



UNIVERSIDADE DO ESTADO DA BAHIA – UNEB
PROGRAMA PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS – PPGFARMA

ÉVILIN SAFIRA SILVEIRA RIBEIRO ROCHA

ESTUDO DO POTENCIAL CITOTÓXICO DA TERAPIA
FOTODINÂMICA COM DERIVADOS FENOTIAZÍNICOS EM
LINHAGENS CELULARES DERIVADAS DE CARCINOMA
ESCAMOCELULAR ORAL

Salvador

2023

ÉVILIN SAFIRA SILVEIRA RIBEIRO ROCHA

**ESTUDO DO POTENCIAL CITOTÓXICO DA TERAPIA
FOTODINÂMICA COM DERIVADOS FENOTIAZÍNICOS EM
LINHAGENS CELULARES DERIVADAS DE CARCINOMA
ESCAMOCELULAR ORAL**

Dissertação apresentada ao Programa Pós-Graduação *Stricto Sensu* Em Ciências Farmacêuticas (PPGFARMA), da Universidade do Estado da Bahia (UNEB) como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Cássio Santana Meira

Linha de Pesquisa: 1 – Prospecção de Fármacos e Recursos Naturais

Salvador

2023

FICHA CATALOGRÁFICA
Sistema de Bibliotecas da UNEB
Bibliotecária: Célia Maria da Costa CRB: 5/918

R672e Rocha, Évilin Safira Silveira Ribeiro

Estudo do potencial citotóxico da terapia fotodinâmica com derivados fenotiazínicos em linhagens celulares derivadas de carcinoma escamocelular oral / Évilin Safira Silveira Ribeiro Rocha. – Salvador, 2023.

68 f. : il.

Orientador: Cássio Santana Meira

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado da Bahia. Departamento Ciências da Vida. Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências Farmacêuticas – PPGFARMA, Campus I. 2023.

Contém referências e anexos.

1. Boca - Câncer. 2. Boca – Câncer - Prevenção. 3. Carcinoma de células escamosas. I. Meira, Cássio Santana. II. Universidade do Estado da Bahia. Departamento de Ciências da Vida. Campus I. III. Título.

CDD: 616.994

FOLHA DE APROVAÇÃO

**"ESTUDO DO POTENCIAL CITOTÓXICO DA TERAPIA FOTODINÂMICA USANDO
DERIVADOS FENOTIAZÍNICOS EM LINHAGENS CELULARES DERIVADAS DE
CARCINOMA ESCAMOCELULAR ORAL"**

EVILIN SAFIRA SILVEIRA RIBEIRO ROCHA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Ciências Farmacêuticas – PPGFARMA, em 28 de setembro de 2023, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade do Estado da Bahia, conforme avaliação da Banca Examinadora:

Cássio Santana Meira

Professor(a) Dr.(a) CÁSSIO SANTANA MEIRA
Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial - SENAI
Doutorado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa
Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz

Elisalva I. Guimarães

Professor(a) Dr.(a) ELISALVA TEIXEIRA GUIMARAES
Universidade do Estado da Bahia - UNEB
Doutorado em Patologia
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz/Fundação Oswaldo Cruz /BA

Simone Garcia Macambira

Professor(a) Dr.(a) SIMONE GARCIA MACAMBIRA
Universidade Federal da Bahia - UFBA
Doutorado em Ciências Biológicas (Biofísica)
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus filhos, marido, pais, orientador, a UNEB e ao Capes sem os quais eu não teria concluído este projeto.

AGRADECIMENTOS

Enquanto entusiasta da ciência e do aprendizado, desejei estudar e trilhar novos caminhos. Nas dificuldades encontradas ao longo dos anos, pude criar alicerce e ganhar forças para continuar. Dessa forma, gostaria de agradecer a toda a minha família, especialmente ao meu marido Luís, por ser um exemplo nato de inteligência e dedicação. Agradeço aos meus pais Sandra e Enos, por toda fé em mim depositada. Agradeço ainda, aos meus filhos Noah e Olívia, por serem a personificação do amor, a ignição e o combustível que me mantem na busca por condições melhores para toda a nossa família. Por vocês farei sempre esforço diário na tentativa de ser uma pessoa melhor.

Terei eterna gratidão aos meus professores da UNEB, especialmente ao meu orientador, Dr. Cássio Santana Meira, que sempre foi um exemplo de maestria profissional e que fez toda a diferença na forma de compartilhar seu conhecimento, de ser um verdadeiro mestre e de me servir diariamente como inspiração. Fico lisonjeada com a responsabilidade a que me confiou. Aos colegas de turma, deixo o meu profundo sentimento de que vencemos juntos, afinal, formamos uma turma que viveu dias de ensino adaptado por conta da pandemia de Covid-19.

Agradeço ainda aos colegas de grupo de pesquisa e dos laboratórios que frequentei ao longo dos últimos anos por todo conhecimento compartilhado, pela ajuda prestada e pelo suporte que me foi tão necessário em certos momentos. Gratidão à Larissa, Isabela, Maria Vitória, Ivan, Sérgio, Kamila, Leice, Jônatas, Maciel além de outros não menos importantes.

Agradeço à CAPES e ao CNPQ pela bolsa concedida durante o mestrado.

Por fim, agradeço imensamente a todos os que por acaso não foram citados, mas que direta ou indiretamente contribuíram para que esse trabalho fosse realizado.

Epígrafe

“Inteligência é a capacidade de se adaptar à
mudança”

-Stephen Hawking

RESUMO

ROCHA, É. S. S. R. **Estudo do potencial citotóxico da terapia fotodinâmica com derivados fenotiazínicos em linhagens celulares derivadas de carcinoma escamocelular oral** (dissertação). Salvador: Departamento de Ciências da Vida (DCV), Universidade do Estado da Bahia, 2023; 83p.

Entre os cânceres mais malignos, o carcinoma espinocelular oral (CECO) destaca-se como o tumor maligno de cabeça e pescoço mais comum, com alta prevalência em todo o mundo. Apesar dos avanços no campo do tratamento, o prognóstico dos pacientes com CECO permanece obscuro. A terapia fotodinâmica (TFD) surgiu como uma opção de tratamento promissora para vários tipos de câncer, incluindo o carcinoma espinocelular oral. Visando superar as limitações das terapias atualmente existentes contra o CECO, o presente trabalho visa investigar o potencial da TFD com derivados fenotiazínicos utilizados isoladamente ou em combinação. A incorporação de azul de metileno (MB) e azul de toluidina (TB) foi avaliada em linhagens celulares de CECO (HSC-3 e SCC-9) e em uma linhagem celular não tumoral (Hfib). Ambos os compostos exibiram concentração e incorporação dependente do tempo, com taxas mais elevadas observadas em células tumorais. Em relação à atividade citotóxica escura, as células SCC-9 foram a linhagem celular mais sensível, com valor CI_{50} de 362,6 μM e 41,4 μM para MB e TB, respectivamente. Utilizando TFD, todas as linhagens apresentaram maior sensibilidade, apresentando menores valores de CI_{50} quando comparados aos valores da fase escura, tendo novamente a linhagem celular SCC-9 apresentando maior sensibilidade. Por último, a atividade de citotoxicidade de MB e TB em combinação foi investigada contra células SCC-9. Os valores dos índices de combinação de 0,69 (fase escura) e 0,73 (fase clara) associados aos Isobogramas côncavos, em ambas as fases, revelaram que MB e TB apresentam efeitos sinérgicos quando combinados contra a viabilidade celular de células SCC-9. Estas descobertas sugerem que MB ou TB assistidos com TFD são promissores para o tratamento do CECO, e o efeito sinérgico da sua combinação justifica uma exploração mais aprofundada em outros tipos de células cancerígenas.

Palavras-chave: câncer; carcinoma espinocelular oral; terapia fotodinâmica; azul de metileno; azul de toluidina.

ABSTRACT

ROCHA, É. S. S. R. **Study of the cytotoxic potential of photodynamic therapy using phenothiazine derivatives in cell lineages derived from oral squamous cell carcinoma** (Dissertation). Salvador: Department of Life Sciences (DLS), State University of Bahia, 2023; 83p.

Among the most malignant cancers, oral squamous cell carcinoma (OSCC) stands out as the most common malignant head and neck tumor, with high prevalence around the world. Despite advances in the field of treatment, the prognosis of patients with OSCC remains poor. Photodynamic therapy (TFD) has emerged as a promising treatment option for various cancer types, including oral squamous cell carcinoma. Aiming to overcome the limitations of the currently existing therapies against OSCC, the present work aims to investigate the potential of TFD with phenothiazine derivatives used alone or in combination. The incorporation of methylene blue (MB) and toluidine blue (TB) was evaluated in OSCC cell lines (HSC-3 and SCC-9) and a non-tumor cell line (Hfib). Both compounds exhibited concentration and time-dependent incorporation, with higher rates observed in tumor cells. Regarding dark cytotoxic activity, SCC-9 cells was the most sensitive cell line with IC_{50} value of 362.6 μ M and 41.4 μ M for MB and TB respectively. Using TFD, all lineages showed greater sensitivity, presenting lower IC_{50} values when compared to the dark phase values, again having the SCC-9 cell line showing the highest sensitivity. Lastly, the cytotoxicity activity of MB and TB in combination was investigated against SCC-9 cells. The combination indexes values of 0.69 (dark phase) and 0.73 (clear phase) associated with concave isobolograms, in both phases, revealed that MB and TB have synergistic effects when combined against cell viability of SCC-9 cells. These findings suggest that MB or TB assisted with TFD holds promise for OSCC treatment, and the synergistic effect of their combination warrants further exploration in other cancer cell types.

Keywords: cancer; oral squamous cell carcinoma; photodynamic therapy; methylene blue; toluidine blue

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

am TFD	Terapia fotodinâmica microbiana (do inglês <i>Antimicrobial Photodynamic Therapy</i>)
ATP	Trifosfato de adenosina (do inglês: <i>adenosine triphosphate</i>)
ATCC	American Type Culture Collection
ANOVA	Análise de variância (do inglês: <i>analysis of variance</i>)
B7	Ligantes de receptores de superfície de linfócitos T
CC₅₀	Concentração citotóxica para 50%
CE₅₀	Concentração efetiva de 50%
CI₅₀	Concentração inibitória de 50%
CTLA-4	Proteína 4 associada a linfócitos T citotóxicos (do inglês: <i>Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4</i>)
DMEM	Meio Eagle Modificado por Dulbecco (do inglês: <i>Dulbecco's Modified Eagle's medium</i>)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês: <i>Deoxyribonucleic acid</i>)
DP	Desvio do padrão (do inglês: <i>standard deviation</i>)
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FITC	Isotiocianato de fluoresceína (do inglês: <i>Fluorescein isothiocyanate</i>)
FS	Fotossensibilizador
FT	Fototerapia
GLOBOCAN	Observatório Global do Câncer (do inglês: <i>Global Cancer Observatory</i>)
HSC-3	Carcinoma de células escamosas de língua
H-FIB	Fibroblasto humano
HTP	Derivados hematoporfirínicos
IARC	Agência Internacional da Pesquisa do Câncer (do inglês:

	<i>International Agency for Research on Cancer)</i>
IC	Índice de combinação
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LASER	<i>Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation</i>
LDL	Lipoproteínas de baixa densidade (do inglês: <i>Low Density Lipoproteins</i>)
LED	Light Emitter Diode
MB	Azul de metileno (do inglês: <i>Methylene blue</i>)
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
PBS	Tampão fosfato salina (do inglês: <i>Phosphate buffered saline</i>)
PDI	<i>Photodynamic Inactivation</i>
PACT	<i>Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy</i>
TFD	<i>Photodynamic therapy</i>
PD-1	Proteína expressa por células tumorais
PDL1	<i>Programmed cell death ligand 1</i>
RPMI	Meio de cultura desenvolvido no <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SCC9	Carcinoma escamocelular oral humano
SDS	Dodecil sulfato de sódio
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
TB	Azul de toluidina (do inglês: <i>Toluidine blue</i>)
TFD	Terapia fotodinâmica
UNEB	Universidade do Estado da Bahia
WHO	Organização Mundial da Saúde (do inglês: <i>World Health Organization</i>)
UV	Ultravioleta

LISTA DE FIGURAS

Figura 01.	O que é câncer?	19
Figura 02.	Taxas de incidência e mortalidade padronizadas por idade estimadas (Mundial) em 2020, em todo o mundo, ambos os sexos, todas as idades.	21
Figura 03.	O processo metastático.	22
Figura 04.	Principais sítios anatômicos de Carcinoma de Células Escamosas de Cabeça e Pescoço.	23
Figura 05.	Leucoplasia.	25
Figura 06.	Reação fotoquímica da terapia fotodinâmica. Diagrama de Jablonski modificado.	31
Figura 07.	Profundidade de penetração dos diferentes comprimentos de onda.	32
Figura 08.	Feixes emitidos por diferentes fontes (Laser x LED).	34
Figura 09.	Estrutura das moléculas em teste.	35
Figura 10.	Desenho experimental.	37
Figura 11.	Incorporação do MB ao longo do tempo em diferentes linhagens celulares.	40
Figura 12.	Incorporação do AT ao longo do tempo em diferentes linhagens celulares.	42
Figura 13.	Efeitos de MB e TBO na viabilidade celular de linhagens celulares.	44
Figura 14.	Isoblograma descrevendo os efeitos sinérgicos de AM e AT na viabilidade celular da linhagem SCC-9.	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Linhagens celulares utilizadas no ensaio de citotoxicidade para determinação de CI_{50}**página 36**

Tabela 2. Atividade citotóxica de MB e TB em diferentes linhagens celulares na ausência (fase escura) ou presença (fase clara) de luz.....**página 43**

Tabela 3. Atividade de citotoxicidade de MB e TB em células SCC-9 isoladamente ou em combinação.....**página 46**

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	18
Geral.....	18
Específicos	18
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	19
3.1 Câncer.....	19
3.2 Câncer de boca	23
3.4 Terapia fotodinâmica	29
3.5 Mecanismo de ação da TPD	30
3.6 Fotossensibilizadores e fontes de luz.....	32
3.7 Derivados fenotiazínicos: Azul de metileno e azul de toluidina	34
4. MATERIAIS E MÉTODOS	35
4.1 Obtenção dos compostos.....	35
4.2 Obtenção e Manutenção das Células em Cultura	35
4.3 Ensaio de incorporação de droga.....	36
4.4 Avaliação de citotoxicidade	37
4.5 Terapia combinada	38
4.6 Análise estatística	38
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
5.1 Ensaio de incorporação do azul de metileno e azul de toluidina	38
5.2 Citotoxicidade da TPD com derivados fenotiazínicos	42
5.3 Terapia combinada: azul de metileno e azul de toluidina	45
6. CONCLUSÕES	47
REFERÊNCIAS	49
ANEXOS	59

1. INTRODUÇÃO

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de cem doenças que têm em comum a proliferação desordenada de células com capacidade de invasão e disseminação (WHO, 2022). Por definição científica, câncer é referenciado ao termo neoplasia, que por sua vez está associada a tumores malignos. Sendo assim, é uma doença caracterizada pela proliferação descontrolada de células transformadas, as quais se diferenciam pela capacidade de invadir tecidos e órgãos, vizinhos ou distantes (ALMEIDA *et al.*, 2005).

Dados globais apresentados pela Organização Mundial da Saúde apontam o câncer como a principal causa de morte no mundo e responsável por quase 10 milhões de mortes no ano de 2020 (WHO, 2022). Em 2040, espera-se uma incidência mundial de 30 milhões de novos casos (OPAS, 2023). O envelhecimento e o crescimento populacional, bem como mudanças na distribuição dos principais fatores de risco para o câncer, estando alguns desses associados ao desenvolvimento socioeconômico são fatores que contribuem para elevação acentuada da incidência do câncer (BRAY *et al.*, 2018). Dentre os tipos de neoplasias, o câncer de mama é o mais diagnosticado, com estimativa de 2,3 milhões de novos casos, seguidos pelo de pulmão, próstata e estômago. O câncer de pulmão continua sendo o principal causador de morte por câncer, estimando-se 1,8 milhão de mortes, seguido por câncer colorretal, fígado, estômago e mama (SUNG *et al.*, 2021).

O câncer de boca, por sua vez, caracteriza-se por uma neoplasia maligna com surgimento em lábio ou na cavidade oral e pode ser definido como um carcinoma de células escamosas devido ao seu perfil histológico. Segundo o Observatório Global do Câncer essa neoplasia ocupa a décima sétima posição em malignidade em todo o mundo 2023 (GLOBOCAN, 2023).

Os principais tratamentos para câncer, especialmente câncer de boca são a cirurgia, quimioterapia e radioterapia, usados em associação ou não, dependendo do protocolo desenvolvido pela equipe médica (LONGO; LOZZI; AZEVEDO, 2011). Na busca por novas alternativas terapêuticas, a utilização de terapia fotodinâmica (TFD) vem mostrando resultados promissores. A TFD é um tipo especial de tratamento que envolve o uso de um fotossensibilizador ou um agente

fotossensibilizante, juntamente com um tipo especial de luz que, combinados, induzem a produção de uma forma de oxigênio que é danosa a vários tipos celulares, incluindo células tumorais (NELKE *et al.*, 2014; CORREIA *et al.*, 2021; SANTOS *et al.*, 2017).

A TFD se apresenta como uma opção potencialmente aplicável, segura e acessível, sendo uma opção atraente comparada ao uso da quimioterapia convencional, principalmente no que se refere à não indução de resistência e de não exigir múltiplas sessões de tratamento (CHEN *et al.*, 2020; WANG, LUO, BASILION, 2021). A terapia fotodinâmica é uma modalidade terapêutica minimamente invasiva que é baseada na administração (sistêmica ou tópica) de um fotossensibilizador seguido de ativação de luz (CIVANTOS *et al.*, 2018). O fotossensibilizador é um tipo de pigmento fotoativo que gera oxigênio singlete por irradiação de luz visível usando um comprimento de onda que corresponde ao seu espectro de absorção (NAFEE *et al.*, 2013; LI *et al.*, 2016). O fotossensibilizador ativado pode reagir com moléculas em sua vizinhança por transferência de elétrons ou hidrogênio, levando à produção de radicais livres (reação tipo I) ou por transferência de energia para oxigênio, levando à produção de oxigênio singlete, causando danos às células tumorais de forma mais efetiva do que em células normais, resultando na morte seletiva dessas células via mecanismos apoptóticos ou necróticos (reação tipo II). Ambos os caminhos podem levar à morte celular e à destruição do tecido doente (BARBOSA *et al.*, 2012).

Dentre as diversas classes de fotossensibilizadores, as fenotiazinas se destacam por serem moléculas com grande potencial e propensão à formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) (VARGA *et al.*, 2017). Até o presente momento, mais de 5.000 derivados de fenotiazina foram obtidos e essa classe tem sido destacada por sua variedade de propriedades químicas e biológicas. As fenotiazinas apresentam algumas vantagens em relação a outros fotossensibilizadores considerando seu custo relativamente baixo e por não apresentar muitos efeitos adversos, já que é pouco ativado pela luz ambiente e rapidamente eliminado do organismo (ANDREADIS *et al.*, 2016). As mesmas são detentoras de inúmeras atividades promissoras, dentre elas: atividade bactericida, atividade antitumoral, antiviral, antifúngica, imunomoduladora, anticonvulsivante e

antiparasitária (HUBBLE, 1941; MITCHELL, 1994; WAINWRIGHT, 1998; BARBOSA *et al.*, 2012; GONZÉLEZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2021; OTREBA & KÓSMIDER, 2021).

Visando superar as limitações das terapias existentes atualmente contra o câncer na cavidade oral, faz-se necessário o estudo e desenvolvimento de novas estratégias a serem empregadas nos tratamentos aos pacientes acometidos por essas doenças. Nesse contexto, a utilização de derivados fenotiazínicos combinados com a terapia fotodinâmica tem sido estudada e apresenta resultados promissores no tratamento do câncer (GOMES *et al.*, 2018). Dessa forma, o presente trabalho visa investigar o potencial da terapia fotodinâmica com derivados fenotiazínicos frente linhagens celulares derivadas de carcinoma espinocelular de cavidade oral.

2. OBJETIVOS

2.1 GERAL

Avaliar o potencial citotóxico da TFD com derivados fenotiazínicos (azul de metileno e azul de toluidina) em linhagens celulares derivadas de carcinoma espinocelular de cavidade oral.

2.2 ESPECÍFICOS

- Determinar a incorporação de diferentes concentrações de azul de metileno e azul de toluidina em diferentes linhagens celulares;
- Comparar o efeito citotóxico da terapia fotodinâmica utilizando MB ou TB em linhagens de carcinoma espinocelular de cavidade oral e uma linhagem não tumoral;
- Avaliar a citotoxicidade do MB e do TB em linhagens de carcinoma espinocelular de cavidade oral e uma linhagem não tumoral;
- Investigar o efeito da combinação dos derivados fenotiazínicos sobre a proliferação de células da linhagem SCC-9, em diferentes linhagens.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Câncer

Câncer (tumores malignos ou neoplasias) é um termo genérico utilizado para designar um grande grupo de doenças multifatoriais que se caracteriza por uma multiplicação celular anormal, que atinge além de seus limites habituais e, que pode, em seguida, invadir partes adjacentes do corpo, se espalhando para outros órgãos (SUHAIL *et al.*, 2019; WHO, 2022). As células tumorais são células transformadas que possuem alterações genéticas adquiridas e/ou herdadas, que podem se transformar num câncer a depender das mutações apresentadas (CREE, 2011; WHO, 2022). Existem ainda agentes externos que interagem com essas alterações, sendo eles os carcinógenos físicos (ex. radiação ultravioleta); carcinógenos químicos (ex. amianto, fumaça do tabaco); e os carcinógenos biológicos (ex. certos vírus e bactérias) (KENTSIS, 2020). Esses agentes cancerígenos são classificados pelo International Agency for Research on Cancer (IARC) (WHO, 2022). Dessa forma, existem alguns fatores de risco bastante conhecidos e difundidos como o uso de tabaco, consumo de álcool, alimentos ultraprocessados, poluição do ar, excesso de exposição ao sol, sedentarismo, stress, tabagismo dentre outros, são exemplos a serem citados para o aumento do risco da ocorrência do câncer (AVGERINOS *et al.*, 2019; INCA, 2020; CREE, 2011; WHO, 2022). O processo de carcinogênese é descrito na **Figura 1**.

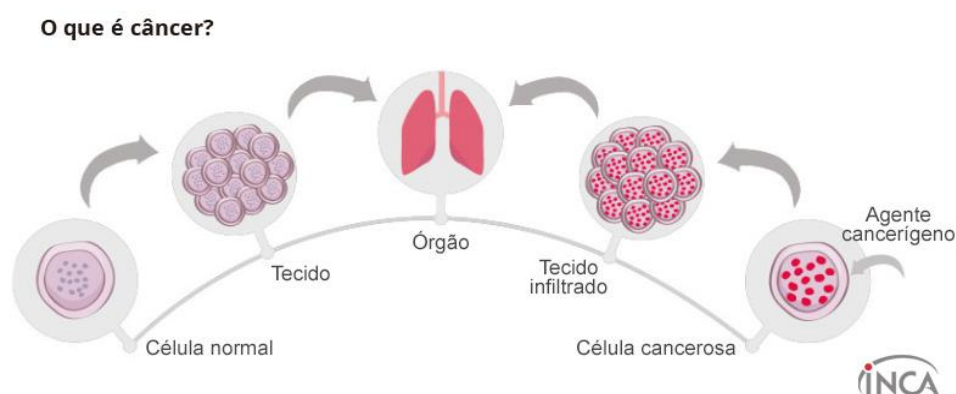


Figura 1. O que é câncer?. Fonte: Instituto Nacional do Câncer (2022).

A formação do câncer é um processo complexo, envolve diversos níveis diferentes de regulação e acontece de forma lenta e progressiva, sendo dividida didaticamente em três fases até se tornar ao estado de câncer detectável, sendo elas: iniciação, promoção e progressão (PETER & GONZALEZ, 2018; SPANDIDOS, 2007). Na fase de iniciação, as células sofrem o efeito de um agente carcinogênico que modifica a estrutura e/ou expressão de alguns de seus genes. Durante a etapa de promoção, as células alteradas geneticamente sofrem o efeito dos agentes carcinogênicos classificados como oncopromotores se transformando numa célula maligna, de forma gradual, necessitando de contato contínuo com o agente carcinogênico promotor. Finalmente, a fase de progressão se caracteriza por multiplicação celular descontrolada, sendo um processo irreversível, na qual o câncer já está instalado e culminará no aparecimento das primeiras manifestações clínicas da doença (SANTOS, 2017; INCA, 2021).

Hipócrates introduziu o termo câncer para descrever tumores, prioritariamente, malignos. Após Hipócrates surgiram várias outras definições a fim de tentar explicar o processo de carcinogênese. Após 2500 anos de registros sobre tumores os mesmos continuavam sem cura definitiva (LAKHTAKIA, 2014). Registros e teorias sobre o câncer foram descritos ao longo dos quase 5000 anos, descrevendo tumores em tecidos humanos e casos raros de cura espontânea. Cada uma destas doenças produz quadros clínicos diferentes e evoluem de formas distintas. Dessa forma os protocolos terapêuticos para cada tipo de câncer devem ser individualizados e personalizados, levando em consideração pelo menos o tipo de câncer, anamnese e o quadro clínico do paciente (LAKHTAKIA, 2014). Apesar da dificuldade inerente aos processos de análise de tumores em amostras seculares existem relatos de tumores em múmias do século 18, bem como outros casos (FELDMAN *et al.*, 2016). Percival Pott, um cirurgião inglês, em 1775, relatou que o câncer do escroto ocorreu em limpadores de chaminés em Londres e abriu margem para posteriores estudos sobre carcinógenos e mutagênicos (LIPSICK, 2021).

Um número expressivo representando entre 30% e 50% dos novos casos de câncer poderiam ser evitados com a diminuição apenas da exposição aos fatores de risco, adicionalmente, aplicando-se estratégias de prevenção baseadas em evidências. Além disso, vale destacar que esse volume poderia se reduzir ao passo que se for realizada a detecção precoce bem como os cuidados e tratamento

apropriados aos pacientes. Em caso de diagnóstico precoce somado ao tratamento adequado, as chances de cura para muitos tipos de câncer são elevadas (INCA, 2022; WHO 2022).

A prevenção do câncer pode-se dar através da adoção de medidas como: evitar o consumo de álcool, peso corporal saudável, manter dieta com inclusão de frutas e legumes, prática de atividade física regular, não consumir tabaco, estar vacinado contra papilomavírus e hepatite B, evitar radiação ultravioleta, e outras (INCA, 2023; SARICH *et al.*, 2020; THEODORATOU, 2017). Vale salientar que essas não são apenas ações preventivas que trazem benefícios para um indivíduo, mas na verdade são representativas com um aspecto importante em políticas de saúde (LEWANDOWSKA *et al.*, 2021).

Dentre os tipos mais comuns de câncer destacam-se mama (2,26 milhões de casos), pulmão (2,21 milhões de casos), cólon e reto (1,93 milhão de casos) e próstata (1,41 milhão de casos, representando mais de 70% de todos os tipos de câncer (WHO, 2022) **(Figura 2)**. Quanto aos tipos de câncer mais letais em 2020 elencam-se o câncer de pulmão (1,8 milhão de mortes), cólon e reto (916.000 mortes), hepático (830.000 mortes), gástrico (769.000 mortes) e o câncer de mama (685.000 mortes) (FERLAY *et al.*, 2018; WHO, 2022).

Taxas estimadas de incidência e mortalidade padronizadas por idade (Mundo) em 2020, Mundo, ambos os sexos, todas as idades (excl. NMSC)

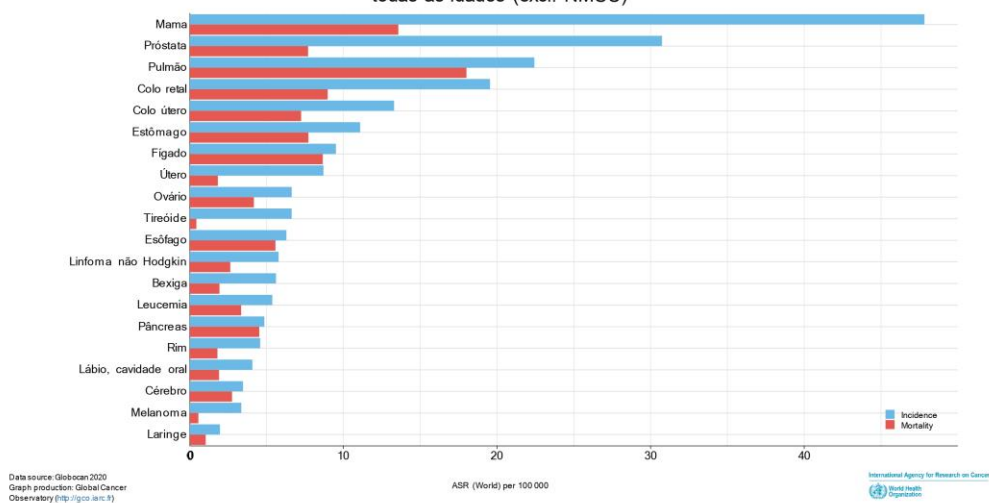


Figura 2. Estimativa de incidência e mortalidade de diferentes tipos de câncer, incluindo ambos os sexos e todas as idades. Fonte: GLOBOCAN, 2023.

O diagnóstico precoce do câncer é de fundamental importância na repercussão e diminuição da sua mortalidade (PAKRAVAN *et al.* 2021; INCA, 2012). Uma vez que a doença é detectada precocemente, aumenta a probabilidade de melhores respostas aos tratamentos, bem como pode-se ter mais chances de sobrevivência, diminuindo assim a morbidade e até barateando-se as terapias (CRAWFORD *et al.*, 2022). Sobretudo, existirá uma melhora significativa na qualidade de vida dos pacientes quando os cuidados precoces se iniciem.

Apesar dos expressivos avanços no diagnóstico e tratamento do câncer, persiste em muitos casos a situação em que células malignas provocam lesões aos tecidos adjacentes, causando inflamações e dores, podendo se espalhar por todo o corpo, através do processo chamado de metástase (LAMBERT *et al.*, 2017; ROSAS *et al.*, 2013). Muito embora o processo de metástase não seja completamente elucidado, alguns mecanismos estão associados com a sua ocorrência (**Figura 3**) (HANAHAN e WEINBERG, 2011).

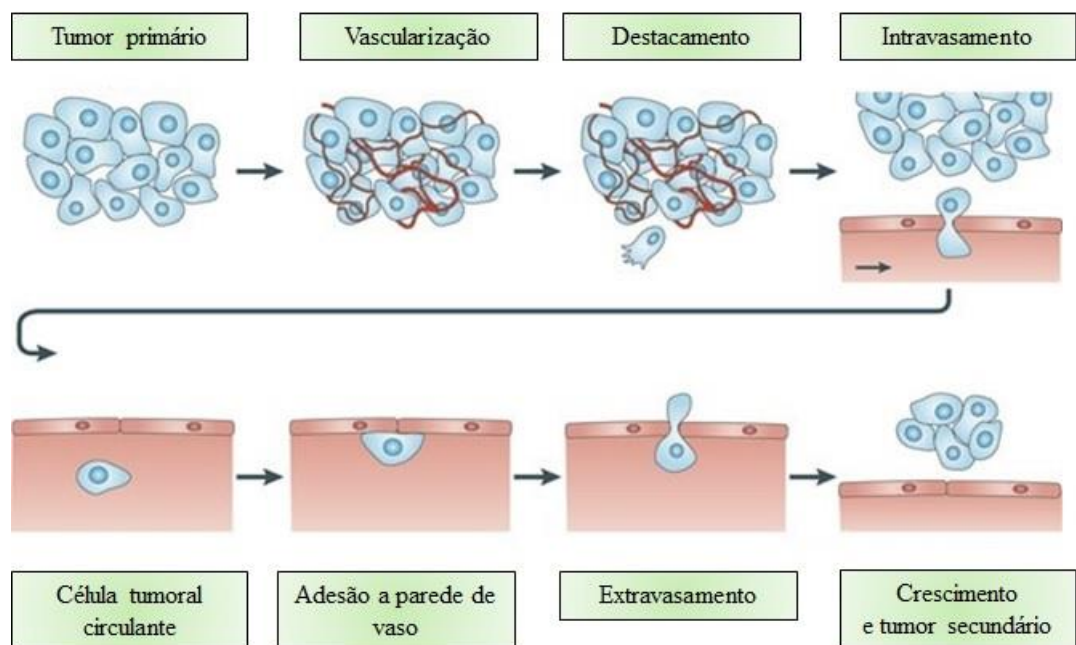


Figura 3. O processo metastático. Nesse processo complexo, as células se desprendem de um tumor primário vascularizado penetram no tecido circundante, entram nos vasos sanguíneos próximos (intravasamento) e circulam no sistema vascular. Algumas dessas células eventualmente aderem às paredes dos vasos sanguíneos e são capazes de extravasar e migrar para o tecido local, onde podem formar um tumor secundário. Fonte: Adaptado de WIRTZ; KONSTANTOPOULOS; SEARSON (2011).

3.2 Câncer de boca

O câncer de boca, também conhecido como câncer de cabeça e pescoço, compreende os lábios, as estruturas da boca, gengivas, bochechas, palato, língua e assoalho de língua (**Figura 4**) (RIVERA, 2015; INCA, 2022;).

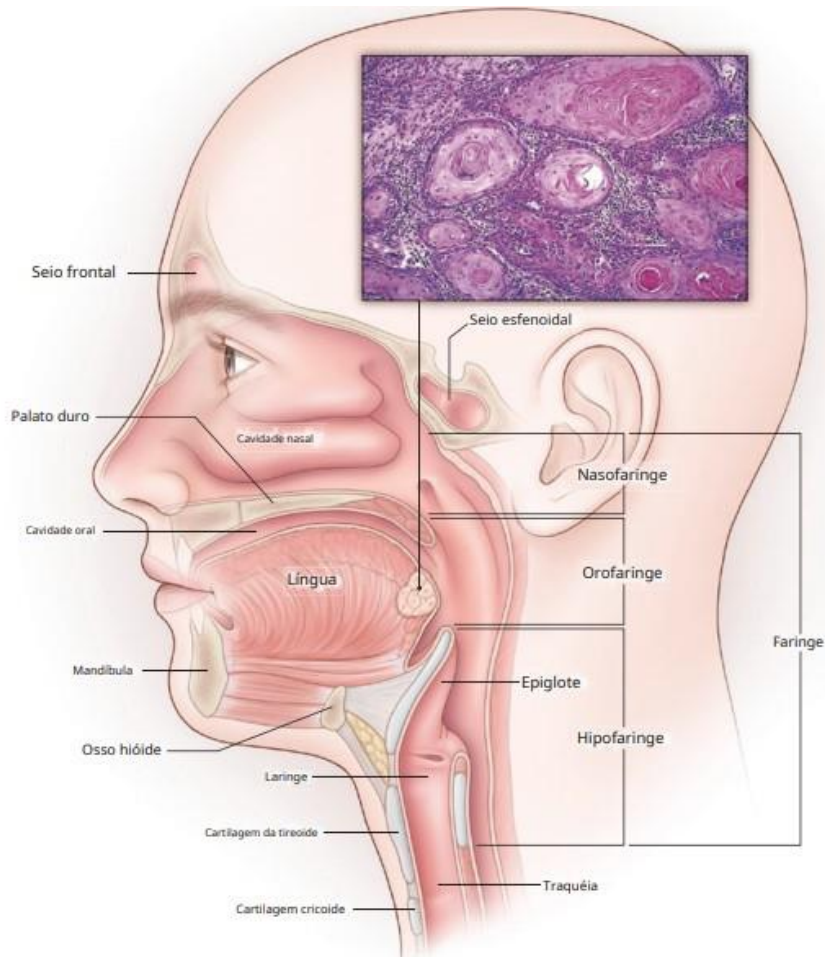


Figura 4 Principais sítios anatômicos de Carcinoma de Células Escamosas de Cabeça e Pescoço. Fonte: Adaptado de Chow (2020).

A neoplasia maligna mais frequente da cavidade oral e nos seus sítios adjacentes é o carcinoma espinocelular, representando mais de 90% de todos os cânceres de boca, tendo como padrão-ouro de tratamento a cirurgia, associada ou não a radioterapia e/ou quimioterapia. Quando não há indicação de cirurgia como em casos avançados, escolhe-se a radioterapia, que pode estar associada ou não a quimioterapia (PRIHANTONO, 2018; IRFAN *et al.*, 2020; SAMI *et al.*, 2020). A incidência de câncer bucal está aumentando, com números expressivos entre mulheres e jovens. Ao redor do mundo, são diagnosticados 350.000-400.000 novos

casos a cada ano. Bactérias, vírus, e fungos estão fortemente associados como fatores etiológicos em certos tipos de cânceres (GHOLIZADEH *et al.*, 2016).

A Organização Mundial da Saúde orienta que qualquer lesão suspeita que não desapareça dentro de duas semanas após ser detectada e que tenham sido removidas as causas locais de irritação necessitam ser biopsiadas (ABATI *et al.*, 2020; ATTY *et al.*, 2022; WHO, 2020). A biópsia cirúrgica continua sendo o padrão ouro para o diagnóstico de câncer bucal (LÓPEZ. OMAÑA-CEPEDA, SALAS, 2015). O manejo do câncer bucal representa um esforço multidisciplinar, uma vez que cada paciente apresenta um conjunto único de características e desafios cuja gestão impacta tanto na sobrevida quanto na qualidade de vida (WONG & WIESENFELD, 2018). A condução dos casos de cânceres da cavidade oral é complexa, por conta das implicações funcionais e estéticas do tratamento de tumores nesta região. Respiração, fala, deglutição, visão, olfato, paladar, mastigação e função da mandíbula são apenas algumas das funções críticas da cabeça e do pescoço que podem ser prejudicadas, temporária ou permanentemente quando acometidos pela doença (ABATI, 2020).

Os primeiros sintomas do câncer bucal são inespecíficos levando muitas vezes à suspeita de outras lesões e doenças menos graves. Dessa forma, a apresentação clínica do câncer bucal é altamente variável (SARODE *et al.*, 2020; RUTKOWSKA *et al.*, 2020). As apresentações mais comuns são a de uma lesão ulcerada na cavidade oral, os pacientes também podem apresentar unidades dentárias com mobilidade grau I, II ou III, sangramentos, dor ou dormência na boca ou face ou uma prótese mal ajustada (WONG & WIESENFELD, 2018).

Ainda sobre apresentações e tipos de lesões é importante salientar que elas podem representar uma grande variedade de diagnósticos sendo as lesões brancas da cavidade oral as mais relevantes. Leucoplasia bucal, que é definida como uma placa ou mancha branca, não-removível à raspagem e que não pode ser classificada clínica ou patologicamente como outra doença (MOHAMED & FAIROZEKHAN, 2023; LOMBARDO *et al.*, 2018). Essa é a lesão pré-cancerosa mais prevalente da cavidade oral e devido ao seu potencial de malignificação, os pacientes devem ser acompanhados periodicamente (**Figura 5**) (WEYLL *et al.*, 2012).



Figura 5. Leucoplasia. Fonte: WEYLL (2012).

Existem ainda as lesões eritematosas, que também devem levantar a suspeita de câncer bucal, lesões exofíticas, proliferativas ou papilomatosas (semelhantes a verrugas) também podem ser apresentações de câncer bucal. E, menos comumente, os cânceres de cavidade oral podem se apresentar como uma lesão cística ao redor de um dente, que mimetiza a de um cisto odontogênico (VONK *et al.*, 2020).

O câncer de cavidade oral, por sua vez, é um dos cânceres evitáveis mais comuns no mundo. Dessa forma, estratégias de saúde pública, como a conscientização e a triagem de doenças deve ser preconizada para sua prevenção e detecção precoce especialmente nos serviços públicos de saúde (INCA, 2020; WHO, 2021). O autoexame da boca apresenta-se com ambos os propósitos, ou seja, atuando tanto na prevenção como na detecção precoce das lesões, sendo um método de fácil execução, não invasivo e de baixo custo. Esse exame não só ajuda na detecção precoce de lesões orais suspeitas, mas também ajuda as pessoas a abandonar seus comportamentos de alto risco como o consumo de tabaco e álcool (SHRESTHA; MAHARJAN, 2020).

3.3 Terapias contra o câncer de boca

A oncologia oral manteve práticas primitivas de tratamento do câncer utilizando técnicas cirúrgicas com a simples remoção do que era relativamente superficial e visível das lesões até a metade do século XIX, quando finalmente a introdução do advento da anestesia geral permitiu o aumento das excisões e

ampliou os acessos cirúrgicos em 1846, viabilizando por exemplo a secção de lábio e mandíbula por Bernhard von Langenbeck (1810 a 1887) e seu colega Theodor Billroth (1829 a 1894) (INCHINGOLO *et al.* 2020).

Existem algumas alternativas para o tratamento do câncer de cavidade oral, sendo elas a cirurgia, a radioterapia, a quimioterapia, a terapia de fotorradiação com derivados hematoporfirínicos (HTP) e a imunoterapia, as quais geralmente são utilizadas em associação, uma vez que é observado aumento significativo da taxa de cura (ALMEIDA *et al.*, 2005; KATZUNG, 2014).

Acerca das modalidades de tratamento, a técnica cirúrgica, na ausência de metástases, é capaz de remover lesões de cânceres com eficácia, especialmente quando o diagnóstico é realizado precocemente (ALMEIDA *et al.*, 2005). A radioterapia (raios gama, radioisótopos como cobalto-60, raios-X e até prótons e mésons pi negativos), por sua vez, pode ser utilizada isoladamente, mas é comumente utilizada em conjunto com a cirurgia, apresentando incremento da eficiência do tratamento. Seu uso é fortemente indicado como única terapia em casos de tumores em estágios iniciais ou combinados para casos de estágios avançados. (SANTOS, 2017; ALTERIO *et al.*, 2019). No entanto, a radioterapia está sujeita a diversas limitações principalmente associadas aos efeitos adversos e aos cânceres sistêmicos (ALMEIDA *et al.*, 2005). Na verdade, embora a cirurgia e/ou radioterapia possam curar com sucesso as lesões primárias, muitos cânceres humanos desenvolvem metástases distantes que levam quase invariavelmente à morte (KOSTOVA, 2006).

A quimioterapia tem como principal objetivo a destruição das células neoplásicas, preservando as normais, dispondo da administração de fármacos com potencial anticâncer, buscando a regressão e destruição das células neoplásicas, entretanto os efeitos adversos, em geral, são frequentes (RODRIGUES *et al.*, 2012). Esses efeitos podem ser explicados pela alta citotoxicidade demonstrada pelos quimioterápicos frente às células com elevadas taxas de replicação, dentre elas as células gastrointestinais, células endoteliais e as células do sistema imunológico, convergindo em inúmeros efeitos adversos, tais como náusea, vômito, queda de cabelo, imunossupressão, dentre outros (KATZUNG *et al.*, 2014). Na atualidade, a quimioterapia ainda é utilizada principalmente em três situações clínicas, sendo elas:

o tratamento de indução primária para a doença avançada ou para cânceres que não existe outra abordagem efetiva, podendo ou não ser curativa; tratamento neoadjuvante para pacientes que apresentam doença localizada, as quais as formas locais de terapia não se mostraram totalmente adequadas, dessa forma, a quimioterapia auxilia na diminuição do câncer para realização da terapia local; e tratamento adjuvante para os métodos locais, que apresenta papel fundamental na redução da recidiva local e/ou sistêmica após a ressecção cirúrgica do câncer primário (KATZUNG, 2014). Almeida e colaboradores destacam a importância da precocidade do diagnóstico do câncer no sucesso da quimioterapia relacionando lesões com tamanho inferior a 1 cm. Uma lista extensa compõe as opções de quimioterápicos, dentre eles estão as antraciclinas (como doxorrubicina e epirrubicina), taxanos, carboplatina, ciclofosfamida e 5-fluorouracil.

A imunoterapia por sua vez, se fundamenta em auxiliar o próprio sistema imunológico do paciente a identificar e combater o câncer. A técnica significou um grande avanço científico no tratamento do câncer nos últimos anos, culminando no Prêmio Nobel de Medicina em 2018. Os pesquisadores James P. Allison e Tasuku Honjo fundamentaram a terapia baseada em inibição da regulação negativa do sistema imune. A inibição da ligação do CTLA-4 com B7 e PD-1 com PD-L1 viabiliza que o linfócito T CD8 esteja livre para promover uma resposta ao tumor. Porém, em alguns tipos de câncer, apenas uma fração dos pacientes atinge a remissão, associado a isso, o não conhecimento da durabilidade da resposta imunológica representa uma limitação da técnica (VASQUEZ *et al.*, 2020).

A combinação de dois ou mais tratamentos terapêuticos é fundamental na terapia do câncer, embora ainda a monoterapia seja uma modalidade de tratamento muito comum para algumas formas diferentes de câncer, este método convencional é geralmente considerado menos eficaz do que a abordagem de terapia combinada (MOKHTARI *et al.*, 2017). A terapia combinada pode ser capaz de reduzir os efeitos tóxicos em células normais ao mesmo tempo em que produz efeitos citotóxicos em células cancerosas tanto pela atuação em diferentes vias das células cancerígenas quanto por um efeito sinérgico ou aditivo entre as drogas, sendo necessárias menores dosagens (ALBAIN *et al.*, 2008; MOKHTARI *et al.*, 2013). Comumente, como em câncer de mama, observa-se tratamentos em que o paciente se submete à cirurgia para remoção de um tumor e também recebe os quimioterápicos. Em caso

de o procedimento cirúrgico acontecer primeiro, a quimioterapia será adjuvante. Caso a administração dos fármacos ocorra antes do procedimento de remoção, esse será indicado como neoadjuvante. Ainda como exemplo de terapias combinadas, pode-se citar o tratamento de câncer de cabeça e pescoço com cirurgia juntamente com a radioterapia, representando uma opção curativa para estágios iniciais ou avançados da doença (ALTERIO *et al.*, 2019). Adicionalmente, pode-se citar combinação de quimioterapia com a terapia fotodinâmica mediada por nanopartículas que vem se desenvolvendo em estudos *in vitro* (KHDAIR *et al.*, 2010).

Com base no cenário atual de opções terapêuticas para o tratamento de lesões de câncer de boca, muitos estudos têm mostrado a terapia fotodinâmica como mais uma alternativa como estratégia no combate às manifestações de lesões neoplásicas (TAN *et al.*, 2022). Pode-se destacar como vantagem dessa terapia a diminuição de efeitos adversos associados ao período pós tratamento antineoplásico quando comparado com outras modalidades de tratamento. No âmbito da saúde coletiva, a aplicação do tratamento por terapia fotodinâmica merece o destaque para o quesito de custo operacional menor frente aos outros tratamentos tradicionalmente utilizados, como por exemplo, quimioterapia e excisões cirúrgicas. Uma vez que a condução da TPD pode ser feita em âmbito ambulatorial, é possível reforçar a vantagem da mesma (LONGO; LOZZI; AZEVEDO, 2011).

A técnica de terapia fotodinâmica parte da premissa de que a interação de comprimentos específicos de onda eletromagnética com um composto não tóxico (fotossensibilizador) e oxigênio resulta em espécies reativas capazes de induzir morte celular (MACHADO, 2000). A terapia permite a localização e a destruição de cânceres com maior seletividade dispondo de radiação específica com fluorescência (λ de 620-640 nm) (MACHADO, 2000; DE MELO GOMES *et al.* 2023; TIAN *et al.*, 2023). É necessária a administração local ou sistêmica do fotossensibilizador associado ao uso radiação dirigida ao local dispondo de um laser (NSEYO, 1992; KWIATKOWSKI *et al.*, 2018). Entretanto, a terapia tem se mostrado efetiva apenas para cânceres cujo diâmetro não exceda cerca de 2 centímetros e com limitações frente a doença disseminada (MACHADO, 2000).

3.4 Terapia fotodinâmica

Existe divergência a respeito de quando se começou a utilizar a luz como terapia. Indícios apontam que foi há milhares de anos atrás e existem relatos de que os antigos egípcios, gregos e indianos, utilizavam a luz solar para tratar doenças como o vitiligo e psoríase, associado a ingestão de plantas (*Amni bajus*) e sementes da (*Psoralea corylifolia*), (BASTOS *et al.*, 2012). Hindus, bem como outros povos do Oriente Médio há 1400 anos, faziam o uso de plantas medicinais associado a exposição à luz do sol, para tratar o vitiligo e acredita-se que houve transmissão desse conhecimento por esses povos (DUARTE *et al.*, 2006; FOLEY *et al.*, 2011). Dados sobre essas práticas foram perdidos ao longo dos séculos, o que se deve a uma série de fatores, como desenvolvimento de terapias inovadoras antimicrobianas, fazendo com que a fotomedicina ficasse estacionada até a década de 60, quando começaram a surgir cepas resistentes aos antibióticos, e dessa forma houve a retomada dos estudos sobre o efeito fotodinâmico por Dougherty e seus colaboradores (FOLEY *et al.*, 2011; BASTOS *et al.*, 2012).

Muitos dos estudos sistemáticos das reações de fotossensibilização são referidos ao grupo de Oscar Raab, que nos anos de 1900, investigou a ação da eosina e da acridina em paramécios, que apresentavam um comportamento diferente quando incubadas com corantes em dias de tempestade, e dessa forma induziam uma perda de viabilidade nos protozoários (BASTOS *et al.*, 2012). Mas foi em 1903 que Niels Finsen, ganhador do prêmio Nobel, devido ao sucesso ao tratar lúpus vulgar utilizando a radiação ultravioleta (UV), que a fototerapia passou a ter maior visibilidade, ampliando sua prática e estudos no tratamento de várias dermatoses (RAJESH *et al.*, 2011). Em 1904, Hermann Von Tappeiner, que era orientador de Oscar, empregou combinação de eosina e a luz, para tratar o câncer de pele, conseguindo uma redução significativa do tumor e descreveu reações químicas dependentes de oxigênio como resultado de fotossensibilização. Na oportunidade ele inferiu o termo “ação fotodinâmica” (SILVA *et al.*, 2009; ANDREADIS *et al.*, 2016), já em 1925, Goeckerman introduziu a combinação do fotossensibilizador (FS) (Coaltar) com UV para tratar a psoríase, sendo essa abordagem utilizada por muito tempo (DUARTE *et al.*, 2006).

Na primeira e na segunda guerras mundiais, a fototerapia (FT) também foi utilizada, devido a várias publicações atribuindo efeitos sobre uma serie de infecções causadas por vírus, bactérias, protozoários e no tratamento de úlceras traumáticas, porém a sua utilização para desinfecção do sangue só foi sugerida em 1955, mesmo tendo sido feitos testes anteriores e tendo sua eficácia comprovada pelo Instituto Walter Reed, só foi praticada anos depois. Entre os anos 60 e 70 foram utilizados fotossensibilizadores antivirais em ensaios clínicos devido a sua responsividade, e a resistência aos medicamentos convencionais (WAINWRIGHT; BAPTISTA, 2011).

Uma formulação de derivados da hematoporfirina (Photofrin®), teve aprovação para o seu uso na clínica em 1993, associada a terapia fotodinâmica (TFD), para o tratamento oncológico e dermatológico, fazendo aumentar o interesse da comunidade acadêmica em estudar a ação fotodinâmica em todo o mundo (BASTOS *et al.*, 2012; GOMES *et al.*, 2018).

3.5 Mecanismo de ação da TPD

O mecanismo da terapia fotodinâmica consiste em três pilares fundamentais, o fotossensibilizador (FS), o oxigênio presente nas células tratadas, e a luz com comprimento de onda específico. A TFD é conhecida principalmente por induzir a morte celular por apoptose, no entanto, durante vários experimentos ao longo dos anos, foi observado que a TFD induz a morte celular por apoptose, necrose ou autofagia, bem como nos mecanismos mencionados, dependendo da localização do PS dentro das células tumorais (MOKOENA, GEORGE, ABRAHAMSE, 2021; DE MELO *et al.*, 2023). Em 1991 Agarwal *et al.* já haviam relatado uma resposta apoptótica à TPD, além de Seberi e colaboradores em 2022 ratificaram que a TPD destrói células tumorais com efeitos adversos mínimos.

Após a absorção da luz, quando utilizada no comprimento de onda adequado, o fotossensibilizador excitado pelo aumento de energia, induz a citotoxicidade por meio de dois mecanismos principais, sendo as reações do tipo I e reações do tipo II. No primeiro momento o mecanismo é semelhante para as duas reações (SANTOS, 2020). O FS é irradiado de acordo com seu espectro de absorção e então é convertido do seu estado fundamental de energia singleto S_0 para o estado excitado

singleto S_1 . Parte dessa energia é emitida em forma de fluorescência e o restante da energia pode partir para um cruzamento intersistema onde há mudança de spin do elétron excitado do FS formando um estado tripleto excitado T_1 (**Figura 6**) (MACDONALD & DOUGHERTY, 2001).

A reação tipo I se dá pelo FS excitado interagindo com os componentes do sistema, produzindo radicais livres. Ocorre uma captação de hidrogênio ou transferência de elétrons entre o FS no estado tripleto e uma molécula adjacente formando radicais iônicos, que interagem com moléculas de oxigênio no seu estado fundamental levando a produção de EROs. Como resultado final da reação acontece a produção de espécies reativas de oxigênio nas células desencadeando a morte celular (KWIATKOWSKI *et al*, 2018).

A reação tipo II por sua vez, promove a geração do oxigênio singleto através da transferência de energia do FS excitado no estado tripleto para o oxigênio também no estado tripleto (**Figura 6**) (YOON E JANG, 2012).

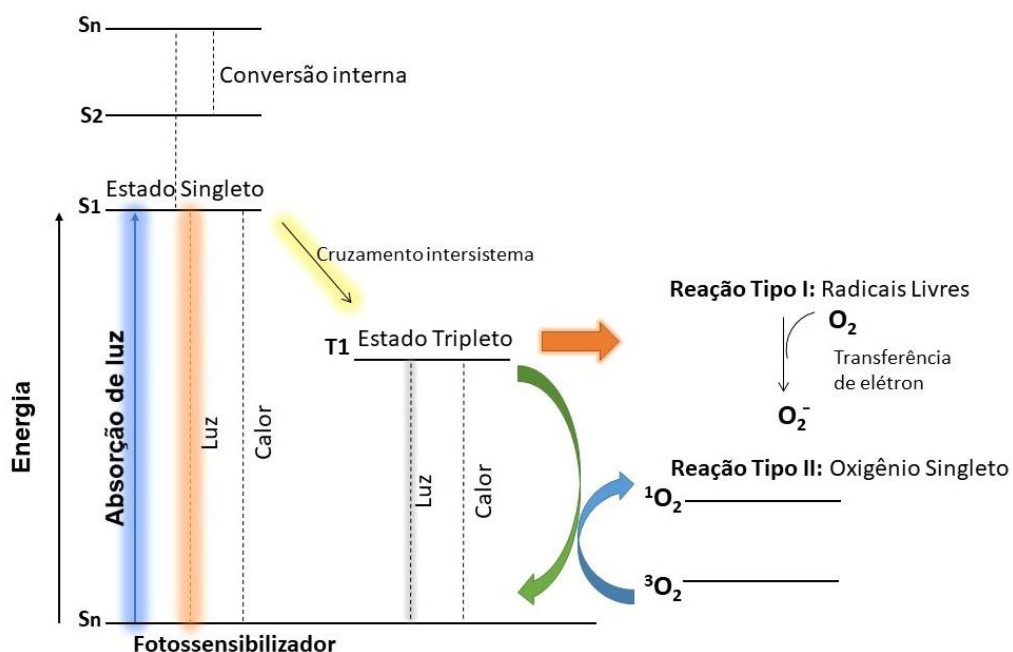


Figura 6. Reação fotoquímica da terapia fotodinâmica. Diagrama de Jablonski modificado descrevendo interação do fotossensibilizador com a luz e possíveis caminhos. Fonte: Autoria própria.

A execução do procedimento de TFD aparenta ser relativamente simples, no entanto, para que seja realizado de forma efetiva e bem sucedida é imperativo que se estabeleça corretamente os parâmetros da técnica e sua dosimetria. Uma vez que a luz chega aos tecidos deve-se considerar os efeitos de espalhamento, absorção e a profundidade de penetração dos variados comprimentos de onda (Figura 7). Dessa forma, é necessário saber selecionar lesões baseadas na sua extensão para receber o tratamento, bem como eleger o fotossensibilizador mais adequado atentando-se para o seu espectro de absorção, e por fim, ajustar o laser são de extrema importância para o sucesso dessa terapia (BAGNATO; REQUENA, 2023).

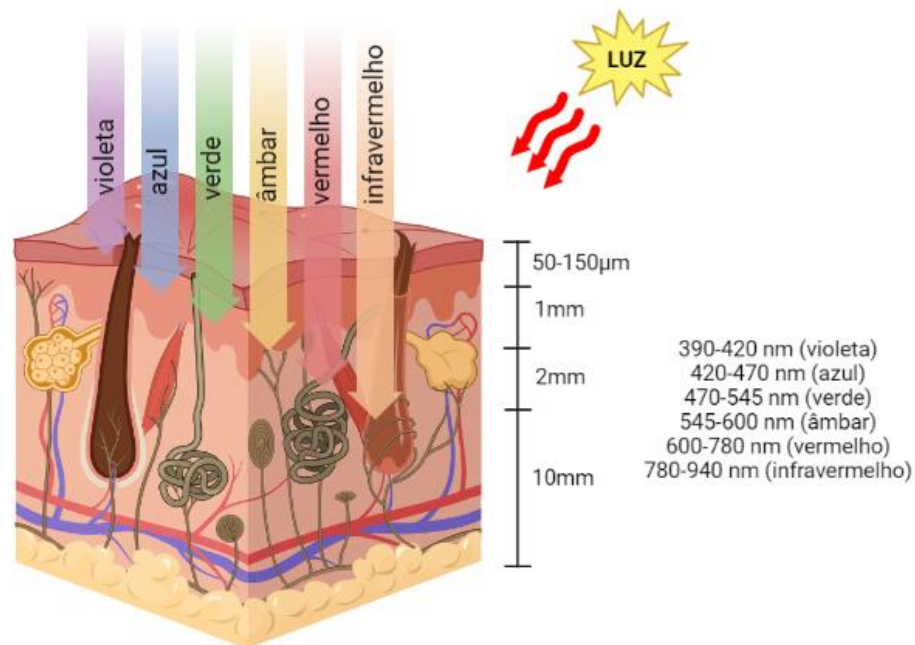


Figura 7. Profundidade de penetração dos diferentes comprimentos de onda na pele.

Fonte: Autoria própria.

3.6 Fotossensibilizadores e fontes de luz

A ação desses agentes corantes, conhecidos como fotossensibilizadores depende basicamente de dois tipos de reação, onde o fotossensibilizador, quando excitado reage diretamente com substratos oxidáveis, através de transferência de elétrons ou removendo átomos de hidrogênio de moléculas biológicas, como fosfolípidios, colesterol, entre outras, ou reagem com o oxigênio molecular

produzindo oxigênio singleto, e reduzindo o corante a seu estado fundamental (MARTIN & LOGSDON, 1987; NÚÑEZ, 2007).

A grande maioria dos agentes fotossensibilizadores tem seletividade por células alteradas, neoplásicas ou não, e isto ocorre porque as células em seu estado normal eliminam o corante em aproximadamente 24h enquanto as células neoplásicas, por exemplo, permanecem com o corante num intervalo de 24 a 72 h (National Cancer Institute, 2021; AGWAL et. al, 1991). Um fotossensibilizador ideal precisa atender as seguintes características: atoxicidade ou pouca toxicidade quando não irradiado; estabilidade cinética e termodinâmica; síntese rápida, e com alto rendimento; seletividade para a células-alvo; ser ampla e rapidamente absorvido pela célula; não ser absorvido ou ser eliminado rapidamente pelas células não-alvo; ter um comprimento de onda para sua ativação dentro do espectro; apresentar alta capacidade de produzir espécies reativas de oxigênio; não apresentar efeito mutagênico (GONZALES, 2007; VAN STRATEN *et al.*, 2017).

Exemplos de fotossensibilizadores são os derivados da hematoporfirina, curcumina, clorina, cianina e eles podem ser divididos de acordo com suas características, sendo de primeira, segunda e terceira geração (LEE et al., 2020). Quando comparados, os FS de segunda geração apresentam algumas vantagens em relação aos de primeira geração, destacando-se uma maior pureza química, maior rendimento na formação de oxigênio singleto, melhor seletividade para tecidos cancerígenos, melhor capacidade de penetração e uma eliminação mais rápida (BASKARAN, LEE, YANG, 2018).

As fenotiazinas certamente estão entre os compostos com maior versatilidade no que se refere a atividade biológica, sendo consideradas compostos básicos em farmacologia e isso está diretamente relacionado com sua ampla aplicabilidade e importância em diversas áreas da medicina. O azul de metileno, por exemplo, foi sintetizado pela primeira vez por Heinrich Caro em 1876 (VARGA *et al.*, 2017).

No que tange às fontes emissoras de luz, existem algumas que podem ser aplicadas na TFD sendo as mais comuns as do tipo LED (Light Emitter Diode) e LASER (Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation). A fonte de luz selecionada deve ser apropriada ao tecido alvo em relação às dimensões da lesão e/ou localização do tumor, bem como ser adequado ao fotossensibilizador

administrado. Lasers são comumente utilizados por produzirem uma luz monocromática coerente e direcional, concentrando-a em um estreito feixe. Podem ser ainda utilizados diodos emissores de luz (LEDs), como ilustrado na **Figura 8** e lâmpadas.

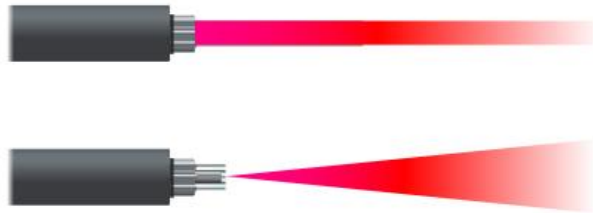


Figura 8. Feixes emitidos por diferentes fontes (Laser x LED). Fonte: Autoria própria.

3.7 Derivados fenotiazínicos: Azul de metileno e azul de toluidina

Os fenotiazínicos foram introduzidos na medicina veterinária em 1950 como tranquilizantes e denominados “neurolépticos” para indicar seus efeitos nas funções do sistema nervoso central (GROSS, 1995). Os fenotiazínicos são potenciais fotossensibilizadores propensos a formação de EROs, são compostos hidrofílicos, tricíclicos contendo nitrogênio e enxofre que veem sendo utilizados durante muitos anos, nos quais atualmente possuem cerca de 5 mil derivados, além das diversas propriedades químicas e biológicas, essa classe se destaca devido ao seu baixo custo, boa tolerância e a sua disponibilidade no mercado. A classe possui atividade contra uma série de microrganismos patogênicos e também como anticonvulsivante, analgésico e imunossupressor (WAINWRIGHT, 1998; BARBOSA, 2012).

O azul de metileno (MB) e o azul de toluidina (TB), são excelentes compostos fotossensibilizadores de grande interesse na área médica e odontológica, tanto para diagnóstico (corantes histopatológicos, identificação de tumores) como para tratamentos como: câncer, choque séptico, malária, metahemoglobinemia e Alzheimer (PREISER *et al.*, 1995; CLIFTON *et al.*, 2003; WONDRAK *et al.*, 2007). Apesar de possuírem propriedades físico-químicas semelhantes, sua eficácia fotodinâmica varia entre os microrganismos (DEMIDOVA, 2005), ambos se ligam ao DNA de bacteriófagos, entretanto em bactérias o efeito muda entre eles, uma vez

que o MB atua no DNA, o TB tem como sítio de atuação as membranas (BAGNATO, 2008).

Segundo Fernandez (1997), o MB em fase aquosa possui uma máxima absorção tecidual em 665 nm, já o TB em 636 nm, seja sistêmico ou tópico o uso desses fotossensibilizadores, possui uma baixa toxicidade (GARCEZ *et. al.*, 2003).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Obtenção dos compostos

Os derivados fenotiazínicos azul de metileno (MB) e azul de toluidina (TB) foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) (**Figura 9**). Ambos os compostos foram diluídos em PBS 1x e filtrados com um filtro de seringa de 0,22 μm . Ambos os compostos foram armazenados em freezer a -20°C até o uso.

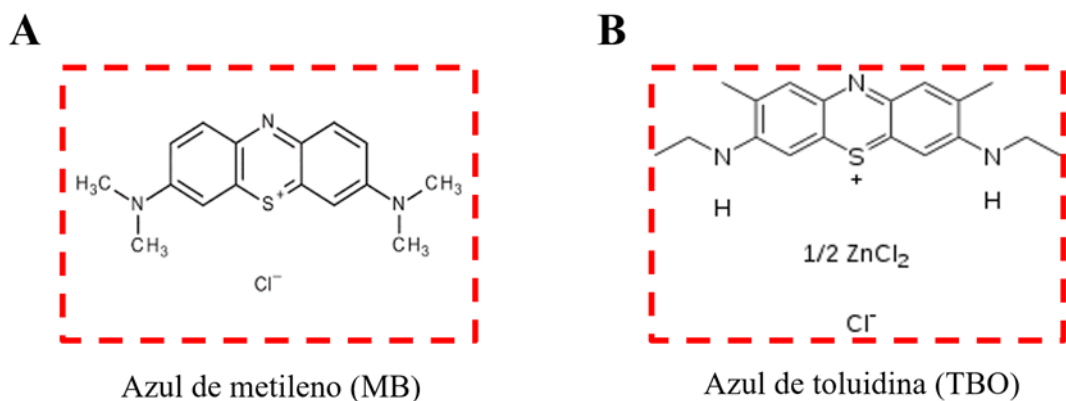


Figura 9. Estrutura das moléculas em teste. (A) Azul de metileno (MB). (B) Azul de toluidina (TB). Fonte: Autoria própria (2022).

4.2 Obtenção e manutenção das células em cultura

Para os ensaios de citotoxicidade, as linhagens de células cancerígenas HSC-3 (carcinoma de células escamosas de língua humano) e SCC-9 (carcinoma escamocelular oral humano), obtidas da *American Type Culture Collection - ATCC* (Rockville, Maryland, U.S.A.) foram utilizadas. Para avaliar a seletividade dos compostos sobre a proliferação de células não cancerígenas, a linhagem Hfib (fibroblasto humano) foi utilizada (**Tabela 1**). As linhagens celulares foram cultivadas

em garrafas para cultura de células (75 cm³, volume de 250 mL) utilizando o meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Gibco®, Grand Island, USA) suplementado com 10% de soro bovino fetal (GIBCO) e 1% de penicilina-estreptomicina (GIBCO). No meio de cultura da SCC-9 foi também adicionado 40 µg/mL de succinato sódico de hidrocortisona (Teuto, Brasil). Todas as linhagens foram mantidas em estufa umidificada à 37°C e 5% de CO₂. Todas as linhagens celulares foram testadas para micoplasma utilizando o kit *MycoAlert*® de detecção de micoplasma (Lonza, Basiléia, Suíça).

Tabela 1. Linhagens celulares utilizadas no ensaio de citotoxicidade para determinação de CE₅₀.

Células	Tipo histológico
Células cancerosas	
SCC-9	Carcinoma escamocelular oral humano
HSC-3	Carcinoma de células escamosas de língua humana
Células não cancerosas	
Hfib	Fibroblasto de orelha humana

Fonte: Autoria própria (2023).

4.3 Ensaio de incorporação de droga

Inicialmente, todas as linhagens celulares foram semeadas em placas de 96 poços em uma densidade celular de 2×10^4 células/poço em seus respectivos meios descritos acima por 24 h a 37°C e 5% de CO₂. Após esse tempo, diferentes concentrações de MB (12,5 – 400 µM) ou TB (6,25 – 200 µM) foram adicionadas à placa, em triplicata, e as placas foram incubadas por diferentes tempos (15, 30, 60 e 120 min). Em seguida, as placas foram lavadas duas vezes com PBS 1x e as células foram incubadas com dodecil sulfato de sódio (SDS; Sigma-Aldrich; 100 µL de uma solução de 50 mM diluída em PBS) para promover a lise da membrana celular e liberação de MB ou TB incorporados pelas células por 30 min em temperatura

ambiente. A absorvância do MB ou TB incorporado foi medida em um espectrofotômetro em um comprimento de onda de 660 nm. Três experimentos independentes foram realizados.

4.4 Avaliação de citotoxicidade

As células foram semeadas em placas de 96 poços a uma densidade celular de 2×10^4 células/poço em seus respectivos meios descrito acima por 24 h a 37°C e 5% de CO_2 . Após esse tempo, diferentes concentrações de MB (12,5 – 400 μM) ou TB (6,25 – 200 μM) foram adicionadas à placa, em quadruplicata, e as células foram incubadas a 37°C por 2 horas. Em seguida, as placas foram lavadas duas vezes com PBS e um novo foi meio adicionado as placas, que foram novamente incubadas a 37°C por mais 24 horas. Por fim, a viabilidade celular foi medida usando o reagente CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability, que indica a viabilidade celular pela medição de ATP, seguindo as instruções do fabricante. Ambos os compostos foram testados na ausência de luz (fase escura) ou após uma exposição fotodinâmica (fase clara) com um laser de diodo que possui um meio ativo semiconductor InGaAlP (λ 660 nm, 100 mW, 12 J/cm^2 , CW, TwinFlex, MMOptics, São Carlos, São Paulo, Brasil) (**Figura 10**).

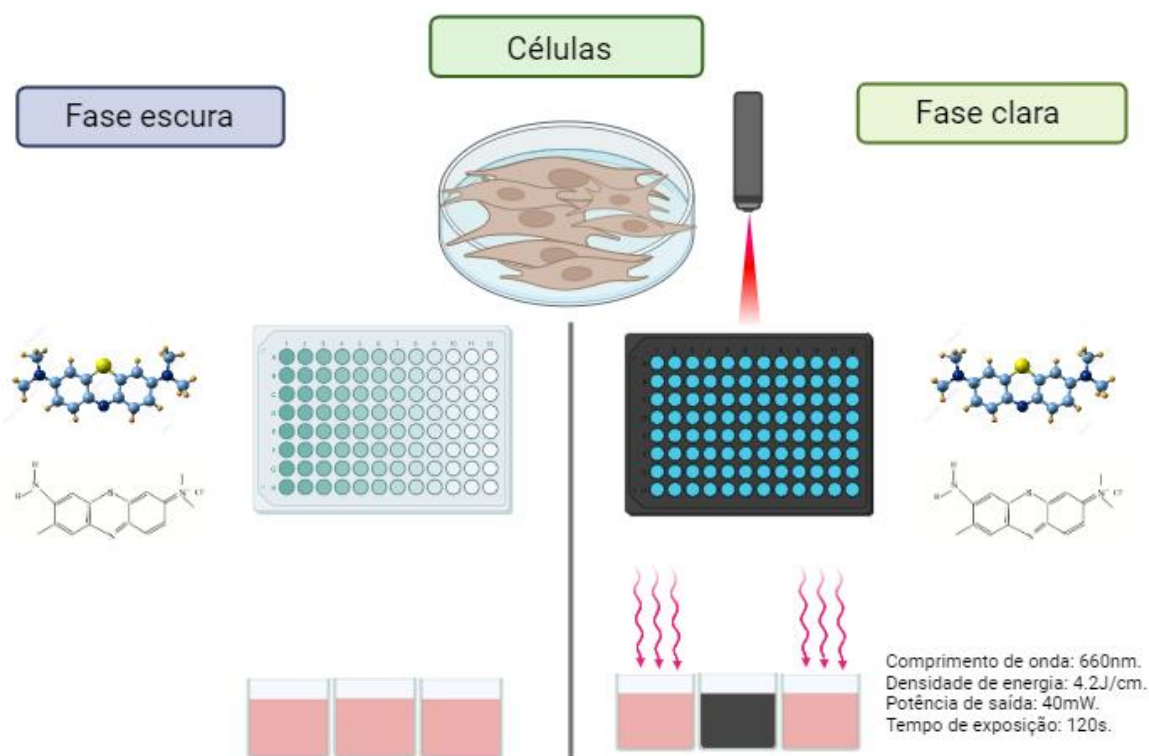


Figura 10. Desenho experimental. Os derivados fenotiazínicos foram avaliados em um painel de células tumorais e não tumorais com a utilização ou não de terapia fotodinâmica. A citotoxicidade em ambas as condições foi avaliada utilizando o reagente CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability. Fonte: Autoria própria.

4.5 Terapia combinada

Para combinações de drogas, diluições duplas de cada droga (MB e TB), usadas isoladamente ou em combinações fixas, foram incubadas com células SCC-9 seguindo o protocolo descrito acima. A terapia combinada foi realizada na fase escura e clara. A análise dos efeitos combinados foi realizada por meio da determinação do índice de combinação (IC), usado como ponto de corte para determinar o sinergismo, pelo método Chou-Talalay CI (CHOU; TALALAY, 1984) e pela construção de isoblograma usando o método de razão fixa, conforme descrito anteriormente (FIVELMAN *et al.*, 2004; TALLARIDA, 2000; TALLARIDA, 2012).

4.6 Análise estatística

Com intuito de determinar a concentração efetiva de 50% (CE₅₀) e a concentração citotóxica de 50% (CC₅₀), foi usado regressão não linear. O teste A ANOVA (análise de variância) de uma via seguida pelo teste de comparação múltipla de *Newman-Keuls* foi usada para determinar a significância estatística das comparações de três ou mais grupos. O limite crítico de significância foi estabelecido para $p < 0,05$. Todas as análises foram realizadas utilizando o programa Graph Pad Prism versão 8.0 (Graph Pad Software, San Diego, CA).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Ensaios de incorporação do azul de metileno e do azul de toluidina

Inicialmente, a capacidade de incorporação do azul de metileno pelas linhagens celulares em teste foi avaliada para selecionar as concentrações e tempos de incubação mais adequados para os testes posteriores. As células foram tratadas com diferentes concentrações de azul de metileno variando entre 400 – 50 μ M em

diferentes tempos (15, 30, 60 e 120 minutos). Em seguida, as placas foram lavadas duas vezes com PBS e as células foram incubadas com SDS para promover a lise da membrana celular e a liberação de MB incorporado pelas células por 30 min em temperatura ambiente. A absorvância do MB incorporado foi medida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 660 nm.

Conforme observado na **Figura 11**, a incorporação do MB apresentou taxas concentração-dependente e tempo-dependente para todas as linhagens, apresentando as maiores taxas de incorporação após 120 minutos de incubação para todas as linhagens. Curiosamente, taxas significativas ($p < 0,05$) de incorporação de MB pela linhagem não tumoral só foram observadas na maior concentração avaliada (400 μM), o que pode ser associado às suas menores taxas proliferativas por se tratarem de células normais, o que por sua vez corrobora com resultados obtidos por Dos Santos e colaboradores em 2017. Em contraponto, foi observado nas linhagens tumorais testadas taxas significativas ($p < 0,05$) de incorporação do MB em concentrações variando entre 100 e 400 μM (**Figura 11**). Dentre as três linhagens celulares avaliadas, a linhagem SCC-9 apresentou maiores taxas de incorporação do MB (**Figura 11**).

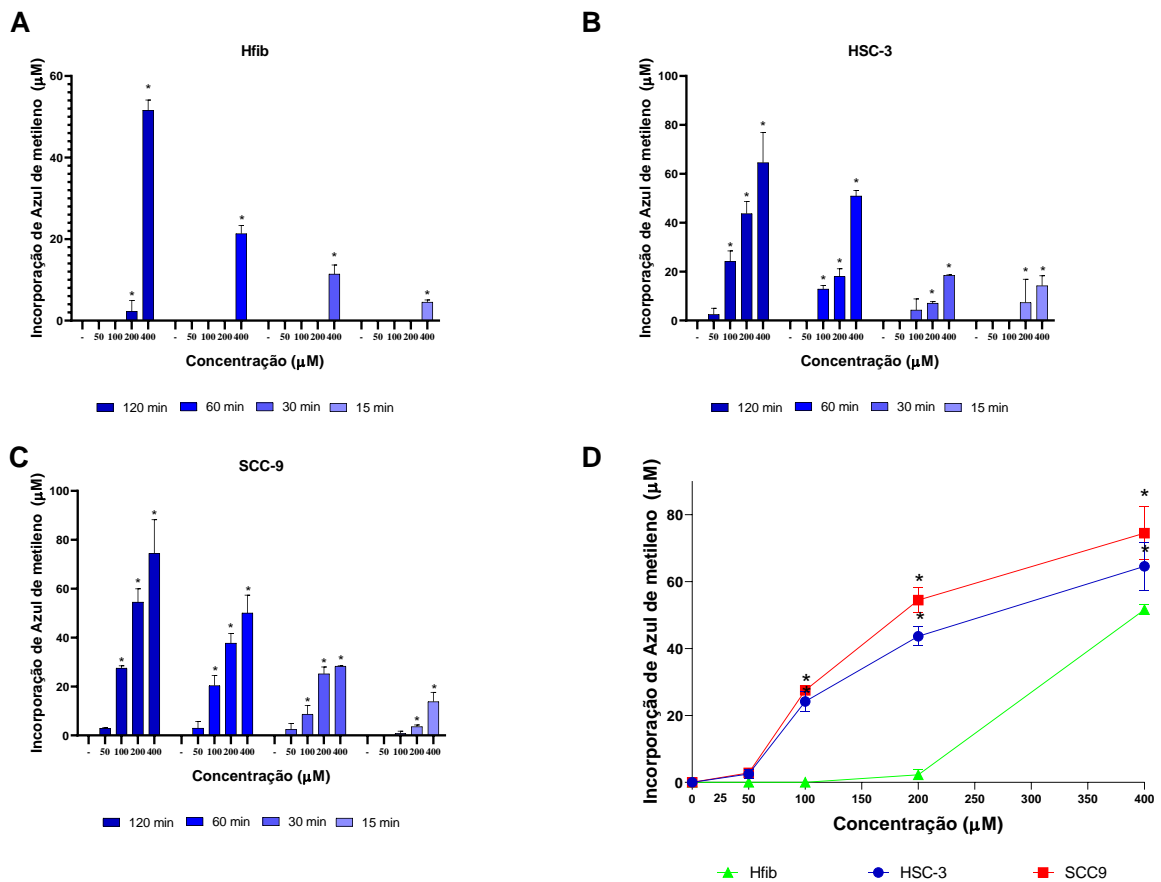


Figura 11. Incorporação do MB ao longo do tempo em diferentes linhagens celulares.

(A) Incorporação de MB em células Hfib. (B) Incorporação de MB em células HSC-3. (C) Incorporação de MB em células SCC-9. (D) Comparação da taxa de incorporação de MB entre as linhagens celulares avaliadas após 2 horas de tratamento. Os valores representam as médias \pm D.P. de quatro determinações obtidas em um dos três experimentos realizados. * $p < 0,05$ em comparação com células não tratadas (-) nos gráficos A, B e C. * $p < 0,05$ comparado à taxa de incorporação do MB pelo Hfib na mesma concentração do gráfico D.

A taxa de incorporação do azul de toluidina também foi avaliada sendo as três linhagens celulares tratadas com diferentes concentrações de droga (200 – 50 μM) em diferentes tempos (15, 30, 60 e 120 minutos). Posteriormente, as placas foram lavadas duas vezes com PBS e as células foram incubadas com SDS para promover a lise da membrana celular e a liberação de TB incorporada pelas células durante 30 min à temperatura ambiente. A absorbância do TB incorporado foi medida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 660 nm.

Observou-se um perfil de incorporação semelhante ao do MB, com as duas linhagens celulares tumorais apresentando taxas de incorporação mais significativas ($p < 0,05$) em relação as células não tumorais, principalmente a 100 ou 200 μM (**Figura 12**). Uma concentração e incorporação de TB dependente do tempo também foi observada nas linhagens de células tumorais, mostrando o tempo de 2 horas com as maiores taxas de incorporação de TB para ambas as células tumorais. Em relação à linhagem com maiores taxas de incorporação de TB, observamos que em altas concentrações (100 e 200 μM), a linhagem HSC-3 apresentou maior absorção e em concentrações mais baixas (25 e 50 μM) a linhagem celular SSC-9 apresentou maiores taxas de incorporação (**Figura 12**).

A tendência de ambos os compostos serem melhor incorporados pelas células tumorais do que pelas células não tumorais está bem descrita na literatura (PENG et al., 1993; TREMBLAY et al., 2002; GANDOLFO et al., 2006). Esta característica justifica o emprego de ambos os compostos como marcadores tumorais visuais para detectar e delinear certos tipos de câncer, especialmente na cavidade oral, e seu uso como fotossensibilizadores para o tratamento de diferentes tipos de câncer (JOHNSON, 1996; KIRSZBERG; RUMJANEK; CAPELA, 2005; WARNAKULASURIYA, 2021). A seletividade dos derivados fenotiazínicos avaliados pode estar relacionada à afinidade dos compostos pelas lipoproteínas de baixa densidade (LDL), que são encontradas em maiores quantidades nas células tumorais (KWIATKOWSKI et al., 2018). O LDL promove a captação de colesterol necessária para a formação da membrana durante a divisão celular e funciona como um “transportador” dos fotossensibilizadores para o espaço intracelular (HAMBLIN; NEWMAN, 1994; CASTANO et al., 2005). Uma vez que as células tumorais aumentam as taxas de divisão mitótica, elas apresentam uma expressão elevada de receptores de lipoproteínas na superfície celular e uma maior captação de LDL (CRUZ et al., 2013; KWIATKOWSKI et al., 2018).

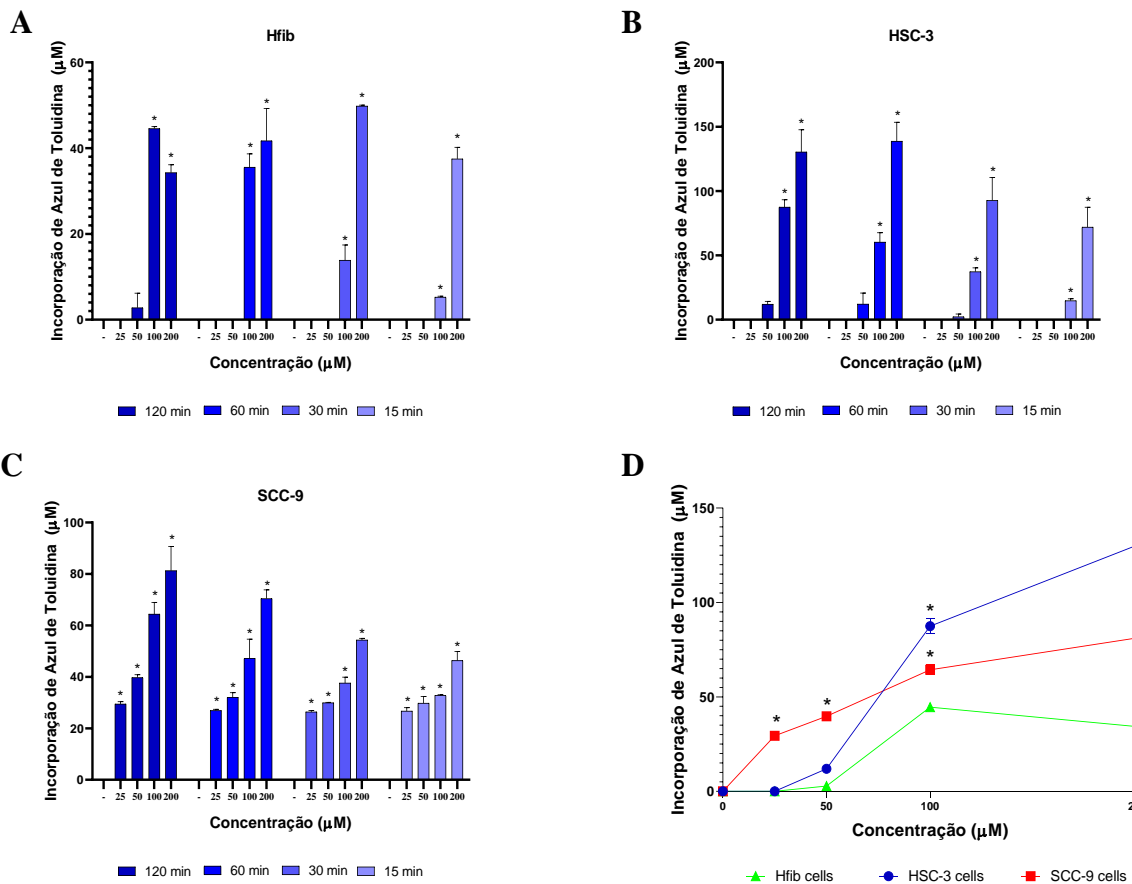


Figura 12. Incorporação do TB ao longo do tempo em diferentes linhagens celulares. (A) Incorporação de TB em células Hfib. (B) Incorporação de TB em células HSC-3. (C) Incorporação de TB em células SCC-9. (D) Comparação da taxa de incorporação de TB entre as linhagens celulares avaliadas após 2 horas de tratamento. Os valores representam as médias \pm D.P. de quatro determinações obtidas em um dos três experimentos realizados. * $p < 0,05$ em comparação com células não tratadas (-) nos gráficos A, B e C. * $p < 0,05$ comparado à taxa de incorporação do TB pelo Hfib na mesma concentração do gráfico D.

5.2 Citotoxicidade da TPD com derivados fenotiazínicos

Em relação à atividade citotóxica na fase escura, o MB apresentou efeito inibitório significativo na viabilidade celular especialmente na concentração de 400 μM para todas as linhagens, sendo a linhagem celular SCC-9 a mais sensível com um valor de CE_{50} de 362,6 μM (Figura 13; Tabela 2). Após utilizar uma densidade de energia fixa (J/cm^2) para excitar MB, encontramos um aumento no efeito citotóxico, com valores de CI_{50} de 234,5, 307,4 e 294,4 μM contra células HSC-3,

SSC-9 e Hfib respectivamente versus valores de CE_{50} de > 400 , $362,6$ e > 400 μM na fase escura, respectivamente (**Tabela 2**). A maior diferença foi observada em células HSC-3 a 400 μM . Quando testado na ausência de luz, o MB causou uma inibição de $34,3\%$ na viabilidade celular. Nas mesmas condições, porém, na presença de luz, o MB inibiu $69,9\%$ a viabilidade celular (Figura 13). A diferença observada entre os grupos foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Tabela 2. Atividade citotóxica de MB e TB em diferentes linhagens celulares na

Composto	$CE_{50} \pm D.P$ (μM) HSC-3		$CE_{50} \pm D.P$ (μM) SSC-9		$CE_{50} \pm D.P$ (μM) Hfib	
	Fase escura	Fase clara	Fase escura	Fase clara	Fase escura	Fase clara
MB	> 400	$234,5 \pm 9,6$	$362,6 \pm 15,6$	$307,4 \pm 28,8$	> 400	$294,4 \pm 12,1$
TB	$73,2 \pm 2,6$	$58,7 \pm 2,3$	$41,4 \pm 4,0$	$33,8 \pm 1,4$	$66,6 \pm 5,9$	$53,7 \pm 3,6$

ausência (fase escura) ou presença (fase clara) de luz.

Os valores representam a média \pm D.P. e foram calculados a partir de três experimentos independentes. CE_{50} = Concentração efetiva de 50%. MB = azul de metileno. TB = azul de toluidina. DP = desvio padrão.

A terapia fotodinâmica utilizando o MB como fotossensibilizador é bem empregada contra diversos tipos de câncer como: carcinoma cervical, leucemia, osteossarcoma, adenocarcinoma mamário, melanoma e adenocarcinoma pulmonar (FREITAS et al., 2017; GUAN et al., 2013; KIRSZBERG et al., 2005; SANTOS et al., 2018; RODRIGUEZ-CÓRDOVA et al., 2019). No entanto, os efeitos da terapia fotodinâmica utilizando o MB nos carcinomas espinocelular orais são pouco descritos e também avaliados com metodologias de baixa sensibilidade em relação a ensaios baseados em ATP como foi usado no presente trabalho (KOFLEER et al., 2018; NOVAK et al., 2018; LE et al., 2021). Anteriormente, KOFLEER e colaboradores (2018) demonstraram atividade citotóxica de MB sozinho ou com terapia fotodinâmica em células CA-9-22 e LE e colegas (2021) demonstraram atividade citotóxica de MB em células da linhagem SCC-25.

Em comparação ao MB, o TB apresentou efeito citotóxico mais proeminente na viabilidade celular na fase escura para todas as linhagens, especialmente em

concentrações entre 50 e 200 μM (**Figura 13**). Conforme revelado na **Tabela 2**, o menor valor de CE_{50} encontrado foi obtido utilizando a linhagem celular SCC-9 (41,4 μM). A citotoxicidade escura do TB está bem caracterizada na literatura e também associada a efeitos adversos indesejados, limitando assim as concentrações e doses que podem ser utilizadas. (TREMBLAY *et al.*, 2002; BLAZQUEZ-CASTRO *et al.*, 2009; GUO *et al.*, 2023).

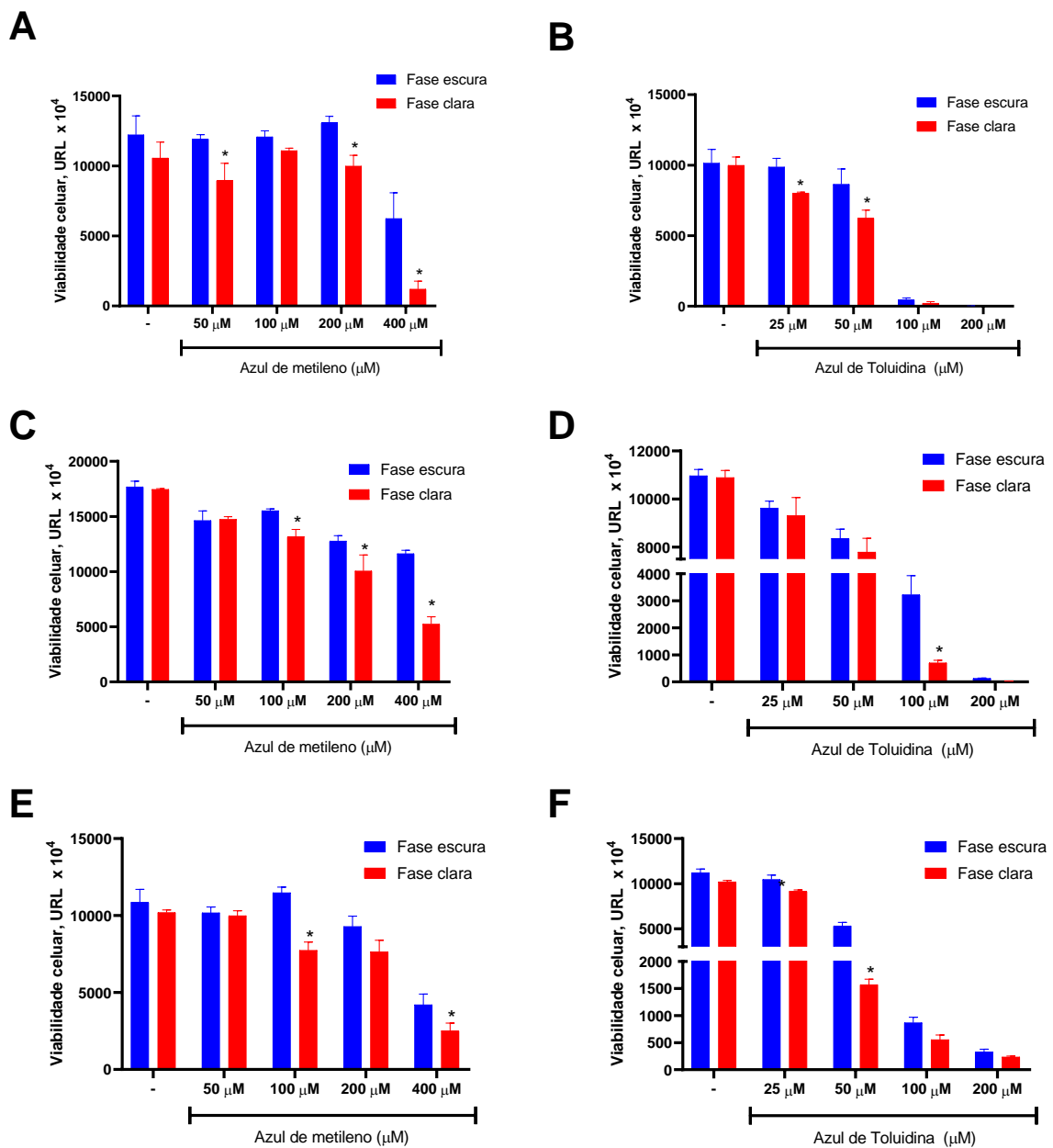


Figura 13. Efeitos de MB e TB na viabilidade celular de linhagens celulares. Hfib (A e B), HSC-3 (C e D) e SCC-9 (E F). As células foram tratadas com diferentes concentrações

de azul de metileno (50 - 400 μM) ou azul de toluidina (25 - 200 μM) na ausência (fase escura; colunas azuis) ou presença (fase clara; colunas vermelhas) de TFD. A viabilidade celular foi determinada pela medição de ATP usando o CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay. Os valores representam as médias \pm D.P. de quatro determinações obtidas em um dos três experimentos realizados. * $P < 0,05$ em comparação com células não tratadas (-).

Na fase clara, todas as linhagens apresentaram maior sensibilidade, apresentando valores de CE_{50} mais baixos quando comparados aos valores da fase escura, tendo novamente a linhagem celular SCC-9 apresentando a maior sensibilidade com um valor de CE_{50} de 33,8 μM (**Tabela 2**). A maior diferença foi observada em células SCC-9 a 50 μM . Quando testada na fase escura, a TB causou uma inibição de 52,6% na viabilidade celular. Nas mesmas condições, contudo, na presença de luz, a TB inibiu 84,6% a viabilidade celular (**Figura 13**). A diferença observada entre os grupos foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Resultados semelhantes usando terapia fotodinâmica com o TB foram encontrados usando linhagens celulares de câncer de mama, onde o TB apresentou um valor de IC_{50} de 1,13 μM na fase escura e 0,88 μM na presença de luz, reforçando as vantagens da terapia fotodinâmica (GUO *et al.*, 2023) Apesar de seu uso já consolidado em conjunto com outras técnicas na área de diagnóstico de câncer, o uso da TB como fotossensibilizador para o tratamento do câncer bucal é pouco discutido na literatura (MILLS, 2022). Também é importante relatar que a exposição à terapia fotodinâmica sem fotossensibilizador não causou perda de viabilidade celular das três linhagens avaliadas, sugerindo que a fototoxicidade deve ser atribuída exclusivamente aos derivados fenotiazínicos conforme relatado anteriormente (BARBOSA *et al.*, 2020; GUO *et al.*, 2023).

5.3 Terapia combinada: Azul de metileno e azul de toluidina

Por fim, a atividade citotóxica do MB e TB em combinação foi investigada contra células SCC-9, que se apresentou como a linhagem mais sensível para ambos os compostos. Primeiramente a combinação foi feita na ausência de luz, onde o MB e o TB apresentaram valores de CE_{50} de 368,5 e 43,8 μM quando testados individualmente, e 30,5 e 26,9 μM quando testados em combinação,

respectivamente. Esses dados demonstram uma redução de aproximadamente 13 vezes no valor de CE_{50} para MB e cerca de 2 vezes no valor de CE_{50} para TB (**Tabela 3**).

Tabela 3. Atividade de citotoxicidade de MB e TB em células SCC-9 isoladamente ou em combinação.

Composto	$CE_{50} \pm D.P$ (μM) Fase escura		$CE_{50} \pm D.P$ (μM) Fase clara		IC ^a	
	Isolada	Combinação	Isolada	Combinação	IC	IC
					Fase escura	Fase clara
MB	368,5 ± 10,8	30,5 ± 4,8	302,3 ± 25,7	23,4 ± 1,4	0,69 ±	0,73 ±
TB	43,8 ± 2,9	26,9 ± 1,4	33,7 ± 1,2	22,4 ± 2,4	0,05	0,08

Os valores representam a média \pm DP e foram calculados a partir de dois experimentos independentes. IC: Índice de combinação. Ponto de corte: valor de IC de 0,3-0,7, sinergismo; 0,7-0,85, sinergismo moderado; 0,85-0,9, leve sinergismo; 0,9-1,1, aditividade; > 1,1, antagonismo. CE_{50} = Concentração efetiva de 50%. MB = azul de metileno. TB = azul de toluidina. DP = desvio padrão.

A combinação de drogas também foi realizada na presença de luz. Conforme mostrado na **Tabela 3**, na fase clara, MB e TB apresentaram valores de CE_{50} de 302,3 e 33,7 μM quando testados separadamente e 23,4 e 22,4 μM quando combinados, respectivamente. Esses dados demonstram uma redução de aproximadamente 13 vezes no valor de CE_{50} para MB e cerca de 1,5 vezes no valor de CE_{50} para TB.

Além disso, os valores dos índices de combinação de 0,69 (fase escura) e 0,73 (fase clara) associados a isobogramas côncavos, em ambas as fases, revelaram que MB e TB têm efeitos sinérgicos quando combinados contra a viabilidade celular de células SCC-9 (**Tabela 2; Figura 14**). Curiosamente, o efeito sinérgico de MB e TB na fase escura já foi demonstrado na inibição da proliferação de amastigotas de *T. cruzi* com um índice de combinação de 0,89 (BULHÕES *et al.*, 2019). Adicionalmente, Zancan e Tebaldi também testaram a combinação de MB mais TB na fase clara, que eliminou o crescimento bacteriano de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* encontrado em sementes de canola naturalmente

contaminadas, o que não ocorreu quando os fotossensibilizantes foram testados isoladamente (ZANCAN; TEBALDI, 2020).

Para tratamento de carcinoma espinocelular oral, este é o primeiro relato relacionado ao efeito sinérgico da combinação de MB mais TB em fase escura ou fase clara. No entanto, combinações de derivados fenotiazínicos auxiliados pela terapia fotodinâmica já apresentam efeitos sinérgicos com outras moléculas com reconhecida atividade citotóxica. Por exemplo, a terapia combinada com terapia fotodinâmica assistida por MB e ácido salicílico ou com doxorrubicina contra células de câncer de mama melhora a eficácia da quimioterapia (HOSSEINZADEH *et al.*, 2017; SADEGHLOO *et al.*, 2020).

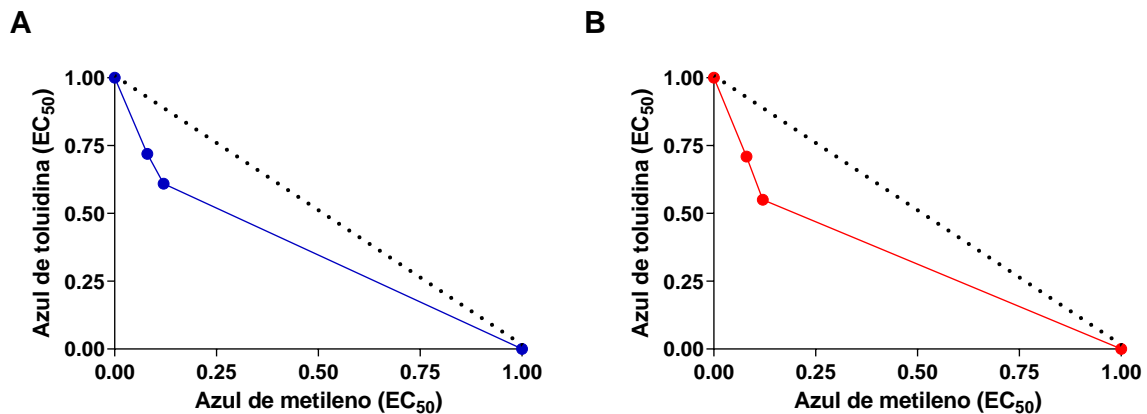


Figura 14. Isobograma descrevendo os efeitos sinérgicos de MB e TB na viabilidade celular da linhagem SCC-9. As células foram tratadas com diferentes concentrações de azul de metileno (MB; 6,25 – 400 μ M) ou azul de toluidina (TB; 3,12 – 200 μ M) isoladamente ou em combinações fixas por um período de 2 horas.

6. CONCLUSÕES

Em síntese, o azul de metileno e o azul de toluidina usados como fotossensibilizadores associados a terapia fotodinâmica aparecem como uma estratégia útil para o tratamento do carcinoma escamocelular oral sendo isso reforçado na presente investigação. Além disso, foi demonstrado que a combinação de azul de metileno com azul de toluidina tem um efeito sinérgico sobre a viabilidade do carcinoma oral de células escamosas, abrindo possibilidades para a utilização da terapia fotodinâmica contra outros tipos de células cancerígenas usando

combinações desses derivados fenotiazínicos já bem caracterizados como promissores fotossensibilizadores.

REFERÊNCIAS

ABATI, S; BRAMATI, C; BONDI, S; LISSONI, A; TRIMARCHI, M. Oral Cancer and Precancer: A Narrative Review on the Relevance of Early Diagnosis. **Int J Environ Res Public Health**. v. 8, n.17, p. 9160, 2020.

AGAWAL M.L, CLAY M.E, HARVEY E.J, EVANS H.H, ANTUNES A.R, OLEINICK N.L. A terapia fotodinâmica induz morte celular rápida por apoptose em células de linfoma de camundongo L5178Y. **Res. de Câncer**, v.51, p. 5993-5996, 1991.

ALBAIN KS, NAG SM, CALDERILLO-RUIZ G, JORDAAN JP, LLOMBART AC, PLUZANSKA A, ROLSKI J, MELEMED AS, REYES-VIDAL JM, SEKHON JS, SIMMS L, O'SHAUGHNESSY J. Gemcitabine plus Paclitaxel versus Paclitaxel monotherapy in patients with metastatic breast cancer and prior anthracycline treatment. **J Clin Oncol**. 2008 Aug 20;26(24):3950-7. doi: 10.1200/JCO.2007.11.9362. PMID: 18711184.

ALMEIDA, V.L; LEITÃO, A; REINA, L.D.C B.; MONTANARI, C.A.; DONNICI, C. L. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o dna: uma introdução. **Quim. Nova**, v. 28, n. 1, p. 118–129, 2005.

ALTERIO D, MARVASO G, FERRARI A, VOLPE S, ORECCHIA R, JERECZEK-FOSSA BA. Modern radiotherapy for head and neck cancer. **Semin Oncol**. 2019 Jun;46(3):233-245. doi: 10.1053/j.seminoncol.2019.07.002. Epub 2019 Jul 26. PMID: 31378376.

ANDREADIS, D, PAVLOU AM, SOTIRIOU E, VRANI F, LOANNIDES D, KOLOKOTRONIS A. Utility of photodynamic therapy for the management of oral potentially malignant disorders and oral cancer. **Translational Research in Oral Oncology**, v. 1, p. 1-19, 2016.

ATTY, A.T.M; GUIMARÃES, R.M; ANDRADE C.L.T. Tendência Temporal da Mortalidade por Câncer de Boca e da Cobertura de Atenção Primária no Estado do Rio de Janeiro. **Rev. Bras. Cancerol**, v.68, n.3, p.042-082, 2022. Disponível em: <https://rbc.inca.gov.br/index.php/revista/article/view/2082>. Acesso em: 29 abr 2023.

AVGERINOS, K. I.; SPYROU, N.; MANTZOROS, C. S.; DALAMAGA, M. Obesity and cancer risk: Emerging biological mechanisms and perspectives. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 92, p. 121–135, 2019.

BAGNATO, V. P. Novas Técnicas Ópticas para as áreas da saúde. **Editora Livraria da Física**, 1 ed. São Paulo, cap. 8, p. 161-177, 2008.

BAGNATO, V.S; REQUENHA, M.B. **Terapia fotodinâmica dermatológica: Programa TFD Brasil**. . São Carlos: Even3, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.29327/terapia-fotodinamica-dermatologica-programa-tfd-brasil-309087>. Acesso em: 14 jul. 2023.

BARBOSA, A.F. et al. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) using

phenothiazine derivatives as photosensitizers against *Leishmania braziliensis*. **Lasers Surg Med.** v. 44, n.10, p. 850-5, 2012.

BASKARAN R, LEE J, YANG SG. Clinical development of photodynamic agents and therapeutic applications. **Biomater. Res.**, vol. 22, no. 1, pp. 1–8, 2018, doi: 10.1186/s40824-018-0140-z. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6158913/>. Acesso em: 04 abr 2023.

BASTOS, M. M. et al. O Uso de Porfirinas em Terapia Fotodinâmica no Tratamento da Leishmaniose Cutânea. **Revista Virtual de Química**, v. 4, n. 3, p. 257–267, 2012.

BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394–424, 2018.

CIVANTOS FJ, KARAKULLUKCU B, BIEL M, SILVER CE, RINALDO A, SABA NF, TAKES RP, VANDER POORTEN V, FERLITO A. A Review of Photodynamic Therapy for Neoplasms of the Head and Neck. **Adv Ther.** v.35, n.3, p324-340, mar 2018.

CHEN J, FAN, T., XIE, Z., ZENG, Q., XUE, P., ZHENG, T., ZHANG H. Advances in Nanomaterials for Photodynamic Therapy Applications: Status and Challenges. **Biomaterials**, v.237, p.119827, 2020.

CHOU TC, TALALAY P. "Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors." **Adv Enzyme Regul**, v. 22, p.27-55, 2005.

CLIFTON MM, JOHNSON SM, ROBERSON PK, KINCANNON J, HORN TD. Immunotherapy for recalcitrant warts in children using intralesional mumps or *Candida* antigens. **Pediatr Dermatol**, v.20, n.3, p.268-71, 2003. doi: 10.1046/j.1525-1470.2003.20318.x.

CORREIA J.H, RODRIGUES J.A, PIMENTA S, DONG T, YANG Z. Photodynamic Therapy Review: Principles, Photosensitizers, Applications, and Future Directions. **Pharmaceutics**. v. 13, n. 9, p. 1332, aug. 2021.

CRAWFORD, M; JOHNSON, E.H.;LIU K.Y..P, POH, C.; TSAY, .Y.L. On the Cutting Edge of Oral Cancer Prevention: Finding Risk-Predictive Markers in Precancerous Lesions by Longitudinal Studies. **Cells**, v. 18, n. 11, p1033, 2022.

CREE, I. A. Cancer Cell Culture, MTT assay. **Methods Mol Biol**, v. 731, n. 1, p. 79–91, 2011.

DE MELO LCG, DE OLIVEIRA ABC, PEIXOTO LFF, ZANON RG, BOTELHO FV, SILVA MJB, PINTO-FOCHI ME, GÓES RM, PAOLI F, RIBEIRO DL. Photodynamic therapy reduces cell viability, migration and triggers necroptosis in prostate tumor cells. **Photochem Photobiol Sci.** v.6, p. 1341-1356, jun 2023. DOI: 10.1007/s43630-023-00382-9. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9983546/>. Acesso em: 10 ago 2023.

DE MELO GOMES L.C, DE OLIVEIRA CUNHA A.B, PEIXOTO L.F.F, ZANON R.G, BOTELHO F.V, SILVA M.J.B, PINTO-FOCHI M.E, GÓES R.M, DE PAOLI F, RIBEIRO D.L. Photodynamic therapy reduces cell viability, migration and triggers necroptosis in prostate tumor cells. **Photochem Photobiol Sci**, v.22, n.6, p.13411356, jun 2023.

DEMIDOVA TN, HAMBLIN MR. Effect of cell-photosensitizer binding and cell density on microbial photoinactivation. **Antimicrob Agents Chemother**, v.49, n.6, p. 2329-35, 2005. doi: 10.1128/AAC.49.6.2329-2335.2005.

DOS SANTOS AF, TERRA LF, WAILEMANN RA, OLIVEIRA TC, GOMES VM, MINEIRO MF, MEOTTI FC, BRUNI-CARDOSO A, BAPTISTA MS, LABRIOLA L. Methylene blue photodynamic therapy induces selective and massive cell death in human breast cancer cells. **BMC Cancer**, v. 17, n. 1,p.194, mar 2017.

DUARTE, I.; BUENSE, R.; KOBATA, C. Fototerapia. **An Bras Dermatol**, v. 81, n. 1, p. 74–82, 2006.

FELDMAN DR, LORCH A, KRAMAR A, ALBANY C, EINHORN LH, GIANNATEMPO P, NECCHI A, FLECHON A, BOYLE H, CHUNG P, HUDDART RA, BOKEMEYER C, TRYAKIN A, SAVA T, WINQUIST EW, DE GIORGI U, APARICIO J, SWEENEY CJ, COHN CEDERMARK G, BEYER J, POWLES T. Brain Metastases in Patients With Germ Cell Tumors: Prognostic Factors and Treatment Options--An Analysis From the Global Germ Cell Cancer Group. **J Clin Oncol**, v.34, n.4, p.345-351, feb 2016. doi: 10.1200/JCO.2015.62.7000. Epub 2015 Oct 12. PMID: 26460295; PMCID: PMC5070579.

FERLAY J, COLOMBET M, SOERJOMATARAM I, MATHERS C, PARKIN DM, PIÑEROS M, ZNAOR A, BRAY F. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. **Int J Cancer**. v. 144, n.8, p. 1941-1953, apr 2019. DOI: 10.1002/ijc.31937. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ijc.31937>. Acesso em: 10 mar 2023.

FIVELMAN, Q. L.; ADAGU, I. S.; WARHURST, D. C. Modified fixed-ratio isoblograma method for studying *in vitro* interactions between atovaquone and proguanil or dihydroartemisinin against drug-resistant strains of *Plasmodium falciparum*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 48, p.4097-4102. 2004.

FOLEY JA, RAMANKUTTY N, BRAUMAN KA, CASSIDY ES, GERBER JS, JOHNSTON M, MUELLER ND, O'CONNELL C, RAY DK, WEST PC, BALZER C, BENNETT EM, CARPENTER SR, HILL J, MONFREDA C, POLASKY S, ROCKSTRÖM J, SHEEHAN J, SIEBERT S, TILMAN D, ZAKS DP. Solutions for a cultivated planet. **Nature**. 2011 Oct 12;478(7369):337-42. doi: 10.1038/nature10452. PMID: 21993620.

GANDOLFO S, PENTENERO M, BROCCOLETTI R, PAGANO M, CARROZZO M, SCULLY C. "Toluidine blue uptake in potentially malignant oral lesions in vivo: clinical and histological assessment." **Oral Oncol**, v.42, n.1, p.89-95, 2006.

GARCEZ, A.S. SOUZA, F.R.; NUNEZ, S.C.; KATHER, J.M.; RIBEIRO, M.S. Terapia Fotodinâmica em Odontologia – Laser de baixa potência para redução microbiana. **Revista APCD**, n. 57, p. 223-226, 2003.

GOMES A.T.P.C, NEVES M.G.P.M.S, CAVALEIRO J.A.S. Cancer, Photodynamic Therapy and Porphyrin-Type Derivatives. **An Acad Bras Cienc.** v,90, p.993-1026, 2018. DOI: 10.1590/0001-3765201820170811. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/aabc/a/SknJ9vWSSV4krLZPkJHDGwF/?lang=en>. Acesso em 18 jul 2023.

GONZALES, F. P.; **Triagem, Identificação e Determinação de Parâmetros Funcionais de fotossensibilizadores com Ação Antifúngica.** 2007. Monografia (Mestrado em Biociências Aplicadas à Farmácia) – Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia – USP, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto. 2007.

GONZÁLEZ-GONZÁLEZ A, VAZQUEZ-JIMENEZ LK, PAZ-GONZÁLEZ AD, BOLOGNESI ML, RIVERA G. Recent Advances in the Medicinal Chemistry of Phenothiazines, New Anticancer and Antiprotozoal Agents. **Curr Med Chem.** v, 28, n.38, p.7910-7936, 2021.

GHOLIZADEH, P; ESLAMI, H; YOUSEFI, M; ASGHARZADESH, M; KALIL, HS. Role of oral microbiome on oral cancers, a review. **Biomed Pharmacother.** v.84, p. 552-558, 2016.

GROSS, M.E;BOOTH, N.H. Tranquilizers, alpha-2-adrenergic agonists and related agents. In Veterinary **Pharmacology and Therapeutics.** 7th edn. Ed. Adams H.R. pp 311-357, Iowa State University Press, Ames, 1995

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell,** v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.

HUBBLE, D. (1941). TOXICITY OF PHENOTHIAZINE. **The Lancet,** 238(6168), 600–601.

INCA, Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação Geral de Ações Estratégicas. **ABC do câncer, abordagens básicas para controle do câncer.** 2º edição, 2012. Disponível em: https://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/inca/abc_do_cancer_2ed.pdf. Acesso em 20 mar 2023.

INCA, Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação Geral de Ações Estratégicas. Coordenação de Prevenção e Vigilância de Câncer. **Estimativas 2020: Incidência de Câncer no Brasil.**, Disponível em: < <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf> > acessado em 20/07/2023.

INCHINGOLO, F; SANTACROCE, L; BALLINI, A; TOPI, S;DIPALMA, G; HAXHIREXHA, K; BOTTALICO, L; CHARITOS, IA. Oral Cancer: A Historical Review. **Int J Environ Res Public Health.** v.1, n.9, p, 3168, 2020.

IRFAN M; DELGADO, RZR e FRIAS-LOPEZ. The Oral Microbioma e Câncer. **Frente. Immunol.** v. 11, p. 591088, 2020.

KATZUNG, G.B. **Basic and Clinical Pharmacology**, 12th edn., McGraw-Hill Medical, United States of America, p.949-975, 2014.

KENTSIS A. Why do young people get cancer? **Pediatr Blood Cancer**. v. 67, n.7, p. 28335, jul 2020. DOI: 10.1002/pbc.28335. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7582786/>. Acesso em: 16 jul 2023.

KHDAIR, A.; CHEN, D.; PATIL, Y.; MA, L.; DOU, Q. P.; SHEKHAR, M. P.; PANYAM, J. Nanoparticle-mediated combination chemotherapy and photodynamic therapy overcomes tumor drug resistance. **J Control Release**. v.141, p137-44, 2010.

KOSTOVA I. Platinum complexes as anticancer agents. *Recent Pat Anticancer Drug Discov*. 2006 Jan;1(1):1-22. doi: 10.2174/157489206775246458. PMID: 18221023.

KWIATKOWSKI S, KNAP B, PRZYSTUPSKI D, SACZKO J, KĘDZIERSKA E, KNAP-CZOP K, KOTLIŃSKA J, MICHEL O, KOTOWSKI K, KULBACKA J. Photodynamic therapy - mechanisms, photosensitizers and combinations. **Biomed Pharmacother**. 2018 Oct;106:1098-1107. doi: 10.1016/j.biopha.2018.07.049. Epub 2018 Jul 17. PMID: 30119176.

LAKHTAKIA, R. A Brief History of Breast Cancer Part I: Surgical domination reinvented. *MEDICAL HISTORY*. **Sultan Qaboos University Med J**. v.14, n.2, p.166-169, 2014.

LAMBERT A.W, PATTABIRAMAN D.R, WEINBERG R.A. Emerging Biological Principles of Metastasis. **Cell**, v. 168, n.4, p.670-691, feb 2017.

LEE CN, HSU R, CHEN H, WONG TW. Daylight Photodynamic Therapy: An Update. **Molecules**, v.8, n. 25, p 5195, nov 2020.

LEWANDOWSKA AM, LEWANDOWSKI T, RUDZKI M, RUDZIK S, LASKOWSKA B. Cancer prevention - review paper. **Ann Agric Environ Med**, v.18, n. 28, ed. 1, p.11-19, mar 2021. LIPSICK J. A History of Cancer Research: Carcinogens and Mutagens. **Cold Spring Harb Perspect**, v.11, n.3, p.035857, mar 2021.

LI B, LIN L, LIN H, WILSON BC. Photosensitized singlet oxygen generation and detection: Recent advances and future perspectives in cancer photodynamic therapy. **J Biophotonics**, v.12 ,p.1314-1325, dec 2016. doi: 10.1002/jbio.201600055. Epub 2016 May 2. PMID: 27136270.

LOMBARDO, E. M., GONÇALVES, M. R., SÓ, M. V. R., MARTINS, M. A. T., & CARRARD, V. C. (2018). Leucoplasia bucal: considerações a respeito do tratamento e do prognóstico. **Revista Da Faculdade De Odontologia De Porto Alegre**, 59(1), 34–41. <https://doi.org/10.22456/2177-0018.44770>

LONGO, J.P.F.; LOZZI, S.P., AZEVEDO, C.R.B. Câncer bucal e a terapia fotodinâmica como modalidade terapêutica. **RGO, Rev. gaúch. odontol.**, v.59, suppl.1, pp. 51-57, 2011.

LÓPEZ-LÓPEZ, J; OMAÑA-CEPEDA, C; JANÉ-SALAS, E. Precáncer y cáncer bucal. **Med Clin (Barc)**. , v. 6, n. 145, p. 404-408, nov 2015.

MACDONALD, IJ, & DOUGHERTY, TJ (2001). Princípios básicos da terapia fotodinâmica. **Journal of Porphyrins and Phthalocyanines (JPP)**, v. 05, n. 2, p.105–129, 2001.

MACHADO, A. E. DA H. TERAPIA FOTODINÂMICA: Princípios, potencial de aplicação e perspectivas. v. 23, n. 2, p. 237–243, 2000. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/PTsbrFMBBzN6HhXjSrfqRGz/>. Acesso em: 25 jul 2023.

MARTIN, J. P.; LOGSDON, N. Oxygen Radicals Are Generated by Dye-Mediated Intracellular Photooxidations: A Role for Superoxide in Photodynamic Effects. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v. 256, n. 1, p. 39-49, 1987.

MITCHELL, S. C. (1994). The Toxicity of Phenothiazine. **Drug Metabolism and Drug Interactions**, 11(3)

MOHAMMED F, FAIROZEKHAN AT. Oral Leukoplakia. **StatPearls Publishing**; 2023 Jan–. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK442013/>. Acesso em: 01 ago 2023.

MOKHTARI, R. B.; KUMAR, S.; ISLAM, S. S.; YAZDANPANA, M.; ADELI, K.; CUTZ, E.; YEGER, H. Combination of carbonic anhydrase inhibitor, acetazolamide, and sulforaphane, reduces the viability and growth of bronchial carcinoid cell lines. **BMC Cancer**. v.13, p378, 2013.

MOKHTARI, R. B.; HOMAYOUNI, T. S.; BALUCH, N.; MORGATSKAYA, E.; KUMAR, S.; DAS, B.; YEGER, H. Combination therapy in combating cancer SYSTEMATIC REVIEW: COMBINATION THERAPY IN COMBATING CANCER BACKGROUND. **Oncotarget**, v. 8, n. 23, p. 38022–38043, 2017.

MOKOENA DR, GEORGE BP, ABRAHAMSE H. Photodynamic Therapy Induced Cell Death Mechanisms in Breast Cancer. **Int J Mol Sci**, v. 29, n. 22, ed. 19, p.10506, sep 2021.

NAFEE N, YOUSSEF A, EL-GOWELLI H, ASEM H, KANDIL S. Antibiotic-free nanotherapeutics: hypericin nanoparticles thereof for improved in vitro and in vivo antimicrobial photodynamic therapy and wound healing. **Int J Pharm**, v.15, n454, p.249-258, jul 2013. doi: 10.1016/j.ijpharm.2013.06.067.

NELKE KH, PAWLAK W, GERBER H, LESZCZYNSZYN J. Head and neck cancer patients' quality of life. **Adv Clin Exp Med**, v.23, n.6, p.1019-27, nov 2014. doi: 10.17219/acem/37361.

NSEYO, U. O. Photodynamic therapy. **Urol Clin North Am**. v.19, n., p. 591-599, 1992.

OTRĘBA M, KOŚMIDER L. In vitro anticancer activity of fluphenazine, perphenazine and prochlorperazine. A review. **J Appl Toxicol**. v. 41, n.1, p.82-94, jan 2021.

PAKRAVAN, F; ABBASE, F; GARSHABI, MA; ISFAHANI, MN. Relationship between oral cancer stage and elapsed time from the onset of signs and symptoms to diagnosis and treatment. **Cancer Treat Res Commun.** v.28 p.100428, 2021.

PENG Q, BROWN SB, MOAN J, NESLAND JM, WAINWRIGHT M, GRIFFITHS J, DIXON B, CRUSE-SAWYER J, VERNON D. "Biodistribution of a methylene blue derivative in tumor and normal tissues of rats." **J Photochem Photobiol B**, v.20, n.1, p.63-71, 1993.

PETERS JM, GONZALEZ FJ. The Evolution of Carcinogenesis. **Toxicol Sci**, v,165, n.2, ed.2, p.272-276, oct 2018.

PREISER JC, LEJEUNE P, ROMAN A, CARLIER E, DE BACKER D, LEEMAN M, KAHN RJ, VINCENT JL. Methylene blue administration in septic shock: a clinical trial. **Crit Care Med**, v.23, n.2, p.259-64, 1995. doi: 10.1097/00003246-199502000-00010.

PRIHANTONO, P. Adjuvants therapy in oral cancer. **International Journal of Surgery and Medicine**, p. 183-187, 2018.

RAJESH, S. et al. Antimicrobial photodynamic therapy: An overview. **Journal of Indian Society of Periodontology**, v. 15, n. 4, p. 323–7, 2011.

RIVERA C. Essentials of oral cancer. **Int J Clin Exp Pathol**, v. 9, n8, ed.1,p.11884-94, sep 2015.

RODRIGUES, F. S. S.; POLIDORI, M. M. Confront and resiliency of the patients in the chemotherapeutic treatment and their families. **Rev. bras. cancerol.**, v. 58, n. 4, p. 619-627, 2012.

RODRÍGUEZ-CÓRDOVA RJ, GUTIÉRREZ-VALENZUELA CA, BOJANG P, ESQUIVEL R, HERNÁNDEZ P, RAMOS KS, GUZMÁN-ZAMUDIO R, LUCERO-ACUÑA A. Differential Response of BEAS-2B and H-441 Cells to Methylene Blue Photoactivation. **Anticancer Res**, v.39, n.7, p.3739-3744, jul 2019.

ROSAS, M. S. L. et al. Incidence of cancer in Brazil and the potential use of isatin derivatives in experimental oncology. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 2, p. 243–265, 2013.

RUTKOWSKA, M; HNITECKA, S; NAHAJOWSKI, M; DOMINISK, M; GERBER, H. Oral cancer: The first symptoms and reasons for delaying correct diagnosis and appropriate treatment. **Adv Clin Exp Med.** v. 29, n. 6, p.735–743, 2020.

SABERI S, HAKIMIHA N, ALAEDDINI M, ETEMAD-MOGHDAM S, ROUDBARI P, SHAHABI S. *In Vitro* Anti-tumor Effects of Photodynamic Therapy on Oral Squamous Cell Carcinoma: A Review. **J Lasers Med Sci.** v, 13, p49, jan 2022.

SAMI, A; ELIMAIRI, I; STATON, C; ROSS, RP; RYAN, CA. The Role of the Microbiome in Oral Squamous Cell Carcinoma with Insight into the Microbiome-Treatment Axis. **Int J Mol Sci.** v. 29, n.21, p 8061, 2020.

SANTOS, A. F.; ALMEIDA, D. R. Q.; TERRA, L. F. et al. Photodynamic therapy in cancer treatment – an update review. **J Cancer Metastasis**. v. 5, n. 25, p. 1-20, 2018.

SANTOS, L.S. **Estudo do potencial citotóxico do alcaloide aporfínico xilopina**. 2017. 90p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa, Fundação Oswaldo Cruz – Instituto Gonçalo Moniz. Salvador. 2017.

SARICH, P.; CANFELL, K.; EGGER, S.; BANKS, E.; JOSHY, G.; GROGAN, P.; WEBER, M. F. Alcohol consumption, drinking patterns and cancer incidence in an Australian cohort of 226,162 participants aged 45 years and over. **British Journal of Cancer**, n.5, p. 1–11, 2020.

SARODE G, MANIYAR N, SARODE S.C, JAFER M, PATIL S, AWAN K.H. Epidemiologic aspects of oral cancer. **Dis Mon**, v.66, n.12, p.100988, dec 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S001150292030050X?via%3Dihub>. Acesso em: 13 jul 2023.

SHRESTHA, G; MAHARJAN, L. Mouth Self-examination for Prevention and Control of Oral Cavity Cancer. **J Nepal Med Assoc** . v. 58, n.225, p.360-362, 2020.

SILVA, E.R; RICCI-JUNIOR, E; SANTOS, E.P. Terapia fotodinâmica no tratamento do câncer de pele: conceitos, utilizações e limitações. **Rev Bras Farm**. v. 90, n. 3, p. 211–217, 2009.

SUHAIL, Y. et al. Systems Biology of Cancer Metastasis. **Cell Syst**, v. 9, n. 2, p. 109-127, 2019.

SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R.L, LAVERSANNE M, SOERJOMATARAM I, JEMAL A, BRAY F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA Cancer J Clin**, v.71, n.3, p.209-249, may 2021. Disponível em: doi: 10.3322/caac.21660. Acesso em: 06 mar 2023.

SPANDIDOS, D.A. Oncogenes and tumor suppressor genes as paradigms in oncogenesis. **Journal of Buon**, v.12 Suppl 1, p.S9 – 12, 2007.

SUNG, H. FERLAY, J.; SIEGEL, R. L.; LAVERSANNE, M.; SOERJOMATARAM, I.; JEMAL, A.; BRAY, F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209–249, 2021.

TALLARIDA, R. J. **Drug synergism and dose-effect analysis**. Boca Raton, Florida: Chapman & Hall/CRC, 2000. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3379564/>. Acesso em: 07 jul 2023.

TALLARIDA, R. J. Revisiting the isobole and related quantitative methods for assessing drug synergism. **Journal of Pharmacology and Experimental**

Therapeutics, v. 342, n. 1, p. 2–8, 2012.

TAN G, XU J, YU Q, YANG Z, ZHANG H. The safety and efficiency of photodynamic therapy for the treatment of osteosarcoma: A systematic review of in vitro experiment and animal model reports. **Photodiagnosis Photodyn Ther.** 2022 Dec;40:103093, dec 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pdt.2022.103093>. Acesso em: 11 abr 2023.

TIAN Z, LI H, LIU Z, Yang L, ZHANG C, HE J, AI W, LIU Y. Enhanced Photodynamic Therapy by Improved Light Energy Capture Efficiency of Porphyrin Photosensitizers. **Curr Treat Options Oncol**, v.24, n. 9, p.1274-1292, jul 2023. Disponível em: doi: 10.1007/s11864-023-01120-0. Acesso em: 01 set 2023.

THEODORATOU, E. et al. Nature, Nurture, and Cancer Risks: Genetic and Nutritional Contributions to Cancer. **Annual Review of Nutrition**, v. 37, p. 293–320, 2017.

TREMBLAY JF, DUSSAULT S, VIAU G, GAD F, BOUSHIRA M, BISSONNETTE R. "Photodynamic therapy with toluidine blue in Jurkat cells: cytotoxicity, subcellular localization and apoptosis induction." **Photochem Photobiol Sci.** , v., n.11, p.852-856, 2002.

VAN STRATEN D., MASHAYEKHI V., DE BRUIJIN H.S., OLIVEIRA S. e ROBINSON D.J. Oncologic Photodynamic Therapy: Basic Principles, Current Clinical Status and Future Directions. **Cancers**, v. 9, n 19, p.1-54, 2017.

VARGA B, CSONKA Á, CSONKA A, MOLNÁR J, AMARAL L, SPENGLER G. Possible Biological and Clinical Applications of Phenothiazines. **Anticancer Res**, v.37, n.11, p.5983-5993, nov 2017.

VASQUEZ, L. et al. Inmunoterapia en cáncer: de los inicios al premio Nobel. **Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública**, v. 37, n. 1, p. 115–21, 2020.

VONK, J; WIT, JG; VOSKUIL, FJ, WITJES, MJH. Improving oral cavity cancer diagnosis and treatment with fluorescence molecular imaging. **Oral Dis.** v. 27, n. 1, p.21-26, 2021.

WARNAKULASURIYA, S; KER, AR. Oral Cancer Screening: Past, Present, and Future. **Journal Dent Res.** v. 100, p. 1313-1320, 2021.

WAINWRIGHT M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). **J Antimicrob Chemother**, v.42, n.1, p.13-28, jul. 1998. Disponível em: <http://doi:10.1093/jac/42.1.13>. Acesso em 05 dez 2022.

WAINWRIGHT, M.; BAPTISTA, M. S. The application of photosensitizers to tropical pathogens in the blood supply. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 8, n. 3, p. 240–8, 2011.

WANG X, LUO D, BASILION JP. Photodynamic Therapy: Targeting Cancer Biomarkers for the Treatment of Cancers. **Cancers (Basel)**, v.1513n.12, p.2992, jun 2021 doi: 10.3390/cancers13122992. PMID: 34203805; PMCID: PMC8232794.

WEYLL, Bárbara Mayoral Pedroso; OLIVEIRA, Thaís Feitosa Leitão de; CARNEIRO JUNIOR, Bráulio e RAMALHO, Luciana Maria Pedreira. Oral leukoplakia: malignant transformation after four years of surgical excision. **RGO, Rev. gaúch. odontol**, v.60, n.3, p. 385-389, 2012. Disponível em:

http://revodontobvsalud.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1981-86372012000300017. Acesso em: 28 jul 2022.

WIRTZ D, KONSTANTOPOULOS K, SEARSON PC. The physics of cancer: the role of physical interactions and mechanical forces in metastasis. **Nat Rev Cancer**. 2011 Jun 24;11(7):512-22. doi: 10.1038/nrc3080. PMID: 21701513; PMCID: PMC3262453.

WONDRAK, G. T. NQO1-activated phenothiazinium redox cyclers for the targeted bioreductive induction of cancer cell apoptosis. **Free Radic Biol Med**, v.43, p.178–90, 2007.

WONG, T; WIESENFELD, D. Oral Cancer. **Australian Dental Journal**, v.63, p. 91–99, mar, 2018. doi: 10.1111/adj.12594. Disponível em:

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/adj.12594>. Acesso em: 17 nov 2022.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Câncer**. Disponível em:

https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1. Acesso em: 10 de jul de 2023.


YOON, H.J; JANG, W.D. Nanotechnology-based photodynamic therapy. *J. Porphyr. Phthalocyanines*, vol. 17, no. 1–2, pp. 16–26, 2013.

<https://10.1142/S108842461230011X>. Disponível em:

<https://www.worldscientific.com/doi/abs/10.1142/S108842461230011X>. Acesso em: 20 jul. 2022.

Article

Photodynamic Therapy with an Association of Methylene Blue and Toluidine Blue Promoted a Synergic Effect against Oral Squamous Cell Carcinoma

Évilin Rocha ¹, Larissa Bomfim ², Sérgio Junior ³, Gustavo Santos ⁴ , Cássio Meira ^{1,2,3,*} and Milena Soares ^{2,3,*}¹ Department of Life Sciences, State University of Bahia, 2555, Salvador 41150-000, BA, Brazil² Gonçalo Moniz Institute, Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), 121, Salvador 40296-710, BA, Brazil³ Institute of Innovation in Advanced Health Systems (ISI SAS), University Center SENAI/CIMATEC, 1845, Salvador 41650-010, BA, Brazil⁴ Institute of Health Sciences, Federal University of Bahia, Salvador 40231-300, BA, Brazil; gmpires-santos@hotmail.com

* Correspondence: cassio.meira@fieb.org.br (C.M.); milena.soares@fiocruz.br (M.S.)

Simple Summary: Among the most malignant cancers, oral squamous cell carcinoma stands out as the most common malignant head and neck tumor, with high prevalence around the world, mainly in developing countries. Despite advances in the field of treatment, the prognosis of patients with oral squamous cell carcinoma remains poor, with a 5-year survival rate of less than 50%. Aiming to overcome the limitations of currently existing therapies, the present work proposes to investigate the potential of photodynamic therapy with methylene blue or toluidine blue. We found higher incorporation rates of both drugs in tumor cells compared to the non-tumor cell line. In addition, photodynamic therapy increases cytotoxic activity of both compounds for all lineages evaluated. Moreover, combination of both compounds promotes a synergistic effect on the viability of oral squamous cell carcinoma, opening up possibilities for the use of photodynamic therapy against other cancer cell types using combinations of these photosensitizers.



Citation: Rocha, É.; Bomfim, L.; Junior, S.; Santos, G.; Meira, C.; Soares, M. Photodynamic Therapy with an Association of Methylene Blue and Toluidine Blue Promoted a Synergic Effect against Oral Squamous Cell Carcinoma. *Cancers* **2023**, *15*, 5509. <https://doi.org/10.3390/cancers15235509>

Academic Editors: Muhammad Abdul Hadi, Md. Sanower Hossain and Bey-Hing Goh

Received: 17 October 2023

Revised: 3 November 2023

Accepted: 7 November 2023

Published: 22 November 2023

Abstract: Among the most malignant cancers, oral squamous cell carcinoma (OSCC) stands out as the most common malignant head and neck tumor. Despite advances in the field of treatment, the prognosis of patients with OSCC remains poor. Aiming to overcome the limitations of the currently existing therapies against OSCC, the present work aims to investigate the potential of photodynamic therapy (PDT) with phenothiazine derivatives used alone or in combination. The incorporation of methylene blue (MB) and toluidine blue (TB) was evaluated in OSCC cell lines (HSC-3 and SCC-9) and a nontumor cell line (Hfib). Both compounds exhibited concentration and time-dependent incorporation, with higher rates observed in tumor cells. Regarding dark-phase cytotoxic activity, SCC-9 cells were the most sensitive cell line with an IC₅₀ value of 362.6 μM and 41.4 μM for MB and TB, respectively. Using PDT, all lineages showed greater sensitivity, presenting lower IC₅₀ values when compared to the dark phase values. The combination index values of 0.69 (dark phase) and 0.73 (clear phase) associated with concave isobolograms, in both phases, revealed that MB and TB have synergistic effects when combined against SCC-9 cells. These findings suggest that MB or TB assisted with PDT holds promise for OSCC treatment.

Keywords: anticancer therapy; phenothiazines; oral carcinoma



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Among the most malignant cancers, oral squamous cell carcinoma (OSCC) stands out as the most common malignant head and neck tumor, with high prevalence around the world, mainly in developing countries [1,2]. OSCC comprises more than 90% of oral cancers and approximately two thirds of cases occur in developing countries [2]. The first-line

treatment is surgical resection associated with chemotherapy or radiotherapy, which can be performed before or after the surgical procedure [3]. Despite advances in the field of treatment, the prognosis of patients with OSCC remains poor, with a 5-year survival rate of less than 50% being reported in the literature [4]. Therefore, new therapies for OSCC are still required.

An attractive option for the treatment of OSCC is the use of photodynamic therapy (PDT). PDT involves the use of a photosensitizer along with a special type of light that, when combined, induce the production of a form of oxygen that is harmful to various cell types, including tumor cells [5–7]. PDT presents itself as a potentially applicable, safe and accessible option, being an attractive option compared to the use of conventional chemotherapy, mainly with regard to not inducing resistance and not requiring multiple treatment sessions [8]. PDT is a minimally invasive therapeutic modality that is based on the administration (systemic or topical) of a photosensitizer followed by light activation. The photosensitizer is a type of photoactive pigment that generates singlet oxygen by irradiating visible light using a wavelength that corresponds to its absorption spectrum [9,10]. The activated photosensitizer can react with molecules in its vicinity by transferring electrons or hydrogen, leading to the production of free radicals (type I reaction) or by transferring energy to oxygen, leading to the production of singlet oxygen, causing damage in a more effective way in tumor cells than in normal cells, resulting in the selective death of these cells via apoptotic or necrotic mechanisms (type II reaction). Both pathways can lead to cell death and destruction of diseased tissue [11]. This therapeutic approach has been shown to be a promising alternative for the treatment of several histotypes of cancer, such as: oropharyngeal cancer, esophageal cancer and cutaneous carcinoma [12–14].

Among the various classes of photosensitizers, phenothiazines stand out for being molecules with great potential and propensity for the formation of reactive oxygen species [15]. So far, more than 5000 phenothiazine derivatives have been obtained and this class has been highlighted for its variety of chemical and biological properties, low cost and use associated with few adverse effects, since it is activated by ambient light and quickly eliminated from the body [16]. Within the class, methylene blue (MB) and toluidine blue (TB) stand out for their use in the medical and dental fields, both for diagnosis (histopathological stains, tumor identification) and for treatments of diseases such as: cancer, septic shock, malaria, methemoglobinemia and Alzheimer's [17–21]. Aiming to overcome the limitations of currently existing therapies for OSCC, the present work proposes to investigate the potential of PDT with phenothiazine derivatives used alone or in combination.

2. Materials and Methods

2.1. Drugs

Methylene blue (MB) and toluidine blue (TB) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Both compounds were diluted in PBS and filtered with a 0.22 µm syringe filter. Both compounds were stored in a –20 °C freezer until use.

2.2. Cell Culture

HSC-3 (human tongue squamous cell carcinoma) and SCC-9 (human tongue squamous cell carcinoma) cell lines were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA). Both cell lines were cultured in DMEM/F12 medium (1:1 mixture of Dulbecco's modified Eagle's medium and Ham's F12 medium, Waltham, MA, USA,) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD, USA), 400 ng/mL hydrocortisone (Sigma-Aldrich) and 50 µg/mL of gentamicin (Life, Carlsbad, CA, USA). The normal human epithelial fibroblast cell line (Hfib) was isolated from a healthy donor skin biopsy and cultured in DMEM medium (GIBCO) supplemented with 10% FBS and 50 µg/mL of gentamicin, as previously described [22]. The cells were maintained in a humidified incubator at 37 °C and 5% CO₂. All cell lines were regularly

tested for mycoplasma contamination using MycoAlert[®] Mycoplasma Detection Kit (Lonza, Basel, Switzerland).

2.3. MB and TB Incorporation Test

Initially, all the cell lines were plated into 96-well plates at a cell density of 2×10^4 cells/well in their respective medium described above for 24 h at 37 °C and 5% CO₂. After that time, different concentrations of MB (12.5–400 µM) or TB (6.25–200 µM) were added to the plate, in triplicate, and the plates were incubated for different times (15, 30, 60 and 120 min). Then, the plates were washed twice with PBS and the cells were incubated with sodium dodecyl sulfate (SDS; Sigma-Aldrich; 100 µL of a solution of 50 mM diluted in PBS) to promote cell membrane lysis and release of MB or TB incorporated by the cells for 30 min in room temperature. The absorbance of the incorporated MB or TB was measured in a spectrophotometer at a wavelength of 660 nm. Three independent experiments were performed.

2.4. Cell Viability

The cells were plated into 96-well plates at a cell density of 2×10^4 cells/well in their respective medium described above for 24 h at 37 °C and 5% CO₂. After that time, different concentrations of MB (12.5–400 µM) or TB (6.25–200 µM) were added to the plate, in quadruplicate, and the plates were incubated at 37 °C for 2 h. Then, the plates were washed twice with PBS, the medium was replaced, and the plates were incubated at 37 °C for an additional 24 h. Finally, cell viability was measured using CellTiter-Glo[®] Luminescent Cell viability assay, which indicates cell viability by measuring ATP, following the manufacturer's instructions. Both compounds were tested in the absence of light (dark phase) or after photodynamic exposure (clear phase) with a diode laser which has a semiconductor active medium InGaAlP (λ 660 nm, 100 mW, 12 J/cm², CW, Flash Lase III, DMC equipamentos, São Carlos, São Paulo, Brazil) (Figure 1). The photodynamic exposure was carried out after the washes with PBS in wells with 200 µL of DMEM.

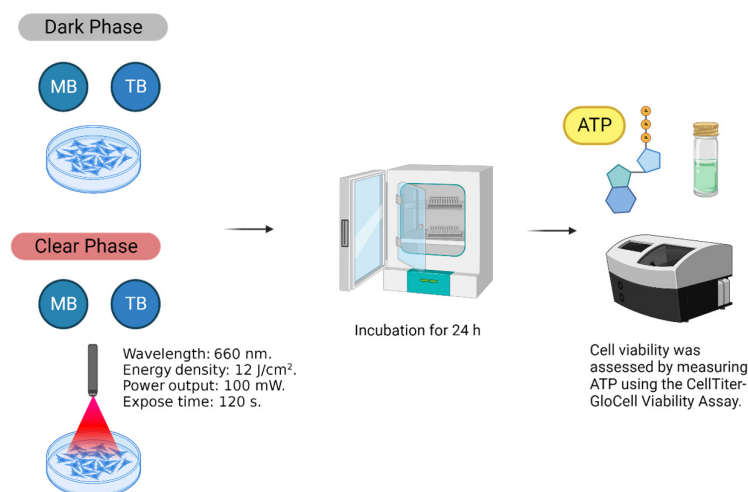


Figure 1. Experiment design. Phenothiazine derivatives (MB and TB) were tested on three cell lines: human fibroblasts (Hfib), HSC-3 (human tongue squamous cell carcinoma) and SCC-9 (human tongue squamous cell carcinoma). Cell viability was measured using CellTiter-Glo[®] Luminescent Cell viability assay. The experiments were performed in the absence (dark phase) or presence (clear phase) of PDT.

2.5. Drug Combination Assay

For in vitro drug combinations, each one of the drugs was tested in eight concentrations alone (12.5–400 µM) or combined in a ratio of 1:1 or 2:1 MB/TB (3.12–200 µM) against SCC-9 cells following the protocol described above. The combined therapy was performed

during both the dark and clear phase. The analysis of the combined effects was performed by determining the combination index (CI), used as cutoff to determine synergism, by using the Chou–Talalay CI method [23], and through the construction of an isobologram using the fixed ratio method, as described previously [24].

2.6. Statistical Analyses

We used non-linear regression for calculating the IC_{50} values. One-way analysis of variance and Newman–Keuls multiple comparison tests were used to determine the statistical significance of the group comparisons in the in vitro assays. The results were considered statistically significant when p was <0.05 . All analyses were performed using Graph Pad Prism version 8.0 (Graph Pad Software, San Diego, CA, USA).

3. Results and Discussion

Initially, the incorporation of phenothiazine derivatives (MB and TB) was determined in oral squamous cell carcinomas (HSC-3 and SCC-9) and in a non-tumor cell line (Hfib). As revealed in Figure 2, MB incorporation showed a concentration and time-dependent profile for all cell lines, with the highest incorporation rates after two hours of incubation for all lineages. Interestingly, significant rates ($p < 0.05$) of MB incorporation by non-tumor cells were only observed at the highest concentration evaluated (400 μ M), which is different to what was observed in tumor cells that had significant rates ($p < 0.05$) of MB incorporation at concentrations ranging from 100 to 400 μ M (Figure 2). Among the three evaluated lineages, the SCC-9 cell line showed the highest MB incorporation rates (Figure 2).

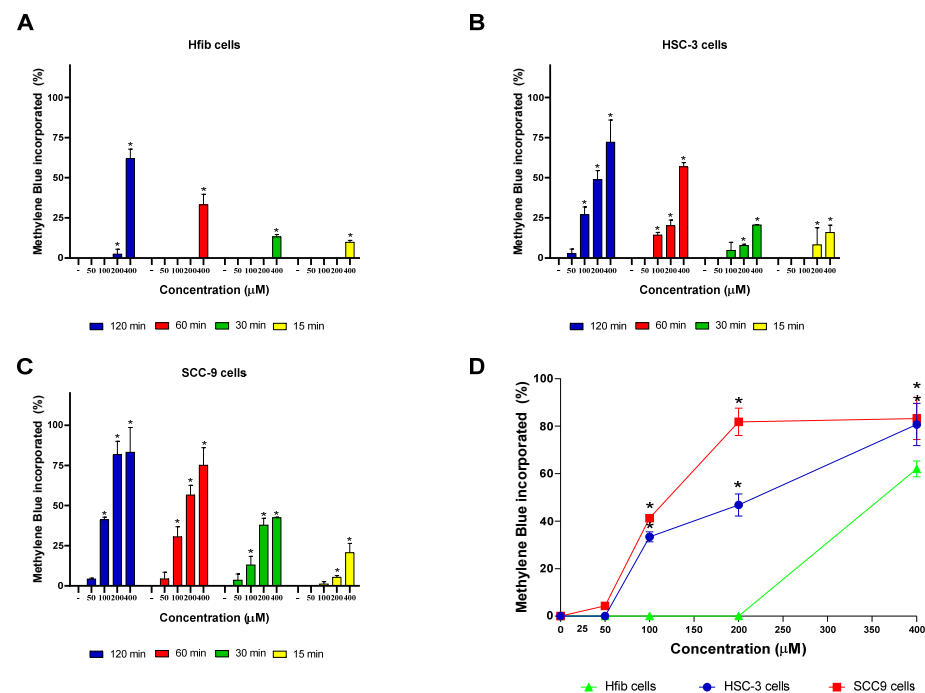


Figure 2. MB incorporation over time in different cell lines. (A) Incorporation rate of MB in Hfib cells. (B) Incorporation of MB in HSC-3 cells. (C) Incorporation of MB in SCC-9 cells. (D) Comparison of the MB incorporation rate between the cell lines evaluated after 2 h of treatment. Values represent the means \pm SD of four determinations obtained in one of the three experiments performed. * $p < 0.05$ compared to untreated cells (-) in graphs (A–C). * $p < 0.05$ compared to the incorporation rate of MB by Hfib in the same concentration in graph (D).

The TB incorporation rate was also evaluated in the three cell lines. An incorporation profile similar to that of MB was observed, with the two tumor cell lines having more significant incorporation rates ($p < 0.05$) than the non-tumor cell line, especially at 100 or 200 μ M (Figure 3). A concentration and time-dependent incorporation of TB was also

observed in the tumor cell lines, with the time of 2 h showing the highest TB incorporation rates for both tumor cell lines. Regarding the lineage with the highest TB incorporation rates, we observed that at high concentrations (100 and 200 μM), the HSC-3 lineage had greater absorption and at lower concentrations (25 and 50 μM) the SCC-9 cell line had higher rates of incorporation (Figure 3).

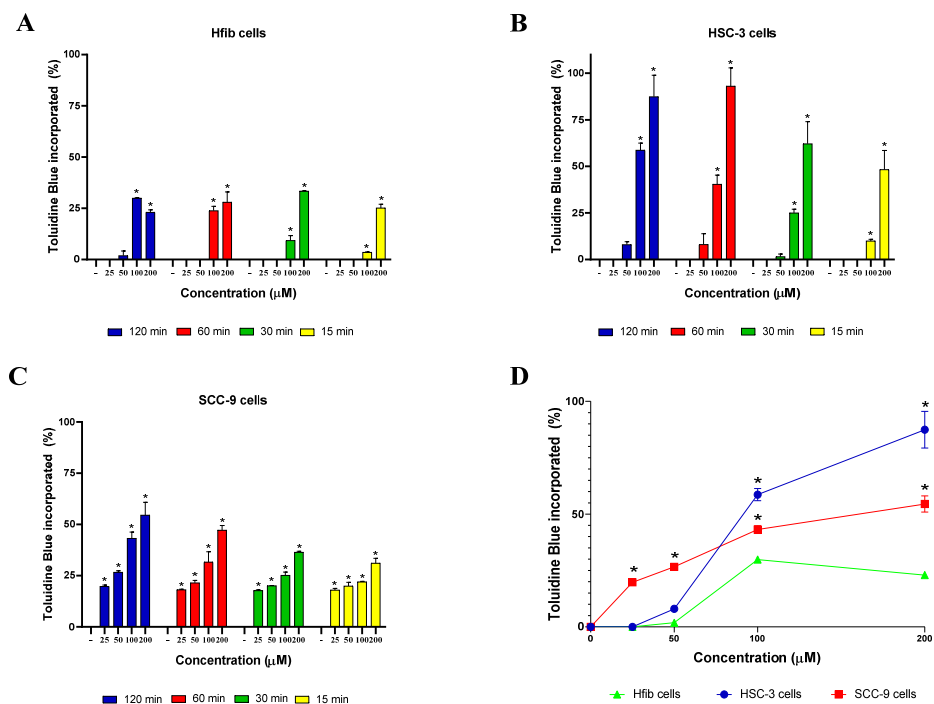


Figure 3. TB incorporation over time in different cell lines. (A) Incorporation of TB in Hfib cells. (B) Incorporation of TB in HSC-3 cells. (C) Incorporation of TB in SCC-9 cells. (D) Comparison of the TB incorporation rate between the cell lines evaluated after 2 h of treatment. Values represent the means \pm SD of four determinations obtained in one of the three experiments performed. * $p < 0.05$ compared to untreated cells (-) in graphs (A–C). * $p < 0.05$ compared to the incorporation rate of TB by Hfib in the same concentration in graph (D).

The tendency of both compounds being better incorporated by tumor cells than non-tumor cells is well described in the literature [25–27]. This feature justifies the employment of both compounds as a visual tumor marker to detect and delineate certain types of cancers, especially on oral cavity, and their use as photosensitizers for the treatment of different types of cancer [28,29]. The selectivity of the evaluated phenothiazine derivatives may be related to the compounds' affinity for low-density lipoproteins (LDLs), which are found in greater amounts in tumor cells [30]. LDLs promote the cholesterol uptake that is necessary for membrane formation during cell division and work as a “transporter” of the photosensitizers into intracellular space [31,32]. Once tumor cells have increased mitotic division rates, they have a high expression of lipoprotein receptors on the cell surface and a higher LDL uptake [30,33].

Regarding cytotoxic activity in the dark phase, MB showed a significant inhibitory effect on cell viability, especially at 400 μM for all lineages, with the SCC-9 cell line being the most sensitive with an IC_{50} value of 362.6 μM (Figure 4; Table 1). After using a fixed energy density (J/cm^2) to excite MB, we found an increase in cytotoxic effect, with IC_{50} values of 234.5, 307.4 and 294.4 μM against HSC-3, SCC-9 and Hfib cells, respectively, versus IC_{50} values of >400, 362.6 and >400 in the dark phase, respectively (Table 1). The largest difference was observed in HSC-3 cells at 400 μM . When tested in the absence of light, MB (400 μM) caused an inhibition of 34.3% in cell viability. Under the same conditions, however, in the presence of light, MB (400 μM) inhibited 70.3% of cell viability (Figure 4).

The difference observed between the groups was statistically significant ($p < 0.05$). MB-PDT is well employed against several types of cancer such as: cervical carcinoma, leukemia, osteosarcoma, mammary adenocarcinoma, melanoma and lung adenocarcinoma [7,29,34–36]. However, MB-PDT effects on OSCCs are poorly described and also evaluated with methodologies less sensitive than the ATP-based assay as was used in the present work [37–39]. Previously, KOFLER and colleagues [37] demonstrated cytotoxic activity of MB alone or with PDT in CA-9-22 cells, and LE and colleagues [38] showed the cytotoxic activity of MB in SCC-25 cells.

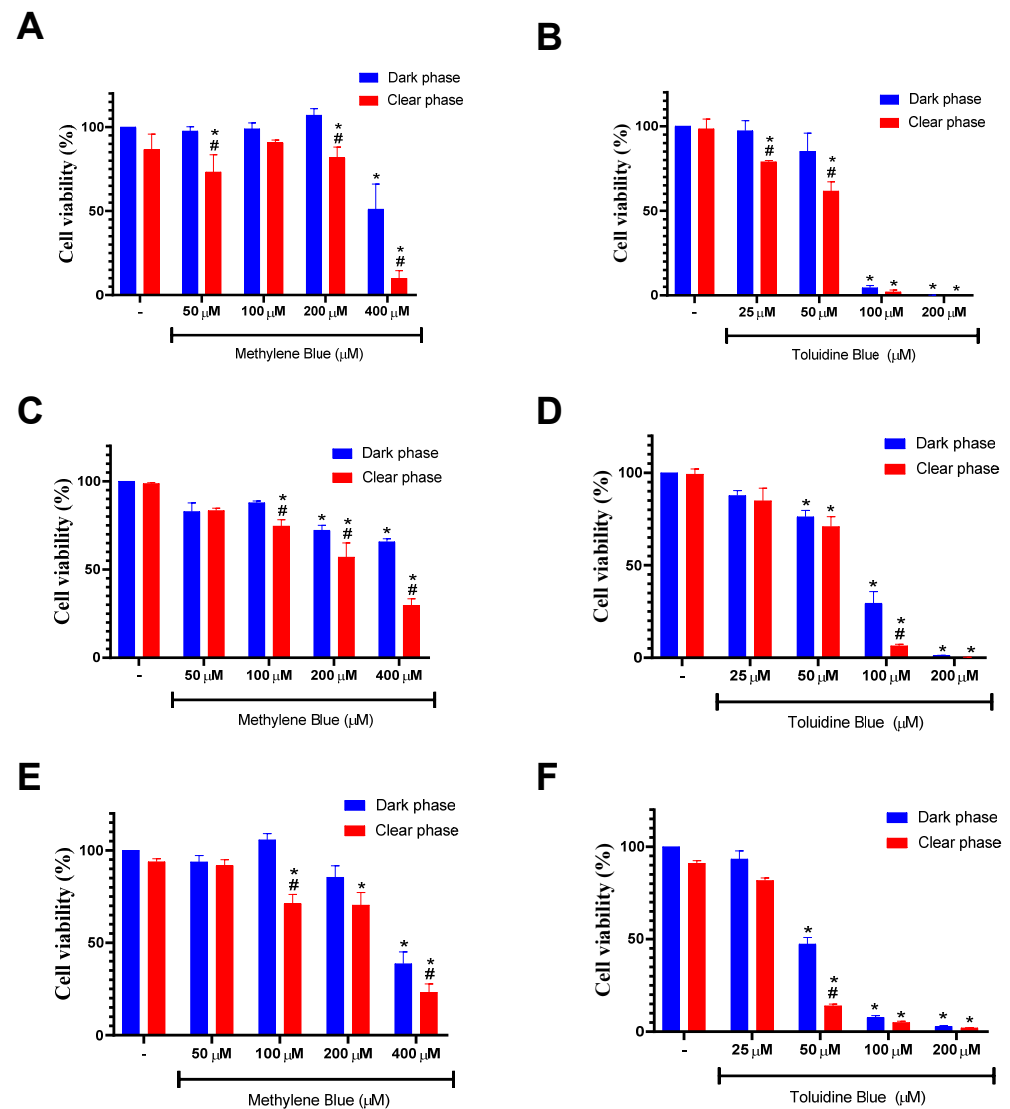


Figure 4. Effects of MB and TB on the cell viability of Hfib (A,B), HSC-3 (C,D) and SCC-9 cell lines (E,F). Cells were treated with different concentrations of methylene blue (50–400 μM) or toluidine blue (25–200 μM) in the absence (dark phase; blue columns) or presence (clear phase; red columns) of PDT. Cell viability was determined by ATP measurement using the CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay. Values represent the means \pm SD of four determinations obtained in one of the three experiments performed. * $p < 0.05$ compared to untreated cells (-). # $p < 0.05$ compared to the same concentration in the dark phase.

Table 1. Cytotoxic activity of MB and TB in different cell lines in the absence (dark phase) or presence (clear phase) of light.

Sample	IC ₅₀ ± S.D. (µM) HSC-3		IC ₅₀ ± S.D. (µM) SCC-9		IC ₅₀ ± S.D. (µM) Hfib	
	Dark Phase	Clear Phase	Dark Phase	Clear Phase	Dark Phase	Clear Phase
MB	>400	234.5 ± 9.6	362.6 ± 15.6	307.4 ± 28.8	>400	294.4 ± 12.1
TB	73.2 ± 2.6	58.7 ± 2.3	41.4 ± 4.0	33.8 ± 1.4	66.6 ± 5.9	53.7 ± 3.6

Values represent the mean ± SD and were calculated from three independent experiments. IC₅₀ = inhibitory concentration of 50%. MB = methylene blue. TB = toluidine blue. SD = standard deviation.

In comparison to MB, TB showed a more prominent cytotoxic effect on cell viability in the dark phase for all lineages, especially in concentrations between 50 and 200 µM (Figure 4). As revealed in Table 1, the lowest IC₅₀ value found was obtained using the SCC-9 cell line (41.4 µM). The dark toxicity of TB is well characterized in the literature and also associated with undesired side effects, thereby limiting the concentrations and doses that can be used [40–42].

In the clear phase, all lineages showed greater sensitivity, presenting lower IC₅₀ values when compared to the dark phase values, again with the SCC-9 cell line showing the highest sensitivity with an IC₅₀ value of 33.8 µM (Table 1). The largest difference was observed in SCC-9 cells at 50 µM. When tested in the dark phase, TB caused an inhibition of 52.6% in cell viability. Under the same conditions, however, in the presence of light, TB inhibited 86% of cell viability (Figure 4). The difference observed between groups was statistically significant ($p < 0.05$). Similar results using TB-PDT were found using breast cancer cell lines, where TB presented an IC₅₀ value of 1.13 µM in the dark phase and 0.88 µM in the presence of light, reinforcing the advantages of PDT [41]. Despite its already established use in conjunction with other techniques in the field of cancer diagnosis, the use of TB as a photosensitizer for the treatment of oral cancer is not much discussed in the literature [42]. It is also important to report that exposure to PDT without a photosensitizer did not cause loss of cell viability in the three lineages evaluated, suggesting that the phototoxicity must be attributed exclusively to phenothiazine derivatives as previously reported [41,43].

Lastly, the cytotoxic activity of MB and TB in combination was investigated against SCC-9 cells, the most sensitive lineage for both compounds. First the combination was carried out in the absence of light, where MB and TB presented IC₅₀ values of 368.5 and 43.8 µM when tested individually, and 30.5 and 26.9 µM when tested in combination, respectively. These data demonstrate an approximately 13-fold reduction in the IC₅₀ value for MB and an approximately 2-fold reduction in the IC₅₀ value for TB (Table 2).

Table 2. Cytotoxic activity of MB and TB on SCC-9 cells alone or in combination.

Sample	IC ₅₀ ± S.D. (µM) Dark Phase		IC ₅₀ ± S.D. (µM) Clear Phase		CI ^a	
	Drug Alone	Combination	Drug Alone	Combination	CI Dark Phase	CI Clear Phase
MB	368.5 ± 10.8	30.5 ± 4.8	302.3 ± 25.7	23.4 ± 1.4	0.69 ± 0.05	0.73 ± 0.08
TB	43.8 ± 2.9	26.9 ± 1.4	33.7 ± 1.2	22.4 ± 2.4		

Values represent the mean ± SD and were calculated from two independent experiments. ^a Combination index (CI). Cutoff: CI value of 0.3–0.7, synergism; 0.7–0.85, moderate synergism; 0.85–0.9, slight synergism; 0.9–1.1, additivity; > 1.1, antagonism. IC₅₀ = inhibitory concentration of 50%. MB = methylene blue. TB = toluidine blue. SD = standard deviation.

Drug combination was also performed in the presence of light. As shown in Table 2, in the clear phase, MB and TB showed IC₅₀ values of 302.3 and 33.7 µM when tested separately and 23.4 and 22.4 µM when combined, respectively. These data demonstrate an

approximately 13-fold reduction in the IC_{50} value for MB and an approximately 1.5-fold in the IC_{50} value for TB.

Moreover, the combination index values of 0.69 (dark phase) and 0.73 (clear phase) associated with concave isobolograms, in both phases, revealed that MB and TB have synergistic effects when combined against the cell viability of SCC-9 cells (Table 2; Figure 5). Interestingly, the synergistic effect of MB and TB in the dark phase has already been demonstrated on the inhibition of the proliferation of amastigotes of *T. cruzi* with a combination index of 0.89 [44]. In addition, combination of MB plus TB in the clear phase eliminated the bacterial growth of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* found in naturally contaminated canola seeds, which did not occur when the photosensitizers were tested alone [45]. For treatment of OSCC, this is the first report related to the synergistic effect of a combination of MB plus TB in the dark phase and clear phase. However, combinations of phenothiazine derivatives assisted with photodynamic therapy already show synergistic effects with other molecules and with recognized cytotoxic activity. For example, combination therapy with MB-assisted photodynamic therapy and salicylic acid or with doxorubicin against breast cancer cells improve the efficacy of chemotherapy [46,47].

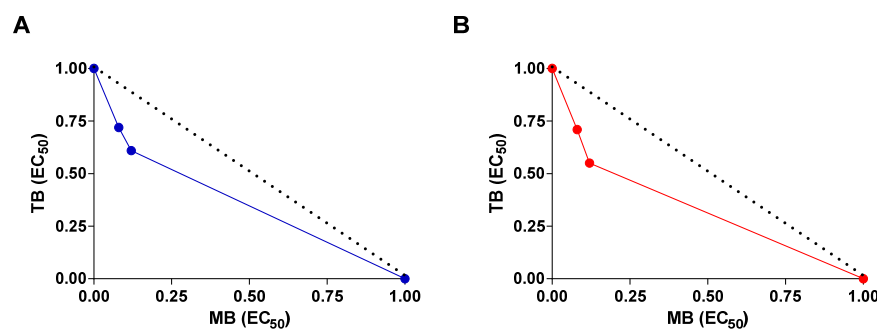


Figure 5. Isobologram describing the synergistic effects of MB and TB on SCC-9 cell viability. The test was conducted in the absence of light (dark phase) (A) or in the presence (clear phase) of PDT (B). Cell viability was determined by ATP measurement after 24 h of incubation. Broken lines correspond to the predicted positions of the experimental points for additive effects.

4. Conclusions

In sum, MB or TB assisted with PDT as a useful strategy for the treatment of oral carcinoma was reinforced in the present investigation. In addition, it was shown that the combination of MB and TB has a synergistic effect on the viability of oral squamous cell carcinoma, opening up possibilities for the use of PDT against other cancer cell types using combinations of these phenothiazine derivatives already well characterized as promising photosensitizers.

Author Contributions: Conceptualization, G.S., C.M. and M.S.; formal analysis, É.R., L.B., S.J. and G.S.; funding acquisition, M.S.; methodology, É.R. and S.J.; supervision, C.M. and M.S.; validation, É.R., S.J. and C.M.; writing—original draft, É.R. and L.B.; writing—review and editing, C.M. and M.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB; (grant number 0002/2014).

Institutional Review Board Statement: Ethics Committee of Integrated Manufacturing and Technology Campus (CIMATEC)–SENAI/BAHIA (CAAE: 20244619.1.0000.9287).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R.L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J. Clin.* **2021**, *71*, 209–249. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Warnakulasuriya, S.; Kerr, A.R. Oral Cancer Screening: Past, Present, and Future. *J. Dent. Res.* **2021**, *100*, 1313–1320. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Imbesi Bellantoni, M.; Picciolo, G.; Pirrotta, I.; Irrera, N.; Vaccaro, M.; Vaccaro, F.; Squadrito, F.; Pallio, G. Oral Cavity Squamous Cell Carcinoma: An Update of the Pharmacological Treatment. *Biomedicines* **2023**, *11*, 1112. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Ferreira, A.K.; Carvalho, S.H.; Granville-Garcia, A.F.; Sarmiento, D.J.; Agripino, G.G.; Abreu, M.H.; Melo, M.C.; Caldas, A.D., Jr.; Godoy, G.P. Survival and Prognostic Factors in Patients with Oral Squamous Cell Carcinoma. *Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal* **2021**, *26*, e387–e392. [[CrossRef](#)]
5. Correia, J.H.; Rodrigues, J.A.; Pimenta, S.; Dong, T.; Yang, Z. Photodynamic Therapy Review: Principles, Photosensitizers, Applications, and Future Directions. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, 1332. [[CrossRef](#)]
6. Nelke, K.H.; Pawlak, W.; Gerber, H.; Leszczyszyn, J. Head and Neck Cancer Patients' Quality of Life. *Adv. Clin. Exp. Med.* **2014**, *23*, 1019–1027. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Dos Santos, A.F.; Terra, L.F.; Wailemann, R.A.; Oliveira, T.C.; Gomes, V.M.; Mineiro, M.F.; Meotti, F.C.; Bruni-Cardoso, A.; Baptista, M.S.; Labriola, L. Methylene Blue Photodynamic Therapy Induces Selective and Massive Cell Death in Human Breast Cancer Cells. *BMC Cancer* **2017**, *17*, 194. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Wang, X.; Luo, D.; Basilion, J.P. Photodynamic Therapy: Targeting Cancer Biomarkers for the Treatment of Cancers. *Cancers* **2021**, *13*, 2992. [[CrossRef](#)]
9. Nafee, N.; Youssef, A.; El-Gowell, H.; Asem, H.; Kandil, S. Antibiotic-free nanotherapeutics: Hypericin nanoparticles thereof for improved in vitro and in vivo antimicrobial photodynamic therapy and wound healing. *Int. J. Pharm.* **2013**, *454*, 249–258. [[CrossRef](#)]
10. Li, G.; Sun, L.; Ji, L.; Chao, H. Ruthenium(II) Complexes with dppz: From Molecular Photoswitch to Biological Applications. *Dalton Trans.* **2016**, *45*, 13261–13276. [[CrossRef](#)]
11. Agostinis, P.; Berg, K.; Cengel, K.A.; Foster, T.H.; Girotti, A.W.; Gollnick, S.O.; Hahn, S.M.; Hamblin, M.R.; Juzeniene, A.; Kessel, D.; et al. Photodynamic Therapy of Cancer: An Update. *CA Cancer J. Clin.* **2011**, *61*, 250–281. [[CrossRef](#)]
12. Pantiuschenko, I.V.; Rudakovskaya, P.G.; Starovoytova, A.V.; Mikhaylovskaya, A.A.; Abakumov, M.A.; Kaplan, M.A.; Tsygankov, A.A.; Majouga, A.G.; Grin, M.A.; Mironov, A.F. Development of Bacteriochlorophyll a-Based Near-Infrared Photosensitizers Conjugated to Gold Nanoparticles for Photodynamic Therapy of Cancer. *Biochemistry* **2015**, *80*, 752–762. [[CrossRef](#)]
13. Mallidi, S.; Anbil, S.; Bulin, A.L.; Obaid, G.; Ichikawa, M.; Hasan, T. Beyond the Barriers of Light Penetration: Strategies, Perspectives and Possibilities for Photodynamic Therapy. *Theranostics* **2016**, *6*, 2458–2487. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Zhang, Q.; Li, L. Photodynamic Combinational Therapy in Cancer Treatment. *J. BUON* **2018**, *23*, 561–567.
15. Varga, B.; Csonka, Á.; Csonka, A.; Molnár, J.; Amaral, L.; Spengler, G. Possible Biological and Clinical Applications of Phenothiazines. *Anticancer Res.* **2017**, *37*, 5983–5993. [[CrossRef](#)]
16. Andreadis, D.; Pavlou, A.-M.; Sotiriou, E.; Vrani, F.; Ioannides, D.; Kolokotronis, A. Utility of Photodynamic Therapy for the Management of Oral Potentially Malignant Disorders and Oral Cancer. *Transl. Res. Oral Oncol.* **2016**, *1*, 2057178X16669161. [[CrossRef](#)]
17. Preiser, J.C.; Lejeune, P.; Roman, A.; Carlier, E.; De Backer, D.; Leeman, M.; Kahn, R.J.; Vincent, J.L. Methylene Blue Administration in Septic Shock: A Clinical Trial. *Crit. Care Med.* **1995**, *23*, 259–264. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Clifton, J., 2nd; Leikin, J.B. Methylene Blue. *Am. J. Ther.* **2003**, *10*, 289–291. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Meissner, P.E.; Mandi, G.; Coulibaly, B.; Witte, S.; Tapsoba, T.; Mansmann, U.; Rengelshausen, J.; Schiek, W.; Jahn, A.; Walter-Sack, I.; et al. Methylene Blue for Malaria in Africa: Results from a Dose-finding Study in Combination with Chloroquine. *Malar J.* **2006**, *5*, 84. [[CrossRef](#)]
20. Yin, R.; Hamblin, M.R. Antimicrobial Photosensitizers: Drug Discovery Under the Spotlight. *Curr. Med. Chem.* **2015**, *22*, 2159–2185. [[CrossRef](#)]
21. Oz, M.; Lorke, D.E.; Petroianu, G.A. Methylene Blue and Alzheimer's Disease. *Biochem. Pharmacol.* **2009**, *78*, 927–932. [[CrossRef](#)]
22. Martins, G.L.S.; Paredes, B.D.; Sampaio, G.L.A.; Nonaka, C.K.V.; da Silva, K.N.; Allahdadi, K.J.; França, L.S.A.; Soares, M.B.P.; Dos Santos, R.R.; Souza, B.S.F. Generation of human iPS cell line CBTCi001-A from dermal fibroblasts obtained from a healthy donor. *Stem Cell Res.* **2019**, *41*, 101630. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Chou, T.C.; Talalay, P. Quantitative Analysis of Dose-Effect Relationships: The Combined Effects of Multiple Drugs or Enzyme Inhibitors. *Adv. Enzyme Regul.* **1984**, *22*, 27–55. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Fivelman, Q.L.; Adagu, I.S.; Warhurst, D.C. Modified Fixed-Ratio Isobologram Method for Studying In Vitro Interactions Between Atovaquone and Proguanil or Dihydroartemisinin Against Drug-Resistant Strains of *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, *48*, 4097–4102. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Peng, Q.; Brown, S.B.; Moan, J.; Nesland, J.M.; Wainwright, M.; Griffiths, J.; Dixon, B.; Cruse-Sawyer, J.; Vernon, D. Biodistribution of a Methylene Blue Derivative in Tumor and Normal Tissues of Rats. *J. Photochem. Photobiol. B* **1993**, *20*, 63–71. [[CrossRef](#)]
26. Tremblay, J.F.; Dussault, S.; Viau, G.; Gad, F.; Boushira, M.; Bissonnette, R. Photodynamic Therapy with Toluidine Blue in Jurkat Cells: Cytotoxicity, Subcellular Localization and Apoptosis Induction. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2002**, *1*, 852–856. [[CrossRef](#)]

27. Gandolfo, S.; Pentenero, M.; Broccoletti, R.; Pagano, M.; Carrozzo, M.; Scully, C. Toluidine Blue Uptake in Potentially Malignant Oral Lesions In Vivo: Clinical and Histological Assessment. *Oral Oncol.* **2006**, *42*, 89–95. [[CrossRef](#)]
28. Warnakulasuriya, K.A.; Johnson, N.W. Sensitivity and Specificity of OraScan[®] Toluidine Blue Mouthrinse in the Detection of Oral Cancer and Precancer. *J. Oral Pathol. Med.* **1996**, *25*, 97–103. [[CrossRef](#)]
29. Kirszberg, C.; Rumjanek, V.M.; Capella, M.A. Methylene Blue Is More Toxic to Erythroleukemic Cells Than to Normal Peripheral Blood Mononuclear Cells: A Possible Use in Chemotherapy. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2005**, *56*, 659–665. [[CrossRef](#)]
30. Kwiatkowski, S.; Knap, B.; Przystupski, D.; Saczko, J.; Kędzierska, E.; Knap-Czop, K.; Kotlińska, J.; Michel, O.; Kotowski, K.; Kulbacka, J. Photodynamic Therapy-Mechanisms, Photosensitizers and Combinations. *Biomed. Pharmacother.* **2018**, *106*, 1098–1107. [[CrossRef](#)]
31. Hamblin, M.R.; Newman, E.L. Photosensitizer Targeting in Photodynamic Therapy. II. Conjugates of Haematoporphyrin with Serum Lipoproteins. *J. Photochem. Photobiol. B* **1994**, *26*, 147–157. [[CrossRef](#)]
32. Castano, A.P.; Demidova, T.N.; Hamblin, M.R. Mechanisms in Photodynamic Therapy: Part Three-Photosensitizer Pharmacokinetics, Biodistribution, Tumor Localization and Modes of Tumor Destruction. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **2005**, *2*, 91–106. [[CrossRef](#)]
33. Cruz, P.M.; Mo, H.; McConathy, W.J.; Sabnis, N.; Lacko, A.G. The Role of Cholesterol Metabolism and Cholesterol Transport in Carcinogenesis: A Review of Scientific Findings, Relevant to Future Cancer Therapeutics. *Front. Pharmacol.* **2013**, *4*, 119. [[CrossRef](#)]
34. de Freitas, L.M.; Serafim, R.B.; de Sousa, J.F.; Moreira, T.F.; Dos Santos, C.T.; Baviera, A.M.; Valente, V.; Soares, C.P.; Fontana, C.R. Photodynamic Therapy Combined to Cisplatin Potentiates Cell Death Responses of Cervical Cancer Cells. *BMC Cancer* **2017**, *17*, 123. [[CrossRef](#)]
35. Guan, J.; Lai, X.; Wang, X.; Leung, A.W.; Zhang, H.; Xu, C. Photodynamic Action of Methylene Blue in Osteosarcoma Cells In Vitro. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **2014**, *11*, 13–19. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Rodríguez-Córdova, R.J.; Gutiérrez-Valenzuela, C.A.; Bojang, P.; Esquivel, R.; Hernández, P.; Ramos, K.S.; Guzmán-Zamudio, R.; Lucero-Acuña, A. Differential Response of BEAS-2B and H-441 Cells to Methylene Blue Photoactivation. *Anticancer Res.* **2019**, *39*, 3739–3744. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Kofler, B.; Romani, A.; Pritz, C.; Steinbichler, T.B.; Schartinger, V.H.; Riechelmann, H.; Dudas, J. Photodynamic Effect of Methylene Blue and Low Level Laser Radiation in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Cell Lines. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 1107. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Le, M.N.; Wuertz, B.R.; Biel, M.A.; Thompson, R.L.; Ondrey, F.G. Effects of Methylene Blue Photodynamic Therapy on Oral Carcinoma and Leukoplakia Cells. *Laryngoscope Investig. Otolaryngol.* **2022**, *7*, 982–987. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Nowak, E.; Kammerer, S.; Küpper, J.H. ATP-Based Cell Viability Assay Is Superior to Trypan Blue Exclusion and XTT Assay in Measuring Cytotoxicity of Anticancer Drugs Taxol and Imatinib, and Proteasome Inhibitor MG-132 on Human Hepatoma Cell Line HepG2. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* **2018**, *69*, 327–336. [[CrossRef](#)]
40. Blázquez-Castro, A.; Stockert, J.C.; Sanz-Rodríguez, F.; Zamarrón, A.; Juarranz, A. Differential Photodynamic Response of Cultured Cells to Methylene Blue and Toluidine Blue: Role of Dark Redox Processes. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2009**, *8*, 371–376. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Guo, H.; Wang, H.; Deng, H.; Zhang, Y.; Yang, X.; Zhang, W. Facile Preparation of Toluidine Blue-Loaded DNA Nanogels for Anticancer Photodynamic Therapy. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2023**, *11*, 1180448. [[CrossRef](#)]
42. Mills, S. How Effective Is Toluidine Blue for Screening and Diagnosis of Oral Cancer and Premalignant Lesions? *Evid. Based Dent.* **2022**, *23*, 34–35. [[CrossRef](#)]
43. Barbosa, A.F.S.; Santos, I.P.; Santos, G.M.P.; Bastos, T.M.; Rocha, V.P.C.; Meira, C.S.; Soares, M.B.P.; Pitta, I.R.; Pinheiro, A.L.B. Anti-*Trypanosoma cruzi* Effect of the Photodynamic Antiparasitic Chemotherapy Using Phenothiazine Derivatives as Photosensitizers. *Lasers Med. Sci.* **2020**, *35*, 79–85. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Bulhões Portapilla, G.; Pereira, L.M.; Bronzon da Costa, C.M.; Voltarelli Providello, M.; Sampaio Oliveira, P.A.; Goulart, A.; Ferreira Anchieta, N.; Wainwright, M.; Leite Braga, G.Ú.; de Albuquerque, S. Phenothiazinium Dyes Are Active against *Trypanosoma cruzi* In Vitro. *Biomed Res. Int.* **2019**, *2019*, 8301569. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Zancan, N.L.B.; Tebaldi, N.D. Terapia fotodinâmica no controle de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in vitro e no tratamento de sementes de canola naturalmente contaminadas. *Summa Phytopathol.* **2020**, *46*, 327–332. [[CrossRef](#)]
46. Hosseinzadeh, R.; Khorsandi, K.; Jahanshiri, M. Combination Photodynamic Therapy of Human Breast Cancer Using Salicylic Acid and Methylene Blue. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2017**, *184*, 198–203. [[CrossRef](#)]
47. Yousefi Sadeghloo, A.; Khorsandi, K.; Kianmehr, Z. Synergistic Effect of Photodynamic Treatment and Doxorubicin on Triple Negative Breast Cancer Cells. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2020**, *19*, 1580–1589. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.