



Universidade Federal do Rio Grande – FURG

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas:

Fisiologia Animal Comparada



Ação fotodinâmica da c-ficocianina extraída da cianobactéria  
*Spirulina platensis* em células de melanoma B16F10

Dissertação submetida como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre no Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas – Fisiologia Animal comparada, da Universidade Federal do Rio Grande – FURG, sob a orientação da Profa. Dra. Ana Paula de Souza Votto do Instituto de Ciências Biológicas.

Bal. Fis. Med. Anahy Arrieche Fazio

Rio Grande

2014

*A vida é como um romance. É cheia de suspense. Você não tem ideia do que acontecerá até virar a página.*

*Sidney Sheldon*

## AGRADECIMENTOS

À universidade, pela minha formação. Por oportunizar, juntamente com o auxílio da CAPES e o PPG FAC, o espaço e todo o suporte intelectual para que eu desenvolvesse a minha tese.

Ao grupo de professores e funcionários (técnicos, porteiros e equipe de limpeza) do Instituto de Ciências Biológicas pela receptividade tão calorosa. Apesar de fazer uma grande mudança de habitat, nunca me senti longe de casa. Este grupo nunca permitiu que eu me sentisse fora de contexto, sempre me trataram com muito respeito, mesmo que eu não conseguia aceitar que o nome certo é moluscos e não “molusculos”, diante da minha alegria infantil ao entender o sistema osmorregulador de uma raia, da minha curiosidade deselegante ao fazer perguntas no meio das aulas – que nem eram minhas - realizadas no laboratório, da minha ousadia ao colocar fórmulas para explicar impulsos elétricos de um copépode, da minha fobia de animais com muitas patas ou da minha surpresa boba ao descobrir que tilápias sofrem adaptações, ainda que não cite nomes, saibam que foram todos mentalizados e lembrados durante a escrita desta tese, muito além destes agradecimentos. O melhor presente para um professor é servir de exemplo para o aluno, participar da vida dele desde a formação até a atuação em sala de aula/laboratório, então, resumirei minha gratidão ao dizer-lhes que identifiquei em vocês aquele profissional que almejo ser. Incluídos neste grande grupo estão os técnicos - sempre muito solícitos e dispostos a nos ajudar a encontrar um reagente perdido ou a fazer a nossa rematricula - funcionárias da limpeza e portaria.

À minha orientadora, que além de fazer parte deste grupo de professores do qual me orgulho muito, foi a minha mentora. Também foi aquela que não se importou em aceitar uma professora de Física com bacharelado em Física Médica para fazer parte do convívio dela. Para compartilhar o seu conhecimento e atenção. Sempre com muita generosidade e conhecimento aprendido com a professora Gilma que me deu boas vindas ao programa e me recebeu de braços abertos. Também é no dia-a-dia do laboratório que aprendemos, pelos aprendizados, sendo assim agradeço também a Daza, técnico Márcio, professora Marta (#soumuitofã) e professor Robert, bem como os outros professores que convivem conosco nesse ambiente.

É no convívio também que selamos grandes parcerias. As meninas que sempre me auxiliaram e incentivaram o meu agradecimento. A Renata, Maiara a Jú que foram as primeiras a pacientemente me ensinar um repique Agradeço as cantorias no laboratório durante as semanas de manutenção do laboratório, aos amigos secretos, aos ensinamentos de protocolo. Destas parcerias, surgem grandes amizades também. Mãos amigas que seguravam nossa “pipeta” na hora em que as coisas pareciam sucumbir, oferecendo-se para uma leitura, para um repique, para ajudar em um meio, depois se oferecem pra ajudar a lavar o material, para fazer um protocolo, para fornecer material para um seminário, para sentir raiva e alegria, para dançar enquanto pipeta uma placa. Vocês minhas queridas, muito obrigado.

Fora do laboratório, o contexto muda, mas a história não. Há aquela amiga que basta um olhar para você se sentir melhor ao participar de uma seleção de mestrado, como a Bruna, sempre me ensinando muito sobre bioquímica, coletas, Geografia – Maranhão que o diga - perseverança e principalmente força. Um exemplo. A primeira das primeiras, mas não única. Tem aquela que diverge opiniões e cujas diferenças, que podem afastam as pessoas, fazem da amizade dela algo muito delicado e especial, não é Tabata molusculo? Tem aquela com o sorriso cativante e a paciência mais longa da história da humanidade quando se trata de me aturar com minha empolgação apresentando trabalho de bioquímica, Santa Gabriela! Sobre as diferenças, muito tenho a falar. A Priscila, a Regina, a Fernanda e a Milene, foram minhas surpresas. Sinto falta do abraço da Geny, de me emocionar com a aparência da Priscila, do jeito indignado de falar da Fer, do “nada disso” da Regina e de muitos milhares de coisas da Milene. Atualmente, até o cabelo colorido da Lais faz falta. Em contra partida uma pessoa que nunca foi surpresa para mim, foi a Mai. Sim, esta estava destinada a participar de todos os momentos da minha vida. A única que consegue comemorar minhas vitórias mesmo quando eu não consigo. Vocês meninas, moram no meu coração e tenho muito a agradecer a vocês. Vocês sabem o quanto significaram/significam pra minha caminhada. Vocês são meus exemplos.

Ao pessoal da Salinha 2, agradeço os muitos momentos. Para demonstrar meu apreço, basta dizer que abriria mão da minha vez no chimarrão para que vocês pudessem bebê-lo. Os amigos secretos, os bolos e as

comidinhas, os papos sobre livro, os recadinhos e deboches, as danças e cantorias, aos sustos pegando camarões saltitantes, aos tombos, aos choros descontrolados e muitos outros momentos. Alguns desses ótimos momentos compartilhados com os vizinhos de sala também.

Aos meus colegas de disciplinas, agradeço muito as “Caróis” pela paciência para me explicarem as coisas na sala de aula. Sempre me tratarem com carinho e respeito, eu admiro muito vocês.

Aos meus colegas de trabalho pelas horas que não pude estar ajudando-os mais ativamente. I hope our brotherhood remains strong. Lá construí grandes parcerias e espero que amizades também. Obrigado Henrique, Bruna, Rosa, Mari, Roberta e a família Wizard. Adoro vocês!

Agradecendo aquelas pessoas que o convívio me trouxe, não posso deixar de agradecer aquelas que tiveram a paciência de continuar me chamando de amiga mesmo quando não fui a amiga que elas mereciam. Agradeço a Raquel, a Amanda e a Sâmia. Enfim, preciso agradecer a vocês por compartilharem das minhas alegrias e acreditarem em mim.

Finalmente e não menos importante, eu quero agradecer à minha família de verdade. Aquela que Deus me deu para amar mais do que a mim mesmo. Na verdade vocês sabem que essa tese é nossa. É da minha mãe, Lucia, me fazendo companhia no laboratório e querendo conhecer as minhas “filhas”, do meu pai Homero, me levando na FURG pra fazer a seleção mesmo depois de eu ter batido o nosso carro. Da minha mana, Hana, por sempre sorrir com orgulho quando eu compartilhei o resultado positivo de uma nota ou um seminário. É das minhas avós, a Olga acha que eu sou “doutora”, a Lela sempre me pergunta o que eu faço na FURG e a Voninha chorando de saudade por não me ver com tanta frequência. É do meu Broto, meu braço direito, minha âncora que me permite voar aparando os meus tombos quando me afasto muito do chão. É da família dele também, que sempre sente orgulho das minhas vitórias. É dos meus cãozinhos, que não entendem nada, mas sempre me fazem sorrir no meio de tanta coisa ruim. Vocês fazem parte disso, é nosso. Amo muito vocês e sempre irei dedicar todas as coisas boas da minha vida à vocês. É o amor imutável e infinito. Tenho muita sorte de tê-los.

# ÍNDICE

<b>RESUMO GERAL</b> .....	<b>6</b>
<b>1. INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	<b>7</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>14</b>
3.1. OBJETIVO GERAL .....	14
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
<b>3. ARTIGO</b> .....	<b>15</b>
ABSTRACT.....	16
1. INTRODUCTION.....	17
2. MATERIALS AND METHODS.....	18
2.1. CELL CULTURE .....	18
2.2. BIOMASS, C-PHYCOCYANIN EXTRACTION, QUANTIFICATION AND PURIFICATION.....	18
2.3. C-PC ABSORPTION .....	19
2.4. CELL TREATMENTS WITH C-PC AND PDA MATERIALS AND METHODS ...	19
2.5. CELL VIABILITY.....	19
2.6. ASSESSMENT OF INTRACELLULAR REACTIVE OXYGEN SPECIES (ROS)	20
2.7. IN VITRO MIGRATION ASSAY .....	20
2.8. STATISTICAL ANALYSES.....	20
3. RESULTS .....	21
3.1. C-PC ABSORPTION.....	21
3.2. CELL VIABILITY.....	21
3.3. ASSESMENT OF INTRACELLULAR REACTIVE OXYGEN SPECIES (ROS) ..	22
3.4. IN VITRO MIGRATION ASSAY .....	23
4. DISCUSSION.....	24
REFERENCES .....	27
<b>4. DISCUSSÃO GERAL</b> .....	<b>32</b>
<b>5. REFERÊNCIAS</b> .....	<b>35</b>

## RESUMO GERAL

Os mecanismos decorrentes da ação fotodinâmica vem sendo amplamente difundidos para o tratamento de diversas doenças, incluindo tratamento de tumores. Neste processo, substâncias fotoativadas desencadeiam uma cascata de eventos fotobioquímicos que podem levar a morte celular. Neste sentido, faz-se importante a pesquisa de possíveis agentes fotossensibilizantes, a exemplo da c-ficocianina, uma ficobiliproteína extraída de cianobactérias como a *Spirulina platensis*, a qual se destaca pela sua abrangente aplicação na indústria alimentícia e farmacológica. Neste estudo, investigamos o efeito da c-ficocianina extraída da cianobactéria *Spirulina platensis* na presença e ausência de luz visível, também denominada fotossinteticamente ativa (PAR) na linhagem tumoral de melanoma murino B16F10. Para tal, as células foram tratadas com c-ficocianina, na forma bruta e após a purificação, expostas à luz visível durante 5 minutos e na ausência desta. Observou-se que na ausência de luz a c-ficocianina, purificada e bruta, não apresentaram efeito na proliferação celular, contudo, na presença de luz observamos uma inibição de proliferação nas células tratadas com c-ficocianina bruta. Para investigar essa redução na proliferação, quantificou-se espécies reativas de oxigênio (ERO) – principal produto da ação fotodinâmica – e um aumento significativo dos níveis de ERO foi observado 24 h após o tratamento com a c-ficocianina purificada, enquanto nenhuma diferença foi observada na ficocinina bruta em relação ao controle. Em vista do aumento de ERO investigou-se o papel da c-ficocianina purificada na presença de luz na migração celular – importante fator na metástase – e foi verificado que a c-ficocianina purificada na presença de luz reduz a migração celular 24h após o tratamento. Desta forma, é possível sugerir que ocorre fotossensibilização da c-ficocianina e que esta substância deve ser melhor investigada para sua possível utilização para o tratamento do melanoma.

**Palavras chave:** proliferação celular, espécies reativas de oxigênio, migração celular.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

No final do século XIX, Oscar Raab estudou os efeitos da luz na coloração dos paramécios. Raab demonstrou efeitos letais em paramécios quando tratados com determinada substância e expostos a luz do dia embora aqueles tratados apenas com a substância e mantidos no escuro e os expostos somente a luz do dia sobreviviam, demonstrando a descoberta da ação fotodinâmica. Juntamente com Joldbauer e Herman Von Tappeiner, Raab identificou o corante acridina como um fotossensibilizante (sensível à luz). Posteriormente, em 1904, em continuidade aos estudos de Raab, Herman associado à Joldbauer introduziu o termo reação fotodinâmica, contudo, sua aplicação clínica e nomenclatura – chamada de terapia fotodinâmica – foi iniciada mais recentemente, cerca de 50 anos atrás, com o considerado pai da terapia fotodinâmica, Dr. Tom Dougherty (Dougherty *et al.*, 2002; Calin e Parasca, 2006; Allison e Sibata, 2010; Chiavello *et al.*, 2011).

Como o nome sugere, a ação fotodinâmica (AFD) é utilizada para especificar reações fotossensíveis - dependentes de luz - que requerem oxigênio para sua formação e uma molécula sensível à luz (Moan *et al.*, 2003; Kiesslich *et al.*, 2013). Neste contexto, a terapia de ação fotodinâmica (TFD) é uma modalidade minimamente invasiva de tratamento clínico que modifica e destrói células e tecidos via ativação, a partir da energia proveniente da luz, de uma substância sensível à luz (fotossensibilizante) na presença de oxigênio sem danos aos tecidos adjacentes (Dougherty 2002; Dolmans *et al.*, 2003; Nowis *et al.*, 2005; Chatterjee *et al.*, 2008; Agostinis *et al.*, 2011). Este processo gera uma cascata de eventos bioquímicos iniciada pela excitação das moléculas da substância fotossensibilizante pela presença de luz que levará a geração de oxigênio tóxico e posteriormente a morte celular (Buytaert *et al.*, 2007; Kielischer *et al.*, 2013; Mensudar, 2014).

Para que uma reação fotobiológica aconteça, a luz deve ser absorvida pelo fotossensibilizante. Para tal, o comprimento de onda da luz incidida deve coincidir com o espectro de absorção deste fotossensibilizante (Niedre *et al.*, 2002) para que ele absorva energia e passe a um estado excitado singlete, no qual um elétron muda de órbita porém mantém a mesma orientação de spin do seu estado fundamental, gerando uma resultante igual a zero. Este estado pode



decair para o estado fundamental via emissão de fluorescência ou cruzar para um estado triplete excitado, no qual o elétron muda de órbita e a orientação de spin difere do estado fundamental, neste caso a resultante passa a ser 1. Após o fotossensibilizante estar em seu estado triplete excitado, reage com a célula por mecanismos fotoquímicos do tipo I e II ilustrados na Figura 1 (Ronsein *et al.*, 2006). Nas reações de tipo I, a substância fotossensibilizante interage com alvos biológicos gerando radicais livres como o ânion superóxido e o radical hidroxila (Zhang *et al.*, 1999; Agostinis *et al.*, 2011), retornando ao seu estado fundamental. Nas reações de tipo II, a substância retorna ao seu estado fundamental singlete e pode transferir energia para o oxigênio molecular gerando oxigênio singlete (Ronsein *et al.*, 2006; Agostinis *et al.*, 2011). O oxigênio singlete, cuja formação prevalece no processo molecular iniciado pela TFD nas reações de tipo II (Niedre *et al.*, 2002; Nishigore, 2004; Kessel, 2012), possui grande capacidade oxidante em células tumorais (Yusupov *et al.*, 2010; Agostinis *et al.*, 2011) causando sua apoptose ou necrose (Oleinick *et al.*, 2001; Nishigore *et al.*, 2004). Contudo, a ocorrência de ambos os tipos de reação pode depender tanto da concentração de fotossensibilizante, quanto da energia de radiação e do tipo celular e sua condição fisiológica (Almeida *et al.*, 2004; Calin e Perasca, 2006).

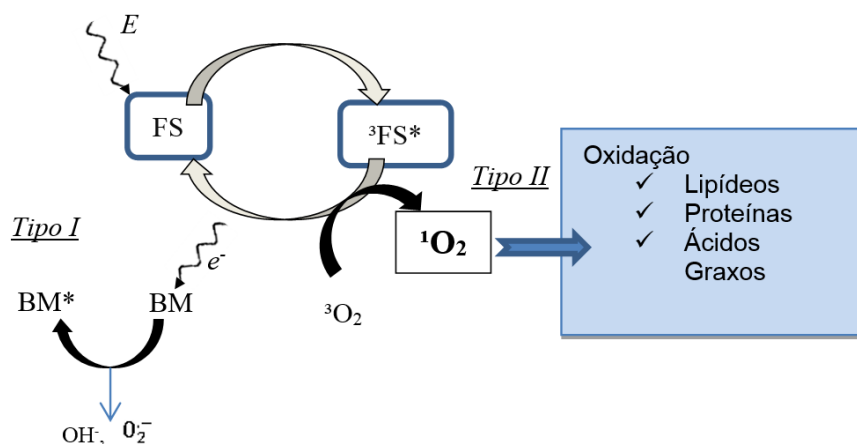


Figura 1 - Representação esquemática das reações de fotooxidação. Abreviaturas: E, energia do fóton incidente; FS, fotossensibilizante; ³FS\*, fotossensibilizante no estado triplete excitado; BM, biomolécula; BM\*, biomolécula oxidada.

As células tumorais podem ser destruídas através de apoptose e necrose, no entanto a extensão do dano é limitada ao local onde está a maior concentração do fotossensibilizante, usualmente nas mitocôndrias, membranas

plasmáticas, lisossomos e outras organelas (Pazos e Nader, 2007; Kiesslich *et al.*, 2013; Sanabria *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2014). O DNA também pode ser afetado pela TFD, que pode produzir quebras na cadeia de DNA e troca de cromátides irmãs (Rosenkranz *et al.*, 2000; Calin e Parasca, 2006).

Os mecanismos da AFD aplicados como terapia parecem ser capazes de enfrentar muitas barreiras até a morte celular apresentando uma maior eficácia neste ponto se comparada à radiação ionizante e à quimioterapia. Este sucesso pode ser explicado pela ação danosa da TFD acontecer diretamente nas organelas, a exemplo das mitocôndrias (Oleinick *et al.*, 2002; Dolmans *et al.*, 2002; Alisson e Sibata, 2010). No entanto, muito deve ser estudado acerca dos mecanismos de degradação celular na TFD, pois as respostas variam de acordo com o tipo celular, do seu potencial genético e metabólico, do fotossensibilizador e sua localização intracelular e de acordo com a dose de TFD.

Aplicações não oncológicas relacionadas incluem: a oftalmologia, como tratamento contra degeneração macular (Bressler e Bressler, 2000), artrite (Gabriel *et al.*, 2009), aterosclerose em veias e artérias (Rockson *et al.*, 2012), tratamentos dermatológicos de queratose actínica (Venturini *et al.*, 2014), psoríase (Almuslet e Osman, 2012) e diagnóstico (Kostron, 2010). A terapia fotodinâmica ainda pode ser utilizada como antibacteriana, combatendo doenças infecciosas, inativando microorganismos (Pop *et al.*, 2011) que poderiam desenvolver resistência a medicamentos mediante exposição prolongada a estes (Patel e Saiman, 2010; Eichner *et al.*, 2013). Vercambre e colaboradores (2006), por exemplo, relatam a utilização da terapia para tratamento de uma infecção superficial cutânea – eritrasma – causada por *Corynebacterium minutissimum*. Em outros exemplos, a ação fotodinâmica teve seus efeitos bactericidas investigados em *Vibrio vulnificus*, com o corante azul de toluidina (Wong *et al.*, 2005) em *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans* com um composto derivado de porfirinas (TMPyP) (Eichner *et al.*, 2013) e na investigação *in vitro* e estudos *in vivo* - avaliando os efeitos da TFD na candidíase bucal em ratos - fornecendo uma visão de sua atuação antifúngica (Pinton *et al.*, 2012)

Em tratamentos oncológicos, o efeito fototóxico está ligado à vascularização do tumor, onde a inibição da liberação de óxido nítrico –

proveniente da parede endotelial dos vasos sanguíneos – causa vasoconstrição levando a isquemia e morte celular (Gilissen *et al.*, 1993; Mroz *et al.*, 2011; Kiesslich *et al.*, 2013).

Espécies reativas de oxigênio, como  $\text{OH}^\cdot$ ,  $\text{HO}_2^\cdot$  e  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , geradas na TFD, possuem diferentes alvos celulares. Podem induzir dano na membrana celular (Jiang *et al.*, 2014a), alterações na adesão das células tumorais (Rousset *et al.*, 1995; Jiang *et al.*, 2014b), dano de DNA e outras estruturas da matriz celular, a qual relaciona-se com a célula provendo diversos sinais em uma variedade de processos como adesão, migração e proliferação (Pazos e Nader 2007; Kim *et al.*, 2011) – que são fatores fundamentais no processo metastático.

Por sua vez, a metástase é facilitada pela interação entre as células tumorais e o endotélio de tecidos distantes constituindo uma cascata que começa com a invasão do tumor, sobrevivência na circulação, extravasamento para diversos locais para final estabelecimento e crescimento (Cimpean *et al.*, 2008; Bendas e Borsig, 2012), envolvendo diversos mediadores, a exemplo das integrinas, que irão participar da progressão tumoral (Chammas and Brentani, 1991).

Rousset e colaboradores (1999) demonstraram diminuição no potencial de metástase associado a mudanças na membrana plasmática em duas linhagens de câncer de cólon, progressivo (PROb) e regressivo (REGb), quando exposto a photofrin® e um benzopireno derivado à TFD. Etminan e colaboradores (2000) demonstraram, após TFD com ácido 5-aminolevulínico (ALA), diminuição de migração e capacidade de invasão de células tumorais humanas (U373 e A172), Kaliki e colaboradores (2012) demonstraram controle na metástase coroidal após tratamento com TFD de verteporfina *in vivo*.

Alguns tumores possuem grande potencial metastático, destacando-se o melanoma maligno. Segundo estimativas para 2014 do Instituto Nacional do Câncer (2014), sua letalidade é elevada, porém sua incidência é baixa. No ano de 2014, estima-se 2.960 novos casos em homens e 2.930 em mulheres. Destes novos casos, cerca de 13% estariam concentrados na Região Sul, perdendo apenas para São Paulo com 31% dos novos casos. Além do grande potencial metastático, a resistência do melanoma maligno a agentes quimioterápicos torna

seu tratamento um grande desafio (Cummins *et al.*, 2006; Flaherty, 2012) e neste sentido a ação fotodinâmica está sendo amplamente encorajada devido aos seus promissores resultados *in vitro* (Miranda *et al.*, 2014) e *in vivo* (Camerinet *et al.*, 2010; Saczko *et al.*, 2011).

Em muitos países a TFD é utilizada para tratamento de carcinoma de bexiga (Bader *et al.*, 2013), esofágico (Tanaka *et al.*, 2011), cabeça e pescoço (Yang *et al.*, 2007), gástrico, tumores cerebrais (Eljamel, 2010) e ainda melanomas oculares (Campbell *et al.*, 2012). Os efeitos da aplicação de TFD depende de propriedades de oxigenação do tecido e suas propriedades ópticas bem como do método de tratamento (Pop *et al.*, 2011) e principalmente do uso do fotossensibilizante adequado (Tan *et al.*, 2008). Substâncias fotossensibilizantes podem ser administradas (uso tópico, oral ou intravenoso) ou existir naturalmente nas células e nos tecidos, a exemplo da bilirrubina nos humanos. Muitas substâncias foram testadas tanto *in vitro* quanto *in vivo* na busca do fotossensibilizante ideal (Calin e Parasca, 2006; Agostinis *et al.*, 2011).

Dentre estas pesquisas, as ficobiliproteínas atuam como fotossensibilizantes em uma ampla gama de aplicações por diversas propriedades: boa estabilidade de armazenamento, facilidade de ligação a proteínas e anticorpos, alta fotoestabilidade (Prozyme, 2014) e resistência a amplas faixas de temperatura (Kumar *et al.*, 2011).

Conceitualmente, ficobiliproteínas são compostos pigmentados – assim como carotenóides e clorofila – que consistem de dímeros com duas subunidades (alfa e beta) de polipeptídios pigmentados (Sarada *et al.*, 1999; Kuddus *et al.*, 2013). Presentes em cianobactérias e outras algas, estes pigmentos protegem-nas do dano causado pela alta radiação solar e do dano oxidativo devido às ligações duplas conjugadas presentes nos cromóforos. A presença destes pigmentos é que dá às algas a vastidão de cores a elas atribuídas (Gualtieri e Barsanti, 2006; Singh *et al.*, 2008).

Neste contexto, algumas espécies de microalgas, a exemplo do gênero *Spirulina*, além de grande conteúdo proteico, possuem diversos componentes e pigmentos naturais com propriedades funcionais. As ficobiliproteínas derivadas da *Spirulina*, ficoeritrina e aloficocianina, são encontradas em pequenas

concentrações, no entanto a ficocianina, pigmento azul brilhante, é a mais abundante e dependendo de sua pureza pode ter diversas aplicações (Walter et al., 2011).

A *Spirulina* tornou-se o gênero mais conhecido e mais amplamente cultivado dentre as cianobactérias e outras algas no mundo (Vonshak et al., 2011). A extração de ficocianina pode ser feita a partir da *Spirulina platensis*, que produz somente dois tipos de ficobiliproteínas: aloficocianina e c-ficocianina onde este último é a principal proteína pigmentar presente em suas células (Boussiba e Richmond, 1979), que vem sendo amplamente utilizada em aplicações comerciais na indústria alimentícia (Martelli et al., 2014) e também na indústria cosmética, como corante azul natural (Moraes et al., 2011). Trabalhos apontam diversas aplicações médicas, como antiinflamatória (Chen et al., 2012), antibacteriana (Sarada et al., 2010), antioxidante, hematoprotetora (Nagaraj et al., 2012), antitumoral (Yang et al., 2014), antiaterosclerótica (Li et al., 2013) combatendo diabetes (Zheng et al., 2013), entre outros.

*S. platensis* é rica em ficocianina e não é agressiva para a saúde humana (Moraes et al., 2010). Outras pesquisas ainda comprovaram que as ficobiliproteínas extraídas da *S. platensis* atuam efetivamente na eliminação de radicais hidroxila e peroxil – o que é relevante também para a diversidade farmacológica das ficobiliproteínas - e inibe a peroxidação lipídica (Bermejo et al., 2008; Zhang et al., 2000; Nishanth et al., 2010), características que contribuem para um fotossensibilizante ideal.

Em vista dos usos variados da ficocianina, investiga-se diferentes procedimentos de extração e os efeitos destes métodos na qualidade e no rendimento do produto da extração, bem como sua purificação (Sarada et al., 1999; Moraes et al., 2010; Figueira, 2014).

Estudos na produção de ficocianina pela *Spirulina platensis* sob diferentes condições de luz foram feitos por Walter et al. (2011) e Kumar et al. (2011) que concluíram que na exposição da *Spirulina platensis* à luz vermelha a pureza da ficocianina extraída aumenta. Pádula e Boiteux (1999) verificaram a quebra de fitas DNA quando associado a AFD da ficocianina na *Escherichia coli*, Li e colaboradores (2010) mostraram que a AFD da ficocianina induz apoptose

em células tumorais de mama (MCF-7) e Lopes (2006), testou a ação fotodinâmica do extrato de ficocianina extraída da *Spirulina platensis* nas linhagens tumorais humanas leucêmicas k562 (não MDR) e k562-Lucena 1 (MDR) onde verificou inibição da proliferação de ambas as linhagens com menor sensibilidade na linhagem MDR.

Em consonância, nosso intuito é investigar os efeitos da provável ação fotodinâmica da c-ficocianina, extraída da cianobactéria *Spirulina platensis*, nas células de melanoma de camundongo da linhagem celular B16F10.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

Investigar o efeito da c-ficocianina extraída da cianobactéria *Spirulina platensis* e sua possível ação fotodinâmica após exposição à radiação fotossinteticamente ativa (PAR) na linhagem celular de melanoma de camundongo B16F10.

### **2.2. Objetivos Específicos**

- ✓ Avaliar a sensibilidade da linhagem celular B16F10 após tratamento com extrato bruto e purificado da c-ficocianina extraída da cianobactéria *Spirulina platensis*, e em associação com PAR;
- ✓ Quantificar níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO) nas células expostas a c-ficocianina em associação com PAR;
- ✓ Avaliar a capacidade migratória das células expostas a c-ficocianina em associação com PAR.

### 3. ARTIGO

Artigo a ser submetido à revista *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*

#### **Photodynamic action of c-phycoyanin: a possible pathway to migration inhibition on melanoma cells**

Anahy Arrieche Fazio<sup>1</sup>, Felipe da Silva Figueira<sup>2</sup>, Suzana Juliano Kalil<sup>2</sup>, Ana Paula de Souza Votto<sup>1\*</sup>

1 Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Rio Grande do Sul, Brazil

2 Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brazil

E-mail adress:

anahyfazio@yahoo.com.br (Anahy Arrieche Fazio);

felipe\_alimentos@yahoo.com.br (Felipe da Silva Figueira);

dqmsjk@furg.br (Suzana Juliano Kalil);

anavotto@yahoo.com.br (Ana Paula de Souza Votto).

\*Corresponding author e-mail: [anavotto@yahoo.com.br](mailto:anavotto@yahoo.com.br) (Ana Paula de Souza Votto)

Phone/Fax: +55 53 32935192/ + 55 53 32336848

Adress: Instituto de Ciências Biológicas -Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Rio Grande, RS, Brazil

Zip Code: 96203-900, Rio Grande, RS, Brazil



## **Abstract**

Photodynamic therapy (PDT) has been effective for the treatment of several malignant diseases even melanoma. This work investigated c-phycoerythrin (C-PC) effects from cyanobacterium *Spirulina platensis* and its possible photodynamic action (PDA) by photosynthetically active radiation (PAR) combination in B16F10 cell line. In order to accomplish this aim cells were treated with nonpurified C-PC or purified C-PC in presence and absence of PAR, and after, cell viability, measurement of intracellular oxygen reactive species (ROS) levels and cell migration tests were performed. These results showed that nonpurified C-PC causes B16F10 proliferation inhibition, and that photoactivation of purified C-PC by PAR occurs leading to increased ROS levels and consequently to cell migration inhibition. C-PC mediated PDA appears exert positively effects in order to damage B16F10 cells, furthermore, studies must be developed to elucidate the mechanisms involved in this process and its capacity to inhibit cancer metastasis by B16F10 death.

**Key words:** B16F10 cell line, cellular proliferation, oxygen reactive species

## 1. Introduction

As the name suggests, photodynamic action (PDA) is applied to specify photosensitive reactions – light depending – that requires presence of oxygen and a photosensitizer substance [1,2]. In this context, photodynamic therapy (PDT) is a minimally invasive medical treatment that modifies and destroy cells and tissues through photosensitizer activation, using energy of photons [3,4,5,6,7]. Two types of reaction can be generated from PDA process: type I or II pathway. In type I pathway, the photosensitizer will react with substrate molecules to produce free radical ions such as hydroxyl radicals and superoxide [8,7]. Singlet oxygen, whose formation prevails in type II pathway, [9,10,11] is a highly reactive state of oxygen and can oxidize tumoral cells [7,12]. These oxygen species have different cellular targets, can induced membrane damage [13], changes in tumoral cells adhesion [14,15], DNA damage and extracellular matrix structure damage, which relates to cell providing signs in several process as adhesion, migration and proliferation [16,17] – those plays an important role in the metastatic process [18].

Melanoma has been acknowledged for its severe behavior and its ability to grow rapidly and high potential to metastasize [18,19]. Therefore, the chemotherapy resistance of malignant melanoma make its treatment a big challenge and PDA has been widely encouraged due its promising results *in vitro* [20] and *in vivo* [19,21].

Forward this advance, *Spirulina* became the most well-known and cultivated gender among the cyanobacterium and algae worldwide [22]. C-phycoyanin (C-PC) is the major pigment protein among the phycobiliproteins produced by *Spirulina platensis* [23], its widely applied in commercial applications in food [24] and cosmetic industry as a natural blue dye [25]. Studies have demonstrated a range of medical applications as anti-inflammatory [26], antibacterial [27], antioxidant, hepatoprotective [28], antiatherosclerotic [29], avoiding diabetics [30] and antitumoral [31].

In order to study C-PC effects in association with PAR, two C-PC extracts were used. The nonpurified extract (crude extract) which has different compounds beyond C-PC, and the purified extract which the major content is C-PC.

In line, the aim of this study was to investigate the C-PC effects from cyanobacterium *Spirulina platensis* and its possible photodynamic action by PAR combination in B16F10 melanoma cell line.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Cell Culture

Murine melanoma cell line, B16F10, obtained from Rio de Janeiro Cell Bank was cultured in Dulbecco's Modified Essential Medium (DMEM) (Gibco BRL) supplemented with sodium bicarbonate (0.2 g/L), L-glutamine (0.3 g/L), Hepes (3 g/L), (Vetec Química, LTDA) 10% fetal bovine serum (Gibco BRL), 1% antibiotic and antimycotic – streptomycin (100 µg/mL), penicillin (100 U/mL) and amphotericin B (0,25 µg/mL) – (Gibco BRL) in cell culture flasks at 37 °C.

### 2.2. Biomass, C-Phycocyanin extraction , quantification and purification

C-phycocyanin was extract from biomass of cyanobacterium *Spirulina platensis* according to Moraes *et al.* [32] After extraction, the crude broth containing cells was centrifuged and the pH adjusted to 6.5.

The C-PC concentration, in mg/mL, was calculated using Eq. 1 [33].

$$C - PC = \frac{(OD_{620} - 4,74 \times (OD_{652}))}{5.34}$$

(1)

The treatments were made using nonpurified extract (the crude extract) and purified extract wherein purity is 0.82, considered food grade [34].

The C-phycocyanin purification by ultrafiltration was performed in a dead-end ultrafiltration cell with a 50 kDa polyethersulfone membrane (UH050 P, Nadir, Germany), at 25°C and pressure 1.0 kgf/cm<sup>2</sup> and diafiltration/ultrafiltration mode [35]. The purity of the C-PC extract were calculated using the absorbance ratio OD<sub>620</sub>/OD<sub>280</sub> [36].

### 2.3. C-PC absorption

The B16F10 cells, seeded in 96-well were exposed to 0.1 mg/ml of purified C-PC. The absorbance was measured every four hours up to 24 h. At each incubation time, the purified C-PC solution was removed, well washed twice, PBS was added in each well and kinetics of uptake were estimated by following the absorbance changes measured using a multiwell plate reader (ELX 800 Universal Microplate Reader, Bio-TEK), with optical density at 620 nm, C-PC maximum absorption.

### 2.4. Cell treatments with C-PC and PDA

The cells were centrifuged, suspense in DMEM medium ( $10^5$  cells/mL), seeded in 96-well, cultured for one day and then treated. The medium was removed and the experiments were performed in PBS buffer solution with 0.35 mg/ml of C-PC, purified and nonpurified.

After C-PC treatment, cells were exposed to photosynthetically active radiation (PAR) (Halopar halogen lamp, 90W) with irradiance of  $23.4 \text{ mW/cm}^2$ , measured using a radiometer photometer (International Light Technologies, ILT 1400), for 5 minutes ( $7 \text{ J/cm}^2$ ) in PBS solution. Next, the PBS was removed and medium was added. The distance between lamp and the well was 40 cm. Cells exposed only to C-PC followed the same procedure of PAR exposure in dark.

### 2.5. Cell Viability

Viability assays were performed by MTT (3-(4,5--2-yl)-2,5-ditetrazolium bromide) assay 0 h, 24 h, 48 h and 72 h after treatment. For the purposes of the experiments, at the end of each incubation time, B16F10 cells were washed with PBS and incubated for 3 h with 20  $\mu\text{l}$  of MTT (5 mg/ml) dissolved in DMEM medium at 37 °C. Then, 200  $\mu\text{l}$  of dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma) were auditioned and the absorbance values were recorded at 490 nm on a multiwell plate reader (ELX 800 Universal Microplate Reader, Bio-TEK).

## 2.6. Assessment of intracellular Reactive Oxygen Species (ROS)

The fluorogenic compound 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (H<sub>2</sub>DCF-DA) was used to assess the intracellular level of ROS. B16F10 cells were treated, as briefly described above, with 0.35 mg/ml of C-PC. ROS production was measured 24h after treatment. At the end of incubation, cells were detached by trypsinization, washed in PBS twice and incubated for 30 min at 37 °C with H<sub>2</sub>DCF-DA at a final concentration of 40 μM. After cells were washed with PBS twice and suspended in fresh PBS. Aliquots of 160 μl of each sample (five replicates) were placed into an ELISA plate and the fluorescence intensity was assessed during 90 min at 37 °C, using a fluorescence microplate reader (Victor 2, Perkin Elmer) equipped with a 485 nm excitation filter and 520 nm emission filter. Intracellular esterase activity oxidize H<sub>2</sub>DCF-DA into DCF which emits fluorescence. The results of ROS production by C-PC in PBS were represented as fluorescence area - fitting fluorescence data to a second order polynomial and integrating between 0 and 90 min - in order to obtain its area.

## 2.7. In vitro migration assay

A total of 10<sup>5</sup> cells were seeded on 24-well culture plates and scratched gently using a 100μl pipette tip - after reaching confluency - to create cell-free area (an initial wound). Cells were washed twice with PBS to remove floating cells and then treated as briefly described. After, cells were maintained serum-free medium. Images were made at 0h and 24h under an inverted microscope (Olympus IX81). Migrated cells were determined by counting cells that moved across the wound limits using Image J software (free software developed by Wayne Rasband, USA).

## 2.8. Statistical analysis

Each experiment was repeated at least three independent times using triplicate samples. The results were expressed as the means ± SEs. Comparisons between groups were made using Student's t-tests and comparisons among multiple groups were made using one-way or two-way ANOVA followed by post-hoc comparisons (Tukey's test). Statistical significance was accepted at  $p < 0.05$ .

### 3. Results

#### 3.1. C-PC absorption

The absorption of C-PC by B16F10 was estimated following the absorbance changes measured every four hours up to 24h. In this period, absorbance values in cells exposed to C-PC (B16F10 treated with C-PC) and C-PC-free cells did not demonstrate significantly changes (Fig. 1).

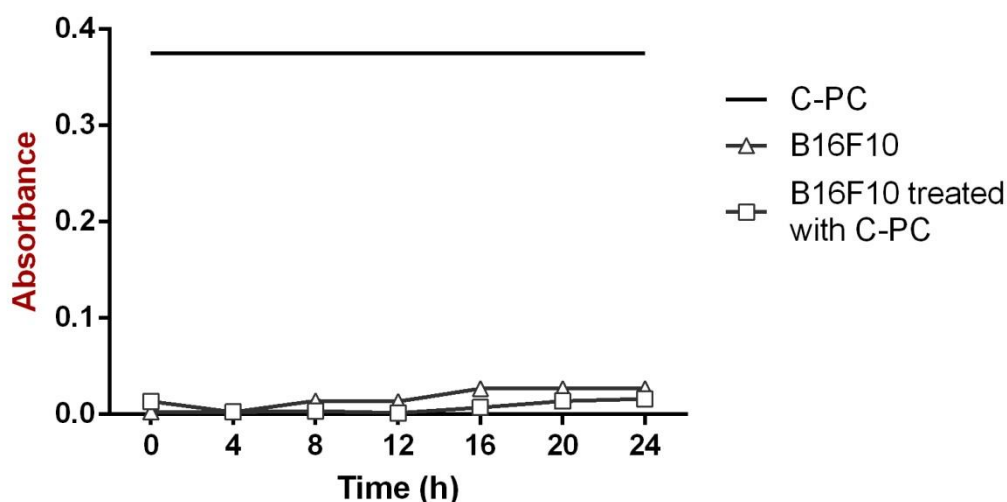


Figure 1 – C-PC absorption by B16F10 cells. The C-PC absorption was measured by absorbance after incubation with 0.1 mg/ml of C-PC at different times. Data are expressed as mean  $\pm$  SE. There was not significant differences ( $p > 0.05$ ).

#### 3.2. Cell Viability

To investigate B16F10 cells proliferation effects by nonpurified and purified C-PC in presence or absence of PAR, the MTT viability assay was performed. The assay demonstrated that PAR, nonpurified C-PC, purified C-PC and purified C-PC in presence of PAR did not cause proliferation inhibition in relation to respective control groups (Fig. 2A, B). However, nonpurified C-PC in presence of PAR show significant proliferation inhibition 72h after treatment (Fig 2A).

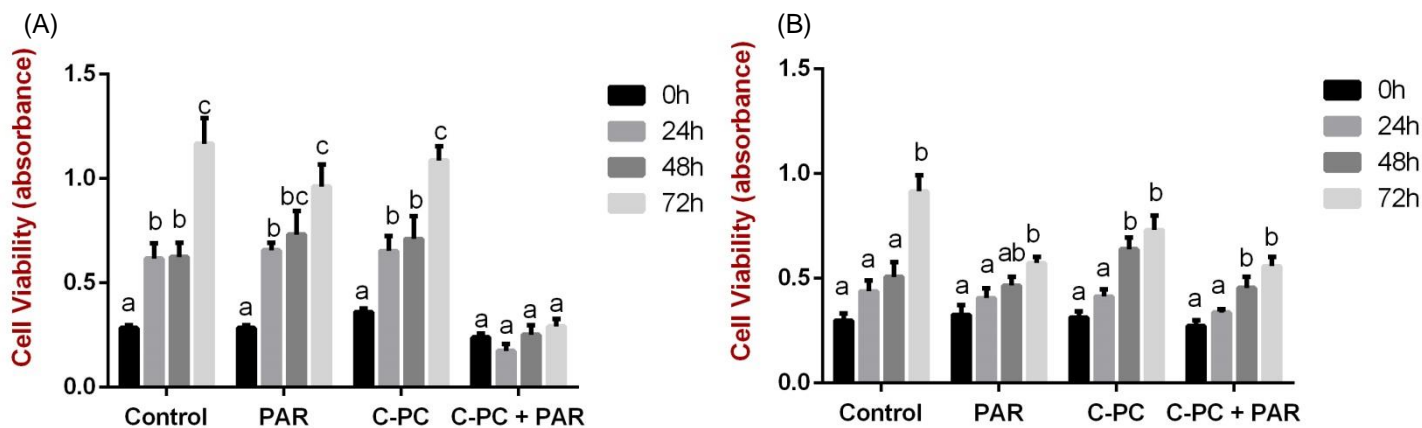


Figure 2 – Cell proliferation, measured by MTT assay. B16F10 cells were treated with 0.35 mg/ml of (A) nonpurified and (B) purified C-PC in absence and presence of photosynthetically active radiation (C-PC + PAR) at 0h, 24h, 48h and 72h after exposure. Data are expressed as mean  $\pm$  SE. Similar letters indicate absence of significant differences in each treatment ( $p > 0.05$ ).

### 3.3. Assessment of intracellular Reactive Oxygen Species (ROS)

Levels of intracellular ROS were assessed in B16F10 cells after 24h of exposure to nonpurified and purified C-PC (0.35 mg/ml) in presence or absence of PAR. PAR or nonpurified and purified C-PC did not show significant differences in ROS levels in comparison with the respective control groups (Fig. 3A,B). However increased ROS level were showed in cells treated with purified C-PC in presence of PAR (C-PC + PAR) in comparison with control group (Fig. 3B), while nonpurified C-PC + PAR did not show this significant increase (Fig. 3A).

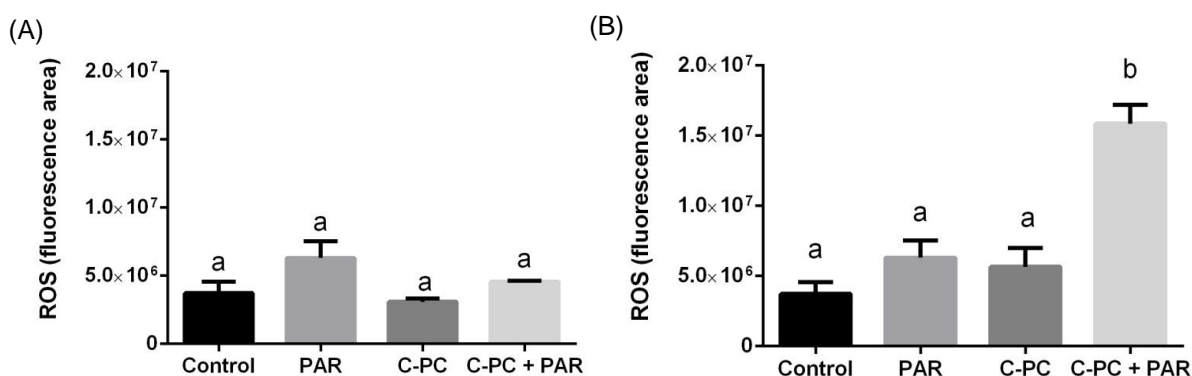


Figure 3 – Intracellular ROS levels (fluorescence area) in B16F10 cells. Cell were exposed to 0.35 mg/ml of (A) nonpurified and (B) purified C-PC in absence (C-PC) and presence of PAR (C-PC + PAR). Data are expressed as mean  $\pm$  1 SE. Similar letters indicate absence of significant differences ( $p > 0.05$ ).

### 3.4. In vitro migration assay

In order to assess the effect of purified C-PC in presence of PAR on migration of B16F10 cells was performed the scratch assays (Fig 4A). This results show that 24h after exposure to purified C-PC in presence of PAR the number of migrated cells and consequently the wound closure significantly decreased (Fig. 4A,B).

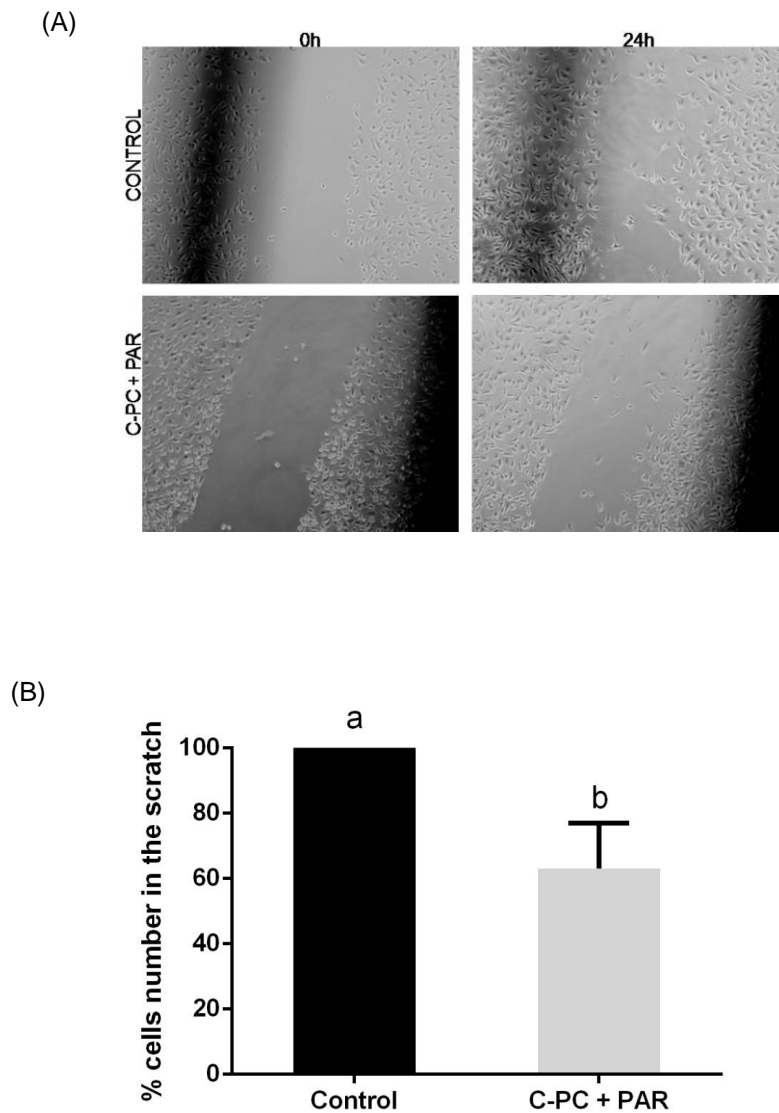


Figure 4 – Migration of B16F10 cells after treatment. The migration 24h after exposure to purified C-PC in presence PAR (C-PC + PAR) using a scratch assay. (A) Example of scratch assay immediately and after 24h. (B) Percent of cells numbers in the scratch for each treatment. Data are expressed as mean  $\pm$  1 SE. Similar letters indicate absence of significant differences ( $p > 0.05$ ).



#### 4. Discussion

Studies have displayed several applications to c-phycoerythrin (C-PE). This variety of roles include since natural food industry even pharmaceutical applications. Due its capacity to inhibit cell proliferation [37,38] and induce apoptosis in carcinoma cells [39], C-PE role as antitumoral agent has been studied. Furthermore, C-PE is photosensitive and have been reported to exert a stronger photodynamic action on tumor cells, thus, a potential photosensitizer for photodynamic action [40,41]. Morcos *et al.* [42,43], have showed C-PE properties and its use in cancer treatment binding cancer cells *in vivo* and *in vitro*. Thereby the aim of this study was to investigate the C-PE effects from cyanobacterium *Spirulina platensis* and its possible photodynamic action by PAR combination in B16F10 cell line.

First, C-PE uptake by B16F10 cells was assessed by studying absorbance changes in treated cells after various incubation periods until 24 h. The C-PE kinetic determine the incubation time where C-PE uptake inside B16F10 cells were highest. However, absorbance did not changed after 24h of incubation, keeping the same values that C-PE-free cells. This result allow us to conclude that C-PE uptake by B16F10 did not occurs in these cells. Regardless of result, the photochemical mechanisms give rise to lipid peroxidation [44,45] which may damage membrane and hence allowing photosensitizer redistribution [46]. Thereby, treatments were performed without C-PE uptake by cells.

An optimal photosensitizing agent should follow several requirements including low dark toxicity [2,5,47]. Results for cell viability have shown that C-PE treatments did not present significant toxicity. Nevertheless, nonpurified C-PE in presence of PAR demonstrated significant proliferation inhibition until 72h. This result come against C-PE (80 µg/ml) photodynamic capacity to inhibit proliferation verified in MCF-7 breast cells *in vitro* when exposed to laser radiation [48], in mouse myeloma cells after treatment with 0.1 mg/ml of C-PE and radiation exposition at dose of 300J/cm<sup>2</sup> compared with cells exposed to phycoerythrin only [42], in human leukemia K562 cells with 72,5 mg/L of C-PE [49], in human hepatocellular carcinoma cells (HepG2) using 100µg/ml of C-PE from *Microcystis* [50] and in human cervical carcinoma HELa cells [51]. However, in present study, inhibition of proliferation was observed in nonpurified C-PE

leading us to conclude that there is some agent enhancing the antiproliferative effect of C-PC.

Reactive oxygen species production (ROS) by photodynamic action is widely known to promote a biochemical cascade, being the mainly product of PDA, that can lead to cell death [7,52]. It's well known the role of singlet oxygen as the major mediator of photochemical cell damage to several photosensitizers, Zhang et al. [52] demonstrated that C-PC damage occurs mainly by type II reactions – oxygen singlet formation. However, the lifetime of singlet oxygen is very short [1], limiting its diffusion and detection methods. In order to investigate a probable correlation between reactive oxygen species and cell viability, ROS intracellular levels assessment were performed to measure DCF fluorescence. This method is not able to detect singlet oxygen formation, but can detect other ROS. In this work increased levels were shown 24h after cells treatment with purified CPC in presence of PAR (CPC + PAR) in comparison with control group while nonpurified CPC did not show significant differences even in presence of light. Thus, this significant increase allows us to conclude that nonpurified CPC might have some compound responsible for keeping the basal ROS levels. While, the increased ROS levels in purified CPC agree with its photoactivation by PAR.

ROS production by PDA has several cell targets, promoting lipid peroxidation [45], cell membrane damage and alterations in cancer cell adhesiveness - an important parameter in cancer metastasis [15,53,54]. Moreover cell migration is an essential process in cancer progression. Thus, in order to assess the effect of purified CPC in presence of PAR on migration of B16F10 cells we performed scratch assays.

This results show that 24h after exposure to purified CPC in presence of PAR the number of migrated cells decreased about 45% and wound closure significantly decreased in relation to control. Our results agree with several works that described decreased in cell migration. For example, chloroaluminum-sulfonated phthalocyanine PDT in smooth muscle cells (SMCs) and fibroblasts [55], ALA/PDT in oral squamous carcinoma cell line (Ca9-22) and nasopharyngeal carcinoma cell line (KJ-1) [56] and chlorin e6 PDT in mouse mammary cancer cell line (4T1) showed suppression in migration [57]. In another

work nasopharyngeal undifferentiated carcinoma cell line, KJ-1, was treated with meta-tetrahydroxyphenyl chlorine (m-THPC) PDT and migration was suppressed since 24 to 48h [58].

In short, B16F10 cell line is sensitive to C-PC photoactivation. Although nonpurified C-PC in presence of PAR have demonstrated a significant proliferation inhibition, it did not corroborate with ROS levels, since these levels were similar to control. On another hand, purified C-PC in presence of PAR was not capable to inhibit cell proliferation, however its photoactivation increased ROS levels in relation to control allow us to investigate how these levels could exercise some influence in cell migration. As expected, purified C-PC mediated PDA inhibit cell migration in relation to control. Hence, C-PC mediated PDA appears exert positively effects in order to damage B16F10 cells avoiding its migration, furthermore, studies must be developed to elucidate the mechanisms involved in this process and its capacity to inhibit cancer metastasis by B16F10 death.

### **Acknowledgments**

This work was supported by CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) – Ministério da Educação and Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas: Fisiologia Animal Comparada, FURG.

## References

- [1] Moan, J. and Berg, K. (1991) The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen. *Photochemistry and photobiology*. 53, 549-553.
- [2] Kiesslich, T., Gollmer, A., Maisch, T., Berneburg, M. and Plaetzer K. (2013) A Comprehensive Tutorial on In Vitro Characterization of New Photosensitizers for Photodynamic Antitumor Therapy and Photodynamic Inactivation of Microorganisms. *Bio Med research international*. 2013, 1-17.
- [3] Dougherty, T.J. (2002) An update on photodynamic therapy applications. *Journal of clinical laser medicine & surgery*. 20, 3-7.
- [4] Dolmans, D., Fukumura, D. and Jain, R. K. (2003) Photodynamic therapy for cancer. *Nature Reviews Cancer*. 3, 380-387.
- [5] Nowis, D., Stoktosa, T., Legat, M., Issat, T., Jakóbiziak, M. and Gotab J. (2005) The influence of photodynamic therapy on the immune response. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2, 283-298.
- [6] Chatterjee, D.K., Fong, S.L. and Zhang, Y. (2008) Nanoparticles in photodynamic therapy: Na emerging paradigm. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 60, 1627–1637.
- [7] Agostinis, P., Berg, K., Cengel, K. A., Foster, T. H., Girotti, A. W., Gollnick, S. O. and Golab, J. (2011) Photodynamic therapy of cancer: an update. *CA: a cancer journal for clinicians*. 61, 250-281.
- [8] Ronsein, G., Miyamoto, S., Bechara E. and Di Mascio, P. (2006) Oxidação de proteínas por oxigênio singleto: mecanismos de dano, estratégias para detecção e implicações biológicas. *Quím. Nova [online]*. 29, 563-568.
- [9] Niedre, M., Patterson, M.S. and Wilson, B.B. (2002) Direct Near-Infrared Luminescence Detection of Singlet Oxygen Generated by Photodynamic Therapy in Cells In Vitro and Tissues in Vivo. *Photoc. Photob.* 4, 382-391.
- [10] Nishigori, C., Hattori, Y. and Toyokuni, S. (2004) Role of reactive oxygen species in skin carcinogenesis. *Antioxidants and Redox Signaling*. 6, 561-570.
- [11] Kessel, D. (2012) Subcellular targets for photodynamic therapy: implications for initiation of apoptosis and autophagy. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*. 10, 56-59.
- [12] Yusupov, A.S., Goncharov, S.E., Zalevskii, I.D., Paramov, V.M. and Kurkov, A.S. (2010) Raman Fiber Laser for the Drug-Free Photodynamic Therapy. *Laser Physic*. 20, 357–359.
- [13] Jiang, Y., Leung, A. W., Hua, H., Rao, X. and Xu, C. (2014) Photodynamic Action of LED-Activated Curcumin against Staphylococcus aureus Involving Intracellular ROS Increase and Membrane Damage. *International Journal of Photoenergy*. 2014, 1-7.
- [14] Vonarx, V., Foulter, M. T., De Brito, L. X., Anasagasti, L., Morlet, L. and Patrice, T. (1995) Photodynamic therapy decreases cancer colonic cell adhesiveness and metastatic potential. *Research in experimental medicine*. 195, 101-116.

- [15] Jiang, Y., Leung, A. W., Wang, X., Zhang, H. and Xu, C. (2014) Effect of photodynamic therapy with hypocrellin B on apoptosis, adhesion, and migration of cancer cells. *International journal of radiation biology*. 90, 575-579.
- [16] Pazos, M. D. C. and Nader, H. B. (2007) Effect of photodynamic therapy on the extracellular matrix and associated components. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 40, 1025-1035.
- [17] Kim, C. H., Chung, C. W., Choi, K. H. Yoo, J. J., Kim, D. H., Jeong, Y. I. and Kang, D. H. (2011) Effect of 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy via reactive oxygen species in human cholangiocarcinoma cells. *International journal of nanomedicine*. 6, 1357–1363.
- [18] Orgaz, J.L. and Moreno, V.S. Emerging molecular targets in melanoma invasion and metastasis. *Pigment Cell and Melanoma Research*. 26, 39-57.
- [19] Saczko, J., Kulbacka, J., Chwiłkowska, A., Dąg-Zalesińska, M., Wysocka, T. and Ługowski, M. (2011) The influence of photodynamic therapy on apoptosis in human melanoma cell line. *Folia Histochemica et Cytobiologica*. 43, 129-128.
- [20] Miranda, A. F., Santos, G. M., De Oliveira, S. C., Monteiro, J. S., Sampaio, F. J., Júnior, R. A. G. and Vannier-Santos, M. A. (2014) Phenothiazinium dyes in association with diode red laser against B16F10 melanoma cells: in vitro study. *SPIE BiOS*. 8932, 1-12.
- [21] Camerin, M., Magaraggia, M., Soncin, M., Jori, G., Moreno, M., Chambrier, I. and Russell, D. A. (2010) The *in vivo* efficacy of phthalocyanine–nanoparticle conjugates for the photodynamic therapy of amelanotic melanoma. *European Journal of Cancer*. 46, 1910-1918.
- [22] Vonshak, A. Use of *Spirulina* biomass. In: Vonshak A (eds) *Spirulina platensis* (Arthrospira): physiology, cell-biology and biotechnology. Editor: Taylor and Francis. USA: 1997, p. 205-212.
- [23] Boussiba, S. and Richmond, A.E. (1979) Isolation and characterization of phycocyanins from the blue alga *Spirulina platensis*. *Arch. Microbiol.* 120, 155–159.
- [24] Martelli, G., Folli, C., Visai, L., Daglia, M. and Ferrari, D. (2014) Thermal stability improvement of blue colorant C-Phycocyanin from *Spirulina platensis* for food industry applications. *Process Biochemistry*. 49, 154-159.
- [25] Moraes, C.C., Sala, L., Cerveira, G.P. and Kalil, S.J. (2011) C-Phycocyanin Extraction From *Spirulina Platensis* Wet Biomass. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. 28, 45-49.
- [26] Chen, J. C., Liu, K. S., Yang, T. J., Hwang, J. H., Chan, Y. C. and Lee, I. T. (2012) *Spirulina* and C-phycocyanin reduce cytotoxicity and inflammation-related genes expression of microglial cells. *Nutritional neuroscience*. 15, 252-256.
- [27] Sarada, R., Pillai, M. G. and Ravishankar, G. A. (1999) Phycocyanin from *Spirulina sp*: influence of processing of biomass on phycocyanin yield, analysis of efficacy of extraction methods and stability studies on phycocyanin. *Proc. Bioc.* 34,795–801.

- [28] Nagaraj, S., Arulmurugan, P., Rajaram, M. G., Karuppasamy, K., Jayappriyan, K. R., Sundararaj, R. and Rengasamy, R. (2012) Hepatoprotective and antioxidative effects of C-phycoerythrin from *Arthrospira maxima* SAG 25780 in CCl<sub>4</sub>-induced hepatic damage rats. *Biomedicine & Preventive Nutrition*. 2, 81-85.
- [29] Li, B., Chu, X. M., Xu, Y. J., Yang, F., Lv, C. Y. and Nie, S. M. (2013) CD59 Underlines the Antiatherosclerotic Effects of C-Phycoerythrin on Mice. *BioMed research international*. 2013, 1-15.
- [30] Zheng, J., Inoguchi, T., Sasaki, S., Maeda, Y., Mccarty, M. F., Fujii, M. and Takayanagi, R. (2013) Phycoerythrin and phycoerythrinobilin from *Spirulina platensis* protect against diabetic nephropathy by inhibiting oxidative stress. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 304, 110-120.
- [31] Yang, F., Li, B., Chu, X. M., Lu, C. Y., Xu, Y. J. and Yang, P. (2014) Molecular mechanism of inhibitory effects of C-phycoerythrin combined with all-trans-retinoic acid on the growth of HeLa cells in vitro. *Tumor Biology*. 2014, 1-10.
- [32] Moraes, C.C., Burket, J.F.M and Kalil, S.J. (2010) C-Phycoerythrin Extraction Process For Large-Scale Use. *Journal of Food Biochemistry*. 34, 133–148.
- [33] Bennet, A. and Bogorad, L. (1973) Complementary Chromatic Adaptation in filamentous Blue-Green-Alga. *Journal of Cell Biology*. 58, 419-435.
- [34] Palomares, R. M., Nuñez, L. and Amador, D. (2001) Practical application of aqueous two-phase systems for the development of a prototype process for c-phycoerythrin recovery from *Spirulina maxima*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 76, 1273-1280.
- [35] Figueira, F. S. (2014) Purificação de C-ficocianina e sua incorporação em nanofibras. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS, Brazil.
- [36] Abalde, J., Betancourt, L., Torres, E., Cid, A. and Barwell, C. (1998) Purification and Characterization of Phycoerythrin from the Marine Cyanobacterium *Synechococcus* sp. IO9201. *Plant Science*. 136, 109-120.
- [37] Basha, O. M., Hafez, R. A., El-Ayouty, Y. M., Mahrous, K. F., Bareedy, M. H. and Salama, A. M. (2008) C-Phycoerythrin inhibits cell proliferation and may induce apoptosis in human HepG2 cells. *Egypt J Immunol*, 15, 161-167.
- [38] Wang, H., Liu, Y., Gao, X., Carter, C. L. and Liu, Z. R. (2007) The recombinant  $\beta$  subunit of C-phycoerythrin inhibits cell proliferation and induces apoptosis. *Cancer letters*. 247, 150-158.
- [39] Li, B., Gao, M. H., Zhang, X. C. and Chu, X. M. (2006) Molecular immune mechanism of C-phycoerythrin from *Spirulina platensis* induces apoptosis in HeLa cells in vitro. *Biotechnology and applied biochemistry*. 43, 155-164.
- [40] Bei, H., Guang-Ce, W., Chen-Kui, Z. and Zhen-gang, L. (2002) The experimental research of R-phycoerythrin subunits on cancer treatment: a new photosensitizer in PDT. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*. 17, 35-42.

- [41] Tan, Y., Huang, B., Ren, Y.N. and Liu, K.W. (2007) A study of pervasion character and PDT effect of phycocyanin subunits on cancer cell treatment. *Acta Laser Biol. Sin.* 16, 684–689.
- [42] Morcos, N.C., Berns, M. and Henry W.L. (1988) Phycocyanin: laser activation, cytotoxic effects, and uptake in human atherosclerotic plaque. *Lasers Surg. Med.* 8, 10–17.
- [43] Morcos, N.C., Zaldivar, F., Hsueh M.L. and Henry W.L. (1991) Bovine coronary artery endothelium: culture, characterization, angiogenesis and sensitivity to laser photodynamic treatment modalities *J. Clin. Lab. Immunol.* 34, 99–106.
- [44] Girotti, A. W. (2001) Photosensitized oxidation of membrane lipids: reaction pathways, cytotoxic effects, and cytoprotective mechanisms. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology.* 63,103-113.
- [45] Hadjur, C., Richard, M. J., Parat, M. O., Jardon, P. and Favier, A. (1996). Photodynamic effects of hypericin on lipid peroxidation and antioxidant status in melanoma cells. *Photochemistry and photobiology.* 64, 375-381.
- [46] Rosenkranz, A. A., Jans, D. A. and Sobolev, A. S. (2000) Targeted intracellular delivery of photosensitizers to enhance photodynamic efficiency. *Immunology and cell biology.* 78, 452-464.
- [47] Baldea, I. and Filip, A.G. (2012) Photodynamic Therapy In Melanoma - An Update. *Journal Of Physiology And Pharmacology.* 63, 109-118.
- [48] Li, B., Chu, X., Gao, M. and Li, W. (2010) Apoptotic mechanism of MCF-7 breast cells in vivo and in vitro induced by photodynamic therapy with C-phycocyanin. *Acta biochimica et biophysica Sinica.* 42, 80-89.
- [49] Liu, Y., Xu, L., Cheng, N., Lin, L. and Zhang, C. (2000) Inhibitory effect of phycocyanin from *Spirulina platensis* on the growth of human leukemia K562 cells. *Journal of applied phycology.* 12, 125-130.
- [50] Wang, C. Y., Wang, X., Wang, Y., Zhou, T., Bai, Y., Li, Y. C., & Huang, B. (2012) Photosensitization of phycocyanin extracted from *Microcystis* in human hepatocellular carcinoma cells: Implication of mitochondria-dependent apoptosis. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology.* 117, 70-79.
- [51] Yang, F., Li, B., Chu, X. M., Lv, C. Y., Xu, Y. J. and Yang, P. (2014) Molecular mechanism of inhibitory effects of C-phycocyanin combined with all-trans-retinoic acid on the growth of HeLa cells in vitro. *Tumor Biology.* 2014, 1-10.
- [52] Zhang, S. P., Xie, J., Zhang, J. P., Zhao, J. Q. and Jiang, L. J. (1999) Electron spin resonance studies on photosensitized formation of hydroxyl radical by C-phycocyanin from *Spirulina platensis*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects.* 1426, 205-211.
- [53] Foulter, M. T., Vonarx-Coinsmann, V., Cordel, S., Combre, A. and Patrice, T. (1994). Modulation of colonic cancer cell adhesiveness by haematoporphyrin derivative photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology.* 23, 9-17.
- [54] Uzdensky, A., Kolpakova, E., Juzeniene, A., Juzenas, P. and Moan, J. (2005) The effect of sub-lethal ALA-PDT on the cytoskeleton and adhesion of

cultured human cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 1722, 43-50.

- [55] Overhaus, M., Heckenkamp, J., Kossodo, S., Leszczynski, D. and LaMuraglia, G. M. (2000) Photodynamic therapy generates a matrix barrier to invasive vascular cell migration. *Circulation research*. 86, 334-340.
- [56] Yang, T. H., Chen, C. T., Wang, C. P. and Lou, P. J. (2007) Photodynamic therapy suppresses the migration and invasion of head and neck cancer cells in vitro. *Oral oncology*. 43, 358-365.
- [57] Li, Q., Liu, Q., Wang, P., Feng, X., Wang, H. and Wang, X. (2014) The effects of Ce6-mediated sono-photodynamic therapy on cell migration, apoptosis and autophagy in mouse mammary 4T1 cell line. *Ultrasonics*. 54, 981-989.
- [58] Wang, C. P., Lou, P. J., Lo, F. Y., and Shieh, M. J. (2012). Meta-tetrahydroxyphenyl chlorine mediated photodynamic therapy inhibits the migration and invasion of a nasopharyngeal carcinoma KJ-1 cell line. *Journal of the Formosan Medical Association*. 113, 173-178.



#### 4. DISCUSSÃO GERAL

O objetivo deste trabalho foi investigar os efeitos da possível ação fotodinâmica da C-PC extraída da cianobactéria *Spirulina platensis* quando exposta à PAR na linhagem celular B16F10.

Primeiramente, a permeabilidade das células B16F10 à C-PC foi medida a partir de leituras de absorvância em células incubadas por até 24 horas a cada 4 horas. O objetivo deste teste era verificar qual o tempo de incubação necessário para a máxima concentração de C-PC no interior das células. Contudo, os valores de absorvância não mudaram depois de 24h de incubação, mantendo os mesmos valores das células que não tinham sido tratadas. Esse resultado nos permitiu concluir que a entrada de C-PC na célula não ocorre. Independentemente, os mecanismos fotoquímicos podem levar a peroxidação lipídica (Hadjur *et al.*, 1996; Girotti. 2001) que pode causar um dano de membrana levando a redistribuição do fotossensibilizante no interior da célula. (Rosenkranz *et al.*, 2000). Desta forma, os tratamentos foram realizados sem a entrada da C-PC.

Um ótimo fotossensibilizante deve seguir alguns requisitos como não causar toxicidade na ausência de luz (Nowis *et al.*, 2005; Filipe and Baldea, 2012; Kiesslich *et al.*, 2013). Os resultados de viabilidade celular mostram que os tratamentos com C-PC não foram significativamente tóxicos. Entretanto, C-PC não purificada na presença de PAR demonstrou inibição de proliferação em 72h após o tratamento. Esse resultado vem ao encontro com a capacidade da ação fotodinâmica da C-PC de inibir proliferação verificada em células de mama (MCF-7) *in vitro* quando expostas a laser (Li *et al.*, 2010); mieloma de rato depois de exposto a uma dose de 300J/cm<sup>2</sup> usando luz comparado com células que foram tratadas apenas com C-PC; células de leucemia humana (K562) (Liu *et al.*, 2000); células de carcinoma hepatocelular humano (HepG2) usando C-PC extraída de *Microcystis* (Wang *et al.*, 2012) e células de carcinoma cervical humano, HELa (Yang *et al.*, 2014). Porém, no presente estudo, a inibição da proliferação foi observada apenas na C-PC não purificada levando-nos a concluir que existe algum agente potencializando o efeito antiproliferativo da C-PC.

A produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) é conhecida pela promoção de uma cascata bioquímica e por ser o principal produto da AFD, podendo levar a morte celular (Zhang *et al.*, 1999; Agostinis *et al.*, 2011). É conhecido o papel do oxigênio singlete como o principal mediador do dano fotoquímico celular causado por fotossensibilizantes. Zhang e colaboradores (1999) demonstraram que o dano causado pela C-PC é promovido principalmente pelas reações de tipo II com formação de oxigênio singlete. Contudo, sua meia vida é muito curta (Moan and Berg, 1991), limitando sua difusão e detecção. Para elucidar o efeito das ERO na viabilidade celular, seus níveis foram estabelecidos medindo a fluorescência do DCF. Esse método não detecta oxigênio singlete, mas pode detectar outras ERO. Nesse trabalho, aumentos nos níveis de ERO foram identificados 24h depois do tratamento com C-PC purificada e PAR (CPC + PAR) em comparação com o grupo controle, enquanto C-PC não purificada não demonstrou diferenças significativas, mesmo na presença de luz. Logo, este aumento significativo nos permite concluir que a C-PC não purificada pode ter algum composto antioxidante responsável por manter os níveis basais de ERO. Enquanto o aumento dos níveis de ERO na C-PC purificada condiz com a sua fotoativação por PAR.

A produção de ERO na AFD tem diferentes alvos celulares, promovendo peroxidação lipídica (Hadjur *et al.*, 1996), dano na membrana celular e alteração da adesão de células tumorais—parâmetro importante na metástase (Foultier *et al.*, 1994; Uzdensky *et al.*, 2005; Jiang *et al.*, 2014). Além disso, migração celular é um processo essencial na progressão tumoral. Portanto, analisamos o efeito da C-PC purificada na presença de PAR na capacidade de migração das células B16F10. Esses resultados mostraram que 24h depois de tratadas com C-PC purificada e PAR, o número de células que migraram diminuiu cerca de 45% em relação ao controle. Este resultado está de acordo com aqueles observados em muitas pesquisas para diferentes fotossensibilizantes em diferentes linhagens celulares, que registraram o mesmo efeito de supressão na migração (Overhaus *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2012).

Resumindo, a linhagem B16F10 é sensível à fotoativação via C-PC. Embora C-PC não purificada em presença de PAR tenha demonstrado uma significativa inibição de proliferação, estes resultados não corroboram com os níveis de ERO, desde que esses níveis eram similares ao controle. Em

contrapartida, C-PC purificada na presença de PAR não foi capaz de inibir a proliferação celular, porém sua fotoativação aumentou os níveis de ERO em relação ao controle, possibilitando a investigação sobre como esses níveis poderiam influenciar na migração celular. Como esperado, a AFD da C-PC purificada inibe a migração celular em relação ao controle. Portanto, a AFD da C-PC parece causar dano às células B16F10 prejudicando sua migração, porém, mais estudos devem ser desenvolvidos para elucidar os mecanismos envolvidos nesse processo e sua consequente capacidade de inibir o desenvolvimento de metástases no melanoma.

## REFERÊNCIAS

- AGOSTINIS P.; BERG K.; CENGEL K. A.; FOSTER T. H.; GIROTTI A. W.; GOLLNICK S. O.; GOLAB J. Photodynamic therapy of cancer: an update. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2011, 4:250-281.
- ALISSON R.R.; SIBATA C.H. Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: A clinical review. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2010, 7: 61-75.
- ALMEIDA R. D.; MANADAS B. J.; CARVALHO A. P.; DUARTE C. B. Intracellular signaling mechanisms in photodynamic therapy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*. 2004, 1704:59-86.
- ALMUSLET N. A.; OSMAN A. E. Investigation of the effect of low power laser used in photodynamic therapy for treatment of psoriasis. *Photonics and Lasers in Medicine*. 2012, 1: 309-317.
- BADER M. J.; STEPP H.; BEYER W.; PONGRATZ T.; SROKA R.; KRIEGMAIR M.; ZAAK D.; WELSCHOF M.; TILKI D.; STIEF C.; WAIDELICH, R. Photodynamic therapy of bladder cancer—a phase I study using hexaminolevulinate (HAL). *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*. 2013, 31: 1178-1183.
- BALDEA I.; FILIP A.G. Photodynamic Therapy In Melanoma - An Update. *Journal Of Physiology And Pharmacology*. 2012, 63:109-118.
- BENDAS G; BORSIG L. Cancer cell adhesion and metastasis: selectins, integrins, and the inhibitory potential of heparins. *International journal of cell biology*. 2012, 2012: 1-10.
- BERMEJO P.; PIÑERO E.; VILLAR A. Iron-chelating ability and antioxidant properties of phycocyanin isolated from a protean extract of *Spirulina platensis*. *Food Chemistry*. 2008, 110:436–445.
- BOUSSIBA S.; RICHMOND A.E.. Isolation and characterization of phycocyanins from the blue alga *Spirulina platensis*. *Arch. Microbiol.*1979, 120:155–159.
- BRESSLER N.M.; BRESSLER S.B.; Photodynamic Therapy with Verteporfin (Visudyne): Impact on Ophthalmology and Visual Sciences. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2000, 41: 624-628.
- BUYTAERT E.; DEWAELE M.; AGOSTINIS P. Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*. 2007, 1776:86-107.
- CALIN, M.A.; PARASCA S.V. Photodynamic therapy in oncology. *J. Opt. And Adv, Mat.* 2006, 8:1173–1179.
- CAMERIN M.; MAGARAGGIA M.; SONCIN M.; JORI G.; MORENO M.; CHAMBRIER I.; RUSSELL D. A. The *in vivo* efficacy of phthalocyanine–nanoparticle conjugates for the photodynamic therapy of amelanotic melanoma. *European Journal of Cancer*. 2010, 46: 1910-1918.
- CAMPBELL W.G.; PEJNOVIC T.M. Treatment of amelanotic choroidal melanoma with photodynamic therapy. *Retina*. 2012, 32:1356-1362.
- CHAMMAS R.; BRENTANI R. Integrins and metastases: an overview. *Tumor biology*. 1996, 12: 309-320.

- CHATTERJEE D.K.; FONG S.L.; ZHANG Y. Nanoparticles in photodynamic therapy: Na emerging paradigm. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2008, 60:1627–1637.
- CHEN J. C.; LIU K. S.; YANG T. J.; HWANG J. H.; CHAN Y. C.; LEE I. T. *Spirulina* and C-phycoerythrin reduce cytotoxicity and inflammation-related genes expression of microglial cells. *Nutritional neuroscience*. 2012, 15: 252-256.
- CHIAVIELLO A.; POSTIGLIONE I.; PALUMBO G. Targets and mechanisms of photodynamic therapy in lung cancer cells: a brief overview. *Cancers*. 2011, 3:1014-1041.
- CIMPEAN A. M.; RIBATTI D.; RAICA M. The chick embryo chorioallantoic membrane as a model to study tumor metastasis. *Angiogenesis*. 2008, 11: 311-319.
- CUMMINS D. L.; CUMMINS J. M.; PANTLE H.; SILVERMAN M. A.; LEONARD A. L.; CHANMUGAM, A. Cutaneous malignant melanoma. In *Mayo clinic proceedings*. 2006, 81: 500-507.
- DARRAS-VERCAMBRE S.; CARPENTIER O.; VINCENT P.; BONNEVALLE A.; THOMAS, P. Photodynamic action of red light for treatment of erythrasma: preliminary results. *Photodermatology, photoimmunology & photomedicine*. 2006, 22: 153-156.
- DOLMANS D.; FUKUMURA D.; JAIN R. K. Photodynamic therapy for cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2003, 3: 380-387.
- DOUGHERTY T.J. An update on photodynamic therapy applications. *Journal of clinical laser medicine & surgery*. 2002, 20: 3-7.
- EICHNER A.; GONZALES F. P.; FELGENTRÄGER A.; REGENSBURGER J.; HOLZMANN T.; SCHNEIDER-BRACHERT W.; MAISCH, T. Dirty hands: photodynamic killing of human pathogens like EHEC, MRSA and Candida within seconds. *Photochemical & Photobiological Sciences*. 2013, 12: 135-147.
- ELJAMEL S. Photodynamic applications in brain tumors: a comprehensive review of the literature. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*. 2010, 7: 76-85.
- ETMINAN N.; PETERS C.; FICNAR J.; ANLASIK S.; BÜNEMANN E.; SLOTTY P. J.; HANGGI D.; STEIGER H.; SORG R.; STUMMER W. Modulation of migratory activity and invasiveness of human glioma spheroids following 5-aminolevulinic acid-based photodynamic treatment: Laboratory investigation. *Journal of neurosurgery*. 2011, 115: 281-288.
- FIGUEIRA F. S. Purificação de C-ficocianina e sua incorporação em nanofibras. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS, Brasil (2014).
- FLAHERTY, K. T. Targeting metastatic melanoma. *Annual review of medicine*. 2012, 63: 171-183.
- GABRIEL D.; BUSSO N.; VAN DEN BERGH A.H.; GURNY R.; LANGE N. Thrombin-sensitive photodynamic agents: A novel strategy for selective synovectomy in rheumatoid arthritis. *Journal of Controlled Release*. 2009, 138: 225–234.

- GILISSEN M.J.; VAN DE MERBEL L.E.W.; STAR W.M.; KOSTER J.F.; SLUITER W. Effect of photodynamic therapy on the endothelium-dependent relaxation of isolated rat aortas. *Cancer Res.* 1993, 53:2548-52.
- GUALTIERI P.; BARSANTI, L. *Algae: anatomy, biochemistry, and biotechnology.* Boca Raton: Taylor and Francis Group. CRC Press; 2006, 301 p. il.
- INCA, Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação de Prevenção e Vigilância *Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil.* 2014, 124p.
- JIANG Y.; LEUNG A. W.; WANG X.; ZHANG H.; XU C. Effect of photodynamic therapy with hypocrellin B on apoptosis, adhesion, and migration of cancer cells. *International journal of radiation biology.* 2014a, 90: 575-579.
- JIANG Y.; LEUNG A. W.; HUA H.; RAO X.; XU C. Photodynamic Action of LED-Activated Curcumin against Staphylococcus aureus Involving Intracellular ROS Increase and Membrane Damage. *International Journal of Photoenergy.* 2014b, 2014: 1- 7.
- KALIKI S.; SHIELDS C. L.; AL-DAHMAH S. A.; MASHAYEKHI A.; SHIELDS J. A. Photodynamic therapy for choroidal metastasis in 8 cases. *Ophthalmology.* 2012, 119: 1218-1222.
- KESSEL D. Subcellular targets for photodynamic therapy: implications for initiation of apoptosis and autophagy. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network.* 2012, 10: 56- 59.
- KIESSLICH T.; GOLLMER A.; MAISCH T.; BERNEBURG M.; PLAETZER K. A Comprehensive Tutorial on In Vitro Characterization of New Photosensitizers for Photodynamic Antitumor Therapy and Photodynamic Inactivation of Microorganisms. *BioMed research international.* 2013, 2013: 1-17.
- KIM C. H.; CHUNG C. W.; CHOI K. H.; YOO J. J.; KIM D. H.; JEONG Y. I.; KANG D. H. Effect of 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy via reactive oxygen species in human cholangiocarcinoma cells. *International journal of nanomedicine.* 2011, 6: 1357–1363.
- KOSTRON H. Photodynamic diagnosis and therapy and the brain. *Photodynamic Therapy.* 2010, 635: 261-280.
- KUDDUS M.; SINGH P.; THOMAS G.; AL-HAZIMI A. Recent Developments in Production and Biotechnological Applications of C-Phycocyanin. *BioMed research international,* 2013, 2013: 1-9.
- KUMAR M.; KULSHRESHTHA J.; SINGH G.P. Growth And Biopigment Accumulation Of Cyanobacterium *Spirulina platensis* At Different Light Intensities And Temperature. *Brazilian Journal of Microbiology.* 2011, 42: 1128-1135.
- LI B.; CHU X. M.; XU Y. J.; YANG F.; LV C. Y.; NIE S. M. CD59 Underlines the Antiatherosclerotic Effects of C-Phycocyanin on Mice. *BioMed research international.* 2013, 2013: 1-15.
- LI B.; CHU X.; GAO M.; LI W. Apoptotic mechanism of MCF-7 breast cells in vivo and in vitro induced by photodynamic therapy with C-phycocyanin. *Acta biochimica et biophysica Sinica.* 2010, 42: 80-89.
- LOPES T.M. *Ação fotodinâmica da c-ficocianina, pigmento extraído da Spirulina Platensis, nas linhagens tumorais humanas K562 (não MDR) e K562-Lucena*

- 1 (MDR). Tese de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS, Brasil (2006).
- MARTELLI G.; FOLLI C.; VISAI L.; DAGLIA M.; FERRARI D. Thermal stability improvement of blue colorant C-Phycocyanin from *Spirulina platensis* for food industry applications. *Process Biochemistry*. 2014, 49: 154-159.
- MENSUDAR R. Photodynamic Therapy-A Review. *World Journal of Medical Sciences*. 2014, 10:139-142.
- MIRANDA A. F.; SANTOS G. M.; DE OLIVEIRA S. C.; MONTEIRO J. S.; SAMPAIO F. J.; JÚNIOR R. A. G.; VANNIER-SANTOS M. A. Phenothiazinium dyes in association with diode red laser against B16F10 melanoma cells: in vitro study. *SPIE BiOS*. 2014, 8932: 1-12.
- MOAN J.; PENG Q. An outline of the history of PDT. In: *PATRIC T.* Editor: Comprehensives series in photochemistry & photobiology. Cambridge: Springer; 2003, p. 3-17.
- MORAES C.C.; BURKET J.F.M; KALIL S.J. C-Phycocyanin Extraction Process For Large-Scale Use. *Journal of Food Biochemistry*. 2010, 34: 133–148.
- MORAES C.C.; SALA L.; CERVEIRA G.P.; KALIL S.J. C-Phycocyanin Extraction From *Spirulina Platensis* Wet Biomass. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. 2011, 28: 45-49.
- MROZ P.; YAROSLAVSKY A.; KHARKWAL G. B.; HAMBLIN, M. R. Cell death pathways in photodynamic therapy of cancer. *Cancers*. 2011, 3: 2516-2539.
- NAGARAJ S.; ARULMURUGAN P.; RAJARAM M. G.; KARUPPASAMY K.; JAYAPPRIYAN K. R.; SUNDARARAJ R.; RENGASAMY R. Hepatoprotective and antioxidative effects of C-phycocyanin from *Arthrospira maxima* SAG 25780 in CCl<sub>4</sub>-induced hepatic damage rats. *Biomedicine & Preventive Nutrition*. 2012, 2: 81-85.
- NIEDRE M.; PATTERSON M.S.; WILSON B.B.; Direct Near-Infrared Luminescence Detection of Singlet Oxygen Generated by Photodynamic Therapy in Cells In Vitro and Tissues in Vivo. *Photoc. Photob.* 2002, 4: 382-391.
- NISHANTH R. P.; RAMAKRISHNA B. S.; JYOTSNA R. G.; ROY K. R.; REDDY G. V.; REDDY P. K.; REDDANNA P. C-Phycocyanin inhibits MDR1 through reactive oxygen species and cyclooxygenase-2 mediated pathways in human hepatocellular carcinoma cell line. *European journal of pharmacology*. 2010, 649: 74-83.
- NISHIGORI C.; HATTORI Y.; TOYOKUNI S. Role of reactive oxygen species in skin carcinogenesis. *Antioxidants and Redox Signaling*. 2004, 6:561-570.
- NOWIS D.; STOKTOSA T.; LEGAT M.; ISSAT T.; JAKÓBIZIAK M.; GOTAB J. The influence of photodynamic therapy on the immune response. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2005, 2:283-298.
- OLEINICK N.L.; MORRIS R.L.; BELICHENKO I. The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2002, 1:1–21.
- PADULA M.; BOITEUX S. Photodynamic DNA damage induced by phycocyanin and its repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 1999, 32:1063-1071.

- PATEL S.J.; SAIMAN L. Antibiotic Resistance in Neonatal Intensive Care Unit Pathogens: Mechanisms, Clinical Impact, and Prevention Including Antibiotic. *Clin Perinatol.* 2010, 37:547–563.
- PAZOS M. D. C.; NADER H. B. Effect of photodynamic therapy on the extracellular matrix and associated components. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* 2007, 40:1025-1035.
- PINTON C.P.; ROSSI M.T.; SALA R.; VENTURINI M. Photodynamic Antifungal Chemotherapy. *Photochemistry and Photobiology.* 2012, 88:512–522.
- POP S.F.; ION R.M.; NEAGU M.; CONSTANTIN C. Sensitizer Localization and Immune Response in Photodynamic Therapy of B16 Cells. *Laser Physics.* 2011, 21: 576–581.
- PROZYME (2014). C-Phycocyanin (Descrição). Produtos. [homepage on the Internet]. USA, Disponível em: <http://www.prozyme.com>.
- ROCKSON S.G.; KRAMER P.; RAZAVI M.; SZUBA A.; FILARDO S.; FITZGERALD P.; COOKE J.P.; YOUSUF S.; DEVAULT A.R.; RENSCHLER M.F.; ADELMAN D.C. Photoangioplasty for Human Peripheral Atherosclerosis Results of a Phase I Trial of Photodynamic Therapy With Motexafin Lutetium (Antrin). *Circulation.* 2000, 102: 2322-2324.
- RONSEIN G.; MIYAMOTO S.; BECHARA E.; DI MASCIO P. Oxidação de proteínas por oxigênio singlete: mecanismos de dano, estratégias para detecção e implicações biológicas. *Quím. Nova [online].* 2006, 29, 563-568.
- ROSENKRANZ A. A.; JANS D. A.; SOBOLEV A. S. Targeted intracellular delivery of photosensitizers to enhance photodynamic efficiency. *Immunology and cell biology.* 2000, 78: 452-464.
- ROUSSET N.; VONARX V.; ELÉOUET S.; CARRÉ J.; KERNINON E.; LAJAT Y.; PATRICE T. Effects of photodynamic therapy on adhesion molecules and metastasis. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology.* 1999, 52: 65-73.
- SACZKO J.; KULBACKA J.; CHWIŁKOWSKA A.; DRĄG-ZALESIŃSKA M.; WYSOCKA T.; ŁUGOWSKI M. The influence of photodynamic therapy on apoptosis in human melanoma cell line. *Folia Histochemica et Cytobiologica.* 2011, 43: 129-128.
- SANABRIA M.L.; RODRÍGUEZ M. E.; COGNO I. S.; RUMIE VITTAR N. B.; PANSA M. F.; LAMBERTI, M. J.; RIVAROLA V. A. Direct and indirect photodynamic therapy effects on the cellular and molecular components of the tumor microenvironment. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer.* 2013, 1835: 36-45.
- SARADA R.; PILLAI M. G.; RAVISHANKAR, G. A. Phycocyanin from *Spirulina* sp: influence of processing of biomass on phycocyanin yield, analysis of efficacy of extraction methods and stability studies on phycocyanin. *Proc. Bioc.* 1999, 34:795–801.
- SILVA J C.; FERREIRA-STRIXINO J.; FONTANA L. C.; PAULA L. M.; RANIERO L.; MARTIN A. A.; CANEVARI R. A. Apoptosis-associated genes related to photodynamic therapy in breast carcinomas. *Lasers in medical science.* 2014, 29: 1429-1436.



- SINGH, R. K.; TIWARI S. P.; RAI A. K.; MOHAPATRA T. M. Cyanobacteria: an emerging source for drug discovery. *The Journal of antibiotics*. 2011, 64: 401-412.
- TAN Y.; XU C.S.; XIA X.S.; YU H.P.; BAI D.Q.; HE Y.; LEUNG A.W.N. Photodynamic action of LED-activated pyropheophorbide-amethyl ester in cisplatinresistant human ovarian carcinoma cells. *Laser Phys. Lett.* 2009, 4: 321-327.
- TANAKA T.; MATONO S.; NAGANO T.; MURATA K.; SUEYOSHI S.; YAMANA H.; SHIROUZU K.; FUJITA H. Photodynamic therapy for large superficial squamous cell carcinoma of the esophagus. *Gastrointestinal endoscopy*. 2011, 73: 1-6.
- VENTURINI M.; ZANCA A.; CALZAVARA-PINTON, P. In Vivo Non-Invasive Evaluation of Actinic Keratoses Response to Methyl-Aminolevulinate-Photodynamic Therapy (MAL-PDT) by Reflectance Confocal Microscopy. *Cosmetics*. 2014, 1: 37-43.
- VONARX V.; FOULTIER M. T.; DE BRITO L. X.; ANASAGASTI L.; MORLET L.; PATRICE T. Photodynamic therapy decreases cancer colonic cell adhesiveness and metastatic potential. *Research in experimental medicine*. 1995, 195:101-116.
- VONSHAK, A. Use of *Spirulina* biomass. In: *Vonshak A (eds) Spirulina platensis (Arthrospira): physiology, cell-biology and biotechnology*. Editor: Taylor and Francis. USA: 1997, p. 205-212.
- WALTER A.; CARVALHO J.C.; SOCCOL V.T.; BISINELLA A.B. Study of Phycocyanin Production from *Spirulina platensis* Under Different Light Spectra. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 2011, 54:675-682.
- WONG T.W.; WANG Y.Y.; SHEU H.M.; CHUANG Y.C. Bactericidal Effects of Toluidine Blue-Mediated Photodynamic Action on *Vibrio vulnificus*. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*. 2005, 49:895–902.
- YANG T. H.; CHEN C. T.; WANG C. P.; LOU, P. J. Photodynamic therapy suppresses the migration and invasion of head and neck cancer cells in vitro. *Oral oncology*. 2007, 43: 358-365.
- YANG F.; LI B.; CHU X. M.; LV C. Y.; XU Y. J.; YANG P. Molecular mechanism of inhibitory effects of C-phycocyanin combined with all-trans-retinoic acid on the growth of HeLa cells in vitro. *Tumor Biology*. 2014, 2014: 1-10.
- YUSUPOV A.S.; GONCHAROV S.E.; ZALEVSKII I.D.; PARAMOV V.M.; KURKOV A.S. Raman Fiber Laser for the Drug-Free Photodynamic Therapy. *Laser Physic*. 2010, 20: 357–359.
- ZHANG S. P.; XIE J.; ZHANG J. P.; ZHAO J. Q.; JIANG L. J. Electron spin resonance studies on photosensitized formation of hydroxyl radical by C-phycocyanin from *Spirulina platensis*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 1999, 1426:205-211.
- ZHENG J.; INOGUCHI T.; SASAKI S.; MAEDA Y.; MCCARTY M. F.; FUJII M.; TAKAYANAGI R. Phycocyanin and phycocyanobilin from *Spirulina platensis* protect against diabetic nephropathy by inhibiting oxidative stress. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2013, 304: 110-120.