



Universidade Federal do Rio Grande - FURG

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas:

Fisiologia Animal Comparada

Mecanismos de toxicidade do azul de metileno em hepatócitos de *Danio rerio*

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. Juliana Zomer Sandrini, do Instituto de Ciências Biológicas.

Tecnóloga em Toxicologia Ambiental Simone Rutz da Costa

Orientadora: Profa. Dra. Juliana Zomer Sandrini

Rio Grande-RS

2014

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Juliana Sandrini, é sempre um enorme prazer trabalhar contigo ao longo desses ± 5 anos. És uma pessoa que eu admiro muito, tenho muito respeito e um carinho especial, com quem eu consigo conversar abertamente e tenho total confiança. Não tenho palavras para agradecer toda ajuda, conhecimento científico, profissional e moral transmitido, toda paciência e compreensão que demonstrasse comigo e também tenho de me desculpar por todo trabalho que eu dei. Encontrei em ti uma profissional exemplar, uma orientadora dedicada, e acima de tudo uma amiga! Tenho como sempre muito orgulho de ser orientada por ti.

Ao Mauricio, que me “salva” toda hora! Agradeço a grande amizade, e fico muito feliz de poder contar contigo. Tua criatividade e alegria me ajudaram muito a não desanimar nestas etapas finais. Foi um grande prazer trabalhar contigo, e apesar de várias coisas darem errado, nossa parceria deu muito certo.

Ao Flávio, obrigada por me aturar te parando nos corredores e te ligando no meio do cometa. Não tem como não sentir-se bem com a alegria que tu sempre transmite, tudo fica mais fácil e divertido. Agradeço muito as sugestões e as palavras motivadoras.

Ao Marcelinho, que apesar de muitas coisas darem errado com os anticorpos, sempre teve calma e foi positivo, isso foi de grande ajuda. No fim do dia sempre ouvi aquele “fica tranquila, não desanima...vamos conseguir”. Eu aprendi muito, obrigada!

Ao Nino, nem sei quantas vezes te incomodei, e tu sempre me escutava e ajudava, sempre sabes quando não estamos muito bem e tem uma palavra amiga pra dizer. Também foste fundamental na minha formação e nesse trabalho.

À Ana que não só a mim, mas a todos, ajuda sempre. Está sempre disposta a “olhar as minhas células”, e com muita tranquilidade resolvia meus problemas. Vou lembrar sempre dessa dedicação e carinho.

À Daza, que além de inspiração pra mim é uma profissional admirável. Obrigado pela oportunidade de fazer estágio contigo. É uma honra ter professores assim.

Ao Robert e a Marta, que posso contar sempre que preciso, pois já aconteceu várias vezes. Marta obrigada inclusive pelos elogios que recebi de ti, foram muito importantes pra mim.

Aos demais professores, que não poderei citar todos, mas que formam uma equipe brilhante de profissionais no ICB, e estão sempre dispostos a ajudar.

Ao grupo embriotox, que são amigos pra todas as horas (científicas e não científicas), fico muito feliz de fazer parte deste grupo, que embora não muito grande é muito unido.

Ao grupo da cultura de células, que me acolheram e eu me sinto parte desta família também, é muito bom ter amigos e profissionais assim, sempre dispostos a ajudar. Obrigado por me aguentarem no escuro durante a realização dos meus experimentos. E como eu sempre digo, o Lab. de cultura celular, é o melhor lugar para trabalhar.

Ao pessoal da Salinha 2, que é a melhor salinha do ICB. Sempre com muito mate, pessoas queridas, e conversas boas, que nos dá ânimo para enfrentar o dia.

À minha turma da Toxicologia, e principalmente aos que me acompanham no mestrado, Fernanda, Priscila, Geny, Marcelo, Roberta. São amigos que levo pra vida toda, é muito bom ter vocês por perto. Também ao Robson, que se tornou um grande amigo e me ajudou muito nessas etapas finais. Obrigada!

Aos Técnicos, principalmente ao Márcio, a Loraine e o Josencler, por toda disponibilidade em ajudar e por manter os laboratórios limpos, facilitando o trabalho de todos.

À Maria, que juntamente com outros funcionários compõem uma equipe fundamental pra realização de todos nossos trabalhos.

Aos meus pais, Wilson e Nailê, devo o que sou a eles, sempre com muita garra fizeram todo possível para que tivéssemos toda oportunidade que eles não tiveram de estudar. Sempre foram muito exigentes com trabalho e estudo, mas ao mesmo tempo nos ajudaram em tudo que fosse necessário. São exemplos de vida que busco sempre seguir. Admiro e amo muito vocês!

À minha irmã e meu cunhado, Vanessa e Guilherme, e minha sobrinha que está quase chegando, Marina, e já amamos muito. Fazem parte da minha vida e são muito importantes, desculpem por todo estresse dessa reta final.

À todos meus familiares, meus avós, tios e primos, de Rio Grande e de Santa Catarina, amo fazer parte dessa família que é muito unida. Agradeço todo apoio e carinho, e me desculpem por não estar tão presente nessa reta final.

Ao meu noivo Filipi, que me ajuda em tudo, obrigada pela confiança e paciência, eu sei que não foi fácil e que os momentos de estresse esse ano não foram poucos. Eu me sinto privilegiada de ter uma pessoa tão bondosa ao meu lado. Te amo!

À Banca, por aceitar participar e me privilegiar com suas sugestões. Obrigada desde já por colaborarem com esse trabalho!

Sumário

LISTA DE ABREVIACÕES	5
RESUMO GERAL	7
1. INTRODUÇÃO GERAL	8
2. OBJETIVOS	19
2.1. OBJETIVO GERAL	19
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
3. ARTIGO	20
1. INTRODUCTION.....	23
2. MATERIALS AND METHODS	25
3. RESULTS	29
4. DISCUSSION	37
REFERENCES.....	42
5. DISCUSSÃO GERAL	48
REFERÊNCIAS	52

LISTA DE ABREVIÇÕES

Apaf-1	Fator de ativação de apoptose 1
Bad	“Bcl-2 associated death promote”
Bak	“Bcl-2 antagonist/killer”
Bax	“Bcl-2 associated X protein”
Bcl-xl	“B-cell lymphoma-extra large”
Bcl-w	“Bcl-2 like protein 2”
Bcl-2	“B-cell lymphoma protein 2”
Bid	“BH3 Interacting Domain Death Agonist”
Bik	“Bcl-2 interacting killer”
Bim	“B-cell lymphoma 2 interacting mediator of cell death”
Bmf	“Bcl-2 modifying factor”
Bok/ Mtd	“Bcl-2 related ovarian killer”
CDKs	“Cyclin-dependent kinase”
CE ₅₀	Concentração efetiva mediana
DCFH	2,7-Diclorodihidrofluoresceína
ERO	Espécies reativas de oxigênio
ERON	Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio
Gadd45	“Growth Arrest and DNA Damage-inducible 45”
Hrk	“Activator of apoptosis hara-kiri”

H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
Mcl-1	“Myeloid cell leukemia-1”
Mdm2	“Mouse double minute 2 homolog”
MDR	Resistência a múltiplas drogas
Noxa/ Pmaip1	“Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1”
OGG1	8-oxoguanina glicosilase
Puma	“p53 upregulated modulator of apoptosis”
p21/cdkn1	“Cyclin-dependent kinase inhibitor 1”
p53	“Tumor protein p53”
SMAC/Diablo	“Second mitochondria-derived activator of caspase”
UVB	Radiação ultravioleta B
XIAP	“X-linked inhibitor of apoptosis protein”
·OH	Radical hidroxila
¹ O ₂	Oxigênio singleto
8-oxoG	7,8-dihidro-8-oxoguanina

RESUMO GERAL

Devido à grande importância do azul de metileno, principalmente como agente fotossensibilizador, estudos a fim de entender mais sobre seus mecanismos de ação e alvos celulares têm sido propostos. O presente trabalho analisou e comparou os mecanismos de toxicidade do azul de metileno em hepatócitos do peixe *Danio rerio* (linhagem celular ZFL), tanto na ausência quanto na presença de luz visível. Para isso, as células foram expostas a concentrações equitóxicas de azul de metileno correspondentes a concentração efetiva mediana em 24 h (CE₅₀) para cada tratamento (38 µg/L- azul de metileno e 5,6 µg/L- azul de metileno na presença de luz visível). Foi observado um aumento significativo nos níveis de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio após 3 h do tratamento nas células que receberam apenas azul de metileno, sendo que no tratamento com azul de metileno e luz visível este aumento só foi observado após 12 h. Todos os tratamentos com azul de metileno (sozinho ou na presença de luz visível) acarretaram em aumento nos danos ao DNA após 3 e 6h, sendo que o tratamento com azul de metileno na ausência de luz promoveu a geração de danos do tipo 8-oxoG. Morte celular por necrose ocorreu em todos os tempos analisados nos dois tratamentos, já a morte por apoptose foi observada apenas a partir de 6 h após o tratamento com azul de metileno na presença de luz visível e a partir de 12 h após o tratamento com azul de metileno sozinho. O nível de expressão de genes relacionados à parada do ciclo celular e apoptose (*cdkn1*, *bax*, *nox*, *bcl-2* e *bcl-xl*) foi alterado após o tratamento com azul de metileno na presença de luz visível, enquanto que no tratamento com azul de metileno sozinho, apenas o gene *bcl-2* apresentou diferenças significativas em sua expressão em relação ao controle. Assim, a linhagem ZFL é sensível à ação fotodinâmica do azul de metileno, e o azul de metileno na presença ou não de luz visível é capaz de gerar danos no DNA e induzir a apoptose nesta linhagem. No entanto, as vias que conduzem à apoptose na linhagem ZFL parecem ser distintas em função do tratamento.

Palavras-chave: azul de metileno, ação fotodinâmica, apoptose, dano de DNA, hepatócito, *Danio rerio*.

1. INTRODUÇÃO GERAL

O azul de metileno é um composto catiônico da classe das fenotiazinas, solúvel em água, com fórmula molecular $C_{16}H_{18}N_3S$ e massa molecular de 319,85 (Figura 1).

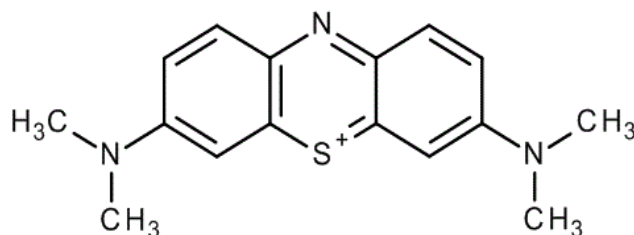


Figura 1 - Estrutura molecular do Azul de Metileno (Adaptado de Perussi, 2007).

A síntese do azul de metileno ocorreu em 1876, no período de expansão industrial de tinturas para tecidos na Europa. Desde então, o azul de metileno é comumente aplicado na produção de papel e outros materiais como poliésteres e nylons. Além disso, o azul de metileno vem sendo muito utilizado na biologia, como corante para diferentes procedimentos de coloração, na química analítica como um indicador redox, e na área da saúde como marcador de campo cirúrgico (Wainwright, 2005). Recentemente, trabalhos usando o peixe *Danio rerio* (com mutações neuronais) como modelo, destacaram o azul de metileno como uma molécula com ação neuronal benéfica, prevenindo a formação de agregados de proteínas específicas, e apontaram para a importância de se entender e pesquisar sobre o mecanismo de ação e alvos do azul de metileno (Bebber et al., 2010; Vaccaro et al., 2012).

Sabe-se também que o azul de metileno é amplamente utilizado como agente fotossensibilizador, através da ação fotodinâmica, principalmente devido ao seu comprimento de onda de absorção máxima igual a 660 nm (luz visível), e boa penetração no tecido alvo (Perussi, 2007). Por suas propriedades de agente redutor, o azul de metileno é empregado como um medicamento para o tratamento de

metahemoglobinemia, psoríase e câncer de bexiga. Além disso, é usado na inativação vírus, bactérias e fungos, e na descontaminação de plasma sanguíneo (Wagner, 2002; Schirmer et al., 2011). Compostos catiônicos tem uma capacidade limitada de permear membranas celulares, no entanto o azul de metileno é um composto hidrofóbico com maior afinidade química para os ácidos nucleicos, o que explica sua aplicação contra vírus (Moreira et al., 2012). Atualmente também vem sendo utilizado na aquicultura como biocida contra algas, cianobactérias e outros organismos específicos (Robertson et al., 2009). E, em decorrência dessa grande variedade de usos, corantes como o azul de metileno são descartados muitas vezes junto com os efluentes nos corpos aquáticos, por perdas nos processos, o que vem sendo considerado um problema ambiental (Guarantini & Zaoni, 2000).

O azul de metileno também tem sido tema de estudos que visam promover ação letal sobre células tumorais. Trindade e colaboradores (2000) estudaram a ação fotodinâmica do azul de metileno em cinco linhagens tumorais e não tumorais que expressavam ou não o fenótipo de resistência a múltiplas drogas (MDR). No trabalho, os autores mostraram que o azul de metileno foi capaz de reverter o fenótipo MDR e que as linhagens estudadas foram sensíveis a sua ação fotodinâmica.

A ação fotodinâmica pode ser caracterizada pela fotooxidação de substratos biológicos através da geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) produzidas pela associação entre a presença de um determinado comprimento de onda, uma substância fotossensível (F), como por exemplo, o azul de metileno, e o oxigênio molecular (O_2). A ação fotodinâmica inicia-se quando a molécula do fotossensibilizador (F_0) absorve a luz e sai do seu estado fundamental migrando para um estado mais energético, o estado excitado singleto (F_1) (Figura 2). Devido à grande instabilidade deste nível de energia, a molécula tem um tempo de vida muito curto e tende a voltar para um nível de energia mais baixo ou mesmo retornando ao seu estado de repouso (Perussi, 2007). Nesta transição, o agente fotossensibilizador pode passar a um nível de energia intermediário, conhecido como estado tripleto (F_2), que está entre o estado fundamental e o estado singleto (Machado, 2000; Yano et al., 2011). Na ausência de moléculas para interagir, o estado excitado tripleto pode perder energia pela emissão de energia luminosa. Mas se estiver próximo de moléculas reativas (como oxigênio molecular ou substratos ricos em oxigênio), o estado tripleto, devido ao tempo de vida relativamente longo, pode

participar de reações fotodinâmicas com produção de um ou mais tipos de ERO. Tais reações são conhecidas como Fotoprocesso Tipo I e Fotoprocesso Tipo II. Este estado excitado tripleto pode excitar outros componentes do meio, que interagem com a molécula de oxigênio gerando rapidamente espécies reativas, como peróxidos, radicais hidroxila e ânion superóxido (fotoprocesso Tipo I) ou excitar diretamente o oxigênio formando oxigênio singleto (fotoprocesso Tipo II) (Konan et al., 2002; Yano et al., 2011).

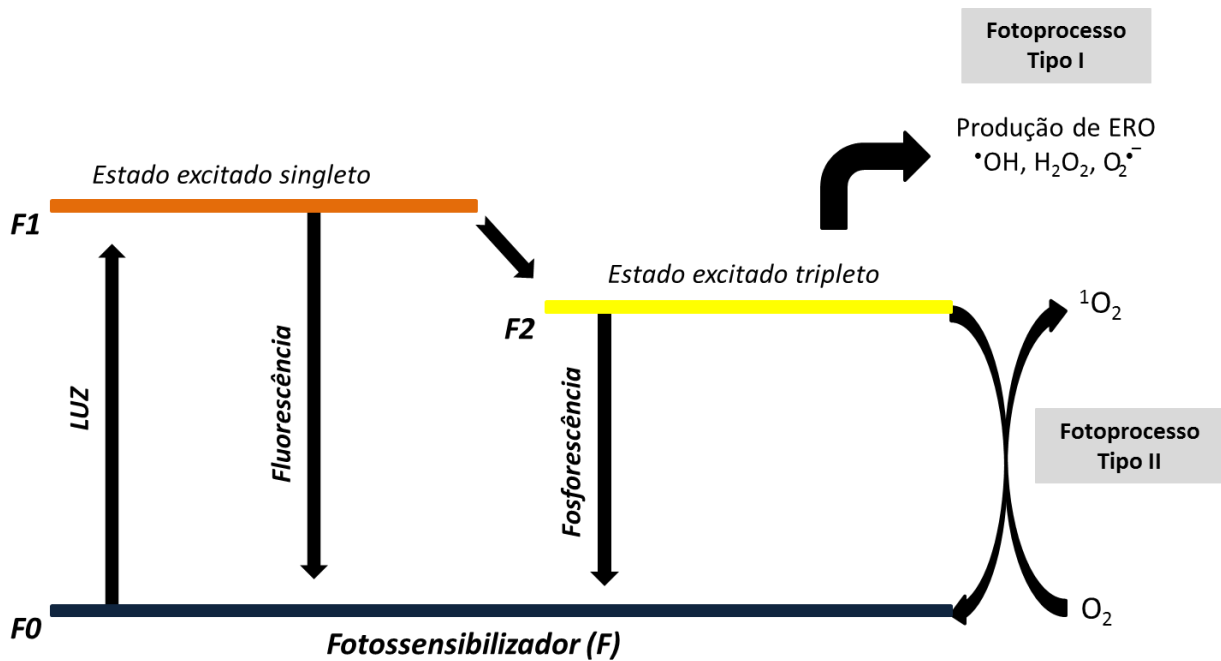


Figura 2- Mecanismo da ação fotodinâmica na geração de espécies reativas de oxigênio (Adaptado de Yano et al., 2011).

Esses dois fotoprocessos podem ocorrer simultaneamente e tanto nas reações Tipo I como Tipo II, a molécula do fotossensibilizador retorna a seu estado

fundamental, e pode produzir continuamente altos níveis de ERO, enquanto estiver exposto à luz (Gorman et al., 2006). Existe uma ampla variedade de fontes de luz que podem ser utilizadas neste processo, por exemplo, LEDs, lâmpadas incandescentes e fluorescentes. Usualmente tem-se utilizado lâmpadas incandescentes convencionais, que tem baixo custo, requerem tecnologia simples e medidas de proteção mínimas (Brancaleon & Moseley, 2002). Por já ser utilizado clinicamente, sem efeitos colaterais significativos, apresentar um bom rendimento quântico de formação de oxigênio singleto, com um baixo potencial de redução, o uso do azul de metileno vem sendo considerado muito promissor na Terapia Fotodinâmica, inviabilizando de modo específico células alvo por meio destes fotoprocessos mencionados anteriormente (Moreira et al., 2012).

Na ausência de luz, o azul de metileno é considerado com uma baixa toxicidade (Blass & Fung, 1976). Entretanto, em condições fisiológicas, o azul de metileno é reduzido pelo NAD(P)H em um composto incolor chamado Leuco-azul de metileno, o qual pode ser espontaneamente reoxidado pelo oxigênio molecular (O_2) ou por ferro e nesse ciclo de redução/oxidação (ciclo redox) é produzido peróxido de hidrogênio (Figura 3) (Schirmer et al., 2011).

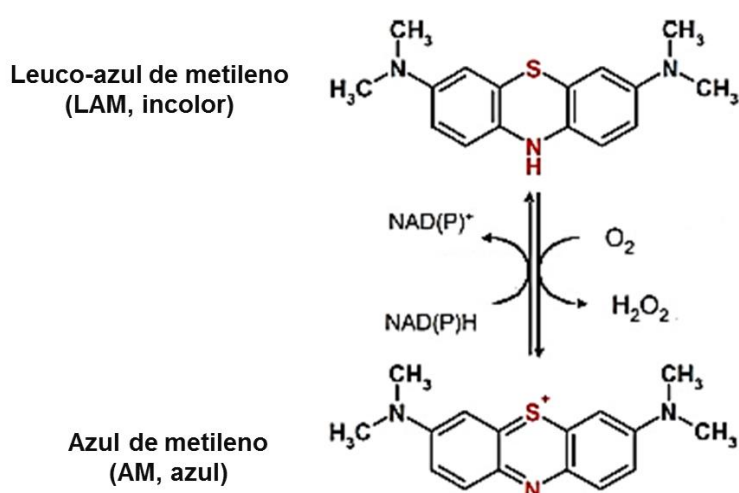


Figura 3- Reações de redução/oxidação do azul de metileno (AM). AM pode ser espontaneamente reduzido por NAD(P)H resultando em Leuco-azul de metileno (LAM) um composto incolor, e ser reoxidado por oxigênio molecular (O_2), produzindo peróxido de hidrogênio (H_2O_2) neste ciclo (Adaptado de Schirmer et al., 2011).

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é um dos oxidantes mais versáteis que existe, e pode reagir com metais como ferro e cobre, levando a produção de radical hidroxila ($\cdot OH$). Além disso, o peróxido de hidrogênio tem meia vida longa e grande capacidade de se difundir através das membranas biológicas (com difusão semelhante à da água), ampliando o efeito tóxico (Júnior et al., 2005). Neste sentido, já foi demonstrado que a exposição de células endoteliais humanas em cultura a concentrações próximas a 5 mM de azul de metileno, na ausência de luz, foi capaz de induzir uma situação de estresse oxidativo intracelular (May et al., 2003). Apesar destes fatos, o efeito do azul de metileno em relação à geração de estresse oxidativo, ainda é controverso. Em contrapartida ao exposto acima, a exposição *in vivo* ao azul de metileno teve um efeito protetor em rim de ratos tratados com ciclosporina A, diminuindo, por exemplo, os níveis de ânion superóxido. Porém o mecanismo pelo qual o azul de metileno exerce sua ação protetora ainda não é bem claro (Rezzani et al., 2001).

Independente do mecanismo envolvido (ação fotodinâmica ou ciclos de oxidação/redução), a exposição ao azul de metileno é capaz de gerar diferentes espécies reativas. Estas espécies reativas formadas nestes processos podem ser radiculares ou não. Os radiculares apresentam grande reatividade, com tendência a ligar o elétron não-pareado com outros elétrons presentes em moléculas próximas, sendo assim, comportam-se como receptores ou doadores de elétrons. As espécies não radiculares, não tem um elétron desemparelhado, mas são reativas em decorrência de sua instabilidade. Estas moléculas citadas apresentam a tendência para reagir com biomoléculas importantes, como proteínas, lipídios e DNA (Sies, 1991; Di Giulio et al., 1995). É importante salientar que as chamadas espécies reativas de oxigênio são formadas não só após exposição a alguns agentes tóxicos, mas também durante o metabolismo aeróbico dos organismos como, por exemplo, durante o processo de fosforilação oxidativa na mitocôndria. Atualmente sabe-se que as ERO podem servir como segundo mensageiro em alguns processos específicos de sinalização celular, ou seja, a geração de ERO, dependendo dos níveis tem um papel vital para célula (Thannickal & Fanburg, 2000). Mesmo assim, devido aos efeitos danosos das ERO, os organismos adquiriram ao longo do processo evolutivo um complexo sistema de defesas antioxidantes que podem atuar na prevenção da formação de ERO, na interceptação das mesmas, e ainda no reparo de componentes celulares danificados (Sies, 1991). Entretanto, em algumas situações pode ocorrer o desequilíbrio entre as defesas

antioxidantes e os oxidantes, como as ERO, a favor destes últimos, levando a uma desregulação do controle e sinalização redox e/ou a dano molecular, caracterizando o estresse oxidativo (Sies & Jones, 2007). O estresse oxidativo pode gerar uma série de danos, tais como peroxidação lipídica, oxidação de proteínas e de bases nitrogenadas do DNA (Halliwell & Whiteman, 2004; Halliwell & Gutteridge, 2006). Todos esses eventos podem fazer com que tais moléculas acabem perdendo sua função, o que, por sua vez, afeta o metabolismo celular ocasionando até mesmo a morte da célula (Berra et al., 2006).

Entre as ERO mencionadas anteriormente está o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), uma das formas mais reativas do O_2 . Diversos autores atribuem como principal alvo desta espécie reativa as proteínas que estão em grande abundância dentro da célula, além disso o oxigênio singlete também é capaz de oxidar diretamente o DNA (Ronsein et al., 2006; Agnez-Lima et al., 2012). Entre os danos causados ao DNA por ERO, como o oxigênio singlete, estão quebras e modificações nas bases púricas e pirimídicas do DNA e também nos açúcares desoxirribose, sendo um exemplo muito comum, a oxidação do átomo C_8 da base guanina, formando 7,8-dihidro-8-oxoguanina (8-oxoG) (Begley & Samson, 2004).

A guanina tem um baixo potencial redox o que a torna muito vulnerável (David et al., 2007), sendo que estudos estimam que sejam produzidas entre 100 e 500 8-oxoG por dia em cada célula (Collins & Gaivão, 2007). A 8-oxoG é o produto de dano oxidativo às bases nitrogenadas melhor caracterizado, sendo fortemente mutagênico visto que pode formar não só os pares clássicos com a citosina mas também pode parear com adenina. Ao parear incorretamente com a adenina, a 8-oxoG dá origem a uma transversão GC:TA, uma mutação frequente em células cancerosas (Bruner et al., 2000). Este dano (8-oxoG) pode ser removido do DNA pela enzima glicosilase OGG1 (8-oxoguanina DNA glicosilase 1), que tem homólogos descritos em vários modelos animais. A enzima OGG1 pode quebrar as ligações entre a base oxidada e o açúcar, auxiliando na remoção do dano. Porém, mesmo havendo mecanismos de proteção e reparo, existe sempre uma quantidade de oxidantes que escapam, causando danos ao DNA (Fortini et al., 2003; Barzilai & Yamamoto, 2004).

Com relação aos danos de DNA induzidos pelo azul de metileno, Lee e Kim (2002) observaram através de ensaio cometa que embriões do camarão *Palaeomonetes*

pugio expostos ao azul de metileno na presença de luz tiveram um aumento significativo nos danos ao DNA quando comparados aos embriões que foram expostos ao azul de metileno na ausência de luz. Além deste possível efeito das espécies reativas formadas pela ação fotodinâmica do azul de metileno sobre o DNA, Wainwright (2000, 2002) descreveu detalhadamente que o azul de metileno pode intercalar na estrutura do DNA devido à sua carga positiva e a geometria planar, especialmente em regiões ricas em guanina-citosina, e por consequência também gerar danos diretos a essa molécula (Figura 4).

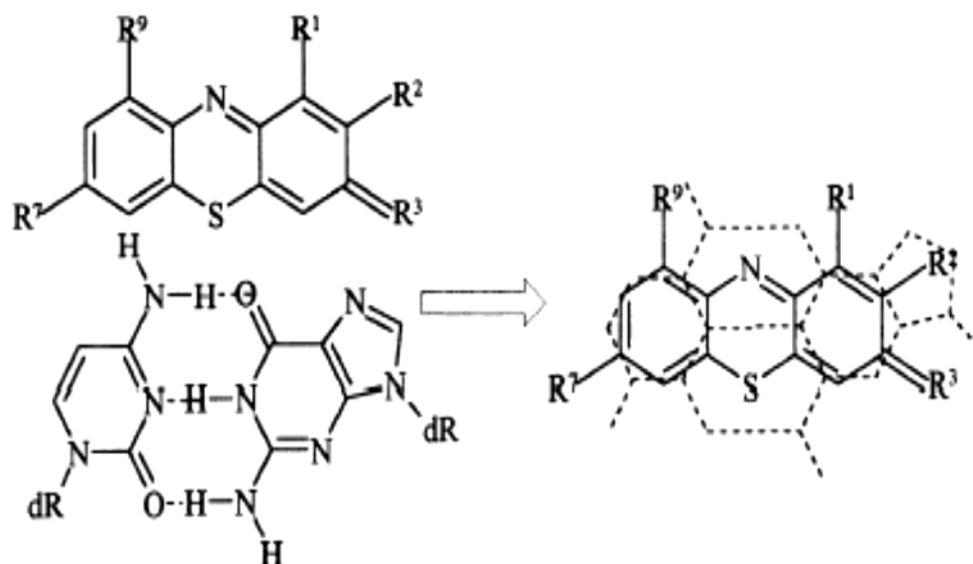


Figura 4- Sobreposição de um cromóforo fenotiazino, como o azul de metileno, em um par guanina-citosina (G-C, representado pela linha pontilhada no esquema à direita) (Wainwright, 2000).

Apesar dos diversos danos gerados ao DNA, diferentes mecanismos para corrigi-los ou repara-los surgiram ao longo do tempo, sendo que estes mecanismos são fundamentais na proteção das células assegurando a transmissão das informações genéticas com uma taxa de erro baixa. Esse sistema, conhecido como sistema de

resposta ao dano de DNA, atua principalmente em três níveis: 1) parando o ciclo celular para permitir tempo para o reparo do DNA, 2) ativando proteínas de reparo, e 3) excisando ou tolerando danos no DNA por meio de atividades constitutivas e induzidas. Mas caso o dano no DNA seja muito extenso e não possa ser reparado, a célula pode entrar em morte celular programada (Begley & Samson, 2004; Barzilai & Yamamoto, 2004).

Desde 1972, é usado o termo apoptose para indicar um tipo de morte celular que ocorre de forma não acidental, e sim programada (Kerr, 1972). A apoptose é essencial para a sobrevivência dos organismos multicelulares, visto que ocorre a eliminação de células danificadas ou infectadas que podem interferir com a função normal (Portt et al., 2011). De um modo geral, são algumas características da apoptose:

- processo discreto (morte de células individuais);
- desorganização do citoesqueleto que causa perda de aderência com matriz extracelular e com células vizinhas, além de modificação do formato celular;
- condensação da cromatina, particularmente próxima à membrana nuclear interna;
- o núcleo e a célula como um todo são desmontados em fragmentos envoltos por membrana, não há extravasamento do conteúdo citoplasmático;
- fragmentação internucleossômica do DNA, onde uma endonuclease é ativada e produz fragmentos de tamanho variável (Wong, 2011).

A apoptose pode ocorrer por duas vias: a intrínseca e a extrínseca. Na via extrínseca ou via de receptores de morte, moléculas sinalizadoras se ligam a receptores de morte celular na superfície da membrana. Já a via intrínseca é ativada por estresse como danos no DNA, hipóxia seguida de reperfusão, a produção excessiva de ERO entre outros. Na sequência é ativada uma cascata de eventos específicos, que convergem principalmente para a mitocôndria. De fato, a apoptose é extremamente regulada e de grande eficiência, o que requer a interação de diversos fatores (Grivicich et al., 2007; Portt et al., 2011).

Estudos moleculares e bioquímicos tem mostrado que os mecanismos de morte celular são bem conservados entre os organismos. De modo geral, a mitocôndria é fundamental neste processo por estar envolvida, por exemplo, na liberação de proteínas que desencadeiam ativação de caspases. Este mecanismo envolve principalmente a liberação do citocromo c da mitocôndria, que, na presença de dATP, Apaf-1 e procaspase-9, forma o complexo apoptossomo que após a ativação de outras moléculas, culmina na morte celular (Chao & Korsmeyer, 1998; Green & Reed, 2009). A família de proteases, conhecidas como caspases, exercem papel central na apoptose. As caspases executoras têm a capacidade de reconhecer e clivar substratos específicos após resíduos de aspartato, clivando assim proteínas estruturais, ativando outras enzimas e produzindo as características morfológicas e bioquímicas associadas com apoptose, descritas anteriormente (McIlwain et al., 2013).

Outra família muito importante no processo de apoptose, é a família Bcl-2 (“B-cell lymphoma protein 2”) que engloba proteínas que regulam a permeabilidade da membrana externa da mitocôndria regulando assim a liberação do citocromo c, e outras proteínas do espaço intermembranas, e a consequente ativação de caspases. Esta família é dividida em três grupos principais, com base na sua função e homologia estrutural com a proteína Bcl-2. O primeiro com maior homologia estrutural e atividade anti-apoptótica, compreende proteínas como a própria Bcl-2 e outros membros como Bcl-xl, Mcl-1, Bcl-w. O segundo grupo também compreende proteínas com grande homologia estrutural, porém com atividade pró-apoptótica, sendo alguns exemplos as proteínas Bax, Bak, e Bok / Mtd. O último grupo também apresenta proteínas com atividade pró-apoptótica, mas é o que tem menor homologia estrutural com a Bcl-2. Exemplos deste grupo incluem Noxa, Bid, Bim, Puma, Bad, Bmf, Hrk e Bik (Martinou & Youle, 2011; Wong, 2011). De modo geral, os membros pró-apoptóticos do segundo grupo podem interagir entre si, formando assim poros na membrana mitocondrial conduzindo a liberação de proteínas do espaço intermembranas como o citocromo c, e por consequência promovendo a apoptose. O controle deste mecanismo pode se dar pela interação dos membros anti e pró-apoptóticos, produzindo neste caso heterodímeros e suprimindo a morte celular. O terceiro grupo da família Bcl-2, parece atuar indiretamente interagindo tanto com os outros membros pró-apoptóticos ativando-os, como com os antiapoptóticos inibindo-os, promovendo assim a apoptose (Hardwick & Soane, 2013).

Ainda com relação a apoptose, a proteína p53 também é conhecida por estar envolvida nestes complexos mecanismos de regulação da apoptose e do sistema de resposta ao dano no DNA mencionados anteriormente. A p53, conhecida como “Guardiã do genoma”, é um fator de transcrição que controla a integridade do genoma celular através da regulação da transcrição de genes chave neste processo. A p53 pode parar o ciclo celular, e através de uma cascata de reações, impedir que esta célula entre em processo de mitose e complete a divisão celular, ou ainda pode induzir a morte celular programada (Levine, 1997; El-Deiry, 1998; Sutcliffe & Brehm, 2004).

A p53, na ausência de estímulos estressores, tem meia vida curta e é mantida em baixos níveis no citoplasma, pois usualmente ela está ligada à proteína Mdm2, que age principalmente impedindo sua ação e promovendo sua degradação, atuando como uma ligase de ubiquitina. O principal mecanismo de ativação da p53 após dano ao DNA parece ser a fosforilação em sítios específicos, embora a acetilação também venha se mostrando importante nesse processo (Levine, 1997; Sutcliffe & Brehm, 2004). Uma vez ativada, a p53 migra para o núcleo onde regula a transcrição de vários genes, dentre eles, o gene *mdm2*, seu principal regulador negativo na célula, e genes como *p21* (*cdkn1*) e *gadd45* envolvidos na parada do ciclo celular. A proteína p21, por exemplo, tem como uma de suas funções inibir a ação das quinases dependentes de ciclinas (CDKs), fazendo com que a célula pare na fase G1 do ciclo celular, até que complete o reparo do DNA. Para tanto, a proteína p53 também ativa a transcrição de genes que codificam para proteínas que vão atuar corrigindo a lesão no DNA. Caso a lesão seja extensa, a p53 pode regular genes envolvidos no mecanismo de morte celular, por exemplo, genes da família Bcl-2 mencionados anteriormente (Cadwell & Zambetti, 2001; Portt et al., 2011).

Ainda no que diz respeito à p53, esta proteína pode induzir apoptose por mecanismos independentes de seu papel como fator de transcrição, atuando no citoplasma e mitocôndrias da célula. Diferentes mecanismos para este processo têm sido propostos, como, por exemplo, interações funcionais da p53 com vários membros da família Bcl-2 regulando desta maneira a atividade destas proteínas nas mitocôndrias (Speidel, 2009; Vousden & Prives, 2009).

Em geral, estes mecanismos citados anteriormente são bem conhecidos em mamíferos, mas em modelos não mamíferos, ainda existem várias lacunas acerca dos

processos envolvidos na regulação da apoptose. Neste sentido, o processo de apoptose e os mecanismos de resposta ao dano de DNA parecem ser bem conservados em peixes, como o *Danio rerio* (Santos et al., 2008). Foi descoberto que o genoma do *Danio rerio* codifica homólogos estruturais e funcionais de vários componentes da via intrínseca da apoptose de mamíferos, por exemplo, a caspase-3 (Yabu et al., 2001), citocromo c (Broughton et al., 2001), homólogos de Apaf-1, XIAP, e SMAC / Diablo (Inohara & Nunez, 2000) e membros da família Bcl-2, estabelecendo o peixe *Danio rerio* como um modelo relevante principalmente para o estudo da via intrínseca da apoptose (Kratz et al., 2006). Além disso, o peixe *Danio rerio* já é considerado um importante modelo para o entendimento de vários aspectos da proteína p53 (Storer & Zon, 2010). Neste sentido, a linhagem celular ZFL foi estabelecida em 1992 a partir de células isoladas do fígado desta espécie e vem sendo utilizada desde então como modelo em diversos estudos toxicológicos (Miranda et al., 1993; Seok et al., 2007). Entre as vantagens da utilização deste modelo está o fácil cultivo e desenvolvimento dessa linhagem, bem como o genoma desta espécie estar inteiramente sequenciado (Schneider et al., 2009). Além disso, estudos já relataram que esta linhagem continua a exibir propriedades características de células do parênquima hepático após 100 gerações em cultura, proporcionando então um bom modelo a ser utilizado (Ghosh et al., 1994).

Com base nestas informações, torna-se evidente a necessidade de estudos que avaliem os mecanismos envolvidos na ativação e regulação destes processos em outros modelos animais, como por exemplo, peixes. Neste sentido, considerando que o azul de metileno pode causar diferentes efeitos quando na presença ou não de luz visível, estudos a fim de entender os mecanismos de ação deste corante em células de peixe podem fornecer informações importantes à respeito dos mecanismos envolvidos no processo de apoptose em diferentes modelos animais.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi comparar os mecanismos envolvidos na ação tóxica do azul de metileno na linhagem de hepatócitos de *Danio rerio* (ZFL), tanto na ausência quanto na presença de luz visível.

2.2. Objetivos específicos

- Determinar a CE_{50} após tratamento com azul de metileno, na presença ou não de luz visível, em hepatócitos de *D. rerio*.
- Avaliar em hepatócitos de *D. rerio* o efeito do tratamento com concentrações equitóxicas de azul de metileno na presença ou não de luz visível, nos níveis de espécies reativas de oxigênio e de danos ao DNA;
- Analisar a indução de morte celular (apoptose e necrose) bem como nível de transcritos de genes envolvidos na parada do ciclo celular e apoptose em hepatócitos de *D. rerio*, após tratamento com concentrações equitóxicas de azul de metileno na presença ou não de luz visível.

3. ARTIGO

Methylene blue cytotoxicity: a comparative study in zebrafish cell line

Artigo a ser submetido à revista

Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology

Methylene blue cytotoxicity: a comparative study in zebrafish cell line.

Simone Rutz da Costa^a, Mauricio da Costa Monteiro^a, Flavio Manoel Rodrigues da Silva Júnior^b, Juliana Zomer Sandrini^{a,b*}.

^a Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas – Fisiologia Animal Comparada. Universidade Federal do Rio Grande - FURG, Av. Itália km 8, 96203-900, Rio Grande, RS, Brazil.

^b Instituto de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Rio Grande - FURG, Av. Itália km 8, 96203-900, Rio Grande, RS, Brazil.

E-mail address:

simonecosta@furg.br (Simone Rutz da Costa);

mauriciomonteiro@furg.br (Mauricio da Costa Monteiro);

f.m.r.silvajunior@gmail.com (Flavio Manoel Rodrigues da Silva Júnior);

juzomer@pq.cnpq.br (Juliana Zomer Sandrini).

* Corresponding author:

juzomer@pq.cnpq.br

+55 (53) 32935162

Av. Itália Km 8 - Campus Carreiros

CEP 96203-900

Rio Grande/RS - Brazil

Abstract

Methylene blue (MB) is a widely utilized compound, mostly as photosensitizing agent. The aim of the present study was to compare the mechanisms of methylene blue action in zebrafish cell line, both in the absence (MB alone) and in the presence of photosynthetically active radiation (PAR; MB+PAR). For this purpose, cells were exposed to equitoxic concentrations of MB corresponding to 24 h median effective concentration (EC₅₀) in each treatment (MB- 38 µg/L and MB+PAR- 5.6 µg/L). In this situation, there was a significant increase of the levels of reactive oxygen and nitrogen species (RONS) 3 h after treatment of cells receiving only MB, while for the treatment MB+PAR this increase was only observed 12 h after treatment. All treatments with MB (alone or in the presence of PAR) resulted in increases in DNA damage after 3 and 6 h, and the MB treatment alone promoted the generation of 8-oxoG. Necrotic cell death was observed in all periods analyzed (3, 6, 12 and 24 h) in both treatments. However, cell death by apoptosis was observed from 6 h after treatment with MB + PAR and 12 h after treatment with MB alone. The expression of genes related to cell cycle arrest (*cdkn1*) and apoptosis (*bcl-2*, *bcl-xl*, *bax1* and *nox1*) was altered after treatment with MB+PAR. However, only expression of *bcl-2* gene was influenced by MB alone. Thus, this zebrafish cell line is sensitive to photodynamic action of methylene blue, and methylene blue both alone and in the presence of PAR are able to generate DNA damage and to induce apoptosis in this lineage. However, the pathways leading to apoptosis in this cell line appear to be different according to methylene blue exposure (in presence or absence of PAR).

Keywords: methylene blue, photodynamic action, apoptosis, DNA damage, zebrafish, hepatocyte.

1. Introduction

Methylene blue (MB) is a cationic compound from the class of phenothiazines and it was first synthesized in 1876 (Wainwright, 2005). Recently, studies using zebrafish (*Danio rerio*) as model described MB as a molecule with beneficial neuronal action and pointed out the importance of understanding the mechanism of action and the cellular targets of MB (Bebber et al., 2010; Vaccaro et al., 2012).

MB is extensively used as a photosensitizing agent, through its photodynamic action, due to its absorption spectrum (maximum in 660 nm, corresponding to visible light or photosynthetically active radiation - PAR) as well as its good penetration into the target tissue. Photodynamic action can be characterized by the photooxidation of organic substrates through the generation of reactive oxygen species (ROS) produced by the association between the presence of a certain wavelength, a photosensitive substance (like MB) and molecular oxygen (O_2). Photodynamic activity begins when the photosensitizer molecule absorbs light and shifts from its ground state to a more energetic state. This excited molecule can interact with other medium components, that react with O_2 generating reactive species such as hydrogen peroxide (H_2O_2), hydroxyl radical ($\cdot OH$) and superoxide anion ($O_2^{\cdot -}$) (photoprocess Type I), or directly excite O_2 , forming singlet oxygen (1O_2) (photoprocess Type II) (Konan et al., 2002; Perussi, 2007; Yano et al., 2011).

Besides its photodynamic action, MB can be reduced by NAD(P)H, in physiological conditions, to a colorless compound called leuco methylene blue, which can be spontaneously reoxidized by molecular oxygen or iron, producing H_2O_2 in this reaction (Schirmer et al., 2011). So, MB is able to generate ROS, both when exposed to PAR or in the dark, and these ROS tend to react with important biomolecules such as proteins, lipids and DNA (Sies, 1991; Di Giulio et al., 1995). Single strand DNA breaks and base oxidation, like guanine oxidation to form 7,8-dihydro-8-oxoguanine (8-oxoG), are commonly induced by ROS (Begley & Samson, 2004). In addition to this possible effect of ROS formed by MB on DNA, Wainwright (2000; 2002) described in detail that MB can intercalate with DNA structure due to its positive charge and planar geometry, especially in guanine-cytosine rich regions, and therefore also generate direct damage to DNA.

Several cellular injuries, including DNA damage, could trigger complex enzymatic reactions that can lead to a programmed cell death called apoptosis (Begley & Samson, 2004). This process is under tight regulation in cells, where proteins of Bcl-2 family act regulating the permeability of outer mitochondrial membrane (Wong, 2011). The Bcl-2 family is divided into three main groups: (1) members with high structural homology to Bcl-2 protein which presents anti-apoptotic activities, such as Bcl-2 itself and Bcl-xl; (2) members with high structural homology but with pro-apoptotic activity, such as Bax; and (3) members with less structural homology and pro-apoptotic activity, such as Noxa and Puma (Martinou & Youle, 2011).

Another protein involved in the cell cycle control and apoptosis is p53. In mammals, p53 protein is an important transcription factor that controls cell survival and death after different cellular stresses. For example, after a genotoxic stress, p53 is activated and regulates the transcription of several genes that play a role in cellular response, such as *p21* or *cdkn1* involved in cell cycle arrest, or genes from Bcl-2 family mentioned above, leading to apoptosis (Levine, 1997; Cadwell & Zambetti, 2001). Recent studies have demonstrated that genes encoding proteins, such as p53 and Bcl-2 family, are functionally conserved between zebrafish and mammals. Accordingly, the zebrafish is taken as a relevant model to study the intrinsic pathway of apoptosis (Kratz et al, 2006; Storer & Zon, 2010) as well as the cellular responses involving DNA damage and repair (Pei & Strauss, 2013).

The ZFL cell line was established in 1992 from liver cells of fish *Danio rerio* and it has been used as an important model for toxicological studies (Miranda et al, 1993; Seok et al, 2007; Sandrini et al., 2009a; 2009b). Thus, the aim of this study was to compare the mechanisms of methylene blue action in ZFL cell line. For this purpose, cells were exposed to equitoxic concentrations of MB in the presence or not of PAR (corresponding to 24 h EC₅₀ values) and the levels of RONS and DNA damage, the incidence of apoptosis and necrosis, and expression of genes related to cell cycle arrest and apoptosis regulation in both MB treatments were analyzed.

2. Materials and Methods

2.1. Cell culture

Hepatocytes from zebrafish (ZFL cell line) were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC® number CRL- 2643TM). ZFL cell line was maintained in RPMI 1640 (Gibco; pH 7.4) medium supplemented with sodium bicarbonate (0.2 g/L), L-glutamine (0.3 g/L), Hepes (25 mM), fetal bovine serum (10%; Gibco) and antibiotic and antimycotic (penicillin [100 U/mL], streptomycin [100 µg/mL], amphotericin B [0.25 µg/mL]; 1%; Gibco) in cell culture flasks (TPP Techno Plastic Products AG) at 28 °C.

2.2. Determination of median effective concentration (EC_{50})

Cells were transferred to 96-well culture plates (TPP Techno Plastic Products AG) (1×10^5 cells/well) and maintained for 48 h at 28 °C to allow cell attachment. After this, cells were washed with Ca^{2+} - and Mg^{2+} -free phosphate buffer saline (PBS; pH 6.9) and incubated for 1h in a medium with different concentrations of MB (0; 3.125; 6.25; 12.5; 25; 50; 100 µg/L). After MB incubation, cells were washed with PBS twice, and were irradiated with 5 J/cm^2 of photosynthetically active radiation (PAR) in PBS to assess the photodynamic action of MB (MB+PAR). The light source was a FLC (PAR 38 Halogen; 90 W, 127 V) lamp, with an emission spectrum in the visible region and a peak of emission in 590 nm. To preventing an increase in temperature during irradiation procedure, a receptacle containing water was interposed between the lamp and cells to eliminate heating due to infrared rays. A group of cells were not exposed to PAR, being exposed only to MB. After the treatment, cells were maintained in RPMI 1640 medium at 28 °C for 24h.

The cytotoxicity was measured by MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay. Cells were washed with PBS and incubated for 3h at 28 °C with MTT (0.5 mg/mL in RPMI medium). After incubation period, medium was removed and formazan crystals were dissolved in 200 µL of dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma) with gentle shaking. The absorbance values were determined in a multiwell plate reader at 490 nm (ELX 800 Universal Microplate Reader, Bio-TEK). The EC_{50} (concentration that causes a 50% reduction in absorbance values) and 95%

confidence interval were calculated by the trimmed Spearman–Karber (TSK) method, version 1.5.

2.3. *Comparative analysis of pathways involved in cytotoxicity and photocytotoxicity of methylene blue*

2.3.1. *Cells treatment*

Based on EC₅₀ values for 24h obtained from MTT assay, equitoxic concentrations were selected in order to compare the cytotoxic mechanism of MB alone (38 µg/L) with its photodynamic action (5.6 µg/L; MB+PAR). First of all, cells were transferred to 96-wells (1x10⁵ cells/well, for apoptosis/necrosis analysis) or 24-well (1x10⁶ cells, for all others analysis) culture plates and maintained in RPMI 1640 medium for 48h at 28 °C for cell attachment, as described for EC₅₀ determination. Then cells were washed with PBS and incubated for 1h in a medium with 5.6 or 38 µg/L of MB. After MB incubation, cells were washed with PBS twice and to assess the photodynamic action of MB the cells that had been exposed to 5.6 µg/L of MB were irradiated in PBS with 5 J/cm² (according to preliminary tests) of PAR (represented as “5.6 µg/L + PAR” in figures). For this experiment, three control groups were done: a group of cells that was not exposed either to MB nor PAR (represented as “control” in figures), a group of cells exposed only to PAR (represented as “PAR” in figures) and a group of cells exposed only to MB in concentration of 5.6 µg/L (represented as “5.6 µg/L” in figures). After the exposure, cells were maintained in dark in RPMI 1640 medium at 28 °C for 3, 6 and 12h for subsequent analysis.

2.3.1.1. *Assessment of intracellular Reactive Oxygen and Nitrogen Species (RONS)*

Cells (four samples of 1x10⁶ cells per group) were washed with PBS and trypsin (0.125%) was added. After trypsinization (10 min at 28° C), cells were incubated for 30 min at 28°C with the fluorogenic compound 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (H₂DCF-DA) at final concentration of 40 µM. After the incubation with H₂DCF-DA, cells were washed with PBS (twice) and then suspended in fresh PBS. Three aliquots of 160 µL of each sample were placed into a microplate and the fluorescence intensity was determined during 30 min at 28°C, using a fluorometer (Victor 2, Perkin Elmer), with an excitation and emission wavelength of 485 and 520 nm, respectively. RONS levels

were expressed in terms of relative area, after fitting fluorescence data to a second order polynomial and integrating between 0 and 30 min in order to obtain its area.

2.3.1.2. *DNA damage*

DNA damage was evaluated by the alkaline single cell electrophoresis (comet assay), performed as described for Singh et al. (1988) and Steinert et al. (1998), with some modifications. After trypsinization, an aliquot (10 μ L) of cell suspension of each sample (1×10^6 cells/mL) was mixed with 120 μ L of 1% low melting point agarose and added to slides which had been covered with a layer of 1.5% normal melting point agarose. Following the solidification of layer, cells on the slides were lysed with lysis solution (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 1% Triton X-100, and 10% dimethyl sulfoxide, pH 10) overnight at 4 °C. In order to detect 8-oxoG formation, some slides were washed with buffer F (40 mM HEPES, 0.1 M KCl, 0.5 mM EDTA, 0.2 g BSA, pH 8.0) at 4 °C for 5 min, and after this procedure, the slides were incubated with 0.08 U of the DNA repair enzyme hOGG1 (New England Biolabs) for 20 min at 37 °C. This repair enzyme excises 8-oxoG and creates abasic sites, which generate single strand breaks in alkaline conditions. Subsequently, all slides were placed in the electrophoresis solution (10 M NaOH and 200 mM EDTA, pH > 13) for 20 min to allow DNA unwinding. Then, electrophoresis was performed for 20 min at 1 V/cm and 280 mA. Finally, the slides were neutralized with 0.4 M Tris buffer (pH 7.5), stained with 30 μ L of SyBR Safe (1:10.000; Molecular Probes) and analyzed using a fluorescence microscope (Olympus BX50) connected to a CCD camera (Pro-Series, High Performance) coupled to commercial software for image acquisition. The analysis was done with four samples per group ($n=4$, one slide per sample) and a total of 50 nucleoid were randomly selected and photographed on each slide. The nucleoids were analyzed by Image J software and DNA damage was represented by tail length (μ m) and % tail DNA.

2.3.1.3. *Quantitative analysis of apoptosis and necrosis*

The evaluation of apoptosis and necrosis was done according to Ribble et al. (2005), using the ethidium bromide and acridine orange staining assay. After addition of dyes (1 μ g/mL each), the analysis was performed with an epifluorescence microscope (Olympus IX81), counting a minimum of 200 cells from each sample (three

samples per group) and the data were expressed in percentage of apoptotic/necrotic cells. Cells were classified as viable (green nucleus), apoptotic (orange nucleus with fragmented chromatin), and necrotic (uniformly orange-stained nucleus).

2.3.1.4. Gene expression analysis

After the treatment, cells in a 24-well plate were washed with PBS and two wells of each treatment were pooled and suspended in 1 mL of TRIzol Reagent (Invitrogen, Brazil) to form one sample. Total RNA was extracted according to the protocol of the manufacturer and the amount of RNA was determined spectrophotometrically (260/280nm). RNA integrity was confirmed by electrophoresis in 1.5% agarose gel. Total RNA (five samples per group) was reverse transcribed to cDNA (complementary DNA) following the protocol of the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Brazil). The obtained cDNA was employed as a template for amplification of genes *bcl-2* associated X protein (*bax1*; *bax2*), B-cell lymphoma protein (*bcl-2*; *bcl-xl*), cyclin-dependent kinase inhibitor 1 (*cdkn1* or *p21*), phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1 (*pmaip1* or *noxa*). Primers were designed using Primer-Blast and are described in Table 1. The elongation factor 1 alpha (*ef1 α*) and β_2 -microglobulin (*b2m*) gene expressions were employed in order to normalize data. The gene expression analysis was performed using Real-time PCR System 7300 equipment (Applied Biosystems, Brazil) and analyzed by the Delta Ct (Δ Ct) method. PCR reactions were carried out using Platinum® SYBR® Green qPCR Super Mix – UDG (Invitrogen, Brazil) and diluted cDNA (1:20). Quantitative real-time PCRs with cDNA serial dilutions were performed for all primers in order to test reaction efficiency. Melting curves were analyzed after amplification reactions and single amplification products were present in all reactions.

Table 1. Gene-specific primers used for Real Time PCR analysis.

Gene	NCBI accession number	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
<i>bax1</i>	NM_131562.2	CGATACGGGCAGTGGCAAT	AGAAGTGCAGCTCCCAAGTC
<i>bax2</i>	NM_001013296.2	TCGGTGACAACTCGACCAG	CTGGCCATCTGTGAACACCT
<i>bcl-2</i>	NM_001030253.2	ATGGAGGTTGGGATGCCTTC	AGAGTCTCTCTGCTGACCGT
<i>bcl-xl</i>	XM_005162026.1	CAAGGAGGATGGGAACGCTT	TTCTGTGCAATGAGTCCCCC
<i>nox1</i>	NM_001045474.1	CGAAGAAAGAGCAAACCGCT	CATCGCTTCCCCTCCATTG
<i>cdkn1</i>	NM_001128420.1	TGCGTGAAACGTCAATTCGAG	TGTCAGCGTTCATGGAGCAA
<i>ef1a</i>	XM_005173785.1	AAAATTGGAGGTATTGGAACGTAC	TCAACAGACTTGACCTCAGTGGTT
<i>b2m</i>	NM_001159768.1	GCCTTCACCCCAGAGAAAGG	GCGGTTGGGATTACATGTTG

2.4. Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm standard error and analyzed with ANOVA followed by Newman Keuls multiple range test. To compare the data of DNA damage in the presence (+) or absence (-) of hOGG1, F-Test was used. Significance level was fixed at $p < 0.05$ and the analysis assumptions (normality and variance homogeneity) were previously verified.

3. Results

3.1. Determination of EC_{50}

Both treatments (MB and MB+PAR) were toxic to cells in a concentration-dependent manner after 24 h (Fig. 1). However, the photodynamic action of methylene blue (MB+PAR) was more toxic than methylene blue alone (MB). Comparing the EC_{50} values found (Table 2), ZFL cells were more sensitive to photodynamic action of MB (MB+PAR, EC_{50} 24 h: 5.6 μ g/L) than to MB alone (EC_{50} 24 h: 38 μ g/L). These equitoxic concentrations (5.6 μ g/L for MB+PAR and 38 μ g/L for MB) were selected for further analysis of mechanisms involved in cytotoxicity of MB alone and in presence of PAR.

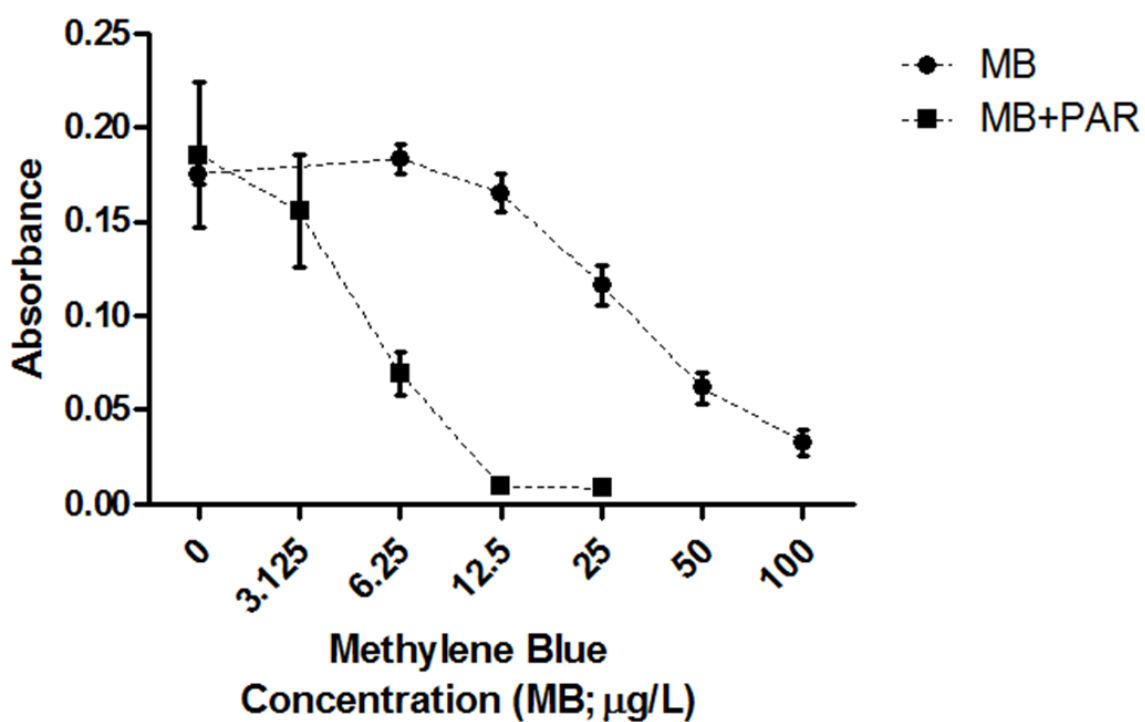


Figure 1. Cytotoxicity of methylene blue (MB; circles) and methylene blue in presence of photosynthetically active radiation (MB+PAR; squares), measured by MTT assay, for ZFL cells 24 h after treatment. Data are expressed as mean \pm standard error.

Table 2. Median effective concentration (EC_{50}) of methylene blue (MB) and methylene blue in presence of photosynthetically active radiation (MB+PAR) in ZFL cells 24 h after exposure. The values were based on MTT assay and determined using Trimmed Spearman-Kärber method, version 1.5.

EC_{50}	
MB	38 μ g/L (36.15 - 39.75)*
MB+PAR	5.6 μ g/L (5.50 - 5.87)*

* 95% confidence interval

3.2. Assessment of intracellular Reactive Oxygen and Nitrogen Species (RONS)

Concerning RONS levels, a significant increase was observed 3h after treatment of cells with MB alone in both concentrations tested (5.6 and 38 $\mu\text{g/L}$) in relation to control (Fig. 2). After treatment of cells with MB in presence of PAR (5.6 $\mu\text{g/L}$ + PAR) it was observed a decrease in RONS levels 3 and 6h after treatment when compared to the control, with a posterior increase 12h after exposure (Fig. 2).

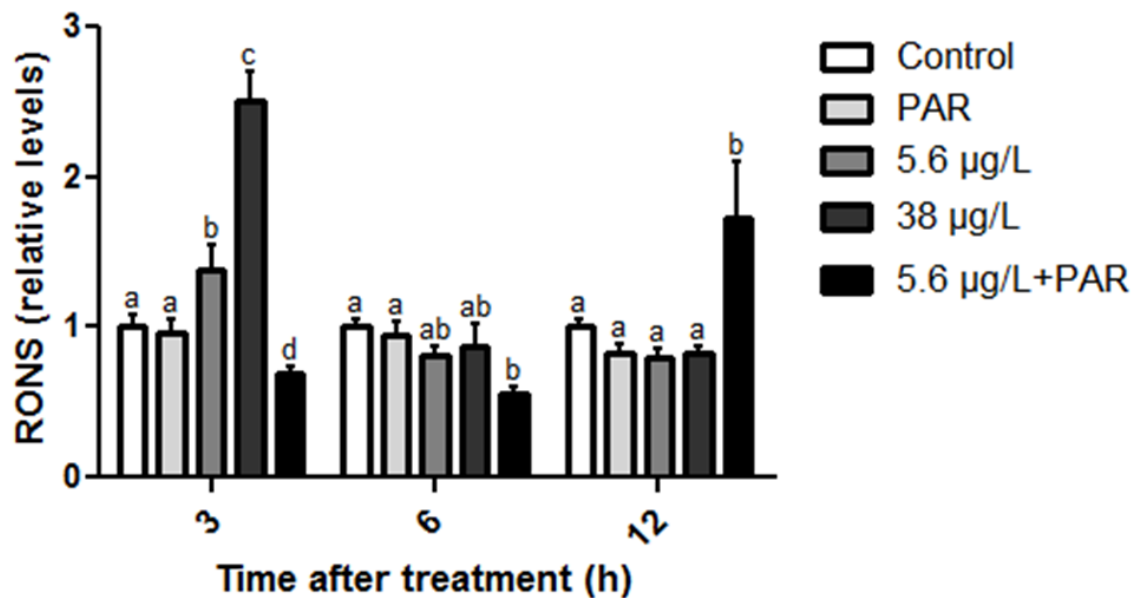


Figure 2. Reactive oxygen and nitrogen species (RONS) levels in ZFL cells 3, 6 and 12h after treatment with methylene blue (5.6 $\mu\text{g/L}$ and 38 $\mu\text{g/L}$) or methylene blue in presence of photosynthetically active radiation (5.6 $\mu\text{g/L}$ +PAR). Data are expressed as mean + standard error. Different letters indicate significant difference ($p<0.05$) between mean values at the same exposure time.

3.3. *DNA damage*

Concerning comet assay, the analysis of tail length (Fig. 3) and % tail DNA (data not shown) showed similar results. In this regard, a significant increase in DNA damage were observed in cells exposed to all MB treatments (5.6 µg/L, 38 µg/L and 5.6 µg/L+PAR) when compared to respective controls, 3 and 6h after treatment (Fig. 3a and 3b). However, 12h after treatment (Fig. 3c) only cells exposed to 5.6 µg/L+PAR showed a significant increase in DNA damage in relation to controls.

DNA damage after hOGG1 treatment (hOGG1 +) was increased only in 5.6 µg/L and 38 µg/L groups after 3h of MB treatment (Fig. 3a). This effect was also observed for 5.6 µg/L of MB group 6h after treatment (Fig. 3b).

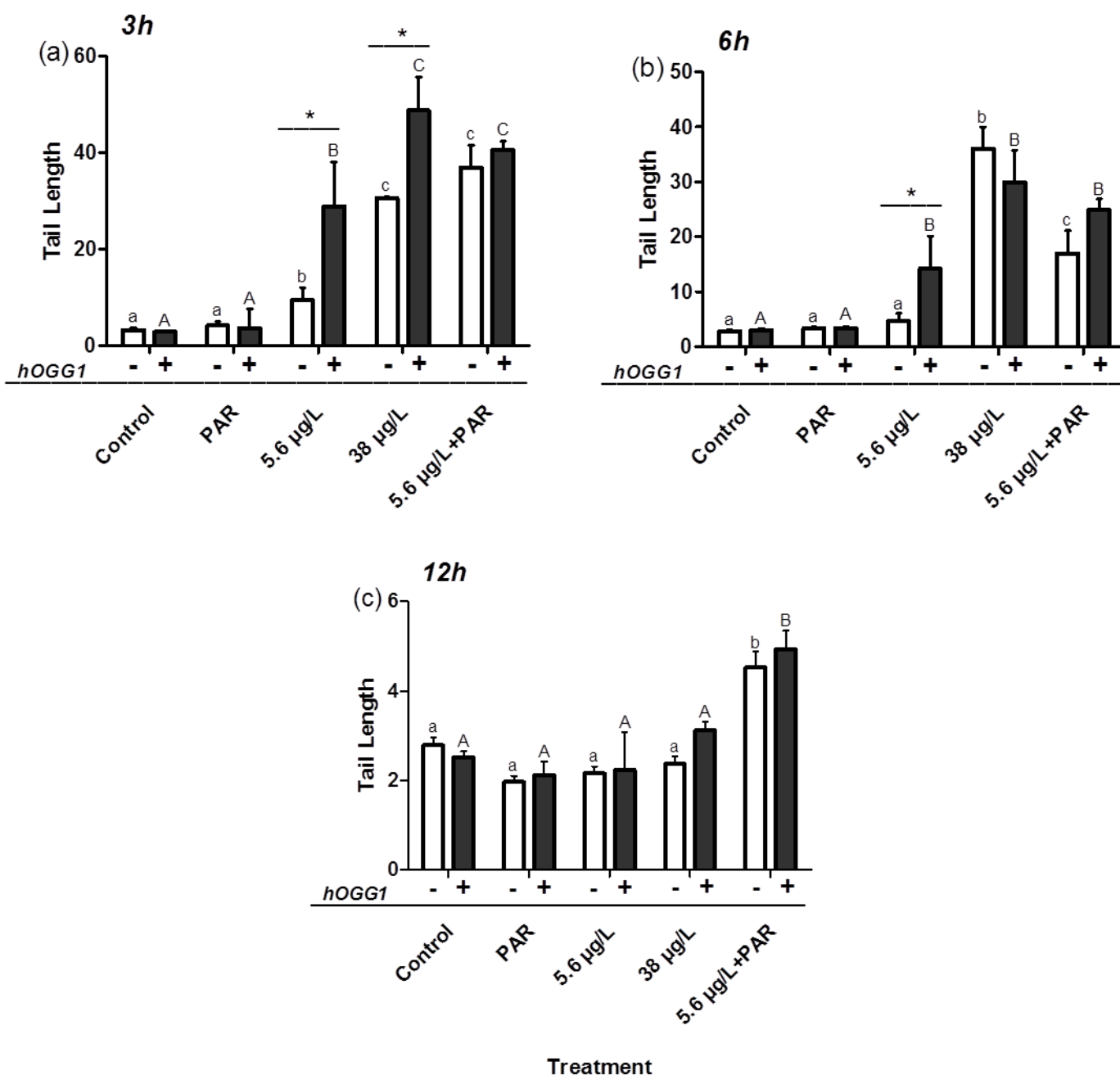


Figure 3. Quantification of DNA damage expressed as tail length (μm) values in ZFL cells 3h (a), 6h (b) and 12h (c) after treatment to methylene blue (5.6 $\mu\text{g/L}$ and 38 $\mu\text{g/L}$) and methylene blue in presence of photosynthetically active radiation (5.6 $\mu\text{g/L}$ +PAR). Gray columns represent slides treated with the DNA repair enzyme hOGG1 (+) and white columns represent slides without hOGG1 treatment (-). Data are expressed as mean + standard error. Different letters indicate significant difference ($p < 0.05$) between mean values for hOGG1(-) samples (lowercase letters) or hOGG1(+) samples (uppercase letters). Significant differences ($p < 0.05$) between samples with (+) or without hOGG1(-) were indicated by asterisks (*).

3.4. Detection of apoptosis/necrosis

The exposure of ZFL cells to equitoxic concentrations of methylene blue (38 $\mu\text{g/L}$ and 5.6 $\mu\text{g/L}$ +PAR) increased the number of necrotic cells at all analyzed times (3, 6, 12 and 24h) when compared to its respective controls (Fig. 4). The number of apoptotic cells has increased after 6h of exposure and were maintained up to 24h in 5.6 $\mu\text{g/L}$ +PAR group (Fig. 4b, 4c and 4d). Similarly, an increase of cell death was observed 12h and 24h after in cells treatment with 38 $\mu\text{g/L}$ of MB (Fig. 4c and 4d).

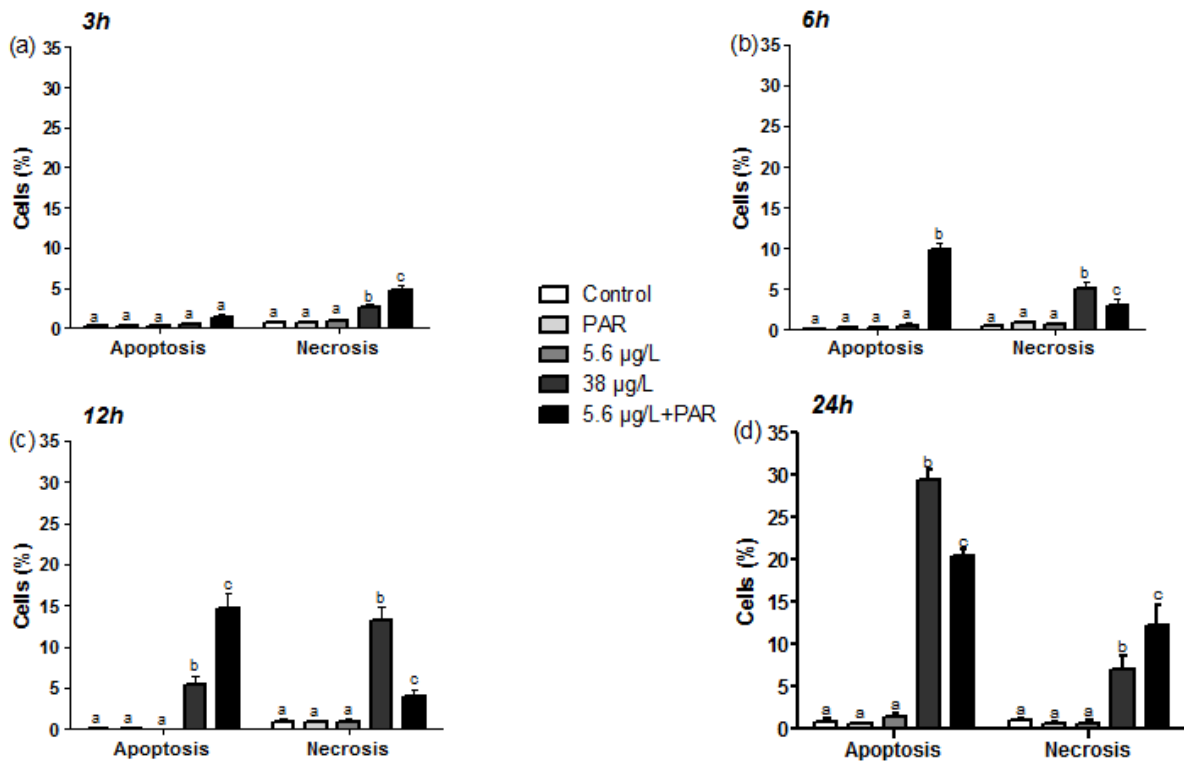


Figure 4. Quantification of apoptotic and necrotic cells after 3h (a), 6h (b), 12h (c) and 24h (d) of exposure to methylene blue (5.6 $\mu\text{g/L}$ and 38 $\mu\text{g/L}$) or methylene blue in presence of photosynthetically active radiation (5.6 $\mu\text{g/L}$ +PAR). Data are expressed as mean + standard error. Different letters indicate significant difference ($p < 0.05$) between mean values for apoptotic or necrotic cells.

3.5. Gene expression

Concerning the expression of the anti-apoptotic and cell cycle arrest genes 3h after MB treatment, only *bcl-2* gene expression was decreased in ZFL cells treated both with 38 $\mu\text{g/L}$ and 5.6 $\mu\text{g/L}+\text{PAR}$ (Fig. 5a) when compared to controls. Simultaneous to this, a significantly increase in expression of the pro-apoptotic *bax1* and *noxa* genes (Fig. 5b) were observed in cells treated with 5.6 $\mu\text{g/L}+\text{PAR}$ when compared to controls. No significant differences in gene expression were observed 6h after any treatment tested (Fig. 5c,d).

After 12h of MB treatment, a significant decrease in the expression of anti-apoptotic gene *bcl-2* was observed in cells treated with 5.6 $\mu\text{g/L}$, 38 $\mu\text{g/L}$ and 5.6 $\mu\text{g/L}+\text{PAR}$ when compared to their respective controls (Fig. 5e). Moreover, cells exposed to 5.6 $\mu\text{g/L}+\text{PAR}$ showed an increase in expression of *cdkn1* and *noxa* genes (Fig. 5e and 5f) and a decrease in *bax1* gene expression when compared to controls (Fig. 5f).

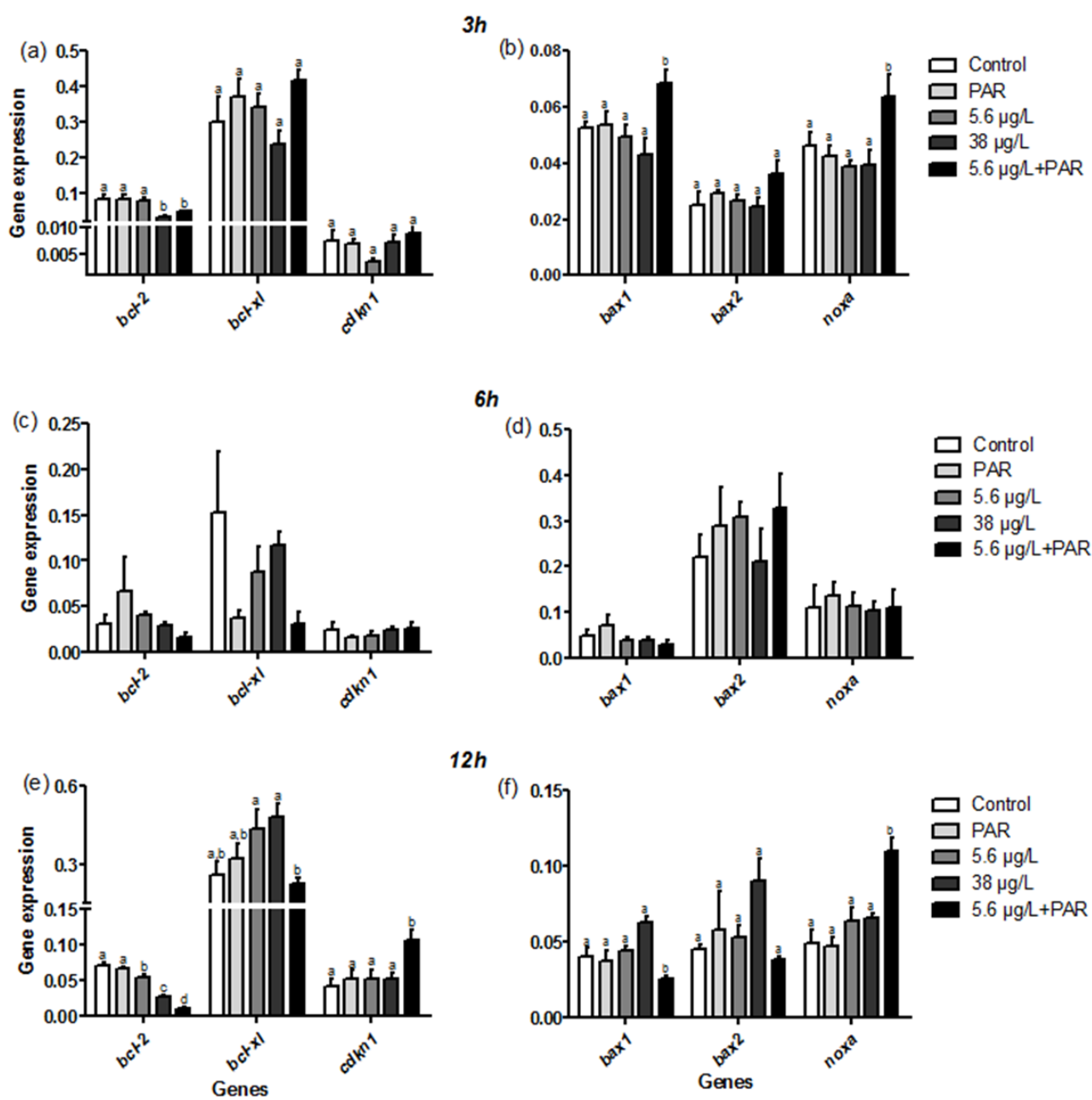


Figure 5. Expression of anti-apoptotic genes (*bcl-2* and *bcl-xl*), gene involved in cell cycle arrest (*cdkn1*) and proapoptotic genes (*bax1*, *bax2* and *noxa*) in ZFL cells 3h (a,b), 6h (c,d) 12h (e,f) after treatment to methylene blue (5.6 µg/L and 38 µg/L) and methylene blue in presence of photosynthetically active radiation (5.6 µg/L+PAR). Values are expressed as mean + standard error. Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$) between mean values for each gene.

4. Discussion

The purpose of the current study was to compare the mechanisms involved in cytotoxicity of methylene blue in ZFL cell line in the presence or not of photosynthetically active radiation (MB or MB+PAR). Recent studies have reported effects of MB exposure in zebrafish and highlighted the importance of understanding the mechanism of MB action and its cellular targets (Bebber et al, 2010; Vaccaro et al, 2012). In the present study, both MB treatments induced cell death. However, the photodynamic action of MB (MB+PAR treatment) has a greater effect, which was confirmed by 24h EC₅₀ values (38 µg/L for MB and 5.6 µg/L for MB+PAR). This result was expected, since MB has been known as an useful biomedical photosensitizer by over a century. In terms of clinical applications, a photosensitizer with greater phototoxicity and lower dark toxicity is considered ideal (Wainwright & Giddens, 2003; Schirmer et al., 2011; Moreira et al., 2012). These characteristics of phenothiazines were studied in RIF-1 murine fibrosarcoma cells by Mellish and colleagues (2002). The authors considered that MB is the most effective phenothiazine dye for photodynamic action for their low dark toxicity. The higher cytotoxicity of MB photodynamic action compared to MB alone was also observed for Wainwright et al. (1997) in the murine mammary tumor cell line (EMT-6) and for Schmidt et al. (1991) in the HeLa tumor cell line.

In general, MB alone is considered to have low toxicity (Blass, 1976). In our study, equitoxic concentrations (5.6 µg/L for MB+PAR and 38 µg/L for MB alone) were selected for analysis and comparison of mechanisms involved in cytotoxicity of MB alone and in presence of PAR. A significant increase in RONS levels 3h after treatment of MB alone in both tested concentrations were observed (Fig. 2). This may be related to the potential of MB to react with O₂, even without PAR, and generate ROS (Schirmer et al., 2011). The present study also showed that MB alone was able to generate DNA damage, including the oxidative DNA damage 8-oxoG. A significant increase in DNA damage in cells treated with 5.6 µg/L and 38 µg/L of MB 3h after cell treatment was observed, and this DNA damage was increased with hOGG1 incubation, indicating 8-oxoG formation. This increase in DNA damage after MB alone treatments was observed up to 6h after treatment. The generation of oxidative damage 8-oxoG by MB alone may be related to significant RONS increase showed after 3h of treatment (Fig. 2). Nitrogen bases are the most oxidizable components of DNA and, among them,

guanine has the lowest reduction potential when compared to the others (Kawanishi et al., 2001).

On the other hand, the results observed for MB+PAR treatment were distinct. In this treatment (5.6 µg/L+PAR) it was observed a decrease in RONS levels (after 3 and 6 h of treatment) with a posterior increase 12h after treatment (Fig. 2). This result is controversial, since MB in presence of PAR is referred as a highly efficient RONS generator, mainly singlet oxygen. These RONS (e.g. singlet oxygen) have a short half-life in biological systems due its high reactivity and that the process of electron exchange, characteristic in photodynamic action, could be very quick (Wainwright, 2000; Machado, 2000; Wainwright & Giddens, 2003; Moreira et al., 2012). Hence, the increase in RONS levels may have occurred immediately after treatment and consequently not have been detected in our study. Besides, singlet oxygen may also have not been detected by the method employed in the present study. The 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH) is employed to assess RONS levels by monitoring the appearance of 2',7'-dichlorofluorescein (DCF), its fluorescent oxidated product. However, Bilski and co-workers (2002) suggest that DCFH should not be regarded as a probe sensitive to singlet oxygen, and care must be taken when using DCFH to measure RONS levels in cells. The singlet oxygen does not contribute directly to DCFH oxidation, although it can do indirectly via reaction with cellular substrates yielding peroxy products and peroxy radicals, which are able to oxidize DCFH in subsequent reactions (Chen et al., 2010). Thus, the significant increase in RONS levels 12h after treatment of MB+PAR in this study, may have been generated by indirect reactions produced after generation of singlet oxygen.

Furthermore, in the MB+PAR treatment it was not found a significant generation of the DNA oxidative damage 8-oxoG. This result is also regarded as contradictory, since the photodynamic action is known to induce oxidative DNA damage, in particular 8-oxoG damage. But, it is important to emphasize that in addition to 8-oxoG analyzed in this study through a modified comet assay, other products such as 2-aminoimidazolone and 2,2-diaminooxazolone may be produced through the formation of guanine cation radicals (Kawanishi et al., 2001). In fact, more than 20 different types of base damage have been identified after oxidative stress generation (Slupphaug et al., 2003). Nevertheless, it was observed DNA damage at all analyzed times after MB+PAR

treatment even when RONS generation was not found. In fact, many studies had been published relating the ability of MB to intercalate into DNA, causing DNA damage (Wainwright, 2000; Ortiz et al., 2011). Several studies demonstrated that the MB photodynamic action has potential to generate DNA damages evaluated through comet assay, and it was observed either in K562 human erythroleukemic cell line (McNair et al., 1997), xeroderma pigmentosum XP-A and XP-C (NER-deficient) human fibroblasts (Berra et al., 2013), or in shrimp *Palaeomonetes pugio* embryos (Lee & Kim, 2002).

DNA damage and high concentrations of RONS can induce cell death (Droge, 2002). In our study, it was observed necrotic cell death in 38 µg/L and 5.6 µg/L+PAR treatments in all times analyzed (Fig. 4). On the other hand, it was observed an increase of levels of apoptotic cells in different times after exposure to MB alone (starting after 12h) and MB in presence of PAR (starting after 6h). Apoptosis is a highly regulated cell death process, which requires the interaction of many factors, including the expression of specific regulatory genes (Grivicich et al., 2007). Several components of the intrinsic apoptotic pathway have been elucidated in zebrafish, including a functional caspase-3 homolog (Yabu et al., 2001), homologs to cytochrome c subunits (Broughton et al., 2001) and potential homologs of Apaf-1, XIAP, and SMAC/Diablo have been reported (Inohara & Nuñez, 2000). Yet, Kratz and co-workers (2006) indicated substantial functional similarity between zebrafish and mammalian Bcl-2 family members, and established the relevance of zebrafish as a model for studying the intrinsic apoptotic pathway.

In this study, it was possible to observe significant differences in expression of key genes involved in apoptosis regulation (*bcl-2*, *bax1*, *noxa*) 3 and 12h after the treatment with MB+PAR. In other animal models, Bcl-2 family members have important role on the apoptosis pathway initiated by photodynamic action (Srivastava et al., 2001). Crescenzi and co-workers (2004) observed that cisplatin photodynamic therapy caused the decrease of *bcl-2* and increase of *bax* and also induced apoptosis in MCF-7 cells. Xue and co-workers (2001) observed that photodynamic therapy (PDT), with the mitochondrial photosensitizer Pc 4, induces a concentration-dependent loss of Bcl-2 proteins, in the human breast cancer MCF-7 (WS8) cell line, contributing to apoptosis induction after this treatment. So, the significant increase in the apoptotic

cells, 6h after treatment with MB+PAR, is probably related to the regulation of genes observed 3h after the same treatment.

Anyway, we have observed that apoptosis occurs in both treatments (MB and MB+PAR), but the pathways seems to be distinct. In MB treatment, it was observed just a down-regulation of anti-apoptotic *bcl-2* gene expression after 3 and 12h of treatments, without any other alteration on gene expression. In this case, other genes could be being regulated beyond the genes analyzed in this study, for example, other pro-apoptotic genes, like *puma*. Expression analysis revealed that while γ irradiation induced an increase of three to four times the gene expression of *noxa*, *puma* expression increased of almost 100 times in zebrafish embryos (Kratz et al., 2006). Similar results have also been seen in mammalian cells (Erlacher et al., 2005). In accordance to this, in mice with either *noxa* or *puma* disrupted it was observed a decreased DNA damage-induced apoptosis in fibroblasts, although only loss of *puma* protected lymphocytes from cell death (Villunger et al., 2003). Therefore, *puma* is critical mediator of the apoptotic responses induced by p53 and other agents (Hotchkiss et al., 2009).

Besides regulating different genes, MB alone could be activating transcriptional-independent pathways for apoptosis. It is known that p53 has complex functions as a nuclear transcription factor but recent studies also shown that this protein may act in the cytoplasm and mitochondria to promote apoptosis by mechanisms independent of transcription. Different mechanisms of this pathway have been proposed. For example, functional interactions between p53 and members of the Bcl-2 family provide the basis for this alternative cell death pathway mediated by p53. Even with many studies on p53, this mechanism is still considered new and unknown in fish (Steele et al., 2008; Speidel, 2009; Vousden & Prives, 2009).

In conclusion, ZFL line is sensitive to photodynamic action of methylene blue. Both equitoxic concentrations of methylene blue alone and methylene blue in the presence of photosynthetically active radiation are able to generate DNA damage and induces apoptosis in this cell line. However, the pathways leading to apoptosis appear to be distinct among treatments. In the MB+PAR treatment it was observed a regulation of genes involved in apoptosis, which did not occur in the treatment with MB alone. In the treatment with MB, others genes may have been regulated or yet apoptosis may have occurred through independent-transcription pathways. This study revealed important

information about the pathways involved in apoptosis in ZFL cell line induced by stress. Such pathways may vary according to the situation and this model proved to be relevant for these studies.

References

- Bebber, F.V., Paquet, D., Hruscha, A., Schmid, B., Haass, C. 2010. Methylene blue fails to inhibit Tau and polyglutamine protein dependent toxicity in zebrafish. *Neurobiology of Disease*, 39, 265-271.
- Begley, T.J., Samson, L.D. 2004. Network responses to DNA damaging agents. *DNA Repair*, 3, 1123-1132.
- Berra, C.M., Oliveira, C.S., Garcia, C.C.M., Rocha, C.R.R., Lerner, L.K., Lima, L.C.A., Baptista, M.S., Menck, C.F.M. 2013. Nucleotide excision repair activity on DNA damage induced by photoactivated methylene blue. *Free Radical Biology and Medicine*, 61, 343-356.
- Bilski, P., Belanger, A.G., Chignel, C.F. 2002. Photosensitized oxidation of 2,7-dichlorofluorescein: singlet oxygen does not contribute to the formation of fluorescent oxidation product 2,7-dichlorofluorescein. *Free Radical Biology & Medicine*, 33 (7), 938-946.
- Blass, N., Fung, D. 1976. Dyed but not dead-methylene blue overdose. *Anesthesiology*, 45, 458-9.
- Broughton, R.E., Milam, J.E., Roe, B.A. 2001. The complete sequence of the zebrafish (*Danio rerio*) mitochondrial genome and evolutionary patterns in vertebrate mitochondrial DNA. *Genome Research*, 11, 1958-1967.
- Cadwell, C., Zambetti, G.P. 2001. The effects of wild-type p53 tumor suppressor activity and mutant p53 gain-of-function on cell growth. *Gene*, 277, 15-30.
- Chen, X., Zhong, Z., Xu, Z., Chen, L., Wang, Y. 2010. 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein as a fluorescent probe for reactive oxygen species measurement: Forty years of application and controversy. *Free Radical Research*, 44 (6), 587-604.
- Crescenzi, E., Varriale, L., Iovino, M., Chiaviello, A., Veneziani, B.M., Palumbo, G. 2004. Photodynamic therapy with indocyanine green complements and enhances low-

dose cisplatin cytotoxicity in MCF-7 breast cancer cells. *Molecular Cancer Therapeutics*, 3 (5), 537-544.

Di Giulio, R.T., Benson, W.H., Sanders, B.M., Van veld, P.A. 1995. Biochemical mechanisms: metabolism, adaptation, and toxicity. *Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate, and risk assesment*. Rand, G.M. ed. Ed. Taylor & Francis, Washington, 1125 pp.

Dröge, W. 2002. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiological Reviews*, 82, 47-95.

Erlacher, M., Michalak, E.M., Kelly, P.N., Labi, V., Niederegger, H., Coultas, L., Adams, J.M., Strasser, A., Villunger, A. 2005. BH3-only proteins Puma and Bim are rate-limiting for gamma-radiation-and glucocorticoid-induced apoptosis of lymphoid cells in vivo. *Blood*, 106, 4131-4138.

Grivicich, I., Regner, A., Rocha, A.B. 2007. Apoptosis: Programmed Cell Death. *Revista Brasileira de Cancerologia*, 53 (3), 335-343.

Hotchkiss, R.S., Strasser, A., McDunn, J.E., Swanson, P.E. 2009. Mechanisms of Disease. Cell death. *The New England Journal of Medicine*, 36, 1570-1583.

Inohara, N., Nunez, G. 2000. Genes with homology to mammalian apoptosis regulators identified in zebrafish. *Cell Death and Differentiation*, 7, 509-510.

Kawanishi, S., Hiraku, Y., Oikawa, S. 2001. Mechanism of guanine-specific DNA damage by oxidative stress and its role in carcinogenesis and aging. *Mutation Research*, 488, 65-76.

Konan, Y.N., Gurny, R., Allemann, E. 2002. State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology*, 66, 89-106.

Kratz, E., Eimon, P.M., Mukhyala, K., Stern, H., Zha, J., Strasser, A., Hart, R., Ashkenazi, A. 2006. Functional characterization of the Bcl-2 gene family in the zebrafish. *Cell Death and Differentiation*, 13, 1631-1640.

- Lee, R., Kim, G.B. 2002. Comet assays to assess DNA damage and repair in grass shrimp embryos exposed to phototoxicants. *Marine Environmental Research*, 54, 465-469.
- Levine, A.J. 1997. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*, 88, 323-331.
- Machado, A.E. 2000. Photodynamic therapy: Principles, Potential of Application and Perspective. *Química Nova*, 23, 237-243.
- Martinou, J., Youle, R.J. 2011. Mitochondria in Apoptosis: Bcl-2 family Members and Mitochondrial Dynamics. *Developmental Cell*, 21, 92-101.
- McNair, F.I., Marples, B., West, C.M.L., Moore, J.V. 1997. A comet assay of DNA damage and repair in K562 cells after photodynamic therapy using haematoporphyrin derivative, methylene blue and meso-tetrahydro-xylphenylchlorin. *British Journal of Cancer*, 75 (12), 1721-1729.
- Mellish, K.J., Cox, R.D., Vernon, D.I., Griffiths, J., Brown, S.B. 2002. In Vitro Photodynamic Activity of a Series of Methylene Blue Analogues. *Photochemistry and Photobiology*, 75 (4), 392-397.
- Miranda, C.L., Collodi, P., Zhao, X., Barnes, D.W., Buhler, D.R. 1993. Regulation of cytochrome P450 expression in a novel liver cell line from zebrafish (*Brachydanio rerio*). *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 305, 320-327.
- Moreira, L.M., Lyon, J.P., Romani, A.P., Severino, D., Rodrigues, M.R., Oliveira, H.P.M. 2012. Phenothiazinium dyes as photosensitizers (PS) in photodynamic therapy (PDT): Spectroscopic properties and photochemical mechanisms. *InTech*, 14, 394-422.
- Ortiz, M., Fragoso, A., Ortiz, P.J., O'Sullivan, C.K. 2011. Elucidation of the mechanism of single-stranded DNA interaction with methylene blue: A spectroscopic approach. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 218, 26-32.
- Pei, D., Strauss, P.R. 2013. Zebrafish as a model system to study DNA damage and repair. *Mutation Research*, 743-744, 151-159.

- Perussi, J.R. 2007. Photodynamic inactivation of microorganisms. *Química Nova*, 30, 988-994.
- Ribble, D., Goldstein, N.B., Norris, D.A., Shellman, Y.G. 2005. A simple technique for quantifying apoptosis in 96-well plates. *BMC Biotechnology*, 5 (12), 1-7.
- Sandrini, J.Z., Bianchini, A., Trindade, G.S., Nery, L.E.M., Marins, L.F.F. 2009a. Reactive oxygen species generation and expression of DNA repair-related genes after copper exposure in zebrafish (*Danio rerio*) ZFL cells. *Aquatic Toxicology*, 95, 285-291.
- Sandrini, J.Z., Trindade, G.S., Nery, L.E.M., Marins, L.F.F. 2009b. Time-course expression of DNA repair-related genes in hepatocytes of zebrafish (*Danio rerio*) after UV-B exposure. *Photochemistry and Photobiology*, 85, 220-226.
- Schmidt, S., Schultes B., Wagner, U., Oehr, P., Decler, W., Lubaschowski, H., Biersack, H.J., Krebs, D. 1991. Photodynamic laser therapy of carcinomas - effects of five different photosensitizers in the colony-forming assay. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 249, 9-14.
- Schirmer, R.H., Adler, H., Pickhardt, M., Mandelkow, E. 2011. "Lest we forget you — methylene blue . . ." *Neurobiology of Aging*, 32, 1-10.
- Seok, S.H., Baek, M.W., Lee, H.Y., Kim, D.J., Na, Y.R., Noh, K.J., Park, S.H., Lee, H.K., Lee, B.H., Ryu, D.Y., Park, J.H. 2007. Arsenite-induced apoptosis is prevented by antioxidants in zebrafish liver cell line. *Toxicology In Vitro*, 21, 870-877.
- Sies, H. 1991. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *American Journal of Medicine*, 91, 31-38.
- Singh, N.P., MCCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L.A. 1988. Simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 175, 184-91.
- Slupphaug, G., Kavli, B., Krokan, H.E. 2003. The interaction pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. *Mutation Research*, 531, 231-251.

Speidel, D. 2009. Transcription-independent p53 apoptosis: an alternative route to death. *Trends in Cell Biology*, 20 (1), 14-24.

Srivastava, M., Ahmad, N., Gupta, S., Mukhtar, H. 2001. Involvement of Bcl-2 and Bax in photodynamic therapy-mediated apoptosis. Antisense Bcl-2 oligonucleotide sensitizes RIF1 cells to photodynamic therapy apoptosis. *The journal of biological chemistry*, 276, 15481-15488.

Steele, A.J., Prentice, A.G., Hoffbrand, A.V., Yogashangary, B.C., Hart, S.M., Nacheva, E.P., Howard-Reeves, J.D., Duke, V.M., Kottaridis, P.D., Cwynarski, K., Vassilev, L.T., Wickremasinghe, R.G. 2008. p53-mediated apoptosis of CLL cells: evidence for a transcription-independent mechanism. *Blood*, 112, 3827-3834.

Steinert, S.A., Streib-montee, R., Leather, J.M. 1998. DNA damage in mussels at sites in San Diego Bay. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 399, 65-85.

Storer, N.Y., Zon, L.I. 2010. Zebrafish Models of p53 Functions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2, 1-12.

Vaccaro, A., Patten, S.A., Ciura, S., Maios, C., Therrien, M., Drapeau, P., Kabashi, E., Parker, J.A. 2012. Methylene Blue Protects against TDP-43 and FUS Neuronal Toxicity in *C. elegans* and *D. rerio*. *Plos one*, 7 (7), 1-10.

Villunger, A., Michalak, E.M., Coultas, L., Müllauer, F., Böck, G., Ausserlechner, M.J., Adams, J.M., Strasser, A. 2003. p53-and Drug-induced apoptotic responses mediated by BH3-only proteins Puma and Noxa. *Science*, 302,1036-1038.

Vousden, K.H., Prives, C. 2009. Blinded by the light: The growing complexity of p53. *Cell*, 137, 413-431.

Wainwright, M., Phoenix, D.A., Rice, L., Burrow, S.M., Waring, J. 1997. Increased cytotoxicity and phototoxicity in the methylene blue series via chromophore methylation. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 40, 233-239.

Wainwright, M. 2000. Methylene blue derivatives — suitable photoantimicrobials for blood product disinfection? *International Journal of Antimicrobial Agents*, 16, 381-394.

Wainwright, M. 2002. Pathogen inactivation in blood products. *Current Medicinal Chemistry*, 9, 127-143.

Wainwright, M., Giddens, R.M. 2003. Phenothiazinium photosensitisers: choices in synthesis and application. *Dyes and Pigments*, 57, 245-257.

Wainwright, M. 2005. The development of phenothiazinium photosensitisers. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2, 263-272.

Wong, R.S.Y. 2011. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 30 (87), 1-14.

Xue, L.Y., Chiu, S.M., Oleinick, N. 2001. Photochemical destruction of the Bcl-2 oncoprotein during photodynamic therapy with the phthalocyanine photosensitizer Pc 4. *Oncogene*, 20, 26, 3420-3427.

Yano, S., Hiroharab, S., Obatac, M., Hagiya, Y., Ogura, S., Ikeda, A., Kataoka, H., Tanaka, M., Joh, T. 2011. Current states and future views in photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, 12, 46-67.

Yabu, T., Kishi, S., Okazaki, T., Yamashita, M. 2001. Characterization of zebrafish caspase-3 and induction of apoptosis through ceramide generation in fish fathead minnow tailbud cells and zebrafish embryo. *Biochemical Journal*, 360, 39-47.

5. DISCUSSÃO GERAL

De maneira geral, o presente trabalho visou o estudo de vias importantes envolvidas na toxicidade do azul de metileno na presença ou não de luz visível. Para isto, as células do peixe *Danio rerio* foram expostas a concentrações equitóxicas de azul de metileno baseadas nos valores da CE_{50} para 24h de cada tratamento (38 $\mu\text{g/L}$ - azul de metileno e 5,6 $\mu\text{g/L}$ - azul de metileno na presença de luz visível). Estes valores de CE_{50} para cada tratamento (na presença ou não de luz visível) corroboram com o fato do azul de metileno ter baixa toxicidade quando comparado ao azul de metileno na presença de luz visível, e por isso ser amplamente utilizado na terapia fotodinâmica (Mellish et al., 2002; Wainwright & Giddens, 2003; Moreira et al., 2012).

Os principais resultados obtidos no presente estudo, bem como alguns pontos importantes para estudos futuros foram resumidos na Figura 4. Ambos os tratamentos com azul de metileno, na presença ou não de luz visível, foram capazes de gerar espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERON) e danos ao DNA, em pelo menos algum dos tempos estudados, o que está de acordo com outros estudos para diferentes modelos animais (Wainwright, 2000; Lee & Kim, 2002; Schirmer et al., 2011; Berra et al., 2013). Entretanto, no tratamento com azul de metileno na presença de luz visível, os níveis de ERON aumentaram significativamente apenas após 12h do tratamento, não sendo detectado aumento 3 e 6 h após da exposição. Este resultado parece contraditório, uma vez que a ação fotodinâmica do azul de metileno é conhecida por gerar uma grande quantidade de oxigênio singlete (representado como “ 1O_2 ” no esquema da Figura 4). Estudos já mostraram que o oxigênio singlete é altamente reativo e tem um tempo de vida curto, e que a troca de elétrons envolvida no processo da ação fotodinâmica é rápido (Wainwright, 2000; Machado, 2000; Wainwright & Giddens, 2003; Moreira et al., 2012), portanto o aumento dos níveis de ERON pode não ter sido detectada nos tempos analisados. Além disso, outro fator importante é o método utilizado. Neste sentido, estudos já relataram que o oxigênio singlete parece não reagir diretamente com o 2,7-Diclorodihidrofluoresceína (DCFH), mas pode fazê-lo apenas indiretamente, através de reação com substratos celulares que geram produtos de peróxidos e radicais peroxil, que são capazes de oxidar DCFH em reações subsequentes (Chen et al., 2010). Sendo assim, o aumento significativo dos níveis de ERON que observamos 12 h após o tratamento com azul de metileno na presença de luz visível, pode ter sido gerada por reações indiretas produzidas através da geração de oxigênio singlete.

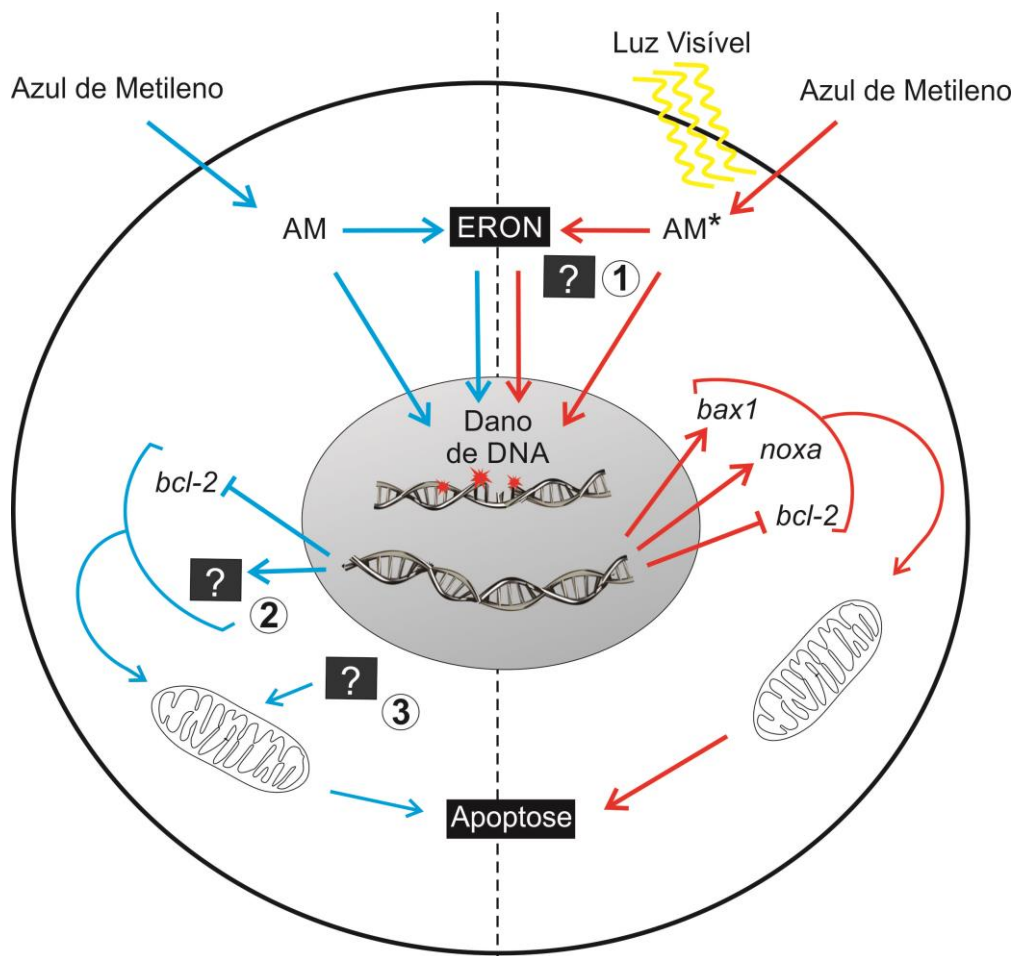


Figura 4- Esquema resumido dos principais resultados obtidos no presente estudo, bem como alguns pontos importantes para estudos futuros, representados por “?”. Para maiores detalhes, ver texto. As linhas azuis representam as vias alteradas pelo tratamento com azul de metileno sozinho, enquanto que as vermelhas representam as vias alteradas pela ação fotodinâmica do azul de metileno. As linhas com setas nas pontas indicam ativação/indução daquela via, enquanto que as linhas com traço nas pontas indicam inibição da mesma.

Em geral, estudos recentes mostram que diversos fatores podem iniciar a apoptose, e que vários mecanismos diferentes podem estar envolvidos (Hotchkiss et al., 2009). Com relação à expressão de genes, aspectos importantes sobre a toxicidade e fototoxicidade do azul de metileno foram revelados neste trabalho. Em geral, o tratamento com azul de metileno na presença de luz visível levou à alteração da

regulação de importantes genes envolvidos na apoptose (diminuição da expressão do gene anti-apoptótico *bcl-2* e aumento na expressão dos genes pró-apoptóticos *bax1* e *nox1*) já em 3 h após o tratamento. Relacionado com este resultado, foi observado 6 h após este mesmo tratamento um aumento na % de células em apoptose. Contudo, no tratamento com azul de metileno na ausência de luz visível, apenas o gene *bcl-2* apresentou uma alteração de sua expressão, também mostrando uma diminuição de sua expressão em 3 e 12h após o tratamento. Neste mesmo tratamento, um aumento na % de apoptose só foi observada a partir de 12 h após o tratamento. Neste sentido, além dos genes estudados, outros genes poderiam estar regulando a entrada das células em apoptose após o tratamento com azul de metileno na ausência de luz visível (representado como “?” 2, no esquema da Figura 4). Neste sentido, pode-se citar o gene *puma*, que tem se mostrado importante na indução da via intrínseca da apoptose em vários organismos modelos, incluindo o peixe *Danio rerio* (Villunger et al., 2003; Erlacher et al., 2005; Kratz et al., 2006).

Além da participação de outros genes neste processo, outra hipótese levantada esta relacionada com a proteína p53 (representado como “?” 3, no esquema da Figura 4), que também tem se mostrado relevante no que diz respeito à via intrínseca da apoptose. Estudos recentes relataram que esta proteína pode induzir a apoptose por mecanismos independentes de seu papel como fator de transcrição, atuando no citoplasma e mitocôndrias da célula (Speidel, 2009; Vousden & Prives, 2009).

Neste estudo parecem ter sido ativadas vias diferentes em cada situação (após tratamento com azul de metileno e azul de metileno na presença de luz visível). Estudos com a mesma linhagem celular do presente estudo observaram diferentes respostas relacionadas à sinalização celular após exposição a diferentes agentes tóxicos. Quando os hepatócitos de *Danio rerio* são expostos a UVB, um tipo de radiação não-ionizante que atua diretamente sobre a molécula de DNA, as respostas são dependentes da proteína p53, com conseqüente indução da expressão de genes envolvidos no sistema de resposta ao dano de DNA (Sandrini et al., 2009a). Porém, quando estas células foram expostas ao cobre, um metal capaz de gerar ERO, a resposta parece não depender da proteína p53, sendo que pode inclusive haver uma inibição da proteína p53 (Sandrini et al., 2009b).

Em conclusão, a linhagem de hepatócitos de *Danio rerio* foi sensível à ação fotodinâmica do azul de metileno e o azul de metileno, na presença ou não de luz visível, pode causar danos ao DNA e induzir apoptose nesta linhagem. Entretanto, as vias que levam a apoptose em cada tratamento parecem ser distintas. Mais estudos devem ser feitos para elucidar os mecanismos envolvidos.

REFERÊNCIAS

- Agnez-Lima, L.F., Melo, J.T.A., Silva, A.E., Oliveira, A.H.S., Timoteo, A.R.S., Lima-Bessa, K.M., Martinez, G.R., Medeiros, M.H.G., Mascio, P.D., Galhardo, R.S., Menck, C.F.M. 2012. DNA damage by singlet oxygen and cellular protective mechanisms. *Mutation Research*, 751, 15-28.
- Barzilai, A., Yamamoto, K.I. 2004. DNA damage responses to oxidative stress. *DNA Repair*, 3, 1109-1115.
- Bebber, F.V., Paquet, D., Hruscha, A., Schmid, B., Haass, C. 2010. Methylene blue fails to inhibit Tau and polyglutamine protein dependent toxicity in zebrafish. *Neurobiology of Disease*, 39, 265-271.
- Begley, T.J., Samson, L.D. 2004. Network responses to DNA damaging agents. *DNA Repair*, 3, 1123-1132.
- Berra, C.M., Menck, C.F.M., Mascio, P.D. 2006. Oxidative stress, genome lesions and signaling pathways in cell cycle control. *Química Nova*, 29, 1340-1344.
- Berra, C.M., Oliveira, C.S., Garcia, C.C.M., Rocha, C.R.R., Lerner, L.K., Lima, L.C.A., Baptista, M.S., Menck, C.F.M. 2013. Nucleotide excision repair activity on DNA damage induced by photoactivated methylene blue. *Free Radical Biology and Medicine*, 61, 343-356.
- Blass, N., Fung, D. 1976. Dyed but not dead-methylene blue overdose. *Anesthesiology*, 45, 458-9.
- Brancaleon, L., Moseley, H. 2002. Laser and Non-laser Light Sources for Photodynamic Therapy. *Lasers in Medical Science*, 17, 173-186.
- Broughton, R.E., Milam, J.E., Roe, B.A. 2001. The complete sequence of the zebrafish (*Danio rerio*) mitochondrial genome and evolutionary patterns in vertebrate mitochondrial DNA. *Genome Research*, 11, 1958-1967.

- Bruner, S.D., Norman, D.P., Verdine, G.L. 2000. Structural basis for recognition and repair of the endogenous mutagen 8-oxoguanine in DNA. *Nature*, 403, 859-866.
- Cadwell, C., Zambetti, G.P. 2001. The effects of wild-type p53 tumor suppressor activity and mutant p53 gain-of-function on cell growth. *Gene*, 277, 15-30.
- Chao, D.T., Korsmeyer, S.J. 1998. BCL-2 Family: Regulators of Cell Death. *Annual Review of Immunology*, 16, 395-419.
- Chen, X., Zhong, Z., Xu, Z., Chen, L., Wang, Y. 2010. 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein as a fluorescent probe for reactive oxygen species measurement: Forty years of application and controversy. *Free Radical Research*, 44(6), 587-604.
- Collins, A.R., Gaivão, I. 2007. DNA base excision repair as a biomarker in molecular epidemiology studies. *Molecular Aspects of Medicine*, 28, 307-322.
- David, S.S., O'Shea, V.L., Kundu, S. 2007. Base-excision repair of oxidative DNA damage. *Nature*, 447, 941-950.
- Di Giulio, R.T., Benson, W.H., Sanders, B.M., Van veld, P.A. 1995. Biochemical mechanisms: metabolism, adaptation, and toxicity. *Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate, and risk assesment*. Rand, G.M. ed. Ed. Taylor & Francis, Washington, 1125 pp.
- El-Deiry, W.S. 1998. Regulation of p53 downstream genes. *Cancer Biology*, 8, 345-357.
- Erlacher, M., Michalak, E.M., Kelly, P.N., Labi, V., Niederegger, H., Coultas, L., Adams, J.M., Strasser, A., Villunger, A. 2005. BH3-only proteins Puma and Bim are rate-limiting for gamma-radiation-and glucocorticoid-induced apoptosis of lymphoid cells in vivo. *Blood*, 106, 4131-4138.
- Fortini, P., Pascucci, B., Parlanti, E., D'Errico, M., Simonelli, V., Dogliotti, E. 2003. 8-Oxoguanine DNA damage: at the crossroad of alternative repair pathways. *Mutation Research*, 53, 127-139.

Ghosh, C., Zhou, Y.L., Collodi, P. 1994. Derivation and characterization of a zebrafish liver cell line. *Cell Biology and Toxicology*, 10, 167-176.

Gorman, S.A., Brown, S.B., Griffiths, J. 2006. An overview of synthetic approaches to porphyrin, phthalocyanine, and phenothiazine photosensitizers for photodynamic therapy. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology*, 25(1-2)79-108.

Green, D.R., Reed, J.C. 2009. Mitochondria and Apoptosis. *Science*, 281, 1309-1312.

Grivicich, I., Regner, A., Rocha, A.B. 2007. Apoptosis: Programmed cell death. *Revista Brasileira de Cancerologia*, 53(3), 335-343.

Guaratini, C.L., Zanoni, M.V.B. 2000. Corantes têxteis. *Química Nova*, 23 (1), 71-78.

Hardwick, J., Soane, M.L. 2013. Multiple Functions of BCL-2 Family Proteins. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5 (2), 1-28.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. 2006. *Free Radicals in Biology and Medicine*, Ed 4. Clarendon Press, Oxford.

Halliwell, B., Whiteman, M. 2004. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *British Journal of Pharmacology*, 142, 231-55.

Hotchkiss, R.S., Strasser, A., McDunn, J.E., Swanson, P.E. 2009. Mechanisms of disease. Cell death. *The New England Journal of Medicine*, 36, 1570-1583.

Inohara, N., Nunez, G. 2000. Genes with homology to mammalian apoptosis regulators identified in zebrafish. *Cell Death and Differentiation*, 7, 509-510.

Júnior, D.R.A., Souza, R.B., Santos, S.A., Andrade, D.R. 2005. Oxygen free radicals and pulmonary disease. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, 31 (1), 60-68.

Kerr, J.R.F., Wyllie, A.H., Currie, A.R. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*, 26, 239-257.

Konan, Y.N., Gurny, R., Allemann, E. 2002. State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology*, 66, 89-106.

Kratz, E., Eimon, P.M., Mukhyala, K., Stern, H., Zha, J., Strasser, A., Hart, R., Ashkenazi, A. 2006. Functional characterization of the *Bcl-2* gene family in the zebrafish. *Cell Death and Differentiation*, 13, 1631-1640.

Lee, R., Kim, G.B. 2002. Comet assays to assess DNA damage and repair in grass shrimp embryos exposed to phototoxicants. *Marine Environmental Research*, 54, 465-469.

Levine, A.J. 1997. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*, 88, 323-331.

Machado, A.E.H. 2000. Photodynamic Therapy: Principles, potential of application and perspectives. *Química Nova*, 23, 237-243.

Martinou, J., Youle, R.J. 2011. Mitochondria in Apoptosis: Bcl-2 family Members and Mitochondrial Dynamics. *Developmental Cell*, 21(1), 92-101.

May, J.M., Qu, Z., Whitesell, R.R. 2003. Generation of oxidant stress in cultured endothelial cells by methylene blue: protective effects of glucose and ascorbic acid. *Biochemical Pharmacology*, 66, 777-784.

McIlwain, D.R., Berger, T., Mak, T.W. 2013. Caspase Functions in Cell Death and Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3 (5), 1-28.

Mellish, K.J., Cox, R.D., Vernon, D.I., Griffiths, J., Brown, S.B. 2002. In Vitro Photodynamic Activity of a Series of Methylene Blue Analogues. *Photochemistry and Photobiology*, 75(4), 392-397.

Miranda, C.L., Collodi, P., Zhao, X., Barnes, D.W., Buhler, D.R. 1993. Regulation of cytochrome P450 expression in a novel liver cell line from zebrafish (*Brachydanio rerio*). *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 305, 320-327.

- Moreira, L.M., Lyon, J.P., Romani, A.P., Severino, D., Rodrigues, M.R., Oliveira H.P.M. 2012. Phenothiazinium Dyes as Photosensitizers (PS) in Photodynamic Therapy (PDT): Spectroscopic properties and photochemical mechanisms. *InTech - Open Science Open Minds*, 14, 394-422.
- Perussi, J.R. 2007. Photodynamic inactivation of microorganisms. *Química Nova*, 30, 988-994.
- Portt, L., Norman, G., Clapp, C., Greenwood, M., Greenwood, M.T. 2011. Anti-apoptosis and cell survival: A review. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1813, 238-259.
- Rezzani, R., Rodella, L., Corsetti, G., Bianchi, R. 2001. Does Methylene Blue Protect the Kidney Tissues from Damage Induced by Ciclosporin A Treatment? *Nephron*, 89, 329-336.
- Robertson, P.K.J., Black, K.D., Adams, M., Willis, K., Buchan, F., Orr, H., Lawton, L., McCullagh, C. 2009. A new generation of biocides for control of crustacean in fish farms. *Journal of Photochemistry and Photobiology*, 95, 58-63.
- Ronsein, G.E., Miyamoto, S., Bechara, E., Mascio, P.D., Martinez, G.R. 2006. Singlet oxygen-mediated protein oxidation: damage mechanisms, detection techniques and biological implications. *Química Nova*, 29 (3), 563-568.
- Sandrini, J.Z., Bianchini, A., Trindade, G.S., Nery, L.E.M., Marins, L.F.F. 2009a. Reactive oxygen species generation and expression of DNA repair-related genes after copper exposure in zebrafish (*Danio rerio*) ZFL cells. *Aquatic Toxicology*, 95, 285-291.
- Sandrini, J.Z., Trindade, G.S., Nery, L.E.M., Marins, L.F.F. 2009b. Time-course expression of DNA repair-related genes in hepatocytes of zebrafish (*Danio rerio*) after UV-B exposure. *Photochemistry and Photobiology*, 85, 220-226.
- Santos, N.M.S., Vale, A., Reis, M.I.R., Silva, M.T. 2008. Fish and Apoptosis: Molecules and pathways. *Current pharmaceutical design*, 14, 148-169.
- Schirmer, R.H., Adler, H., Pickhardt, M., Mandelkow, E. 2011. “Lest we forget you — methylene blue . . .” *Neurobiology of Aging*, 32, 1-10.

Schneider, A.C.R., Santos, J.L., Porawski, M., Schaefer, P.G., Maurer, R.L., Matte, U., Silveira, T.R. 2009. Implementation of a new experimental animal model Zebrafish. *Revista do hospital de clínicas de Porto Alegre*, 29, 2, 100-103.

Seok, S.H., Baek, M.W., Lee, H.Y., Kim, D.J., Na, Y.R., Noh, K.J., Park, S.H., Lee, H.K., Lee, B.H., Ryu, D.Y., Park, J.H. 2007. Arsenite-induced apoptosis is prevented by antioxidants in zebrafish liver cell line. *Toxicology In Vitro*, 21, 870-877.

Sies, H. 1991. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *American Journal of Medicine*, 91, 31-38.

Sies, H., Jones, D. 2007. Oxidative stress, In: G. Fink (Ed.), *Encyclopedia of Stress*, vol. 3, Elsevier, Amsterdam, 45-48 pp.

Speidel, D. 2009. Transcription-independent p53 apoptosis: an alternative route to death. *Trends in Cell Biology*, 20 (1), 14-24.

Storer, N.Y., Zon, L.I. 2010. Zebrafish models of p53 functions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2, 1-12.

Sutcliffe, J.E., Brehm, A. 2004. Of flies and men; p53, a tumour suppressor. *FEBS Letters*, 567, 86-91.

Thannickal, V.J., Fanburg, B.L. 2000. Reactive oxygen species in cell signaling. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 279, 1005-1028.

Trindade, G.S., Farias, S.L.A., Rumjanek, V.M., Capella, M.A.M. 2000. Methylene blue reverts multidrug resistance: Sensitivity of multidrug resistant cells to this dye and its photodynamic action. *Cancer Letters*, 151, 161-167.

Vaccaro, A., Patten, S.A., Ciura, S., Maios, C., Therrien, M., Drapeau, P., Kabashi, E., Parker, J.A. 2012. Methylene Blue Protects against TDP-43 and FUS Neuronal Toxicity in *C. elegans* and *D. rerio*. *Plos one*, 7 (7), 1-10.

- Villunger, A., Michalak, E.M., Coultas, L., Müllauer, F., Böck, G., Ausserlechner, M.J., Adams, J.M., Strasser, A. 2003. p53-and Drug-induced apoptotic responses mediated by BH3-only proteins *puma* and *noxa*. *Science*, 302,1036-1038.
- Vousden, K.H., Prives, C. 2009. Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell*, 137, 413-431.
- Wagner, S.J. 2002. Virus inactivation in blood components by photoactive phenothiazine dyes. *Transfusion Medicine Reviews*, 16, 61-66.
- Wainwright, M. 2000. Methylene blue derivatives — suitable photoantimicrobials for blood product disinfection? *International Journal of Antimicrobial Agents*, 16, 381-394.
- Wainwright, M. 2002. Pathogen inactivation in blood products. *Current Medicinal Chemistry*, 9, 127-143.
- Wainwright, M., Giddens, R.M. 2003. Phenothiazinium photosensitisers: choices in synthesis and application. *Dyes and Pigments*, 57, 245-257.
- Wainwright, M. 2005. The development of phenothiazinium photosensitisers. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2, 263-272.
- Wong, R.S.Y. 2011. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 30 (87), 1-14.
- Yabu, T., Kishi, S., Okazaki, T., Yamashita, M. 2001. Characterization of zebrafish caspase-3 and induction of apoptosis through ceramide generation in fish fathead minnow tailbud cells and zebrafish embryo. *Biochemical Journal*, 360, 39-47.
- Yano, S., Hiroharab, S., Obatac, M., Hagiya, Y., Ogura, S., Ikeda, A., Kataoka, H., Tanaka, M., Joh, T. 2011. Current states and future views in photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, 12, 46-67.