *Oncology reports* 16(5) (2006) 943-7.
- [69] J. Cathcart, A. Pulkoski-Gross, J. Cao, Targeting Matrix Metalloproteinases in Cancer: Bringing New Life to Old Ideas, *Genes & diseases* 2(1) (2015) 26-34.
- [70] A.H. Webb, B.T. Gao, Z.K. Goldsmith, A.S. Irvine, N. Saleh, R.P. Lee, J.B. Lendermon, R. Bheemreddy, Q. Zhang, R.C. Brennan, D. Johnson, J.J. Steinle, M.W. Wilson, V.M. Morales-Tirado, Inhibition of MMP-2 and MMP-9 decreases cellular migration, and angiogenesis in in vitro models of retinoblastoma, *BMC cancer* 17(1) (2017) 434.
- [71] J. Shen, Y. Horii, Y. Fujisaki, K. Nagai, Effects of L-arginine and L-lysine mixtures on splenic sympathetic nerve activity and tumor proliferation, *Autonomic neuroscience : basic & clinical* 147(1-2) (2009) 86-90.
- [72] S.G. Lamarre, G. Morrow, L. Macmillan, M.E. Brosnan, J.T. Brosnan, Formate: an essential metabolite, a biomarker, or more?, *Clinical chemistry and laboratory medicine* 51(3) (2013) 571-8.
- [73] J. Meiser, A. Schuster, M. Pietzke, J. Vande Voorde, D. Athineos, K. Oizel, G. Burgos-Barragan, N. Wit, S. Dhayade, J.P. Morton, E. Dornier, D. Sumpton, G.M. Mackay, K. Blyth, K.J. Patel, S.P. Niclou, A. Vazquez, Increased formate overflow is a hallmark of oxidative cancer, *Nature communications* 9(1) (2018) 1368.
- [74] M.L. Goodwin, Z. Pennington, E.M. Westbroek, E. Cottrill, A.K. Ahmed, D.M. Sciubba, Lactate and cancer: a "lactic" perspective on spinal tumor metabolism (part 1), *Annals of translational medicine* 7(10) (2019) 220.
- [75] F. Hirschhaeuser, U.G. Sattler, W. Mueller-Klieser, Lactate: a metabolic key player in cancer, *Cancer research* 71(22) (2011) 6921-5.

- [76] I. San-Millan, G.A. Brooks, Reexamining cancer metabolism: lactate production for carcinogenesis could be the purpose and explanation of the Warburg Effect, *Carcinogenesis* 38(2) (2017) 119-133.
- [77] R. Ragone, F. Sallustio, S. Piccinonna, M. Rutigliano, G. Vanessa, S. Palazzo, G. Lucarelli, P. Ditonno, M. Battaglia, F.P. Fanizzi, F.P. Schena, Renal Cell Carcinoma: A Study through NMR-Based Metabolomics Combined with Transcriptomics, *Diseases* 4(1) (2016).
- [78] F. Baumann, P. Leukel, A. Doerfelt, C.P. Beier, K. Dettmer, P.J. Oefner, M. Kastenberger, M. Kreutz, T. Nickl-Jockschat, U. Bogdahn, A.K. Bosserhoff, P. Hau, Lactate promotes glioma migration by TGF-beta2-dependent regulation of matrix metalloproteinase-2, *Neuro-oncology* 11(4) (2009) 368-80.
- [79] F. Polet, O. Feron, Endothelial cell metabolism and tumour angiogenesis: glucose and glutamine as essential fuels and lactate as the driving force, *Journal of internal medicine* 273(2) (2013) 156-65.
- [80] T.K. Hunt, R. Aslam, Z. Hussain, S. Beckert, Lactate, with oxygen, incites angiogenesis, *Advances in experimental medicine and biology* 614 (2008) 73-80.

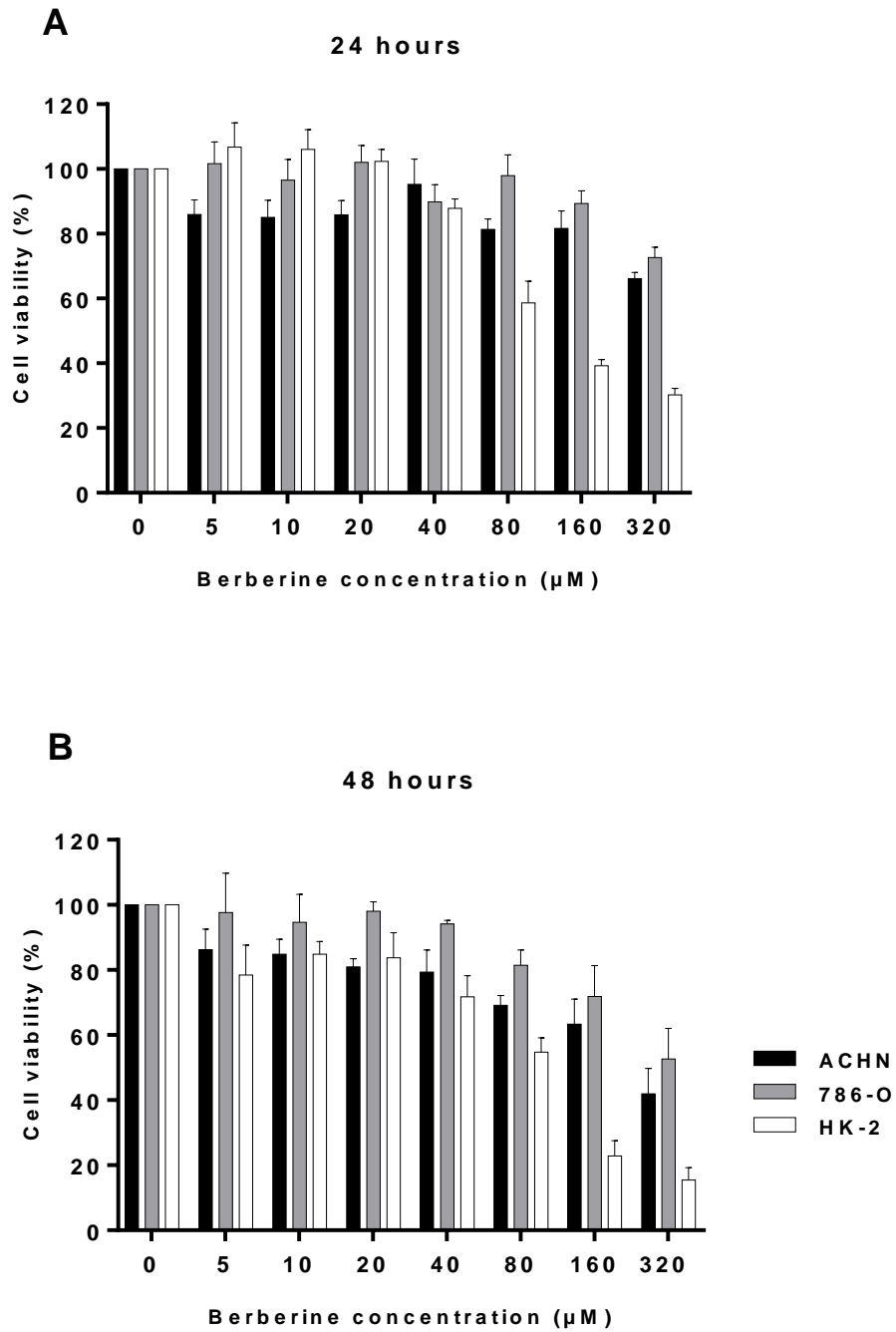


Figure 1: Cytotoxicity of berberine on ACHN, 786-O and HK-2 cells. The ACHN, 786-O and HK-2 cells were treated with different concentrations (5 μM , 10 μM , 20 μM , 40 μM , 80 μM , 160 μM and 320 μM). (A) Cellular viability of the cell lines 24 hours after BBR incubation. (B) Cellular viability of the cell lines 48 hours after BBR incubation. All assays were performed in triplicate, and data shown are mean \pm SD of three independent experiments.

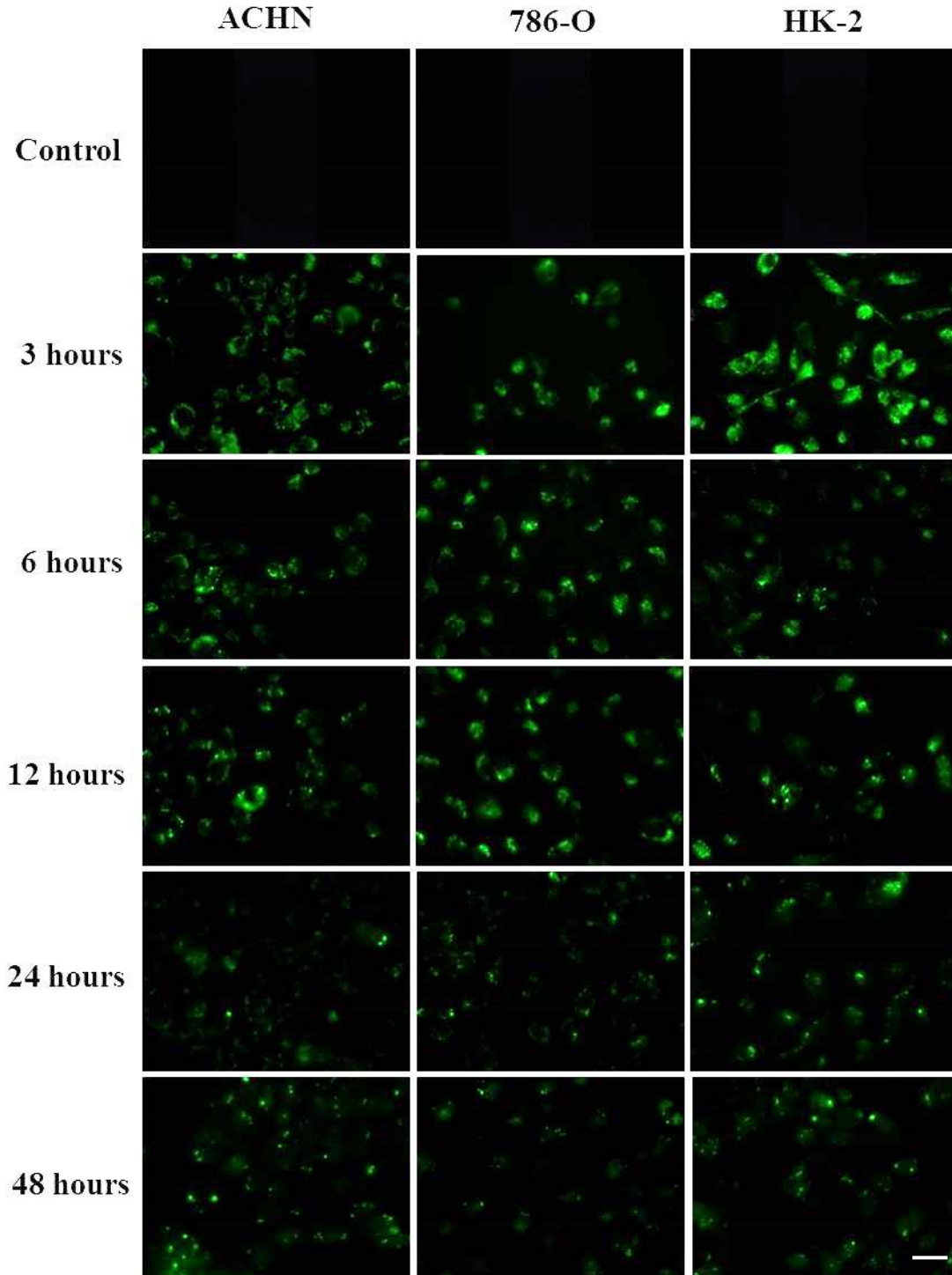


Figure 2: Fluorescence microscopy images of cellular uptake of BBR (20 μ M) after different periods of BBR incubation. The pictures were taken 3, 6, 12, 24 and 48 hours after BBR incubation. Scale bar: 20 μ m.

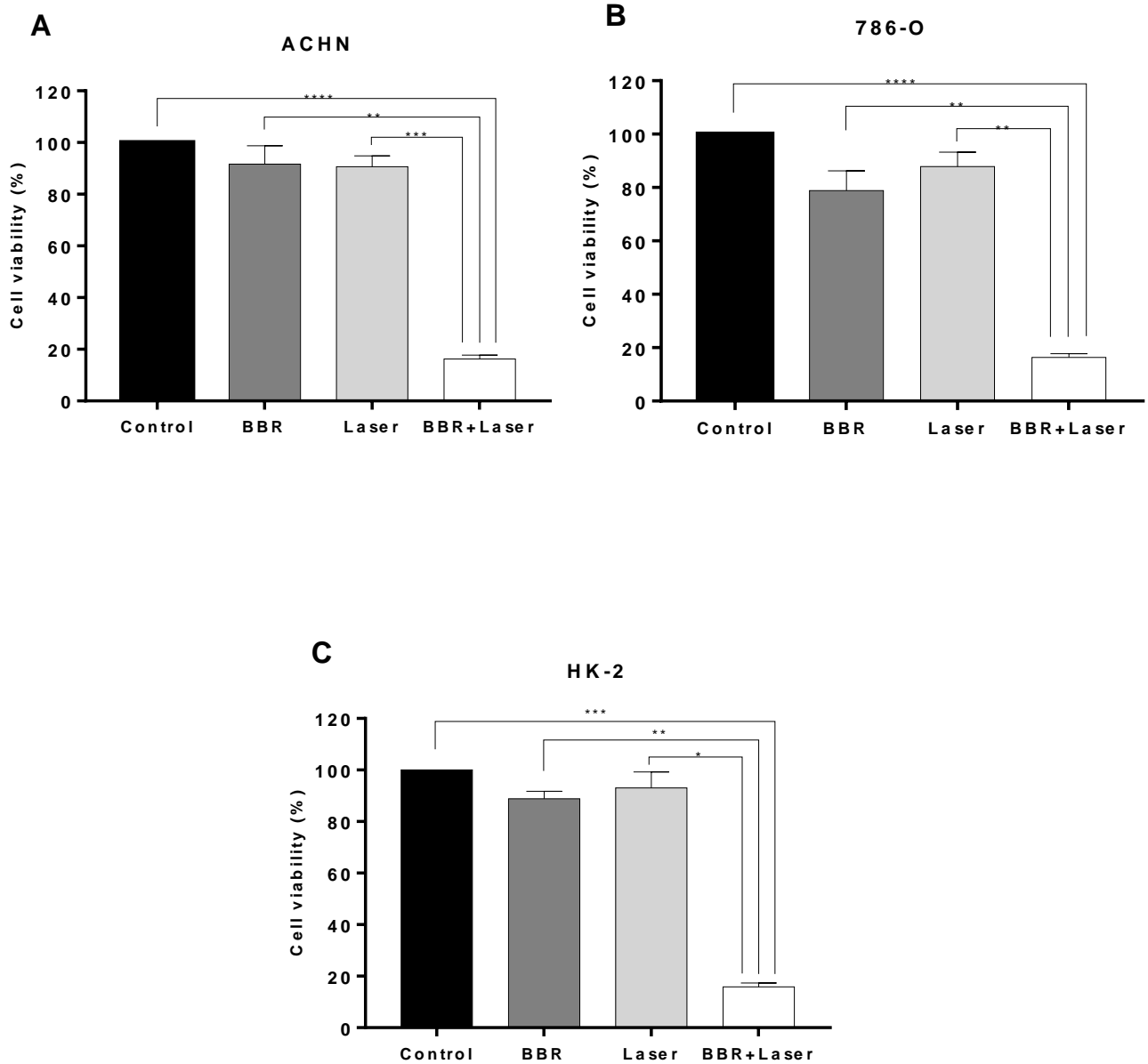


Figure 3: Phototoxicity assay in ACHN (A), 786-O (B) and HK-2 (C) cells. The cellular viability was evaluated 24 hours after laser irradiation. All assays were performed in triplicate, and data shown are mean \pm SD of three independent experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$. Control = without any treatment; BBR = berberine only; Laser = laser only; BBR+Laser = berberine associated PDT.

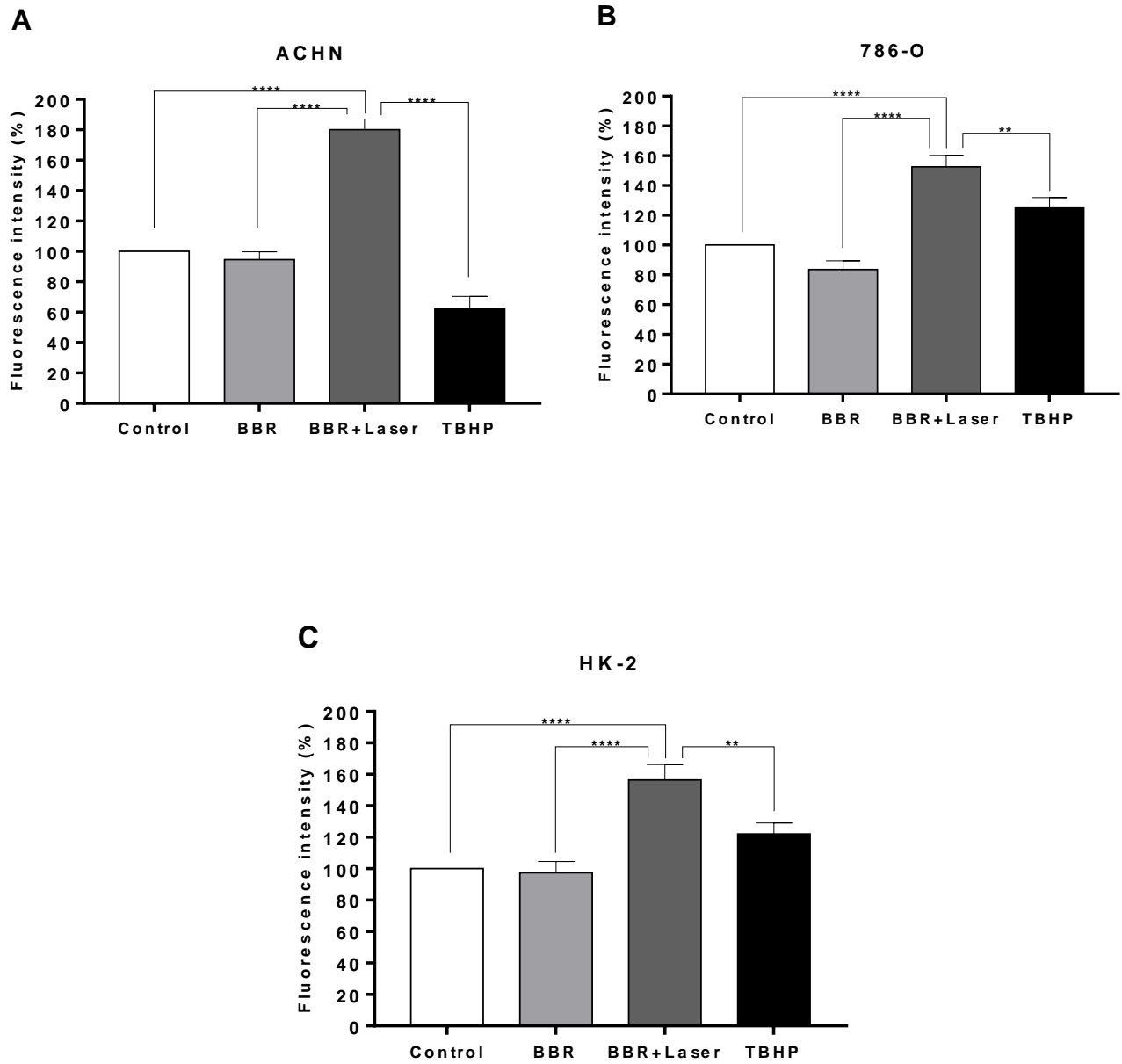


Figure 4: ROS generation in ACHN (A), 786-O (B) and HK-2 (C) cell lines. All assays were performed in triplicate, and data shown are mean \pm SD of three independent experiments. ** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$. Control = without any treatment; BBR = berberine only; BBR+Laser = berberine associated PDT; TBHP = hydrogen peroxide (positive control).

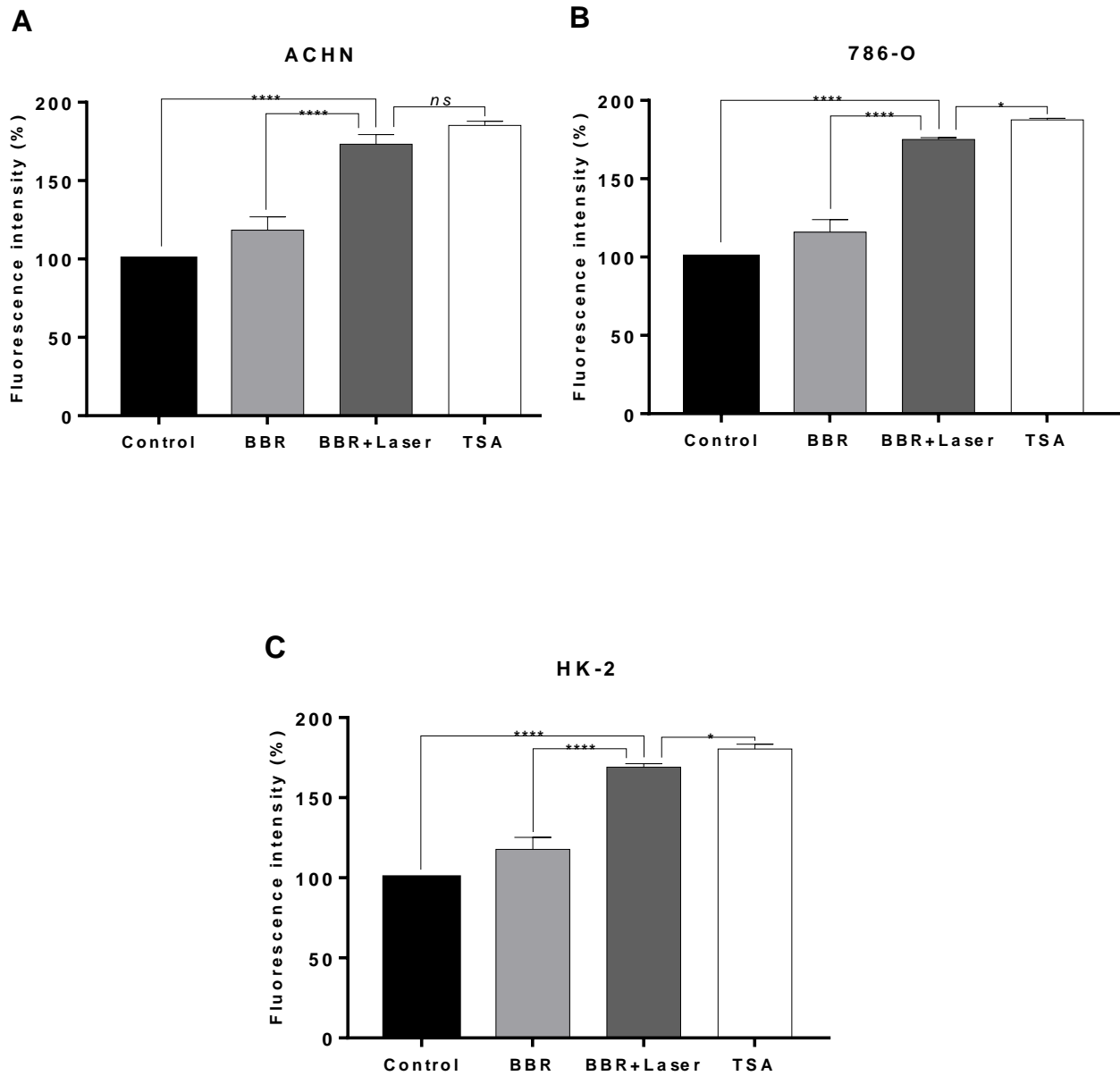


Figure 5: Autophagy in ACHN (A), 786-O (B) and HK-2 (C) cell lines. All assays were performed in triplicate, and data shown are mean \pm SD of three independent experiments. * $p < 0.05$; **** $p < 0.0001$, *ns*: no significant. Control = without any treatment; BBR = berberine only; BBR+Laser = berberine associated PDT; TSA= trichostatin A (positive control).

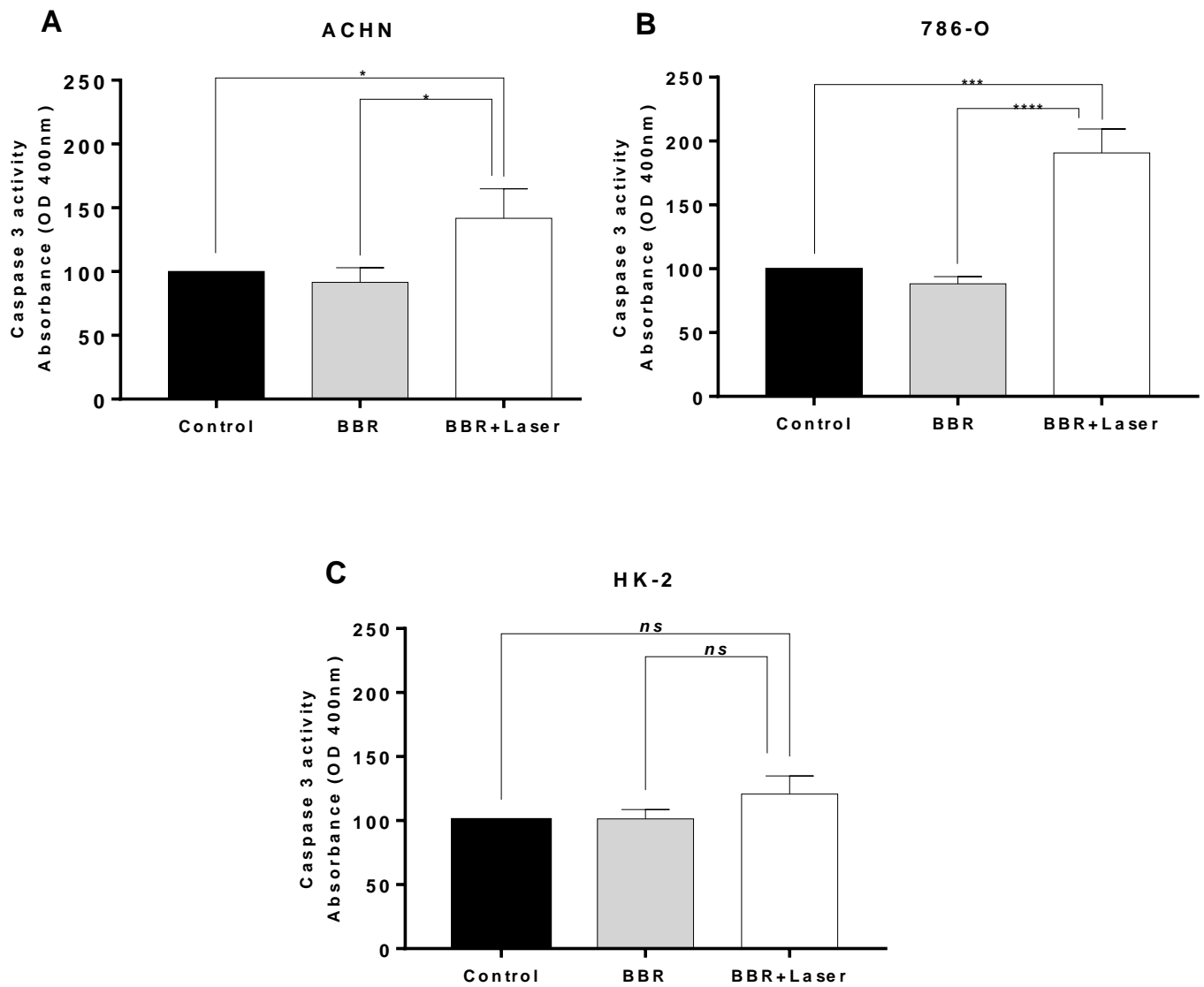


Figure 6: Caspase 3 activity in ACHN (A), 786-O (B) and HK-2 (C) cell lines. All assays were performed in triplicate, and data shown are mean \pm SD of three independent experiments. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$. ns: no significant. Control = without any treatment; BBR = berberine only; BBR+Laser = berberine associated with PDT.

Table I: Differential expression of target genes of anticancer drugs in 786-O cells after treatment with berberine associated PDT.

Gene symbol	Fold regulation	<i>p</i>-value
<i>FIGF</i>	-3.23	0.02
<i>TERT</i>	-2.46	0.05
<i>PLK3</i>	2.46	0.001

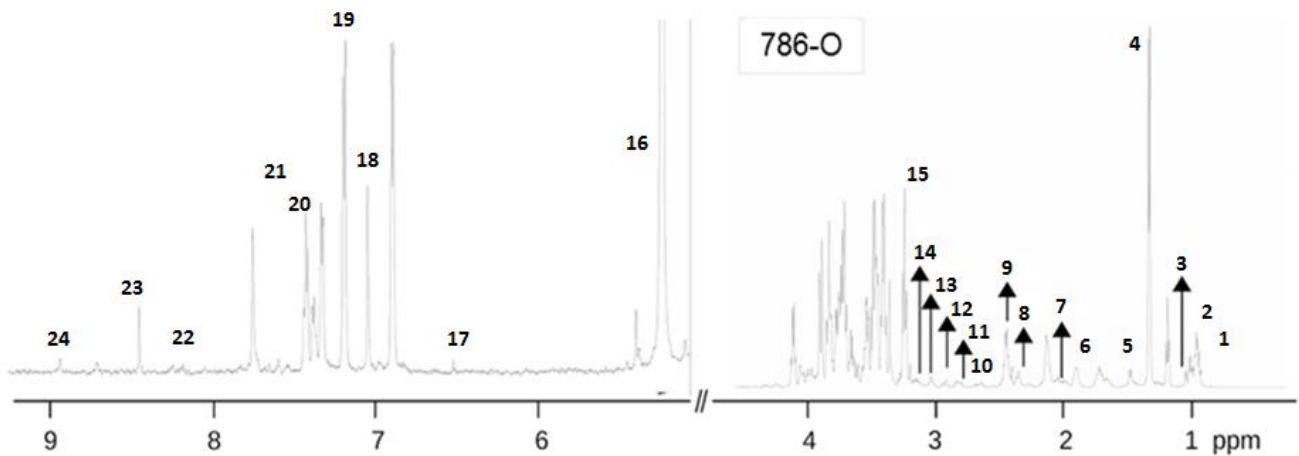


Figure 7: ¹H-NMR spectra from cell lines 786-O after treatment with berberine associated PDT. Assigned metabolites are: 1 - Isoleucine; 2 - Leucine; 3 - Valine; 4 - Lactate; 5 - Alanine; 6 - Arginine; 7 - Proline; 8 - Succinate; 9 - Glutamine; 10 - Aspartate; 11 - Sarcosine; 12 - Asparagine; 13 - Lysine ; 14 - Cystine; 15 - Carnitine; 16 - Glucose; 17 - Fumarate; 18 - Histidine; 16 - Tyrosine; 20 - Phenylalanine; 21 - Pyridoxine; 22 - Hypoxanthine; 23 - Formate; 24 - Niacinamide.

Table II. Differential metabolites in 786-O cells after treatment with berberine associated PDT compared with control.

Extracellular metabolites in 786-O cell line	30 minutes after treatment with berberine + laser <i>p</i>-value	3 hours after treatment with berberine + laser <i>p</i>-value	6 hours after treatment with berberine + laser <i>p</i>-value
Cystine	↑(0.0059)	↑(0.5794)	↑(0.3988)
Succinate	-(0.8306)	↑(0.0164)	↓(0.6538)
Sarcosine	↑(0.0079)	↑(0.0317)	↑(0.0481)
Formate	↑(0.1201)	-(0.8413)	↓(< 0.0001)
Pyridoxine	↑(0.4952)	↑(0.8896)	↑(0.9229)
Niacinamide	↑(0.0119)	↑(0.5476)	↓(0.9650)
Hypoxanthine	↑(0.0169)	↓(0.3971)	↑(0.0015)
Fumarate	↑(0.0967)	↑ (0.2698)	↑ (0.5526)
Asparagine	↑(0.1215)	↑(0.5476)	↑ (0.0490)
Aspartate	↑(0.1120)	↑(0.8472)	↑ (0.9001)
Phenylalanine	↑ (0.0375)	↑ (0.2273)	↑ (0.1346)
Glucose	↑(0.3095)	↑(0.0317)	↑ (0.0208)
Lysine	↑ (0.4206)	↑(0.0014)	↑ (0.9606)
Isoleucine	↑ (0.2222)	↑(0.0159)	↑ (0.1720)
Carnitine	↑ (0.1886)	↓(0.0307)	↑ (0.3435)
Tyrosine	↑ (0.0819)	↑(0.0317)	↑ (0.0295)
Leucine	↑ (0.1310)	↑(0.0952)	↑ (0.0182)
Arginine	↑ (0.2522)	↑(0.0159)	↑ (0.1802)
Lactate	↑ (0.2233)	↑ (0.1497)	↓ (0.0079)
Alanine	↑ (0.1656)	↑ (0.0588)	↓ (0.0705)
Proline	↑ (0.2190)	↑ (0.0952)	- (0.6015)

SUPPLEMENTARY MATERIALS

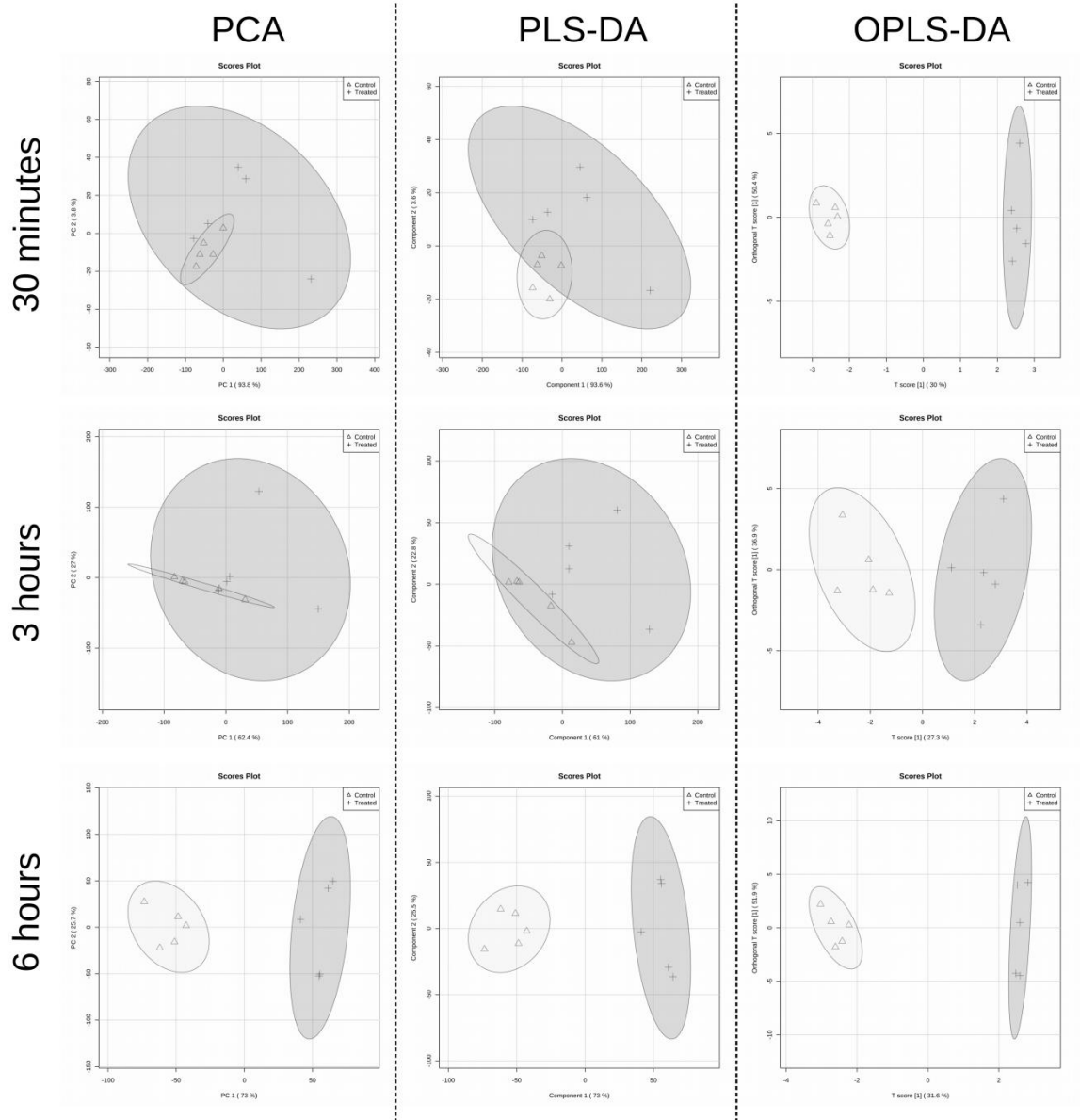


Figure S1: PCA, PLS-DA and OPLS-DA score plots for 786-O cell culture medium metabolites. PCA and PLS-DA show overlapped control and treated with BBR associated PDT groups for 30 minutes and 3 hours after treatment. After 6 hours, distinct groups are observed, indicating metabolic differences between them. OPLS-DA was able to distinguish control and treated groups in all time periods.

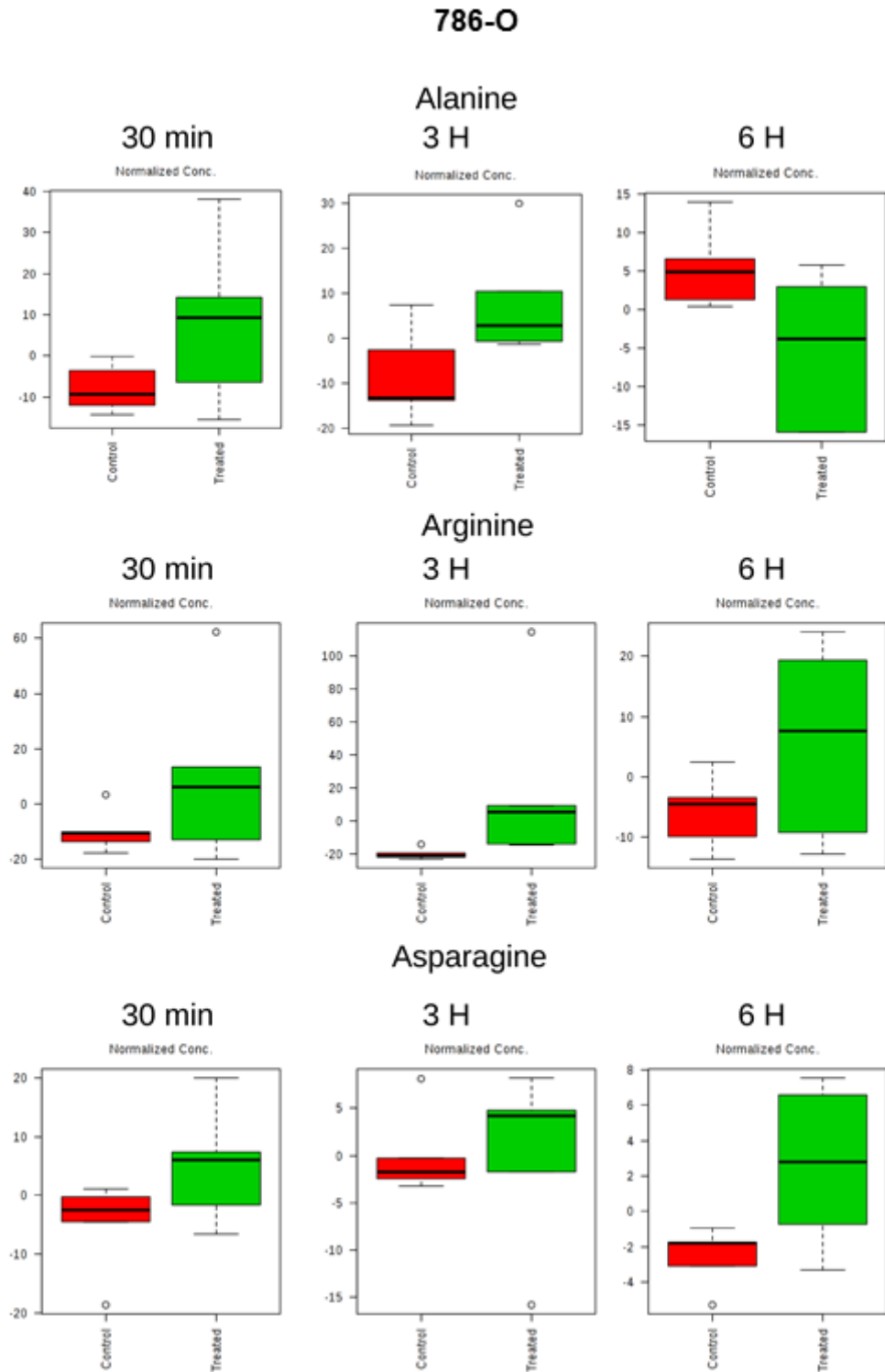


Figure S2: Alanine, arginine and asparagine levels from 786-O cell culture medium after 30 minutes, 3 hours and 6 hours.

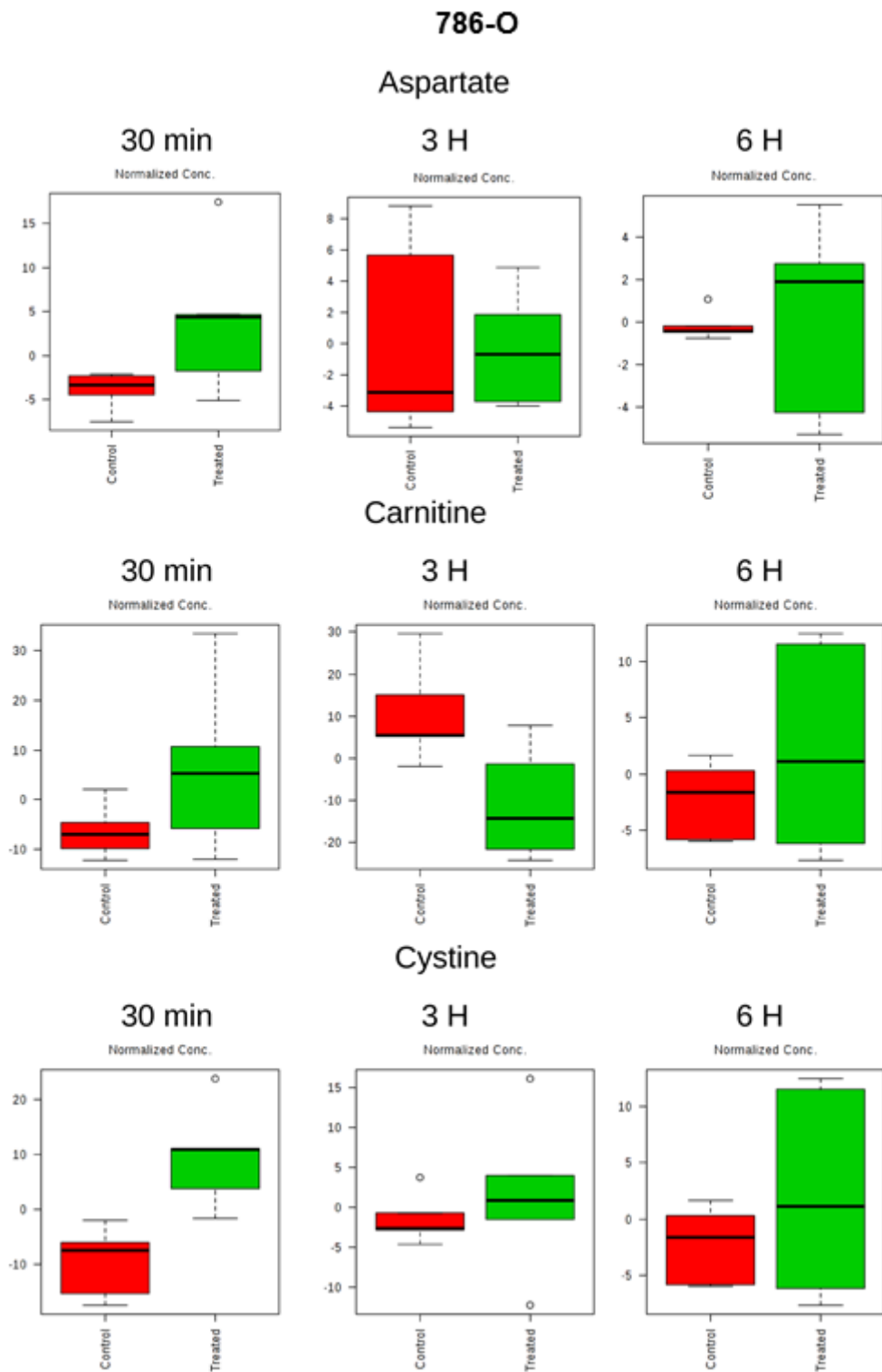


Figure S3: Aspartate, carnitine and cystine levels from 786-O cell culture medium after 30 minutes, 3 hours and 6 hours.

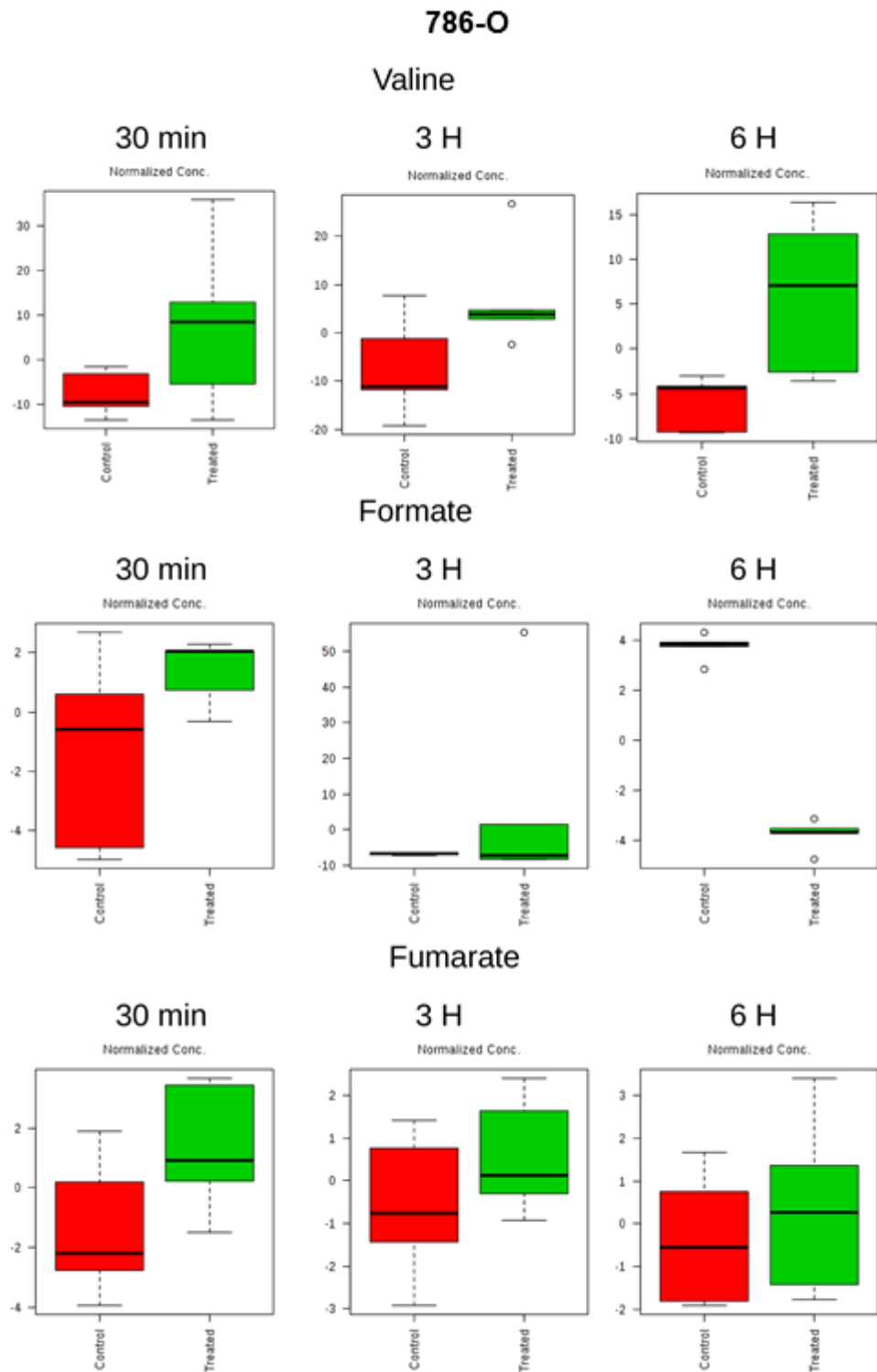


Figure S4: Valine, formate and fumarate levels from 786-O cell culture medium after 30 minutes, 3 hours and 6 hours.

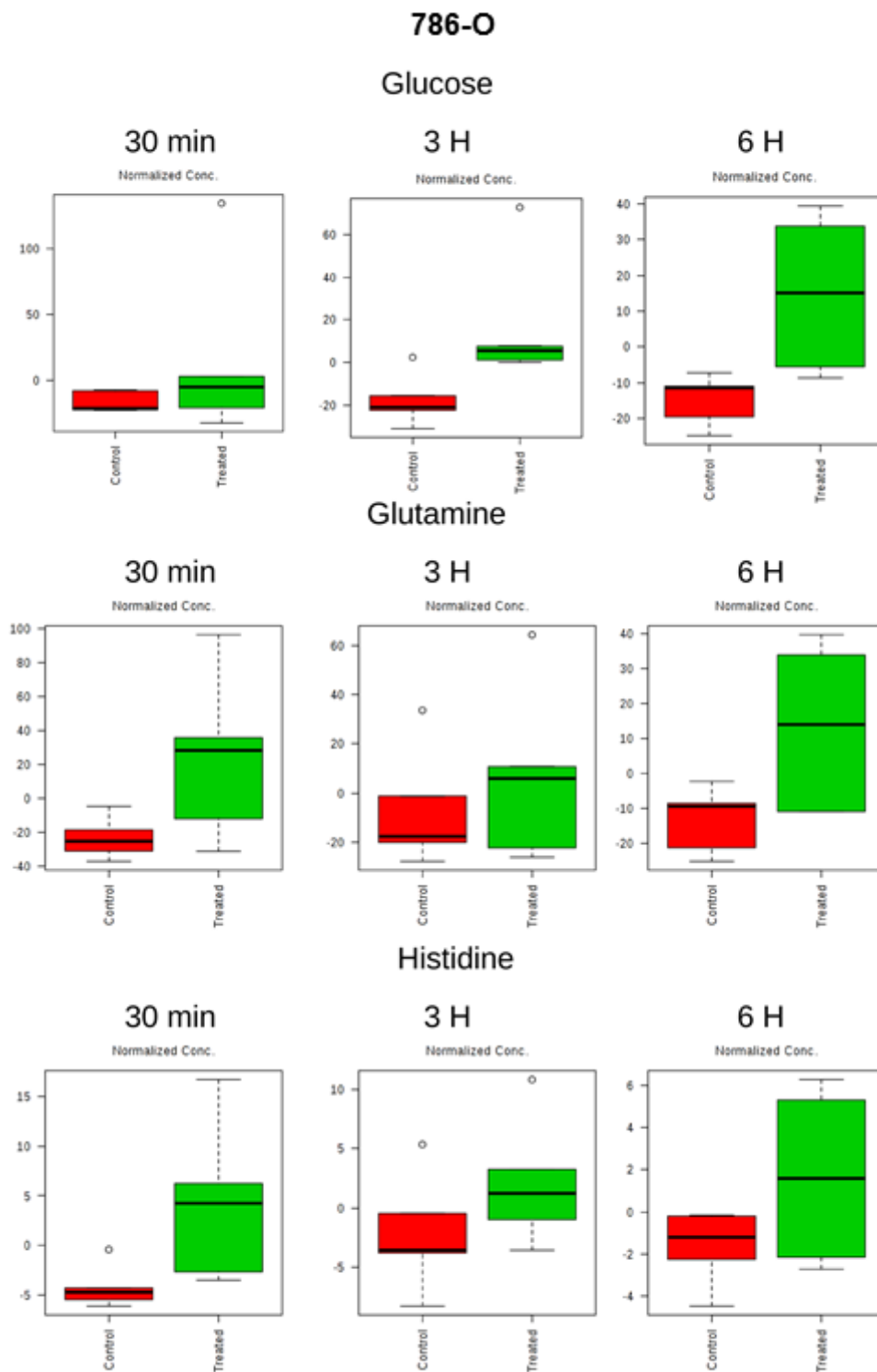


Figure S5: Glucose, glutamine and histidine levels from 786-O cell culture medium after 30 minutes, 3 hours and 6 hours.

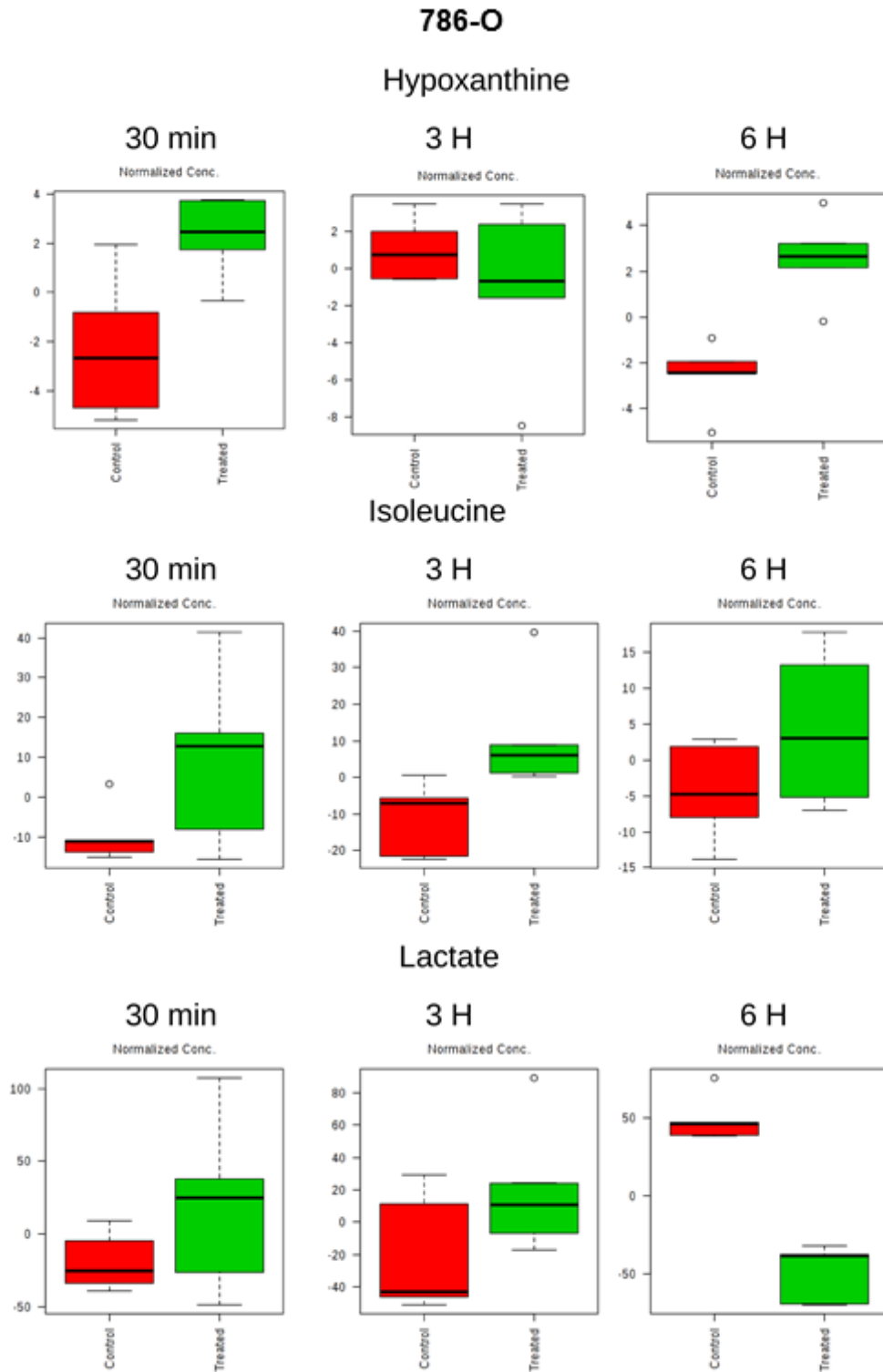


Figure S6: Hypoxanthine, isoleucine and lactate levels from 786-O cell culture medium after 30 minutes, 3 hours and 6 hours.

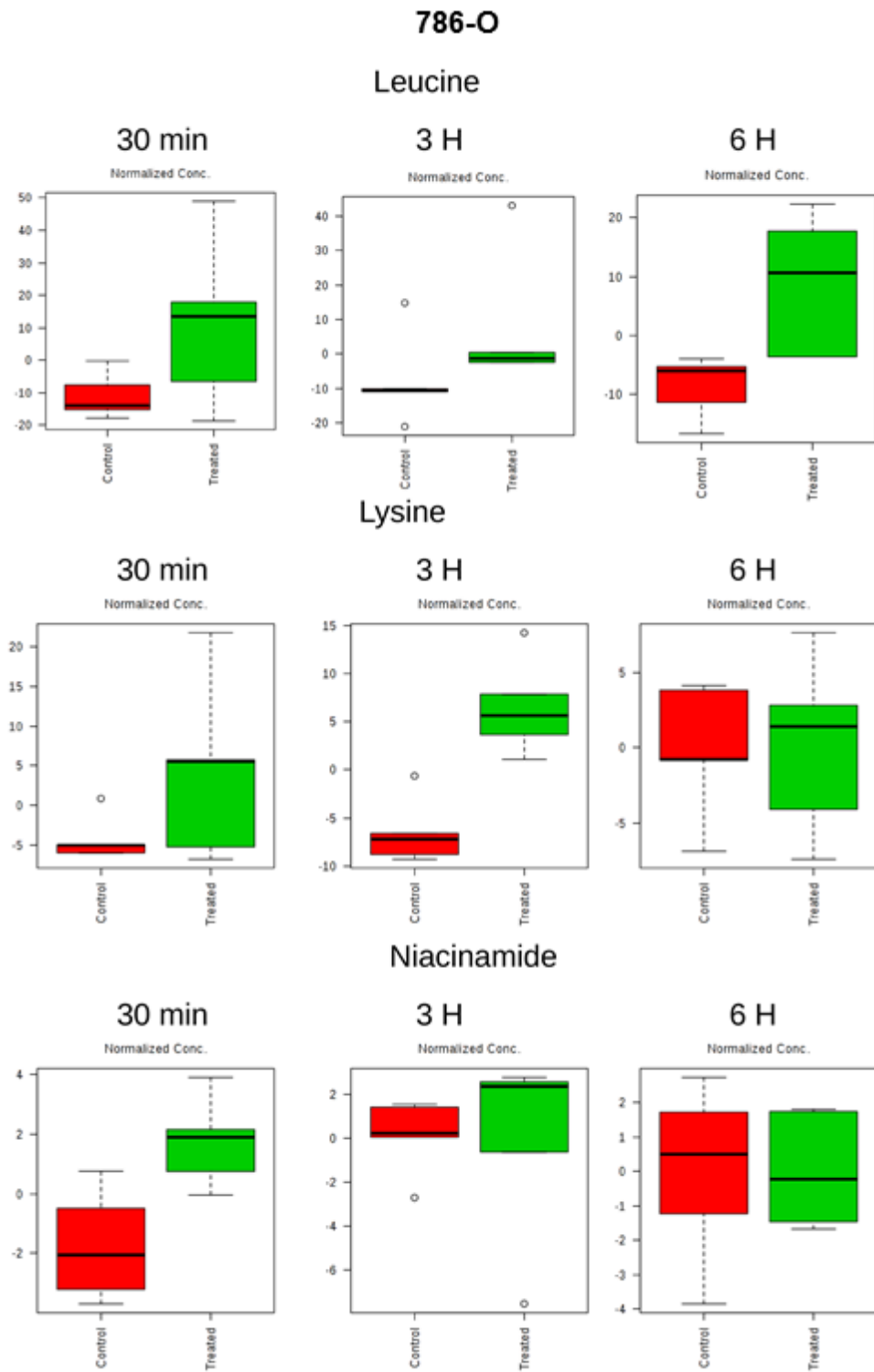


Figure S7: Leucine, lysine and niacinamide levels from 786-O cell culture medium after 30 minutes, 3 hours and 6 hours.

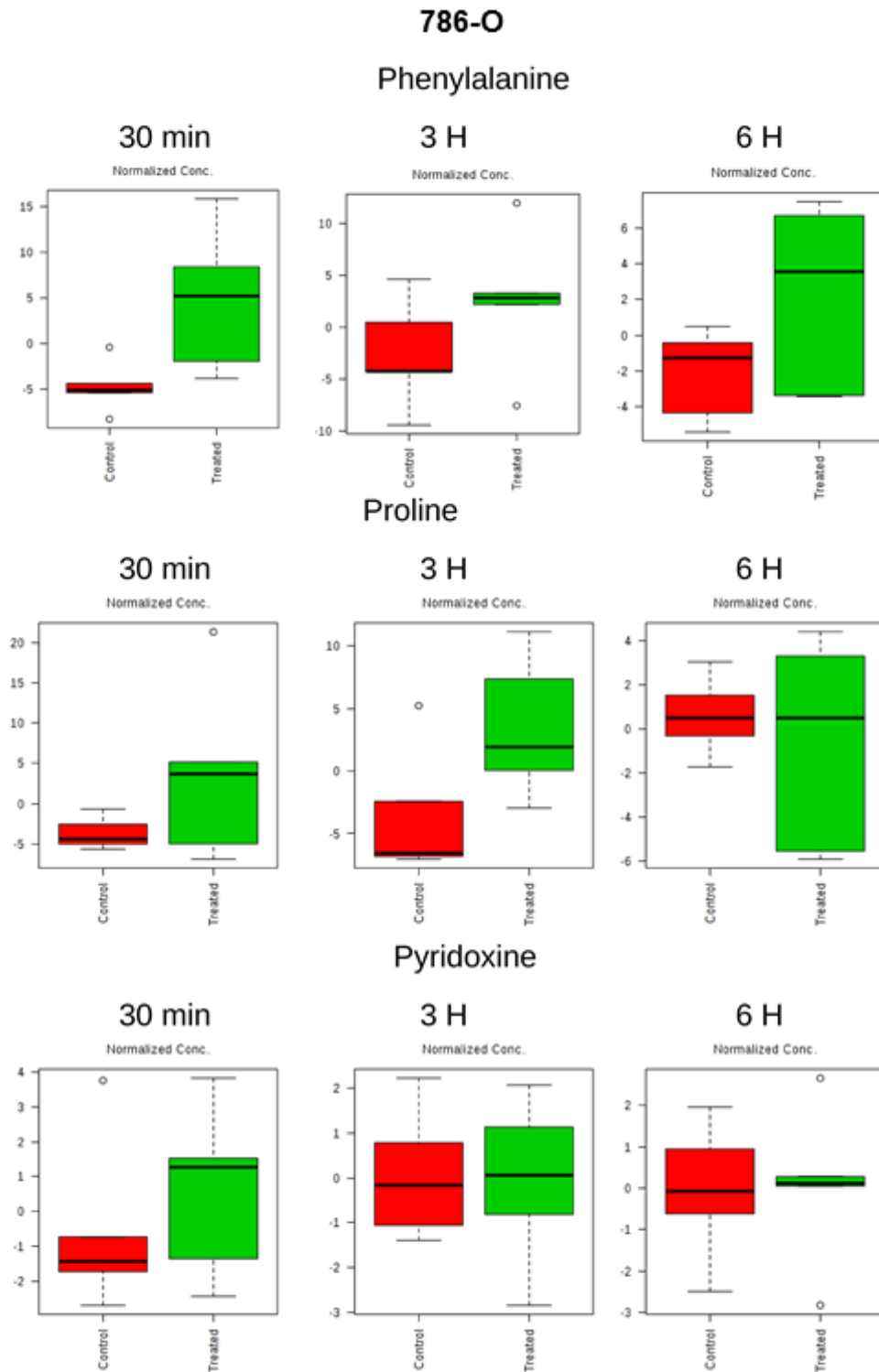


Figure S8: Phenylalanine, proline and pyridoxine levels from 786-O cell culture medium after 30 minutes, 3 hours and 6 hours.

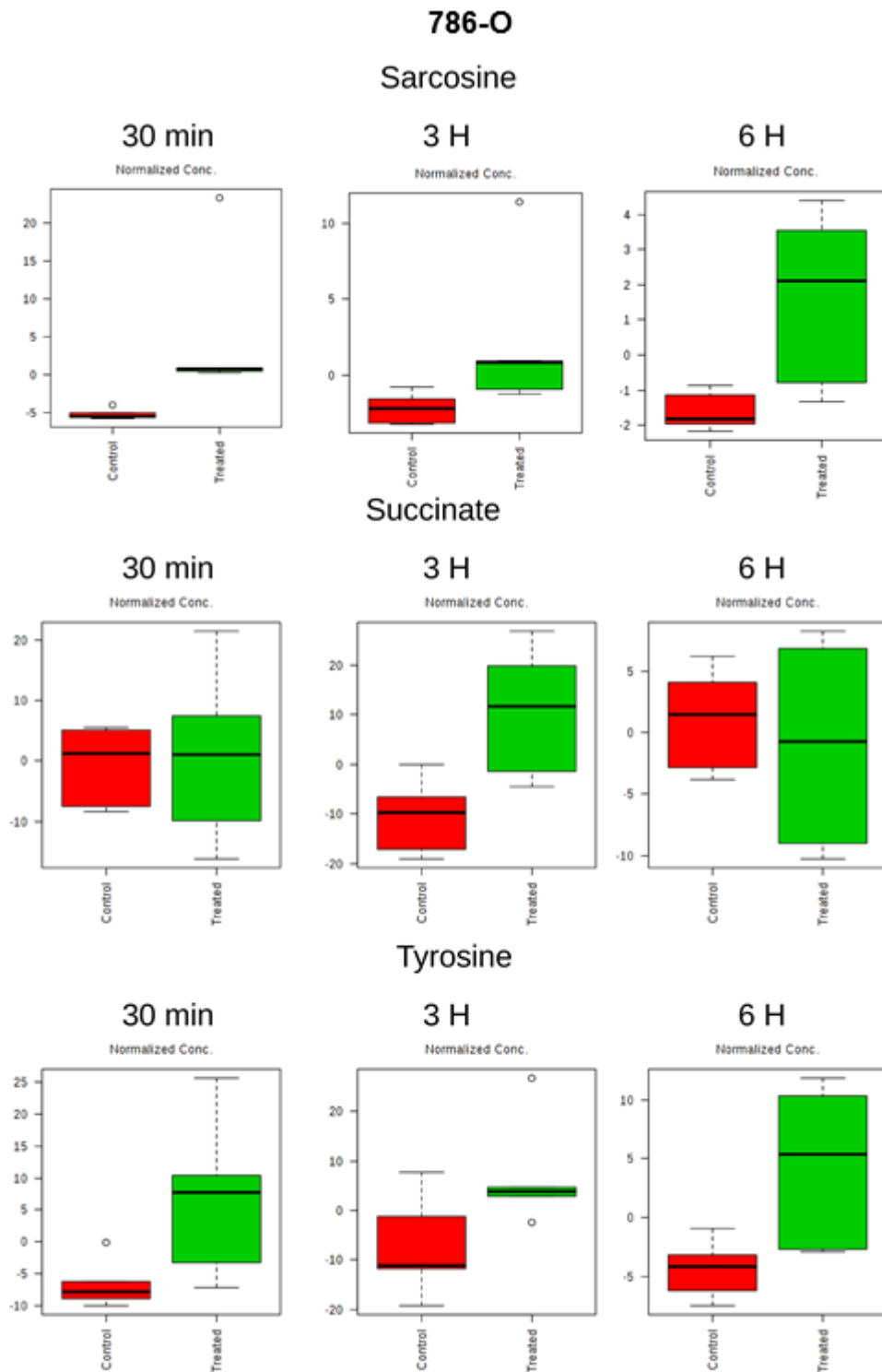


Figure S9: Sarcosine, succinate and tyrosine levels from 786-O cell culture medium after 30 minutes, 3 hours and 6 hours.

CONCLUSÕES

O presente trabalho permitiu as seguintes conclusões:

1. A berberina apresentou citotoxicidade dose e tempo dependente;
2. Foi observada eficiente internalização para todas as linhagens estudadas;
3. O efeito anticâncer da berberina foi potencializado quando associado à terapia fotodinâmica, diminuindo consideravelmente a viabilidade celular;
4. A geração de espécies reativas de oxigênio pela berberina associada à terapia fotodinâmica induziu morte celular por autofagia e apoptose;
5. O tratamento proposto foi capaz de diminuir a expressão do gene *FIGF* que está relacionado aos processos de angiogênese, assim como o gene *TERT* responsável pela regulação da atividade da telomerase;
6. O gene *PLK3*, considerado um supressor tumoral, teve sua expressão aumentada após o tratamento com berberina associada à terapia fotodinâmica.
7. O tratamento proposto foi capaz de alterar metabólitos que estão relacionados à proliferação e migração celular, além de processos angiogênicos.

Diante do exposto, podemos inferir o potencial promissor da berberina como agente fotossensibilizante em um sistema de terapia fotodinâmica, pois gerou uma resposta antitumoral no carcinoma de células renais.

REFERÊNCIAS

ABD EL-WAHAB, A. E. et al. In vitro biological assessment of *Berberis vulgaris* and its active constituent, berberine: antioxidants, anti-acetylcholinesterase, anti-diabetic and anticancer effects. **BMC Complement Altern Med**, v. 13, p. 218, Sep 5 2013. ISSN 1472-6882 (Electronic)1472-6882 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24007270>>.

ACS. American Cancer Society. Disponível em www.cancer.org. Acesso em: 11 mar. 2019.

AGOSTINIS, P. et al. Photodynamic therapy of cancer: an update. **CA Cancer J Clin**, v. 61, n. 4, p. 250-281, Jul-Aug 2011. ISSN 1542-4863 (Electronic)0007-9235 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21617154>>.

ALANEE, S. et al. Trichloroethylene Is Associated with Kidney Cancer Mortality: A Population-based Analysis. **Anticancer Res**, v. 35, n. 7, p. 4009-4013, Jul 2015. ISSN 1791-7530 (Electronic)0250-7005 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26124349>>.

ALBERTS, B. *et al.* Biologia molecular da célula, 6. ed. Ed. Artmed, Porto Alegre, 2017.

ARAVIND, S. R.; KRISHNAN, L. K. Curcumin-albumin conjugates as an effective anti-cancer agent with immunomodulatory properties. **Int Immunopharmacol**, v. 34, p. 78-85, May 2016. ISSN 1878-1705 (Electronic)1567-5769 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26927614>>.

BALAKRISHNA, A.; KUMAR, M. H. Evaluation of Synergetic Anticancer Activity of Berberine and Curcumin on Different Models of A549, Hep-G2, MCF-7, Jurkat, and K562 Cell Lines. **Biomed Res Int**, v. 2015, p. 354614, 2015. ISSN 2314-6141 (Electronic). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26247019>>.

BARZEGAR, E. et al. Effects of berberine on proliferation, cell cycle distribution and apoptosis of human breast cancer T47D and MCF7 cell lines. **Iran J Basic Med Sci**, v. 18, n. 4, p. 334-342, Apr 2015. ISSN 2008-3866 (Print)2008-3866 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26019795>>.

BELENKOV, Y. N. et al. [Vascular Complications Of Cancer Chemotherapy]. **Kardiologiya**, v. 58, n. Suppl 9, p. 4-9, Sep 2018. ISSN 0022-9040 (Print)0022-9040 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30312566>>.

BENNETT, R. L.; LICHT, J. D. Targeting Epigenetics in Cancer. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 58, p. 187-207, Jan 6 2018. ISSN 1545-4304 (Electronic)0362-1642 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28992434>>.

BHATTACHARYYA, R. et al. Differential modes of photosensitisation in cancer cells by berberine and coralyne. **Free Radic Res**, v. 51, n. 7-8, p. 723-738, Jul-Aug 2017. ISSN 1029-2470 (Electronic)1029-2470 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28870132>>.

BHAUMIK, I. et al. Natural product inspired allicin analogs as novel anti-cancer agents. **Bioorg Chem**, v. 86, p. 259-272, Jan 29 2019. ISSN 1090-2120 (Electronic)0045-2068 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30731359>>.

CALIXTO, G. M. et al. Nanotechnology-Based Drug Delivery Systems for Photodynamic Therapy of Cancer: A Review. **Molecules**, v. 21, n. 3, p. 342, Mar 11 2016. ISSN 1420-3049 (Electronic)1420-3049 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26978341>>.

CANCER GENOME ATLAS RESEARCH, N. et al. Comprehensive Molecular Characterization of Papillary Renal-Cell Carcinoma. **N Engl J Med**, v. 374, n. 2, p. 135-145, Jan 14 2016. ISSN 1533-4406 (Electronic)0028-4793 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26536169>>.

CASTILHO-FERNANDES, A. et al. Photodynamic process induced by chloro-aluminum phthalocyanine nanoemulsion in glioblastoma. **Photodiagnosis Photodyn Ther**, v. 19, p. 221-228, Sep 2017. ISSN 1873-1597 (Electronic)1572-1000 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28599959>>.

CHENG, G.; XIE, L. Alcohol intake and risk of renal cell carcinoma: a meta-analysis of published case-control studies. **Arch Med Sci**, v. 7, n. 4, p. 648-657, Aug 2011. ISSN 1896-9151 (Electronic)1734-1922 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22291801>>.

CHIGNELL, C. F. et al. Photochemistry and photocytotoxicity of alkaloids from Goldenseal (*Hydrastis canadensis* L.) 3: effect on human lens and retinal pigment epithelial cells. **Photochem Photobiol**, v. 83, n. 4, p. 938-943, Jul-Aug 2007. ISSN 0031-8655 (Print)0031-8655 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17645667>>.

CHONG, J. et al. MetaboAnalyst 4.0: towards more transparent and integrative metabolomics analysis. **Nucleic Acids Res**, v. 46, n. W1, p. W486-W494, Jul 2 2018. ISSN 1362-4962 (Electronic)0305-1048 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29762782>>.

CHOW, W. H.; DEVESA, S. S. Contemporary epidemiology of renal cell cancer. **Cancer J**, v. 14, n. 5, p. 288-301, Sep-Oct 2008. ISSN 1528-9117 (Print)1528-9117 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18836333>>.

CHOW, W. H.; DONG, L. M.; DEVESA, S. S. Epidemiology and risk factors for kidney cancer. **Nat Rev Urol**, v. 7, n. 5, p. 245-257, May 2010. ISSN 1759-4820 (Electronic)1759-4812 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20448658>>.

COLT, J. S. et al. Hypertension and risk of renal cell carcinoma among white and black Americans. **Epidemiology**, v. 22, n. 6, p. 797-804, Nov 2011. ISSN 1531-5487 (Electronic)1044-3983 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21881515>>.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochim Biophys Acta**, v. 1830, n. 6, p. 3670-3695, Jun 2013. ISSN 0006-3002 (Print)0006-3002 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23428572>>.

CUENCA, R. E. et al. Breast cancer with chest wall progression: treatment with photodynamic therapy. **Ann Surg Oncol**, v. 11, n. 3, p. 322-327, Mar 2004. ISSN 1068-9265 (Print)1068-9265 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14993029>>.

DAGHER, J. et al. Clear cell renal cell carcinoma: a comparative study of histological and chromosomal characteristics between primary tumors and their corresponding metastases. **Virchows Arch**, v. 471, n. 1, p. 107-115, Jul 2017. ISSN 1432-2307 (Electronic)0945-6317 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28488172>>.

DAI, T. et al. Concepts and principles of photodynamic therapy as an alternative antifungal discovery platform. **Front Microbiol**, v. 3, p. 120, 2012. ISSN 1664-302X (Electronic)1664-302X (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22514547>>.

DAI, W. et al. Berberine Promotes Apoptosis of Colorectal Cancer via Regulation of the Long Non-Coding RNA (lncRNA) Cancer Susceptibility Candidate 2 (CASC2)/AU-Binding Factor 1 (AUF1)/B-Cell CLL/Lymphoma 2 (Bcl-2) Axis. **Med Sci Monit**, v. 25, p. 730-738, Jan 25 2019. ISSN 1643-3750 (Electronic)1234-1010 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30681073>>.

DANIELL, M. D.; HILL, J. S. A history of photodynamic therapy. **Aust N Z J Surg**, v. 61, n. 5, p. 340-348, May 1991. ISSN 0004-8682 (Print)0004-8682 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2025186>>.

DOUGHERTY, T. J. Photodynamic therapy--new approaches. **Semin Surg Oncol**, v. 5, n. 1, p. 6-16, 1989. ISSN 8756-0437 (Print)1098-2388 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2652248>>.

DOUGHERTY, T. J. et al. Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors. **Cancer Res**, v. 38, n. 8, p. 2628-2635, Aug 1978. ISSN 0008-5472 (Print)0008-5472 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/667856>>.

DRUCKER, B. J. Renal cell carcinoma: current status and future prospects. **Cancer Treat Rev**, v. 31, n. 7, p. 536-545, Nov 2005. ISSN 0305-7372 (Print)0305-7372 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16236454>>.

DUNNICK, N. R. Renal cell carcinoma: staging and surveillance. **Abdom Radiol (NY)**, v. 41, n. 6, p. 1079-1085, Jun 2016. ISSN 2366-0058 (Electronic). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26971340>>.

DUTTA, S. et al. Natural products: An upcoming therapeutic approach to cancer. **Food Chem Toxicol**, Apr 13 2019. ISSN 1873-6351 (Electronic)0278-6915 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30991130>>.

EDGE, S. B.; COMPTON, C. C. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. **Ann Surg Oncol**, v. 17, n. 6, p. 1471-1474, Jun 2010. ISSN 1534-4681 (Electronic)1068-9265 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20180029>>.

ESCUDIER, B. et al. Renal cell carcinoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. **Ann Oncol**, Feb 21 2019. ISSN 1569-8041 (Electronic)0923-7534 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30788497>>.

FAJKOVIC, H. et al. Impact of smoking status on survival after cytoreductive nephrectomy for metastatic renal cell carcinoma. **World J Urol**, v. 34, n. 10, p. 1411-1419, Oct 2016. ISSN 1433-8726 (Electronic)0724-4983 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26879416>>.

FENG, Z. et al. CT texture analysis: a potential tool for predicting the Fuhrman grade of clear-cell renal carcinoma. **Cancer Imaging**, v. 19, n. 1, p. 6, Feb 6 2019. ISSN 1470-7330 (Electronic)1470-7330 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30728073>>.

FERLAY, J. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **Int J Cancer**, v. 136, n. 5, p. E359-386, Mar 1 2015. ISSN 1097-0215 (Electronic)0020-7136 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25220842>>.

GALI-MUHTASIB, H. et al. Cell death mechanisms of plant-derived anticancer drugs: beyond apoptosis. **Apoptosis**, v. 20, n. 12, p. 1531-1562, Dec 2015. ISSN 1573-675X (Electronic)1360-8185 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26362468>>.

HIRAKAWA, K.; HIRANO, T. The microenvironment of DNA switches the activity of singlet oxygen generation photosensitized by berberine and palmatine. **Photochem Photobiol**, v. 84, n. 1, p. 202-208, Jan-Feb 2008. ISSN 0031-8655 (Print)0031-8655 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18173721>>.

HSIEH, J. J. et al. Renal cell carcinoma. **Nat Rev Dis Primers**, v. 3, p. 17009, Mar 9 2017. ISSN 2056-676X (Electronic)2056-676X (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28276433>>.

HUANG, Z. H. et al. Berberine targets epidermal growth factor receptor signaling to suppress prostate cancer proliferation in vitro. **Mol Med Rep**, v. 11, n. 3, p. 2125-2128, Mar 2015. ISSN 1791-3004 (Electronic)1791-2997 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25394789>>.

HUTSON, T. E. Renal cell carcinoma: diagnosis and treatment, 1994-2003. **Proc (Bayl Univ Med Cent)**, v. 18, n. 4, p. 337-340, Oct 2005. ISSN 0899-8280 (Print)0899-8280 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16252025>>.

Instituto Nacional do Câncer (INCA). Ministério da saúde. Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil/ Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva. Rio de Janeiro, INCA, 2017.

JONASCH, E. et al. State of the science: an update on renal cell carcinoma. **Mol Cancer Res**, v. 10, n. 7, p. 859-880, Jul 2012. ISSN 1557-3125 (Electronic)1541-7786 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22638109>>.

KABARIA, R.; KLAASSEN, Z.; TERRIS, M. K. Renal cell carcinoma: links and risks. **Int J Nephrol Renovasc Dis**, v. 9, p. 45-52, 2016. ISSN 1178-7058 (Print)1178-7058 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27022296>>.

KARAMI, S.; DAUGHERTY, S. E.; PURDUE, M. P. A prospective study of alcohol consumption and renal cell carcinoma risk. **Int J Cancer**, v. 137, n. 1, p. 238-242, Jul 1 2015. ISSN 1097-0215 (Electronic)0020-7136 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25431248>>.

KATO, H. [History of photodynamic therapy--past, present and future]. **Gan To Kagaku Ryoho**, v. 23, n. 1, p. 8-15, Jan 1996. ISSN 0385-0684 (Print)0385-0684 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8546474>>.

KESSEL, D. Death pathways associated with photodynamic therapy. **Med Laser Appl**, v. 21, n. 4, p. 219-224, Nov 15 2006. ISSN 1615-1615 (Print)1615-1615 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19890442>>.

KESSEL, D.; OLEINICK, N. L. Cell Death Pathways Associated with Photodynamic Therapy: An Update. **Photochem Photobiol**, v. 94, n. 2, p. 213-218, Mar 2018. ISSN 1751-1097 (Electronic)0031-8655 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29143339>>.

KIM, B. J. et al. Prognostic and predictive value of VHL gene alteration in renal cell carcinoma: a meta-analysis and review. **Oncotarget**, v. 8, n. 8, p. 13979-13985, Feb 21 2017. ISSN 1949-2553 (Electronic)1949-2553 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28103578>>.

KIM, I. et al. The Relationship between the Occupational Exposure of Trichloroethylene and Kidney Cancer. **Ann Occup Environ Med**, v. 26, p. 12, 2014. ISSN 2052-4374 (Print)2052-4374 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24955246>>.

KROEZE, S. G. et al. Photodynamic therapy as novel nephron sparing treatment option for small renal masses. **J Urol**, v. 187, n. 1, p. 289-295, Jan 2012. ISSN 1527-3792 (Electronic) 0022-5347 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22099991>>.

LEW, J. Q. et al. Alcohol consumption and risk of renal cell cancer: the NIH-AARP diet and health study. **Br J Cancer**, v. 104, n. 3, p. 537-541, Feb 1 2011. ISSN 1532-1827 (Electronic) 0007-0920 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21245859>>.

LI, D. X. et al. Inhibitory effect of berberine on human skin squamous cell carcinoma A431 cells. **Genet Mol Res**, v. 14, n. 3, p. 10553-10568, Sep 8 2015. ISSN 1676-5680 (Electronic) 1676-5680 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26400287>>.

LI, Z. et al. Genetic mutations associated with metastatic clear cell renal cell carcinoma. **Oncotarget**, v. 7, n. 13, p. 16172-16179, Mar 29 2016. ISSN 1949-2553 (Electronic)1949-2553 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26908440>>.

LJUNGBERG, B. et al. EAU guidelines on renal cell carcinoma: 2014 update. **Eur Urol**, v. 67, n. 5, p. 913-924, May 2015. ISSN 1873-7560 (Electronic)0302-2838 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25616710>>.

LODISH, H. *et al.* Molecular Cell Biology, 4, ed. Ed. W. H. Freeman, Nova Iorque, 2000.

LOPEZ-BELTRAN, A. *et al.* 2009 update on the classification of renal epithelial tumors in adults. **Int J Urol**, v. 16, n. 5, p. 432-443, May 2009. ISSN 1442-2042 (Electronic)0919-8172 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19453547>>.

LUCKY, S. S.; SOO, K. C.; ZHANG, Y. Nanoparticles in photodynamic therapy. **Chem Rev**, v. 115, n. 4, p. 1990-2042, Feb 25 2015. ISSN 1520-6890 (Electronic)0009-2665 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25602130>>.

LUIZA ANDREAZZA, N. *et al.* Berberine as a photosensitizing agent for antitumoral photodynamic therapy: Insights into its association to low density lipoproteins. **Int J Pharm**, v. 510, n. 1, p. 240-249, Aug 20 2016. ISSN 1873-3476 (Electronic)0378-5173 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27282536>>.

LUO, D. *et al.* Chemoprevention: An Emerging Treatment Option for Solid Tumors. **Adv Sci (Weinh)**, v. 4, n. 1, p. 1600106, Jan 2017. ISSN 2198-3844 (Print)2198-3844 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28105389>>.

MAKHOV, P. *et al.* Resistance to Systemic Therapies in Clear Cell Renal Cell Carcinoma: Mechanisms and Management Strategies. **Mol Cancer Ther**, v. 17, n. 7, p. 1355-1364, Jul 2018. ISSN 1538-8514 (Electronic)1535-7163 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29967214>>.

MCGUIRE, B. B.; FITZPATRICK, J. M. BMI and the risk of renal cell carcinoma. **Curr Opin Urol**, v. 21, n. 5, p. 356-361, Sep 2011. ISSN 1473-6586 (Electronic)0963-0643 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21730854>>.

MONDAL, S. *et al.* Natural products: promising resources for cancer drug discovery. **Anticancer Agents Med Chem**, v. 12, n. 1, p. 49-75, Jan 2012. ISSN 1875-5992 (Electronic)1871-5206 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21707502>>.

MUGLIA, V. F.; PRANDO, A. Renal cell carcinoma: histological classification and correlation with imaging findings. **Radiol Bras**, v. 48, n. 3, p. 166-174, May-Jun 2015. ISSN 0100-3984 (Print)0100-3984 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26185343>>.

MULLER, P. J.; WILSON, B. C. Photodynamic therapy of brain tumors--a work in progress. **Lasers Surg Med**, v. 38, n. 5, p. 384-389, Jun 2006. ISSN 0196-8092 (Print)0196-8092 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16788926>>.

NAIDOO, C.; KRUGER, C. A.; ABRAHAMSE, H. Photodynamic Therapy for Metastatic Melanoma Treatment: A Review. **Technol Cancer Res Treat**, v. 17, p. 1533033818791795, Jan 1 2018. ISSN 1533-0338 (Electronic)1533-0338 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30099929>>.

NG, C. S. *et al.* Renal cell carcinoma: diagnosis, staging, and surveillance. **AJR Am J Roentgenol**, v. 191, n. 4, p. 1220-1232, Oct 2008. ISSN 1546-3141 (Electronic)0361-803X (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18806169>>.

NUNES, S. M.; SGUILLA, F. S.; TEDESCO, A. C. Photophysical studies of zinc phthalocyanine and chloroaluminum phthalocyanine incorporated into liposomes in the presence of additives. **Braz J Med Biol Res**, v. 37, n. 2, p. 273-284, Feb 2004. ISSN 0100-879X (Print)0100-879X (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14762584>>.

ONCOGUIA. Instituto Oncoguia. Estatística para câncer de rim. Disponível em <http://www.oncoguia.org.br/conteudo/estatistica-para-cancer-de-rim/6844/239/>. Acesso em 09 jan. 2019.

ORTIZ, L. M. et al. Berberine, an epiphany against cancer. **Molecules**, v. 19, n. 8, p. 12349-12367, Aug 15 2014. ISSN 1420-3049 (Electronic)1420-3049 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25153862>>.

PARK, G. B. et al. Berberine induces mitochondrial apoptosis of EBV-transformed B cells through p53-mediated regulation of XAF1 and GADD45alpha. **Int J Oncol**, v. 49, n. 1, p. 411-421, Jul 2016. ISSN 1791-2423 (Electronic)1019-6439 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27121748>>.

PARK, S. H. et al. Berberine induces apoptosis via ROS generation in PANC-1 and MIA-PaCa2 pancreatic cell lines. **Braz J Med Biol Res**, v. 48, n. 2, p. 111-119, Feb 2015. ISSN 1414-431X (Electronic)0100-879X (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25517919>>.

PARK, Y. K.; PARK, C. H. Clinical efficacy of photodynamic therapy. **Obstet Gynecol Sci**, v. 59, n. 6, p. 479-488, Nov 2016. ISSN 2287-8572 (Print)2287-8572 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27896250>>.

PENG, P. L. et al. Synergistic tumor-killing effect of radiation and berberine combined treatment in lung cancer: the contribution of autophagic cell death. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**, v. 70, n. 2, p. 529-542, Feb 1 2008. ISSN 0360-3016 (Print)0360-3016 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18207031>>.

PENTICUFF, J. C.; KYPRIANOU, N. Therapeutic challenges in renal cell carcinoma. **Am J Clin Exp Urol**, v. 3, n. 2, p. 77-90, 2015. ISSN 2330-1910 (Print)2330-1910 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26309897>>.

PEREIRA, S. Photodynamic therapy for pancreatic and biliary tract cancer: the United Kingdom experience. **J Natl Compr Canc Netw**, v. 10 Suppl 2, p. S48-51, Oct 1 2012. ISSN 1540-1413 (Electronic)1540-1405 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23055216>>.

PERERA, M. et al. An update on focal therapy for prostate cancer. **Nat Rev Urol**, v. 13, n. 11, p. 641-653, Nov 2016. ISSN 1759-4820 (Electronic)1759-4812 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27670618>>.

PHILOGENE, B. J. et al. Berberine: A naturally occurring phototoxic alkaloid. **J Chem Ecol**, v. 10, n. 1, p. 115-123, Jan 1984. ISSN 0098-0331 (Print)0098-0331 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24318233>>.

PIERPAOLI, E. et al. Antiangiogenic and antitumor activities of berberine derivative NAX014 compound in a transgenic murine model of HER2/neu-positive mammary carcinoma. **Carcinogenesis**, v. 36, n. 10, p. 1169-1179, Oct 2015. ISSN 1460-2180 (Electronic)0143-3334 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26168818>>.

RINI, B. I.; CAMPBELL, S. C.; ESCUDIER, B. Renal cell carcinoma. **Lancet**, v. 373, n. 9669, p. 1119-1132, Mar 28 2009. ISSN 1474-547X (Electronic)0140-6736 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19269025>>.

SENGUPTA, P. et al. Evaluation of Apoptosis and Autophagy Inducing Potential of Berberis aristata, Azadirachta indica, and Their Synergistic Combinations in Parental and Resistant Human Osteosarcoma Cells. **Front Oncol**, v. 7, p. 296, 2017. ISSN 2234-943X (Print)2234-943X (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29312880>>.

SHANMUGAM, M. K. et al. Potential Role of Natural Compounds as Anti-Angiogenic Agents in Cancer. **Curr Vasc Pharmacol**, v. 15, n. 6, p. 503-519, 2017. ISSN 1875-6212 (Electronic)1570-1611 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28707601>>.

SHI, S. et al. Reactive Oxygen Species-Responsive Nanoparticles Based on PEGlated Prodrug for Targeted Treatment of Oral Tongue Squamous Cell Carcinoma by Combining Photodynamic Therapy and Chemotherapy. **ACS Appl Mater Interfaces**, v. 10, n. 35, p. 29260-29272, Sep 5 2018. ISSN 1944-8252 (Electronic)1944-8244 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30106279>>.

SHIRASU, N.; NAM, S. O.; KUROKI, M. Tumor-targeted photodynamic therapy. **Anticancer Res**, v. 33, n. 7, p. 2823-2831, Jul 2013. ISSN 1791-7530 (Electronic)0250-7005 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23780966>>.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2016. **CA Cancer J Clin**, v. 66, n. 1, p. 7-30, Jan-Feb 2016. ISSN 1542-4863 (Electronic)0007-9235 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26742998>>.

SIMONE, C. B., 2ND; CENGEL, K. A. Photodynamic therapy for lung cancer and malignant pleural mesothelioma. **Semin Oncol**, v. 41, n. 6, p. 820-830, Dec 2014. ISSN 1532-8708 (Electronic)0093-7754 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25499640>>.

SOBOLEV, A. S.; ROZENKRANTS, A. A.; GILIAZOVA, D. G. [Approaches to the targeted intracellular delivery of photosensitizers in order to enhance their efficacy and cell specificity]. **Biofizika**, v. 49, n. 2, p. 351-379, Mar-Apr 2004. ISSN 0006-3029 (Print)0006-3029 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15129633>>.

SONG, D. Y. et al. Alcohol intake and renal cell cancer risk: a meta-analysis. **Br J Cancer**, v. 106, n. 11, p. 1881-1890, May 22 2012. ISSN 1532-1827 (Electronic)0007-0920 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22516951>>.

SONG, Y. C. et al. Berberine regulates melanin synthesis by activating PI3K/AKT, ERK and GSK3beta in B16F10 melanoma cells. **Int J Mol Med**, v. 35, n. 4, p. 1011-1016, Apr 2015.

ISSN 1791-244X (Electronic)1107-3756 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25716948>>.

STOJANOVIC, M.; GOLDNER, B.; IVKOVIC, D. Renal cell carcinoma and arterial hypertension. **Clin Exp Nephrol**, v. 13, n. 4, p. 295-299, Aug 2009. ISSN 1437-7799 (Electronic)1342-1751 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19184271>>.

SUN, Y. et al. A systematic review of the anticancer properties of berberine, a natural product from Chinese herbs. **Anticancer Drugs**, v. 20, n. 9, p. 757-769, Oct 2009. ISSN 1473-5741 (Electronic)0959-4973 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19704371>>.

TAKASAKI, A. A. et al. Application of antimicrobial photodynamic therapy in periodontal and peri-implant diseases. **Periodontol 2000**, v. 51, p. 109-140, 2009. ISSN 1600-0757 (Electronic)0906-6713 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19878472>>.

TANEJA, K.; WILLIAMSON, S. R. Updates in Pathologic Staging and Histologic Grading of Renal Cell Carcinoma. **Surg Pathol Clin**, v. 11, n. 4, p. 797-812, Dec 2018. ISSN 1875-9157 (Electronic)1875-9157 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30447842>>.

THOMPSON & THOMPSON. Genética e câncer. *In*: Genética Médica. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2002.

TSANG, C. M. et al. Berberine suppresses Id-1 expression and inhibits the growth and development of lung metastases in hepatocellular carcinoma. **Biochim Biophys Acta**, v. 1852, n. 3, p. 541-551, Mar 2015. ISSN 0006-3002 (Print)0006-3002 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25496992>>.

TSIVIAN, M. et al. Cigarette smoking is associated with advanced renal cell carcinoma. **J Clin Oncol**, v. 29, n. 15, p. 2027-2031, May 20 2011. ISSN 1527-7755 (Electronic)0732-183X (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21502558>>.

VERA-BADILLO, F. E.; CONDE, E.; DURAN, I. Chromophobe renal cell carcinoma: a review of an uncommon entity. **Int J Urol**, v. 19, n. 10, p. 894-900, Oct 2012. ISSN 1442-2042 (Electronic)0919-8172 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22715810>>.

WANG, N. et al. Berberine and Coptidis Rhizoma as potential anticancer agents: Recent updates and future perspectives. **J Ethnopharmacol**, v. 176, p. 35-48, Dec 24 2015. ISSN 1872-7573 (Electronic)0378-8741 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26494507>>.

WCRFI. World Cancer Research Fund International. Disponível em www.wcrf.org. Acesso em: 09 jan. 2018.

WHO. World Health Organization. Disponível em www.who.int/cancer/en/. Acesso em: 04 jan. 2018.

WILSON, K. M.; CHO, E. Obesity and Kidney Cancer. **Recent Results Cancer Res**, v. 208, p. 81-93, 2016. ISSN 0080-0015 (Print)0080-0015 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27909903>>.

WISHART, D. S. et al. HMDB 3.0--The Human Metabolome Database in 2013. **Nucleic Acids Res**, v. 41, n. Database issue, p. D801-807, Jan 2013. ISSN 1362-4962 (Electronic)0305-1048 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23161693>>.

YAN, L. et al. Berberine inhibits the migration and invasion of T24 bladder cancer cells via reducing the expression of heparanase. **Tumour Biol**, v. 34, n. 1, p. 215-221, Feb 2013. ISSN 1423-0380 (Electronic)1010-4283 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23065570>>.

ZHAO, A. et al. Serum miR-210 as a novel biomarker for molecular diagnosis of clear cell renal cell carcinoma. **Exp Mol Pathol**, v. 94, n. 1, p. 115-120, Feb 2013. ISSN 1096-0945 (Electronic)0014-4800 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23064048>>.

ZOU, K. et al. Advances in the study of berberine and its derivatives: a focus on anti-inflammatory and anti-tumor effects in the digestive system. **Acta Pharmacol Sin**, v. 38, n. 2, p. 157-167, Feb 2017. ISSN 1745-7254 (Electronic)1671-4083 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27917872>>.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de São José do Rio Preto

TERMO DE REPRODUÇÃO XEROGRÁFICA

Autorizo a reprodução xerográfica do presente Trabalho de Conclusão, na íntegra ou em partes, para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, 25/11/2019

Assinatura do autor