UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA

PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
ÁREA: IMUNOLOGIA E DOENÇAS INFECTO-PARASITÁRIAS

Álvaro Carneiro de Souza

TIPOS DE MORTES CELULARES INDUZIDAS PELA TERAPIA FOTODINÂMICA COM AZUL DE METILENO EM CÉLULAS DE CÂNCER DE MAMA MURINO *IN VITRO E IN VIVO*

Tese de Doutorado

JUIZ DE FORA
2026

Álvaro Carneiro de Souza

TIPOS DE MORTES CELULARES INDUZIDAS PELA TERAPIA FOTODINÂMICA COM AZUL DE METILENO EM CÉLULAS DE CÂNCER DE MAMA MURINO *IN VITRO E IN VIVO*

Tese de Doutorado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas para obtenção do Título de Doutor em Ciências Biológicas: Área: Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias.

Orientadora: Prof. Drª Flávia de Paoli

JUIZ DE FORA
2026

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração
automática da Biblioteca Universitária da UFJF,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Carneiro de Souza, Álvaro.
TIPOS DE MORTES CELULARES INDUZIDAS PELA TERAPIA FOTODINÂMICA COM AZUL DE METILENO EM CÉLULAS DE CÂNCER DE MAMA MURINO IN VITRO E IN VIVO / Álvaro Carneiro de Souza. -- 2026.
118 f. : il.

Orientadora: Flávia de Paoli
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2026.

1. terapia fotodinâmica. 2. azul de metileno. 3. carcinoma mamário. 4. morte celular regulada. I. de Paoli, Flávia, orient. II. Título.

Álvaro Carneiro de Souza

TIPOS DE MORTES CELULARES INDUZIDAS PELA TERAPIA FOTODINÂMICA COM AZUL DE METILENO EM CÉLULAS DE CÂNCER DE MAMA MURINO *IN VITRO* E *IN VIVO*

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas. Área de concentração: Imunologia e Doenças Infectoparasitárias.

Aprovado em 07 de agosto de 2026.

BANCA EXAMINADORA

Profª. Drª. Flávia de Paoli - Orientadora
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Carlos Maranduba
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Gilson Costa Macedo
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Adenilson de Souza da Fonseca
Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Profª. Drª. Daniele Lisboa Ribeiro
Universidade Federal de Uberlândia

Juiz de Fora, 16/07/2026.

Documento assinado eletronicamente por **Flavia de Paoli**, **Professor(a)**, em 10/08/2026, às 17:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Adenilson de Souza da Fonseca**, **Usuário Externo**, em 15/08/2026, às 11:13, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Gilson Costa Macedo**, **Professor(a)**, em 15/08/2026, às 11:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Carlos Magno da Costa Maranduba**, **Professor(a)**, em 15/08/2026, às 14:24, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Daniele Lisboa Ribeiro**, **Usuário Externo**, em 17/08/2026, às 14:35, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf (www2.ufjf.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **3090414** e o código CRC **99AB019C**.

RESUMO

A terapia fotodinâmica (TFD) destaca-se como uma modalidade terapêutica minimamente invasiva baseada na ativação de um fotossensibilizador por luz em comprimento de onda específico, na presença de oxigênio molecular, promovendo a geração localizada de espécies reativas de oxigênio capazes de induzir morte celular seletiva. Entre os fotossensibilizadores disponíveis, o azul de metileno (AM) apresenta elevada disponibilidade, baixo custo e propriedades fotofísicas favoráveis, configurando-se como uma alternativa promissora para o tratamento de neoplasias. Entretanto, permanecem lacunas quanto aos mecanismos moleculares desencadeados pela TFD mediada por azul de metileno (AM-TFD) e à influência dos parâmetros dosimétricos sobre a ativação das diferentes modalidades de morte celular. O presente estudo teve como objetivo avaliar os mecanismos de morte celular induzidos pela TFD mediada por AM (AM-TFD) em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo* de carcinoma mamário murino da linhagem 4T1, utilizando duas concentrações do fotossensibilizador (25 e 50 μM) e investigando as vias de apoptose, autofagia, necroptose e ferroptose. Inicialmente, foram estabelecidos os parâmetros experimentais por meio de ensaios de viabilidade celular, determinando-se as concentrações de azul de metileno e definindo-se o protocolo fotodinâmico. A irradiação foi realizada com laser de diodo InGaAlP, com comprimento de onda de 660 nm, potência de 100 mW, área de ponto de 0,028 cm², energia de 2,8 J por ponto, densidade de energia de 100 J/cm², irradiância de 3,57 W/cm² e tempo de exposição de 28 s por ponto. Posteriormente, foram realizados ensaios de migração celular, análise da expressão gênica por RT-qPCR, avaliação funcional das vias de morte celular por meio de inibidores farmacológicos específicos e caracterização histopatológica e imuno-histoquímica em camundongos BALB/c portadores de carcinoma mamário induzido por células 4T1. Os resultados demonstraram que a AM-TFD reduziu significativamente a viabilidade e a capacidade migratória das células tumorais. A análise da expressão gênica revelou modulação de marcadores associados às vias de morte celular regulada, com maior participação de mecanismos relacionados à autofagia e ferroptose. Os ensaios com inibidores farmacológicos confirmaram a contribuição funcional da ferroptose para a citotoxicidade induzida pela terapia. No modelo *in vivo*, o tratamento mostrou-se seguro, sem evidências de toxicidade sistêmica. Embora não tenham sido observadas diferenças significativas na regressão macroscópica do volume tumoral durante o período experimental, as análises moleculares e imuno-histoquímicas evidenciaram alterações compatíveis com a ativação de diferentes vias de morte celular imunogênica no tecido tumoral como necroptose. A AM-TFD constitui uma estratégia antitumoral promissora para o tratamento do carcinoma mamário experimental, sendo capaz de induzir múltiplas vias de morte celular regulada, com destaque para autofagia, necroptose e ferroptose. Esses achados ampliam a compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na fototerapia e fornecem subsídios para a otimização dos parâmetros terapêuticos e o desenvolvimento de protocolos translacionais para o tratamento do câncer de mama.

Palavras-chave: terapia fotodinâmica; azul de metileno; carcinoma mamário; morte celular regulada; apoptose; autofagia; necroptose; ferroptose.

ABSTRACT

Photodynamic therapy (PDT) stands out as a minimally invasive therapeutic modality based on the activation of a photosensitizer by light at a specific wavelength in the presence of molecular oxygen, promoting the localized generation of reactive oxygen species capable of inducing selective cell death. Among the available photosensitizers, methylene blue (MB) has high availability, low cost, and favorable photophysical properties, making it a promising alternative for the treatment of neoplasms. However, gaps remain regarding the molecular mechanisms triggered by methylene blue-mediated photodynamic therapy (MB-PDT) and the influence of dosimetric parameters on the activation of different forms of cell death. The present study aimed to evaluate the cell death mechanisms induced by MB-mediated PDT (MB-PDT) in *in vitro* and *in vivo* experimental models of 4T1 murine mammary carcinoma, using two photosensitizer concentrations (25 and 50 μM) and investigating the pathways of apoptosis, autophagy, necroptosis, and ferroptosis. Initially, the experimental parameters were established through cell viability assays, determining the methylene blue concentrations and defining the photodynamic protocol. Irradiation was performed using an InGaAlP diode laser at a wavelength of 660 nm, with a power output of 100 mW, spot area of 0.028 cm², energy of 2.8 J per point, energy density of 100 J/cm², irradiance of 3.57 W/cm², and exposure time of 28 s per point. Subsequently, cell migration assays, gene expression analysis by RT-qPCR, functional assessment of cell death pathways using specific pharmacological inhibitors, and histopathological and immunohistochemical characterization were performed in BALB/c mice bearing 4T1 cell-induced mammary carcinoma. The results demonstrated that MB-PDT significantly reduced tumor cell viability and migratory capacity. Gene expression analysis revealed modulation of markers associated with regulated cell death pathways, with a greater contribution of mechanisms related to autophagy and ferroptosis. Pharmacological inhibitor assays confirmed the functional contribution of ferroptosis to the cytotoxicity induced by the therapy. In the *in vivo* model, the treatment was shown to be safe, with no evidence of systemic toxicity. Although no significant differences in macroscopic tumor volume regression were observed during the experimental period, molecular and immunohistochemical analyses revealed alterations consistent with the activation of different immunogenic cell death pathways in the tumor tissue, including necroptosis. MB-PDT represents a promising antitumor strategy for the treatment of experimental mammary carcinoma, capable of inducing multiple regulated cell death pathways, particularly autophagy, necroptosis, and ferroptosis. These findings expand the understanding of the molecular mechanisms involved in photodynamic therapy and provide a basis for optimizing therapeutic parameters and developing translational protocols for breast cancer treatment.

Keywords: photodynamic therapy; methylene blue; mammary carcinoma; regulated cell death; apoptosis; autophagy; necroptosis; ferroptosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Reações do tipo I e II na Terapia Fotodinâmica ---------- p. 11
Figura 2 - Mecanismos de apoptose celular regulada induzida por Terapia Fotodinâmica ---------- p. 20
Figura 3 - Mecanismos de autofagia celular regulada induzida por Terapia Fotodinâmica ---------- p. 23
Figura 4 - Mecanismos de necroptose celular regulada induzida por Terapia Fotodinâmica ---------- p. 27
Figura 5 - Mecanismos de ferroptose celular regulada induzida por Terapia Fotodinâmica ---------- p. 30
Figura 6 - Disposição experimental em placa de 96 poços para triagem de citotoxicidade do azul de metileno ---------- p. 37
Figura 7 - Representação esquemática do procedimento experimental da Terapia Fotodinâmica mediada por Azul de Metileno (AM-TFD) ---------- p. 40
Figura 8 - Representação esquemática bidimensional do ensaio de cicatrização de ferida (*scratch wound healing assay*) ---------- p. 43
Figura 9 - Esquema representativo Anatomia Topográfica da distribuição das glândulas mamarias de camundongo fêmea ---------- p. 48
Figura 10 - Aspecto macroscópico do tumor antes (A) e após (B) a administração intratumoral de Azul de Metileno ---------- p. 49
Figura 11 - Avaliação da viabilidade celular da linhagem 4T1 submetida a diferentes tempos de incubação (10, 15 e 30 min) com azul de metileno (AM) (toxicidade no escuro) ou associado à terapia fotodinâmica (TFD) ---------- p. 54
Figura 12 - Viabilidade celular determinada após 30 minutos de incubação com azul de metileno (AM 25 e 50), na ausência ou presença de irradiação laser de baixa potência, incluindo o grupo controle de irradiação isolada (Laser) ---------- p.55
Figura 13 - Porcentagem de internalização do fotossensibilizador após incubação em diferentes concentrações (0 a 150 μM) nos tempos de 10, 15 e 30 minutos, determinada por lise celular com

SDS e leitura espectrofotométrica ---------- p. 56
Figura 14 - Ensaio de migração das células 4T1 nos tempos de 0h, 24h e 48h ---------- p. 57
Figura 15 - Níveis relativos de mRNA quantificados por RT-qPCR para os genes (A) Caspase-3, (B) Caspase-6, (C) Bax, (D) Bcl-2 e (E) Razão Bax/Bcl-2 ---------- p. 59
Figura 16 - Níveis relativos de mRNA quantificados por RT-qPCR para o gene LC3B ---------- p. 60
Figura 17 - Níveis relativos de mRNA quantificados por RT-qPCR para o gene MLKL ---------- p. 61
Figura 18 - Níveis relativos de mRNA quantificados por RT-qPCR para o gene Gpx4 ---------- p. 62
Figura 19 - Fragmentação do DNA por ensaio de TUNEL ---------- p. 63
Figura 20 - Viabilidade de células 4T1 mensurada pelo ensaio de MTT na ausência ou presença do inibidor lisossomotrópico Cloroquina (CQ) ---------- p. 64
Figura 21 - Viabilidade de células 4T1 tratadas na ausência ou presença do inibidor alostérico de RIPK1, Necrostatina-1 (Nec-1) -- p. 65
Figura 22 - Viabilidade celular de células de carcinoma mamário murino 4T1 após exposição aos regimes terapêuticos na ausência (Sem inibidor) ou presença do inibidor específico de ferroptose, Ferrostatina-1 (Fer-1) ---------- p.66
Figura 23 - Cronograma e imagens representativas dos eventos experimentais *in vivo* ---------- p. 67
Figura 24 - Avaliação da progressão da área tumoral *in vivo* ---------- p. 68
Figura 25 - Gráfico representativo da média e desvio padrão da massa corpórea (em gramas) dos camundongos nos momentos inicial (início do protocolo) e final (eutanásia) ---------- p. 69
Figura 26 - Aspectos histopatológicos representativos do carcinoma mamário 4T1 em camundongos BALB/c. Fotomicrografias de secções tumorais coradas em Hematoxilina e Eosina (HE) em diferentes aumentos ---------- p. 70
Figura 27 - Análise imuno-histoquímica da expressão de Caspase-3

em tumores mamários 4T1 ---------- p.72
Figura 28 - Análise imuno-histoquímica da expressão de LC3B em tumores mamários 4T1 ---------- p. 74
Figura 29 - Análise imuno-histoquímica da expressão de MLKL em tumores mamários 4T1 ---------- p. 76
Figura 30 - Resumo gráfico das principais evidências obtidas no estudo ---------- p. 94

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Evolução das gerações de fotossensibilizadores utilizados em Terapia Fotodinâmica ---------- p. 13
Quadro 2 - Sequências dos primers utilizados nas reações de PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR) ---------- p.45
Quadro 3 - Graduação histopatológica dos tumores mamários 4T1 com base no sistema de Elston e Ellis (1998) ---------- p. 71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros físicos do laser utilizados nos modelos experimentais ---------- p. 38

SIGLAS

ACTB ---------- gene β-actina
AKT ---------- Proteína quinase B
AM ---------- Azul de Metileno
AMPK ---------- Proteína quinase ativada por monofosfato de adenosina
APC's ---------- Celulas Apresentadoras de Antigenos
APAF ---------- Fator Ativador de Protease Apoptótico
ATG ---------- Proteína relacionada à autofagia
ATP ---------- Adenosina Trifosfato
ALA ---------- Ácido 5-aminolevulínico
BAK ---------- Antagonista/Homólogo killer da Bcl-2
BAX ---------- Proteína X associada à Bcl-2
Bcl-2 ---------- Linfoma de células B 2
Bcl-xL ---------- Linfoma de células B – isoforma extra longa
Beclin -1 ------- Proteína 1 relacionada à autofagia
Ca^{2+} ---------- Íon cálcio
Casp ---------- Caspase
CBR ---------- Centro de Biologia da Reprodução
CQ ---------- Cloroquina
CRT ---------- Calreticulina
dATP ---------- Desoxiadenosina trifosfato
DEPC ---------- Dietilpirocarbonato
DMSO ---------- Dimetilsulfóxido
EROs ---------- Espécies Reativas de Oxigênio
EUA ---------- Estados Unidos da América
FDA ---------- Food and Drug Administration
Fe^{2+} ---------- Íon ferroso (ferro no estado de oxidação +2)
Fer ---------- Ferrostatina
FS ---------- Fotossensibilizador
GPX ---------- Glutationa Peroxidase
HMGB1 -------- Proteína do grupo de alta mobilidade Box 1
HpD ---------- Hematoporphyrinderivative

J/cm^2 ---------- Jaule por centímetro quadrado

LC3 ---------- Cadeia leve 3 da proteína 1 associada aos microtúbulos

MCI ---------- Morte Celular Imunogênica

MHC ---------- Complexo Principal de Histocompatibilidade

MLKL ---------- Proteína semelhante ao domínio de quinase da linhagem mista

MCI ---------- Morte Celular Imunogênica

mM ---------- Milimolar

MOMP ---------- Permeabilização da membrana externa mitocondria

mTOR ---------- Alvo mecanístico da rapamicina

MTT ---------- Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio

mW ---------- Miliwatt

NEC ---------- Necrostatina

Nm ---------- Nanômetro

PBS ---------- Solução salina tamponada com fosfato

PI3K ---------- Fosfatidilinositol 3-quinase

PI3P ---------- Fosfatidilinositol 3-fosfato

PCR ---------- Reação em Cadeia da Polimerase

pH ---------- Potencial de Hidrogênio

DAMPs --------- Padrões Moleculares Associados a Danos

RE ---------- Retículo Endoplasmático

RIPK ---------- Quinase de proteína de interação com receptor

SDS ---------- Dodecil sulfato de sódio

SFB ---------- Soro Fetal Bovino

tBID ---------- Agonista do domínio de morte truncado que interage com BH3

$TCD8^+$ ---------- Linfócitos T citotóxicos $CD8^+$

TNF ---------- Fator de Necrose Tumoral

TUNEL --------- Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling

TFD ---------- Terapia Fotodinâmica

UFJF ---------- Universidade Federal de Juiz de Fora

µg ---------- Micrograma

ULK 1 ---------- Quinase 1 semelhante à quinase Unc-51

μM ---------- Micromolar

VPS 15 --------- Proteína 15 de classificação vacuolar

VPS 34 --------- Proteína 34 de classificação vacuolar

WIPI2 ---------- Proteína 2 de interação com domínio WD40 do fosfoinositídeo

ZnPc ---------- Zinco Ftalocianina

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO ---------- p. 9
1.1 A Terapia Fotodinâmica ---------- p. 10
1.2 O Fotossensibilizador – Azul de Metileno ---------- p. 12
1.3 Terapia Fotodinâmica e as Principais Vias de Morte Celular -- p. 16
1.3.1 Mecanismos de Indução da Via Apoptótica na Terapia Fotodinâmica ---------- p. 18
1.3.2 Mecanismos de indução da via autofágica na Terapia Fotodinâmica ---------- p. 21
1.3.3 Mecanismos de indução da via necroptose na Terapia Fotodinâmica ---------- p. 25
1.3.4 Mecanismos de indução da ferroptose na Terapia Fotodinâmica ---------- p. 28
1.4 Modelo Experimental 4T1 (RRID:CVCL_0125) ---------- p. 31
1.5 Justificativa ---------- p. 33
2. OBJETIVOS ---------- p. 35
2.1 Objetivo Geral ---------- p. 35
2.2 Objetivos Específicos ---------- p. 35
3. MATERIAIS E MÉTODOS ---------- p. 36
3.1 Fotossensibilizador ---------- p. 36
3.2 Laser de Baixa Potência ---------- p. 37
3.3 Modelo Experimental *in Vitro* ---------- p. 38
3.4 Incubação com AM e Irradiação com Laser de Baixa Potência p. 38
3.5 Viabilidade Celular ---------- p. 40
3.6 Concentração Intracelular do Azul de Metileno ---------- p. 41
3.7 Análise Ensaio de Cicatrização de “Ferida” ---------- p. 42
3.8 Extração de RNA e PCR em tempo real ---------- p. 43
3.9 Inibidores de morte celular ---------- p. 45
3.10 Detecção de fragmentação do DNA por ensaio de TUNEL --- p. 46
3.11 Modelo experimental in vivo de carcinoma mamário --------- p. 47
3.12 Inoculação do AM e Irradiação com Laser de Baixa

Potência nos Tumores ---------- p. 48
3.13 Eutanásia dos Animais Experimentais ---------- p. 50
3.14 Análise Histopatológica ---------- p. 50
3.15 Análises Imuno-histoquímicas ---------- p. 51
3.16 Análises estatísticas ---------- p. 52
4 RESULTADOS ---------- p. 53
In vitro---------- p. 53
4.1 Viabilidade Celular ---------- p. 53
4.2 Internalização Intracelular do Fotossensibilizador ---------- p. 55
4.3 Migração Celular ---------- p. 56
4.4 Expressão Gênica Associado às Vias de Morte Celular -------- p. 58
4.4.1 Marcadores de Apoptose ---------- p. 58
4.4.2 Marcador de Autofagia ---------- p. 60
4.4.3 Marcador de Necroptose ---------- p. 61
3.4.4 Marcador de Ferroptose ---------- p. 61
4.5 Avaliação da Fragmentação de DNA por Ensaio de TUNEL --- p. 62
4.6. Inibidores Farmacológicos ---------- p.64
In Vivo ---------- p. 67
4.7 Modelo Experimental de Tumor Mamário 4T1 ---------- p. 67
4.8 Análises Histopatológicas do Tumor Mamário 4T1 ---------- p. 69
4.9 Análises Imuno-histoquímicas dos Marcadores de Morte Celular ---------- p. 71
5 DISCUSSÃO ---------- p. 78
5.1 A terapia fotodinâmica com azul de metileno no modelo experimental *in vitro* ---------- p. 78
5.2 A terapia fotodinâmica com azul de metileno no modelo experimental *in vivo* ---------- p. 87
5.3 Correlação *in vitro* vs. *in vivo* ---------- p. 92
6 CONCLUSÃO ---------- p. 93
7 DECLARAÇÃO DE USO ÉTICO E TRANSPARÊNCIA - USO DE INTELIGÊNCIA ARTIFICIAL ---------- p. 95
8 REFERÊNCIAS ---------- p. 117

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, a oncologia tem experimentado avanços expressivos no desenvolvimento de estratégias terapêuticas para o tratamento do câncer. Esses progressos foram impulsionados principalmente pela introdução e aperfeiçoamento de terapias sistêmicas, incluindo a quimioterapia, terapias-alvo e, mais recentemente, a imunoterapia (PALUMBO et al., 2013; MIN; LEE, 2022). Esta última tem se destacado por sua maior especificidade biológica, atuando na modulação de diferentes mecanismos celulares e imunológicos envolvidos na eliminação das células tumorais, o que frequentemente resulta em menor toxicidade aos tecidos saudáveis quando comparada às abordagens convencionais (FARKONA; DIAMANDIS; BLASUTIG, 2016). Entretanto, apesar dos avanços alcançados, a elevada capacidade proliferativa das células neoplásicas, associada à sua notável plasticidade, favorece o desenvolvimento de mecanismos adaptativos de resistência terapêutica. Esse processo, frequentemente denominado quimiorresistência ou quimioadaptação, permite que as células tumorais sobrevivam à pressão seletiva imposta pelos tratamentos, reduzindo sua eficácia ao longo do tempo. Consequentemente, o desenvolvimento contínuo de novas terapias antineoplásicas permanece essencial (MARTINS et al., 2021).

As terapias convencionais para o tratamento do câncer, incluindo cirurgia, quimioterapia, radioterapia e imunoterapia, podem causar efeitos colaterais que superam os benefícios clínicos, especialmente em pacientes com o estado de saúde comprometido. Diante disso, novas alternativas terapêuticas vêm sendo exaustivamente investigadas em todo o mundo. Nesse contexto, a Terapia Fotodinâmica (TFD, do inglês *photodynamic therapy* - PDT) tem sido amplamente explorada, com vários fotossensibilizadores (FS) já aprovados para aplicações clínicas em determinados tipos de câncer (NATH; OBAID; HASAN, 2019).

1.1 A Terapia Fotodinâmica

A TFD é uma modalidade terapêutica minimamente invasiva, bem estabelecida e em constante evolução. Embora a "ação fotodinâmica" tenha sido descrita pela primeira vez em 1903 (DOLMANS et al., 2003; MISHCHENKO et al., 2022), a abordagem consolidou-se na medicina moderna ao combinar um fotossensibilizador (FS) com a irradiação de luz em um comprimento de onda específico, influenciado pelas características químicas da molécula (ALZEIBAK et al., 2021). Essa combinação ativa o FS na presença de oxigênio molecular, gerando espécies reativas de oxigênio (EROs) intracelulares capazes de desencadear uma cascata de eventos que culmina na morte das células tumorais (GUNAYDIN; GEDIK; AYAN, 2021).

Na TFD, ocorrem duas reações fotoquímicas principais após a excitação do FS: a do tipo I envolve a transferência de elétrons ou prótons que reagem com substratos celulares, formando ânions ou cátions radicais, ou interagem diretamente com o oxigênio molecular para produzir EROs, como íons superóxido e radicais hidroxila; e a do tipo II, que por sua vez, baseia-se na transferência direta de energia do estado tripleto do FS para o oxigênio molecular no estado fundamental, gerando oxigênio singleto ($^1O_2$), uma espécie altamente reativa em estado excitado (HU et al., 2021) (Figura 1). Ambas as reações podem ocorrer simultaneamente e provocar diferentes mecanismos de morte celular. A predominância de cada via é influenciada pelas características físico-químicas do FS, pelas concentrações de substrato e pelos níveis de oxigenação do tecido, podendo também levar a danos na microvasculatura tumoral e a processos inflamatórios locais (AGOSTINIS et al., 2011).

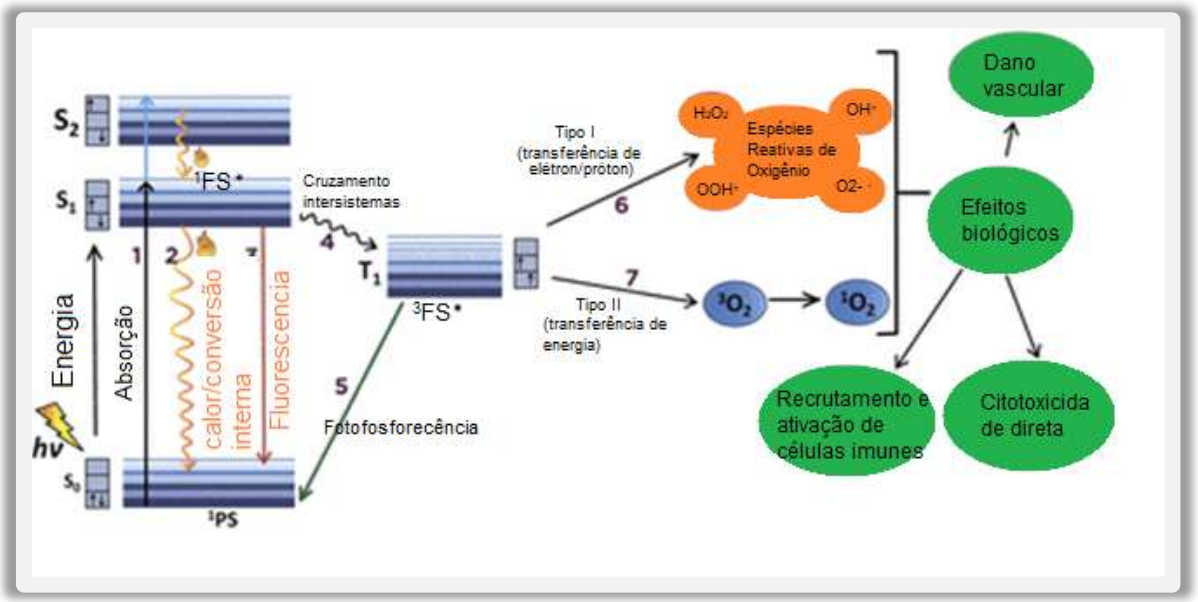


Figura 1: Reações do tipo I e II na Terapia Fotodinâmica. Após a absorção de um fóton, os elétrons do FS são impulsionados para um orbital de alta energia (estado excitado singleto) e, por cruzamento intersistemas, passam para um estado excitado tripleto (^{3}FS), podendo seguir duas vias reacionais. No tipo I, o ^{3}FS reage diretamente com um substrato (por exemplo, ácidos graxos poli-insaturados nos lipídios da membrana celular), transferindo um elétron ou próton e formando radicais orgânicos e espécies reativas de oxigênio (EROs), como o ânion superóxido ($O_2^{-}\cdot$), radical hidroperóxido (HOO·), peróxidos (H_2O_2, ROOH) e radical hidroxila (HO·). No tipo II, o ^{3}FS transfere sua energia diretamente para o oxigênio molecular fundamental ($^3O_2$), formando oxigênio singleto excitado ($^1O_2$). Adaptado de Alzeibak et al., 2021 e Martins et al., 2021.

Devido à elevada reatividade, ao curto tempo de vida e à limitada capacidade de difusão das EROs, apenas os FS localizados nas proximidades de alvos biológicos críticos são capazes de promover danos fotodinâmicos efetivos nas células tumorais (AGOSTINIS et al., 2011; PRZYGODA et al., 2023). O oxigênio singleto ($^1O_2$), considerado a principal espécie citotóxica gerada durante a TFD, apresenta um tempo de vida aproximado de 4 μs em água pura, o que limita sua distância média de difusão a valores inferiores a 200 nm. Dessa forma, embora as células de mamíferos possuam dimensões que variam entre 10 e 30 μm de diâmetro, o dano oxidativo induzido pelo $^1O_2$ permanece restrito a regiões subcelulares muito próximas ao local de sua geração, afetando predominantemente as organelas e estruturas que acumulam o FS (CUNHA et al., 2026).

Dessa forma, a eficácia da TFD não depende exclusivamente da quantidade de EROs produzidas, mas também da distribuição intracelular do FS. Quando localizado próximo a estruturas essenciais para a manutenção da

homeostase celular, como mitocôndrias, lisossomos, retículo endoplasmático ou membrana plasmática, o FS promove a oxidação seletiva de lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, desencadeando vias específicas de morte celular (BUYTAERT et al., 2007; AGOSTINIS et al., 2011). Além disso, fatores relacionados ao microambiente tumoral, especialmente a disponibilidade local de oxigênio, influenciam diretamente a eficiência da reação fotodinâmica, podendo potencializar ou limitar a geração de EROs e, por conseguinte, a resposta terapêutica (MARTINS et al., 2021).

Diante dessas características, a escolha do FS representa um dos fatores mais críticos para o sucesso da TFD. As propriedades físico-químicas da molécula, incluindo carga elétrica, hidrofobicidade, caráter anfifílico, tendência à agregação e afinidade por determinados compartimentos celulares, determinam não apenas sua capacidade de internalização e acúmulo tumoral, mas também os tipos de organelas que serão preferencialmente danificadas após a fotoativação (CASTANO; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2004; KESSEL, 2020). Como resultado, diferentes FS podem induzir respostas biológicas distintas, ativando mecanismos regulados de morte celular, tais como apoptose, autofagia, necroptose ou ferroptose (ATAMNA et al., 2008; BUZGA et al., 2022; ALZEIBAK et al., 2021; MISHCHENKO et al., 2022). Assim, a seleção adequada do FS para cada tipo tumoral constitui um aspecto fundamental para maximizar a eficácia terapêutica e ampliar o potencial antitumoral da terapia fotodinâmica.

1.2 O Fotossensibilizador – Azul de Metileno

Idealmente, um FS deve reunir características específicas para garantir a máxima eficácia terapêutica. Entre elas, destacam-se a forte absorção de luz em comprimentos de onda na janela fototerapêutica, a ausência de toxicidade no escuro, a alta seletividade pelo tecido tumoral com retenção prolongada e a rápida eliminação do organismo após o tratamento (JORI, 1996). Para transitar eficientemente nos diferentes ambientes biológicos, muitas moléculas investigadas apresentam caráter anfifílico, equilibrando propriedades hidrofílicas e hidrofóbicas (HU et al., 2021).

Ao longo dos anos, diferentes classes e gerações de FS foram desenvolvidas e empregadas na TFD (Quadro 1). Os compostos de primeira geração são representados pelos derivados de porfirinas, incluindo a hematoporfirina e seus derivados purificados. Para superar as limitações dessas moléculas iniciais, como a persistente fotossensibilidade cutânea, foram desenvolvidos os agentes de segunda geração. Esta classe abrange uma ampla variedade de estruturas químicas, incluindo porfirinas modificadas ou expandidas, clorinas, ftalocianinas e corantes fenotiazínicos. Por fim, os FS de terceira geração consistem em moléculas de gerações anteriores conjugadas a sistemas de direcionamento, como anticorpos monoclonais, peptídeos ou nanopartículas, visando elevar consideravelmente a seletividade tumoral (ALLISON; SIBATA, 2010). Entretanto, vale ressaltar que muitos desses sistemas avançados de terceira geração ainda permanecem em fase experimental ou apresentam viabilidade clínica limitada.

Quadro 1: Evolução das gerações de fotossensibilizadores utilizados em Terapia Fotodinâmica.

Geração	Principais Classes	Exemplos	Vantagens	Limitações
1ª	Porfirinas naturais e derivados	HpD, Porfímero sódico (Photofrin®)	Pioneiros clínicos Eficácia consolidada	Baixa absorção em comprimentos de onda longos Fototoxicidade cutânea prolongada
2ª	Porfirinas sintéticas, Clorinas, Ftalocianinas e Corantes (Fenotiazina)	ALA, Azul de Metileno, Foscan®, Verteporfina, ZnPc	Absorção na janela terapêutica (600–800 nm) Menor fototoxicidade cutânea	Distribuição sistêmica residual Captação tumoral variável
3ª	FS de 2ª geração conjugados a transportadores ou biomoléculas	Conjugados anticorpo-FS, Nanopartículas, Lipossomas, G-clorina	Alta seletividade tumoral Melhor biodistribuição e farmacocinética	Complexidade de síntese Elevado custo de produção
[1] 4ª	Sistemas	Nanoplataformas	Liberação	Predominantemente

Geração	Principais Classes	Exemplos	Vantagens	Limitações
	nanotecnológicos multifuncionais e estimuláveis	responsivas (pH, hipóxia, EROs)	inteligente e controlada no tumor Potencial teranóstico	em fase experimental Desafios regulatórios

Embora a classificação clássica contemple até a terceira geração, diversos autores têm utilizado o termo "quarta geração" para descrever fotossensibilizadores inteligentes e plataformas nanoestruturadas multifuncionais desenvolvidas recentemente (Bonnett, 2000; Allison; Sibata, 2010; Abrahamse; Hamblin, 2016; Kataoka et al., 2017; Sorrin et al., 2020; Aebisher et al., 2024).

É importante destacar que FS pertencentes a uma mesma classe química não apresentam necessariamente o mesmo comportamento biológico ou fotofísico. Pequenas variações nos grupos substituintes ligados ao cromóforo central podem modificar significativamente a solubilidade, a taxa de agregação e a farmacocinética da molécula (MARTINS et al., 2021). Nesse cenário, embora novas gerações de FS estejam em desenvolvimento, os corantes histológicos tradicionais ganharam destaque devido ao seu custo acessível e perfil de segurança bem documentado.

Entre eles, o azul de metileno (AM) tem se destacado por sua ampla disponibilidade comercial, baixo custo e segurança consolidada por décadas de uso médico (GALVAN et al., 2021). Classificado quimicamente como um composto aromático heterocíclico pertencente à classe das fenotiazinas, o AM possui propriedades antissépticas marcantes e capacidade de induzir a degradação de ácidos nucleicos, sendo tradicionalmente utilizado em diversas intervenções clínicas, incluindo o tratamento da meta-hemoglobinemia, da encefalopatia induzida por ifosfamida, da malária, e como marcador em cirurgias de tireoide (ATAMNA et al., 2008; CONGDON et al., 2012; LIM et al., 2013; TORATANI et al., 2016; BERNDT-PAETZ et al., 2017; LIM DJ, 2021).

Estruturalmente, o AM é um derivado catiônico que apresenta um sistema aromático extensamente conjugado. Essa conformação confere à

molécula um caráter anfifílico, equilibrando regiões hidrofóbicas associadas ao núcleo fenotiazínico e regiões hidrofílicas decorrentes dos grupos amino e de sua carga positiva permanente (MAHAJAN et al., 2013; BOLLINGER et al., 2025). Essa natureza anfipática favorece a interação do AM com as membranas biológicas, cujos componentes estruturais primários, fosfolipídios e proteínas integrais, compartilham da mesma afinidade (MAHAJAN et al., 2013; TSUBONE et al., 2019; MARTINS et al., 2021). Como consequência, esse FS é capaz de se internalizar e se associar eficientemente a múltiplos compartimentos celulares delimitados por membranas, acumulando-se no núcleo, nas mitocôndrias, nos lisossomos e no retículo endoplasmático (GABRIELLI et al., 2004; SORRIN et al., 2020).

As propriedades fotofísicas do AM também determinam sua eficiência na TFD. A molécula exibe uma forte banda de absorção na região do vermelho do espectro visível (faixa de 550 a 700 nm), com pico de máxima absortividade em aproximadamente 664 nm, o que permite uma boa penetração óptica nos tecidos biológicos (JUNQUEIRA et al., 2002; KHAN et al., 2022; BOLLINGER et al., 2025). Sob fotoativação, o AM apresenta um alto rendimento quântico para o estado tripleto, sendo altamente eficiente na geração de oxigênio singleto ($^1O_2$) por mecanismos do tipo II, além de produzir espécies de radicais livres via reações do tipo I (TUITE; KELLY, 1993; TARDIVO et al., 2005; MERTINS et al., 2014). Somado a isso, é descrito na maioria dos trabalhos que o AM não manifesta toxicidade significativa em baixas concentrações na ausência de luz, o que eleva substancialmente a especificidade e a segurança biológica do protocolo terapêutico (SCHIRMER et al., 2011; dos SANTOS et al., 2017).

Diante dessas vantagens, a TFD mediada pelo azul de metileno (AM-TFD) tem demonstrado uma promissora atividade antitumoral em modelos experimentais e ensaios clínicos para neoplasias superficiais, tais como tumores de bexiga, carcinomas esofágicos, carcinoma basocelular, sarcoma de Kaposi e melanoma (FERNANDEZ et al., 2007; PETRELLIS et al., 2014; SCOTTINI et al., 2021), exibindo também forte eficácia *in vitro* e *in vivo* em linhagens de carcinoma cervical HeLa (TARDIVO et al., 2005; LOU et al., 2008). Mais recentemente, essa abordagem tem se consolidado como uma alternativa promissora para a investigação de novas terapias voltadas ao

tratamento do câncer de mama. No entanto, apesar dos resultados encorajadores acumulados na literatura, a otimização dos protocolos e o estabelecimento de parâmetros dosimétricos precisos permanecem fundamentais para garantir a máxima eficácia e a segurança dessa modalidade a longo prazo.

1.3 Terapia Fotodinâmica e as Principais Vias de Morte Celular

A oncologia avançou significativamente com a caracterização de que as células tumorais podem sofrer múltiplas formas de morte celular regulada além dos processos clássicos de apoptose e necrose, englobando vias complexas como a autofagia, necroptose, piroptose, parthanatos e ferroptose (MISHCHENKO et al., 2022; WANG et al., 2022; ZHANG et al., 2025). A elucidação dessas rotas alternativas tornou-se um alvo estratégico essencial, visto que neoplasias agressivas frequentemente desenvolvem quimiorresistência através do bloqueio de vias apoptóticas convencionais. Nesse contexto, a AM-TFD surge como uma abordagem promissora, capaz de contornar fenótipos de resistência a múltiplos fármacos ao ativar mecanismos paralelos e independentes de eliminação tumoral (dos SANTOS et al., 2020; de SOUZA et al., 2024).

A rota molecular de morte desencadeada pela TFD é governada primariamente pelas propriedades físico-químicas do FS, as quais determinam seu perfil de permeabilidade e sítio de acúmulo subcelular (CASTANO; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2004). Uma vez que o FS se distribui por organelas como mitocôndrias, lisossomos, retículo endoplasmático (RE), complexo de Golgi ou membrana plasmática, a fotoativação local promove um dano oxidativo restrito e direcionado (MISHCHENKO et al., 2022). Em linhagens de melanoma, carcinoma pulmonar e adenocarcinoma mamário, o tropismo do FS pelas mitocôndrias correlaciona-se classicamente à indução de apoptose intrínseca. Contudo, a magnitude desse foto-dano mitocondrial pode desviar o destino celular: doses fototerapêuticas elevadas colapsam a permeabilidade da membrana e exaurem os níveis de ATP, culminando em necrose, enquanto doses subletais estimulam a remoção de organelas danificadas por autofagia

seletiva, via mitofagia (CHEN et al., 2008; ANDRZEJAK et al., 2011; BACELLAR et al., 2015; ANIOGO et al., 2020).

De forma homóloga, o estresse oxidativo direcionado a outros compartimentos celulares evoca respostas moleculares distintas. O foto-dano ao complexo de Golgi pode deflagrar a catástrofe mitótica, ao passo que o acúmulo do FS na membrana plasmática frequentemente induz piroptose e ferroptose, e a presença nuclear do agente induz o processo de parthanatos (MISHCHENKO et al., 2022; ZHOU et al., 2025). Adicionalmente, o acúmulo de FS localizado no RE promove uma liberação massiva de cálcio intracelular (Ca^{2+}), desregulando a homeostase citosólica e ativando tanto a paraptose, uma via independente de caspases, quanto a necroptose (ZONG, 2006; BACELLAR et al., 2015). Notavelmente, para a via da necroptose, evidências sugerem que a transição do estímulo apoptótico para o necroptótico pode ser modulada não apenas pela localização celular do FS, mas também pela concentração intracelular da substância e pela densidade de energia luminosa aplicada (MISHCHENKO et al., 2022).

A capacidade da AM-TFD em induzir essas modalidades não-convencionais de morte tem sido progressivamente demonstrada em modelos tumorais agressivos. Em ensaios utilizando painéis de linhagens de adenocarcinoma pancreático humano (Panc-1, MIAPaCa-2, AsPC-1 e BxPC-3*),* que mimetizam a heterogeneidade fenotípica e genotípica tumoral, a AM-TFD foi eficaz em disparar vias concomitantes de autofagia e necroptose (ALMEIDA et al., 2023). Essa interconexão molecular também foi evidenciada em culturas de carcinoma prostático altamente agressivo (PC3), onde o tratamento fotodinâmico induziu a fosforilação da proteína quinase semelhante ao domínio de linhagem mista (pMLKL), um marcador molecular definitivo e obrigatório para a execução da necroptose (GOMES et al., 2023).

A relevância acadêmica e clínica em mapear o predomínio dessas vias reguladas reside na sua associação com o fenômeno da Morte Celular Imunogênica (MCI). Ao contrário da apoptose fisiológica, que mimetiza um evento metabolicamente silencioso, processos como a necroptose e a ferroptose rompem a integridade celular de forma programada, promovendo a liberação massiva de padrões moleculares associados ao dano (DAMPs), como a proteína do grupo de alta mobilidade 1 (HMGB1), trifosfato de

adenosina (ATP), calreticulina (CRT), Erp57, proteínas de choque térmico (como HSP90) e vasostatina, além de citocinas pró-inflamatórias no microambiente (GARG; AGOSTINIS, 2017). Esses sinais de perigo recrutam e ativam células dendríticas, convertendo o sítio tumoral em um ambiente imunogenicamente ativo capaz de instruir uma resposta imune adaptativa duradoura mediada por linfócitos T CD8+ (GARG et al., 2015). Assim, decodificar os mecanismos moleculares acionados pela AM-TFD em modelos de câncer abre caminhos para a proposição de protocolos dosimétricos otimizados que unam a citotoxicidade direta local ao ganho de uma vacinação antitumoral sistêmica.

1.3.1 Mecanismos de Indução da Via Apoptótica na Terapia Fotodinâmica

A apoptose constitui uma modalidade de morte celular regulada caracterizada por alterações morfológicas coordenadas, incluindo picnose (condensação da cromatina), retração citoplasmática, blebbing (bolhas) na membrana plasmática e fragmentação do DNA, culminando na formação de corpos apoptóticos fagocitados sem o extravasamento de conteúdo citosólico ou indução de resposta inflamatória (ELMORE, 2007). Na TFD, o estresse oxidativo agudo gerado pelas EROs atua como o gatilho primário para a ativação de cascatas apoptóticas por vias intrínsecas (PAPA et al., 2025). Essa suscetibilidade ao dano oxidativo exibe uma seletividade biológica favorável: células não-tumorigênicas frequentemente mantêm sistemas antioxidantes robustos e maquinários de reparo eficientes, o que preserva o tecido saudável adjacente, ao passo que as células neoplásicas colapsam sob o estresse induzido pela fotossensibilização (dos SANTOS et al., 2020).

Considerando que a meia-vida das EROs (especialmente do oxigênio singlete, ($^1O_2$) é extremamente curta e seu raio de ação intracelular é restrito a poucos nanômetros, a apoptose induzida pela TFD é governada diretamente pela localização subcelular do fotossensibilizador (DONOHOE et al., 2019). As mitocôndrias representam o alvo central nessa dinâmica (RIBEIRO; SILVA; JORGE, 2004). O foto-dano direto às membranas mitocondriais induz a perda do potencial de membrana e promove a permeabilização da membrana externa mitocondrial, um evento bioquímico regulado por proteínas da família Bcl-2

(KESSEL; OLEINICK, 2018). Esse processo resulta na liberação massiva de fatores pró-apoptóticos para o citosol, com destaque para o citocromo c e o fator indutor de apoptose (ELMORE, 2007). Uma vez no citoplasma, o citocromo c interage com o fator ativador de protease apoptótica 1 (APAF-1) na presença de dATP, organizando o complexo proteico conhecido como apoptossomo, o qual recruta e cliva a caspase-9 iniciadora (ANIOGO; GEORGE; ABRAHAMSE, 2020).

Alternativamente, a cascata mitocondrial pode ser disparada indiretamente por meio do fenômeno de *crosstalk* organelar quando o FS acumula-se nos lisossomos (NATH et al., 2019). A fotoativação nesta organela provoca a permeabilização da membrana lisossomal e a consequente liberação de proteases ácidas, particularmente as catepsinas, no citosol. No ambiente citoplasmático, as catepsinas promovem a clivagem proteolítica da proteína pró-apoptótica BID em sua forma truncada ativa (tBID), a qual se transloca para a mitocôndria (NATH et al., 2019). A tBID induz diretamente a ativação de BAX e BAK na membrana mitocondrial externa, mimetizando a liberação do citocromo c e do segundo ativador mitocondrial de caspases para o citoplasma (MOYER; TANAKA; CHENG, 2025). A convergência dessas vias citoplasmáticas (Figura 2) culmina na ativação sequencial das caspases executoras, primariamente a caspase-3 e a caspase-7 (SALVESEN; DIXIT, 1997).

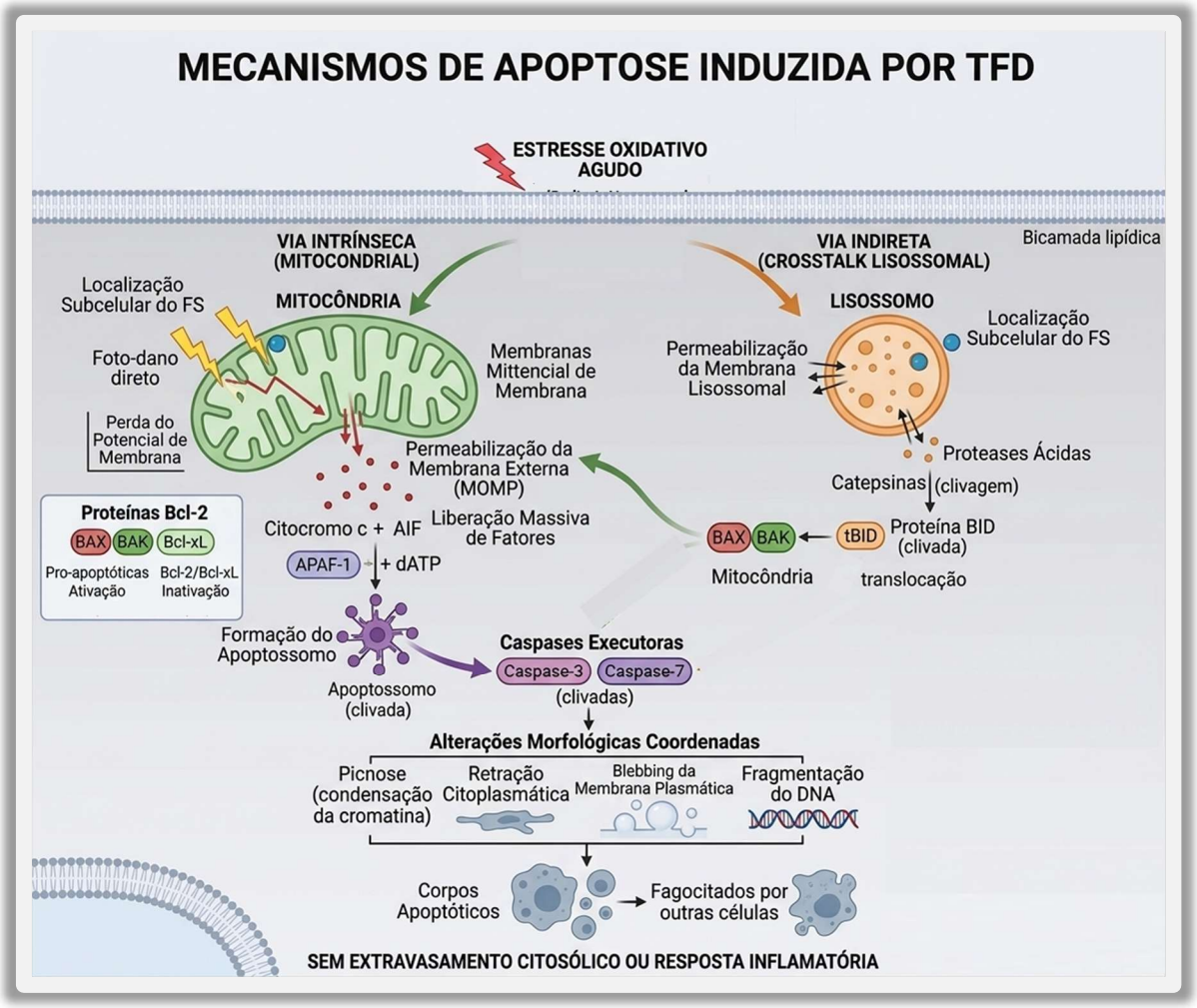


Figura 2 - Mecanismos de apoptose celular regulada induzida por Terapia Fotodinâmica. Gerada pelo autor com o auxílio do modelo de Inteligência Artificial Gemini da Google (2026).

Simultaneamente, a eficácia dessa via depende do balanço de proteínas da família Bcl-2: enquanto membros antiapoptóticos como Bcl-2 e Bcl-xL tentam antagonizar a formação de poros mitocondriais, a sua inativação por foto-oxidação direta ou clivagem enzimática anula sua função protetora, acelerando a degradação proteica estrutural e a fragmentação genômica (KESSEL; OLEINICK, 2018; MOYER; TANAKA; CHENG, 2025).

Apesar da robustez desse mecanismo, a resistência à apoptose permanece como um dos principais determinantes de falha terapêutica em tumores de alta agressividade (DANDOTI, 2021). Neoplasias avançadas contornam rotas de morte convencionais por meio de mutações no gene supressor tumoral TP53, redução na expressão de proteínas efetoras (como BAX/BAK) ou superexpressão de polipeptídeos antiapoptóticos (MOYER;

TANAKA; CHENG, 2025). Todavia, a capacidade da TFD de mimetizar danos foto-oxidativos diretos em organelas vitais, surge como uma ferramenta contundente na oncologia experimental (SORRIN et al., 2020). Ao induzir o estresse físico-químico imediato nas mitocôndrias e lisossomos, a terapia fotodinâmica contorna bloqueios transcricionais de sobrevida celular, restabelecendo a sinalização de morte em tumores previamente refratários (BACELLAR et al., 2015).

1.3.2 Mecanismos de indução da via autofágica na Terapia Fotodinâmica

A autofagia representa um processo catabólico homeostático, altamente conservado, responsável pela degradação e reciclagem de componentes citoplasmáticos, macromoléculas e organelas disfuncionais via sistema lisossomal (WHITE; DIPAOLA, 2009). No cenário oncológico, a autofagia exibe um caráter paradoxal de dupla face: atua como um mecanismo citoprotetor de sobrevivência sob condições de estresse metabólico ou hipóxia, permitindo que a célula recicle seus próprios constituintes para sustentar o bioenergetismo basal, mas também pode atuar como uma rota de morte celular programada (morte celular autofágica) quando induzida de forma massiva e persistente (SHINTANI; KLIONSKY, 2004; KROEMER; JAATTELA, 2005). Durante o tratamento antineoplásico, a transição entre o resgate de sobrevivência e a autofagia letal é governada pela extensão do estresse celular e pelo grau de integridade do aparato lisossomal (KESSEL et al., 2020).

A orquestração molecular do fluxo autofágico (Figura 3) é rigidamente controlada por uma rede de sinalização *upstream* que monitora o estado energético celular. Sob homeostase, a via da fosfoinositídeo 3-quinase/proteína quinase B/alvo mecânico da rapamicina (PI3K/AKT/mTOR) mantém a autofagia reprimida (WEI et al., 2014). O estresse oxidativo agudo gerado pelas EROs pós-TFD atua como um potente modulador desse eixo, promovendo a inibição da mTOR ou a ativação direta da proteína quinase ativada por AMP (AMPK) (EGAN et al., 2011; KIM et al., 2011). Ambos os estímulos convergem para a ativação do complexo iniciador ULK1/ATG13/FIP200, que se transloca para domínios específicos da membrana do retículo endoplasmático, recrutando a

proteína transmembranar ATG9 para fornecer os lipídeos necessários à montagem do fagóforo inicial (ORSI et al., 2012; KARANASIOS et al., 2016).

Na fase subsequente de nucleação e expansão da membrana, a ativação do complexo PI3K de classe III (composto por Vps34, Vps15 e Beclin-1) gera bolsões locais de fosfatidilinositol-3-fosfato (PI3P), os quais recrutam proteínas efetoras como WIPI2 (ITAKURA; MIZUSHIMA, 2010). O alongamento do fagóforo para a formação do autofagossomo de dupla membrana depende crucialmente de dois sistemas de conjugação semelhantes à ubiquitinação: o complexo ATG5–ATG12–ATG16L1 e a clivagem mediada por ATG7 e ATG3 da proteína citosólica LC3-I. Esse processo resulta na lipidação da LC3-I através de sua conjugação à fosfatidiletanolamina, gerando a forma hidrofóbica LC3-II. A LC3-II ancora-se firmemente em ambas as faces da membrana do autofagossomo nascente, servindo como o marcador molecular padrão-ouro para a quantificação do fluxo e maturação desta organela vesicular (MARTINS et al., 2021).

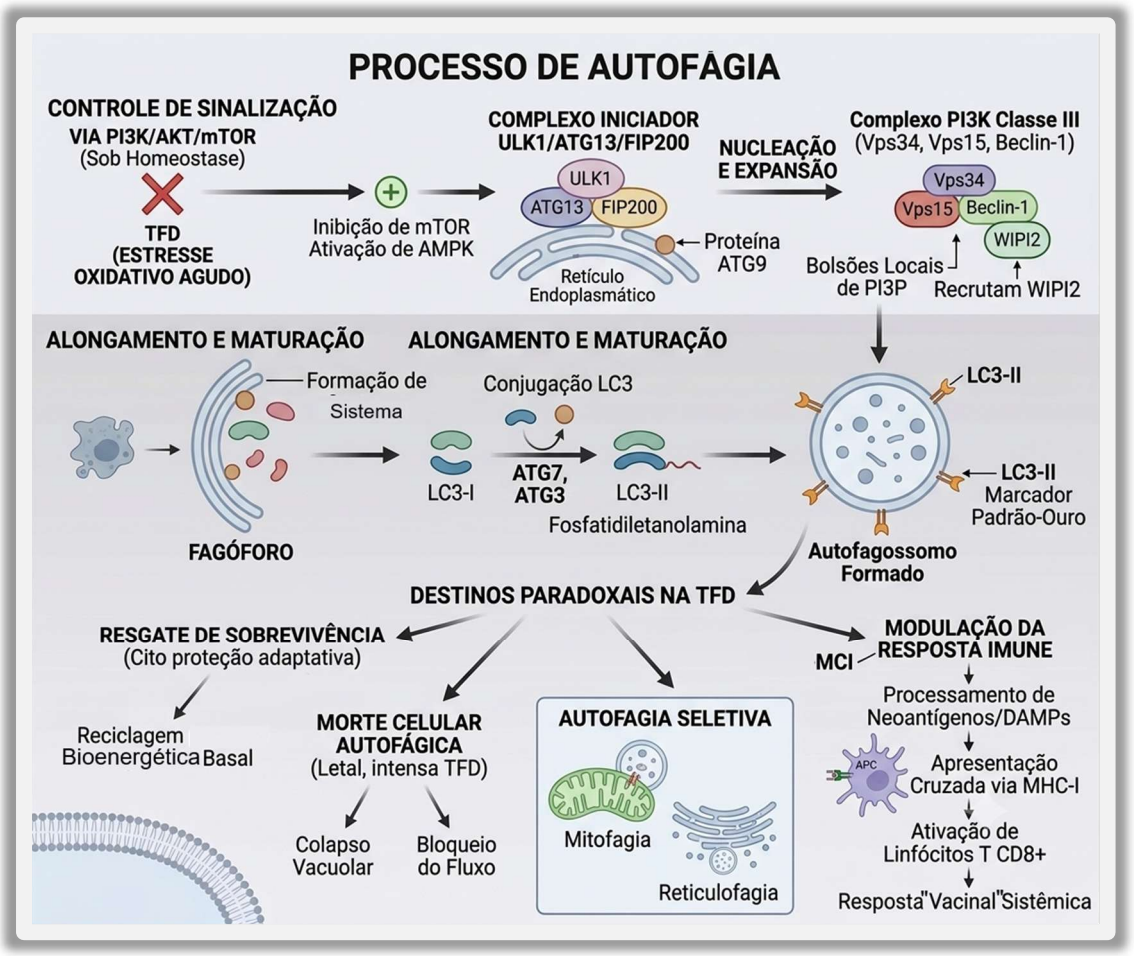


Figura 3 - Mecanismos de autofagia celular regulada induzida por Terapia Fotodinâmica. Gerada pelo autor com o auxílio do modelo de Inteligência Artificial Gemini da Google (2026).

No contexto da TFD, a ativação da maquinaria autofágica está intimamente ligada à localização intracelular do fotossensibilizador e à dosimetria da irradiação (SORRIN et al., 2020). Quando o FS acumula-se primariamente nos lisossomos, a fotoativação pode promover a fotodegradação parcial de hidrolases e a permeabilização moderada da membrana lisossomal (LMP). Se o foto-dano for subletal, a autofagia é disparada como um mecanismo adaptativo de citoproteção, limpando os detritos gerados e impedindo a deflagração da apoptose, especialmente em células tumorais que apresentam deleção de eixos efetores como Bax ou Caspase-3 (CODOGNO; MEIJER, 2005; ANIOGO; GEORGE; ABRAHAMSE, 2020). Contudo, se o estímulo fotodinâmico for intenso, ocorre o colapso do sistema vacuolar: os autofagossomos acumulam-se sem conseguir fundirem-se a lisossomos disfuncionais, bloqueando o fluxo catabólico e forçando a célula tumoral a evoluir para a morte (SHI et al., 2018).

Adicionalmente, o estresse foto-oxidativo organela-específico pode induzir modalidades de autofagia seletiva voltadas ao resgate celular. Quando a integridade mitocondrial é parcialmente comprometida pelo tratamento, a célula ativa a mitofagia, um processo seletivo de eliminação de mitocôndrias despolarizadas para evitar o vazamento de fatores pró-apoptóticos e a produção exacerbada de radicais livres endógenos (AGOSTINIS et al., 2011). De modo análogo, o acúmulo de FS no retículo endoplasmático ativa a sua autofagia seletiva, denominada reticulofagia. Esse mecanismo é coordenado por receptores residentes da membrana do retículo, como RETREG1 (FAM134B) e CCPG1, que se ligam diretamente à LC3-II ancorada no fagóforo para isolar os subdomínios proteicos oxidados (MARTINS et al., 2021).

Para além de sua participação direta no balanço entre a sobrevivência e a letalidade celular, a maquinaria autofágica atua de forma ativa na modulação da resposta imune antitumoral. No contexto da MCI deflagrada pela fototerapia, os autofagossomos servem como plataformas eficientes para o processamento e o tráfego de antígenos tumorais (NATH; OBAID; HASAN, 2019). Fragmentos proteicos de células neoplásicas em degeneração, encapsulados pelas vesículas autofágicas, são direcionados ao compartimento lisossomal para proteólise controlada, otimizando a secreção de DAMPs e o processamento de neoantígenos (MARTINS et al., 2021). Esse microambiente enriquecido estimula o recrutamento de células apresentadoras de antígenos (APCs), como as células dendríticas, facilitando o fenômeno de apresentação cruzada (*cross-presentation*), onde peptídeos tumorais internalizados são expostos via complexo principal de histocompatibilidade de classe I (MHC-I) para a ativação clonal e expansão de linfócitos T CD8+ citotóxicos (GARG; AGOSTINIS, 2017). Dessa forma, a manutenção do fluxo autofágico basal ou induzido atua como um elo molecular crítico para converter a destruição tumoral local em uma resposta vacinal sistêmica e duradoura.

Evidências experimentais recentes confirmam a relevância biológica desse eixo molecular especificamente quando modulado pelo AM. Em ensaios utilizando modelos de adenocarcinoma prostático altamente agressivo (PC3), observou-se que a AM-TFD promoveu um incremento robusto e dose-dependente na formação de vacúolos autofágicos positivos para LC3-II, confirmando o papel da terapia como um indutor direto desse fenótipo vacuolar

(GOMES et al., 2023). De forma homóloga, investigações focadas no mapeamento espacial do FS em linhagens de adenocarcinoma mamário demonstraram que, contrariando o perfil lipofílico clássico de outros agentes, as mitocôndrias não representavam o sítio primário de ancoragem do AM (dos SANTOS et al., 2017). Em contrapartida, o composto exibiu um tropismo pelo sistema endossomal-lisossomal (dos SANTOS et al., 2017).

Essa compartimentação preferencial nos lisossomos justifica a propensão da AM-TFD em deflagrar processos autofágicos por estresse de organela, reforçando o paradigma de que os desfechos biológicos da fototerapia não são randômicos, mas sim estritamente condicionados pelas propriedades químicas do fármaco, por sua compartimentação citoplasmática, pela densidade de energia luminosa entregue e pelo perfil intrínseco da célula-alvo (ANIOGO et al., 2020).

1.3.3 Mecanismos de indução da via necroptose na Terapia Fotodinâmica

Embora a apoptose seja classicamente descrita como a rota preferencial de eliminação celular em terapias oncológicas, a evasão desse mecanismo por tumores agressivos exige a ativação de vias alternativas de morte celular regulada. Dentre estas, a necroptose tem se destacado como uma via contundente para a superação de fenótipos de multirresistência a fármacos (dos SANTOS et al., 2017). Conceitualmente caracterizada em meados da década de 2000 como uma modalidade de necrose programada e geneticamente controlada, a necroptose difere da necrose acidental por depender de um aparato enzimático específico, mimetizando a apoptose em sua sinalização, mas resultando na rápida permeabilização da membrana plasmática, inchaço organelar e lise celular (KACZMAREK; VANDENABEELE; KRYSKO, 2013).

A ativação da via necroptótica é governada por uma fina regulação molecular complexa, frequentemente iniciada por receptores de morte (como os receptores de TNF) ou sensores de estresse oxidativo intracelular (HOLLER et al., 2000; TANG et al., 2019). O ponto de inflexão que desvia o destino celular da apoptose para a necroptose reside na atividade da enzima caspase-8 (MISHCHENKO et al., 2022). Sob estresse foto-oxidativo severo induzido

pela TFD, ocorre a inibição ou o bloqueio da atividade catalítica da Caspase-8. Na ausência de clivagem mediada por esta caspase, a serina/treonina quinase 1 induzida por receptor (RIPK1) não é clivada, permitindo seu recrutamento e auto-fosforilação para a montagem de um complexo multiproteico citoplasmático conhecido como complexo II ou necrossomo (TANG et al., 2019).

Uma vez estruturado o necrossomo, a RIPK1 recruta e interage com a serina/treonina quinase 3 (RIPK3), promovendo a sua homofosforilação. Na sequência da cascata, a RIPK3 ativada atua diretamente sobre a MLKL, induzindo a sua fosforilação (pMLKL) (GOMES et al., 2023). A fosforilação da MLKL promove sua oligomerização em complexos multiméricos que se translocam do citosol em direção à membrana plasmática. A inserção desses oligômeros de pMLKL na bicamada lipídica desestabiliza a integridade física da membrana, mediando a abertura de poros transmembranares hidrofílicos que colapsam o potencial osmótico e deflagram o extravasamento massivo do conteúdo citoplasmático (MARTINEZ-OSORIO et al., 2023) (Figura 4).

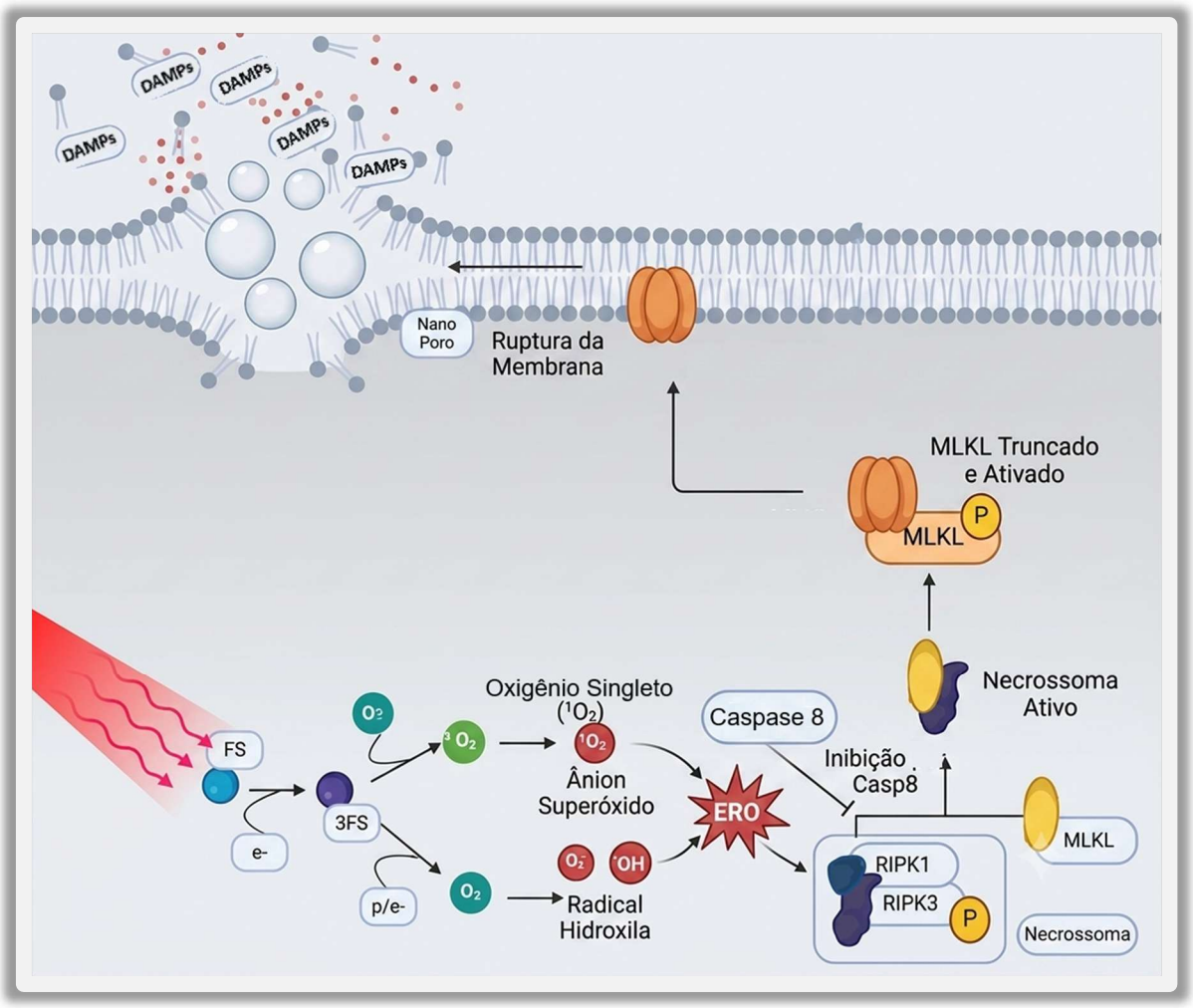


Figura 4 - Mecanismos de necroptose celular regulada induzida por Terapia Fotodinâmica. Criado com BioRender®. (de Souza *et al*., 2024).

O grande diferencial biológico da execução da necroptose no microambiente tumoral reside no seu caráter intrinsecamente pró-inflamatório, o qual atua como um potente gatilho para a MCI (MISHCHENKO et al., 2022). Em decorrência da ruptura física da membrana induzida pelos poros de pMLKL, ocorre a liberação maciça e desimpedida de DAMPs no meio extracelular, HMGB1, ATP, CRT, Erp57, HSP e vasostatina (ATAMNA et al., 2008; BUZGA et al., 2022).

Paralelamente à liberação desses sinais de perigo, o foto-dano promove a supressão de marcadores de evasão imune na superfície da célula tumoral, como o sinal de "não me coma" (do inglês *“don’t eat me”*) codificado pela proteína CD47 (ZHANG et al., 2021). Esse rearranjo molecular e o incremento

de quimiocinas inflamatórias sinalizam eficientemente para o sistema imune inato. As células apresentadoras de antígenos, especificamente as células dendríticas, fagocitam os remanescentes tumorais e sofrem um processo de maturação fenotípica, caracterizado pela superexpressão das moléculas coestimulatórias CD80 e CD86 (GARG; AGOSTINIS, 2017). Consequentemente, as células dendríticas maduras migram aos linfonodos e realizam a apresentação antigênica cruzada para os linfócitos T, estabelecendo uma imunidade adaptativa antitumoral sistêmica e de longo prazo, capaz de erradicar micrometástases e mitigar os riscos de recorrência tumoral (ATAMNA et al., 2008; BUZGA et al., 2022).

1.3.4 Mecanismos de indução da ferroptose na Terapia Fotodinâmica

A ferroptose constitui uma modalidade de morte celular regulada estritamente dependente de ferro e caracterizada pelo acúmulo deletério de peróxidos lipídicos nas membranas biológicas, culminando no colapso da integridade celular (DIXON et al., 2012). Na oncologia translacional, essa via tem despertado considerável interesse devido à sua capacidade de contornar e eliminar clones tumorais refratários aos estímulos apoptóticos clássicos (AGOSTINIS et al., 2011). No que se refere à TFD, a ferroptose consolida-se como um desfecho citotóxico proeminente, uma vez que a cascata fotofísica baseia-se na geração massiva de EROs capazes de desencadear danos oxidativos severos e imediatos na bi camada lipídica (STOCKWELL et al., 2020).

O início desse processo (Figura 5) ocorre quando a transferência de energia do FS fotoativado gera $^1O_2$ e radicais livres nas proximidades das membranas celulares ou organelares. Essas EROs atacam preferencialmente os fosfolipídios que contêm ácidos graxos poli-insaturados, disparando uma reação em cadeia de abstração de hidrogênio e formação subsequente de radicais e hidroperóxidos lipídicos (STOCKWELL et al., 2020). A propagação dessa oxidação é catalisada de forma crítica pelo *pool* de ferro intracelular livre; os íons ferrosos (Fe^{2+}) reagem com os hidroperóxidos via reação de Fenton, gerando radicais alcoxila e peroxila altamente reativos que retroalimentam o ciclo de destruição da membrana. Adicionalmente, metaloenzimas

dependentes de ferro, como as lipoxigenases, atuam de forma sinérgica na oxidação programada dos lipídios estruturais, tornando linhagens tumorais com distúrbios no metabolismo férrico ou com elevados estoques de ferro lábil particularmente vulneráveis à TFD (JIANG et al., 2021).

Para mitigar o estresse lipídico, as células coordenam sistemas de defesa enzimática, centralizados na atividade da Glutationa Peroxidase 4 (GPX4) (YANG et al., 2014; ZOU et al., 2019). A GPX4 atua convertendo hidroperóxidos lipídicos citotóxicos em álcoois lipídicos inertes, utilizando a glutationa reduzida como cofator essencial para interromper a peroxidação (YANG et al., 2014). No entanto, o estresse foto-oxidativo agudo promovido pela TFD exaure rapidamente as reservas citoplasmáticas de glutationa reduzida devido ao consumo acelerado frente à onda de radicais livres. Sob condições de sobrecarga funcional e depleção do substrato glutationa, a atividade catalítica da GPX4 é severamente comprometida. Desse modo, mesmo diante de mecanismos transcricionais compensatórios de sobre-expressão enzimática, a taxa de peróxidos formados supera o limiar antioxidante celular, conduzindo a célula a um ponto de não retorno termodinâmico (ZOU et al., 2019).

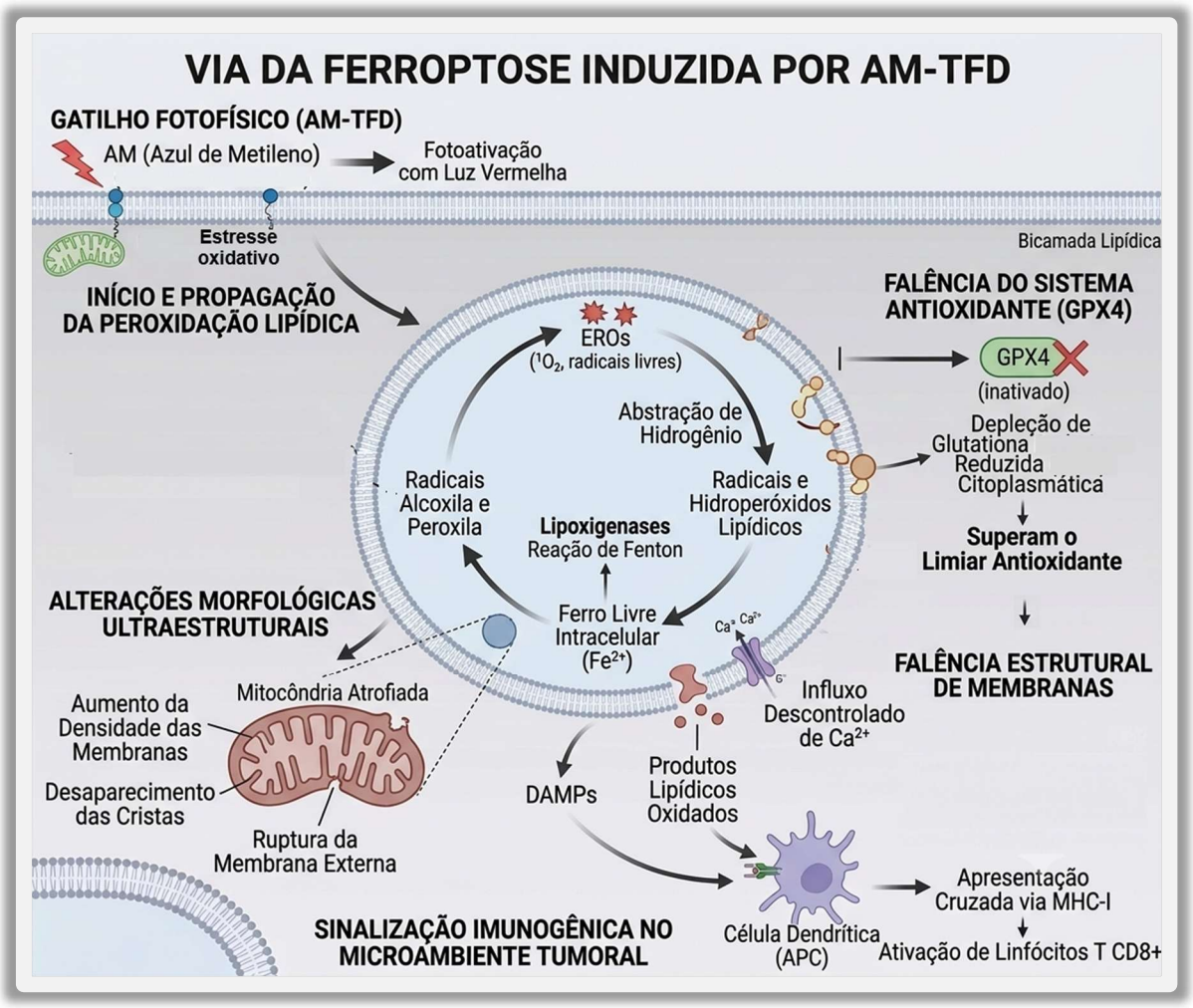


Figura 5 - Mecanismos de ferroptose celular regulada induzida por Terapia Fotodinâmica. Gerada pelo autor com o auxílio do modelo de Inteligência Artificial Gemini da Google (2026).

Ao contrário da apoptose, que envolve o desmonte enzimático ordenado por caspases, a ferroptose expressa-se essencialmente como uma falência estrutural de membranas. A oxidação extensiva de fosfolipídios altera drasticamente a fluidez, a curvatura e a permeabilidade da bicamada, resultando no influxo descontrolado de Ca^{2+}, perda da homeostase iônica e disfunção bioenergética. Em nível ultraestrutural, as mitocôndrias sofrem uma remodelação morfológica: exibem redução acentuada do volume vacuolar (*shrunken mitochondria*), aumento da densidade eletrônica de suas membranas, redução ou desaparecimento completo das cristas mitocondriais e ruptura física da membrana externa (JIANG et al., 2021).

No contexto específico da AM-TFD, as propriedades físico-químicas do AM potencializam a indução dessa rota molecular. Por ser uma molécula fenotiazínica de natureza catiônica e caráter anfifílico, o AM exibe alta afinidade

eletrostática por membranas biológicas carregadas negativamente, acumulando-se preferencialmente no sistema endomembranar e em cristas mitocondriais (dos SANTOS et al., 2017; MISHCHENKO et al., 2022). Sob irradiação na faixa do vermelho, a produção localizada de $^1O_2$ ocorre em íntima proximidade com as cadeias de ácidos graxos poli-insaturados dessas organelas, precipitando a cascata de peroxidação lipídica e o consequente colapso mitocondrial e celular por ferroptose (ANIOGO et al., 2020; GOMES et al., 2023).

Adicionalmente ao dano parenquimatoso direto, a morte por ferroptose inicia uma robusta sinalização imunogênica no microambiente tumoral. Semelhante a necroptose, o colapso físico e a lise celular promovem a liberação de DAMPs, acompanhados de produtos lipídicos oxidados que atuam como quimiotrativos (JIANG et al., 2021). Essa liberação de moléculas também recrutam e ativam as células dendríticas, que ao internalizarem esses remanescentes tumorais, sofrem maturação e coordenam a apresentação cruzada de neoantígenos para linfócitos T CD8+, integrando a citotoxicidade foto-oxidativa local à indução de uma resposta antitumoral sistêmica adaptativa (GARG; AGOSTINIS, 2014; JIANG; STOCKWELL; CONRAD, 2021).

1.4 Modelo Experimental 4T1 (RRID:CVCL_0125)

A linhagem celular 4T1 (RRID:CVCL_0125) consiste em um modelo experimental amplamente consolidado para o estudo do adenocarcinoma mamário espontâneo altamente agressivo. Derivada originalmente do tecido da glândula mamária de camundongos *Mus musculus* da linhagem BALB/c, esta cepa exibe morfologia epitelial e crescimento aderente *in vitro* (LELEKAKIS et al., 1999). Quando implantadas em modelos *in vivo*, as células 4T1 reproduzem características relevantes do carcinoma mamário humano avançado, particularmente no que se refere à agressividade, invasividade e capacidade de disseminação metastática, caracterizando-se por uma proliferação epitelial maligna arranjada em blocos sólidos, pleomorfismo celular acentuado e um índice mitótico criticamente elevado (SOUZA, 2013; CELLOSAURUS, 2025). O isolamento pioneiro dessa linhagem baseou-se na seleção por resistência nativa à 6-tioguanina, obtida de forma espontânea e sem a intervenção de

agentes mutagênicos químicos, preservando a estabilidade cariotípica e fenotípica do tumor (LELEKAKIS et al., 1999).

A principal relevância translacional do modelo 4T1 reside em sua extraordinária capacidade tumorigênica e no perfil de metástase espontânea (BAIROCH, 2018). Quando inoculadas no coxim gorduroso mamário (*fat pad*) de camundongos BALB/c imunocompetentes, estas células desencadeiam um crescimento tumoral primário agressivo que mimetiza com precisão o curso clínico humano. Mesmo diante de intervenções terapêuticas ou ressecções cirúrgicas do tumor primário, a linhagem mantém uma cinética de disseminação sistêmica contínua, desenvolvendo micrometástases em órgãos vitais distantes, tais como pulmões, fígado, linfonodos e cérebro (DEXTER et al., 1978; ASLAKSON; MILLER, 1992). Clinicamente, o grande diferencial técnico decorrente de sua resistência intrínseca à 6-tioguanina é a viabilidade de realizar ensaios de clonogenicidade *ex vivo*: a aplicação do quimioterápico nos tecidos dos órgãos afetados permite purificar e quantificar focos metastáticos incipientes com altíssima sensibilidade (PULASKI; OSTRAND-ROSENBERG, 2000).

Outro aspecto de elevada relevância para a caracterização do modelo 4T1 é seu fenótipo molecular compatível com o câncer de mama triplo-negativo (*triple-negative breast cancer*, TNBC), caracterizado pela ausência de expressão dos receptores de estrogênio (ER), progesterona (PR) e do receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2/ErbB2) (SCHRÖRS et al., 2020). A ausência desses três principais alvos moleculares empregados na classificação e no direcionamento terapêutico das neoplasias mamárias confere ao modelo características particularmente relevantes para o estudo de tumores biologicamente agressivos e com opções terapêuticas direcionadas mais restritas.

Para a manutenção dos ensaios *in vitro*, o cultivo celular padronizado exige o emprego de meio RPMI-1640 modificado, suplementado com 2 mM de L-glutamina, 1 mM de piruvato de sódio, 4.500 mg/L de glicose e soro fetal bovino (SFB) a uma concentração final de 10% (BCRJ, s.d.). O perfil de proliferação celular ideal requer a manutenção das culturas em condições controladas de incubação a 37 °C, sob atmosfera umidificada contendo 95% de ar atmosférico e 5% de dióxido de carbono (CO_2).

Do ponto de vista imunológico, o modelo destaca-se por expressar níveis fisiológicos basais de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade de classe I (MHC-I) e níveis indetectáveis de MHC-II na ausência de estímulos pró-inflamatórios (PULASKI; OSTRAND-ROSENBERG, 2000). Esta assinatura molecular torna as células 4T1 alvos biológicos ideais e responsivos para o reconhecimento citotóxico mediado por linfócitos T CD8+. Consequentemente, o modelo 4T1/BALB/c firma-se como o padrão-ouro internacional para investigações que correlacionam a citotoxicidade tumoral direta local a estratégias de imunoterapia, permitindo avaliar o ganho de sobrevida sistêmica sob um sistema imune funcional e íntegro (PULASKI; OSTRAND-ROSENBERG, 2000).

1.5 Justificativa

Apesar do sólido avanço no mapeamento molecular de agentes fotodinâmicos na última década, a translação clínica da AM-TFD enfrenta impasses significativos. O principal desafio reside na ausência de padronização internacional dos protocolos dosimétricos, observando-se uma disparidade crítica na literatura biomédica quanto às concentrações ideais do FS e às densidades de energia e taxas de fluência de luz aplicadas. Essa variabilidade metodológica compromete a reprodutibilidade dos dados e dificulta a correlação dose-resposta necessária para predizer qual via de morte celular regulada, apoptose, autofagia, necrose ou necroptose, será prioritariamente ativada no parênquima tumoral (MISHCHENKO et al., 2022; de SOUZA et al., 2024).

Embora haja evidências de que a AM-TFD orquestre múltiplas rotas de morte celular, permanecem lacunas sobre como essas janelas de tratamento influenciam a transição do resgate adaptativo para o colapso celular irreversível *in vivo*. Atualmente, a TFD possui status regulatório aprovado para o tratamento de diversas condições oncológicas malignas em agências internacionais regulatórias nos Estados Unidos (FDA), Canadá, União Europeia, Japão e Rússia.

No cenário nacional brasileiro, a técnica atingiu um marco histórico recente com a recomendação da Comissão Nacional de Incorporação de

Tecnologias no Sistema Único de Saúde (Conitec), tornando o Brasil pioneiro na inclusão da TFD em um sistema público de saúde universal (BUZZÁ et al., 2019; BAGNATO, REQUENA, 2023). Contudo, essa incorporação permanece estritamente restrita ao manejo de carcinomas cutâneos não-melanoma superficiais (ISSA, MANELA-AZULAY, 2010). Essa delimitação clínica reflete entraves econômicos e estruturais da oncologia nacional, visto que os fotossensibilizadores comerciais de alta eficiência para uso sistêmico ou intracavitário são importados e de alto custo para a tabela de repasses do SUS, sendo a atual viabilidade na rede pública dependente de insumos e plataformas de emissão de luz desenvolvidas por centros nacionais de pesquisa. Em contrapartida, a vertente antimicrobiana da técnica (a-PDT) encontra-se amplamente consolidada e disseminada na prática odontológica nacional, sendo rotineiramente empregada como recurso terapêutico coadjuvante no controle microbiológico devido ao uso de corantes de baixo custo, como o azul de metileno (CARRERA et al., 2016).

Portanto, torna-se necessário elucidar os mecanismos celulares relacionados à diferentes tipos de mortes desencadeadas pela AM-TFD utilizando um modelo experimental de câncer de mama triplo-negativo 4T1. Ao determinar as condições ótimas de concentração, tempo de incubação e entrega de energia pela luz, este trabalho busca fornecer resultados para auxiliar no conhecimento dos tipos de mortes, quimiorresistência local e mitigar a progressão metastática, auxiliando assim na expansão dessa modalidade terapêutica na oncologia.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar os mecanismos de morte celular induzidos pela terapia fotodinâmica mediada por azul de metileno (AM-TFD), comparando duas diferentes concentrações do fotossensibilizador, em modelos *in vitro* e *in vivo* de carcinoma mamário murino (linhagem 4T1).

2.2 Objetivos Específicos

- Estabelecer a relação dose-resposta da irradiação com laser vermelho (660 nm) e determinar a cinética de internalização celular do azul de metileno;
- Avaliar o impacto do estresse foto-oxidativo na migração das células 4T1;
- Investigar o perfil de expressão de genes associados às vias de apoptose, autofagia, necroptose e ferroptose por meio de PCR em tempo real (RT-PCR);
- Determinar a participação das vias de autofagia, necroptose e ferroptose na citotoxicidade da AM-TFD por meio do bloqueio farmacológico seletivo *in vitro*;
- Caracterizar as alterações histopatológicas, arquitetura tecidual, índice mitótico e o perfil de progressão ou regressão do tumor primário em modelo *in vivo* utilizando camundongos BALB/c;
- Avaliar a expressão de proteínas executoras de apoptose, autofagia e necroptose por técnicas de imuno-histoquímica nos tecidos tumorais *in vivo*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Fotossensibilizador

Soluções de Azul de Metileno (AM) (Sigma-Aldrich/Merck, CAS nº 122965-43-9, pureza de 95%) foram preparadas utilizando-se meio de cultura basal, desprovido de suplementação com soro fetal bovino (SFB), em concentrações seriadas variando de 5 a 150 μM (Figura 6). Com o intuito de padronizar o intervalo ideal para a internalização celular do fotossensibilizador antes da fotoativação, foram avaliados três tempos distintos de incubação: 10, 15 e 30 minutos. Esses intervalos de tempo e gradientes de concentração foram testados de forma comparativa tanto na ausência de luz (toxicidade no escuro) quanto após a irradiação laser (eficiência fotodinâmica). Imediatamente após o preparo, todas as soluções foram esterilizadas por filtração em membranas com porosidade de 0,22 μM.

A partir dos dados obtidos nas curvas de triagem inicial, o tempo de 30 minutos de incubação foi estabelecido como o período padrão de internalização para os experimentos definitivos. Sob este intervalo cinético, as concentrações de 25 e 50 μM foram selecionadas como as doses de trabalho do estudo, de acordo com os achados prévios da literatura (GOMES et al., 2023).

A concentração de 25 μM foi padronizada por representar o limiar máximo de segurança biológica, no qual o fotossensibilizador não manifestou toxicidade na ausência de luz (*dark toxicity*). Por sua vez, a concentração de 50 μM embora tenha exibido uma tendência à citotoxicidade no escuro ($p>0,05$), demonstrou elevada eficiência fotodinâmica quando submetida à irradiação, justificando sua inclusão para avaliar os mecanismos de morte regulada sob estresse foto-oxidativo severo.

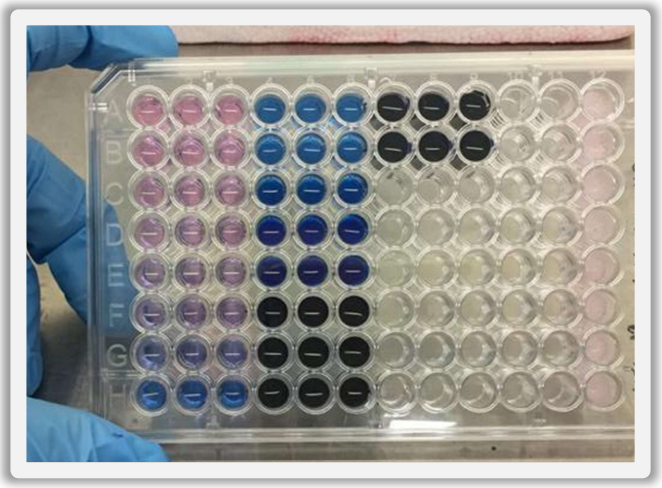


Figura 6 - Disposição experimental em placa de 96 poços para triagem de citotoxicidade do azul de metileno. As colunas ilustram o gradiente de diluição seriada do fotossensibilizador em meio de cultura e o mapeamento dos grupos experimentais antes da etapa de irradiação. Fonte: Acervo pessoal.

3.2 Laser de Baixa Potência

Para a fotoativação do azul de metileno, utilizou-se um equipamento emissor de laser de diodo semicondutor no espectro visível do vermelho (Photon Lase III, D.M.C. Equipamentos Ltda., São Carlos, SP, Brasil), operando em modo contínuo. O equipamento foi posicionado de forma perpendicular à superfície superior das placas de cultivo (*in vitro*) ou em contato com a pele do animal (*in vivo*), mantendo uma distância fixa e padronizada entre a mão e as células em todas as sessões de tratamento. O os parâmetros biofísicos de entrega de energia foram tabulados e padronizados para ambos os modelos experimentais, conforme detalhado na Tabela 1.

Tabela 1: Parâmetros físicos do laser utilizados nos modelos experimentais.

Comprimento de onda	660 nm
Laser de diodo	InGaAlP
Potência	100 mW
Área do ponto	0.028 cm²
Energia por ponto	2.8 J
Densidade de energia	100 J/cm²
Irradiância	3,57 W/cm^2
Tempo por ponto	28s
Número de pontos	1
Técnica de aplicação	Perpendicular (contato com a placa superior)
Número de sessões de tratamento	Uma (*in vitro*) ou duas (*in vivo*)

3.3 Modelo Experimental in Vitro

Para a realização dos ensaios biológicos, as células da linhagem de 4T1 foram descongeladas e expandidas em garrafas de cultivo de 75cm^2. Subsequentemente, as células foram tripsinizadas, centrifugadas e semeadas em placas de microtitulação de 96 poços na densidade de 1 x 10^4. Foi utilizado o meio RPMI-1640 (Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de solução mista de antibióticos (100 U/mL de penicilina e 100 ug/mL de estreptomicina; Gibco™). As culturas foram mantidas em condições fisiológicas estáveis a 37 °C, sob atmosfera umidificada contendo 5% de dióxido de carbono (CO_2). Após o período de 24 horas destinado à adesão e estabilização celular, os poços foram lavados e submetidos aos respectivos tratamentos.

3.4 Incubação com AM e Irradiação com Laser de Baixa Potência

Previamente aos ensaios fotodinâmicos, as células 4T1 foram monitoradas até atingirem uma confluência de aproximadamente 80%. Para a etapa de incorporação do fotossensibilizador, o meio de cultura completo foi

removido e as culturas foram lavadas com tampão fosfato-salino (PBS pH 7,4) para eliminar resíduos de proteínas do soro que pudessem mimetizar o AM.

O delineamento experimental foi estruturado a partir da distribuição das culturas em seis grupos distintos de análise:

- Grupo Controle (C): Células mantidas em meio de cultura basal, sem exposição ao fotossensibilizador ou à irradiação laser;
- Grupo Laser: Células submetidas exclusivamente à irradiação com laser vermelho, na ausência do fotossensibilizador;
- Grupo Azul de Metileno 25 μM (AM 25 μM): Células incubadas apenas com o fotossensibilizador na concentração de 25 μM mantidas no escuro;
- Grupo Azul de Metileno 50 μM (AM 50 μM): Células incubadas apenas com o fotossensibilizador na concentração de 50 μM mantidas no escuro;
- Grupo Terapia Fotodinâmica 25 μM (TFD 25 μM): Células incubadas com AM 25 μM e subsequentemente submetidas à irradiação laser;
- Grupo Terapia Fotodinâmica 50 μM (TFD 50 μM): Células incubadas com AM 50 μM e subsequentemente submetidas à irradiação laser.

Em seguida, as soluções de AM (25 e 50 uM) diluídas em meio RPMI foram adicionadas e as placas foram mantidas em incubação no escuro por um período 30 minutos.

Para mitigar artefatos experimentais decorrentes de reflexão óptica, refração lateral ou irradiação cruzada entre amostras adjacentes, adotou-se um isolamento espacial (Figura 7). Os grupos experimentais mantidos estritamente no escuro (Controles de Toxicidade no Escuro) e os grupos destinados à fotoativação (TFD) foram alocados em placas de microtitulação fisicamente independentes. Adicionalmente, nas placas submetidas à irradiação, a semeadura celular foi realizada em poços intercalados, utilizando-se poços vazios circundantes como barreiras ópticas físicas. Durante o procedimento de aplicação do laser, as paredes laterais dos poços vizinhos foram mascaradas com anteparos pretos opacos, garantindo que a entrega da densidade de

energia ocorresse de forma isolada, colimada e restrita exclusivamente ao poço sob tratamento. Após a irradiação, o meio contendo as soluções de AM foi removido, as células foram lavadas e preenchidas com meio de cultura completo para as análises dos desfechos biológicos nos tempos experimentais correspondentes.

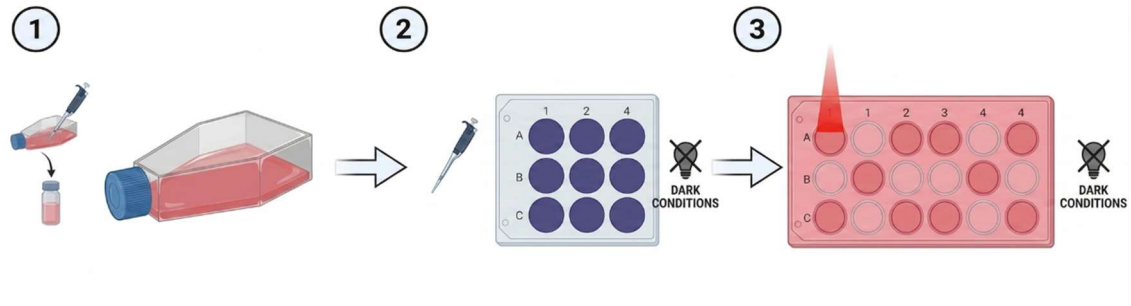


Figura 7 - Representação esquemática do procedimento experimental da Terapia Fotodinâmica mediada por Azul de Metileno (AM-TFD). (1) Cultivo e preparação das células até atingirem aproximadamente 80% de confluência. (2) Incubação com Azul de Metileno (AM) sob condições de ausência de luz, garantindo a integridade do grupo Controle Escuro e evitando a fotoativação não intencional do fotossensibilizador. (3) Irradiação laser do grupo submetido à AM-TFD, com as células distribuídas estrategicamente em poços não adjacentes, a fim de prevenir interferências causadas por luz dispersa ou irradiação cruzada entre as amostras.

3.5 Viabilidade Celular

A viabilidade celular foi quantificada 24 horas após os tratamentos fotodinâmicos e grupos controles. Considerando que o estresse foto-oxidativo severo pode induzir o desprendimento precoce de células em processo de morte celular regulada, as placas foram submetidas à centrifugação a 1500 rpm por 5 min à 4ºC em rotor apropriado para microplacas, assegurando a sedimentação de toda a população celular (aderente e em suspensão). Após a centrifugação, o sobrenadante foi cuidadosamente descartado e no *pellet* celular remanescente, foi adicionado a cada poço 10 µL de solução de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) (5 mg/mL) dissolvido em meio RPMI-1640. As culturas foram incubadas por um período de 150 minutos a 37 °C, sob atmosfera umidificada contendo 5% de CO_2.

Ao término do período de incubação, as placas foram centrifugadas novamente sob as mesmas condições previamente descritas para garantir a retenção dos cristais e *debris* celulares. O sobrenadante contendo o MTT residual não reagido foi inteiramente removido e foram adicionados 100 uL de dimetilsulfóxido (DMSO, grau analítico) em cada poço para promover a lise celular e a completa solubilização dos cristais insolúveis de formazana. As microplacas foram submetidas à agitação orbital suave por 10 minutos em abrigo da luz para homogeneização do soluto. A densidade óptica (DO) foi determinada por meio da leitura da absorbância em comprimento de onda de 595 nm em um espectrofotômetro de microplacas. Para validação estatística, foram executados cinco experimentos biológicos independentes, com triplicata técnica por grupo.

3.6 Concentração Intracelular do Azul de Metileno

Para determinar o perfil cinético de captação do fotossensibilizador, as células 4T1 foram semeadas em placas de microtitulação na densidade de 1 x 10^4 células por poço. Após o período de estabilização, as culturas foram incubadas com µL de meio de cultura basal contendo AM nas concentrações seriadas de 5 a 150 µM. Visando mapear a dinâmica de incorporação celular, foram avaliados de forma cruzada três tempos de incubação: 10, 15 e minutos. Ao término de cada intervalo, o sobrenadante foi aspirado e as monocamadas celulares foram lavadas por duas vezes consecutivas com PBS para a completa eliminação das moléculas de corante não internalizadas ou retidas fracamente na superfície externa da membrana plasmática.

Subsequentemente, para promover a lise celular por solvatação de membranas e a consequente liberação do AM estocado no compartimento intracelular, adicionou-se a cada poço 100 µL de uma solução do detergente aniônico dodecil sulfato de sódio (SDS) a 50mM dissolvido em água destilada. Os lisados celulares resultantes foram homogeneizados e transferidos para leitura.

A quantificação do AM internalizado foi determinada por espectrofotometria de microplacas a partir da mensuração da densidade óptica

no comprimento de onda de 655nm, correspondente ao pico máximo de absorbância espectral do fotossensibilizador em sistema monomérico.

Para corrigir a interferência da absorbância basal das células sobre a mensuração do AM, os valores obtidos nos poços contendo células incubadas com o fotossensibilizador foram corrigidos pela subtração da absorbância correspondente aos respectivos poços contendo apenas células, sem a adição de AM. Dessa forma, os valores corrigidos de absorbância a 655 nm foram utilizados como medida relativa da quantidade de AM presente no lisado celular, permitindo a comparação da captação intracelular do fotossensibilizador entre as diferentes concentrações e tempos de incubação avaliados.

3.7 Análise Ensaio de Cicatrização de "Ferida"

Para avaliar a capacidade de migração e o potencial invasivo da linhagem 4T1 após o estresse foto-oxidativo, realizou-se o ensaio de cicatrização de ferida (*wound healing assay*). As células foram semeadas em placas de cultura de 12 poços na densidade de 1 x 10^6 células por poço em 2 mL de meio RPMI-1640 completo, sendo mantidas a 37 °C em atmosfera umidificada com 5% de CO_2 por 48 horas até atingirem a confluência de 80 - 90%.

Após o período de incubação, a monocamada celular foi submetida à escarificação mecânica pontual. Utilizando-se uma ponteira estéril de micropipeta de 1000 µl posicionada perpendicularmente ao fundo do poço, foi realizado um risco linear longitudinal, conforme figura 8. Imediatamente após a escarificação, o meio foi aspirado e as culturas foram lavadas duas vezes consecutivas com tampão PBS para a remoção completa dos debris e das células flutuantes desprendidas pelo atrito mecânico.

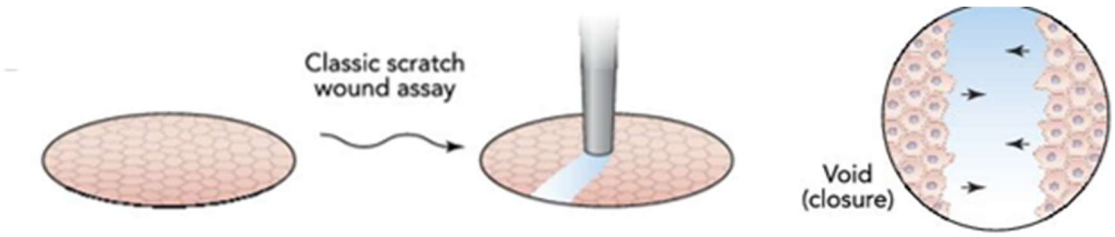


Figura 8 - Representação esquemática bidimensional do ensaio de cicatrização de ferida (*scratch wound healing assay*). O diagrama ilustra o princípio de escarificação mecânica da monocamada celular confluente com o auxílio de ponteira de micropipeta, delimitando uma área de denudação central (*void*) livre de células para a posterior avaliação quantitativa da cinética de migração lateral. Fonte: Gerada pelo autor com o auxílio do modelo de Inteligência Artificial Gemini da Google (2026).

Na sequência, os poços foram preenchidos com as soluções de trabalho de AM em meio basal por 30 minutos no escuro, seguidas dos respectivos protocolos de irradiação laser, conforme o delineamento dos grupos experimentais. Finalizada a etapa fotodinâmica, o meio de tratamento foi inteiramente removido e substituído por meio RPMI-1640 suplementado com concentração reduzida de soro fetal bovino (1% de SFB) e 1% de antibiótico. Essa restrição sérica foi estrategicamente adotada para induzir o estado de quiescência replicativa celular, assegurando que o preenchimento subsequente da área escarificada fosse decorrente de migração celular ativa e não de eventos proliferativos. A cinética de fechamento da ferida foi monitorada e fotodocumentada sob microscopia de luz invertida Nikon Eclipse TS 100 (Nikon, Japão), objetiva de 10x, nos tempos 0, 24h, 48h e 72h (tempo no qual houve o fechamento de todos os poços). A análise quantitativa da migração celular foi obtida através da redução do espaço aberto em comparação com os seus respectivos controles (somente poços com meio RPMI e tratados com laser), por meio do *software* Image Proplus (Media Cybernetics, China/Japão).

3.8 Extração de RNA e PCR em tempo real

O RNA total foi extraído de células 4T1 semeadas em placas de cultura de 12 poços na densidade de 1 × 10^6 células/cm^2 por poço, 24 horas após a incubação com AM-TFD nas concentrações de 25 e 50 μM, utilizando o reagente TRIzol® (Thermo Fisher Scientific, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Foram realizados cinco experimentos independentes

em triplicata. Após a coleta, as amostras foram armazenadas a −80 °C até o processamento. Posteriormente, foram adicionados 100 µL de clorofórmio (Merck, Alemanha) a cada amostra, que permaneceu incubada à temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm, a 4 °C, por 15 minutos. A fase aquosa foi cuidadosamente transferida para microtubos de 1,5 mL, aos quais foram adicionados 250 µL de isopropanol (Merck, Alemanha). Após incubação por 15 minutos à temperatura ambiente, as amostras foram novamente centrifugadas a 12.000 rpm, a 4 °C, por 15 minutos. Os sobrenadantes foram descartados e o RNA total precipitado foi ressuspendido em solução aquosa de dietilpirocarbonato (DEPC) a 0,1% (Merck, Alemanha). A concentração e a pureza do RNA foram determinadas por espectrofotometria utilizando o equipamento NanoDrop 1000 (NanoDrop Technologies, EUA). As amostras de RNA foram então armazenadas a −80 °C até sua utilização nas análises subsequentes.

A síntese de DNA complementar (cDNA) foi realizada utilizando o kit de transcriptase reversa SuperScript™ IV (Thermo Fisher Scientific, EUA). Para isso, 2 µg de RNA total foram submetidos à transcrição reversa em uma reação final de 20 µL, seguindo as recomendações do fabricante. A determinação dos níveis relativos de RNAm foi realizada por meio da reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR), conduzida em triplicata para cada amostra. Foram avaliados genes relacionados à apoptose (Caspase-3, Caspase-6, Bax e Bcl-2), à autofagia (LC3B), à necroptose (MLKL) e à ferroptose (GPX4). As sequências dos primers utilizados encontram-se apresentadas no Quadro 2. As reações foram realizadas em equipamento de RT-qPCR 7500 (Qiagen, EUA). Inicialmente, as amostras foram submetidas à desnaturação a 94 °C por 10 minutos. Em seguida, a amplificação foi conduzida por 40 ciclos, consistindo em desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 60 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 30 segundos. O gene β-actina (ACTB) foi utilizado como controle endógeno para normalização dos níveis de expressão dos genes-alvo. Os valores obtidos foram analisados no Microsoft Excel (Microsoft, EUA) utilizando o método comparativo do limiar de ciclo (Ct), expresso como 2^−ΔΔCt.

Quadro 2: Sequências dos primers utilizados nas reações de PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR).

Primers	Sequências	
	Forward	Reverse
ACTB	CATCCGTAAAGACCTCTATGCC	GGAGCCAGAGCAGTAATCTC
CASP-3	GGGAGCAAGTCAGTGGACTC	CCGTACCAGAGCGAGATGAC
CASP-6	GACGTGGTGGAAGGGCTAAA	AGTGTCACAAAAGGGGAGGC
BCL-2	TGGGTCTAGGAAAGGGGGAA	CGGGCTATTCACAATTCTGCC
BAX	CAAACTGGTGCTCAAGGCC	GGCTCACGGAGGAAGTCC
LC3B	GTCCTGGACAAGACCAAGTTCCC	CCATTCACCAGGAGGAAGAAGG
MLKL	CTGAGGGAACTGCTGGATAGAG	CGAGGAAACTGGAGCTGCTGAT
GPX4	CTTATCCAGGCAGACCATGTGC	CCTCTGCTGCAAGAGCCTCCC

3.9 Inibidores de morte celular

Com o objetivo de caracterizar os mecanismos de morte celular induzidos pela AM-TFD, foram empregados inibidores farmacológicos específicos: necrostatina-1s (Nec-1s; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA; 20 μM) para inibição da necroptose; ferrostatina-1 (Fer-1; Sigma-Aldrich; 1 μM) para inibição da ferroptose; e cloroquina (Sigma-Aldrich; 10 μM) como inibidor da autofagia.

Os inibidores foram adicionados às culturas de células 4T1 concomitantemente ao fotossensibilizador e mantidos em pré-incubação por 30 minutos. Após a aplicação do protocolo de irradiação, as células permaneceram incubadas por mais 24 horas em meio de cultura completo contendo os respectivos inibidores, até a realização das análises de viabilidade celular. Essa metodologia foi conduzida de acordo com protocolos previamente estabelecidos para a caracterização de diferentes modalidades de morte celular regulada (TURUBANOVA et al., 2019; dos SANTOS et al., 2020).

3.10 Detecção de fragmentação do DNA por ensaio de TUNEL

A ocorrência de clivagem e fragmentação do DNA, marcador tardio de morte celular regulada, foi avaliada por meio do ensaio histoquímico de marcação de extremidades livres (*Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling* — TUNEL), utilizando o kit comercial TUNEL POD (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanha). Para tanto, as células 4T1 foram semeadas na densidade de 1 x 10^6 células por poço sobre lamínulas circulares de vidro estéreis, previamente posicionadas no fundo de placas de cultura de 6 poços. Após atingirem 40% de confluência, as culturas foram submetidas aos respectivos tratamentos e mantidas em incubação por 24 horas.

Transcorrido o período experimental, o meio de cultura foi aspirado e as lamínulas contendo as células foram lavadas por duas vezes com tampão PBS pH 7,4. Subsequentemente, procedeu-se à fixação com solução de paraformaldeído a 4% tamponado, pH 7,4 por 30 minutos a 4 °C. Posteriormente, todo o material foi lavado com tampão PBS pH 7,4 por 2 vezes e incubado com solução bloqueadora de peroxidase endógena (3 ml peroxido de hidrogênio a 3% + 7ml de metaonol) por 30 min a temperatura ambiente.

Após lavagens subsequentes com tampão PBS pH 7,4, as amostras foram expostas à mistura reacional TUNEL, contendo a enzima recombinante terminal desoxinucleotidil transferase e o nucleotídeo modificado fluoresceína-dUTP, permanecendo em câmara umidificada por 1 hora a 37 °C. As lamínulas foram lavadas com PBS e incubadas com o reagente *Converter-POD* (anticorpo anti-fluoresceína conjugado à peroxidase de rábano) por 30 minutos a 37 °C. A reação imuno-histoquímica foi visualizada por meio do desenvolvimento de cor com o cromógeno 3,3′-diaminobenzidina (DAB; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) por 10 minutos à temperatura ambiente. As lamínulas foram contra coradas com verde de metila (0,5%), desidratadas, clarificadas e montadas sobre lâminas de microscopia com meio de montagem sintético. A análise quantitativa foi realizada por contagem manual de núcleos TUNEL-positivos em dez campos aleatórios por lamínula sob microscopia de luz (Microscópio Olympus BX53F equipado com objetivas U-PlanFL N 4×/0,13, 10×/0,30, 40×/0,75 e 100×/0,85. As imagens foram capturadas utilizando uma câmera Olympus DP73 e o software CellSens Imaging - versão 5.1, Olympus,

EUA). Todos os procedimentos foram validados a partir de três experimentos independentes.

3.11 Modelo experimental in vivo de carcinoma mamário

Fêmeas de camundongos da linhagem BALB/c, isogênicas, com peso corporal entre 20-25 g e idade aproximada de quatro semanas, foram obtidas junto ao Centro de Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Juiz de Fora (CBR/UFJF). Os animais foram alojados em microisoladores sob condições controladas de biotério, mantendo-se a temperatura estável a 22 ± 2 °C e ciclo artificial de 12 horas claro/escuro. A dieta consistiu em ração comercial peletizada padrão e água filtrada, fornecidas *ad libitum*. Todos os protocolos experimentais que envolveram a manipulação animal foram rigorosamente analisados e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFJF (CEUA/UFJF, protocolo nº 034/2023).

Para a indução do crescimento tumoral, realizou-se a inoculação de 1,5 x 10^6 células 4T1 viáveis, ressuspendidas em 100 µL de PBS estéril. A suspensão celular foi injetada no tecido adiposo da glândula mamária abdominal esquerda (Figura 9), utilizando-se seringas de insulina estéreis equipadas com agulhas de calibre 26G (0,45 x 13 mm). O procedimento foi bem tolerado pelos animais, sem registros de intercorrências ou mortalidade imediata. A taxa de estabelecimento tumoral foi de 92%, com o desenvolvimento macroscópico da massa neoplásica consolidado em 23 dos 25 animais inoculados dentro do intervalo de 14 dias.

Os animais foram monitorados e o peso corporal foi aferido periodicamente em balança analítica de precisão. O início das intervenções terapêuticas foi padronizado no 14º dia pós-inoculação, momento em que os nódulos tumorais atingiram o diâmetro médio palpável de aproximadamente 0,5 cm.

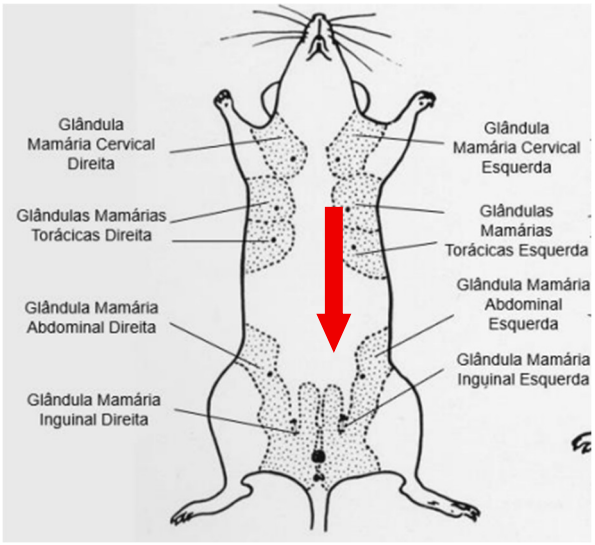


Figura 9 - Esquema representativo Anatomia Topográfica da distribuição das glândulas mamarias de camundongo fêmea (VIEIRA, 2019). Seta vermelha indica local da inoculação das células 4T1.

3.12 Inoculação do AM e Irradiação com Laser de Baixa Potência nos Tumores

Quando os tumores atingiram aproximadamente 0,5 cm de diâmetro, os animais foram distribuídos aleatoriamente nos grupos experimentais e submetidos aos respectivos tratamentos.

O delineamento experimental foi estruturado em cinco grupos distintos:

- **Grupo Controle (C):** animais portadores de tumor sem exposição ao Azul de Metileno ou à irradiação laser;
- **Grupo Azul de Metileno 25 µM (AM 25 µM):** animais submetidos à administração intratumoral de AM na concentração de 25 µM, sem posterior irradiação laser;
- **Grupo Azul de Metileno 50 µM (AM 50 µM):** animais submetidos à administração intratumoral de AM na concentração de 50 µM, sem posterior irradiação laser;
- **Grupo Terapia Fotodinâmica 25 µM (TFD 25 µM):** animais submetidos à administração intratumoral de AM na concentração de 25 µM, seguida de irradiação com laser vermelho;

- **Grupo Terapia Fotodinâmica 50 µM (TFD 50 µM):** animais submetidos à administração intratumoral de AM na concentração de 50 µM, seguida de irradiação com laser vermelho.

Para a realização dos tratamentos, as soluções de AM nas concentrações de 25 e 50 µM foram preparadas em PBS e administradas diretamente no interior da massa tumoral por via intratumoral. A administração do fotossensibilizador foi realizada em dois pontos distintos de cada tumor, buscando favorecer sua distribuição no tecido tumoral. O volume de solução administrado foi determinado de acordo com o tamanho e a capacidade de acomodação de cada massa tumoral, sendo utilizado, em média, um volume total de 150 a 200 µL de solução de AM por tumor. A administração foi realizada até que fosse observada tumefação macroscópica do tumor, conforme ilustrado na Figura 10.

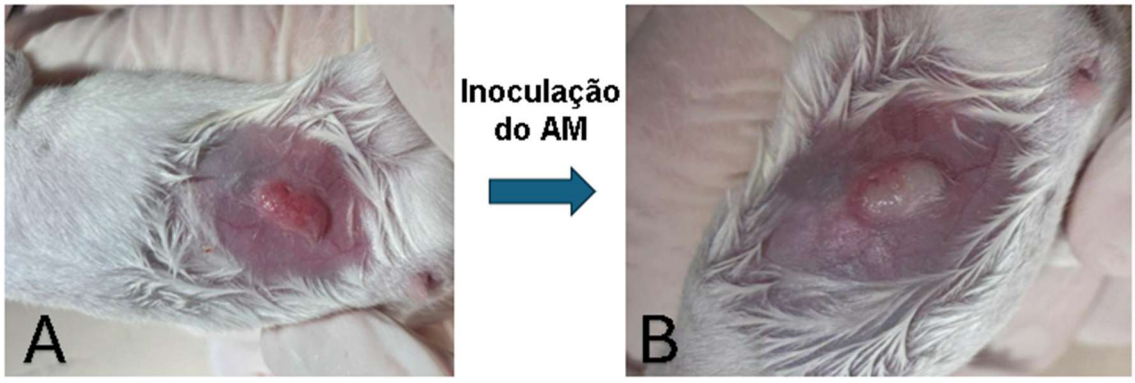


Figura 10 – Aspecto macroscópico do tumor antes (A) e após (B) a administração intratumoral de Azul de Metileno. Em B, observa-se a tumefação da massa tumoral após a administração do corante.

Após o período de incubação do fotossensibilizador (30 minutos), os animais pertencentes aos grupos submetidos à Terapia Fotodinâmica foram posicionados para a aplicação do laser. A irradiação foi realizada em um único ponto de aplicação, seguindo os mesmos parâmetros utilizados *in vitro* descritos na tabela 1, com o aplicador mantido na vertical em contato direto com a pele sobrejacente à massa tumoral. O diâmetro do *spot* de luz foi suficiente para abranger toda a extensão do tumor, permitindo a irradiação

uniforme da massa tumoral sem a necessidade de múltiplos pontos de aplicação.

Os tratamentos foram realizados em duas sessões, com intervalo de 48h entre as aplicações, mantendo-se os parâmetros experimentais em ambas as sessões. Vinte e quatro horas após a segunda intervenção, os animais foram submetidos à eutanásia, sendo posteriormente coletados os tumores e demais amostras biológicas destinadas às análises histopatológicas e moleculares.

3.13 Eutanásia dos animais experimentais

Vinte quatro horas após a segunda sessão do tratamento, os animais foram submetidos à eutanásia mediante administração intraperitoneal de uma associação anestésica de cloridrato de cetamina (DCB 01937; 95 mg/kg; solução a 10%) e cloridrato de xilazina (DCB 09208; 12 mg/kg; solução a 2%), conforme protocolo experimental previamente aprovado. Após a administração, os animais foram monitorados até a obtenção de plano anestésico profundo, caracterizado pela ausência de resposta aos estímulos externos e ausência de reflexos. A confirmação do óbito foi realizada mediante a constatação de ausência de movimentos respiratórios, seguida de deslocamento cervical como método complementar de confirmação da morte. Somente após a confirmação dos sinais de morte foram iniciados os procedimentos de coleta dos tecidos.

3.14 Análise Histopatológica

Vinte e quatro horas após a segunda sessão de tratamento, os animais foram eutanasiados e os tumores, juntamente com a pele circundante, o linfonodo drenante (linfonodo inguinal esquerdo), os pulmões e o fígado, foram coletados, lavados em PBS estéril e fixados em solução de paraformaldeído 4% pH 7.4 por 48 horas. Após a fixação, os tecidos foram submetidos ao processamento histológico convencional, incluindo desidratação em concentrações crescentes de álcool, diafanização, inclusão em parafina e obtenção de cortes histológicos com 4 µm de espessura.

Foram confeccionadas lâminas histológicas contendo os tumores provenientes de todos os grupos experimentais. Para a avaliação das características histopatológicas das neoplasias, um corte histológico representativo do modelo experimental foi selecionado e encaminhado a um laboratório particular especializado em patologia veterinária na cidade de Juiz de Fora – MG (HemoFastVet), onde foi submetido à coloração por hematoxilina e eosina (HE) e posteriormente avaliado por médico-veterinário patologista.

A avaliação histopatológica foi realizada de forma descritiva, considerando as principais características morfológicas do tecido neoplásico e do microambiente tumoral, incluindo organização e arquitetura da neoplasia, padrão de crescimento, características citomorfológicas das células tumorais, grau de pleomorfismo, anisocitose, anisocariose, presença e intensidade de figuras de mitose, áreas de necrose e demais alterações histopatológicas observadas.

3.15 Análises Imunohistoquímicas

Para a avaliação da expressão de proteínas relacionadas às diferentes vias de morte celular, cortes histológicos foram submetidos à técnica de imunohistoquímica para detecção das proteínas MLKL (*mixed lineage kinase domain-like*), CASP3 (*caspase-3*) e LC3 (*microtubule-associated protein 1 light chain 3*), associadas, respectivamente, às vias de necroptose, apoptose e autofagia. Foram utilizados anticorpos primários da marca Invitrogen, Thermo Fisher Scientific.

Inicialmente, as lâminas contendo os cortes histológicos foram submetidas à desparafinização, seguida de hidratação em PBS durante 15 minutos. Para recuperação antigênica, as lâminas foram submetidas a dois ciclos de 7 minutos em banho-maria em forno de micro-ondas, utilizando tampão citrato 0,01 M, pH 5,6. Após a recuperação, as lâminas foram lavadas com PBS e submetidas ao bloqueio da atividade da peroxidase endógena com solução de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a 3%. Após nova lavagem com PBS, foi realizado o bloqueio de sítios inespecíficos mediante incubação com

solução de albumina sérica bovina (BSA) a 1% durante 1 hora, à temperatura ambiente.

Após o bloqueio, as lâminas foram incubadas com os respectivos anticorpos primários, sendo utilizado o anticorpo anti-MLKL na diluição de 1:100, anti-CASP3 na diluição de 1:100 e anti-LC3 na diluição de 1:300. Para cada marcador, foram incluídos controles negativos, nos quais o anticorpo primário foi omitido. A incubação dos anticorpos primários foi realizada *overnight* (aproximadamente 16 horas), a 4 °C e ao abrigo da luz.

Em seguida, as lâminas foram lavadas com PBS e incubadas com os anticorpos secundários apropriados, utilizando o kit VECTASTAIN Elite ABC-HRP (EUA), Peroxidase, R.T.U. (Universal) (Anti-Camundongo/Coelho IgG de Cavalo). A reação foi revelada utilizando o cromógeno 3,3'-diaminobenzidina (substrato DAB, ROCHE, EUA) e os cortes foram contra-corados com verde de metila. Controles negativos foram realizados omitindo-se o anticorpo primário.

3.16 Análises estatísticas

Os dados foram expressos como média ± desvio-padrão. As comparações entre múltiplos grupos foram realizadas por meio da análise de variância de uma via (ANOVA one-way), seguida do teste pós-hoc de Tukey para comparações múltiplas.

Para os dados obtidos no ensaio TUNEL, que apresentaram distribuição não paramétrica, foi utilizado o teste de Kruskal–Wallis. Nos experimentos envolvendo inibidores farmacológicos (Nec-1s, Fer-1 e cloroquina), foi empregada análise de variância de duas vias (ANOVA two-way), seguida do teste pós-hoc de Bonferroni para determinar diferenças entre os grupos tratados na ausência e na presença dos respectivos inibidores.

Em todas as análises, valores de $p<0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad InStat para Windows (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, EUA).

4 RESULTADOS

In vitro

4.1 Viabilidade Celular

Com o objetivo de estabelecer uma curva de dose-resposta e padronizar o tempo de incubação e a concentração de azul de metileno foram testados três tempos: 10 min, 15 min e 30 min (Figura 11).

Nos intervalos de 10 e 15 minutos, não foram registradas alterações na viabilidade das células 4T1 em nenhuma das concentrações testadas ($p > 0,05$), padrão que se manteve inalterado mesmo após a aplicação do protocolo de irradiação laser (TFD 10 min e TFD 15 min).

Por outro lado, 30 minutos de incubação revelou perfis biológicos distintos e estatisticamente significativos. No ensaio de toxicidade no escuro (AM 30 min), a viabilidade das células 4T1 nas doses de 5 a 25 μM não foi alterada ($p > 0,05$), mas um efeito citotóxico significativo foi observado a partir da concentração de 50 μM ($p < 0,05$).

Quando a incubação de 30 minutos foi combinada à irradiação laser (TFD 30 min), a partir da dose de 25 μM, a terapia promoveu um declínio acentuado e estatisticamente significativo na sobrevivência das células 4T1 em comparação ao grupo controle ($p<0,05$), efeito que se intensificou progressivamente nas concentrações de 50, 100 e 150 μM.

Esses achados ratificaram o tempo de 30 minutos como o período padrão de incubação pré-irradiação para as etapas seguintes, elegendo as concentrações de 25 μM (limiar de indução de fotocitotoxicidade com segurança no escuro) e 50 μM (potencial máximo de modulação fotodinâmica combinada) como as doses experimentais de trabalho para o detalhamento dos mecanismos moleculares subsequentes.

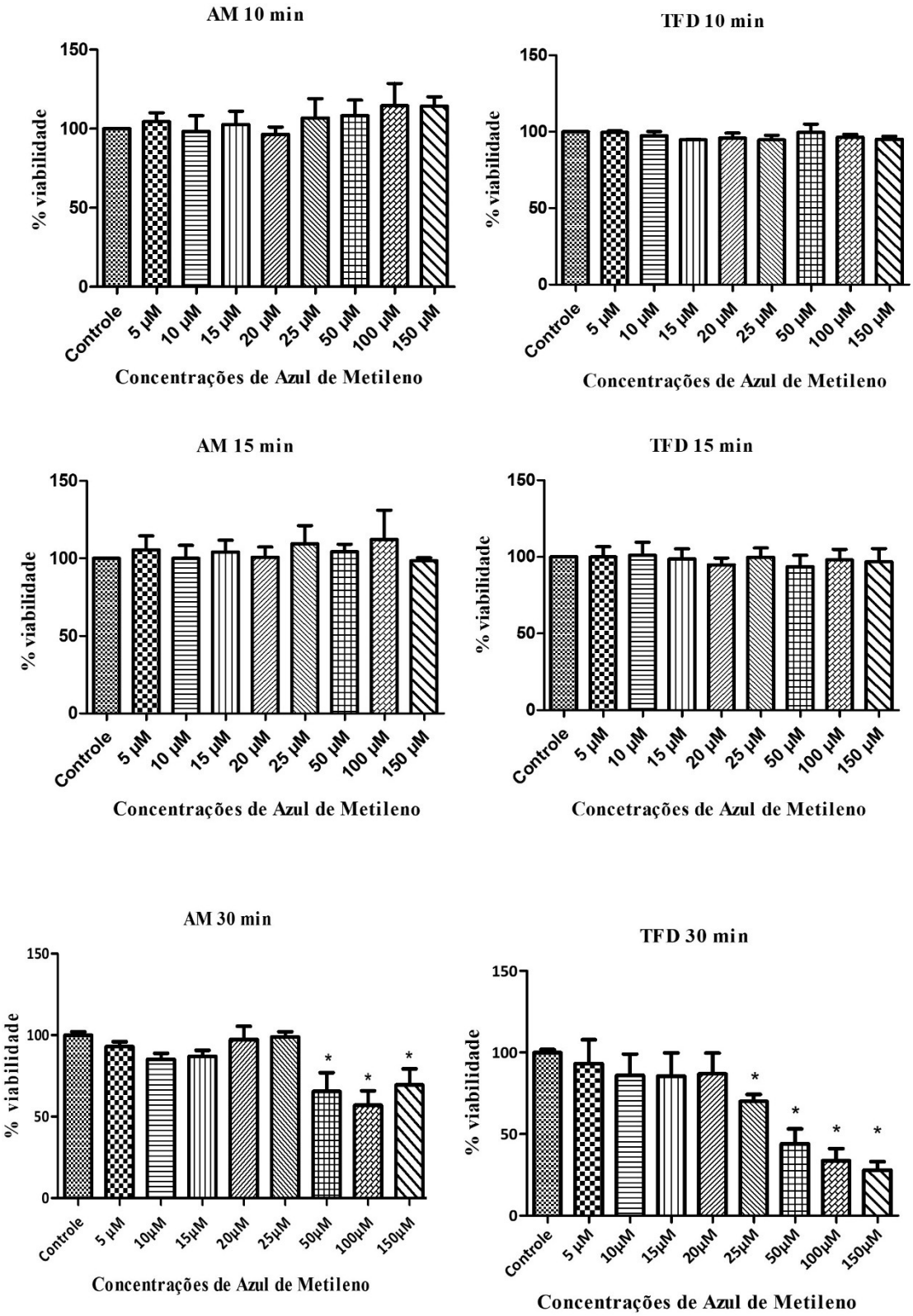


Figura 11 - Avaliação da viabilidade celular da linhagem 4T1 submetida a diferentes tempos de incubação (10, 15 e 30 min) com azul de metileno (AM) (toxicidade no escuro) ou associado à terapia fotodinâmica (TFD). Os dados expressam a média ± desvio padrão obtidos de 5 ensaios independentes. (*) indicam diferença estatistica significativa em relação ao respectivo grupo controle ($p < 0,05$).

Para destacar os dados das concentrações escolhidas e comparar com o efeito de cada tratamento, os dados dessas concentrações (25 e 50 μM) com o tempo de incubação de 30 minutos foram comparados e sua representação gráfica está ilustrada na figura 12. Os resultados mostram ainda nesta imagem que o laser é seguro, já que a viabilidade celular para este grupo não foi alterada (p>0,05).

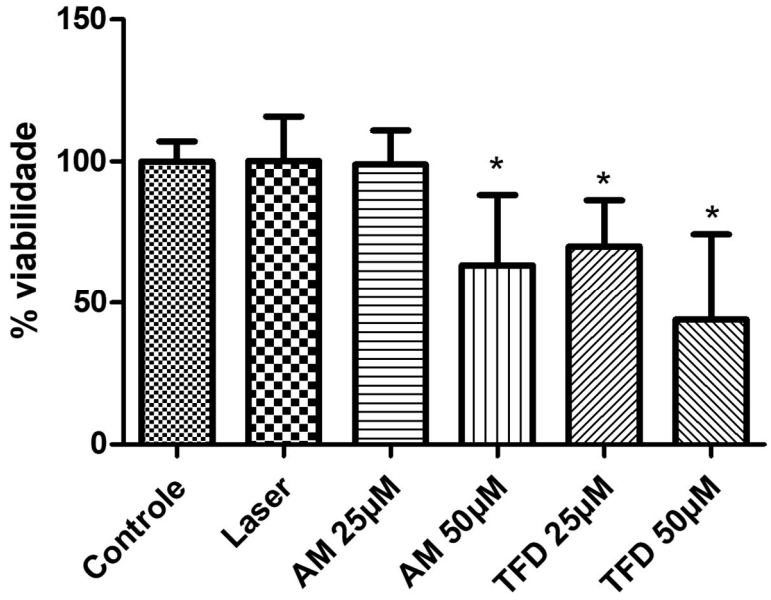


Figura 12 - Viabilidade celular determinada após 30 minutos de incubação com azul de metileno (AM 25 e 50), na ausência ou presença de irradiação laser de baixa potência, incluindo o grupo controle de irradiação isolada (Laser). Os dados representam a média ± desvio padrão de 5 ensaios independentes. (*) indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao respectivo grupo controle (p < 0,05).

4.2 Internalização Intracelular do Fotossensibilizador

Para investigar como o fotossensibilizador entra nas células, a captação intracelular do AM foi quantificada após a incubação com concentrações de 0 a 150 μM nos tempos de 10, 15 e 30 minutos (figura 13).

A entrada do AM nas células 4T1 mostrou um padrão dependente da concentração em todos os tempos testados. Nas concentrações mais baixas, a captação celular ficou abaixo de 10%. Por outro lado, as concentrações mais

altas (100 e 150 μM) aumentaram muito a internalização, atingindo valores entre aproximadamente 22% e 28%. Nota-se ainda que a captação do fotossensibilizador chega perto da saturação em pouco tempo. O tempo de 15 minutos mostrou níveis de internalização um pouco maiores do que o tempo de 30 minutos na concentração máxima. Isso sugere que a entrada do AM nas células acontece de forma rápida e se estabiliza cedo.

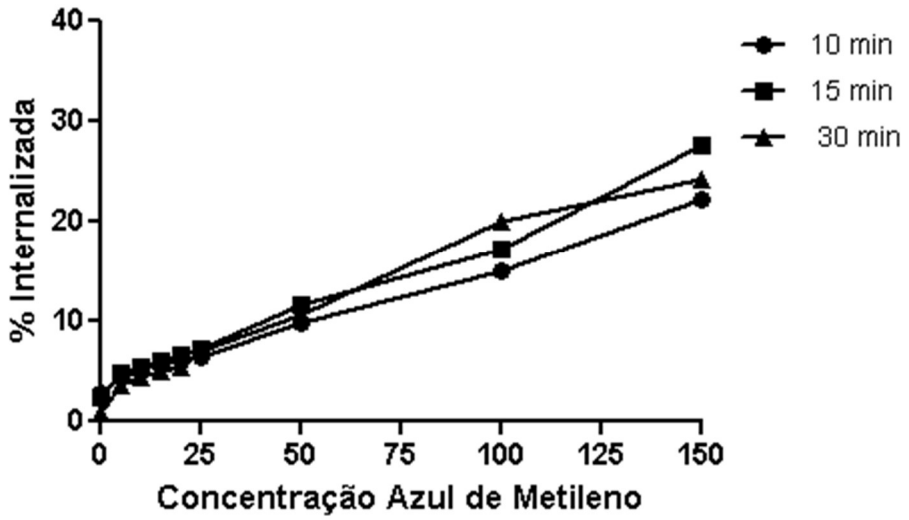


Figura 13 - Porcentagem de internalização do fotossensibilizador após incubação em diferentes concentrações (0 a 150 μM) nos tempos de 10, 15 e 30 minutos, determinada por lise celular com SDS e leitura espectrofotométrica. Foram realizados três experimentos independentes, cada um conduzido em triplicata.

4.3 Migração Celular

Para avaliar a capacidade de migração das células 4T1, foi realizado o ensaio de fechamento de ferida. Na Figura 14, estão os gráficos com a quantificação das áreas para cada tratamento nos tempos de 0h, 24h e 48h.

No tempo inicial (0h), todos os grupos começaram com a área da fenda padronizada, sem diferenças entre eles. Após 24 horas, os grupos Controle e Laser migraram rapidamente, quase fechando totalmente. Em contrapartida, os grupos tratados com AM 25 e 50 μM e com TFD 25 e 50 μM apresentaram um atraso importante nessa migração, mantendo a fenda aberta com relevância estatística ($p < 0,01$ e $p < 0,001$).

Depois de 48 horas, os grupos controle, laser e AM 25 μM alcançaram o fechamento completo da fenda (área igual a zero). Por outro lado, o grupo AM 50 μM e os grupos que receberam a terapia fotodinâmica (TFD 25 e 50 μM) ainda continuaram com uma área aberta. O grupo TFD 50 μM foi o mais eficiente em segurar a migração celular, mantendo a maior área aberta mesmo após dois dias de experimento.

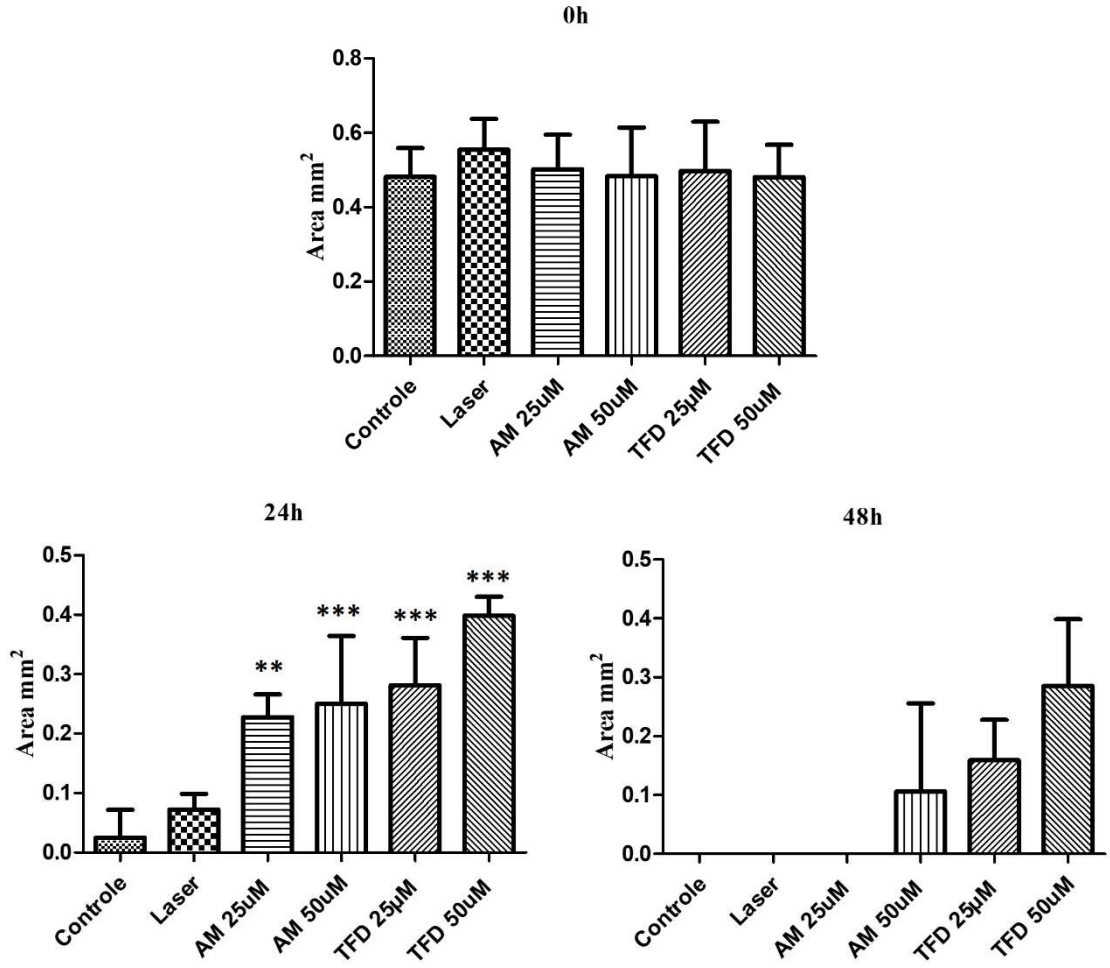


Figura 14 - Ensaio de migração das células 4T1 nos tempos de 0h, 24h e 48h. Controle: sem tratamento; Laser: irradiado com laser vermelho de baixa potência; AM: incubados com concentrações de azul de metileno (concentrações de azul de metileno utilizadas) TFD: incubadas com azul de metileno (25 μM e 50 μM) e irradiadas com laser de baixa potência. Quantificação das áreas indicando que o MB-PDT resultou em uma redução na capacidade de migração das células 4T1, sugerindo um impacto negativo no processo de cicatrização, especialmente no grupo PDT 50 μM ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$.

4.4 Expressão Gênica Associado às Vias de Morte Celular

4.4.1 Marcadores de Apoptose

Para compreender os mecanismos moleculares envolvidos na morte celular induzida pelos tratamentos, avaliou-se a expressão de genes da via apoptótica por RT-qPCR (Figura 15). Os níveis relativos de RNAm para as enzimas efetoras Caspase-3 e Caspase-6 não apresentaram alterações estatisticamente significativas em nenhuma das condições testadas, mantendo um perfil de expressão basal muito próximo ao observado no grupo controle (Figuras 15A e 15B).

Em contrapartida, o gene pró-apoptótico Bax exibiu uma expressiva e significativa superexpressão modulada exclusivamente pela terapia combinada (Figura 15C). Tanto o grupo TFD 25 μM quanto o grupo TFD 50 μM promoveram um aumento marcante nos níveis de RNAm de Bax em comparação ao controle ($p < 0,05$). Como as células expostas isoladamente ao laser ou ao fotossensibilizador não demonstraram variações no perfil de Bax, confirma-se que essa ativação decorre diretamente do efeito citotóxico sinérgico da terapia fotodinâmica.

Para o gene antiapoptótico Bcl-2 (Figura 15D), observou-se um aumento significativo nos níveis relativos de mRNA exclusivamente no grupo tratado com AM 25 μM em relação ao controle ($p < 0,05$), sugerindo uma resposta adaptativa de sobrevivência celular ao corante no escuro. Nas demais condições, incluindo os grupos de TFD, a expressão de Bcl-2 manteve padrões semelhantes às células não tratadas.

Essa divergência entre a indução do gene pró-apoptótico e o perfil do antiapoptótico refletiu-se de maneira contundente na razão Bax/Bcl-2 (Figura 15E). Nos grupos tratados com a TFD, houve um deslocamento drástico do equilíbrio celular em direção a um perfil pró-apoptótico, evidenciado pelo aumento altamente significativo da razão nos grupos TFD 25 μM ($p < 0,001$) e TFD 50 μM ($p < 0,05$). Este desequilíbrio pronunciado pode sugerir que o estímulo fotodinâmico rompe a homeostase de sobrevivência da célula tumoral, direcionando o sistema para as vias de sinalização de morte celular.

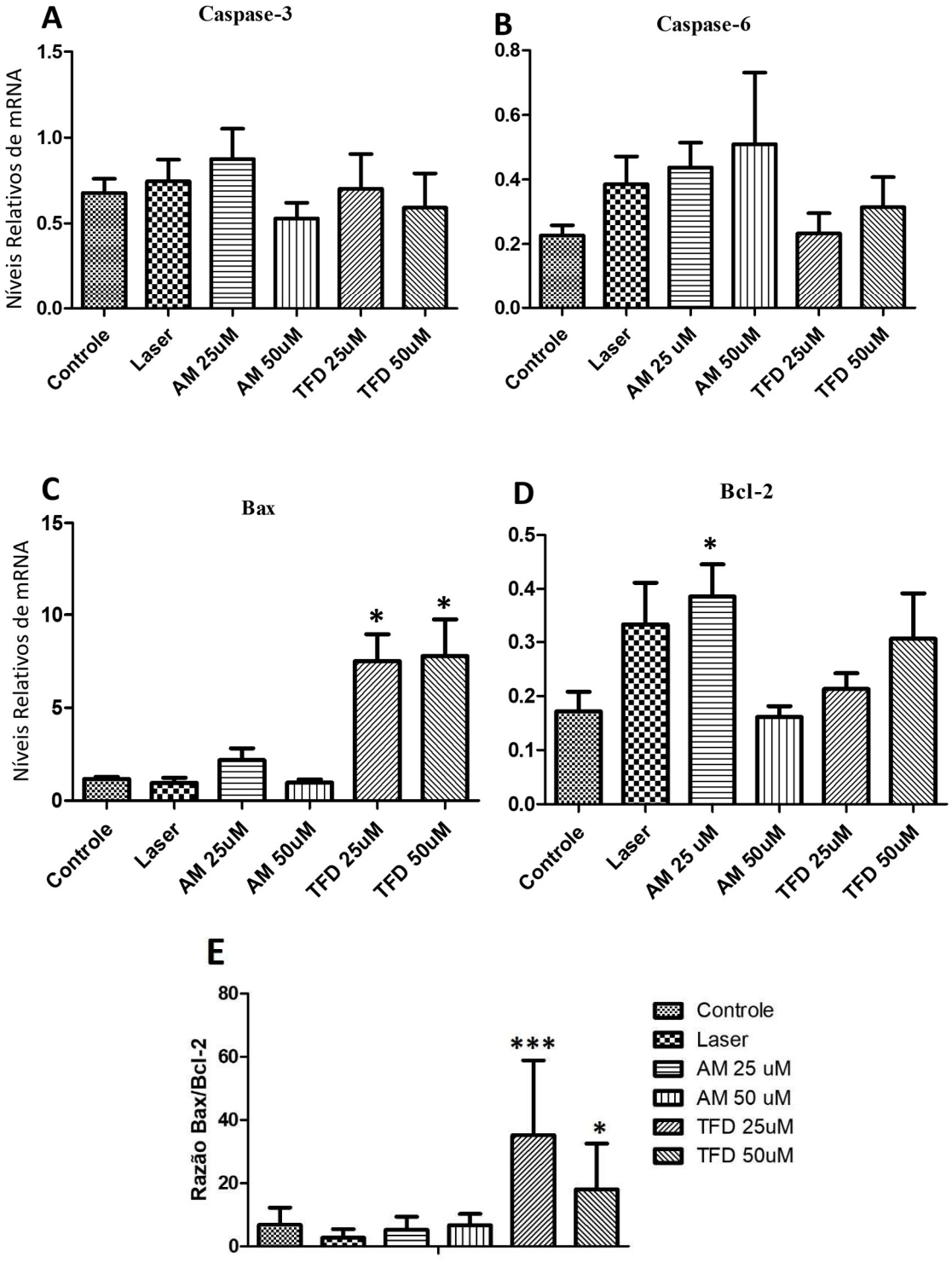


Figura 15 - Níveis relativos de mRNA quantificados por RT-qPCR para os genes (A) Caspase-3, (B) Caspase-6, (C) Bax, (D) Bcl-2 e (E) Razão Bax/Bcl-2. Os dados expressam a média ± SD. Seus respectivos níveis de significância estatística são indicados por (*) $p < 0,05$ e (***) $p < 0,001$ em comparação ao grupo controle. AM – grupos incubados com azul de metileno; TFD – grupos incubados com azul de metileno e irradiados com laser de baixa potência.

4.4.2 Marcador de Autofagia

Para avaliar se a TFD poderia desencadear a via de autofagia nas células 4T1, analisou-se a expressão os níveis relativos de mRNA do gene LC3B (Figura 16).

Ao contrário dos demais grupos, observou-se um aumento significativo nos níveis relativos de mRNA da LC3B exclusivamente no grupo tratado com AM 50 μM em comparação ao grupo controle ($p < 0,05$). Esse resultado sugere que a exposição isolada ao FS em maior concentração, mesmo na ausência de luz, poderia induzir a uma modulação associada à ativação da maquinaria de autofagia.

Em contrapartida, os grupos submetidos à terapia fotodinâmica (TFD 25 μM e TFD 50 μM) não apresentaram alterações estatisticamente significativas nos níveis de expressão de LC3B, mantendo perfis semelhantes ao grupo controle ($p > 0,05$). Esse resultado pode indicar que, sob o efeito citotóxico direto da terapia combinada, a modulação imediata do LC3B não é a via preferencialmente ativada nas células tumorais 4T1 nessas condições experimentais.

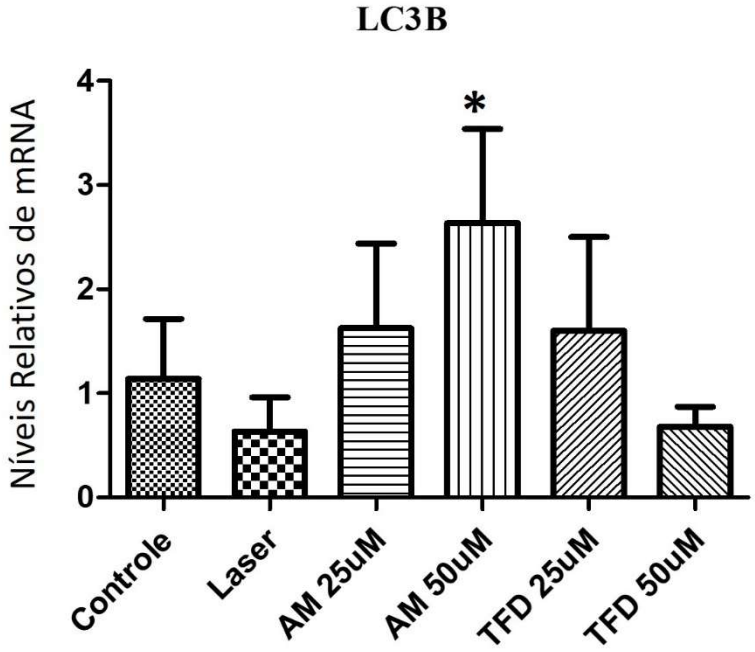
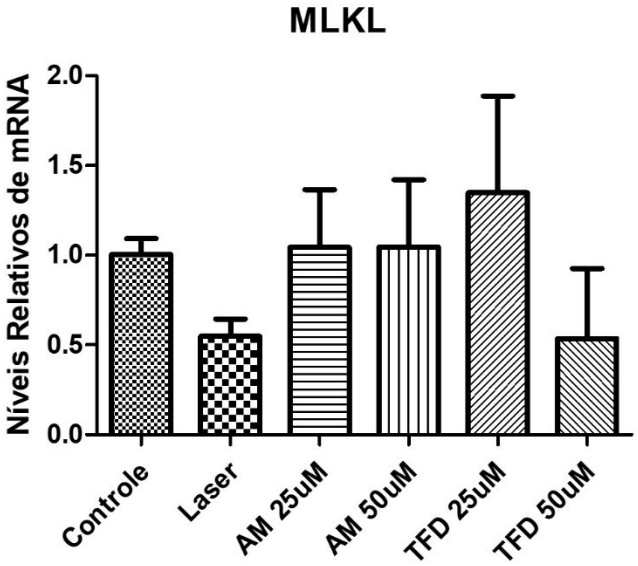


Figura 16 - Níveis relativos de mRNA quantificados por RT-qPCR para o gene LC3B. Os dados expressam a média ± SD. Seus respectivos níveis de significância estatística são indicados por (*) $p < 0,05$ em comparação ao grupo controle. AM – grupos incubados com azul de metileno; TFD – grupos incubados com azul de metileno e irradiados com laser de baixa potência.

4.4.3 Marcador de Necroptose

Próxima via de morte regulada induzida pela TFD investigada foi a necroptose, através da expressão relativa do gene MLKL (Figura 17).

Os resultados demonstraram que os níveis relativos de mRNA de MLKL permaneceram inalterados em todos os grupos experimentais quando comparados ao grupo controle ($p > 0,05$). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos submetidos à TFD, ao fotossensibilizador isolado ou ao laser.



.

Figura 17 - Níveis relativos de mRNA quantificados por RT-qPCR para o gene MLKL. Os dados expressam a média ± SD. Seus respectivos níveis de significância estatística são indicados por (*) $p < 0,05$ em comparação ao grupo controle. AM – grupos incubados com azul de metileno; TFD – grupos incubados com azul de metileno e irradiados com laser de baixa potência.

4.4.4 Marcador de Ferroptose

Para investigar o envolvimento da via de ferroptose nos diferentes tratamentos, avaliou-se a expressão relativa da enzima Gpx4 por RT-qPCR (Figura 18).

Os resultados demonstraram que a exposição isolada ao fotossensibilizador na maior concentração (AM 50 μM) provocou um aumento significativo nos níveis relativos de mRNA de Gpx4 em comparação ao grupo

controle ($p < 0,05$). Notavelmente, o grupo submetido à terapia combinada de menor concentração (TFD 25 μM) exibiu uma indução ainda maior, com níveis de expressão muito superiores aos observados no grupo controle ($p < 0,01$).

Em contrapartida, as células tratadas apenas com laser, com AM 25 μM ou submetidas à maior dose da terapia combinada (TFD 50 μM) não apresentaram alterações estatisticamente significativas nos níveis de RNAm de Gpx4 em relação ao grupo controle ($p > 0,05$).

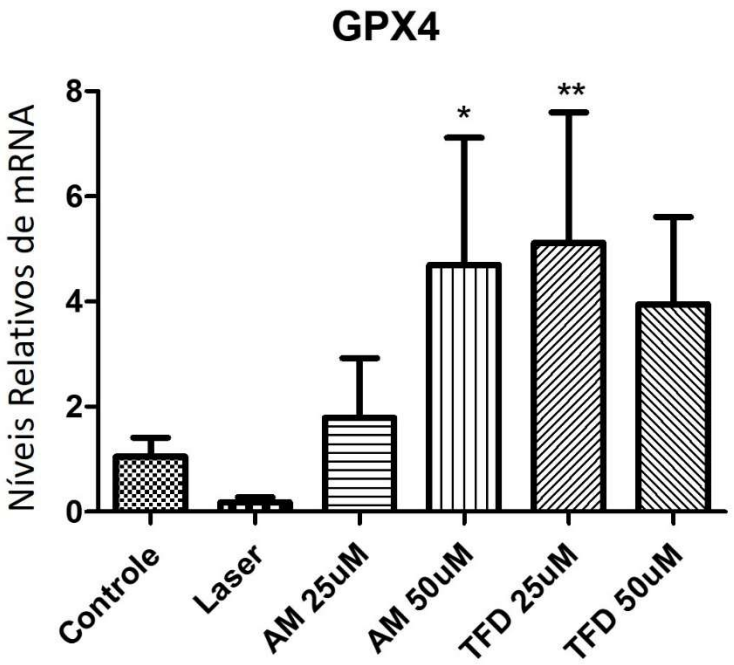


Figura 18 - Níveis relativos de mRNA quantificados por RT-qPCR para o gene Gpx4. Os dados expressam a média ± SD. Seus respectivos níveis de significância estatística são indicados por (*) $p < 0,05$ em comparação ao grupo controle. AM – grupos incubados com azul de metileno; TFD – grupos incubados com azul de metileno e irradiados com laser de baixa potência.

4.5 Avaliação da Fragmentação de DNA por Ensaio de TUNEL

Para verificar se as alterações observadas nos resultados de RT-PCR nos marcadores apoptóticos resultaram na execução da morte celular por apoptose, quantificou-se a fragmentação do DNA por meio do ensaio de TUNEL (Figura 19 – A - G).

Os resultados demonstraram que a ocorrência de fragmentação do DNA não apresentou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos experimentais avaliados ($p>0,05$). Os níveis de fragmentação observados nos

grupos tratados com o FS isolado (AM 25 µM e AM 50 µM) ou submetidos à terapia combinada (TFD 25 µM e TFD 50 µM) foram semelhantes aos encontrados nas células dos grupos controle e laser, como observado na análise quantitativa (Figura 19 - H).

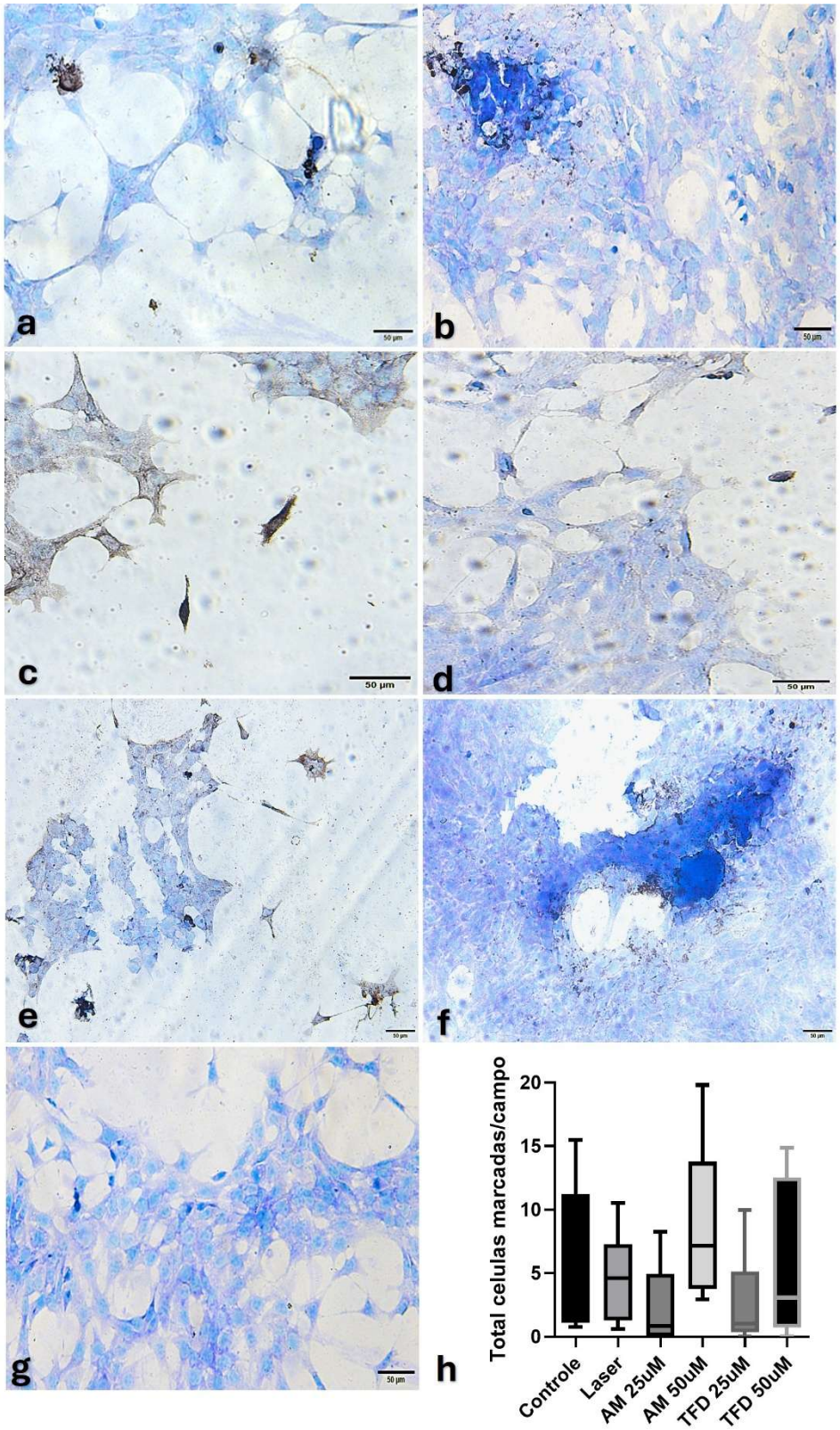


Figura 19 - Avaliação da fragmentação do DNA por ensaio de TUNEL. Fotomicrografias representativas e análise quantitativa de células submetidas aos diferentes tratamentos. (A) Grupo Controle; (B) Grupo Laser; (C) Azul de Metileno (AM) 25 μM; (D) Terapia Fotodinâmica (TFD) 25 μM; (E) AM 50 μM; (F) TFD 50 μM; (G) Controle Negativo; (H) Quantificação do total de células marcadas por campo. Os dados expressam a ausência de diferenças estatisticamente significativas entre os grupos avaliados (p > 0,05). Análise estatística realizada por meio do teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Bonferroni. Barra de escala: 50μm

4.6. Inibidores Farmacológicos

As células inicialmente foram tratadas com cloroquina (CQ), um agente lisossomotrópico capaz de inibir as etapas finais da degradação autofágica. Os ensaios de viabilidade celular (Figura 20) demonstraram que a adição de CQ não alterou significativamente a sobrevivência das células 4T1 em nenhum dos grupos experimentais quando comparados aos seus respectivos grupos sem inibição farmacológica (p>0,05). Uma análise detalhada de comparações múltiplas pareadas (com pós-teste de Bonferroni) confirmou a ausência de diferenças, evidenciando que o perfil de sobrevivência das células 4T1 permaneceu estatisticamente homogêneo independentemente da adição do inibidor de autofagia.

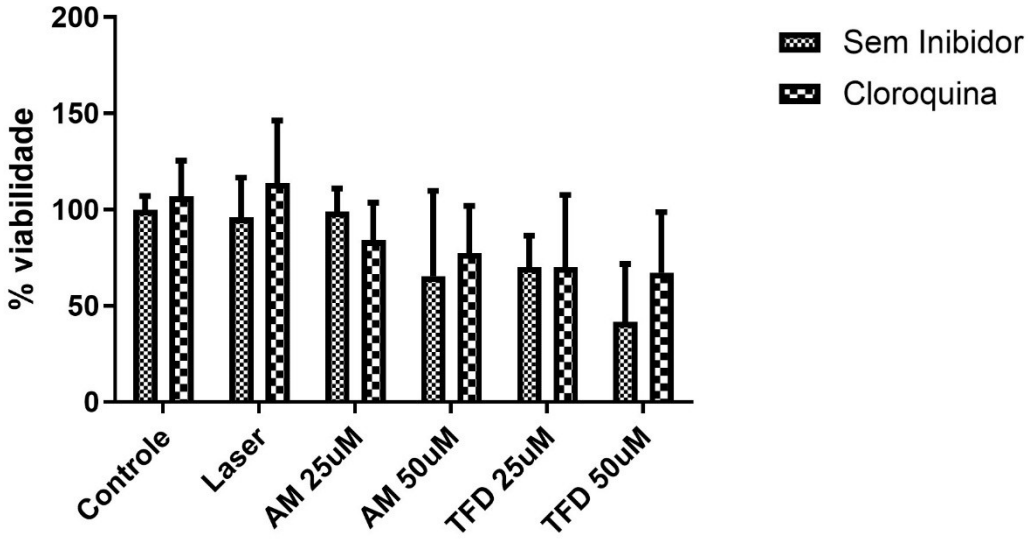


Figura 20 - Viabilidade de células 4T1 mensurada pelo ensaio de MTT na ausência ou presença do inibidor lisossomotrópico Cloroquina (CQ). Os grupos experimentais compreendem: Controle, Laser, Azul de Metileno (AM 25 e 50) e Terapia Fotodinâmica (TFD 25 e 50). Os valores representam a média ± desvio padrão (SD) de quatro experimentos independentes realizados em triplicatas.

Na sequência, investigou-se a participação da via de necroptose na morte celular induzida pelos tratamentos por meio do uso do inibidor específico necrostatina-1 (Nec-1) (Figura 21). As análises estatísticas demonstraram que, os grupos controle, Laser, AM 25 e na TFD 25, a adição de Nec-1 não provocou alterações significativas na sobrevivência das células 4T1 ($p > 0,05$).

Em contrapartida, um efeito protetor robusto foi observado nas concentrações e condições de estresse mais elevadas. No grupo exposto ao AM 50 isolado, a presença do inibidor promoveu um aumento estatisticamente significativo na viabilidade celular ($p<0,01$). De forma ainda mais pronunciada, no grupo submetido à terapia fotodinâmica em maior concentração (TFD 50), a Nec-1 aumentou significativamente a viabilidade celular, elevando-a de 49% na ausência de inibição para aproximadamente 92% na condição protegida ($p < 0,001$). Esses achados demonstram que a necroptose atua de maneira ativa e relevante como um dos mecanismos executores de morte celular nas células tumorais 4T1 sob condições severas de estresse fotodinâmico.

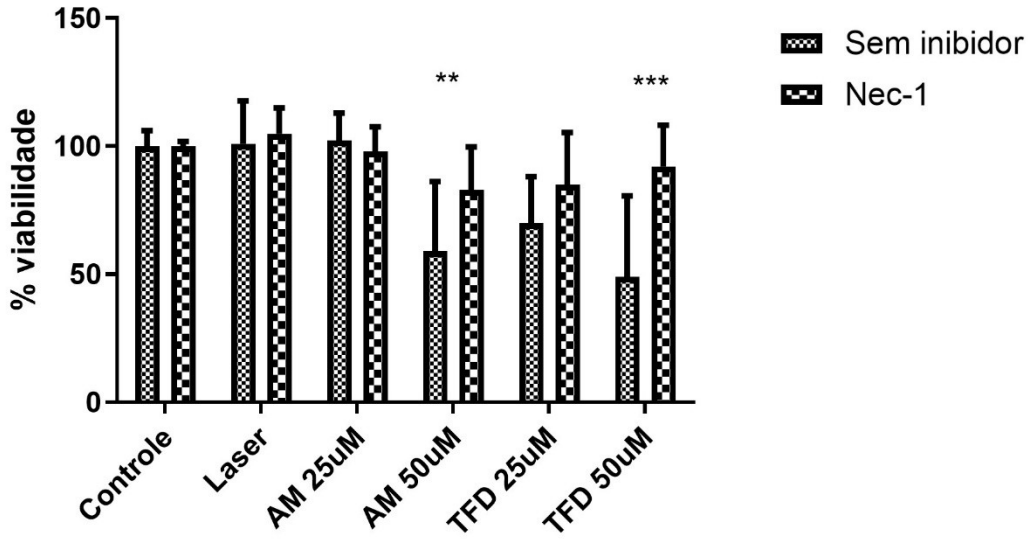


Figura 21 - Viabilidade de células 4T1 tratadas na ausência ou presença do inibidor alostérico de RIPK1, Necrostatina-1 (Nec-1). O gráfico evidencia uma atenuação significativa da morte celular dependente da dose nas maiores concentrações testadas (50 μM). No grupo AM 50 μM, a Nec-1 promoveu um incremento significativo na sobrevivência celular ($p<0,01$); no grupo terapia fotodinâmica (TFD 50 μM), observou-se uma reversão severa da citotoxicidade, com resgate da viabilidade celular para patamares próximos a 92% (*** $p<0,001$). Os valores correspondem à média ± desvio padrão (SD).

Por fim, avaliou-se a via de morte celular por ferroptose utilizando o inibidor específico ferrostatina-1 (Fer-1) (Figura 22). O ensaio de viabilidade celular demonstrou um papel protetor evidente do inibidor dependente da dose de FS empregada.

As análises revelaram que, para os grupos Laser, AM 25 e 50) e TFD 25, a adição de Fer-1 não induziu alterações com significância estatística ($p > 0,05$). No entanto, no grupo TFD 50, a viabilidade celular que era em torno de 49% na ausência de inibição foi significativamente aumentada para aproximadamente 89% na presença de Fer-1 ($p < 0,001$; diferença de médias +40,07%). Esse expressivo bloqueio da citotoxicidade aponta para um envolvimento majoritário da via de ferroptose no mecanismo de morte induzido pelo protocolo de TFD em concentrações mais elevadas.

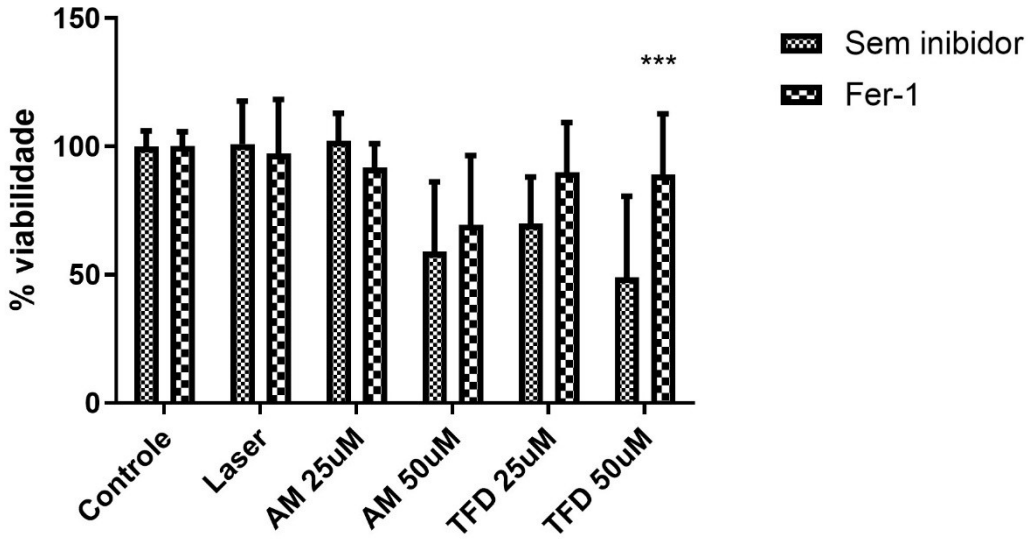


Figura 22 - Viabilidade celular de células de carcinoma mamário murino 4T1 após exposição aos regimes terapêuticos na ausência (Sem inibidor) ou presença do inibidor específico de ferroptose, Ferrostatina-1 (Fer-1). Nota-se um resgate marcante e localizado da sobrevivência celular no grupo submetido à terapia fotodinâmica (TFD 50 μM). Os dados expressam a média ± desvio padrão (SD). Asteriscos indicam diferença estatística localizada em relação ao respectivo grupo sem inibidor (*** $p < 0,001$).

In Vivo

4.7 Modelo Experimental de Tumor Mamário 4T1

Após a inoculação das células 4T1 em camundongos BALB/c, o curso do desenvolvimento neoplásico foi monitorado periodicamente. Durante os primeiros 14 dias de evolução, os animais foram acompanhados quanto a aspectos macroscópicos, não sendo observados sinais de ulceração na região do tumor. A cronologia detalhada das etapas do estudo, compreendendo desde a indução tumoral, progressão da vascularização local, até as sessões de tratamento e posterior eutanásia para exérese de órgãos (tumores, linfonodos, pulmões e fígado), está representada na Figura 23.

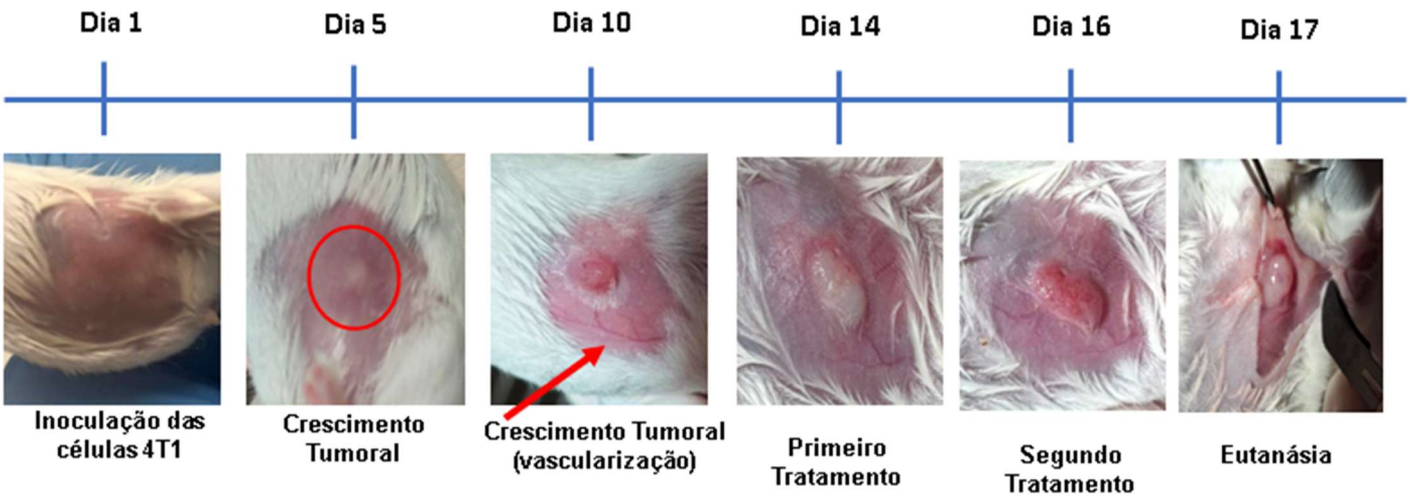


Figura 23 - Cronograma e imagens representativas dos eventos experimentais *in vivo*. Linha do tempo detalhando as principais etapas do estudo, utilizando o modelo experimental de tumor mamário 4T1 em camundongos BALB/c. (Dia 1) Inoculação subcutânea das células tumorais; (Dia 5) Início do crescimento tumoral palpável e visível (círculo vermelho); (Dia 10) Progressão tumoral com vascularização evidente (seta vermelha); (Dia 14) Início do protocolo de tratamento (primeira sessão); (Dia 16) Segunda sessão de tratamento; (Dia 17) Encerramento do experimento via eutanásia dos animais para a coleta de tumores e órgãos exérese (linfonodos, pulmões e fígados).

A avaliação do crescimento tumoral consistiu na mensuração do maior eixo da lesão (em mm) em dois momentos cruciais do protocolo experimental:

no início das intervenções (**i**, correspondente ao dia que se iniciou o tratamento experimental) e no desfecho do estudo (**f**, correspondente ao dia 17, momento da eutanásia), conforme ilustrado na Figura 24. De maneira geral, os diâmetros tumorais iniciais variaram entre 3,0 mm e 7,6 mm, enquanto os valores finais se situaram na faixa de 4,0 mm a 8,6 mm.

O grupo controle exibiu um incremento mais acentuado no diâmetro tumoral entre os dois períodos analisados, atingindo as maiores médias ao final do experimento. Em contrapartida, os grupos submetidos aos tratamentos demonstraram uma tendência a uma menor variação no crescimento do eixo tumoral, com destaque visual para o grupo tratado com AM 50 µM. Contudo, a análise estatística revelou que todos os grupos experimentais apresentaram aumento do eixo tumoral ao término do período e não foram detectadas diferenças significativas entre eles ($p > 0,05$). Esses achados evidenciam que as terapias instituídas (Azul de Metileno isolado ou Terapia Fotodinâmica, nas concentrações de 25 e 50 µM) não promoveram alterações ou regressão no tamanho absoluto dos tumores primários durante a janela temporal avaliada.

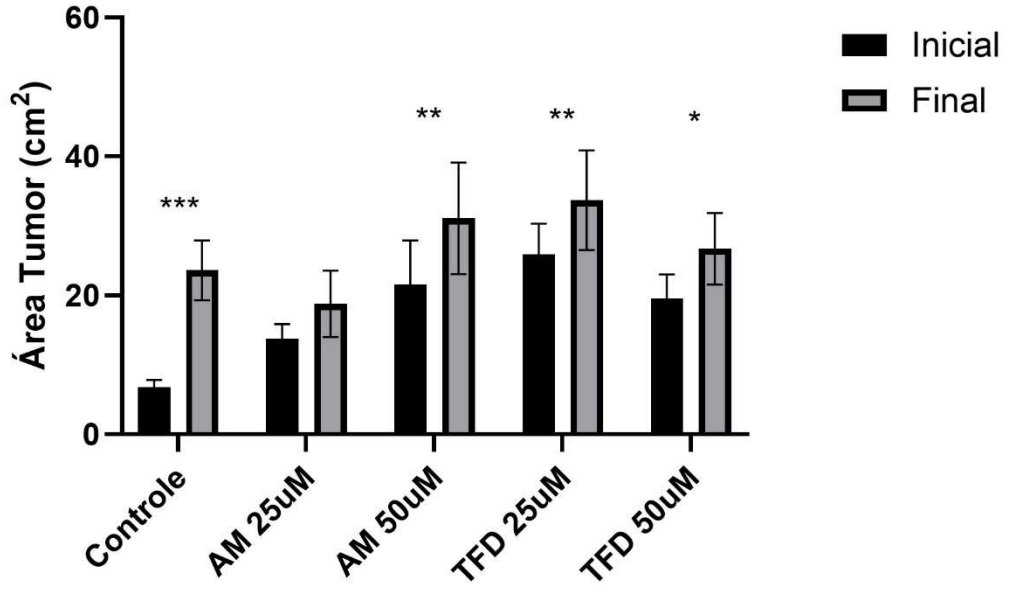


Figura 24 - Avaliação da progressão da área tumoral *in vivo*. O gráfico representa a média e o desvio padrão da área tumoral (cm^2) para cada grupo experimental nos momentos inicial (início do tratamento) e final (eutanásia). Grupos experimentais: Controle (sem tratamento); AM 25 µM e AM 50 µM (Azul de Metileno isolado); TFD 25 µM e TFD 50 µM (Terapia Fotodinâmica). Os asteriscos indicam diferença estatística significativa em relação ao respectivo momento inicial dentro do mesmo grupo ($p < 0,05$; $^{**}p < 0,01$; $^{***}p < 0,001$). Two-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni.

O peso corporal dos camundongos foi monitorado como um indicador de toxicidade sistêmica e bem-estar geral, sendo avaliado no início do protocolo experimental (i, momento da inoculação das células tumorais) e no desfecho do estudo (f, imediatamente antes da eutanásia). Conforme demonstrado na Figura 25, os animais apresentaram pesos médios homogêneos e semelhantes entre os diferentes grupos experimentais em ambos os momentos avaliados. Durante o período de acompanhamento, não foram observadas variações ponderais significativas entre os tempos inicial e final dentro de cada grupo, tampouco diferenças estatisticamente significativas na comparação intergrupos ($p > 0,05$). Esses resultados sugerem a ausência de toxicidade sistêmica severa ou caquexia induzida pela progressão tumoral ou pelas terapias aplicadas.

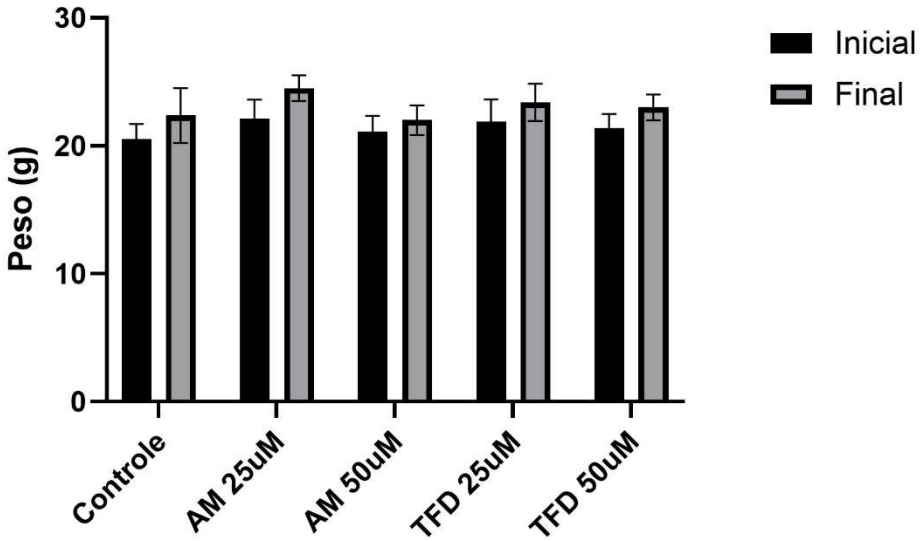


Figura 25 - O gráfico representa a média e o desvio padrão da massa corpórea (em gramas) dos camundongos nos momentos inicial (início do protocolo) e final (eutanásia). Grupos experimentais: Grupos experimentais: Controle (sem tratamento); AM 25 μM e AM 50 μM (Azul de Metileno isolado); TFD 25 μM e TFD 50 μM (Terapia Fotodinâmica). $p > 0,05$; Two-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni.

4.8 Análises Histopatológicas do Tumor Mamário 4T1

A análise histopatológica das massas tumorais (Figura 26) revelou uma proliferação densa de células epiteliais neoplásicas dispostas predominantemente em arranjo sólido (ninhos e blocos compactos),

sustentadas por um estroma fibrovascular escasso e delicado. Morfologicamente, as células exibiram citoplasma eosinofílico com limites intercelulares indistintos, núcleos volumosos, cromatina pontilhada e nucléolos múltiplos e proeminentes. Foi observado moderado pleomorfismo celular e nuclear (anisocitose e anisocariose). A atividade mitótica mostrou-se acentuada, registrando-se 17 figuras de mitose em uma área de 2,37 mm^2, com presença frequente de formas atípicas. Na derme adjacente, evidenciou-se a presença de nódulos satélites e invasão de vasos sanguíneos por células neoplásicas (êmbolos tumorais), além de um infiltrado inflamatório de intensidade moderada, constituído predominantemente por neutrófilos e raros linfócitos.

A avaliação dos critérios histológicos baseada no sistema de Nottingham modificado por Elston e Ellis (1998) determinou: formação tubular inferior a 10% (escore 3), pleomorfismo nuclear moderado (escore 2) e índice mitótico elevado (escore 3). Conforme detalhado no Quadro 3, o somatório resultou em um escore total de 8 pontos, classificando a neoplasia experimental como Carcinoma Invasor com Padrão Sólido, Grau III (Alto Grau).

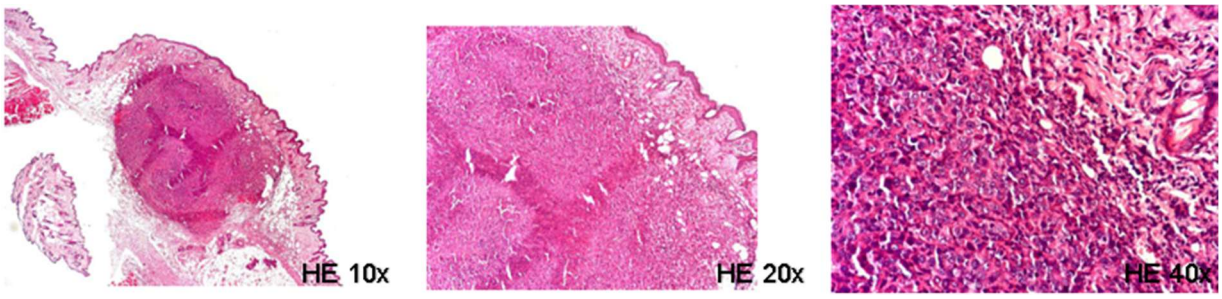


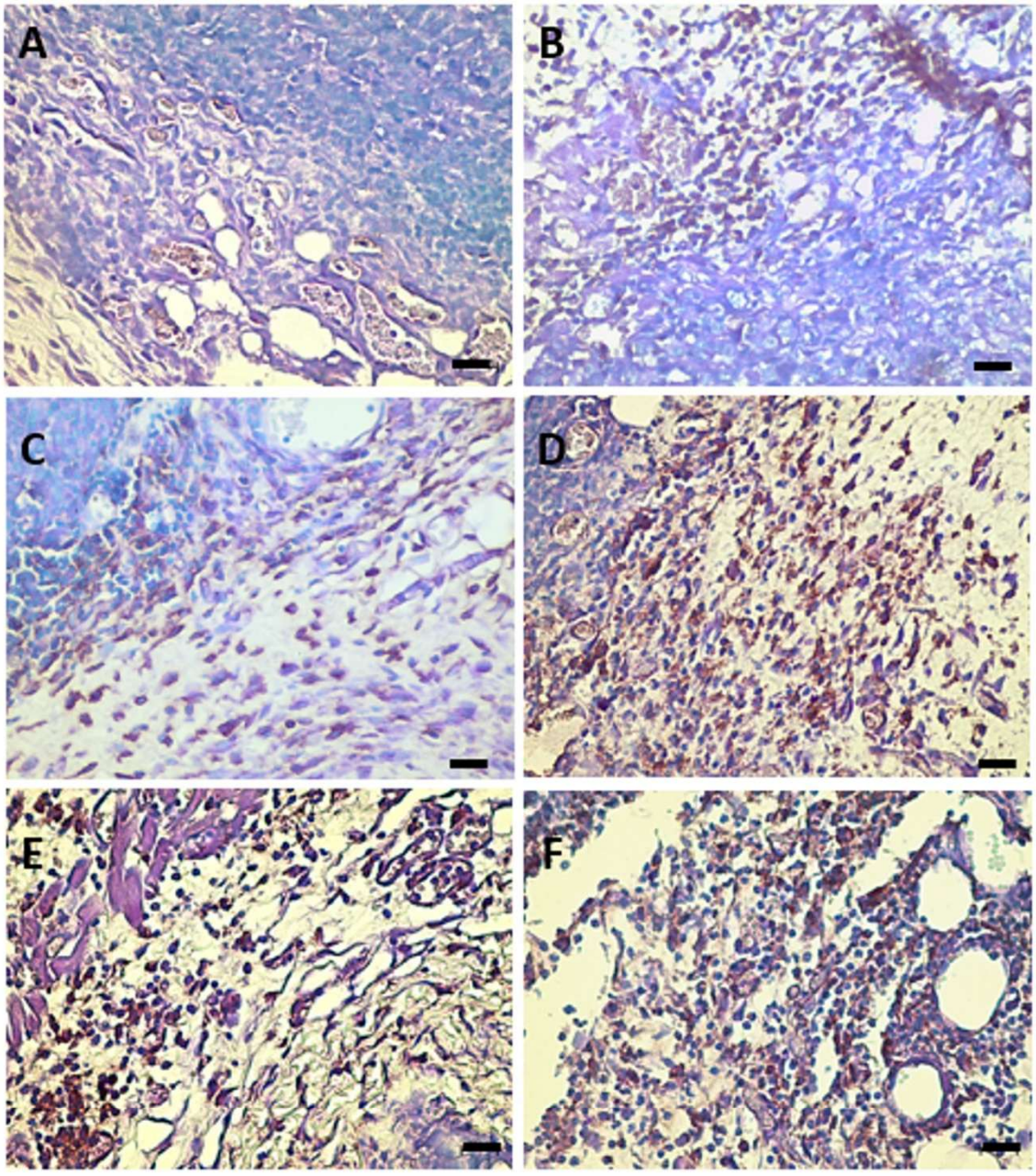
Figura 26 - Aspectos histopatológicos representativos do carcinoma mamário 4T1 em camundongos BALB/c. Fotomicrografias de secções tumorais coradas em Hematoxilina e Eosina (HE) em diferentes aumentos. (HE 10x) Panorâmica evidenciando massa neoplásica infiltrativa na derme e hipoderme com arranjo predominantemente sólido e delimitação lobulada. (HE 20x) Proliferação celular compacta intimamente associada ao estroma local, exibindo áreas de densidade celular homogênea abaixo da epiderme adjacente. (HE 40x) Detalhe em alta resolução demonstrando acentuado índice proliferativo, pleomorfismo nuclear moderado, nucléolos evidentes e limites celulares imprecisos, característicos do padrão sólido de Grau III.

Quadro 3. Graduação histopatológica dos tumores mamários 4T1 com base no sistema de Elston e Ellis (1998).

Parâmetro Histopatológico	Achado Fenotípico/ Resultado	Pontuação Atribuída
Formação Tubular	Padrão sólido predominante (< 10% de túbulos)	3
Pleomorfismo Nuclear	Moderado (variação moderada em tamanho e forma)	2
Índice Mitótico	Elevado (17 mitoses em 2,37mm^2)	3
Nódulo Satélite	Presente	—
Invasão Vascular (Derme)	Presente	—
Escore Total/Grau Histológico	**—**	**8 (Grau III)**

4.9 Análises Imunohistoquímicas dos Marcadores de Morte Celular

A avaliação imuno-histoquímica no microambiente tumoral revelou perfis distintos de marcação proteica entre os grupos experimentais, auxiliando na elucidação das vias de morte celular moduladas pelas terapias. A imunomarcação para a Caspase-3, utilizada como o marcador clássico da via apoptótica dependente de protease, não apresentou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos tratados e o controle ($p > 0,05$), conforme ilustrado nas Figura 27.


A
B
C
D
E
F

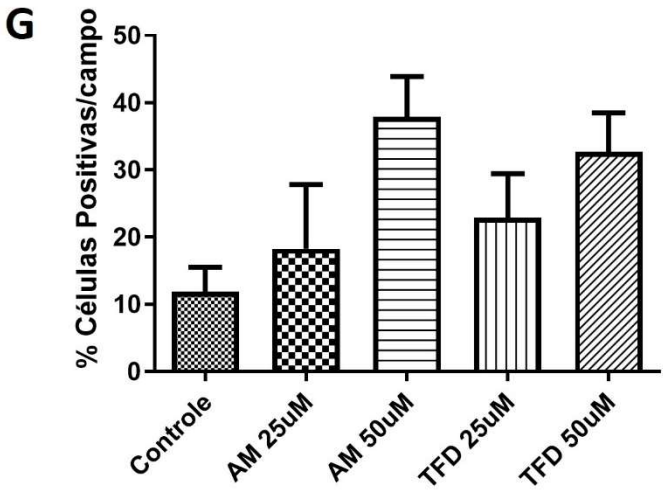

G
% Células Positivas/campo
0
10
20
30
40
50
Controle
AM 25uM
AM 50uM
TFD 25uM
TFD 50uM

Figura 27 - Análise imunohistoquímica da expressão de Caspase-3 em tumores mamários 4T1. Fotomicrografias representativas do tecido tumoral evidenciando o padrão de imunomarcação e quantificação das células marcadas. (A) Controle Negativo; (B) Controle (C) Azul de Metileno (AM) 25 μM; (D) AM 50 μm (E) Terapia Fotodinâmica (TFD) 25 μm; (F) TFD 50 μm (G) Análise quantitativa da porcentagem de células positivas por campo. Os dados expressam a média ± desvio padrão. Não foram detectadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos experimentais avaliados ($p > 0,05$; ANOVA com pós-teste de Tukey). Barra de escala: 50 μm.

Por outro lado, o monitoramento do processo autofágico via imunomarcação para a proteína LC3 revelou um aumento significativo em sua expressão percentual especificamente nos grupos MB 50 μM e PDT50 μM, quando comparados ao grupo controle ($p < 0,05$; Figura 28).

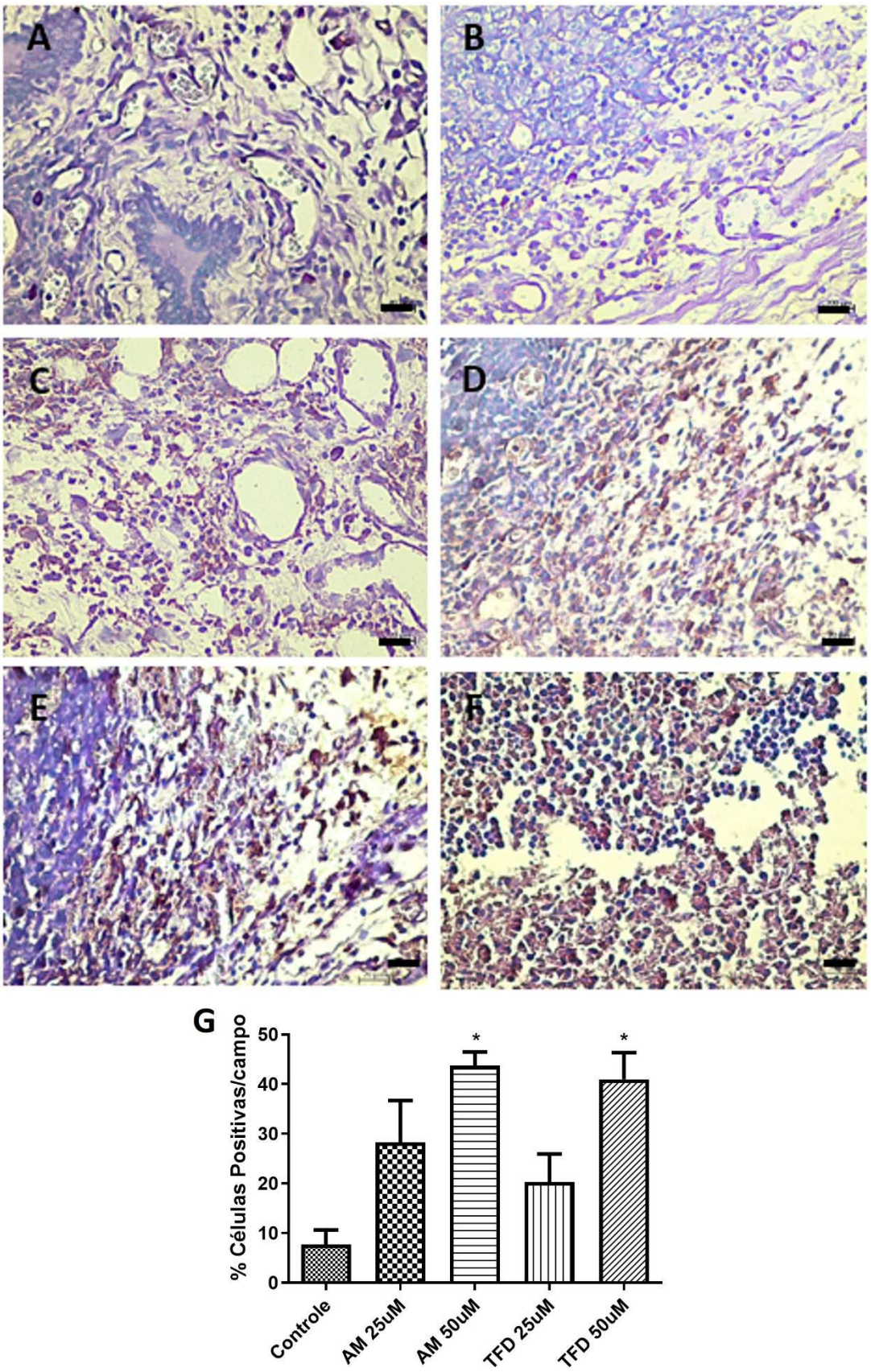


Figura 28 - Análise imunohistoquímica da expressão de LC3B em tumores mamários 4T1. Fotomicrografias representativas do tecido tumoral evidenciando o padrão de imunomarcação e quantificação de células marcadas. (A) Controle Negativo; (B) Controle (C) Azul de Metileno (AM) 25 μM; (D) AM 50 μm (E) Terapia Fotodinâmica (TFD) 25 μm; (F) TFD 50 μm (G) Análise quantitativa da porcentagem de células positivas por campo. Os dados expressam a média ±

desvio padrão. *Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$). Barra de escala: 50 µm.

Adicionalmente, a investigação da via de necroptose (morte celular necrótica regulada) por meio da quantificação da proteína MLK demonstrou uma elevação estatisticamente significativa em sua imunomarcação nos grupos tratados com MB 50 µM e TFD 50 µM ($p < 0,05$; Figura 29).

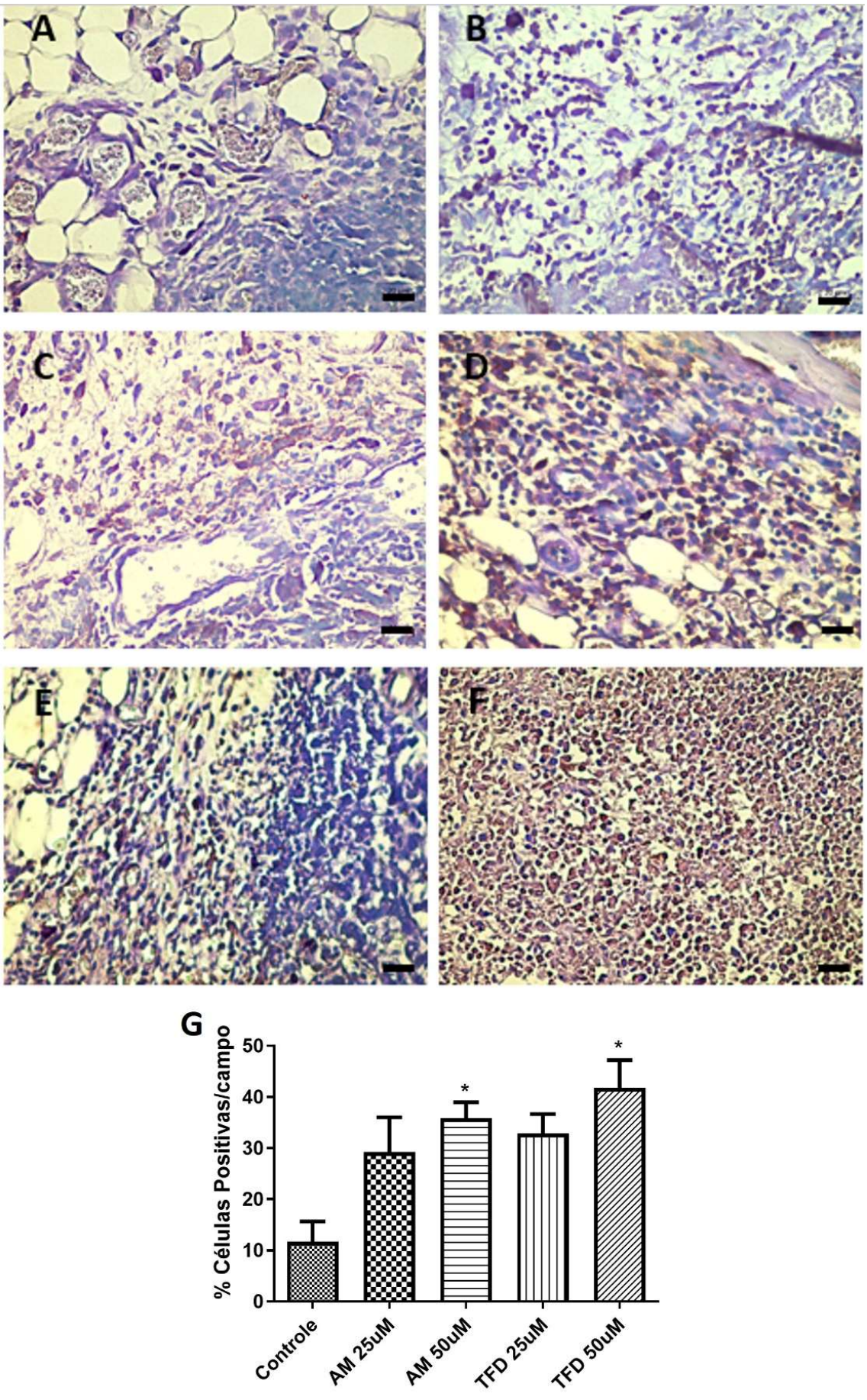


Figura 29 - Análise imunohistoquímica da expressão de MLKL em tumores mamários 4T1. Fotomicrografias representativas do tecido tumoral evidenciando o padrão de imunomarcação

e quantificação de células marcadas. (A) Controle Negativo; (B) Controle (C) Azul de Metileno (AM) 25 μM; (D) AM 50 μm (E) Terapia Fotodinâmica (TFD) 25 μm; (F) TFD 50 μm (G) Análise quantitativa da porcentagem de células positivas por campo. Os dados expressam a média ± desvio padrão. *Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$). Barra de escala: 50 μm.

5 DISCUSSÃO

5.1 A terapia fotodinâmica com azul de metileno no modelo experimental in vitro

A terapia fotodinâmica tem emergido como uma estratégia terapêutica inovadora no tratamento de vários tipos de câncer. Entre os fotossensibilizadores disponíveis, o AM tem ganhado atenção devido às suas propriedades fotoquímicas e ao seu potencial em várias abordagens terapêuticas. Neste estudo, investigamos os efeitos da combinação do AM com a luz em células tumorais de mama murinas 4T1, um modelo amplamente utilizado para estudos de câncer de mama triplo-negativo altamente metastático.

Um dos desafios proeminentes na translação clínica da TFD reside na padronização rigorosa da concentração do FS, do tempo de incubação e dos parâmetros físicos da irradiação laser. A literatura reporta uma expressiva heterogeneidade metodológica em ensaios *in vitro*, o que frequentemente dificulta a comparação direta de limiares fototóxicos (MELLISH et al., 2002; TURCHIELLO et al., 2021). Nossos ensaios preliminares de viabilidade celular revelaram que nos intervalos de incubação mais curtos (10 e 15 minutos) a homeostase celular das células 4T1 permaneceu inalterada em todo o espectro de concentrações (5 a 150 μM), mesmo após o protocolo de irradiação com o laser. Esse perfil inicial é combinado com o ensaio de internalização celular (Figura 12), o qual demonstrou que, embora a captação do AM seja rápida e concentração-dependente, o período de 30 minutos foi o que viabilizou o acúmulo intracelular crítico necessário para deflagrar o estresse fotodinâmico nas doses moduladoras. A ausência de toxicidade em tempos curtos reforça a segurança biológica do corante na ausência de fotoativação massiva, em consonância com dados clássicos de transporte de membrana para compostos catiônicos (JUNQUEIRA et al., 2002).

Esses achados indicam que o AM, em baixas concentrações e com tempos de exposição curtos, não apresenta toxicidade no escuro para as células tumorais. Adicionalmente, dos Santos et al, (2017) demostraram uma

eficiência maior em causar uma morte seletiva em células tumorais sem citotoxicidade escura nas concentrações mais baixas do corante (<20uM). Além disso, os autores demostraram também pela primeira vez que células normais do epitélio mamário são mais resistentes ao AM-TFD. Essas são características fundamentais para o uso seguro da terapia, reforçando o fato de que uma das vantagens da TFD sobre outras abordagens terapêuticas é a possibilidade de gerar menos efeitos colaterais aos pacientes.

A ausência de toxicidade no escuro observada na concentração de 25 μM estabelece uma janela terapêutica favorável para as células 4T1, demonstrando que o AM permanece biologicamente inerte até a sua fotoativação, o que se alinha a relatos de que doses inferiores a 30 μM mimetizam condições seguras na ausência de luz (TURCHIELLO et al., 2021; GOMES et al., 2023). Em contrapartida, o declínio da viabilidade celular obtido na dose de 50 μM independentemente da irradiação, potencializado após a associação ao laser, demonstra o perfil de "toxicidade no escuro" inerente ao corante em concentrações elevadas (KOFLER et al., 2018; LE et al., 2022). Esse fenômeno decorre da capacidade intrínseca do AM de interferir na homeostase mitocondrial, uma resposta estritamente dependente do tipo celular e já documentada pela literatura em linhagens de carcinoma oral (IC50 de 362,6 μM em SCC-9), tumores retinianos e adenocarcinoma prostático expostos a doses superiores a 30–50 μM (KOFLER et al., 2018; TURCHIELLO et al., 2021; ROCHA et al., 2023). Desse modo, os resultados sugerem que a dose de 25 μM representa o limiar crítico de segurança biológica para o modelo experimental avaliado, viabilizando o mapeamento das vias de morte desencadeadas exclusivamente pelo estresse fotodinâmico.

Apesar disso, a dose de 50 μM também foi mantida nas investigações subsequentes. A inclusão dessa concentração justificou-se pela intenção de extrapolar os achados *in vitro* para o modelo tumoral *in vivo*. Sabendo que o comportamento farmacológico e citotóxico de compostos em sistemas celulares isolados frequentemente diverge daquele observado em organismos complexos (SAEIDNIA; MANAYI; ABDOLLAHI, 2015), a avaliação da dose de

50 μM tornou-se essencial para analisar possíveis respostas terapêuticas e limitações biológicas no modelo animal.

Paralelamente à perda de viabilidade, o ensaio de “cicatrização de ferida” demonstrou o potencial da terapia em mitigar a motilidade celular, um componente crucial para a invasão tumoral. Os resultados revelaram que, enquanto os grupos controle e laser alcançaram o fechamento completo da fenda em 48 horas, a aplicação da AM-TFD (25 e 50 μM) e o AM 50 μM isolado preservaram a fenda significativamente aberta. A contenção máxima da migração foi obtida no grupo TFD 50 μM. Esse efeito é altamente relevante no contexto do carcinoma mamário 4T1, conhecido por sua agressividade e rápida disseminação sistêmica. Padrão semelhante foi reportado por Gomes et al. (2023) em células PC3, onde a atividade migratória foi drasticamente suprimida pela terapia fotodinâmica combinada. A atenuação da migração sugere que a fotooxidação local promove não apenas a redução na viabilidade, mas também a desestruturação do citoesqueleto e das proteínas de adesão focal, limitando a capacidade invasiva das células sobreviventes.

Desde que a viabilidade celular foi reduzida, associada com o atraso na “cicatrização de feridas”, especialmente nos grupos AM-TFD, foi investigado quais tipos de mortes celulares poderiam estar envolvidas. A primeira via investigada foi a apoptótica clássica. Os resultados de RT-qPCR revelaram um aumento robusto e altamente significativo na expressão do gene pró-apoptótico Bax, acompanhado por um deslocamento drástico na razão Bax/Bcl-2 nos grupos submetidos à TFD, o que teoricamente sinalizaria o desencadeamento da via intrínseca mitocondrial (RENAULT et al., 2013). No entanto, os níveis transcricionais das caspases efetoras Caspase-3 e Caspase-6 não foram alteradas 24 horas pós-tratamento. Em estrita concordância com a estabilidade das caspases, o ensaio de TUNEL não demonstrou diferenças significativas, indicando a ausência de fragmentação do DNA em todos os grupos. Esse cenário pode indicar que, embora o estresse foto-oxidativo tenha sido suficiente para ativar o gene pró-apoptótico Bax, a cascata enzimática clássica não foi mobilizada para a execução final da apoptose nas condições avaliadas. Nossos achados sugerem que a morte celular induzida pela AM-TFD ocorre predominantemente por mecanismos independentes da apoptose clássica.

Esses resultados estão de acordo com achados recentes que também demonstraram que a AM-TFD (25 μM) não promoveu aumento significativo dos níveis de Caspase-3 ativa nem alterações na expressão de BCL-2 em células de tumor prostático PC3 (GOMES et al., 2023), sugerindo que a apoptose também não constitui o principal mecanismo de morte celular nesse contexto experimental. De forma semelhante, dos Santos et al., 2017, utilizando inibidor de caspases Z-VAD-FMK, demonstrou redução da viabilidade celular em células MCF-10A e MCF-7 tratadas com AM-TFD (20 μM), onde o inibidor não foi capaz de impedir a morte celular. Além disso, não foi detectada ativação significativa das caspases-3 ou -9, nem alterações na razão Bcl-2/Bax.

Por outro lado, alguns estudos observaram resultados opostos. Nesses trabalhos, os autores descreveram que a AM-TFD (3,2 μg/mL) promoveu uma redução significativa da expressão de Bcl-2 e superexpressão de Bax, induzindo efetivamente apoptose em células de carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (HNSCC) (KAHALIAN et al., 2022). Adicionalmente, a AM-TFD (1,0 mg/L), mais LED na dose de 7,5 J/cm² reduziu significativamente a viabilidade celular em fibroblastos (LAMARQUE et al., 2020), aumentando a expressão de citocromo c e Fas-L após 3 horas, seguida por aumentos nas razões Bax/Bcl-2, Bad/Bcl-2 e na expressão de VDAC-1 após 6 horas. Esses resultados indicam que, em fibroblastos murinos, a citotoxicidade induzida pela TFD está associada à ativação de vias apoptóticas dependentes de Bcl-2.

Nossos achados foram obtidos a partir de análises experimentais realizadas 24 horas após a aplicação da AM-TFD. Entretanto, a avaliação da apoptose em um único ponto temporal pode não contemplar integralmente a dinâmica dessa via de morte celular, uma vez que sua manifestação após a terapia fotodinâmica pode ocorrer de forma precoce e transitória. Nesse contexto, Yin et al. (2016), ao investigarem a cinética temporal da apoptose induzida pela terapia fotodinâmica com PsD007 em células de leucemia mieloide aguda LT12, identificaram uma janela apoptótica compreendida aproximadamente entre 2 e 24 horas após o tratamento. Os autores observaram que a intensidade e a duração da resposta apoptótica foram dependentes da dose de PDT, com redução rápida dos eventos apoptóticos em

concentrações mais baixas, enquanto em concentrações mais elevadas esses eventos persistiram por períodos mais prolongados, de até 6 a 12 horas, conforme demonstrado por citometria de fluxo. Além disso, por meio da análise da expressão de 84 genes relacionados à apoptose e da quantificação de proteínas envolvidas nessa via, incluindo a caspase-3 ativada, Yin et al. (2016) observaram maior intensidade dos eventos associados à morte apoptótica entre aproximadamente 6 e 12 horas após a TFD. Esses dados sugerem que a resposta apoptótica pode apresentar uma dinâmica temporal anterior ao período de 24 horas utilizado em nossas análises. Dessa forma, embora nossos resultados não permitam excluir a participação da apoptose na resposta à AM-TFD, a avaliação realizada exclusivamente 24 horas após o tratamento pode ter subestimado a magnitude dessa via de morte celular. A inclusão de diferentes pontos temporais, especialmente em períodos mais precoces, poderia contribuir para uma caracterização mais abrangente da cinética da apoptose e esclarecer sua participação na resposta induzida pela AM-TFD no modelo 4T1.

Embora esses estudos apontem a apoptose como principal via de morte celular, a agressividade do modelo 4T1 e o tipo de estresse gerado pelo nosso tratamento direcionam o destino celular para modalidades alternativas de morte regulada. Por isso, o segundo tipo de morte celular avaliado foi a autofagia. A autofagia é frequentemente iniciada para remover organelas danificadas, como mitocôndrias, lisossomos ou retículo endoplasmático, que constituem alvos intracelulares comuns de diversos FS (KESSEL et al., 2015; ANIOGO et al., 2020). De fato, consolidou-se um consenso de que a autofagia é uma consequência frequente da TFD, desempenhando um papel duplo ao determinar tanto citoproteção celular quanto morte celular programada (MARTINS et al., 2021).

Em nossos experimentos, em contraste com os outros grupos, apenas o tratamento isolado com AM 50 μM promoveu um aumento significativo nos níveis relativos de mRNA de LC3B em relação ao controle ($p < 0,05$). Esse resultado sugere que o AM em altas concentrações, mesmo no escuro, pode atuar como um estímulo para a modulação e ativação da via da autofagia. Entretanto, a via autofágica assumiu um caráter puramente adaptativo ou

acessório frente ao estresse induzido, já que a co-incubação com o agente lisossomotrópico cloroquina foi incapaz de modular a citotoxicidade em qualquer um dos grupos, o que demonstra que a autofagia não atuou como o mecanismo de morte celular. Tais achados também foram descritos em células tumorais prostáticas (PC3) tratadas com AM-TFD (25 μM), onde os marcadores autofágicos foram aumentados significativamente, mas esse processo atuou como uma resposta pró-sobrevivência, e não como um mecanismo indutor de morte celular (GOMES et al., 2023). Esse resultado evidencia que, mesmo quando a autofagia está presente do ponto de vista morfológico e bioquímico, ela pode não representar o mecanismo executor final dos efeitos da TFD.

Notavelmente, o maquinário autofágico vem sendo cada vez mais reconhecido por sua capacidade de interagir com outras formas de morte celular regulada, como apoptose e necroptose (MARTINS et al., 2021). Sua modulação pode alterar significativamente o limiar apoptótico; especificamente, a inibição da autofagia ou a sobrecarga dos seus mecanismos de sobrevivência leva à redução da expressão de proteínas antiapoptóticas, como Bcl-2, e ao aumento de fatores pró-apoptóticos, como Bax (MARTINS et al., 2021). Essa alteração molecular sensibiliza efetivamente as células tumorais ao estresse fotoinduzido, reduzindo sua resistência aos danos provocados pela luz. Em nosso estudo, os grupos submetidos à TFD apresentaram tal alteração expressiva na razão Bax/Bcl-2, o que poderia sugerir um potencial envolvimento da autofagia. Dessa forma, os resultados indicam que a AM-TFD em células 4T1 desencadeia sinais moleculares associados ao estresse celular, porém a autofagia parece desempenhar um papel secundário ou adaptativo em especial no grupo AM 50 μM, sem contribuição decisiva para a execução dessa via de morte celular nas condições experimentais avaliadas.

A terceira via de morte celular investigada foi a necroptose, uma forma regulada de morte celular que apresenta morfologia necrótica e é orquestrada pelo eixo de sinalização RIPK1/RIPK3/MLKL. Esse processo é caracterizado pela rápida permeabilização da membrana plasmática, facilitada pela formação de poros em escala nanométrica com diâmetro superior a 200 nm, levando ao intumescimento celular, condensação moderada da cromatina e subsequente liberação do conteúdo intracelular para o espaço extracelular (DUAN et al., 2018). Os resultados de viabilidade celular demonstraram inicialmente que

tanto o tratamento isolado com AM (50 μM) quanto a TFD nas duas concentrações (25 e 50 μM) exerceram um pronunciado efeito citotóxico. No entanto, a ausência de resgate significativo pela Nec-1 no grupo TFD 25 μM sugere que a via necroptótica não foi expressivamente recrutada nessa dosagem mais baixa, indicando que ela não desempenha um papel preponderante na resposta citotóxica das células 4T1 sob esse estímulo específico. Em contrapartida, nos grupos submetidos à maior concentração do fotossensibilizador (AM 50 μM isolado e TFD 50 μM), a co-incubação com a Nec-1 foi capaz de resgatar de forma significativa a viabilidade celular. Esse comportamento funcional fornece evidências de que a necroptose pode atuar como uma das vias de morte predominantemente ativadas pelo estresse fotodinâmico nestas condições avaliadas. Curiosamente, embora o resgate farmacológico com a Nec-1 demonstre o envolvimento da necroptose, a análise molecular revelou que os níveis relativos de mRNA de MLKL permaneceram inalterados em todos os grupos experimentais. A execução da necroptose baseia-se primordialmente em modificações pós-traducionais, especificamente na cascata de fosforilação de RIPK1/RIPK3/MLKL e na subsequente translocação proteica para a membrana celular. Desse modo, o processo utiliza o *pool* de proteínas preexistentes no citoplasma, ocorrendo de forma independente de novas sínteses de mRNA no intervalo de tempo avaliado (COUPIENNE et al., 2011; SUN et al., 2012).

Adicionalmente, o estresse oxidativo gerado pela TFD pode desencadear a lise celular de maneira tão rápida que antecede qualquer resposta transcricional compensatória detectável para o gene MLKL. Em consonância com Wang et al. (2023), o tratamento de células 4T1 com 5-ALA-TFD resultou na redução da viabilidade celular em até 4 horas pós-irradiação, efeito associado ao aumento acentuado da fosforilação de MLKL, reforçando o caráter agudo e pós-traducional dessa via de morte.

A literatura demonstra que a ativação da necroptose pela AM-TFD é altamente dependente do modelo celular e do perfil metabólico específico do tumor. A AM-TFD (25 μM) foi capaz de reduzir significativamente a viabilidade de células PC3 por meio da indução de necroptose, conforme confirmado pelo aumento dos níveis de MLKL fosforilada (p-MLKL) (GOMES et al., 2023). Além disso, foi relatado que a AM-TFD promove a eliminação eficaz de células

agressivas de câncer de mama humano (MCF-10A e MDA-MB-231) por mecanismos envolvendo a permeabilização da membrana lisossomal, processo que pode culminar em necroptose e/ou ferroptose (dos SANTOS et al., 2020). Esses resultados corroboram a hipótese de que a AM-TFD desencadeia respostas citotóxicas específicas para cada tipo celular e dependentes da dose do fotossensibilizador.

Por fim, a última via de morte celular investigada foi a ferroptose. Considerando a relação bem estabelecida entre estresse foto-oxidativo e peroxidação lipídica, a ferroptose surgiu como uma principal candidata a explicar a redução da viabilidade pela AM-TFD 25μM. Nossos resultados revelaram um aumento significativo nos níveis relativos de mRNA de GPX4 nos grupos AM 50 μM e AM-TFD 25 μM. A GPX4 é considerada a principal enzima antioxidante responsável pela neutralização de hidroperóxidos lipídicos presentes nas membranas biológicas (KACZMAREK et al., 2013). Dessa forma, sua superexpressão provavelmente representa uma resposta celular compensatória destinada a neutralizar o intenso estresse oxidativo e os danos de membrana induzidos pelo tratamento.

A evidência mais robusta da participação da ferroptose foi obtida por meio do experimento de resgate utilizando a Fer-1, um potente antioxidante lipofílico e inibidor específico dessa via de morte celular. A adição de Fer-1 aboliu completamente os efeitos citotóxicos da AM-TFD em ambas as doses, apesar do grupo AM-TFD 50 μM não ter apresentado inicialmente aumento nos níveis de mRNA de GPX4, restaurando a viabilidade celular a níveis comparáveis aos do grupo controle ($p < 0,05$). Essa recuperação total mostra que a peroxidação lipídica pode constituir um evento decisivo responsável pela morte das células 4T1.

É válido destacar aqui que, embora as análises dos nossos resultados demonstrem que o grupo TFD 25 μM tenha apresentado apenas uma tendência visual de resgate da viabilidade celular na presença de Fer-1, essa diferença não atingiu significância estatística na análise global devido à alta variância observada nos grupos de maior concentração (50 μM). Visualmente, observa-se que o grupo TFD 25 μM exibe uma tendência nítida de resgate da viabilidade celular na presença do inibidor de ferroptose. No entanto, quando submetido às análises estatísticas considerando todos os grupos experimentais

simultaneamente, essa diferença não atingiu significância, ao passo que, na ausência dos grupos AM 50 μM e AM-TFD 50 μM, mantendo as análises estatísticas, o grupo AM-TFD 25 μM passa a apresentar significância estatística. A exclusão matemática dos grupos de 50 μM reduz o número de hipóteses testadas concorrentemente e diminui a variabilidade residual, permitindo que o grupo TFD 25 μM alcance significância estatística de forma isolada. Portanto, a ausência de uma sinalização de relevância estatística no gráfico completo não anula o potencial biológico de resgate por Fer-1 na dose de 25 μM, mas reflete uma limitação de sensibilidade analítica induzida pela dispersão de dados nas doses superiores.

Em concordância com nossos achados, foi demonstrado que a AM-TFD (20 μM - 4,5 J/cm²) foi capaz de induzir ferroptose em células humanas de câncer de mama (dos SANTOS et al., 2020). Considerando que as EROs geradas durante a TFD apresentam curto raio de difusão e elevada reatividade, a localização intracelular do FS constitui um fator determinante para a eficiência do tratamento (MROZ et al. 2011; MARTINS et al., 2021). Dessa forma, a associação do AM às membranas biológicas potencializa a ocorrência de danos foto-oxidativos localizados, especialmente a peroxidação lipídica de fosfolipídios de membrana. Esse mecanismo é particularmente relevante no contexto da ferroptose. A combinação entre a afinidade do AM por membranas, sua capacidade de gerar EROs após fotoativação e sua localização em organelas sensíveis ao estresse oxidativo (BACELLAR et al., 2014) favorece a indução de danos lipídicos extensos, culminando na ativação de vias de morte celular dependentes de peroxidação lipídica. Assim, além de atuar como um eficiente FS, o AM apresenta propriedades que o tornam particularmente adequado para a indução de ferroptose.

O direcionamento dessas formas não-apoptóticas de morte celular regulada emerge como uma alternativa na oncologia. Tumores agressivos e refratários, como o carcinoma mamário triplo-negativo, frequentemente exibem mutações deletérias em vias apoptóticas, desenvolvendo resistência a múltiplos fármacos. A capacidade da AM-TFD em atuar nas células tumorais promovendo a lise regulada da membrana plasmática contorna com eficácia esses bloqueios genéticos (WANG et al., 2019; SHISHIDO et al., 2021). Além da citotoxicidade local direta, a ativação da necroptose e da ferroptose produz

um impacto sistêmico. Ao contrário do caráter imunologicamente "silencioso" da apoptose clássica, a ruptura de membrana característica da necrose regulada atua como um gatilho para a Morte Celular Imunogênica (YAN et al., 2021; MISHCHENKO et al., 2022). O extravasamento do conteúdo citoplasmático culmina na liberação massiva de DAMPs (GARG; AGOSTINIS, 2017).

Essa sinalização biológica atua como um potente quimiotático, promovendo o recrutamento, a fagocitose de antígenos tumorais e a maturação subsequente de células dendríticas no microambiente tumoral. Uma vez ativadas, as células dendrítica migram para os linfonodos drenantes, promovendo a apresentação antigênica e expandindo clones clonais de linfócitos T citotóxicos $CD8^+$ específicos contra o tumor (WANG et al., 2019). Ao deflagrar a morte via necroptose ou ferroptose de maneira dose-dependente, a AM-TFD transita de uma modalidade puramente local para um estimulador de vacinação tumoral *in situ*. Esse mecanismo é fundamental para o estabelecimento de uma memória imunológica adaptativa de longo prazo. No contexto do carcinoma mamário metastático, essa resposta imune sistêmica torna-se a ferramenta mais promissora para rastrear, reconhecer e erradicar micrometástases e células tumorais 4T1 disseminadas em sítios distantes (GARG et al., 2015), consolidando a AM-TFD como uma abordagem terapêutica estratégica e de alto impacto no controle da progressão de tumores mamários agressivos.

5.2 A terapia fotodinâmica com azul de metileno no modelo experimental in vivo

Os mesmos tratamentos com AM e AM-TFD *in vitro* foram utilizados num ambiente complexo de um organismo vivo, avaliados inicialmente por meio do monitoramento do diâmetro tumoral macroscópico na janela temporal compreendida entre o início das intervenções (Dia 14) e o desfecho experimental com a eutanásia dos animais (Dia 17) (Figura 23). Conforme exposto na análise intragrupo (Momento Inicial vs. Momento Final), o grupo Controle exibiu uma expansão tumoral explosiva e altamente acentuada ($p < 0,001$). De forma homóloga, os grupos expostos ao AM 50 µM ($p < 0,01$), TFD

25 μM ($p < 0,01$) e TFD 50 μM ($p < 0,05$) também apresentaram um incremento estatisticamente significativo em suas áreas ao término do período.

Em contraste evidente, o grupo submetido ao tratamento com AM 25 μM demonstrou uma estabilização no crescimento macroscópico da lesão, configurando-se como a única condição experimental que não apresentou aumento estatisticamente significativo de sua área entre os momentos inicial e final. Esse efeito de estabilização do volume tumoral, sem necessariamente promover a regressão completa do tecido neoplásico, já foi descrito em modelos experimentais, tratados com AM-TFD, inclusive sob regimes de doses superiores às empregadas no presente estudo, nos quais a indução de dano vascular local e o estresse oxidativo podem reduzir a taxa mitótica e lentificar a progressão da massa tumoral (TARDIVO et al., 2005).

Por outro lado, a persistência do crescimento tumoral nos grupos tratados com doses mais elevadas (AM 50 μM e TFD 50 μM), embora em menor escala que o controle ($p < 0,01$ e $p < 0,05$, respectivamente), pode levantar a hipótese de ativação de vias adaptativas tumorais. O disparo de respostas inflamatórias e o recrutamento da maquinaria autofágica tumoral são frequentemente associados ao restabelecimento da homeostase tecidual e ao surgimento de nichos de resistência adaptativa, os quais podem justificar a progressão proliferativa do tumor e impedem o desfecho de remissão (INGUSCIO; PANZARINI; DINI, 2012).

Paralelamente, o monitoramento da massa corpórea dos animais (Figura 24) foi realizado para ser indicador de bem-estar geral e de ausência de toxicidade sistêmica pré-clínica. Os camundongos exibiram pesos médios homogêneos e semelhantes em ambos os momentos avaliados, sem variações ponderais significativas ($p > 0,05$). Esses dados de tolerabilidade confirmam que a progressão neoplásica não induziu quadros de caquexia tumoral e, crucialmente, atestam que nem o AM administrado de forma isolada nem o estresse foto-oxidativo decorrente da AM-TFD provocaram efeitos adversos agudos deletérios. Esse perfil seguro e não invasivo corrobora os achados de Wu et al. (2019), que administraram AM encapsulado em lipossomas por via intravenosa (dose de 1mg/kg) em camundongos portadores de câncer de mama e avaliaram o peso corporal dos animais durante 14 dias. Essa elevada biossegurança sistêmica fundamenta-se na natureza espacialmente restrita da

ativação fotodinâmica, cuja reação fotoquímica e geração de EROs ocorrem exclusivamente nos sítios biológicos submetidos à intersecção simultânea entre o acúmulo do FS e a irradiação direcionada pelo laser (VAN STRATEN et al., 2017).

Microestruturalmente, a caracterização histopatológica das massas tumorais (Figura 25) revelou um fenótipo de alta agressividade biológica, consolidado pelo sistema de Nottingham modificado por Elston e Ellis (1998) como um Carcinoma Invasor com Padrão Sólido de Grau III (Alto Grau). Conforme detalhado no mapeamento morfométrico (Quadro 3), o escore total de 8 pontos decorreu de uma formação tubular inferior a 10% (escore 3), pleomorfismo nuclear moderado com anisocitose e anisocariose evidentes (escore 2) e um índice mitótico severamente elevado, registrando-se 17 figuras de mitose em uma área de 2,37 mm^2 (escore 3), inclusive com a identificação frequente de formas atípicas. Essa intensa atividade mitótica e o arranjo celular em blocos compactos sustentados por um estroma fibrovascular escasso mimetizam o microambiente de carcinomas pouco diferenciados de prognóstico desfavorável.

Adicionalmente, a identificação histológica de nódulos satélites na derme adjacente e de invasão de vasos sanguíneos por células neoplásicas (êmbolos tumorais) atesta o perfil altamente invasivo e metastático da linhagem 4T1. Tumores de alto grau histológico associados à infiltração vascular representam um dos maiores desafios terapêuticos na oncologia. Nesses cenários, a eliminação incompleta de células presentes na periferia infiltrativa ou nos vasos acometidos pode favorecer a sobrevivência de subpopulações celulares mais resistentes, com maior capacidade invasiva e expressão de metaloproteinases, estimulando processos de transição epitélio-mesenquimal e impulsionando a progressão tumoral residual (Mossakowska et al., 2022). Por fim, o infiltrado inflamatório de intensidade moderada, constituído predominantemente por neutrófilos na periferia tumoral, sinaliza uma resposta imune inata local basal ativa, a qual pode atuar de forma estratégica ao ser modulada por terapias indutoras de morte imunogênica (CASTANO; MROZ; HAMBLIN, 2006; NATH; OBAID; HASAN, 2019).

É importante ressaltar aqui, como uma limitação metodológica do presente estudo, que não foi realizada a avaliação histopatológica comparativa

individualizada grupo a grupo após as intervenções; em contrapartida, estabeleceu-se uma caracterização histopatológica descritiva do modelo experimental de enxerto tumoral.

As análises imuno-histoquímicas das massas tumorais expandiram de forma consistente os achados observados nos ensaios in vitro. As análises para Caspase-3, um dos principais efetores da fase executora da apoptose, não revelaram diferenças estatísticas significativas entre os grupos tratados e o grupo controle ($p>0,05$). Considerando que a ativação da Caspase-3 representa um evento central na apoptose clássica, responsável pela clivagem de múltiplos substratos intracelulares e pela fragmentação nuclear (ELMORE, 2007), esses resultados sugerem que a apoptose não constituiu a principal modalidade de morte celular induzida pelos tratamentos avaliados. A ausência de aumento da expressão de Caspase-3 corrobora com as evidências crescentes de que a TFD pode desencadear mecanismos alternativos de morte celular regulada (dos SANTOS et al., 2020; de SOUZA et al., 2024), cuja ativação depende da localização subcelular do FS, da intensidade do estresse oxidativo gerado e das características metabólicas intrínsecas do tumor.

A ausência de ativação significativa da Caspase-3 observada neste estudo pode ainda estar relacionada à capacidade intrínseca das células tumorais de evadir a apoptose, um dos principais *hallmarks of cancer* (Hanahan, 2022). Por outro lado, a imuno-histoquímica para LC3B demonstrou aumento significativo nos grupos tratados com AM 50 μM e AM-TFD 50 μM; esses achados sugerem o recrutamento da maquinaria autofágica em resposta ao estresse celular induzido pelo tratamento.

No contexto da TFD, o aumento na expressão de LC3B nos grupos de maior dose reflete o recrutamento da maquinaria autofágica em resposta ao estresse foto-oxidativo. A fotoxidação de organelas vitais, como mitocôndrias e retículo endoplasmático, estimula processos seletivos, como mitofagia e reticulofagia, voltados para a remoção de estruturas disfuncionais, reciclagem de componentes intracelulares e contenção do dano tecidual (AGOSTINIS et al., 2011; MARTINS et al., 2021). Desse modo, essa ativação opera como uma via adaptativa e citoprotetora de reparo frente à agressão terapêutica, atuando diretamente como um potencial mecanismo de resistência ao tratamento (INGUSCIO; PANZARINI; DINI, 2012). Essa resiliência molecular correlaciona-

se perfeitamente com os achados macroscópicos do modelo *in vivo*, auxiliando no entendimento do porquê dos grupos expostos à dose de 50 μM (AM 50 μM e TFD 50 μM) terem mantido uma progressão tumoral estatisticamente significativa; o gatilho adaptativo da autofagia nesses tecidos atuou de forma eficiente para mitigar a ação fotodinâmica, sustentando a sobrevivência e a expansão da massa neoplásica. Adicionalmente a interpretação desse perfil tecidual, deve-se considerar a heterogeneidade do microambiente tumoral sólido. Conforme descrito por White e DiPaola (2009), a autofagia é naturalmente hiperativada em nichos hipóxicos distantes do suprimento vascular como uma estratégia de resiliência metabólica. Assim, o acúmulo de LC3B observado correlaciona-se tanto à injúria fotoquímica direta quanto a processos homeostáticos da própria biologia infiltrativa do carcinoma 4T1.

Além da autofagia, observou-se aumento significativo de MLKL nos grupos tratados com AM 50 μM e AM-TFD 50 μM. A proteína MLKL é considerada o principal efetor terminal da necroptose, uma forma de morte celular regulada dependente da ativação da via RIPK1/RIPK3/MLKL (de SOUZA et al., 2024). Diferentemente da apoptose, que geralmente ocorre de forma imunologicamente silenciosa, a necroptose resulta na liberação de conteúdo intracelular e de moléculas sinalizadoras conhecidas como DAMPs, incluindo HMGB1, ATP extracelular, proteínas de choque térmico e fragmentos de DNA (GARG; AGOSTINIS, 2017). Considerando o caráter altamente agressivo e metastático da linhagem 4T1, a ativação de vias alternativas de morte celular regulada, como necroptose, pode representar um mecanismo compensatório induzido pela TFD para superar as resistências apoptótica e autofágica frequentemente observada em tumores avançados (AGOSTINIS et al., 2011).

A crescente valorização da necroptose na oncologia decorre justamente de seu potencial imunogênico. Estudos recentes demonstram que a ativação dessa via oferece uma nova perspectiva sobre a TFD ao favorecer o recrutamento de células dendríticas, macrófagos e linfócitos T citotóxicos, contribuindo diretamente para a transformação de um microambiente tumoral imunossupressor em um nicho pró-inflamatório e imunologicamente ativo (dos SANTOS et al., 2020). Trabalhos na literatura indicam que a necroptose opera como um mecanismo subjacente crucial no contexto da TFD, especialmente

em neoplasias de pâncreas e glândulas mamárias, nas quais a indução desse perfil de morte estimula a liberação de citocinas pró-inflamatórias e a quimiotaxia leucocitária local (dos SANTOS et al., 2020; CHOI et al., 2023). No presente estudo, embora os achados histopatológicos detalhados correspondam à caracterização inicial e descritiva do modelo de enxerto tumoral, a identificação prévia de um infiltrado inflamatório local, composto predominantemente por neutrófilos e raros linfócitos, sinaliza de forma contundente que as populações celulares imunológicas já se fazem presentes no microambiente da lesão. Por constituir uma das principais modalidades de morte celular regulada associadas à deflagração da morte celular imunogênica, esse processo é fundamental para o desenvolvimento de respostas antitumorais sistêmicas e o estabelecimento de uma memória imunológica duradoura (TURUBANOVA, 2019). Desse modo, o aumento expressivo na marcação tecidual de MLKL evidenciado sinaliza que a AM-TFD vai além da ablação citotóxica puramente local, podendo estar relacionado também como um gatilho estratégico para modular e potencializar a atividade desse contingente imune já residente, o que carrega implicações clínicas extraordinárias para o desenho de terapias combinatórias focadas na promoção de uma imunidade ativa e sustentada a longo prazo.

5.3 Correlação in vitro vs. in vivo

É amplamente reconhecido que uma parcela significativa das respostas biológicas obtidas em culturas celulares não se reproduz fielmente em modelos *in vivo*, uma discrepância decorrente da grande complexidade sistêmica do organismo animal, que envolve interações estromais, barreiras farmacocinéticas e modulações imunológicas. No presente estudo, contudo, observou-se uma sólida sobreposição dos resultados experimentais entre as duas formas de análise, validando a consistência dos fenômenos moleculares investigados. Essa convergência de dados reflete-se de forma nítida na ausência de modulação da Caspase-3, o que confirma, em ambas as fases metodológicas, que a apoptose clássica desempenhou papel estritamente limitado como via executora. Em contrapartida, o aumento concomitante e estatisticamente significativo dos marcadores LC3B e MLKL, tanto nas análises

in vitro quanto no mapeamento proteico *in vivo*, corrobora a coexistência e o sinergismo entre a maquinaria autofágica adaptativa e a rota necroptótica regulada frente ao estresse oxidativo severo (em especial nos grupo AM 50 μM e AM-TFD 50 μM). Achados similares e descritos recentemente na literatura sustentam que linhagens neoplásicas glandulares de alta agressividade, quando submetidas a injúrias fotodinâmicas agudas, tendem a recrutar simultaneamente essas cascatas multifatoriais de morte como uma resposta coordenada para contornar o bloqueio de vias programadas convencionais (ALMEIDA et al., 2023; GOMES et al., 2023).

Essa mesma consistência na correlação dos resultados estendeu-se ao fenômeno da toxicidade no escuro associada à concentração de 50 μM, cuja ação citotóxica observada exaustivamente nos ensaios *in vitro* manteve-se de forma fidedigna nos resultados *in vivo*. Embora o AM possua um histórico consolidado de segurança na prática clínica, a literatura pré-clínica adverte que doses locais elevadas podem intensificar o estresse oxidativo basal através de danos diretos ao DNA mitocondrial e da indução de reações inflamatórias locais por radicais livres (ATAMNA et al., 2008; BUZGA et al., 2022). Esse comportamento dose-dependente e independente de fotoativação reforça a importância crítica da determinação rigorosa da janela terapêutica do FS. No presente estudo, a sobreposição desse achado em ambas as plataformas, valida a dose de 25 μM como o limiar crítico de segurança biológica para o modelo 4T1, abrindo perspectivas valiosas para investigações futuras focadas na avaliação de marcadores adicionais de peroxidação lipídica e disfunção de endomembranas.

6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo reforçam o potencial da Terapia Fotodinâmica mediada por Azul de Metileno como uma abordagem terapêutica promissora, com possível relevância no tratamento de neoplasias mamárias agressivas, invasivas e refratárias às terapias convencionais, conforme resumido na Figura 30.

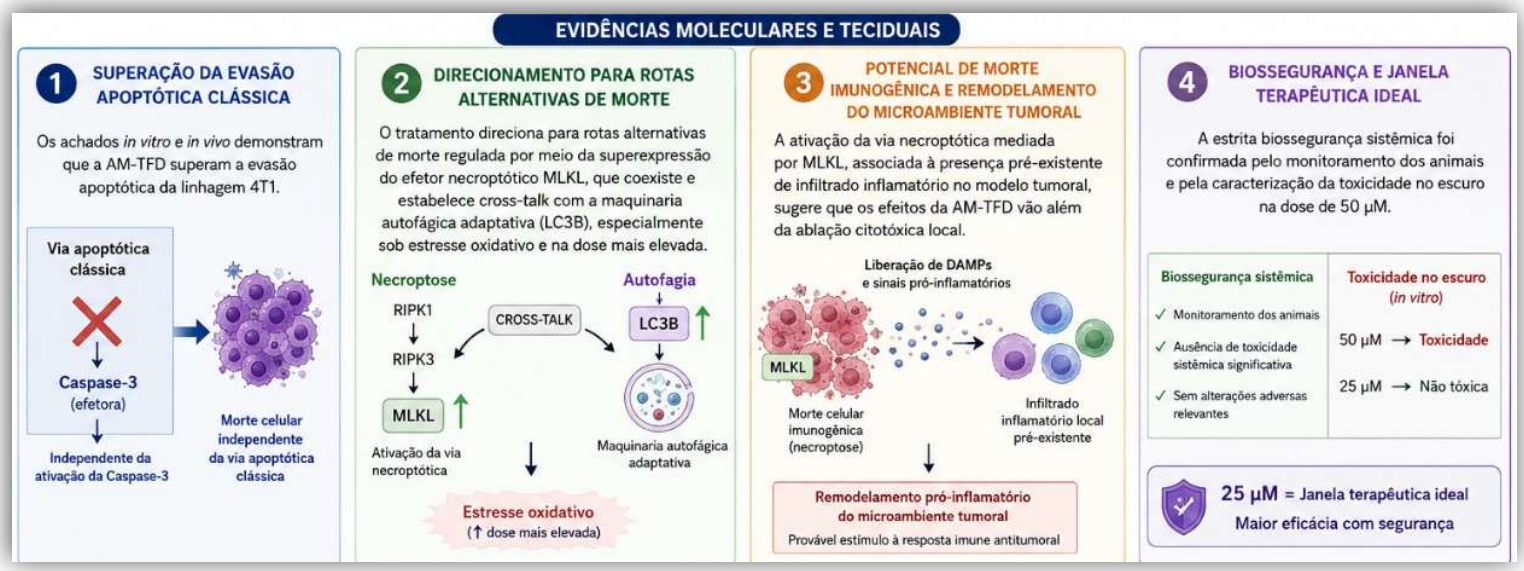


Figura 30 - Resumo gráfico das principais evidências obtidas no estudo: Os achados *in vitro* e *in vivo* demonstram que a AM-TFD superam a evasão apoptótica clássica característica da linhagem 4T1, uma vez que as mortes celulares ocorram de forma independente da ativação da via efetuadora da Caspase-3; O tratamento direciona para rotas alternativas de morte regulada por meio da superexpressão do efetor necroptótico MLKL, a qual coexiste e estabelece um *cross-talk* com a maquinaria autofágica adaptativa (expressão de LC3B), ativada sobretudo sob estresse oxidativo e na dose mais elevada; A ativação da via necroptótica mediada por MLKL, associada à identificação histopatológica pré-existente de um infiltrado inflamatório local no modelo de enxerto tumoral, sugere que os efeitos da AM-TFD vão além da ablação citotóxica local, sugerindo a indução de morte celular imunogênica e provável remodelamento pró-inflamatório do microambiente tumoral.

Por fim, a estrita biossegurança sistêmica demonstrada pelo monitoramento dos animais e a caracterização da toxicidade no escuro na dose de 50 µM consagram a concentração de 25 µM como a janela terapêutica ideal para o modelo. Conclui-se, portanto, que a AM-TFD se consolida não apenas como uma estratégia de destruição tumoral direta, mas como um promissor tratamento para terapias oncológicas combinatórias focadas na modulação do estroma neoplásico e na provável resposta imune antitumoral frente a ativação de mortes celulares imunogênicas.

7 DECLARAÇÃO DE USO ÉTICO E TRANSPARÊNCIA - USO DE INTELIGÊNCIA ARTIFICIAL

Declaro, para os devidos fins de transparência e integridade acadêmica, que utilizei ferramenta de Inteligência Artificial (IA) para a concepção e criação de figuras e esquemas ilustrativos apresentados nesta tese.

Ressalto que o uso dessa tecnologia teve caráter exclusivamente auxiliar, servindo para otimizar o processo de criação visual e aprimorar a clareza didática das ilustrações, sem interferir no conteúdo científico, na análise de dados ou na redação do texto da pesquisa.

A ferramenta de IA (Google Gemini®) foi empregada sob minha supervisão direta, sendo as imagens geradas submetidas a rigorosa revisão e edição por minha parte para garantir sua precisão técnica e total conformidade com os resultados e conceitos discutidos no trabalho. A autoria intelectual, a responsabilidade pelo conteúdo e as interpretações apresentadas permanecem sob minha inteira responsabilidade.

8 REFERÊNCIAS

1. ABRAHAMSE, H.; HAMBLIN, M. R. **New photosensitizers for photodynamic therapy**. *Biochemical Journal*, London, v. 473, n. 4, p. 347–364, 2016. DOI: 10.1042/BJ20150942.
2. AEBISHER, D.; SERAFIN, I.; BATÓG-SZCZĘCH, K.; DYNAROWICZ, K.; CHODUREK, E.; KAWCZYK-KRUPKA, A.; BARTUSIK-AEBISHER, D. **Photodynamic therapy in the treatment of cancer—The selection of synthetic photosensitizers**. *Pharmaceuticals*, Basel, v. 17, n. 7, art. 932, 2024. DOI: 10.3390/ph17070932.
3. AGOSTINIS, P.; BERG, K.; CENGEL, K. A.; FOSTER, T. H.; GIROTTI, A. W.; GOLLNICK, S. O.; HAHN, S. M.; HAMBLIN, M. R.; JUZENIENE, A.; KESSEL, D. **Photodynamic therapy of cancer: an update**. *CA: A*

Cancer Journal for Clinicians, Hoboken, v. 61, n. 4, p. 250–281, 2011. DOI: 10.3322/CAAC.20114.

4. ALLISON, R. R.; SIBATA, C. H. **Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: a clinical review**. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, Amsterdam, v. 7, n. 2, p. 61–75, 2010. DOI: 10.1016/j.pdpdt.2010.02.001.

5. ALMEIDA, D. R. Q. *et al.* **Necroptosis activation is associated with greater methylene blue-photodynamic therapy-induced cytotoxicity in human pancreatic ductal adenocarcinoma cells**. *Photochemical & Photobiological Sciences*, Cambridge, v. 22, p. 729–744, 2023. DOI: 10.1007/s43630-022-00347-4.
6. ALZEIBAK, R.; MISHCHENKO, T. A.; SHILYAGINA, N. Y.; BALALAEVA, I. V.; VEDUNOVA, M. V.; KRYSKO, D. V. **Targeting immunogenic cancer cell death by photodynamic therapy: past, present and future**. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, London, v. 9, n. 1, e001926, 2021. DOI: 10.1136/jitc-2020-001926.
7. ANDRZEJAK, M.; PRICE, M.; KESSEL, D. H. **Apoptotic and autophagic responses to photodynamic therapy in 1c1c7 murine hepatoma cells**. *Autophagy*, Abingdon, v. 7, n. 9, p. 979–984, 2011. DOI: 10.4161/auto.7.9.15865.
8. ANIOGO, E. C.; GEORGE, B. P. A.; ABRAHAMSE, H. **Role of Bcl-2 family proteins in photodynamic therapy mediated cell survival and regulation**. *Molecules*, Basel, v. 25, n. 22, art. 5308, 2020. DOI: 10.3390/molecules25225308.
9. ASLAKSON, C. J.; MILLER, F. R. Selective events in the metastatic process defined by analysis of the sequential dissemination of subpopulations of a mouse mammary tumor. **Cancer Research**, v. 52, n. 6, p. 1399-1405, 1992.
10. ATAMNA, H.; NGUYEN, A.; SCHULTZ, C.; BOYLE, K.; NEWBERRY, J.; KATO, H.; AMES, B. N. **Methylene blue delays cellular senescence and enhances key mitochondrial biochemical pathways**. *FASEB Journal*, Bethesda, v. 22, n. 3, p. 703–712, 2008. DOI: 10.1096/fj.07-9610com.

11. BACELLAR, I. O. L.; PAVANI, C.; SALES, E. M.; ITRI, R.; WAINWRIGHT, M.; BAPTISTA, M. S. **Membrane damage efficiency of phenothiazinium photosensitizers**. *Photochemistry and Photobiology*, Hoboken, v. 90, n. 4, p. 801–813, 2014. DOI: 10.1111/php.12264.
12. BACELLAR, I.; TSUBONE, T.; PAVANI, C.; BAPTISTA, M. **Photodynamic efficiency: from molecular photochemistry to cell death**. *International Journal of Molecular Sciences*, Basel, v. 16, n. 9, p. 20523–20559, 2015. DOI: 10.3390/ijms160920523.
13. BAGNATO, V. S.; REQUENA, M. B. (org.). **Terapia fotodinâmica dermatológica: Programa TFD Brasil**. São Carlos: Even3 Publicações Editora, 2023.
14. BAIROCH, A. **The Cellosaurus, a cell-line knowledge resource**. *Journal of Biomolecular Techniques*, Bethesda, v. 29, n. 2, p. 25–38, 2018. DOI: 10.7171/JBT.18-2902-002.
15. BANCO DE CÉLULAS DO RIO DE JANEIRO (BCRJ). **4T1 (código 0022)**. Duque de Caxias: BCRJ, [s.d.]. Disponível em: https://bcrj.org.br/celula/4t1/. Acesso em: 11 jun. 2026.
16. BERNDT-PAETZ, Mandy; WEIMANN, Annett; SIEGER, Nadine; SCHASTAK, Stanislaw; RIYAD, Yasser M.; GRIEBEL, Jan; ARTHANAREESWAREN, Vinodh K. A.; STOLZENBURG, Jens-Uwe; NEUHAUS, Jochen. **Tetrahydroporphyrin-tetratosylat (THPTS): a near-infrared photosensitizer for targeted and efficient photodynamic therapy (PDT) of human bladder carcinoma. An in vitro study**. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, Amsterdam, v. 18, p. 244-251, 2017. DOI: 10.1016/j.pdpdt.2017.02.017.
17. BOLLINGER, Jean-Claude; LIMA, Eder C.; MOUNI, Lotfi; SALVESTRINI, Stefano; TRAN, Hai Nguyen. Molecular properties of methylene blue, a common probe in sorption and degradation studies: a review. *Environmental Chemistry Letters*, [S. l.], v. 23, n. 5, p. 1403-1424, 2025. DOI: 10.1007/s10311-025-01856-1.
18. BONNETT, Roger. *Chemical aspects of photodynamic therapy*. Amsterdam: Gordon and Breach Science Publishers, 2000. DOI: 10.1201/9781482296952.

19. BUYTAERT, Esther; DEWAELE, Michael; AGOSTINIS, Patrizia. Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, [S. l.], v. 1776, n. 1, p. 86-107, 2007. DOI: 10.1016/j.bbcan.2007.07.001.

20. **BUZGA, M.; MACHYTKA, E.; DVOŘÁČKOVÁ, E.; ŠVAGERA, Z.; STEJSKAL, D.; MÁCA, J.; KRÁL, J.** Methylene blue: a controversial diagnostic acid and medication? ***Toxicology Research***, [S. l.], v. 11, n. 5, p. 711-717, 2022. DOI: 10.1093/toxres/tfac050.

21. BUZZÁH, H. et al. Overall results for a National Program of Photodynamic Therapy for basal cell carcinoma: a multicenter clinical study to bring new techniques to social health care. **Cancer Control**, v. 26, n. 1, p. 1-12, 2019. DOI: https://doi.org/10.1177/1073274819863824.

22. CARRERA, E. T.; DIAS, H. B.; CORREA, L.; LIMA, C. S.; BAGNATO, V. S. The role of photodynamic therapy in the treatment of infectious diseases. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 13, p. 298-310, 2016. DOI: https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2015.10.005.

23. **CASTANO, Ana P.; DEMIDOVA, Tatiana N.; HAMBLIN, Michael R.** Mechanisms in photodynamic therapy: part one—photosensitizers, photochemistry and cellular localization. ***Photodiagnosis and Photodynamic Therapy***, [S. l.], v. 1, n. 4, p. 279-293, 2004. DOI: 10.1016/S1572-1000(05)00007-4.

24. CELLOSAURUS. **4T1 (CVCL_0125)**. Lausanne: Swiss Institute of Bioinformatics (SIB), 2025. Disponível em: Cellosaurus – 4T1 (CVCL_0125). Acesso em: 11 jun. 2026.

25. **CHEN, Yongjun; ZHENG, Wei; LI, Yingqian; ZHONG, Jieying; JI, Jianguo; SHEN, Pingping.** Apoptosis induced by methylene-blue-mediated photodynamic therapy in melanomas and the involvement of mitochondrial dysfunction revealed by proteomics. ***Cancer Science***, [S. l.], v. 99, n. 10, p. 2019-2027, 2008. DOI: 10.1111/j.1349-7006.2008.00910.x.

26. **CHOI, M.; SHIN, J.; LEE, C. E.; CHUNG, J. Y.; KIM, M.; YAN, X.; YANG, W. H.; CHA, J. H.** Immunogenic cell death in cancer

immunotherapy. ***BMB Reports***, [S. l.], v. 56, n. 5, p. 275-286, 2023. DOI: 10.5483/BMBRep.2023-0024.

27. **CODOGNO, P.; MEIJER, A. J.** Autophagy and signaling: their role in cell survival and cell death. ***Cell Death & Differentiation***, [S. l.], v. 12, n. 2, p. 1509-1518, 2005. DOI: 10.1038/sj.cdd.4401751.

28. **CONGDON, E. E.; WU, J. W.; MYEKU, N.; FIGUEROA, Y. H.; HERMAN, M.; MARINEC, P. S.; GESTWICKI, J. E.; DICKEY, C. A.; YU, W. H.; DUFF, K. E.** Methylthioninium chloride (methylene blue) induces autophagy and attenuates tauopathy in vitro and in vivo. ***Autophagy***, [S. l.], v. 8, n. 4, p. 609-622, 2012. DOI: 10.4161/auto.19048.

29. **COUPIENNE, I.; FETTWEIS, G.; RUBIO, N.; AGOSTINIS, P.; PIETTE, J.** 5-ALA-PDT induces RIP3-dependent necrosis in glioblastoma. ***Photochemical & Photobiological Sciences***, [S. l.], v. 10, n. 12, p. 1868-1878, 2011. DOI: 10.1039/C1PP05213F.

30. **CUNHA, Ieda Vieira da; CYTRÂNGOLO, Isabela Lopes e; BAPTISTA, Maurício S.; TSUBONE, Tayana Mazin.** Polymeric nanocarriers for subcellular targeting in photodynamic therapy. ***Photochemical & Photobiological Sciences***, [S. l.], 2026. DOI: 10.1007/s43630-026-00916-x.

31. **DANDOTI, Sayequa.** Mechanisms adopted by cancer cells to escape apoptosis–A review. ***Biocell***, [S. l.], v. 45, n. 4, p. 863-884, 2021. DOI: 10.32604/biocell.2021.013993.

32. De SOUZA, Á. C.; MENCALHA, A. L.; FONSECA, A. S. D.; PAOLI, F. Necroptosis as a consequence of photodynamic therapy in tumor cells. *Lasers in Medical Science*, v. 39, n. 1, p. 267, 2024. DOI: https://doi.org/10.1007/s10103-024-04218-5.

33. DEXTER, D. L.; KOWALSKI, H. M.; BLAZAR, B. A.; FLIGIEL, Z.; VOGEL, R.; HEPPNER, G. H. Heterogeneity of tumor cells from a single mouse mammary tumor. **Cancer Research**, v. 38, n. 10, p. 3174-3181, 1978.

34. DIXON, S. J.; LEMBERG, K. M.; LAMPRECHT, M. R.; SKOUTA, R.; ZAITSEV, E. M.; GLEASON, C. E.; PATEL, D. N.; BAUER, A. J.;

CANTLEY, A. M.; YANG, W. S.; MORRISON, B.; STOCKWELL, B. R. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. **Cell**, v. 149, n. 5, p. 1060-1072, 2012. DOI: https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.042.

35. **DOLMANS, D.; FUKUMURA, D.; JAIN, R. K.** Photodynamic therapy for cancer. ***Nature Reviews Cancer***, [S. l.], v. 3, p. 380-387, 2003. DOI: 10.1038/nrc1071.
36. **DONOHOE, C.; SENGE, M. O.; ARNAUT, L. G.; GOMES-DA-SILVA, L. C.** Cell death in photodynamic therapy: from oxidative stress to anti-tumor immunity. *Biochimica et Biophysica Acta Reviews on Cancer*, v. 1872, n. 2, p. 188308, 2019. DOI: https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2019.07.003.
37. DOS SANTOS, A. F.; INAGUE, A.; ARINI, G. S.; TERRA, L. F.; WAILEMANN, R. A. M.; PIMENTEL, A. C.; YOSHINAGA, M. Y.; SILVA, R. R.; SEVERINO, D.; ALMEIDA, D. R. Q. Distinct photo-oxidation-induced cell death pathways lead to selective killing of human breast cancer cells. *Cell Death & Disease*, [S. l.], v. 11, n. 12, p. 1070, 2020. DOI: 10.1038/s41419-020-03275-2.
38. **DOS SANTOS, A. F.; TERRA, L. F.; WAILEMANN, R. A. M.; OLIVEIRA, T. C.; GOMES, V. M.; MINEIRO, M. F.; MEOTTI, F. C.; CARDOSO, A. B.; BAPTISTA, M. S.; LABRIOLA, L.** Methylene blue photodynamic therapy induces selective and massive cell death in human breast cancer cells. ***BMC Cancer***, [S. l.], v. 17, p. 194, 2017. DOI: 10.1186/s12885-017-3179-2.
39. **DUAN, X.; CHEN, B.; CUI, Y.; ZHOU, L.; WU, C.; YANG, Z.; WEN, Y.; MIAO, X.; LI, Q.; XIONG, L.; HE, J.** Ready player one? Autophagy shapes resistance to photodynamic therapy in cancers. ***Apoptosis***, [S. l.], v. 23, p. 587-606, 2018. DOI: 10.1007/s10495-018-1483-5.
40. **EGAN, Daniel F.; SHACKELFORD, David B.; MIHAYLOVA, Maria M.; GELINO, Sara; KOHNZ, Rebecca A.; MAIR, William; VASQUEZ, Debbie S.; JOSHI, Aashish; GWINN, Dana M.; TAYLOR, Rebecca.** Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy. ***Science***, [S. l.], v. 331, n. 6016, p. 456-461, 2011. DOI: 10.1126/science.1196371.

41. **ELMORE, S.** Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, v. 35, n. 4, p. 495-516, 2007. DOI: https://doi.org/10.1080/01926230701320337.

42. **ELMORE, S.** Apoptosis: a review of programmed cell death. ***Toxicologic Pathology***, [S. l.], v. 35, n. 4, p. 495-516, 2007. DOI: 10.1080/01926230701320337.

43. **ELSTON, C. W.; ELLIS, I. O. Assessment of histological grade. In: ELSTON, C. W.; ELLIS, I. O. (ed.). *Systemic pathology: the breast*. 3. ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1998. p. 365-384.**

44. **FARKONA, Sofia; DIAMANDIS, Eleftherios P.; BLASUTIG, Ivan M.** Cancer immunotherapy: the beginning of the end of cancer? ***BMC Medicine***, [S. l.], v. 14, n. 1, 2016. DOI: 10.1186/s12916-016-0623-5.

45. **FERNANDEZ-GUARINO, M.; GARCÍA-MORALES, I.; HARTO, A.; MONTULL, C.; PÉREZ-GARCÍA, B.; JAÉN, P.** Photodynamic therapy: new indications. ***Actas Dermo-Sifiliográficas (English Edition)***, [S. l.], v. 98, n. 6, p. 377-395, 2007. DOI: 10.1016/S1578-2190(07)70471-7.

46. **GABRIELLI, Dino; BELISLE, Eduardo; SEVERINO, Divinomar; KOWALTOWSKI, Alicia J.; BAPTISTA, Mauricio S.** Binding, aggregation and photochemical properties of methylene blue in mitochondrial suspensions. ***Photochemistry and Photobiology***, [S. l.], v. 79, n. 3, p. 227-232, 2004. DOI: 10.1562/BE-03-27.1.

47. **GALVAN, J. et al.** Methylene blue for the treatment of health conditions: a scoping review. ***Brazilian Archives of Biology and Technology***, [S. l.], 2021. DOI: 10.1590/1678-4324-20212002660266.

48. **GARG, Abhishek D.; AGOSTINIS, Patrizia.** Cell death and immunity in cancer: from danger signals to mimicry of pathogen defense responses. ***Immunological Reviews***, [S. l.], v. 280, n. 1, p. 126-148, 2017. DOI: 10.1111/imr.12574.

49. **GARG, Abhishek D.; DUDEK-PERIC, Aleksandra M.; ROMANO, Erminia; AGOSTINIS, Patrizia.** Immunogenic cell death. ***The International Journal of Developmental Biology***, [S. l.], v. 59, n. 1-2-3, p. 131-140, 2015. DOI: 10.1387/ijdb.150061pa.

50. GOMES, Laura Calazans de Melo; CUNHA, Amanda Branquinho de Oliveira; PEIXOTO, Luiz Felipe Fernandes; ZANON, Renata Graciele; BOTELHO, Françoise Vasconcelos; SILVA, Marcelo José Barbosa; PINTO-FOCHI, Maria Etelvina; GÓES, Rejane Maira; DE PAOLI, Flávia; RIBEIRO, Daniele Lisboa. Photodynamic therapy reduces cell viability, migration and triggers necroptosis in prostate tumor cells. *Photochemical & Photobiological Sciences*, v. 22, n. 6, p. 1341-1356, 2023. DOI: 10.1007/s43630-023-00382-9
51. GUNAYDIN, G.; GEDIK, M. E.; AYAN, S. Photodynamic therapy—current limitations and novel approaches. *Frontiers in Chemistry*, v. 9, e691697, 2021. DOI: 10.3389/fchem.2021.691697.
52. HANAHAN, D. Hallmarks of cancer: new dimensions. **Cancer Discovery**, v. 12, n. 1, p. 31-46, 2022. DOI: https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059.
53. HOLLER, N. et al. Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nature Immunology*, v. 1, n. 6, p. 489-495, 2000. DOI: 10.1038/82732.
54. HU, T.; WANG, Z.; SHEN, W.; LIANG, R.; YAN, D.; WEI, M. Recent advances in innovative strategies for enhanced cancer photodynamic therapy. *Theranostics*, v. 11, n. 7, p. 3278-3300, 2021. DOI: 10.7150/thno.54227.
55. INGUSCIO, V.; PANZARINI, E.; DINI, L. Autophagy contributes to the death/survival balance in cancer photodynamic therapy. **Cells**, v. 1, n. 3, p. 464-491, 2012. DOI: https://doi.org/10.3390/cells1030464.
56. ISSA, M. C. A.; MANELA-AZULAY, M. Terapia fotodinâmica: revisão da literatura e documentação iconográfica. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 85, n. 4, p. 501-511, 2010. DOI: https://doi.org/10.1590/S0365-05962010000400011.
57. ITAKURA, E.; MIZUSHIMA, N. Characterization of autophagosome formation site by a hierarchical analysis of mammalian Atg proteins. *Autophagy*, v. 6, n. 6, p. 764-776, 2010. DOI: 10.4161/auto.6.6.12709.
58. JIANG, X.; STOCKWELL, B. R.; CONRAD, M. Ferroptosis: mechanisms, biology and role in disease. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.

22, n. 4, p. 266-282, 2021. DOI: https://doi.org/10.1038/s41580-020-00324-8.

59. JORI, G. Tumour photosensitizers: approaches to enhance the selectivity and efficiency of photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 36, n. 2, p. 87-93, 1996. DOI: 10.1016/S1011-1344(96)07352-6.
60. JUNQUEIRA, H. C.; SEVERINO, D.; DIAS, L. G.; GUGLIOTTI, M. S.; BAPTISTA, M. S. Modulation of methylene blue photochemical properties based on adsorption at aqueous micelle interfaces. *Physical Chemistry Chemical Physics*, v. 4, n. 11, p. 2320-2328, 2002.
61. KACZMAREK, A.; VANDENABEELE, P.; KRYSKO, D. V. Necroptosis: the release of damage-associated molecular patterns and its physiological relevance. *Immunity*, v. 38, n. 2, p. 209-223, 2013. DOI: 10.1016/j.immuni.2013.02.003.
62. KAHALIAN, S.; KOOPAIE, M.; HAKIMIHA, N.; KOLAHDOOZ, S. Assessment of the methylene blue mediated photodynamic therapy on BCL2 and BAX genes expression at mRNA level and apoptosis of head and neck squamous cell carcinoma cell line. *Folia Medica*, v. 64, n. 2, p. 221-228, 2022. DOI: 10.3897/folmed.64.e63635.
63. KARANASIOS, E.; WALKER, S. A.; OKKENHAUG, H.; MANIFAVA, M.; HUMMEL, E.; ZIMMERMANN, H.; AHMED, Q.; DOMART, M.-C.; COLLINSON, L.; KTISTAKIS, N. T. Autophagy initiation by ULK complex assembly on ER tubulovesicular regions marked by ATG9 vesicles. *Nature Communications*, v. 7, art. 12420, 2016. DOI: 10.1038/ncomms12420.
64. KATAOKA, H.; NISHIE, H.; HAYASHI, N.; TANAKA, M.; NOMOTO, A.; YANO, S.; JOH, T. New photodynamic therapy with next-generation photosensitizers. *Annals of Translational Medicine*, v. 5, n. 8, art. 183, 2017. DOI: 10.21037/atm.2017.03.59.
65. KESSEL, D. Autophagic death probed by photodynamic therapy. *Autophagy*, v. 11, n. 10, p. 1941-1943, 2015. DOI: 10.1080/15548627.2015.1098795.

66. KESSEL, D. Photodynamic therapy: apoptosis, paraptosis and beyond. *Apoptosis*, v. 25, n. 9-10, p. 611-615, 2020. DOI: 10.1007/s10495-020-01634-0.
67. KESSEL, D.; OLEINICK, N. L. Cell death pathways associated with photodynamic therapy: an update. *Photochemistry and Photobiology*, v. 94, n. 2, p. 213-218, 2018. DOI: 10.1111/php.12857.
68. KESSEL, D.; REINERS, J. J. Photodynamic therapy: autophagy and mitophagy, apoptosis and paraptosis. **Autophagy**, v. 16, n. 11, p. 2098-2101, 2020. DOI: https://doi.org/10.1080/15548627.2020.1783823.
69. KHAN, I.; SAEED, K.; ZEKKER, I.; ZHANG, B.; HENDI, A. H.; AHMAD, A.; AHMAD, S.; ZADA, N.; AHMAD, H.; SHAH, L. A. Review on methylene blue: its properties, uses, toxicity and photodegradation. *Water*, v. 14, n. 2, art. 242, 2022. DOI: 10.3390/w14020242.
70. KIM, J.; KUNDU, M.; VIOLLET, B.; GUAN, K.-L. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of ULK1. *Nature Cell Biology*, v. 13, n. 2, p. 132-141, 2011. DOI: 10.1038/ncb2152.
71. KOFLER, B.; ROMANI, A.; PRITZ, C.; STEINBICHLER, T. B.; SCHARTINGER, V. H.; RIECHELMANN, H.; DUDAS, J. Photodynamic effect of methylene blue and low level laser radiation in head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 19, n. 4, art. 1107, 2018. DOI: 10.3390/ijms19041107.
72. KROEMER, G.; JÄÄTTELÄ, M. Lysosomes and autophagy in cell death control. **Nature Reviews Cancer**, v. 5, n. 11, p. 886-897, 2005. DOI: https://doi.org/10.1038/nrc1738.
73. LAMARQUE, G. C. C.; MÉNDEZ, D. A. C.; MATOS, A. A.; DIONÍSIO, T. J.; MACHADO, M. A. A. M.; MAGALHÃES, A. C.; OLIVEIRA, R. C.; CRUVINEL, T. Cytotoxic effect and apoptosis pathways activated by methylene blue-mediated photodynamic therapy in fibroblasts. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v. 29, art. 101654, 2020.
74. LE, M. N.; WUERTZ, B. R.; BIEL, M. A.; THOMPSON, R. L.; ONDREY, F. G. Effects of methylene blue photodynamic therapy on oral carcinoma and leukoplakia cells. *Laryngoscope Investigative Otolaryngology*, v. 7, n. 4, p. 982-987, 2022. DOI: 10.1002/lio2.772.

75. LELEKAKIS, Maria; MOSELEY, Jane M.; MARTIN, T. John; HARDS, Daphne; WILLIAMS, Elizabeth; HO, Patricia; LOWEN, Darren; JAVNI, Jeannie; MILLER, Fred R.; SLAVIN, John. A novel orthotopic model of breast cancer metastasis to bone. **Clinical & Experimental Metastasis**, [S. l.], v. 17, n. 2, p. 163-170, mar. 1999. DOI: https://doi.org/10.1023/A:1006689719505

76. LIM, D. J. Methylene blue-based nano and microparticles: fabrication and applications in photodynamic therapy. **Polymers**, [S. l.], v. 13, n. 22, p. 3955, 16 nov. 2021. DOI: https://doi.org/10.3390/polym13223955

77. LIM, Eun Jin; OAK, Chul-Ho; HEO, Jeonghoon; KIM, Young-Ho. Methylene blue-mediated photodynamic therapy enhances apoptosis in lung cancer cells. **Oncology Reports**, v. 30, n. 2, p. 856-862, 24 maio 2013. DOI: https://doi.org/10.3892/or.2013.2494

78. LOU, Y.; PREOBRAZHENSKA, O.; KELLER, U. A.; SUTCLIFFE, M.; BARCLAY, L.; MCDONALD, P. C.; ROSKELLEY, C.; OVERALL, C. M.; DEDHAR, S. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) is not sufficient for spontaneous murine breast cancer metastasis. **Developmental Dynamics**, [S. l.], v. 237, n. 10, p. 2755-2768, 4 set. 2008. DOI: https://doi.org/10.1002/dvdy.21658.

79. MAHAJAN, Suruchi; MAHAJAN, Rakesh Kumar. Interactions of phenothiazine drugs with surfactants: a detailed physicochemical overview. **Advances in Colloid and Interface Science**, [S. l.], v. 199-200, p. 1-14, nov. 2013. DOI: https://doi.org/10.1016/j.cis.2013.06.008.

80. MARTINEZ-OSORIO, V.; ABDELWAHAB, Y.; ROS, U. The many faces of MLKL, the executor of necroptosis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, p. 10108, 2023. DOI: https://doi.org/10.3390/ijms241210108.

81. MARTINS, Waleska K.; BELOTTO, Renata; SILVA, Maryana N.; GRASSO, Daniel; SURIANI, Maynne D.; LAVOR, Tayná S.; ITRI, Rosangela; BAPTISTA, Mauricio S.; TSUBONE, Tayana M. Autophagy regulation and photodynamic therapy: insights to improve outcomes of cancer treatment. **Frontiers in Oncology**, v. 10, p. 1-2, 20 jan. 2021. DOI: https://doi.org/10.3389/fonc.2020.610472.

82. MELLISH, K. J.; COX, R. D.; VERNON, D. I.; GRIFFITHS, J.; BROWN, S. B. In vitro photodynamic activity of a series of methylene blue analogues. **Photochemistry and Photobiology**, v. 75, p. 392-397, 2002.
83. MERTINS, Omar; BACELLAR, Isabel O. L.; THALMANN, Fabrice; MARQUES, Carlos M.; BAPTISTA, Maurício S.; ITRI, Rosangela. Physical damage on giant vesicles membrane as a result of methylene blue photoirradiation. **Biophysical Journal**, [S. l.], v. 106, n. 1, p. 162-171, jan. 2014. DOI: https://doi.org/10.1016/j.bpj.2013.11.4457.
84. MIN, Hye-Young; LEE, Ho-Young. Molecular targeted therapy for anticancer treatment. **Experimental & Molecular Medicine**, [S. l.], v. 54, n. 10, p. 1670-1694, 12 out. 2022. DOI: https://doi.org/10.1038/s12276-022-00864-3.
85. MISHCHENKO, T.; BALALAEVA, I.; GOROKHOVA, A.; VEDUNOVA, M.; KRYSKO, D. V. Which cell death modality wins the contest for photodynamic therapy of cancer? **Cell Death & Disease**, v. 13, n. 5, p. 455, 2022. DOI: https://doi.org/10.1038/s41419-022-04851-4.
86. MOSSAKOWSKA, B. J.; FABISIEWICZ, A.; TUDEK, B.; SIEDLECKI, J. A. Possible mechanisms of resistance development to photodynamic therapy (PDT) in vulvar cancer cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 23, p. 14689, 2022. DOI: https://doi.org/10.3390/ijms232314689.
87. MOYER, Allison; TANAKA, Kosuke; CHENG, Emily H. Apoptosis in cancer biology and therapy. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, [S. l.], v. 20, n. 1, p. 303-328, 24 jan. 2025. DOI: https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-051222-115023
88. MROZ, Pawel; YAROSLAVSKY, Anastasia; KHARKWAL, Gitika B.; HAMBLIN, Michael R. Cell death pathways in photodynamic therapy of cancer. **Cancers**, [S. l.], v. 3, n. 2, p. 2516-2539, 3 jun. 2011. DOI: https://doi.org/10.3390/cancers3022516
89. NATH, S.; OBAID, G.; HASAN, T. The course of immune stimulation by photodynamic therapy: bridging fundamentals of photochemically induced immunogenic cell death to the enrichment of T-cell repertoire.

Photochemistry and Photobiology, v. 95, n. 6, p. 1288-1305, nov. 2019. DOI: https://doi.org/10.1111/php.13173.

90. ORSI, A.; RAZI, M.; DOOLEY, H. C.; ROBINSON, D.; WESTON, A. E.; COLLINSON, L. M.; TOOZE, S. A. Dynamic and transient interactions of Atg9 with autophagosomes, but not membrane integration, are required for autophagy. **Molecular Biology of the Cell**, [S. l.], v. 23, n. 10, p. 1860-1873, 15 maio 2012. DOI: https://doi.org/10.1091/mbc.e11-09-0746
91. PALUMBO, Michael O.; KAVAN, Petr; MILLER, Wilson H.; PANASCI, Lawrence; ASSOULINE, Sarit; JOHNSON, Nathalie; COHEN, Victor; PATENAUDE, Francois; POLLAK, Michael; JAGOE, R. Thomas. Systemic cancer therapy: achievements and challenges that lie ahead. **Frontiers in Pharmacology**, [S. l.], v. 4, maio 2013. DOI: https://doi.org/10.3389/fphar.2013.00057.
92. PAPA, Vincenzo; FURCI, Fabiana; MINCIULLO, Paola Lucia; CASCIARO, Marco; ALLEGRA, Alessandro; GANGEMI, Sebastiano. Photodynamic therapy in cancer: insights into cellular and molecular pathways. **Current Issues in Molecular Biology**, [S. l.], v. 47, n. 2, p. 69, 21 jan. 2025. DOI: https://doi.org/10.3390/cimb47020069.
93. PETRELLIS, Maria Carla. **Avaliação dos efeitos do azul de metileno fotoativado no modelo experimental do Tumor de Walker 256**. 2014. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014. DOI: https://doi.org/10.11606/T.42.2014.tde-12122014-102820.
94. PRZYGODA, Maria; BARTUSIK-AEBISHER, Dorota; DYNAROWICZ, Klaudia; CIEŚLAR, Grzegorz; KAWCZYK-KRUPKA, Aleksandra; AEBISHER, David. Cellular mechanisms of singlet oxygen in photodynamic therapy. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 24, n. 23, p. 16890, 29 nov. 2023. DOI: https://doi.org/10.3390/ijms242316890.
95. PULASKI, Beth A.; OSTRAND-ROSENBERG, Suzanne. Mouse 4T1 breast tumor model. **Current Protocols in Immunology**, [S. l.], v. 39, n. 1, out. 2000. DOI: https://doi.org/10.1002/0471142735.im2002s39.

96. RENAULT, T. T.; FLOROS, K. V.; CHIPUK, J. E. BAK/BAX activation and cytochrome c release assays using isolated mitochondria. **Methods**, v. 61, p. 146-155, 2013.

97. RIBEIRO, Joselito Nardy; SILVA, André Romero da; JORGE, Renato Atilio. Involvement of mitochondria in apoptosis of cancer cells induced by photodynamic therapy. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, [S. l.], v. 40, n. 6, dez. 2004. DOI: https://doi.org/10.1590/S1676-24442004000600005.

98. ROCHA, É.; BOMFIM, L.; JUNIOR, S.; SANTOS, G.; MEIRA, C.; SOARES, M. Photodynamic therapy with an association of methylene blue and toluidine blue promoted a synergic effect against oral squamous cell carcinoma. **Cancers**, v. 15, n. 23, p. 5509, 2023. DOI: https://doi.org/10.3390/cancers15235509.

99. SAEIDNIA, S.; MANAYI, A.; ABDOLLAHI, M. From in vitro experiments to in vivo and clinical studies: pros and cons. **Current Drug Discovery Technologies**, v. 12, n. 4, p. 218-224, 2015. DOI: https://doi.org/10.2174/1570163813666160114093140.

100. SALVESEN, G. S.; DIXIT, V. M. Caspases: intracellular signaling by proteolysis. **Cell**, v. 91, n. 4, p. 443-446, 1997. DOI: https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80430-4

101. SCHIRMER, R. H.; ADLER, H.; PICKHARDT, M.; MANDELKOW, E. Lest we forget you — methylene blue…. **Neurobiology of Aging**, [S. l.], v. 32, n. 12, p. 7-16, dez. 2011. DOI: https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2010.12.012.

102. SCOTTINI, Aline. **Terapia fotodinâmica com azul de metileno em células derivadas de carcinoma espinocelular: estudo in vitro**. Ponta Grossa, 2021. 52 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2021. Disponível em: http://tede2.uepg.br/jspui/handle/prefix/3571.

103. SHI, Yin; ZHANG, Boli; FENG, Xiaolan; QU, Fei; WANG, Shuang; WU, Lijie; WANG, Xiaobing; LIU, Quanhong; WANG, Pan; ZHANG, Kun. Apoptosis and autophagy induced by DVDMs-PDT on human esophageal cancer Eca-109 cells. **Photodiagnosis and Photodynamic**

Therapy, [S. l.], v. 24, p. 198-205, dez. 2018. DOI: https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2018.09.013.

104. SHINTANI, T.; KLIONSKY, D. J. Autophagy in health and disease: a double-edged sword. **Science**, v. 306, n. 5698, p. 990-995, 2004. DOI: https://doi.org/10.1126/science.1099993.

105. SHISHIDO, Y.; AMISAKI, M.; MATSUMI, Y.; YAKURA, H.; NAKAYAMA, Y.; MIYAUCHI, W.; MIYATANI, K.; MATSUNAGA, T.; HANAKI, T.; KIHARA, K.; YAMAMOTO, M.; TOKUYASU, N.; TAKANO, S.; SAKAMOTO, T.; HONJO, S.; HASEGAWA, T.; FUJIWARA, Y. Antitumor effect of 5-aminolevulinic acid through ferroptosis in esophageal squamous cell carcinoma. **Annals of Surgical Oncology**, v. 28, p. 3996-4006, 2021.

106. SORRIN, Aaron J.; RUHI, Mustafa Kemal; FERLIC, Nathaniel A.; KARIMNIA, Vida; POLACHECK, William J.; CELLI, Jonathan P.; HUANG, Huang-Chiao; RIZVI, Imran. Photodynamic Therapy and the Biophysics of the Tumor Microenvironment. **Photochemistry And Photobiology**, [S.L.], v. 96, n. 2, p. 232-259, mar. 2020. Wiley. http://dx.doi.org/10.1111/php.13209.

107. SOUZA, Cristina Maria de. **Carcinoma mamário murino 4T1: características morfológicas, imunofenotípicas, bioquímicas e ensaios pré-clínicos com talidomida/carboplatina**. 2013. Tese (Doutorado em Patologia) – Programa de Pós-Graduação em Patologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013.

108. STOCKWELL, B. R.; JIANG, X.; GU, W. Emerging mechanisms and disease relevance of ferroptosis. **Trends in Cell Biology**, v. 30, n. 6, p. 478-490, 2020.

109. TANG, D. et al. The molecular machinery of regulated cell death. **Cell Research**, v. 29, p. 347-364, 2019. DOI: https://doi.org/10.1038/s41422-019-0164-5.

110. TARDIVO, J. P. et al. Methylene blue in photodynamic therapy: from basic mechanisms to clinical applications. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 2, p. 175-191, 2005. DOI: https://doi.org/10.1016/S1572-1000(05)00097-9.

111. TORATANI, S.; TANI, R.; KANDA, T.; KOIZUMI, K.; YOSHIOKA, Y.; OKAMOTO, T. Photodynamic therapy using Photofrin and excimer dye laser treatment for superficial oral squamous cell carcinomas with long-term follow up. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, [S. l.], v. 14, p. 104-110, jun. 2016. DOI: https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2015.12.009.

112. TSUBONE, Tayana Mazin; BAPTISTA, Mauricio S.; ITRI, Rosangela. Understanding membrane remodelling initiated by photosensitized lipid oxidation. **Biophysical Chemistry**, [S. l.], v. 254, p. 106263, nov. 2019. DOI: https://doi.org/10.1016/j.bpc.2019.106263.

113. TUITE, E. M.; KELLY, J. M. New trends in photobiology. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, [S. l.], v. 21, n. 2-3, p. 103-124, dez. 1993. DOI: https://doi.org/10.1016/1011-1344(93)80173-7.

114. TURCHIELLO, R. F.; SILVA, L. F. M.; GOMES, A.; SOUSA, M.; PEREIRA, J.; ALMEIDA, C.; BAPTISTA, M. S. Methylene blue-mediated photodynamic therapy in human retinoblastoma cell lines. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 222, p. 1-6, 2021.

115. TURUBANOVA, V. D. et al. Immunogenic cell death induced by a new photodynamic therapy based on photosensitisers of the porphyrazine series. **Journal for ImmunoTherapy of Cancer**, v. 7, n. 1, p. 312, 2019. DOI: https://doi.org/10.1186/s40425-019-0786-3.

116. VAN STRATEN, D.; MASHAYEKHI, V.; DE BRUIJN, H. S.; OLIVEIRA, S.; ROBINSON, D. J. Oncologic photodynamic therapy: basic principles, current clinical status and future directions. **Cancers**, Basel, v. 9, n. 2, art. 19, 2017. DOI: https://doi.org/10.3390/cancers9020019.

117. WANG, Lingyan; CHELAKKOT, Vipin Shankar; NEWHOOK, Nick; TUCKER, Stephanie; HIRASAWA, Kensuke. Inflammatory cell death induced by 5-aminolevulinic acid-photodynamic therapy initiates anticancer immunity. *Frontiers in Oncology*, v. 13, 2023. DOI: https://doi.org/10.3389/fonc.2023.1156763.

118. WANG, W.; GREEN, M.; CHOI, J. E.; GIJÓN, M.; KENNEDY, P. D.; JOHNSON, J. K.; LIAO, P.; LANG, X.; KRYCZEK, I.; SELL, A.; XIA,

H.; ZHOU, J.; LI, G.; LI, J.; LI, W.; WEI, S.; VATAN, L.; ZHANG, H.; SZELIGA, W.; GU, W.; LIU, R.; LAWRENCE, T. S.; LAMB, C.; TANNO, Y.; CIESLIK, M.; STONE, E.; GEORGIOU, G.; CHAN, T. A.; CHINNAIYAN, A.; ZOU, W. CD8+ T cells regulate tumour ferroptosis during cancer immunotherapy. *Nature*, v. 569, p. 270-274, 2019. DOI: https://doi.org/10.1038/s41586-019-1170-y.

119. WANG, X.; HUA, P.; HE, C.; CHEN, M. Non-apoptotic cell death-based cancer therapy: molecular mechanism, pharmacological modulators, and nanomedicine. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, v. 12, n. 9, p. 3567-3593, 2022. DOI: https://doi.org/10.1016/j.apsb.2022.03.020.

120. WEI, M. F.; CHEN, M. W.; CHEN, K. C.; LOU, P. J.; LIN, S. Y. F.; HUNG, S. C.; HSIAO, M.; YAO, C. J.; SHIEH, M. J. Autophagy promotes resistance to photodynamic therapy-induced apoptosis selectively in colorectal cancer stem-like cells. *Autophagy*, v. 10, n. 7, p. 1179-1192, 2014. DOI: https://doi.org/10.4161/auto.28679.

121. WHITE, E.; DIPAOLA, R. S. The double-edged sword of autophagy modulation in cancer. *Clinical Cancer Research*, v. 15, n. 17, p. 5308-5316, 2009. DOI: https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-5023.

122. WU, P. T.; LIN, C. L.; LIN, C. W.; CHANG, N. C.; TSAI, W. B.; YU, J. Methylene-blue-encapsulated liposomes as photodynamic therapy nano agents for breast cancer cells. *Nanomaterials*, Basel, v. 9, n. 1, p. 14, 2019. DOI: https://doi.org/10.3390/nano9010014

123. YAN, H. F.; ZOU, T.; TUO, Q. Z.; XU, S.; LI, H.; BELAIDI, A. A.; LEI, P. Ferroptosis: mechanisms and links with diseases. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, v. 6, p. 49, 2021.

124. YANG, W. S.; SRIRAMARATNAM, R.; WELSCH, M. E.; SHIMADA, K.; SKOUTA, R.; VISWANATHAN, V. S.; CHEAH, J. H.; CLEMONS, P. A.; SHAMJI, A. F.; CLISH, C. B.; BROWN, L. M.; GIROTTI, A. W.; CORNISH, V. W.; SCHREIBER, S. L.; STOCKWELL, B. R. Regulation of ferroptotic cancer cell death by GPX4. **Cell**, v. 156, n. 1-2, p. 317-331, 2014. DOI: https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.12.010.

125. YIN, Huijuan; YE, Xuying; NIU, Qing; WANG, Chao; LI, Yingxin. Time course of apoptosis induced by photodynamic therapy with PsD007 in LT12 acute myeloid leukemia cells. **Lasers In Medical Science**, [S.L.], v. 31, n. 5, p. 817-824, 9 fev. 2016. Springer Science and Business Media LLC. http://dx.doi.org/10.1007/s10103-016-1887-x.

126. ZHANG, Y.; CHEUNG, Y. K.; NG, D. K. P.; FONG, W. P. Immunogenic necroptosis in the antitumor photodynamic action of BAM-SiPc, a silicon(IV) phthalocyanine-based photosensitizer. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 70, p. 485-495, 2021. DOI: https://doi.org/10.1007/s00262-020-02688-8.

127. ZHANG, Y.; YI, S.; LUAN, M. Advances in non-apoptotic regulated cell death: implications for malignant tumor treatment. *Frontiers in Oncology*, v. 15, p. 1519119, 2025. DOI: https://doi.org/10.3389/fonc.2025.1519119.

128. ZHOU, Zhuo-Liang; ZHANG, Xiao; HU, Ming-Hao. Enhanced ferroptosis in triple-negative cancer cells achieved by a type-I cell membrane-targeted tetrabenzophenazine photosensitizer. **Sensors And Actuators B**: Chemical, [S.L.], v. 441, p. 137978, out. 2025. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2025.137978.

129. ZONG, W. X.; THOMPSON, C. B. Necrotic death as a cell fate. ***Genes & Development***, v. 20, n. 1, p. 1-15, 2006. DOI: https://doi.org/10.1101/gad.1376506**.**

130. ZOU, Y.; PALTE, M. J.; DEIK, A. A.; LI, H.; EATON, J. K.; WANG, W. *et al.* A GPX4-dependent cancer cell state underlies the clear-cell morphology and confers sensitivity to ferroptosis. **Nature Communications**, v. 10, p. 1617, 2019. DOI: https://doi.org/10.1038/s41467-019-09277-9.

131. SCHRÖRS, B. et al. Multi-omics characterization of the 4T1 murine mammary gland tumor model. *Frontiers in Oncology*, v. 10, p. 1195, 2020. DOI: 10.3389/fonc.2020.01195.