UNIVERSIDADE DO VALE DO PARAÍBA
INSTITUTO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA

Viviane Paula dos Santos Jesus

Tratamento de Câncer de Mama em Modelo Animal Via Terapia Fotodinâmica Associada a Nanossondas Bifuncionais

São José dos Campos
2022

Viviane Paula dos Santos Jesus

Tratamento de Câncer de Mama em Modelo Animal Via Terapia Fotodinâmica Associada a Nanossondas Bifuncionais

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade do Vale do Paraíba, como complementação dos créditos necessários para obtenção do título de Doutora em Engenharia Biomédica.

Orientador: Prof. Dr. Leandro José Raniero
Co-orientadora: Profa. Dra Maiara Lima Castilho

São José dos Campos
2022

Fundação Valeparaibana de Ensino

BIBLIOTECA

TERMO DE AUTORIZAÇÃO DE DIVULGAÇÃO DA OBRA

Ficha catalográfica

Jesus, Viviane Paula dos Santos
Tratamento de Câncer de Mama em Modelo Animal Via Terapia Fotodinâmica Associada a Nanossondas Bifuncionais / Viviane Paula dos Santos Jesus; orientador, Leandro José Raniero; co-orientadora Maiara Lima Castilho . - São José dos Campos, SP, 2022.
1 CD-ROM, 75 p.

Tese (Doutorado) - Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica.

Inclui referências

1. Engenharia Biomédica. 2. Breast cancer. 3. photosensitizer. 4. photodynamic therapy. I. Raniero, Leandro José, orient. II. Castilho , Maiara Lima , co-orient. III. Universidade do Vale do Paraíba. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica. IV. Título.

Eu, Viviane Paula dos Santos Jesus, autor(a) da obra acima referenciada:

Autorizo a divulgação total ou parcial da obra impressa, digital ou fixada em outro tipo de mídia, bem como, a sua reprodução total ou parcial, devendo o usuário da reprodução atribuir os créditos ao autor da obra, citando a fonte.

Declaro, para todos os fins e efeitos de direito, que o Trabalho foi elaborado respeitando os princípios da moral e da ética e não violou qualquer direito de propriedade intelectual sob pena de responder civil, criminal, ética e profissionalmente por meus atos.

São José dos Campos, 17 de Fevereiro de 2023.

_____

Autor(a) da Obra

Data da defesa: 13 / 12 / 2022

VIVIANE PAULA DOS SANTOS JESUS

"TRATAMENTO DE CÂNCER DE MAMA EM MODELO ANIMAL VIA TERAPIA FOTODINÂMICA ASSOCIADA A NANOSSONDAS BIFUNCIONAIS."

Tese aprovada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor, do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba – Univap, pela seguinte banca examinadora:

Prof.ª Dr.ª Cristina Pacheco Soares	Cristina Pacheco Soares
Prof. Dr. Leandro José Raniero	Leandro José Raniero
Prof.ª Dr.ª Maiara Lima Castilho	Maiara Lima Castilho
Prof.ª Dr.ª Denise Maria Zezell – IPEN/USP	Denise Maria Zezell
Prof.ª Dr.ª Ana Maria do Espírito Santo - Unifesp	Ana Maria do E. Santo Slapnik

Prof.ª Dr.ª Lúcia Vieira

Diretora do IP&D – Univap

São José dos Campos, 13 de dezembro 2022.

DEDICATÓRIA

A Deus que guiou, guia e continuará guiando cada dia de minha vida. A quem peço ajuda nos momentos difíceis, força para continuar minha caminhada e agradeço cada conquista.

Meus pais, **Silvia de Paula** e **Gilson**, que me deram toda a ajuda necessária em todos os momentos em que precisei. Sem vocês eu não teria chegado até aqui. Gratidão eterna por tudo o que vocês fizeram e fazem por mim.

Ao meu marido **David** que sempre esteve ao meu lado me aguentando nos momentos difíceis, sempre me incentivando (mesmo eu sendo estressada e chata). Obrigada por todo amor, carinho e paciência. Amo você.

À minha filha **Mariah** (*in memorian*), que foi minha força, luz, renascimento e direção. Transformou-me em uma mulher guerreira que jamais teria conhecido, que mesmo tendo que seguir sem ela, me fez entender que o amor só se multiplica, me fez manter o sorriso em meio a tristeza em dias difíceis, mostrando-nos qual seria nossa missão. Saudade e amor eterno.

À minha filha **Antonella** que chegou de surpresa, nos trazendo alegria e restaurou nossa fé, você vem para nos encher de cores e amores, nosso bebê arco-íris! Tudo que eu puder fazer para ver a sua felicidade eu colocarei como prioridade em minha vida.

A toda minha família, tias, tios, sogros, cunhada, primas e primos que compartilham comigo minha felicidade, não medindo esforços para estarem ao meu lado quando preciso. Muito obrigada por tudo.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, por abençoar todos os dias da minha vida, iluminar, guiar meus caminhos e me conceder forças para seguir sempre adiante.

Ao meu orientador Prof. Dr. Leandro José Raniero pela confiança, dedicação competência, conselhos e incentivo nos momentos necessários. Agradeço por ter o privilégio de ser sua orientada, pelo apoio, elaboração e revisão final do texto. Aprendi muito, adquiri experiência de vida e profissional. Muito obrigada por tudo, por me aceitar em seu grupo, contribuindo para que eu chegasse até o Doutorado.

A minha família, por todo apoio e incentivo para alcançar este objetivo. Obrigada por toda paciência e compreensão.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal e Nível Superior, pela bolsa de doutorado.

À técnica da Central Analítica, Priscila Leite, pelo carinho e dedicação ao meu trabalho. Sempre disposta a ajudar, me auxiliando no Biotério, no cuidado dos animais, sempre te admirei. Gratidão!

À Profa. Dra. Cristina Pacheco que está sempre pronta a nos ajudar, compartilhando sua experiência cientifica. Admiro-te muito como pessoa e professora, por sua humildade e ética. Meus agradecimentos por sua ajuda sempre que precisei.

À Profa. Dra. Maiara Lima Castilho pela contribuição na elaboração do projeto.

À Profa. Dra. Denise Maria Zezell, pela parceria e cooperação no projeto, fornecendo os camundongos para os xenoenxertos.

À Profa. Dra. Juliana Strixino por ceder o uso dos equipamentos de seu laboratório, possibilitando o tratamento dos animais.

À Profa. Dra. Luciana Barros Sant Anna por ceder seu laboratório e pela assistência na análise histológica.

À aluna Paula Vieira pela imensurável ajuda durante a execução do trabalho experimental, obrigada pelo companheirismo, amizade, apoio, incentivo, conversas e paciência.

À aluna Thaís Veriato pela valorosa amizade durante esses anos, foram muitas conversas, choros, risadas, puxões de orelha, viagens inesquecíveis e nunca me deixou desistir. Obrigada, amiga, por tudo, sei que Deus te colocou no meu caminho com muitos propósitos e um deles é nunca deixar que abalem minha fé.

Às amigas de Laboratório Marcela Cândido, Nathanne Rost e Inglid pelo grande companheirismo e conversas deixando o laboratório mais leve, divertido e agradável, com muitos cafés (A hora da crítica), lembrarei sempre com muito carinho. Grata por todos os momentos que vivemos, meninas determinadas, corajosas e bondosas.

Aos funcionários da secretaria da Pós-Graduação, pela colaboração ao longo do curso.

Por conseguinte, agradeço a todos que de alguma forma colaboraram para realização deste trabalho.

Não fui eu que ordenei a você? Seja forte e corajoso! Não se apavore nem desanime, pois o Senhor, o seu Deus, estará com você por onde você andar".

(Josué 1:9)

RESUMO

A superexpressão do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) está presente em diferentes tipos de câncer, entre eles, bexiga, colo uterino, colorretal, gástrico, em especial, o câncer de mama triplo-negativo (TNBC). Desta forma, a superexpressão do EGFR está correlacionada com um mau prognóstico do paciente, pois está associada à ativação de genes de desenvolvimento, invasão e diferenciação tumoral. Nesse sentido, há a necessidade de novos tratamentos contra o câncer de mama. Visando um tratamento menos invasivo e de efeitos colaterais reduzidos, a presente tese propõe avaliar a ação antitumoral e toxicológica da terapia fotodinâmica (TFD) em associação às nanossondas bifuncionais (NB), em modelo animal. Estas avaliações objetivam responder questões vinculadas à produção de espécies reativas de oxigênio e ao tipo de morte celular. É importante ressaltar que a presença da proteína fator de crescimento epidérmico na NB pode oferecer afinidade tumoral, revelando um potencial mecanismo para acessar outros tipos de câncer. Dessa forma, a captação das NB pelas linhagens celulares utilizadas, MDA-MB-468 (TNBC - adenocarcinoma mamário humano) e MCF 10A (epitelial de mama) foi constante, entretanto, descontinuada nas células epiteliais de mama após 120 minutos de incubação, que tampouco revelaram citotoxicidade. As células de TNBC não mostram saturação no período estudado. A TFD revelou excelentes resultados para o tratamento, em que o aumento da concentração de NB influenciou o tipo de morte celular, sendo possível estabelecer uma correlação com a atividade mitocondrial. A análise histológica permitiu a comparação entre grupos para avaliar a resposta tecidual ao tratamento. Os resultados se complementam ao confirmar a eficiência das NB *in vitro* e *in vivo*. Outro resultado importante obtido pela técnica de citometria de fluxo foi aplicação da NB como nanomarcador de EGFR, permitindo diferenciar as linhagens celulares estudadas. Desta forma, a NB pode ser utilizada como marcador específico diagnóstico e como tratamento na TFD.

Palavras-chave: câncer de mama; fotossensibilizador; terapia fotodinâmica.

TREATMENT OF BREAST CANCER IN ANIMAL MODEL VIA PHOTODYNAMIC THERAPY ASSOCIATED WITH BIFUNCTIONAL NANOPROBES

ABSTRACT

Overexpression of the epidermal growth factor receptor (EGFR) is present in several types of cancer, including bladder, cervix, colorectal, gastric, especially triple-negative breast cancer (TNBC). Thus, EGFR overexpression is correlated with a poor patient prognosis, as it is associated with the activation of genes for tumor development, invasion and differentiation. In this sense, there is a need for new treatments against breast cancer. Aiming at a less invasive treatment and reduced side effects, the present thesis proposes to evaluate the antitumor and toxicological action of photodynamic therapy (PDT) in association with bifunctional nanoprobes (BN) in an animal model. These evaluations aim to answer questions related to the production of reactive oxygen species and the type of cell death. Importantly, the presence of the epidermal growth factor protein in BN may offer tumor affinity, revealing a potential mechanism to access other types of cancer. Thus, the uptake of BN by the cell lines used, MDA-MB-468 (TNBC - human mammary adenocarcinoma) and MCF 10A (breast epithelial) was constant, however, discontinued in breast epithelial cells after 120 minutes of incubation, which nor did they reveal cytotoxicity. TNBC cells do not show saturation in the studied period. PDT revealed excellent results for the treatment, in which the increase in BN concentration influenced the type of cell death, making it possible to establish a correlation with mitochondrial activity. Histological analysis allowed comparison between groups to assess tissue response to treatment. The results complement each other by confirming the efficiency of BN in vitro and in vivo. Another important result obtained by the flow cytometry technique was the application of BN as an EGFR nanomarker, allowing the differentiation of the cell lines studied. In this way, BN can be used as a specific diagnostic marker and as a treatment in PDT.

Keywords: breast Cancer; photosensitizer; photodynamic therapy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estrutura da glândula mamária. 20
Figura 2- Características fundamentais do câncer. 21
Figura 3- Representação esquemática da organização da EFGR e os domínios do ligante EGF. 24
Figura 4- Estrutura do receptor do fator de crescimento epidérmico na membrana celular e no mecanismo de dimerização. A proteína Fator de Crescimento Epidérmico se associa ao receptor por meio do domínio extracelular, ativando o receptor, que muda os domínios extracelular e intracelular, favorecendo a homodimerização com outro receptor EGFR ou heterodimerização com outras proteínas da família de receptores de fatores de crescimento epiteliais. 25
Figura 5- Diagrama de Jablonski modificado. 26
Figura 6- A janela terapêutica da TFD e propagação da Luz em tecido biológico. A) A janela óptica (terapêutica) da TFD. O melhor efeito é na região do vermelho entre 600 nm e 800 nm. B) A interação da luz com o tecido pode ocorrer por reflexão, absorção, transmissão e dispersão, em função do comprimento de onda aplicado. 28
Figura 7- Ilustração das NB com recobrimento de Ce6 e EGF. 33
Figura 8- Espectro UV-visível da Nanossonda Bifuncional. 37
Figura 9 - Quantificação da captação celular de NB. (a) Número de NB por célula; (b) Número de Ce6 por célula. Os dados são apresentados como média ± SD (n = 3). 38
Figura 10 - A incorporação de NB nas células das linhagens: (a) MDA-MB-468 e (b) MCF-10A. As micrografias mostram organizadas em função do tempo (15 – 360 min), destacando a de 120 min. 39
Figura 11 - Eficácia da TFD associada a NB nas linhagens celulares MDA-MB-468 e MCF 10A. (a) Viabilidade celular, (b) Atividade mitocondrial em MDA-MB-468; (c) viabilidade celular, (d) atividade mitocondrial em MCF 10A. Os dados são apresentados como média ± DP (n = 3). 40
Figura 12- Efeito da TFD associada às NB na produção de EROs intracelular. A produção de EROs foi determinada 20 min após a TFD, usando 0,2 µg / mL e 1,2 µg / mL de NB. Os dados são apresentados como média ± DP (n = 3). Controles experimentais: control 1, células tratadas apenas com radiação; control 2, células apenas com AuNPs; control 3, células sem nenhum tratamento. 41
Figura 13 - Efeitos da TFD associada a NB, após 20 h, determinada pelo ensaio de apoptose Tali, citômetro baseado em imagem. Os dados são apresentados como média ± DP (n = 3). 41
Figura 14 - Ilustração do xenoenxerto localizado no flanco e glândula mamária. 48
Figura 15 - Ilustração do tratamento via TFD. 49
Figura 16 - Diagrama de acompanhamento e crescimento tumoral dos camundongos. 49
Figura 17 - Procedimento de microtomia dos tecidos tumorais coletados dos camundongos. 51
Figura 18 - Camundongos fêmeas Balb/c Nude com xenoenxerto no Flanco (A) e na Glândula Mamária abdominal (B). O círculo vermelho destaca o tumor formado. 54
Figura 19 - Peso corporal dos camundongos monitorados por 14 semanas (1 vez por semana) durante o período de acompanhamento do crescimento tumoral. Os animais foram pesados antes do xenoenxerto, no acompanhamento do crescimento e antes da eutanásia. 55

Figura 20 - Curva de crescimento tumoral após inoculação de 100 µL de 5×10^6 células. Análise do tamanho tumoral dos grupos, no total de 14 semanas. 56
Figura 21 - Fotografia da determinação do volume tumoral por meio de paquímetro digital, pela medida do maior e do menor diâmetro tumoral em camundongo Balb/c Nude com massa tumoral. 57
Figura 22 - TFD em combinação com a droga no tratamento de camundongos com xenoenxerto de tumor MDA-MB-468: a) O laser foi conduzido em camundongos xenoenxertados sob condições *in vivo*, irradiação com um laser de 670 mn para TFD foi aplicada por 10 min, 4h depois da injeção da droga. b).Necrose após exposição ao TFD. c) Visão geral do experimento. 58
Figura 23 - Imagens da coleta do tumor após a terapia. (A) O procedimento de microdissecção do tumor ao final do experimento (B) Medida do tecido tumoral. 58
Figura 24 - Amostras de sangue coletadas da veia da cauda de camundongos pelados BALB / c de todos os grupos. a) A fração do tipo de leucócito foi determinada por exame microscópico de esfregaços de sangue periférico corados do Panótico Rápido e expressa como uma porcentagem. O gráfico representa os valores médios da contagem total de leucócitos em cada grupo. Os valores são as médias ± DP ($p < 0,05$ por One-Way ANOVA, Teste de Tukey). Cada experiência foi realizada em triplicado. b) Fotomicrografias de sangue de camundongos. Lâmina de esfrgaço sanguíneo (Leucócitos apontados pelas setas). 59
Figura 25 - Classificação Histopatológica dos tumores do grupo sem tratamento. Coloração HE. Tecido sólido de Adenocarcinoma Mamário. (A) Área de aglomerado de células neoplásicas (elipse). (B) Fragmentos celulares (seta vermelha); Áreas de necrose (seta preta). (C) Reação Desmoplásica (seta preta). (A, B, C aumento de 20x). (D) Células neoplásicas, núcleo volumoso e nucléolo evidente (setas pretas). (E) Mitose (seta preta). (D, E aumento de 40x). 60
Figura 26 - Classificação Histopatológica dos Tumores grupo Grupo Clorina e6 + TFD. Coloração HE. Tecido sólido de Adenocarcinoma Mamário. (A) Área de aglomerado de células neoplásicas (elipse). (B) Células com núcleos em menor volume, sem nucléolo evidente (seta vermelha); Células com ligeira coloração azulada (seta preta). (C) Área de necrose (elipse). (A, B, C aumento de 20x). (D) Aglomerado de células neoplásicas (elipse). (E) Área de necrose (elipse). (D, E aumento de 40x). 61
Figura 27 - Classificação Histopatológica dos Tumores grupo Nanossonda Bifuncional + TFD. Coloração HE. Tecido sólido de Adenocarcinoma Mamário. (A) Área de aglomerado de células neoplásicas (elipse); Reação desmoplásica (seta). (B) fragmentos celulares (elipse). (C) Área de necrose. (A, B, C aumento de 20x). (D) Aglomerado de células neoplásicas (elipse). (E) Área de necrose (elipse). (D, E aumento de 40x). 62
Figura 28 - Análise por PCR quantitativa de transcrição reversa da expressão dos genes Bax, Bcl-2, Caspase 3 e Caspase 8, SOD2, 14-3-3 sigma em xenoenxerto de TNBC. A análise estatística foi realizada por meio do teste Singleplex. Os dados foram normalizados pelo nível de expressão de GAPDH. As barras representam os desvios padrão ($P > 0,05$, ANOVA One-Way, Teste de Tukey). O nível de expressão foi maior nas amostras NB+TFD em comparação com os grupos Ce6+TFD e NB. * - Diferença significante. NS - Não significativo 63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Genes relacionados com vias de regressão tumoral e seus respectivos primers para RT-qPCR..... 53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1^0d	Primeira derivada
A	Absorbância
BRCA	Câncer de mama, do inglês *Breast Cancer*
Ce6	Clorina e6
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
DLS	Espalhamento Dinâmico da Luz
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EGF	Fator de Crescimento Epidérmico, do inglês *Epidermal Growth Factor*
EGFR	Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico, do inglês *Epidermal Growth Factor Receptor*
ELISA	Teste de reações antígeno-anticorpo detectáveis através de reações enzimáticas, do inglês *Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*
ERO's	Espécies reativas de oxigênio
FS	Fotossensibilizador
I_0	Intensidade de luz incidente
INCA	Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio
NB	Nanossonda Bifuncional
RPM	Rotação por minutos
TFD	Terapia fotodinâmica
TNBC	Câncer de mama triplo-negativo, do inglês *triple- negative breast cancer*
λ	Comprimento de onda

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 15
1.1 OBJETIVOS 18
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 20
2.1 CÂNCER DE MAMA 20
2.2 A TERAPIA FOTODINÂMICA E NANOBIOTECNOLOGIA 26
2.3 FOTOSSENSIBILIZADORES 27
2.4 LIBERAÇÃO DOS FÁRMACOS 30
2.5 MECANISMO DE MORTE CELULAR 31
3 CAPÍTULO 1 - CHLORIN E6-EGF CONJUGATED GOLD NANOPARTICLES AS A NANOMEDICINE BASED THERAPEUTIC AGENT FOR TRIPLE NEGATIVE BREAST CANCER 32
3.1 METODOLOGIA 33
3.1.1 Nanossondas Bifuncionais 33
3.1.2 Ensaios in vitro 34
3.1.3 Espectroscopia de fluorescência e Microscopia confocal 34
3.1.4 Ensaios da Terapia Fotodinâmica em cultura celular 35
3.1.5 Quantificação das espécies reativas de oxigênio 35
3.1.6 Determinação do tipo de morte celular 36
3.4 RESULTADOS 36
3.3 DISCUSSÃO 42
3.4 CONCLUSÃO DO CAPÍTULO 44
4 CAPÍTULO 2 - TRIPLE-NEGATIVE BREAST CANCER TREATMENT IN XENOGRAFT MODELS BY BIFUNCTIONAL NANOPROBES COMBINED TO PHOTODYNAMIC THERAPY 46
4.1 METODOLOGIA 47
4.1.1 Animais 47
4.1.2 Xenoenxerto 47
4.1.3 Tratamento com terapia fotodinâmica 48
4.1.4 Eutanásia dos animais 49
4.1.5 Avaliação Clínica dos animais 49
4.1.6 Diferencial Leucocitária 50
4.1.7 Avaliação Histopatológica do tumor 51
4.1.8 Extração e quantificação do RNA 51
4.1.9 Tratamento com Dnase: 52
4.1.10 Transcrição Reversa seguida por qPCR (RT-qPCR) 52
4.2 RESULTADOS 53
4.3 DISCUSSÃO 63
4.4 CONCLUSÃO DO CAPÍTULO 66
5 CONCLUSÃO GERAL 68
REFERÊNCIAS 69

1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença complexa, sendo uma das principais causas de morte nos países economicamente em desenvolvimentoergentes ou desenvolvidos, se tornando um problema de saúde pública. Esta doença é caracterizada pelo crescimento desordenado de células, relacionada a diversos fatores, que incluem ambientais, estilo de vida (hábitos alimentares, tabagismo, sedentarismo entre outros) e derivados de mutações genéticas inerentes a cada indivíduo (INCA, 2018; JEMAL *et al*., 2011).

Em 2018, o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) estimou as taxas de incidência de diversos tipos de tumores, em que o câncer de mama é o segundo tipo mais frequente no mundo e o mais comum entre as mulheres. O INCA estima 66.280 novos casos para cada ano do triênio 2020-2022, um risco de 61,61 casos novos a cada 100 mil mulheres, representando 29,7% dos casos (INCA, 2018).

O carcinoma mamário apresenta diferentes vias moleculares que regulam o seu crescimento, sobrevivência e resposta à terapia, pois é composto por um grupo heterogêneo de neoplasias malignas, podendo ser subdividido em seis subtipos moleculares: Luminal A, Luminal B, Superexpressão de HER2, basalóides, mama normal-like e Claudin-low (CIRQUEIRA *et al*., 2011; EROLES *et al*., 2012; HERSCHKOWITZ *et al*., 2007; MECHE; CIMPEAN; RAICA, 2009). É importante ressaltar que quatro dos seis subtipos apresentam expressão do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR).

A proteína EGFR é expressa em mais de 60% dos tumores do subtipo basalóides, bem como também nos subtipos moleculares HER2 e luminal B. No subtipo luminal B, a expressão do EGFR é mais baixa quando comparado aos outros subtipos moleculares, entretanto, acredita-se que o carcinoma luminal EGFR positivo é mais agressivo, e provavelmente apresenta um maior risco de metástases (TURNER; REIS-FILHO, 2006). A co-expressão de EGFR no subtipo molecular superexpressão de HER2 está relacionada à formação de heterodímeros HER1-HER2 e a fosforilação em células malignas. Embora o receptor HER2 não possua ligantes específicos para sua ativação, está bem estabelecido que a sinalização tirosina quinase pode ser potencializada pela formação de heterodímeros, aumentando sua afinidade ao EGFR e HER3. A heterodimerização está associada a um aumento da

proliferação de células do câncer de mama, levando a um pior prognóstico (CREIGHTON, 2012; MECHE; CIMPEAN; RAICA, 2009; NETWORK, 2012).

Os tratamentos convencionais do câncer envolvem a cirurgia, quimioterapia, radioterapia e, em casos específicos, a hormonioterapia. A combinação de diferentes modalidades de tratamento também é utilizada, mas estes tratamentos são agressivos e em várias ocasiões com prognóstico insatisfatório, podendo ser explicado pela heterogeneidade clínica dos tumores (NIE *et al*., 2007; PARHI; MOHANTY; SAHOO, 2012). Atualmente, o diagnóstico precoce e um tratamento efetivo para o câncer continuam sendo um desafio tecnológico, evidenciando a necessidade de métodos inovadores.

A terapia fotodinâmica (TFD) apresenta potencial de tratamento isolado ou associado a outras terapias para suprir necessidades médicas. Embora emergente, a modalidade terapêutica tem resultados bem-sucedidos e aprovada clinicamente para alguns tratamentos de doenças neoplásicas e de lesões malignas. A TFD foi a primeira técnica a utilizar uma combinação de luz e fotossensibilizador (FS), aprovado pela Associação Americana de Drogas e Alimentos (do inglês, Food and Drug Administration - FDA), há quase duas décadas, mas continua sendo clinicamente subutilizado (AGOSTINIS *et al*., 2011).

O princípio físico da TFD provém da utilização de um FS com banda de absorção ressonante em um comprimento de onda específico, quando irradiado promove a produção de espécies reativas e ocasiona a morte celular. Muitos estudos nomeiam alguns pré-requisitos para FS ideais, como a pureza química, a seletividade de célula alvo, a estabilidade química e física, menor tempo entre a administração e a máxima acumulação celular, mínimos efeitos tóxicos aos tecidos normais, ativação em comprimentos de onda acima de 600 nm, rápida depuração sistêmica, entre outros (ALLISON *et al*., 2004; CASTANO; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2004; ROBERTSON; EVANS; ABRAHAMSE, 2009). Os FS podem ser classificados em função de sua estrutura química e origem, dividindo-se em três gerações baseados em porfirina, clorofila e corantes (HUANG, 2005).

A clorina e6 (Ce6) é uma forma derivada da clorofila α, uma molécula assimétrica contendo três grupos carboxílicos ionizáveis. A neutralização da carga destes grupos em pH levemente ácido aumenta a lipofilicidade da Ce6, visto que o tecido tumoral apresenta um pH menor quando comparados ao tecido normal. Esta característica favorece a absorção da molécula Ce6 por células neoplásicas malignas,

aumentando a seletividade do FS. Além disso, a Ce6 oferece um maior rendimento quântico na formação do oxigênio singleto, possuindo uma intensa banda de absorção em comprimento de onda na região de 650-660nm, que favorece a penetração desta radiação nos tecidos biológicos.

Entretanto, a utilização deste FS tem sido limitada para aplicações clínicas por ser praticamente insolúvel em água, dificultando sua administração sistêmica e reduzindo os efeitos da TFD (XIAO et al., 2012). Nesse âmbito, o FS pode ser funcionalizado em nanopartículas e aumentar a solubilidade, consequentemente aumentar a eficácia da TFD para células cancerígenas e minimizar os efeitos colaterais para os tecidos normais (JEONG et al., 2011; MEYERS *et al*., 2015).

A nanotecnologia associada ao diagnóstico e tratamento de câncer está emergindo como um novo campo de pesquisa interdisciplinar, focada na concepção e aplicação de nanomateriais. Estudos têm desenvolvido nanopartículas funcionais com diversas geometrias, as quais estão funcionalizados a moléculas biológicas, tais como peptídeos, proteínas, ácidos nucléicos, ou pequenas moléculas ligantes com o intuito de ser um agente facilitador no processo de absorção de drogas hidrofóbicas em células (CHATTERJEE; FONG; CHENG, 2011; DOANE; BURDA, 2013; GHOSH *et al*., 2008; MEYERS *et al*., 2015; STUCHINSKAYA *et al*., 2011).

O direcionamento ativo de nanopartículas vem se tornando um conceito fundamental na investigação terapêutica contra o câncer, o qual se baseia na utilização de ligantes periféricos que se ligam especificamente a biomoléculas expressas na superfície das células malignas. O objetivo do direcionamento ativo é entregar as nanopartículas nesses tecidos tumorais oferecendo uma melhor farmacocinética, limitando sua concentração no tecido normal (ACHARYA; DILNAWAZ; SAHOO, 2009; GROBMYER *et al*., 2011; MOHANTY *et al*., 2011).

Nesse contexto, o EGFR está presente na maioria dos casos relacionados ao mau prognóstico com um alto índice proliferativo e diferenciação celular, o mesmo se torna um marcador de grande importância para a classificação molecular do tumor, podendo ser utilizado em terapia alvo para o câncer de mama. Priorizando novos tratamentos contra o câncer, menos invasivo e com menores efeitos colaterais, o que é objeto de estudo desta tese.

Assim, a bifuncionalização de nanopartículas de ouro foi feita para atingir melhores resultados, a EGF foi utilizada com o intuito de aumentar a especificidade e o acoplamento da Ce6, resolvendo o problema de solubilidade. Estes experimentos

foram realizados com apoio do projeto FAPESP de 2013/17404-7, sendo tema de doutorado (CASTILHO, 2016) no grupo de pesquisa do Laboratório de Nanossensores (LNS). Questões importantes foram respondidas: como a cinética de captação e internalização celular na linhagem MDA-MB-468, a citotoxicidade da Ce6 livre em comparação a NB para a linhagem MDA-MB-468, etc.

Este trabalho também recebeu financiamento via projeto FAPESP 2017/07519-2, permitindo a continuidade dessa pesquisa, quando a cinética de captação e internalização celular na linhagem MDA-MB-468 foi comparada as de células normais (MCF-10A), informações importantes como a quantificação da produção intracelular de espécies reativas de oxigênio e a determinação da morte celular também foram mensuradas. Estes resultados *in vitro* foram publicados em forma de artigo científico na revista Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. Os bons resultados obtidos permitiram a aplicação *in vivo* utilizando o modelo de xenoenxerto, que permite a utilização da EGF humana na composição da NB. Os resultados também foram publicados na revista Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. Deste modo, a tese será dividida em dois capítulos, correspondendo aos artigos publicados.

1.1 OBJETIVOS

Esta tese teve por objetivo avaliar a ação antitumoral e toxicológica de Nanossondas Bifuncionais (NB) na TFD em modelo animal, visando o desenvolvimento de um método inovador para o tratamento contra o câncer de mama. Os objetivos específicos são:

a) Síntese das nanossondas bifuncionais e sua caracterização por espectroscopia UV-Visível, Espectroscopia e microscopia de fluorescência.
b) Avaliar *in vitro* as nanossondas bifuncionais em células tumorais de adenocarcinoma mamário (MDA-MB-468), avaliando a quantificação da produção das espécies reativas de oxigênio e determinação do tipo de morte celular.

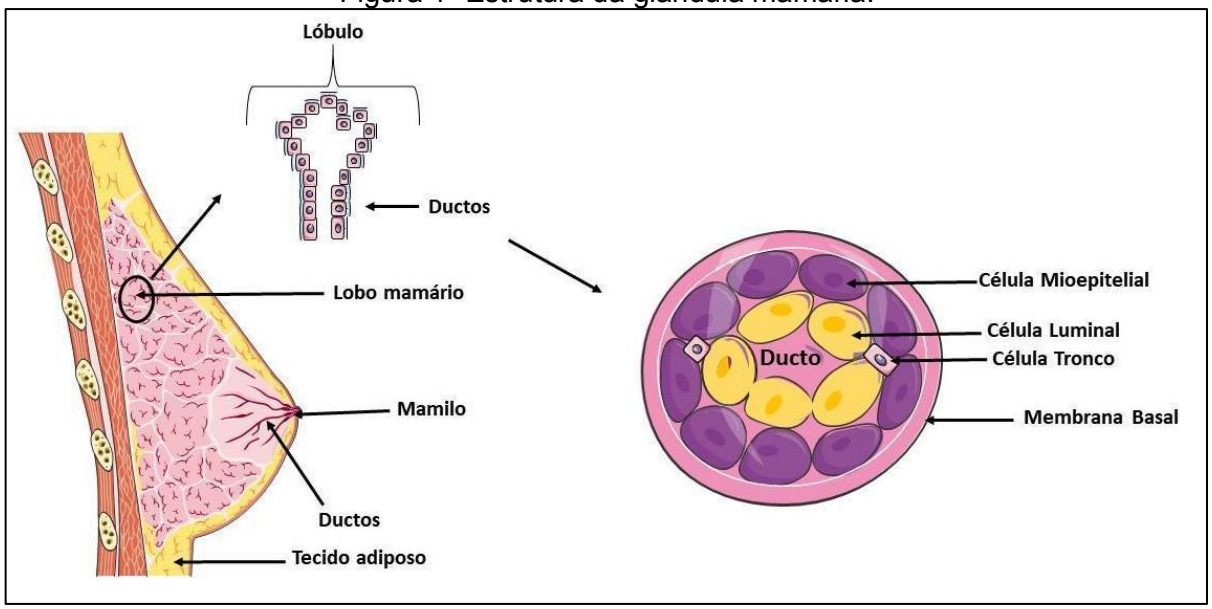
c) Avaliar *in vitro* as nanossondas bifuncionais em células normais (MCF10A), avaliando sua internalização; quantificação da produção das espécies reativas de oxigênio e determinação do tipo de morte celular.
d) Avaliar *in vivo* a regressão tumoral em virtude de danos teciduais como a necrose e/ou apoptose, que serão avaliados pelas análises histopatológicas e análises quantitativa pela PCR em tempo real, a fim de determinar as alterações promovidas nos marcadores que regulam a regressão do tumor.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CÂNCER DE MAMA

A glândula mamária é composta por uma rede de ductos e lóbulos. O epitélio da mama é composto por duas camadas: a interna por epitélio luminal e a externa por células mioepiteliais, que está agregada à membrana basal. Assim, o tecido mamário normal é composto por células estromais, luminais, mioepiteliais e membrana basal. A Figura 1 apresenta uma breve descrição da anatomia da região, na qual compreende melhor estas particularidades do câncer de mama descritas acima.

Figura 1- Estrutura da glândula mamária.



Fonte: adaptado de Cristea, Polyak (2018).

O tumor mais diagnosticado entre as mulheres é o proveniente do epitélio dos lóbulos e ductos da glândula mamária (RUSSO; LYNCH; RUSSO, 2001; BIRNBAUM, 2004). A perda da membrana basal, proliferação acelerada, angiogênese e invasão do estroma, ocorrem no desenvolvimento da carcinogênese por células estromais e epiteliais anormais ou por ambas (DIMRI; BAND; BAND; 2005; CRISTEA; POLYAK, 2018). A matriz extracelular é composta por proteínas (proteoglicanas e glicoproteínas), que auxiliam na estrutura e nas propriedades mecânicas das células e tecidos, sendo também essencial na regulação da expressão gênica, movimento, etc. Esta matriz sofre mudanças epitélio-mesenquimatoso, que contribuem para que

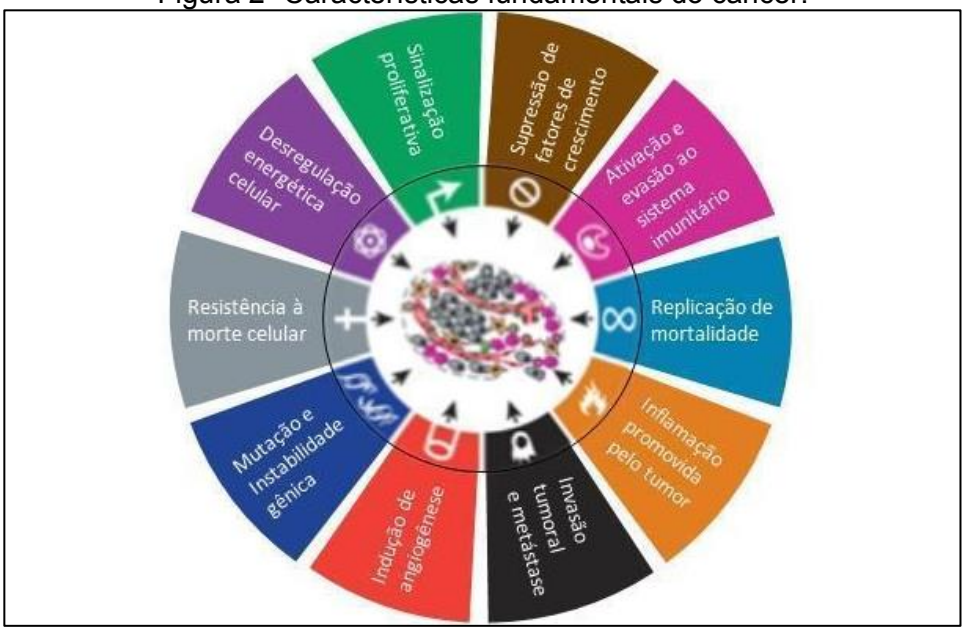
a célula tumoral crie um microambiente adequado para proliferação, angiogênese e invasão celular (GROSSMAN et al., 2016).

As modificações que ocorrem em células tumorais são divididas em: carcinoma *in situ*, ficando retida no tecido mamário; carcinoma invasivo, espalhando nos tecidos; e carcinoma metastático, migrando para órgãos adjacentes. Para os metastáticos, os tumores malignos podem romper a membrana basal e penetrar nos tecidos adjacentes. Devido à metástase, o tratamento é complexo e 90% dos pacientes vão a óbito (BROWN *et al*, 1999; HENDRY *et al*., 2017; LIOTTA; LEE; MORAKIS; 1980; FOUAD; AANEI; 2017).

Os exames preventivos são essenciais no diagnóstico precoce da doença, pois o câncer de mama não possui sintomas ou sinais anatomopatológicos, podendo ser detectado em diferentes estágios histopatológicos, impossibilitando muitas vezes o diagnóstico em fases iniciais.

O desenvolvimento tumoral depende de uma série de etapas que possibilitam o crescimento contínuo/descontrolado das células, detalhado por Hanahan e Weinberg, 2011, como exemplificado no diagrama da Figura 2.

Figura 2- Características fundamentais do câncer.



Fonte: Adaptado de Hanahan e Weinberg (2011).

Estes pesquisadores descrevem os fatores que permitem a formação do tecido tumoral por meio da instabilidade genômica e inflamação crônica, tal como manutenção dos sinais de proliferação, resistência à morte celular, ativação de

imortalidade replicativa, angiogênese e a capacidade de invadir tecidos próximos e desenvolver metástase. Estas características permitem a proliferação descontrolada e a sobrevivência das células cancerosas (BACAC; STAMENKOVIC, 2008; HANAHAN, WEINBERG; 2011).

Entretanto, a neoplasia mamária é uma doença heterogênea, geralmente classificada de acordo com a microscopia, o aspecto molecular e o comportamento clínico. Podendo ser subdividida em seis subtipos moleculares: Luminal A, Luminal B, Superexpressão de HER2, basalóides (ou triplo negativo), mama normal-like e Claudin-low (MECHE; CIMPEAN; RAICA, 2009; EROLES *et al*., 2012; DUMAY *et al*., 2013).

A identificação desses subtipos imunofenotípicos ajuda a determinar o prognóstico do paciente e a abordagem terapêutica. Portanto, o diagnóstico é baseado nos receptores de estrogênio (ER), progesterona (PR) e fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2) (CIRQUEIRA *et al*., 2011; GONÇALVES JUNIOR *et al*., 2018).

Os subtipos “triplo negativo” são tumores que não expressam os receptores de estrógenos, progesterona e o receptor de fator de crescimento da epiderme HER2, representando de 15% a 20% dos diagnósticos de câncer de mama e o seu desenvolvimento é mais agressivo, de menor sobrevida, pior prognóstico e poucas opções terapêuticas em virtude do alto índice proliferativo (GONÇALVES JUNIOR *et al*., 2018; SCHMID *et al*., 2018). Portanto, o triplo negativo é o subtipo mais resistente para terapia endócrina ou terapias direcionadas para o HER2 (UENO *et al*., 2011).

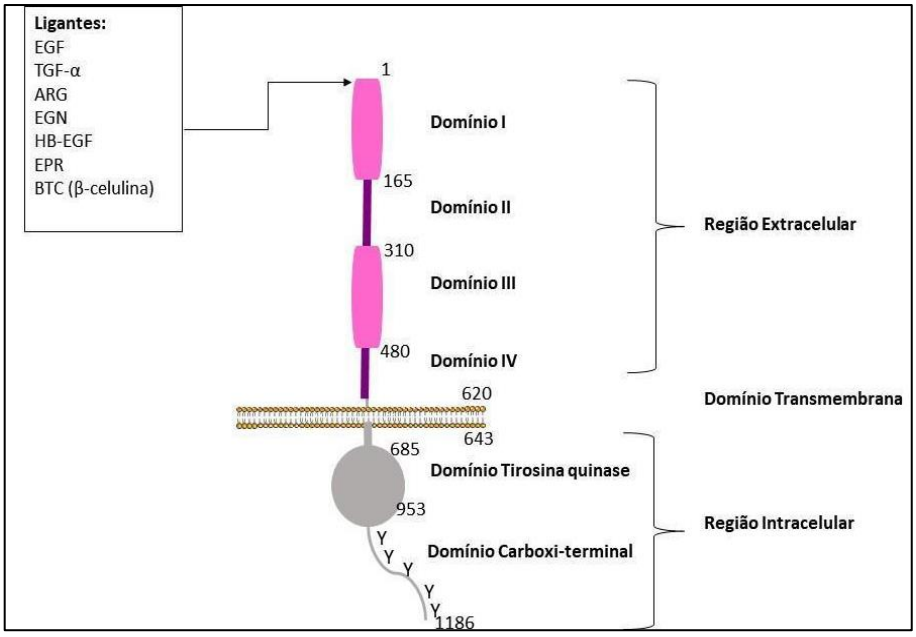
Neste contexto, os receptores celulares têm tanta importância no tratamento como no diagnóstico do câncer. Os diferentes fatores de crescimento atuam no desenvolvimento da glândula mamária, tal como o fator de crescimento epidérmico (EGF) e seus receptores, que são expressos em células estromais e/ou epiteliais da mama e modificadas durante o avanço de cada estágio (CASALINI *et al*., 2004). A proteína do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), que possui um gene localizado no cromossomo 7p12, é uma tirosina quinase altamente expressa em diversos tumores de origem epitelial. Esse receptor pertence a uma família conhecida como receptores epidérmicos humanos (HERs): EGFR (HER1 ou ErbB1), *neu*/HER2 ou ErbB2, HER3 ou ErbB3 e HER4 ou ErbB4, estão envolvidos em processos cancerígenos, sendo fundamental no processo de crescimento do tumor, como

proliferação, motilidade, adesão, invasão, sobrevivência celular e angiogênese (WOODBURN, 1999; HAYES, 2019).

De fato, os receptores têm importante papel na fisiologia celular e tecidual e se localizam na membrana plasmática. Estímulos vindos do ambiente externo, como os ligantes específicos, ativam esses receptores produzindo sinais intracelulares transduzidos por diversas cascatas moleculares, no qual a fosforilação de sequências de substrato específicas aciona a transcrição de genes relacionados com a proliferação, diferenciação, invasão, angiogênese, metástase e resistência à apoptose celular (EARP *et al*., 1995; HYNES, 2005; ANIDO *et al*., 2003). Estes receptores possuem um domínio extracelular composto por ligantes que especificamente têm afinidade química ao EGFR, são eles: EGF, fator de crescimento transformante alfa (TGF-α), anfiregulina, EGF de ligação à heparina (HB-EGF), betacelulina (β-celulina) e outras, sendo estes responsáveis por sua ativação; um domínio transmembrânico; um domínio C-terminal intracelular que promove autofosforilação (EARP *et al*., 1995).

A interação do ligante do EGFR e o domínio extracelular deste receptor faz com que permaneça em uma forma estendida, capaz de gerar dímeros. O EGFR, quando está inativo, apresenta-se na membrana plasmática como um monômero (LOPES; VATTINO, 2015). A região extracelular possui quatro domínios: Domínio I (aminoácidos 1-165), domínio II (aminoácidos 165-310), domínio III (aminoácidos 310-480) e domínio IV (aminoácidos 480-620). Os domínios I e III são ricos na ligação de peptídeo e os domínios II e IV são ricos em cisteínas, sendo o domínio II responsável pela dimerização, que geralmente promove autofosforilação estimulando a sinalização da via jusante, seguida da proliferação e invasão de células tumorais. Os resíduos de cisteínas se unem e produzem três pontes dissulfeto para manutenção da atividade biológica. A tirosina quinase é seguida de um fragmento carboxi-terminal (aminoácidos 953-1186), onde se encontram resíduos de autofosforilação (HYNES; LANE, 2005; YEWALE *et al*., 2013; LEMMON; SCHLESSINGER; FERGUSON; 2014). A estrutura representativa da EGFR pode ser observada na figura 3.

Figura 3- Representação esquemática da organização da EFGR e os domínios do ligante EGF.



Fonte: Flynn, Wong, Wu (2009).

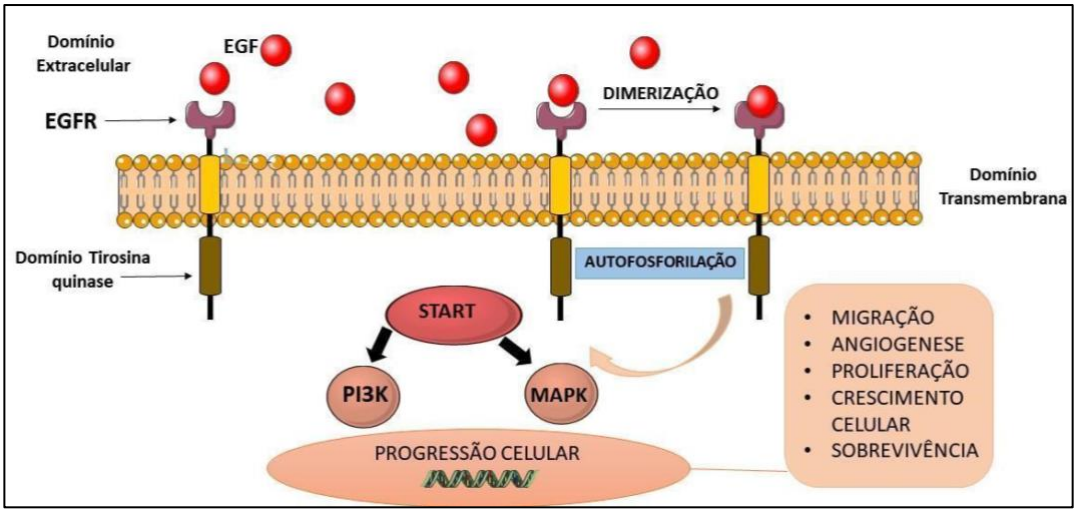
O processo de dimerização ocorre quando uma molécula EGF ou outro ligante compatível se liga a um monômero do receptor, levando a alteração em sua forma, induzindo o aumento da atividade quinase e autofosforilação dos resíduos de tirosina (Figura 4). A EGFR quando está inativa apresenta uma meia-vida de 30 min, sendo reciclada e restituída a membrana plasmática. No entanto, a EGFR em linhagem celular tumoral possui uma meia-vida de 20 h, indicando que o ciclo do receptor irá ocorrer por várias vezes na via endocítica neste período (NAKAMARU-OGISO *et al.*, 2012; YEWALE *et al*., 2013).

Uma das funções fisiológicas da EGFR está relacionada com a progressão do câncer, que induz a promoção da angiogênese e manutenção da sobrevivência das células cancerígenas, indicando que os fatores de crescimento auxiliam na progressão tumoral por via de diferentes mecanismos (NORMANNO *et al*., 2006). Diversos fatores são encarregados da ativação irregular do EGFR em tumores, envolvem crescimento, superexpressão, participação de receptores mutantes, ativação constitutiva e liberação autócrina de fatores de crescimento.

De acordo com o ligante, os receptores de EGFR podem gerar homodímeros e heterodímeros. O reconhecimento dos ligantes por receptores individuais aumenta a variedade, devido a heterodimerização, permitindo o recrutamento de moléculas sinalizadoras e adaptadoras que ativam diversas vias de sinalização. As vias de

sinalização principais ativadas pelos receptores são proteínas quinases ativadas por mitogênio (MAPKs) e fosfatidilinositosol 3’ quinase (PI3K/Akt), responsáveis por proliferação celular, sobrevivência (Figura 4) (MENDELSOHN; BASELGA, 2006; ROENGVORAPHOJ *et al*., 2013).

Figura 4- Estrutura do receptor do fator de crescimento epidérmico na membrana celular e no mecanismo de dimerização. A proteína Fator de Crescimento Epidérmico se associa ao receptor por meio do domínio extracelular, ativando o receptor, que muda os domínios extracelular e intracelular, favorecendo a homodimerização com outro receptor EGFR ou heterodimerização com outras proteínas da família de receptores de fatores de crescimento epiteliais.



Fonte: Nagano, Tachihara e Nishimura, 2018; Minnelli *et al*. (2020).

No subtipo luminal B, a expressão do EGFR é mais baixa quando comparado aos outros subtipos moleculares, mas acredita-se que o carcinoma luminal EGFR positivo é mais agressivo e provavelmente apresenta um maior risco de metástases (MECHE; CIMPEAN; RAICA, 2009; TURNER; REIS-FILHO, 2006). A co-expressão de EGFR no subtipo molecular de superexpressão de HER2 está relacionada à formação de heterodímeros HER1-HER2 e a fosforilação em células malignas. Embora o receptor HER2 não possua ligantes específicos para sua ativação, a sinalização tirosina quinase pode ser potencializada pela formação de heterodímeros, aumentando sua afinidade ao EGFR e HER3. Entretanto, esta heterodimerização está associada ao aumento da proliferação de células do câncer de mama, levando a um pior prognóstico (CREIGHTON, 2012; MECHE; CIMPEAN; RAICA, 2009; NETWORK, 2012).

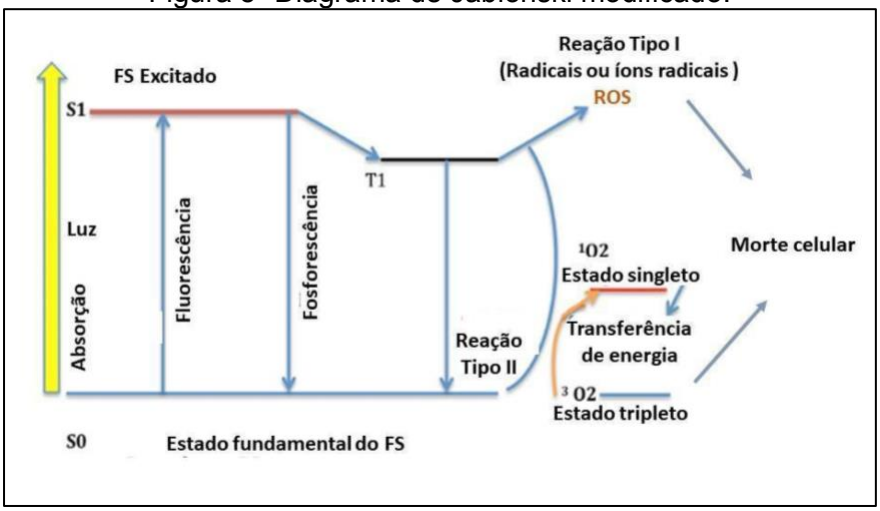
Os tratamentos convencionais do câncer envolvem a cirurgia, quimioterapia, radioterapia e, em casos específicos, a hormonioterapia. A combinação de diferentes

modalidades de tratamento também é utilizada, mas os efeitos colaterais são conhecidos (KIEVIT; ZHANG, 2011; PARHI; MOHANTY; SAHOO, 2012). Atualmente, o diagnóstico precoce e o tratamento efetivo do câncer continuam a ser um desafio tecnológico, evidenciando a necessidade de métodos inovadores que viabilizem a terapia seletiva, consequentemente, minimizando os danos aos tecidos normais, que se traduz em aumento de especificidade e sensibilidade do tratamento. No contexto apresentado, o EGFR está relacionado ao mau prognóstico, mas poderá se tornar um marcador importante na entrega de drogas no tratamento do câncer (WOODBURN, 1999; OHNO *et al*., 2013; SUN *et al*., 2017). Assim nesta tese, a EGF será parte integrante de um nanofármaco com objetivo de aumentar as chances de tratamento.

2.2 A TERAPIA FOTODINÂMICA E NANOBIOTECNOLOGIA

A terapia fotodinâmica (TFD) emprega o uso de fármacos (fotossensibilizadores) que são ativados com a luz. Assim, o princípio físico da TFD baseia-se na combinação da irradiação de um tecido, com um comprimento de onda específico, na presença de fotossensibilizador (FS) e oxigênio molecular tecidual. Este processo ocorre em três etapas, podendo ser representado diagrama de nível energético de Jablonski da Figura 5 (JAFFÉ; MILLER, 1966; BUSKARD; WILSON; 1994; BANERJEE *et al*., 2017).

Figura 5- Diagrama de Jablonski modificado.



Fonte: Adaptado de Jaffé; Miller (1966).

Neste diagrama, quando a molécula do FS interage com os fótons incidentes, os elétrons do seu estado fundamental (S0) têm a probabilidade de ser transferidos

para um estado excitado singleto, havendo também a probabilidades de ocorrer processos de fluorescência, do estado S1 para o S0, bem como a probabilidade de cruzamento intersistemas, levando ao estado excitado tripleto.

Assim, a energia no estado T1 tem a probabilidade de ser dissipada no processo de fluorescência, quando o elétron volta para o estado S0, mas também é permitida a transferência de energia intersistemas, ou seja, moléculas de oxigênio que se tornam espécies reativas de oxigênio (reação tipo I) ou para o estado singleto altamente reativo (tipo II reação). (ETHIRAJAN *et al*., 2011).

Na do tipo I, a transferência de elétrons entre o FS e as moléculas biológicas geram radicais livres ou íons-radicais, tendendo a reagir com o oxigênio no estado fundamental, resultando em intermediários reativos como peróxido de hidrogênio, radical superóxido e radical hidroxila (ALLISON *et al*., 2004; ROBERTSON; EVANS; ABRAHAMSE, 2009). Na do tipo II, o FS transfere a energia para o oxigênio, dando origem ao oxigênio singleto ($^1O_2$). Este oxigênio é extremamente reativo, sendo um dos agentes citotóxicos de importância na TFD, devido à fotoinativação das células tumorais, desencadeando danos oxidativos e gerando respostas celulares como a necrose, apoptose e autofagia. As espécies reativas de oxigênio (EROs) possuem meia-vida curta e alta reatividade, prejudicando exatamente os substratos biológicos (CALIXTO *et al*., 2016; BANERJEE *et al*., 2017).

2.3 FOTOSSENSIBILIZADORES

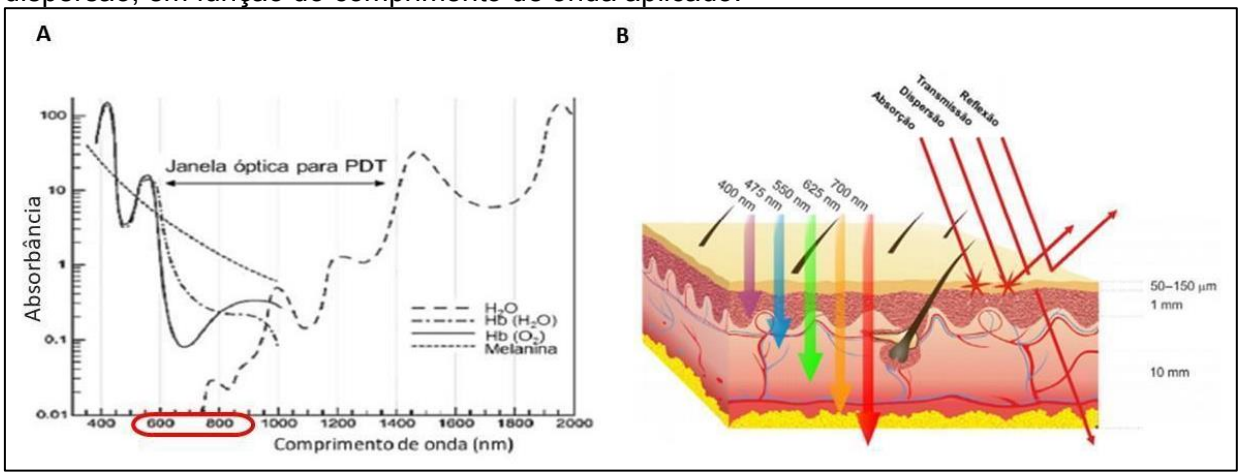
Nos anos de 1960, foi relatado diagnóstico de tumor por sua fluorescência, devido ao uso de fotossensibilizadores hematoporfirina. Por volta de 1970, foi relatado a destruição de tumores em modelos animais, posteriormente estudos com pacientes foram realizados. Em 1993, no Canadá aprovaram o uso do derivado de hematoporfirina, em seguida esse método foi aprovado para tratamento de diferentes tipos de tumores no Japão, Europa e Estados Unidos. Desde então, inúmeros foram os desenvolvimentos na TFD, surgindo novos fotossensibilizadores (FS) e aperfeiçoamento no equipamento quanto dose e luz (FISHER; MURPHREE; GOMER; 1995).

O FS ideal possui características específicas, destacando a banda de absorção na região entre 600 nm e 800 nm, a elevada pureza química, a afinidade tumoral para aumento da seletividade, a estabilidade química e física, a eficiência na absorção

celular, menor/nenhuma citotoxicidade em tecidos normais, rápida depuração sistêmica, capacidade de produzir altos níveis de EROs, entre outros (ROBERTSON; EVANS; ABRAHAMSE, 2009; ABRAHAMSE, HAMBLIN; 2016; KWIATKOWSKI *et al*., 2018).

Na TFD, os comprimentos de onda menores que 650 nm possuem menor penetração, levando à alta fotossensibilidade da pele. Porém, os comprimentos de onda maiores que 850 nm têm menor probabilidade de produção de oxigênio singleto excitado. Em resumo, a absorção otimizada no tecido acontece no intervalo entre 650 e 850 nm, denominada região da janela terapêutica na TFD com menor absorção dos cromóforos presentes no tecido: água (H_2O), oxihemoglobina (HbO_2), deoxihemoglobina (HbH_2O) e melanina, exemplificada na figura 6 (YOON; LI; SHIM; 2013; ABRAHAMSE; HAMBLIN; 2016). Outro grande desafio na TFD é a entrega da luz na região de tratamento, dependendo da coerência, densidade de energia, dose, tempo, polarização, energia dos fótons, entre outros (PLAETZER *et al*., 2009; WANG et al., 2015).

Figura 6- A janela terapêutica da TFD e propagação da Luz em tecido biológico. A) A janela óptica (terapêutica) da TFD. O melhor efeito é na região do vermelho entre 600 nm e 800 nm. B) A interação da luz com o tecido pode ocorrer por reflexão, absorção, transmissão e dispersão, em função do comprimento de onda aplicado.



Fonte: Adaptado de Plaetzer et al. (2009); Dąbrowski (2017).

A localização do FS vem sendo estudada com o objetivo de melhorar a liberação de medicamentos no tecido alvo, aumentando a seletividade. De forma resumida, os FS podem ser classificados de acordo com sua estrutura química e origem, dividindo-se em três gerações baseadas em porfirina (ex.: Photofrin, ALA, PpIX), clorofila (ex.: clorinas, purpurinas, bacterioclorinas) e corantes (ex.:

ftalocianinas) (YOON; LI; SHIM; 2013). As clorinas são porfirinas reduzidas, exibem um sistema macrocíclico no qual ocorre uma mudança na simetria da molécula em virtude da redução, provocando um deslocamento na última banda Q do espectro UV-Visível, permitindo grande absorção na região do vermelho (650-690 nm) (CALVETE; GOMES; MOURA, 2009; PERUSSI, 2007; LI *et al*., 2017). A seletividade do FS para com tecido tumoral é dependente da ligação e farmacocinética. Em alguns casos, é necessário uso de veículo de entrega do fármaco, como nanopartículas e lipossomas, por possuírem baixa solubilidade em água (WILSON, 2002).

Dentre os FS, a Ce6 é uma forma derivada da clorofila α, uma molécula assimétrica contendo três grupos carboxílicos ionizáveis. As associações do anel central aos grupos carboxílicos ionizáveis permitem a geração de espécies iônicas em função do pH. A imobilização da carga destes grupos, em pH levemente ácido, aumenta a lipofilicidade da Ce6, sendo um diferencial em virtude do pH característico do tecido tumoral entre 6,5 e 7,2. Enquanto, que o tecido normal apresenta um pH de 7,2. Esta alteração permite a absorção da molécula Ce6 por células tumorais, melhorando a seletividade do FS (ČUNDERLÍKOVÁ; GANGESKAR; MOAN; 1999; LI *et al*., 2017). A Ce6 também oferece um maior rendimento quântico de formação do oxigênio singleto e uma intensa banda de absorção em comprimento de onda maiores (650-660 nm), quando comparados às porfirinas (610-630 nm). Como apresentado, esta região energética possui maior penetração nos tecidos biológicos, sendo propriedades relevantes para o bom desempenho deste FS na TFD (PERUSSI, 2007).

Entretanto, a utilização deste FS tem sido limitada para aplicações clínicas por ser praticamente insolúvel em água, dificultando sua administração sistêmica e reduzindo os efeitos da TFD (XIAO *et al*., 2012; LIU *et al*., 2017). Neste âmbito, a fim de melhorar a eficiência dos fotossensibilizadores para o tratamento de câncer, nanopartículas funcionalizadas podem ser uma estratégia para a entrega direcionada, aumentando a eficácia da TFD para as células cancerígenas e minimizando os efeitos colaterais, dose da droga e luz. (JEONG *et al*., 2011; MEYERS *et al*., 2015).

Assim, a nanobiotecnologia vem mostrando o seu valor, tornando-se um potencial para melhorar a eficácia do diagnóstico e tratamento de tumores malignos, sendo classificada como um novo campo de pesquisa interdisciplinar entre a biologia e nanotecnologia, focada na concepção e aplicação de nanomateriais. Diversas nanopartículas funcionais com diferentes geometrias estão sendo pesquisadas, as quais vêm sendo funcionalizadas com moléculas biológicas, como peptídeos,

proteínas, ácidos nucleicos, ou pequenas moléculas ligantes, almejando facilitar o processo de absorção de drogas hidrofóbicas em células (LIU *et al*., 2017).

2.4 LIBERAÇÃO DOS FÁRMACOS

O direcionamento ativo de nanopartículas se tornou um conceito na investigação terapêutica contra o câncer, o qual se baseia na utilização de ligantes periféricos específicos para biomoléculas expressas na superfície das células malignas. O objetivo do direcionamento ativo é entregar as nanopartículas nesses tecidos tumorais oferecendo uma melhor farmacocinética, limitando sua concentração no tecido normal (ACHARYA; DILNAWAZ; SAHOO, 2009; GROBMYER *et al*., 2011; MOHANTY *et al*., 2011).

Nos últimos anos, as nanopartículas vêm emergindo nas aplicações biomédicas. A nanotecnologia atribui a aplicação de nanoestruturas com dimensões na escala nano, sendo de consenso entre 10-100 nm. Em razão do seu tamanho e alta relação área superficial/volume, as NPs possuem propriedades únicas e desejáveis, relacionando com atributos elétricos, ópticos e magnéticos. Ademais, as NPs possuem meia-vida mais longa no sistema circulatório do organismo tratamento, tendo boa permeabilidade e excelentes efeitos de retenção, entrando facilmente no corpo celular, em virtude do tamanho das partículas. Diferentes NPs foram estudadas para uso biomédico, como pontos quânticos, magnéticos, polímeros e polímeros metálicos (DANIEL; ASTRUC; 2004; DYKMAN; KHLEBTSOV;2012; EALIA; SARAVANAKUMAR, 2017)

As nanopartículas de ouro (AuNPs) foram destacadas para uso biomédico, exibindo excelente potencial na marcação de células, entrega de drogas, terapia fototérmica e imagiologia molecular. São quimicamente inerte, não tóxico e de fácil funcionalização superficial. Assim, as AuNPs são associadas a diferentes materiais para desenvolver um nanocarreador, sendo biocompatível para aplicação dos fármacos. A atuação óptica das AuNPs são dependentes da ressonância plasmônica de superfície (SPR), estando em uma região que vai do visível ao infravermelho do espectro, definida pela oscilação coletiva dos elétrons condutores (PACIOTTI; KINGSTON; TAMARKIN; 2006; AMINA; GUO; 2020).

2.5 MECANISMO DE MORTE CELULAR

O mecanismo de morte celular ocorre em dois processos, morte por necrose ocorre lise celular, danificando a membrana, o núcleo não sofre alteração, ocorrendo o extravasamento de componentes celulares, gerando reação inflamatória prejudicando a região necrótica (HANG *et al*., 2012). A morte por necrose gerada por TFD ocorre pela produção de EROs presentes no citoplasma da célula; O segundo processo é a apoptose, seu mecanismo é controlado, não danifica a membrana plasmática e o núcleo sofre alterações, neste processo, estudos afirmam que ocorre o mecanismo de autodestruição (PENNICA *et al*., 1984; SIMON; HAJ-YEHIA; LEVI-SCHAFFER; 2012).

A TFD é uma técnica que estimula a necrose e apoptose de tecidos tumorais, apresentando eficiência em células resistentes a drogas provocando respostas imunológicas específicas combatendo o câncer (ZONG; THOMPSON; 2006; VYAS *et al*., 2007). Estudos avaliam agentes FS em diferentes tipos de câncer, resistentes aos tratamentos convencionais, mostrando que a TFD provoca apoptose por processos diferentes: Mediado por mitocôndria, ou por receptor, os processos intrínsecos, ou mitocondriais ocorrem pela aglomeração de FS na mitocôndria (SCHMIDT-ERFURTH *et al*., 1997; WU *et al*., 2015).

Priorizando novos tratamentos contra o câncer de mama, menos invasivos e com menores efeitos colaterais, o presente projeto propõe avaliar a ação antitumoral e toxicológica de NB na TFD em modelo animal (adenocarcinoma mamário). Assim, nanopartículas com o direcionamento ativo por meio da proteína Fator de Crescimento Epidérmico (EGF) e transportadoras de Ce6, serão utilizadas como um método alternativo de tratamento contra o câncer de mama via terapia fotodinâmica.

3 CAPÍTULO 1 - CHLORIN E6-EGF CONJUGATED GOLD NANOPARTICLES AS A NANOMEDICINE BASED THERAPEUTIC AGENT FOR TRIPLE NEGATIVE BREAST CANCER

Photodiagnosis and Photodynamic Therapy 33 (2021) 102186

Contents lists available at ScienceDirect

Photodiagnosis and Photodynamic Therapy

journal homepage: www.elsevier.com/locate/pdpdt

Chlorin e6-EGF conjugated gold nanoparticles as a nanomedicine based therapeutic agent for triple negative breast cancer

Maiara L. Castilho [a,b], Viviane. P.S. Jesus [a], Paula F.A. Vieira [a], Kevin C. Hewitt [c], L. Raniero [a,*]

[a] Laboratório de Nanossensores, Instituto de Pesquisa & Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, UNIVAP, Av. Shishima Hifumi, 2911, Urbanova, São José dos Campos, São Paulo 12244-000, Brazil
[b] Laboratório de Bionanotecnologia, Instituto de Pesquisa & Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, UNIVAP, Av. Shishima Hifumi, 2911, Urbanova, São José dos Campos, São Paulo 12244-000, Brazil
[c] Department of Physics and Atmospheric Science, Dalhousie University, 6310 Coburg Road, Halifax, Nova Scotia B3H 4R2, Canada

ARTICLE INFO

Keywords:
Bifunctional nanoprobes
Epidermal growth factor
Chlorin e6
Triple-negative breast cancer
Theranostic, Photodynamic Therapy

ABSTRACT

To develop a treatment modality for triple-negative breast cancer, we investigated the efficacy of a bifunctional theranostic nanoprobes (BN) during Photodynamic Therapy (PDT) on human breast carcinoma and normal human cells. The BN is a 21 nm gold nanoparticles functionalized with Chlorin e6 (Ce6) and Epidermal Growth Factor (EGF). Attachment to gold nanoparticle stabilizes Ce6 while EGF acts as a cancer cell targeting agent. Fluorescence Spectroscopy and Confocal Fluorescence Microscopy revealed a gradual uptake of nanoprobes into cancer cells at an average rate of 63 BN/min. Cell viability assays showed that 0.2 μg/mL BN concentration was highly cytotoxic to cancer cells (86 %), but not normal cells. At this concentration, 58 % cancer cells were necrotic and 38 % apoptotic, while the reactive oxygen species (ROS) was 9-fold higher in cancer cells compared to normal. Overall, results suggest that BN mediated PDT can achieve targeted cancer cell death with high efficiency.

1. Introduction

Breast cancer (BC) is the most common type of cancer diagnosed in women, with an average incidence of 23.5 % in high/very-high Human Development Index (HDI) regions versus 26.9 % in low/medium HDI regions. Mortality rates tend to be lower in more developed regions. Statistical data shows an increasing worldwide incidence, with approximately 2 million new cases (11.6 %) diagnosed in 2018 [1]. BC presents a good prognosis if diagnosed and adequately treated in its early stage. However, most BC are diagnosed at advanced stages, resulting in high mortality rates. Further, intra-tumoral heterogeneity is high, resulting in varied phenotypes and morphological profiles with differing therapeutic response.

Among the BC molecular subtypes, triple-negative breast cancer (TNBC) requires attention. Characterized by a suppression of the main receptors expression, such as estrogen, progesterone and human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) [2–4], TNBC are associated with worse prognosis, early relapse after standard chemotherapy, a high frequency of metastasis to lung, liver and brain and a low overall survival compared to other breast cancer subtypes [5]. It also has a higher incidence among African American women [6]. In Brazil, there is a 21 % incidence of TNBC and more women are diagnosed with triple-negative BC in the north and central-west than other regions [7]. TNBC also does not respond to current targeted therapy, exhibits more aggressive clinical behavior and high cellular proliferation. TNBC also does not respond to currently available targeted therapies, highlighting the need for more research in alternative treatments [2,8,9]

Modern cancer treatments may combine chemotherapy, radiotherapy and surgery to achieve better outcomes, but there are many deleterious side effects of chemo-drugs or ionizing irradiation. Among the most promising alternatives, Photodynamic Therapy (PDT) is particularly attractive. PDT employs a photosensitizer (PS) that, upon irradiation at a specific wavelength, generates single oxygen species and other free radicals, leading to cell death via necrosis or apoptosis [10, 11].

Among prospective PS, Chlorin e6 (Ce6) is attractive because of its large extinction coefficient in the red/NIR and high singlet oxygen quantum yield. The activation by NIR light results in a higher volumetric PDT response [11–13]. However, Ce6 is limited its use in PDT because of its chemical instability under physiological conditions, which results in

* Corresponding author.
E-mail address: lraniero@univap.br (L. Raniero).

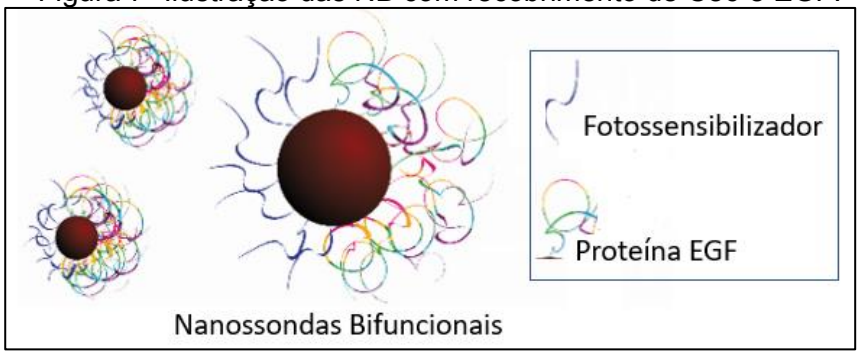
https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2021.102186
Received 25 June 2020; Received in revised form 7 December 2020; Accepted 8 January 2021
Available online 23 January 2021
1572-1000/© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

3.1 METODOLOGIA

3.1.1 Nanossondas Bifuncionais

No processo de síntese das NB foi utilizado protocolos estabelecidos no LNS, publicados em: a) LUCAS, Leanne J. et al. Journal of Raman Spectroscopy, v. 46, n. 5, p. 434-446, 2015; b) CASTILHO et al. Sensors and Actuators B: Chemical, v. 240, p. 903-908, 2017 e c) VIEIRA et al. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy 18, 6–11, 2017. A síntese da NB foi realizada utilizando nanopartículas de ouro com o diâmetro médio de aproximadamente 21 nm, funcionalizadas aos complexos EGF-α-ácido-lipóico e Ce6-cisteamina. A química carbodiimida foi utilizada para ligar os grupos carboxílicos a aminas primárias. De forma resumida, os reagentes foram misturados na razão molar 1 COOH: 10 EDC: 25 Sulfo-NHS: 1 NH_2 como grupo amina disponível, sendo encontrada na EGF ou na cisteamina, enquanto que, os grupos carboxílicos são encontrados na Ce6 ou no ácido lipóico. Ambos os complexos, Ce6-cisteamina e EGF-ácido lipóico, foram misturados na proporção de 1: 1 com as AuNPs, mantendo sob agitação constante por 48 h, para formar as NB (EGF-AuNPs-Ce6) (Figura 7). A purificação da NB foi obtida por centrifugação da solução coloidal a 13.000 rpm por 5 min, seguida pela substituição do sobrenadante por água ultrapura. Este processo foi repetido duas vezes e o produto final foi armazenado a 4 ºC no escuro. Este protocolo produz NB estável com um diâmetro hidrodinâmico de 34 nm e potencial Zeta de -38,9 mV.

Figura 7- Ilustração das NB com recobrimento de Ce6 e EGF.



Fonte: Autora.

3.1.2 Ensaios in vitro

As linhagens celulares desta tese foram adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro. O procedimento de cultivo seguiu as recomendações do fornecedor.

A linhagem celular de adenocarcinoma mamário humano MDA-MB-468 foi cultivada em monocamadas e mantidas em meio de cultura L-15 (Leibovitz, Sigma Life Science, L4386-10x1L), complementado com 10% (v/v) de Soro Fetal Bovino (Life Technologies, 16000-044). A condição de cultivo foi em estufa de crescimento a 37ºC em 95% de umidade, sem adição de CO_2 (Thermo Scientific, water Jacket serie 8000). O meio foi substituído a cada dois dias e as células subcultivadas a cada 15 dias, após tripsinização com solução de Tripsina-EDTA 0,25%.

A linhagem celular de mama humano MCF-10A foi cultivada em monocamadas e mantidas em meio de cultura DMEM/F-12 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Ham's Nutrient Mixture F-12, Gibco - Life Technologies, 12500-062-10x1L), complementado com 5% (v/v) de soro de cavalo (Gibco - Life Technologies, 16050122), 20 ng/mL de EGF (Sigma Aldrich, E9644), 0,5 mg/mL de hidrocotisona, 100 ng/mL de toxina de cólera (Sigma Aldrich, C8052-.5MG) e 10 µg/mL de insulina (Sigma Aldrich, I9278-5ML). A condição de cultivo foi em estufa de crescimento a 37ºC com 5% de CO_2. O meio foi substituído a cada três dias e as células subcultivadas a cada 25 dias, após tripsinização com solução de Tripsina-EDTA 0,25%.

3.1.3 Espectroscopia de fluorescência e Microscopia confocal

As células MDA-MB- 468 foram tripsinizadas e plaqueadas a uma densidade de $1x10^5$ células/mL em placa preta de 96 poços. Após 24 horas para a adesão celular, o meio de cultura completo foi substituído pelo fotossensibilizador Ce6 na concentração de 2 mg/mL, e incubadas em diferentes tempos experimentais (15, 30, 60, 120, 240, 360, 720, 1440, 2880 min). Na mesma placa, foram adicionadas as 12 diluições seriadas para determinação da fluorescência do FS. A leitura de absorção foi realizada em triplicata com emissão 690 nm e excitação de 664 nm pelo espectrofotômetro Synergy HT Multi-Detection Microplate Reader (BioTek Instruments, USA), procedimento realizado no laboratório da Unifesp. A fluorescência dos grupos foi plotada. Imagens confocais foram coletadas por meio de procedimentos semelhantes, exceto nas etapas finais. Para imagens de fluorescência, as células

foram fixadas em solução de paraformaldeído a 4% em 30 min e lavadas com PBS. O vidro foi removido (localizado no fundo do poço) e Prolong® Antifade (DAPI, Life Technologies, P36971) adicionado para destacar a presença de DNA. As amostras foram fotografadas usando uma objetiva Zeiss Plan-apocromático 63x/1.4 Oil M27 com um microscópio confocal de varredura a laser Zeiss LSM 700 (Carl Zeiss AG, Alemanha). As imagens foram obtidas em linha de laser de 405 nm (5 mW) para DAPI (emissão de 435 nm), linha de laser de 639 nm (5 mW) para Ce6 (emissão de 669 nm) e processadas no software Zeiss (ZEN Black edition). Os canais individuais foram obtidos usando um modo de varredura sequencial para evitar a degradação dos fluoróforos do sinal de excitação, as amostras foram varridas em um formato de resolução de 512x512 pixels e tempo de permanência de pixel de 12,6µs.

3.1.4 Ensaios da Terapia Fotodinâmica em cultura celular

Para o ensaio de TFD, a suspensão de $1x10^5$ células/mL (MDA-MB-468 e MCF-10A) foi aplicada em placas de 96 poços, contendo meio de cultura completo. Após 24 h de condicionamento das células, ou seja, adesão celular, o meio foi substituído pelas NB. As células foram mantidas em contato com a substância por 2 h, nas condições de cultivo. Decorrido o tempo de incorporação, o meio contendo a substância foi removido, os poços foram lavados com PBS e adicionou-se um novo meio de cultura completo para a irradiação utilizando o LED Irrad-Led5 660 (Biopdi) no comprimento de onda de 660 nm, 25 mW, na dose de 25 J/cm^2, sendo a placa posicionada a 1,5 cm de distância da fonte de irradiação.

3.1.5 Quantificação das espécies reativas de oxigênio

A acumulação de ERO foi quantificada utilizando a coloração com diacretato de 2',7' diclorodi-hidrofluoresceína (H_2DCF-DA, Molecular Probes). As células das linhagens MDA-MB-468 e MCF-10A ($1x10^5$ células/poço) foram semeadas em uma placa de 96 poços e mantidas até a adesão celular, em condições de cultivo supracitadas. Após 24 h, as NB (0,2 µg/mL ou 1,2 µg/mL) foram incubadas por 2 h em ambiente escuro em condições de cultivo. Uma hora após a incubação das NB, 20 µM de H_2DCF-DA foram adicionados aos poços. Então, após o tempo de internalização, as células foram lavadas com PBS e mantidas em 150 µL de PBS para o ensaio TFD.

A intensidade de fluorescência da suspensão foi medida diretamente, em unidades arbitrárias, usando um Leitor de Microplacas de Detecção Múltipla Synergy HT Multi-Detection Microplate Reader (BioTek Instruments, USA), equipamento disponibilizado pelo laboratório de bioquímica aplicada a engenharia biomédica do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento (UNIVAP) com excitação a 485 nm e emissão a 530 nm.

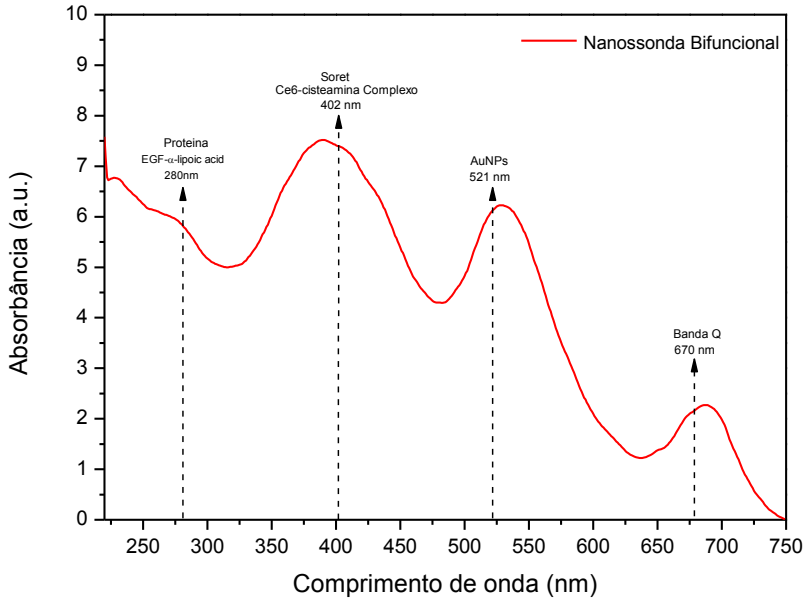
3.1.6 Determinação do tipo de morte celular

A determinação do tipo de morte celular foi realizada utilizando o kit Tali® Apoptosis (Life TechnologiesTM, A10788), que permite a identificação de células apoptóticas, necróticas e viáveis em uma população. O procedimento experimental seguiu as recomendações do fabricante, as células foram incubadas com as NB por 2 h, decorrido esse tempo, as células foram suspensas em tampão 1X (kit fabricante), de modo que exista, pelo menos, 100 µL por ensaio de células individuais a uma concentração de aproximadamente $5x10^6$ células/mL. Para cada 100 µL de amostra, adicionou-se 5 µL de anexina V Fluor® Alexa 488, e incubou a 23ºC no escuro por 20 min. Após o período de incubação, as células foram centrifugadas e ressuspensas em 100 µL da solução tampão (kit fabricante), adicionando 1 µL iodeto de propídio, deixando a 23 ºC no escuro por 5 min. Então, 25 µL das células coradas foram depositadas no dispositivo Tali® Cellular Analysis Slide (Life TechnologiesTM) e a leitura foi feita no equipamento Citómetro Tali® Image-Based Cytometer (Life TechnologiesTM).

3.4 RESULTADOS

A síntese e caracterização das NB foram produzidas a partir da funcionalização das AuNPs com os complexos produzidos. A banda na região de 280 nm é característica de proteína, sendo da EGF. As bandas ressonantes atribuídas a Ce6 são centradas em 402 nm, na banda Soret e em 670 nm, representada pela banda Q. A banda de ressonância plasmônica das AuNPs pode ser verificada na região de 521 nm. A análise de espectroscopia afirma a produção da NB, comprovando o processo de funcionalização, conforme a figura 8.

Figura 8- Espectro UV-visível da Nanossonda Bifuncional.



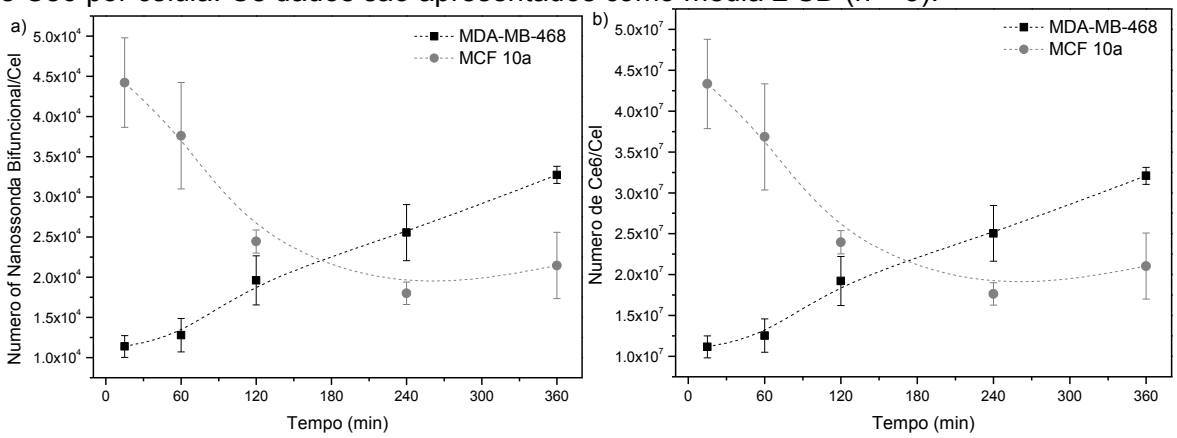
Fonte: Autora.

Para facilitar a apresentação dos resultados e a discussão será o utilizado o termo TN (triplo negativo) para as células de adenocarcinoma mamário humano, MDA-MB-468, e NB para a célula normal da linhagem celular de mama humano, MCF-10A.

A Figura 9 apresenta os resultados dos ensaios de espectroscopia de fluorescência, quantificando a fluorescência média da molécula de Ce6, levando em consideração o número de célula por poço, a concentração das NB incubadas e a quantidade de complexos adicionados às superfícies das AuNPs. Estes dados permitiram estimar o número de nanossondas por células (Figura 9a) e o número de Ce6 por célula (Figura 9b) em função do tempo de incubação para as duas linhagens celulares.

Primeiramente, um comportamento inesperado foi observado quando comparamos as células TN com as normais. As células normais captaram rapidamente todas as NB nos primeiros 15 min (neste tempo, a citotoxicidade no escuro para células normais foi medida, registrando 90% para a atividade mitocondrial e 81% de viabilidade celular medido pelo método de exclusão azul de tripan), superando as células TN que apresentaram um comportamento de captação crescente e lento. Em 120 min, as células TN captaram 2.9×10^4 NB, correspondendo a 1.9×10^7 moléculas de Ce6, comparando com 2.4×10^4 NB ou 2.3×10^7 moléculas de Ce6 para células normais.

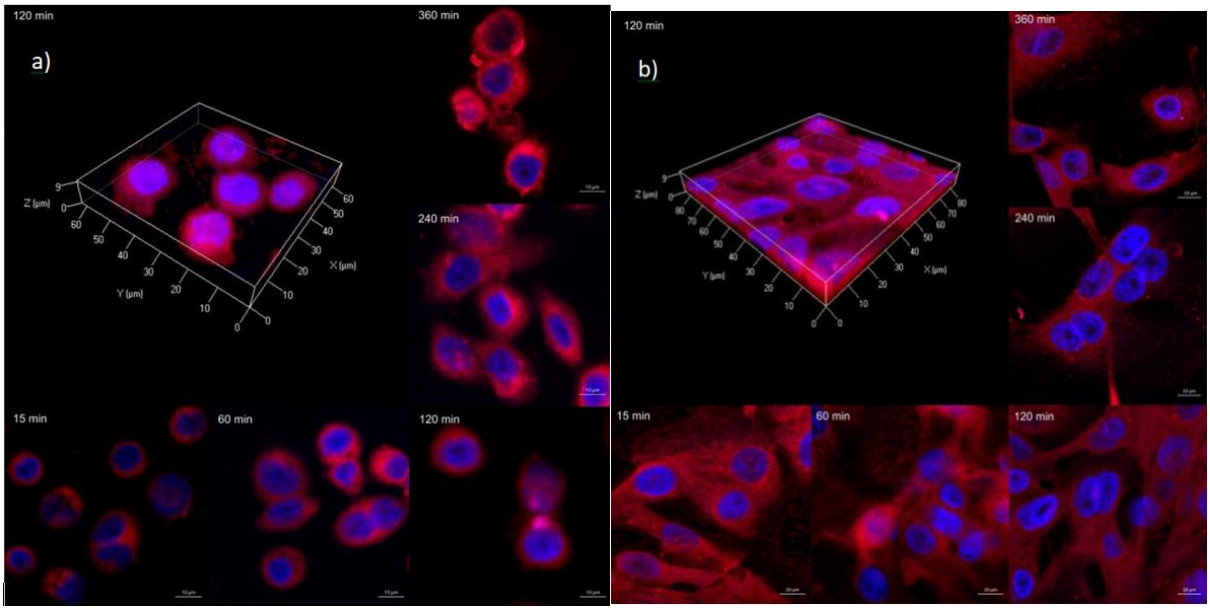
Figura 9 - Quantificação da captação celular de NB. (a) Número de NB por célula; (b) Número de Ce6 por célula. Os dados são apresentados como média ± SD (n = 3).



Fonte: Dados da MDA-MB-468 são referentes a CASTILHO, 2016. Dados da MCF 10A da autora.

As imagens de fluorescências feitas pela microscopia confocal mostram uma intensidade similar de NB para ambos os tipos celulares a 120 min, veja a Figura 10. Nessas imagens, a coloração azul se refere à marcação do DNA (ácido desoxirribonucleico) localizado no núcleo, o qual foi corado com o marcador DAPI e, a coloração vermelha é da fluorescência da Ce6. A imagem tridimensional da captação celular confirma a presença da NB na região intracelular, incluindo o núcleo. Estes resultados corroboram com a Figura 9, pois a célula TN tem um aumento de intensidade da cor vermelha com o tempo, enquanto que para a normal a intensidade diminui.

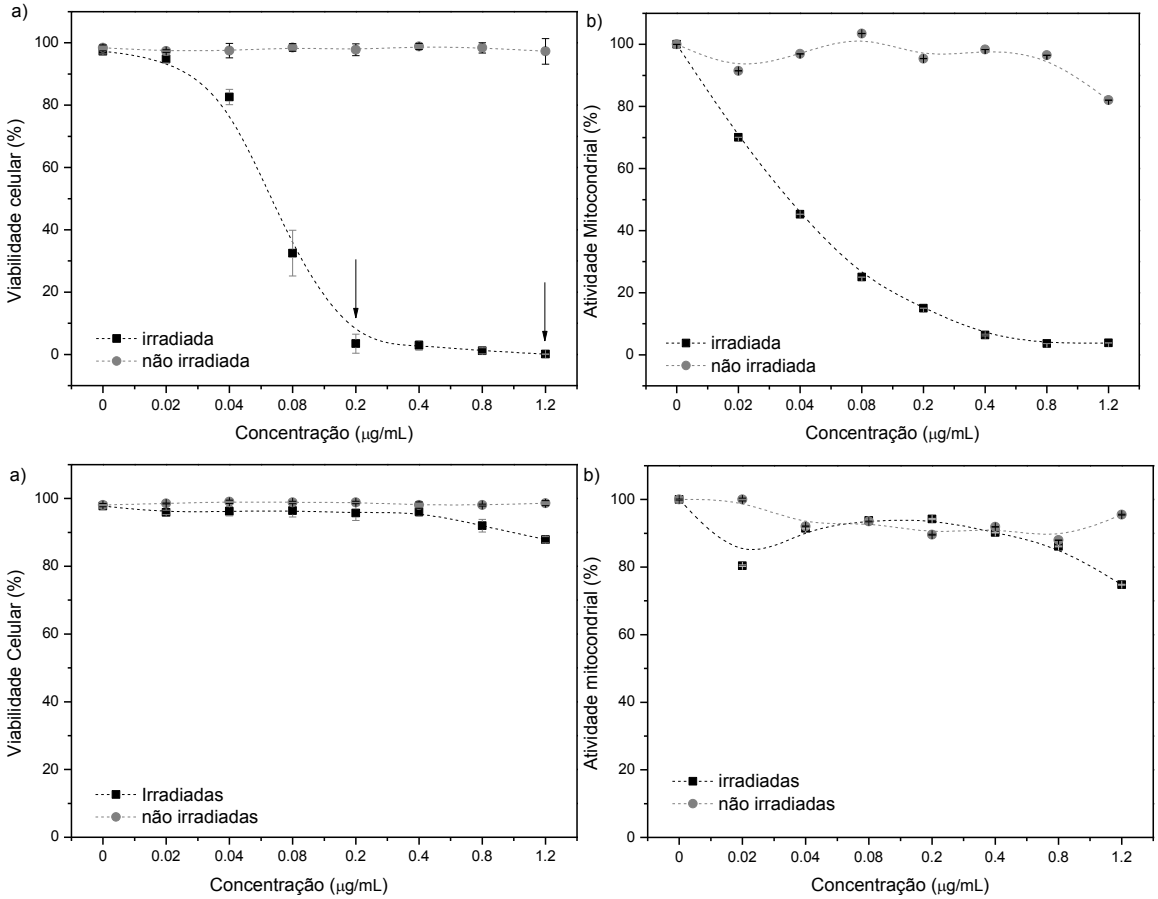
Figura 10 - A incorporação de NB nas células das linhagens: (a) MDA-MB-468 e (b) MCF-10A. As micrografias mostram organizadas em função do tempo (15 – 360 min), destacando a de 120 min.



Fonte: Dados da MDA-MB-468 são referentes a Castilho, 2016. Dados da MCF 10A da autora.

Os efeitos citotóxicos nas células TN (Figuras 11a e 11b) e nas células normais (Figuras 11c e 11d) foram obtidas pelo método de exclusão azul de tripan e pela atividade mitocondrial (MTT) para o tempo de incubação de 120 min. As NBs não foram citotóxicas para ambos os grupos celulares na ausência de irradiação. Para o grupo TFD, apesar do número de NB captadas pelas células normais ser similar ao das células TN (Figura 9), as células normais não apresentaram sinais de citotoxicidade em baixas concentrações. Apenas uma leve diminuição na viabilidade celular (86%) e na atividade mitocondrial (74%) foi observada para a maior concentração de NB. De fato, as NB apresentaram alta seletividade, porque 96% das células TN não eram viáveis a 2 µg/mL e aproximadamente 100% a 1,2 µg/mL. Outro ponto importante a ser destacado é que atividade mitocondrial em 0,04 µg/mL está abaixo de 50%, demonstrando citotoxicidade mesmo para baixas concentrações de NB.

Figura 11 - Eficácia da TFD associada a NB nas linhagens celulares MDA-MB-468 e MCF 10A. (a) Viabilidade celular, (b) Atividade mitocondrial em MDA-MB-468; (c) viabilidade celular, (d) atividade mitocondrial em MCF 10A. Os dados são apresentados como média ± DP (n = 3).

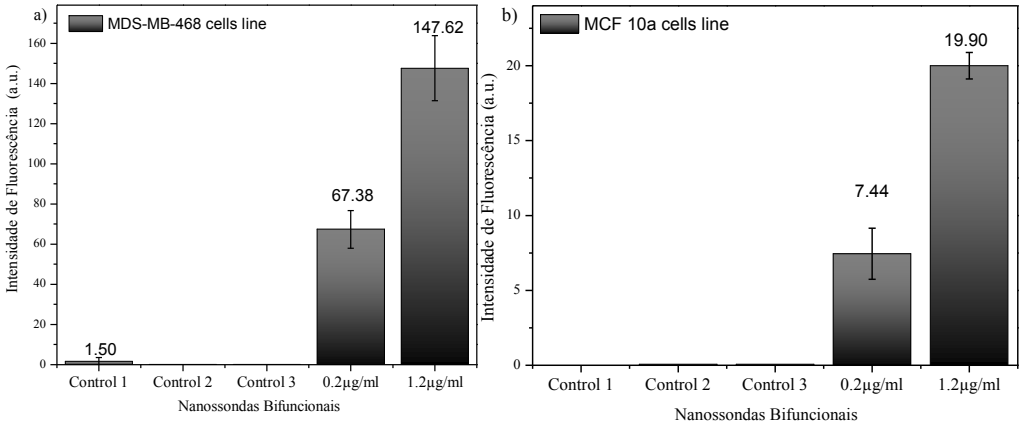


Fonte: Dados da MDA-MB-468 são referentes a Castilho, 2016. Dados da MCF 10A da autora

Para o ensaio de quantificação de formação de EROs, as linhagens MDA-MB-468 e MCF-10A foram tratadas com NB nas concentrações de 0,2 µg/ml e 1,2 µg/ml especificadas nos gráficos. Na linhagem MDA-MB-468 ocorreu um aumento significativo dos níveis de formação de EROs, de acordo com as concentrações, em comparação com o controle. Enquanto que na MCF-10A, mostra baixa produção nos níveis de EROs de acordo com as concentrações em comparação com o controle.

A formação elevada de EROs por nanossondas levou a uma alta eficácia na destruição celular aumentando duas vezes, indicando que foi eficaz a ativação do fármaco produzindo EROs. O acúmulo nas células de câncer de mama tratadas causou a formação elevada na produção de EROs. Assim, as nanossondas melhoraram ainda mais a formação de EROs nas células e levaram a uma alta eficácia de destruição (Figura 12).

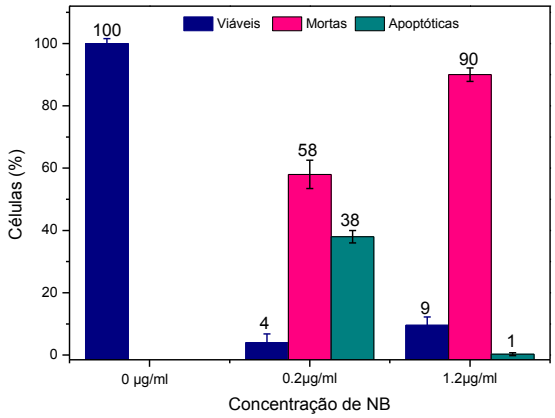
Figura 12- Efeito da TFD associada às NB na produção de EROs intracelular. A produção de EROs foi determinada 20 min após a TFD, usando 0,2 µg / mL e 1,2 µg / mL de NB. Os dados são apresentados como média ± DP (n = 3). Controles experimentais: control 1, células tratadas apenas com radiação; control 2, células apenas com AuNPs; control 3, células sem nenhum tratamento.



Fonte: Autora.

Para um melhor entendimento dos efeitos da TFD associados à NB, o tipo de morte celular foi determinado para as células TN, 20 h após terapia. As células marcadas com anexina V foram consideradas apoptóticas, enquanto as células necróticas foram marcadas com PI, que permeia facilmente nas células mortas e se liga aos ácidos nucleicos. Além disso, as células vivas não podem ser coradas pela anexina V ou PI. Para 0,2 µg / mL de NB, as células TN apresentaram necrose estatisticamente significante, com 58% de necrose e 38% de apoptose. O aumento de concentração de NB para 1,2 µg / mL alterou dramaticamente o tipo de morte celular, 90% necrótico e 9% apoptótico (Figura 13).

Figura 13 - Efeitos da TFD associada a NB, após 20 h, determinada pelo ensaio de apoptose Tali, citômetro baseado em imagem. Os dados são apresentados como média ± DP (n = 3).



Fonte: Autora.

3.3 DISCUSSÃO

A NB foi projetada para melhorar a ação da Ce6 por meio da funcionalização com a AuNPs. A coligação de EGF foi usada para aumentar a seletividade e a estabilidade coloidal, conforme determinado por nós anteriormente. De acordo com vários estudos, a superexpressão do EGFR em tipos de câncer de bexiga, mama, colo uterino, colorretal, gástrico etc., está correlacionada com um mau prognóstico do paciente (NICHOLSON *et al*., 2001). De fato, a superexpressão do EGFR está correlacionada com a ativação de genes associados ao desenvolvimento, invasão e diferenciação tumoral (OKAWA *et al*., 2007). Nesse contexto, a presença de EGF na NB oferece uma oportunidade de afinidade tumoral, revelando um mecanismo potencial para acessar vários tipos de câncer, incluindo o de pior prognóstico - TN. Assim, em um esforço para entender o mecanismo de captação celular de NB entre células mamárias normais e cancerosas, a espectroscopia de fluorescência revelou um comportamento inesperado associado à captação de NB. As células TN possuem um número maior de EGFR do que as células normais. Esperava-se que as células TN exibissem uma captação celular mais rápida de NB. Ao contrário do esperado, as células normais são capazes de captar todas as NB disponíveis nos primeiros 15 min, logo após, ocorre um processo de expulsão a uma taxa de 189 NB/min até 120 min, momento em que a expulsão parece ter sido interrompida. Por outro lado, as células TN captam as NB a uma taxa de 63 NB/min. Aos 120 min, ambas as linhagens celulares tinham a mesma ordem de magnitude da NB internalizada. Consideramos esse o melhor momento para estudos de citotoxicidade, porque ambos os tipos celulares mantêm os mesmos níveis de NB. Esses resultados também demonstram a importância de estudos com células *in vitro* para entender a cinética celular. As taxas de captação de NB foram calculadas por meio da primeira derivada do ajuste linear dos pontos experimentais apresentados na Figura 8.

Segundo Fröhlich *et al.* (2012), a captação celular é influenciada pelo tamanho da estrutura, forma, material, carga superficial, hidrofobicidade e também pela morfologia das células. Nesse caso, a morfologia das células normais exibe uma forma alongada com os lamelipódios espalhados na superfície do substrato, aumentando a área superficial das células normais em relação às células tumorais (KWON *et al*. 2007). Essas previsões são confirmadas pelas micrografias de imagem

confocal que mostram células TN esféricas e menores que as células normais, que são mais alongadas.

É importante destacar que a endocitose mediada por clatrina é o principal mecanismo de captação das nanopartículas pelas células, seja por captação adsortiva específica do receptor ou inespecífica (BEHZADI *et al*., 2017). Assim, a captação mais rápida de NB pelas células normais pode ser explicada pela maior área superficial da membrana plasmática. Além disso, Ivošev *et al*. (2019), mostrou que os fibroblastos expulsavam nanopartículas mais rapidamente do que as linhagens celulares de câncer, indicando que as nanopartículas permanecem de forma mais eficiente nas células tumorais do que nas saudáveis, corroborando com nossos resultados.

A captação celular ao longo do tempo é extremamente importante para a eficiência da TFD, por isso analisamos a farmacocinética das NB como parâmetro crítico para as aplicações biomédicas. A Figura 9 apresenta as imagens de microscopia de fluorescência em função do tempo de incubação. As células tumorais exibem um aumento gradual da intensidade do vermelho (15-360 min) relacionado à fluorescência Ce6. O comportamento oposto é observado para células normais em função do tempo de incubação, sugerindo exocitose das NB, corroborando com os dados da espectroscopia de fluorescência. Além disso, as imagens em 3D revelam a presença de NB ao redor e dentro dos núcleos celulares aumentando a eficiência da TFD confirmada nas medições de viabilidade celular.

Entre os resultados apresentados nas Figuras de 10 a 11, é difícil discuti-los separadamente, pois todos os dados estão conectados com a captação celular, após eventos em cascata que afetam a atividade mitocondrial durante a terapia. Muitas espécies reativas são formadas durante a TFD, o pH da célula muda à medida que os íons são criados no microambiente celular pelas EROs. Embora as células cancerígenas tenham capacidade de proliferar indefinidamente, devido a uma mutação genética, os danos causados foram irreparáveis e a morte celular é representada nos testes de viabilidade.

A concentração de NB internalizada no microambiente das células TN alterou o tipo de morte. As EROs nas células tumorais aumentaram de acordo com a concentração; esse fato pode estar relacionado ao dano por estresse oxidativo das mitocôndrias induzido pela presença de NB. Castano, Demidova e Hamblin (2004), mostraram que as mitocôndrias de células de carcinoma retêm preferencialmente certos corantes catiônicos, como FS, em uma extensão muito maior do que a maioria

das células normais (CASTANO; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2004). Além disso, a presença de AuNPs contribui para o aumento da formação de EROs, comprometendo o potencial e a integridade mitocondrial (PAN *et al*., 2007; BENITO *et al*., 2013; JESUS *et al*., 2018).

Vários estudos demonstraram que mutações nas células cancerígenas podem levar a um aumento ou diminuição da suscetibilidade à TFD, sugerindo que as células cancerígenas são mais suscetíveis à morte celular induzida pela TFD do que as células normais (CASTANO; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2005; HUBENAK *et al*., 2014; ROBERTSON; EVANS; ABRAHAMSE, 2009). A produção de EROs na célula normal foi 9 vezes menor do que nas células TN, sendo consistente com a ausência de citotoxicidade nas células normais para todas as condições experimentais estudadas. Também, a diminuição da atividade mitocondrial e a viabilidade celular para a maior concentração de NB poderiam ser explicadas pela ação de ERO, o que é consistente com a conclusão de que as células cancerígenas são mais suscetíveis ao mecanismo de ação da TFD.

Para células TN tratadas a 0,2 µg / ml, a maioria das células estava morta e a atividade mitocondrial também estava abaixo de 50%, o que pode ser explicado pela morte apoptótica (38%) influenciada por uma grande quantidade de EROs. Entretanto, a 1,2 µg/mL, a atividade mitocondrial da célula TN é praticamente desprezível e o principal mecanismo de morte foi necrótico (90%), mostrando correlação entre atividade mitocondrial e tipo de morte. Choi *et al*. (2018), demonstraram resultados semelhantes, utilizando nanopartículas de Fe3O4-Ce6-FA após 2h de incubação não demonstraram nenhuma citotoxicidade no escuro, mas após a irradiação, a viabilidade celular diminuiu com o aumento de concentração de nanopartículas.

3.4 CONCLUSÃO DO CAPÍTULO

Os resultados *in vitro* obtidos nesta pesquisa viabilizam a aplicabilidade destas nanossondas no tratamento de adenocarcinoma mamário no modelo animal, pois apresentam excelente biocompatibilidade e citotoxicidade quando irradiados a 660 nm. Os resultados de captação das NB mostraram que, em 120 min de incubação, ambas as células apresentaram a mesma ordem de magnitude de internalização: 104. Por períodos mais longos de incubação, as células normais parecem estabilizar a captação e a expulsão de NB, mas as células TN continuaram exibindo um aumento

de NB com uma taxa de 63 NB/min, sem mostrar saturação no período de tempo estudado. A TFD mostrou resultados excelentes e o papel do tipo de morte celular foi determinado com o aumento de concentração de NB, o que é claramente influenciado pela produção de EROs e pode ser monitorado pela atividade mitocondrial.

4 CAPÍTULO 2 - TRIPLE-NEGATIVE BREAST CANCER TREATMENT IN XENOGRAFT MODELS BY BIFUNCTIONAL NANOPROBES COMBINED TO PHOTODYNAMIC THERAPY

Photodiagnosis and Photodynamic Therapy 38 (2022) 102796

Contents lists available at ScienceDirect

Photodiagnosis and Photodynamic Therapy

journal homepage: www.elsevier.com/locate/pdpdt

Triple-negative breast cancer treatment in xenograft models by bifunctional nanoprobes combined to photodynamic therapy

Viviane Paula dos Santos Jesus [a], Paula Fonseca Antunes Vieira [a], Ricardo Cesar Cintra [b], Luciana Barros Sant'Anna [c], Denise Maria Zezell [d], Maiara Lima Castilho [e], Leandro Raniero [a,*]

[a] Nanosensors Laboratory, Research and Development Institute, University of Vale do Paraíba, UNIVAP, Av. Shishima Hifumi, 2911, Urbanova, São José dos Campos, São Paulo 12244-000, Brazil
[b] Biochemistry Department, Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brazil
[c] Histology and Regenerative Therapy Laboratory, Research and Development Institute, University of Vale do Paraíba, UNIVAP, São Paulo, Brazil
[d] Energetics and Nuclear Research Institute, IPEN, Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brazil
[e] Bionanotecnology Laboratory, Research and Development Institute, University of Vale do Paraíba, UNIVAP, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Photodinamic therapy
Breast cancer
Photosensitizer
Nanoparticle

ABSTRACT

Triple-negative breast cancer (TNBC) overexpresses the Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR), a characteristic of different types of tumors, linked to worse disease prognosis and risk of recurrence. Conventional treatments are also aggressive and can be morbid.. Therefore, t improvement and development of new methods are notorious. Photodynamic Therapy (PDT) is an effective method for treating different types of cancer by using light radiation to activate a photosensitizing agent (drug) in molecular oxygen presence, promoting cell death., Improving drug uptake in target cells could contribute to PDT efficiency. Accordingly, we developed a bifunctional nanoprobe (BN), used in PDT as a a treatment method *in vivo* against breast cancer. The BN uses gold nanoparticles with active targeting through the Epidermal Growth Factor (EGF) protein and Chlorine e6 (Ce6) carriers. We evaluated the therapeutic efficacy of *in vivo* xenograft in 4 groups: Saline, BN, Ce6+PDT, and BN+PDT. As a result, we observed that the BN+PDT group exhibited an excellent effect with greater selectivity to tumor tissue and tissue damage when compared to the Saline, BN, and Ce6+PDT groups. The results indicate a potential impact on breast cancer treatment *in vivo*.. In conclusion, our data propose that the BN developed heightened PDT efficacy through cellular DNA repair effects and tumor microenvironment.

1. Introduction

Breast cancer is a disease with high incidence and mortality in women worldwide [1]. It is a highly heterogeneous disease, which pathology classifies into molecular subgroups with different characteristics based on the expression of breast cancer receptors: estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), and human epidermal growth factor receptor type 2 (HER-2) (1-3). ER, PR and HER-2 expression's absence classifies an aggressive breast cancer subtype: triple-negative breast cancer (TNBC) that is responsible for 10 to 20% of invasive breast cancer [2,5].

TNBC in general exhibits tumor hypoxia with necrosis and central fibrosis, which in turn promotes proliferation and metastasis [4,6]. Developing hypoxia favors tumor heterogeneity, stimulating aggressive growth, which genetically alters tumor cells, allowing them to get used to oxygen and nutrient deprivation [7,8]. TNBC has an overexpression level of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) accelerating cell growth and carcinogenesis, due to acting on the regulation of cell proliferation, differentiation, migration, and survival [6]. In addition, there are few alternatives for treatments since it does not respond to hormonal therapy or therapies directed to receptors [2,3].

Thus, alternative therapies have been studied, such as Photodynamic Therapy (PDT), which is widely used to treat diseases as well as different types of tumors with promising therapeutic results in oncology. PDT can also be used in conjunction with other therapies, increasing the performance of the treatments.

In this context, EGF is an excellent approach to biomarker studies and PDT can be a choice for TNBC treatment using a powerful photosensitizer (PS) [9,10,11]. In our previous work, a new PS for PDT was designed to bind to the EGFR, increasing specificity and treatment

* Corresponding author.
E-mail address: lraniero@univap.br (L. Raniero).

https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2022.102796
Received 21 January 2022; Received in revised form 16 February 2022; Accepted 2 March 2022
Available online 6 March 2022
1572-1000/© 2022 Elsevier B.V. All rights reserved.

4.1 METODOLOGIA

4.1.1 Animais

O biotério do Instituto de Pesquisa Energéticas e Nucleares (IPEN-USP) viabilizou os animais Balb/c nude fêmeas atímicas, com idade de 8 semanas e peso aproximadamente de 20 g, seguindo procedimentos aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Vale do Paraíba, sob o protocolo nº A07/CEUA2018. Os animais foram identificados e separados, mantidos durante todo o período experimental em biotério SPF (*Specific Pathogen Free*), mantidos em microisoladores com temperatura controlada de ~24ºC, com ciclo claro/escuro de 12 horas (luminárias acesas às 6:00 h e apagadas às 18:00 h), recebendo água potável e ração *ad libitum*. Todos os procedimentos foram realizados em colaboração com a Prof. Dra. Denise Maria Zezell, no laboratório de Biofotônica Centro de Lasers e Aplicações IPEN-CNEN/SP, de acordo com as normas estabelecidas pelo comitê de ética.

4.1.2 Xenoenxerto

O xenoenxerto das células tumorais nos camundongos foi realizado após 15 dias de adaptação, utilizando células de adenocarcinoma mamário (MDA-MB-468), conforme esquema apresentado pela figura 14. Esta linhagem de câncer de mama apresenta um perfil molecular triplo negativo e altamente metastático. As células foram tripsinizadas e lavadas duas vezes com meio de cultura Leibovitz incompleto. A viabilidade das células foi determinada pelo método de exclusão de Azul de Tripan a 0,4 % (Sigma Aldrich, T8154) e mensuradas utilizando a câmara de Neubauer. A suspensão celular de $5x10^6$ células foi injetada em condições assépticas subcutaneamente na glândula mamária abdominal do camundongo (BARTHOLOMEUSZ *et al*., 2010). Este procedimento foi realizado em animais anestesiados com 100 µL de solução de quetamina (10 mg/Kg) e xilazina (80 mg/Kg) injetada intraperitoneamente. Utilizaram-se 60 animais para realização deste experimento, os grupos experimentais foram divididos: G1 (Controle 1), Animais que não receberam o xenoenxerto e receberam a administração de salina 0,9% (n=5); G2 (Controle 2), Animais que receberam o xenoenxerto e não receberam qualquer tipo de tratamento (n=5); G3: Animais que receberam o xenoenxerto, administração de

Ce6 (2 mg/kg) e submetidos a TFD (n=20); G4: Animais que receberão o xenoenxerto, administração de NB (2 mg/kg) e submetidos a TFD (n=20).

Figura 14 - Ilustração do xenoenxerto localizado no flanco e glândula mamária.

Fonte: Autora (2020).

4.1.3 Tratamento com terapia fotodinâmica

O tratamento foi realizado após a 14ª semana, com um tumor de aproximadamente 10 mm. A concentração de NB e Ce6 de 2,0 mg/kg foi administrada na veia caudal dos camundongos. Os camundongos foram anestesiados com quetamina (10 mg/Kg) e xilazina (80 mg/Kg) para a administração da terapia. Após 4 horas da administração dos fármacos, o tecido foi irradiado utilizando um laser com comprimento de onda adequado para o fotossensibilizador e com uma densidade de energia (DE) de 100 J/cm^2 por aplicação fornecida por um laser de Diodo Eagle Heron 660 Quantum Tech® com comprimento de onda de 660 nm via difusor de fibra óptica, compatível para a excitação da Ce6 e acoplado a uma fibra óptica para iluminação direta (Figura 15).

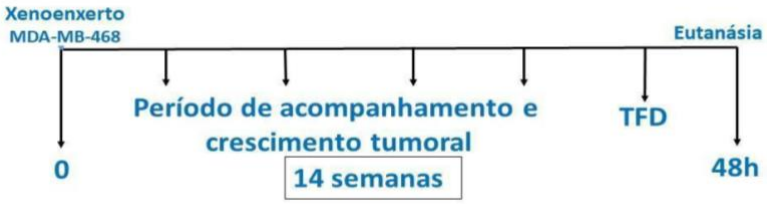
Figura 15 - Ilustração do tratamento via TFD.

Fonte: Autora.

4.1.4 Eutanásia dos animais

Após 48 horas da sessão de tratamento, os camundongos foram eutanasiados, foram submetidos à eutanásia mediante à dose excessiva dos anestésicos quetamina e xilazina (FAVORETTO; SEABRA; OLIVATO, 2013). Posteriormente, foram colocados sobre um campo operatório para a retirada do tumor, verificando visualmente se havia indícios de metástase. Em seguida, os tumores coletados foram colocados em recipientes com solução de formol a 10% e tampão fosfato, para avaliação histopatológica (Figura 16).

Figura 16 - Diagrama de acompanhamento e crescimento tumoral dos camundongos.



Fonte: Autora.

4.1.5 Avaliação Clínica dos animais

Os animais foram observados a fim de avaliar os impactos do tratamento, sendo considerados os aspectos físicos gerais, quanto a perda de peso, sinais de apatia, emagrecimento, desidratação, em decorrência de crescimento tumoral e comportamento durante todo o período de tratamento. A quantidade de ração e o

volume de água ingerida pelos animais também foram quantificadas para determinar possíveis alterações do comportamento físico e o ganho de peso dos camundongos. O crescimento tumoral foi monitorado durante todo o período experimental até o dia da eutanásia, com o objetivo de determinar a eficiência do tratamento. A mensuração do tamanho do tumor foi realizada utilizando um paquímetro digital de alta precisão, a fim de determinar o início do tratamento e eficiência do mesmo antes da eutanásia dos animais (JEONG *et al*., 2011; YAZDI *et al*., 2012). Os parâmetros hematológicos, incluindo contagem total de eritrócitos e leucócitos, assim como uma contagem diferencial de leucócitos, tais como neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos, também foram medidos.

As pesagens dos animais foram realizadas por meio de uma balança digital, determinando as alterações de peso, conforme a progressão tumoral e resposta do tratamento realizado. Os registros foram realizados antes do xenoenxerto, antes dos tratamentos e no dia da eutanásia dos animais, os quais serão comparados entre os grupos experimentais. Um paquímetro digital (200 mm Mitutoyo 500-172-30B 0,01 mm) foi usado para realização da mensuração externa dos tumores. O peso dos animais foi determinado por meio da balança digital Toledo 9094.

4.1.6 Diferencial Leucocitária

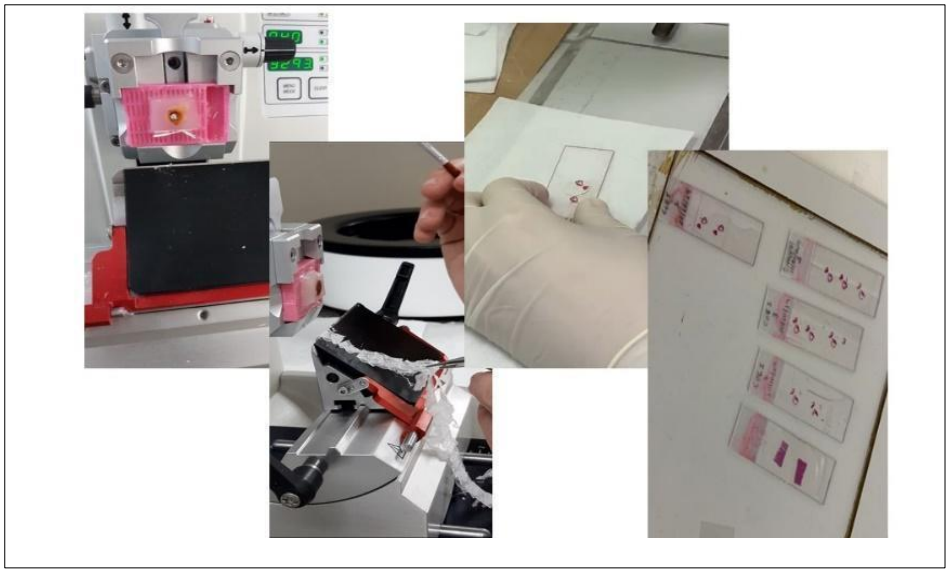
Após a coleta de sangue da veia da cauda dos camundongos, um esfregaço de sangue foi feito para observar as diferenças hematológicas entre os grupos. Para isso, foi utilizada a técnica de Coloração Panótico Rápido. Após seco à temperatura ambiente, imediatamente o esfregaço foi submetido à coloração Panótico Rápido, ou seja, 5 s no corante 1 e escorrer o excesso (fixador, que mantém as estruturas celulares inalteradas), em seguida colocar no corante 2 (laranja cora o citoplasma das células) por 5 s e por último 10 s no corante 3 (azul, cora ácidos nucléicos e grânulos). Em seguida, foi o excesso dos corantes foram removidos em água. Deixando secando em temperatura ambiente. Após, foi utilizado o óleo de imersão para leitura no microscópio para contagem do diferencial, ou seja, a porcentagem de cada tipo de leucócito presente nas lâminas.

4.1.7 Avaliação Histopatológica do tumor

A toxicidade do tratamento realizado (TFD) foi avaliada por meio da análise dos tecidos tumorais coletados. A coleta do tumor (tecido mamário) foi realizada após a eutanásia dos camundongos, observando os aspectos gerais do tecido, possível ocorrência de necrose e a presença de aglomerados de nanopartícula de ouro.

As amostras foram fixadas em formol 10% e desidratadas uma série de concentrações crescentes de álcool (70% a 100%), diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. Após a solidificação, os blocos foram seccionados em um micrótomo (Leica Biosystems RM2245) para obtenção de cinco cortes semi-seriados com 5 µm de espessura, os quais foram colocados em uma lâmina de vidro. O método de hematoxilina-eosina foi utilizado para coloração das lâminas, no qual foram observados o citoplasma e o núcleo a fim de determinar a presença, tipo e intensidade de infiltrados inflamatórios, presença e padrão de necrose e qualquer outro tipo de anormalidade presente nos tecidos. A figura 17 mostra a confecção das lâminas.

Figura 17 - Procedimento de microtomia dos tecidos tumorais coletados dos camundongos.



Fonte: Autora.

4.1.8 Extração e quantificação do RNA

As amostras foram submetidas à maceração em cadinho com pistilo de cerâmica em nitrogênio líquido, transferidas para 1mL de Trizol e 200uL de clorofórmio. Homogeneizadas por vórtex por 15 s seguidas de repouso por 5 min. em

temperatura ambiente. Passado esse período, as amostras foram centrifugadas por 20 min. a 12000rpm (112g) e 4°C. O sobrenadante foi coletado, adicionado de 500uL de isopropanol e, mantido por um período mínimo de 16 horas a -80 ºC. Após esse período, as amostras foram centrifugadas por 20 min. a 4°C e 12000 rpm para sedimentação do pellet. O pellet foi lavado 3 vezes com etanol 75% preparado com Água tratada com DEPC. O material foi ressuspendido com 20µL de água livre de nucleases.

4.1.9 Tratamento com Dnase:

De cada amostra, 7,2 µL foi utilizado no tratamento com RQ1® RNase-Free DNase, segundo recomendações do fabricante (Promega Co., Madison, USA). Como controle negativo para a presença de DNA residual, 1µL do RNA tratado com DNase foi submetido a uma reação de qPCR convencional para amplificação de um fragmento de globina humana de 128 pares de bases, dentro de éxon único de forma que apenas fragmentos de DNA possam ser amplificados. As reações foram realizadas primers de Globina forward 5'- GCTTCTGACACAACTGTGTTCAC-3' e Globina reverse 5'- GGCCTCACCACCAACTTCAT-3' numa concentração final de 150 nM em 1x GoTaq® qPCR Master Mix (Promega Co., Madison, USA) em um volume final de 12,5 µL/reação. O ensaio foi realizado no equipamento 7500 Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems, California, USA). Não houve amplificação em nenhuma das amostras confirmando a efetividade do tratamento com DNase.

4.1.10 Transcrição Reversa seguida por qPCR (RT-qPCR)

As concentrações de RNA das amostras foram verificadas por meio da espectrofotometria, utilizando o equipamento NanoDrop2000® (Thermo Scientific, Wilmington, DE), 1ug de RNA seguiu para transcrição reversa utilizando o ImProm-II ™ reverse Transcription System (Promega Co., Madison, USA). O cDNA foi então diluído 100X e 2µL utilizados para reações de qPCR com primers específicos para Bcl2, Bax, Caspase 3, Caspase 8, SOD2 e Stratifina (14-3-3σ) (Tabela 1). Para determinação do gene de referência foram utilizados um painel de 8 genes endógenos (HPRT1, RPLP0, RPL27, TBP, ACTB, TUBA, GAPDH e HMBS) sendo que o gene escolhido foi o GAPDH por ter uma variação <1 Ct entre todas as amostras. A partir

de então, os ensaios foram realizados em duplicata com 150nM de cada primer em uma reação final de 1x GoTaq® qPCR Master Mix e volume final de 12,5µL/reação, no equipamento 7500 Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems, California, USA). As condições da reação foram de 95°C por 2 min. seguidos por 40 ciclos de 95°C por 15 s e 60°C por 1 min. A análise de expressão gênica foi realizada pela metodologia $\Delta\Delta Ct$[1] em que as amostras são normalizadas pelo gene de referência (endógeno) e comparada com as amostras controle experimentais. Os resultados foram então plotados em uma planilha de Excel e determinados os desvios e erros padrão. Cada ensaio foi repetido 3 vezes sem haver desvio significativo para cada gene testado.

Tabela 1 - Genes relacionados com vias de regressão tumoral e seus respectivos primers para RT-qPCR.

Gene	Primer
Caspase 3	*Forward* 5'-CATGGAAGCGAATCAATGGACT-3'
	Reverse 5'-CTGTACCAGACCGAGATGTCA-3'
Caspase 8	*Forward* 5'-AGAGTCTGTGCCCAAATCAAC-3'
	Reverse 5'- GCTGCTTCTCTCTTTGCTGAA-3'
Bax	*Forward* 5'-CCCGAGAGGTCTTTTTCCGAG-3'
	Reverse 5'- CCAGCCCATGATGGTTCTGAT-3'
Bcl2	*Forward* 5'-GGTGGGGTCATGTGTGTGG-3'
	Reverse 5'-CGGTTCAGGTACTCAGTCATCC-3'
SOD2	*Forward* 5'-TGAACAACCTGAACGTCACC-3'
	Reverse 5'-GTAGTAAGCGTGCTCCCACA-3'
SFN	*Forward* 5'-AAGACCACTTTCGACGAGGC-3'
	Reverse 5'-CTCTTCCCCGGCGTTGT-3'
GAPDH	*Forward* 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTCA-3'
	Reverse 5'-TTGAGGTCAATGAAGGGGTC-3'

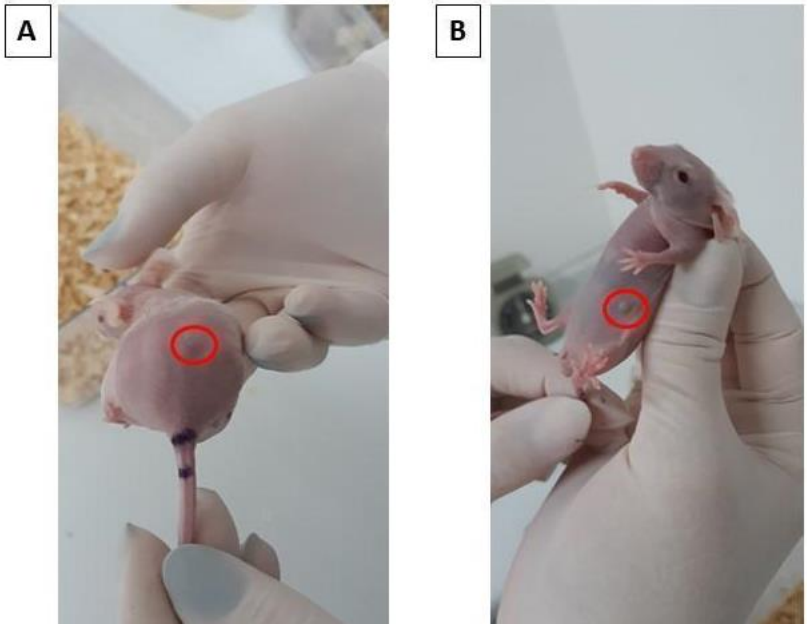
Fonte: Autora.

4.2 RESULTADOS

O xenoenxerto foi realizado com sucesso em camundongos da linhagem Balb/c Nude, apresentando desenvolvimento tumoral constante, porém lento (protocolo nº A07/CEUA2018). Após 15 dias da inoculação das células, foi observado, no local de xenoenxerto, o crescimento de uma massa endurecida e fixa com aumento de vascularização e também de fácil visualização. A figura 18, apresenta as primeiras

observações durante o crescimento do tumor. Os animais foram avaliados clinicamente dois dias da semana, baseado nos parâmetros do Guia para a Condução de Estudos não Clínicos de Toxicologia e Segurança Farmacológica, necessários ao desenvolvimento de medicamentos (ANVISA, 2013).

Figura 18 - Camundongos fêmeas Balb/c Nude com xenoenxerto no Flanco (A) e na Glândula Mamária abdominal (B). O círculo vermelho destaca o tumor formado.



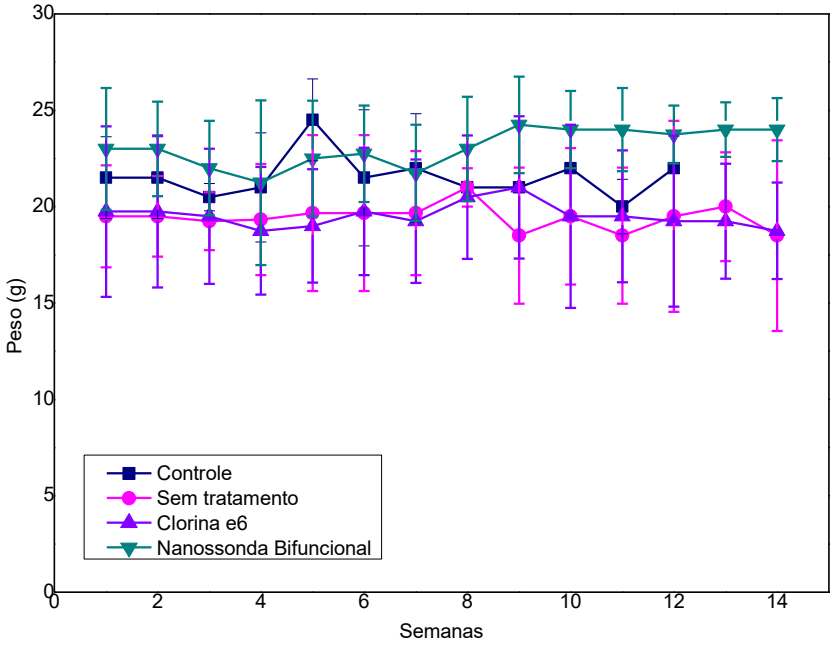
Fonte: Autora.

A escolha do local de aplicação do xenoenxerto foi baseada em dados da literatura (BARTHOLOMEUSZ *et al*., 2010), quando dois sítios foram escolhidos, uma aplicação na glândula mamária abdominal e outra no flanco (Figura 18). Entretanto, com a evolução/crescimento do tumor foi possível notar que o flanco teve melhor desenvolvimento do tumor. Na glândula mamária, o crescimento do tumor proporciona o atrito da região com a maravalha, material que fica espalhado no fundo dos microventiladores. Sendo a pele do animal muito sensível, surgiu lesão no local do tumor começou a crescer.

Os camundongos foram pesados uma vez na semana, afim de ter uma comparação minuciosa da variação do peso. Os animais foram pesados antes do procedimento do xenoenxerto e, estavam com aproximadamente 22±3 g. Após o xenoenxerto, não foram observadas diferenças significativas no peso corporal dos animais. Entretanto, notou-se diferença significativa entre os grupos, devido ao modo aleatório que os camundongos foram agrupados. Durante o acompanhamento, as

variações do peso mais relevantes observadas foram: na 5ª semana, houve o aumento de peso para 25 g do grupo controle, e diminuição de peso para 17 g no grupo sem tratamento na 9ª semana (Figura 19).

Figura 19 - Peso corporal dos camundongos monitorados por 14 semanas (1 vez por semana) durante o período de acompanhamento do crescimento tumoral. Os animais foram pesados antes do xenoenxerto, no acompanhamento do crescimento e antes da eutanásia.

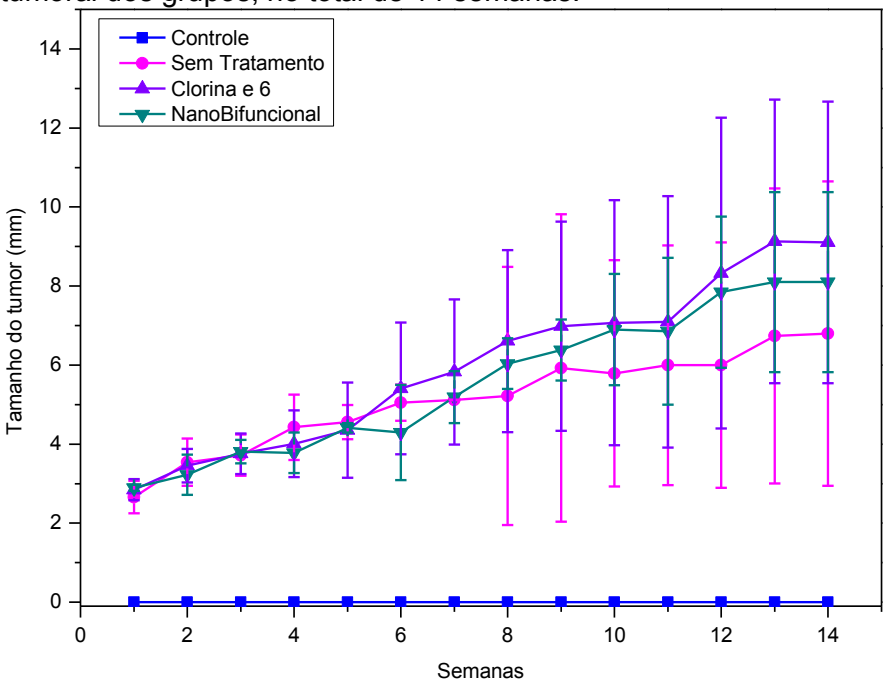


Fonte: Autora.

O tempo de crescimento do xenoenxerto no camundongo foi analisado com o auxílio de um paquímetro, durante 14 semanas. Os dados mostram que, inicialmente, todos os grupos apresentaram em média volume tumoral de aproximadamente 2,5 mm, depois de algumas semanas, apresentaram aumento crescente no volume tumoral (Figura 20).

A incidência do desenvolvimento tumoral foi de 100% nos grupos experimentais. O grupo clorina e6 teve o aumento exponencial do volume tumoral, chegando a apresentar na última semana ~10 mm, sendo o grupo que apresentou maior aumento do tumor comparado aos demais grupos. Contudo, dois camundongos do grupo sem tratamento apresentaram crescimento tumoral nas primeiras semanas, porém o tumor regrediu.

Figura 20 - Curva de crescimento tumoral após inoculação de 100 µL de 5×10^6 células. Análise do tamanho tumoral dos grupos, no total de 14 semanas.



Fonte: Autora.

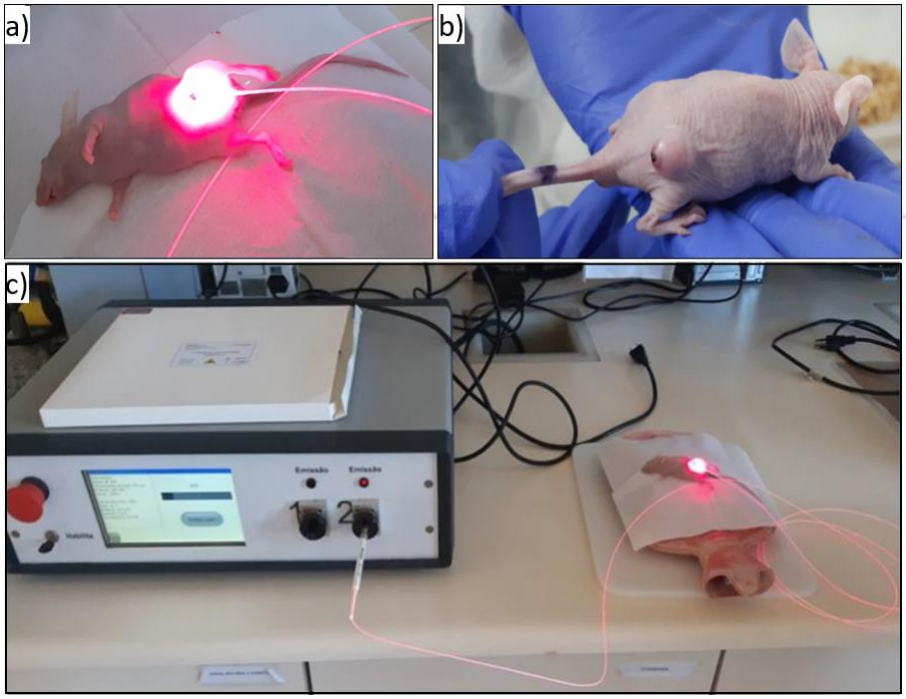
Na sétima semana, foram observados aspectos clínicos, como presença de necrose com o aumento do volume tumoral (Figura 21). Tumores que crescem rapidamente podem sofrer necrose de forma espontânea, e este fator ocorre em virtude do maior crescimento da massa tumoral em relação a velocidade que a vascularização consegue acompanhar. Os animais não apresentaram sinais ou sintomas clínicos, comportamentais e patológicos anormais durante todos os experimentos. O tratamento foi realizado após a 14ª semana de indução tumoral, com tumores de tamanho aproximado de 10 mm.

Figura 21 - Fotografia da determinação do volume tumoral por meio de paquímetro digital, pela medida do maior e do menor diâmetro tumoral em camundongo Balb/c Nude com massa tumoral.

Fonte: Autora.

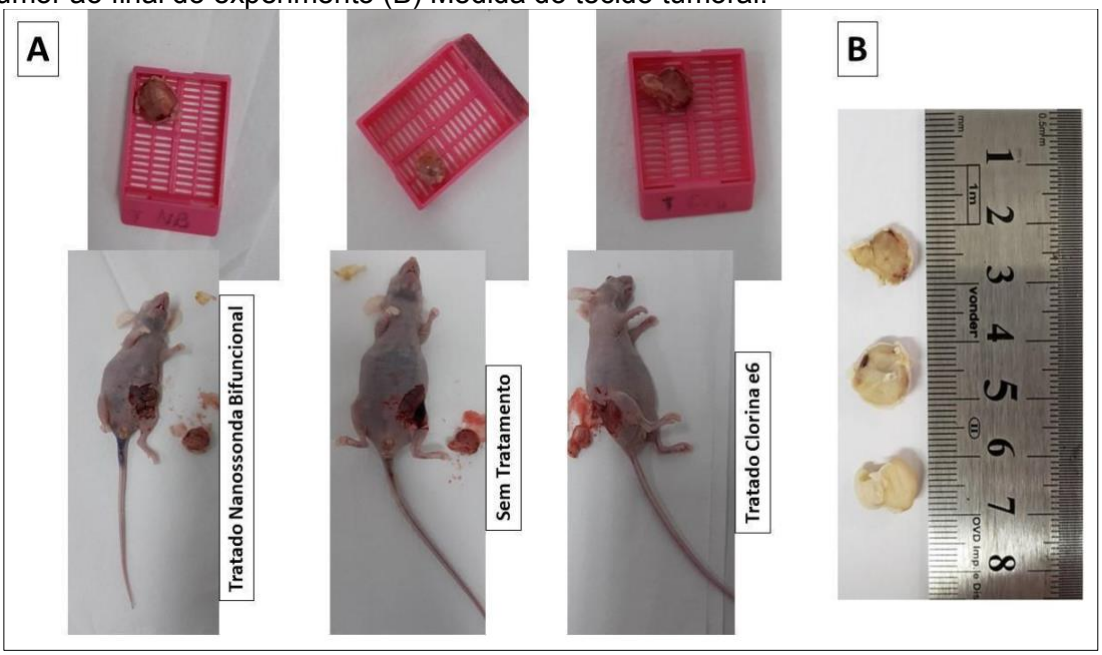
Antes do procedimento de irradiação da área a ser tratada, foram administradas as drogas de seus respectivos grupos para a realização da terapia fotodinâmica (Figura 22). Os camundongos foram anestesiados, tratados e eutanasiados após 48 h. As mudanças macroscópicas nos tecidos tumorais após TFD foram acompanhadas por fotografias, mas não foi possível identificar alteração. Contudo, a indução tumoral nestes camundongos produz geralmente o adenocarcinoma sólido de alto grau. Os tumores coletados exibiram consistência maciça, morfologia esférica e bem delimitada, conforme apresentado na Figura 23.

Figura 22 - TFD em combinação com a droga no tratamento de camundongos com xenoenxerto de tumor MDA-MB-468: a) O laser foi conduzido em camundongos xenoenxertados sob condições *in vivo*, irradiação com um laser de 670 mn para TFD foi aplicada por 10 min, 4h depois da injeção da droga. b).Necrose após exposição ao TFD. c) Visão geral do experimento.



Fonte: Autora.

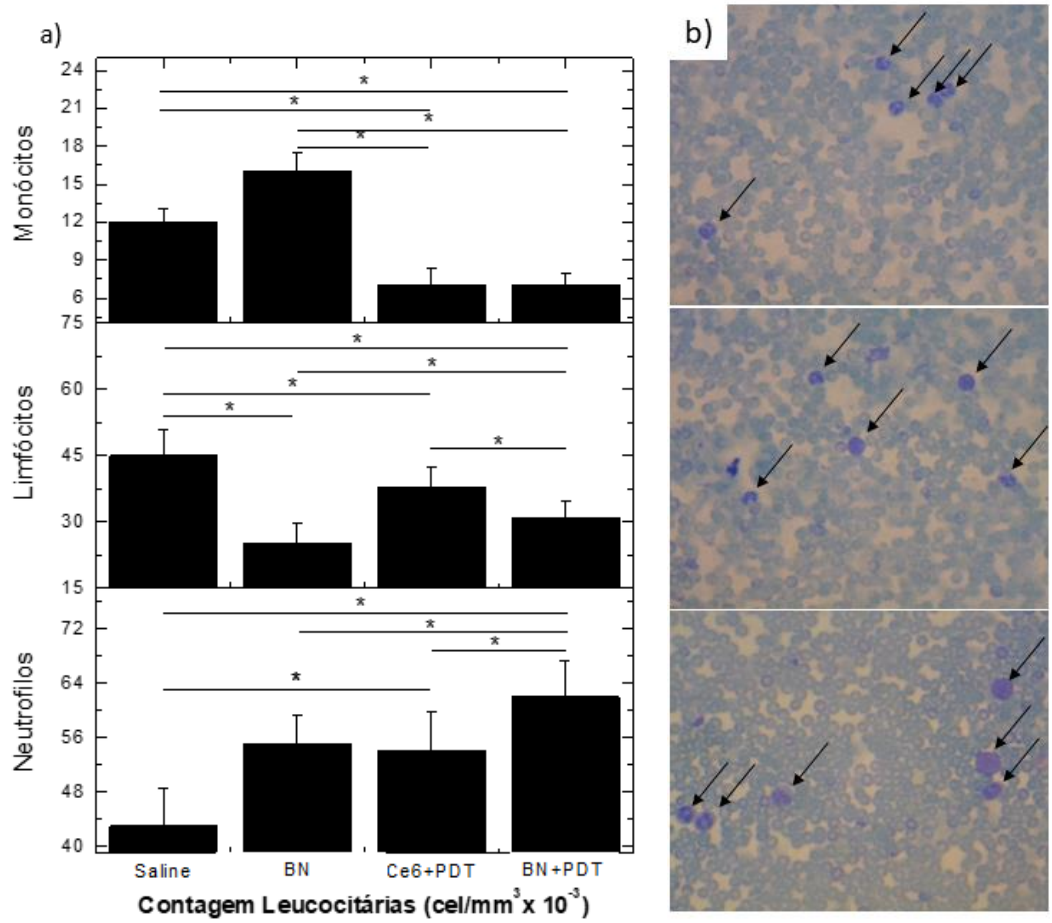
Figura 23 - Imagens da coleta do tumor após a terapia. (A) O procedimento de microdissecção do tumor ao final do experimento (B) Medida do tecido tumoral.



Fonte: Autora.

As amostras de sangue total foram obtidas de camundongos de todos os grupos, no dia da eutanásia para avaliar as mudanças na contagem do diferencial leucocitário. A contagem nos camundongos do grupo controle não foi significativamente diferentes do grupo Ce6 + TFD livre e NB + TFD (P> 0,05, ANOVA One-Way, Teste de Tukey). Camundongos resistiram à aplicação das drogas injetadas via intravenosa e não mostraram sinais de toxicidade. Além disso, não foi encontrado linfopenia em camundongos e, nenhuma alteração foi identificada na contagem de leucócitos (P = 0,65, One-Way ANOVA, Teste de Tukey). (Figura 24).

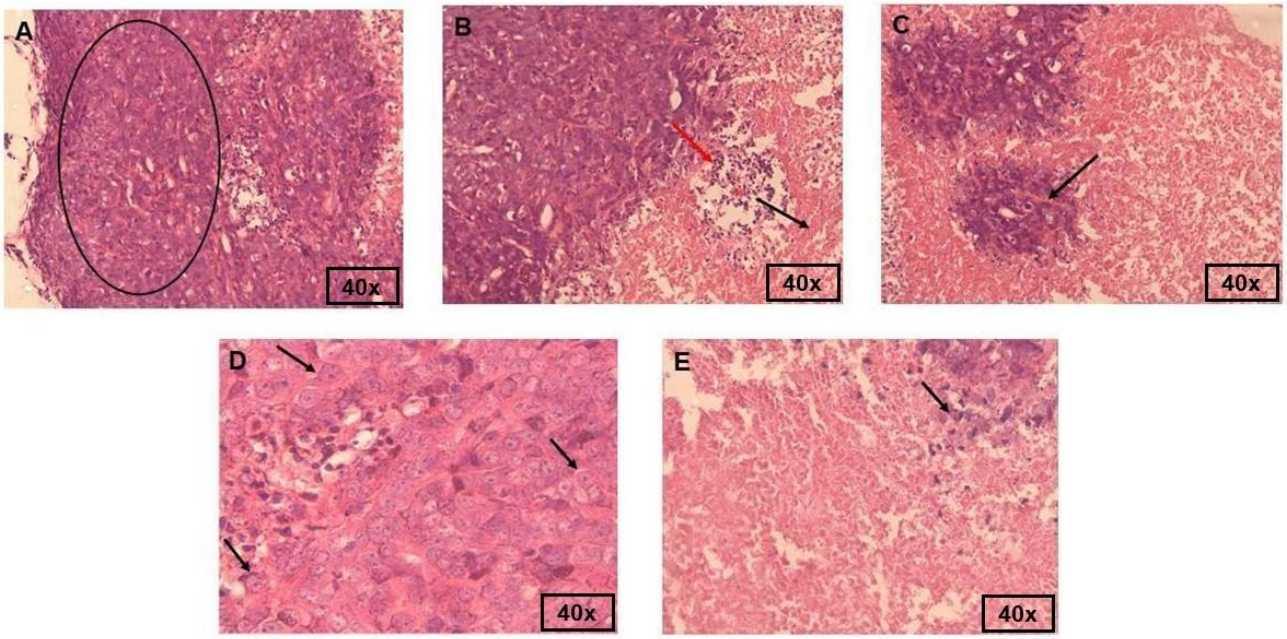
Figura 24 - Amostras de sangue coletadas da veia da cauda de camundongos pelados BALB / c de todos os grupos. a) A fração do tipo de leucócito foi determinada por exame microscópico de esfregaços de sangue periférico corados do Panótico Rápido e expressa como uma porcentagem. O gráfico representa os valores médios da contagem total de leucócitos em cada grupo. Os valores são as médias ± DP (p <0,05 por One-Way ANOVA, Teste de Tukey). Cada experiência foi realizada em triplicado. b) Fotomicrografias de sangue de camundongos. Lâmina de esfrgaço sanguíneo (Leucócitos apontados pelas setas).



Fonte: Autora.

A análise histopatológica realizada permitiu classificar os tumores em carcinoma mamário invasivo bem diferenciado, caracterizado por células epiteliais. Em todas as amostras foram observadas diversas características de malignidade, tais como: nucléolos evidentes, mitoses atípicas, infiltrado inflamatórios, aumento de aglomerados de células tumorais, característicos de tumor do tecido mamário. A figura 25 apresenta as micrografias representativas do grupo com xenoenxerto sem tratamento.

Figura 25 - Classificação Histopatológica dos tumores do grupo sem tratamento. Coloração HE. Tecido sólido de Adenocarcinoma Mamário. (A) Área de aglomerado de células neoplásicas (elipse). (B) Fragmentos celulares (seta vermelha); Áreas de necrose (seta preta). (C) Reação Desmoplásica (seta preta). (A, B, C aumento de 20x). (D) Células neoplásicas, núcleo volumoso e nucléolo evidente (setas pretas). (E) Mitose (seta preta). (D, E aumento de 40x).



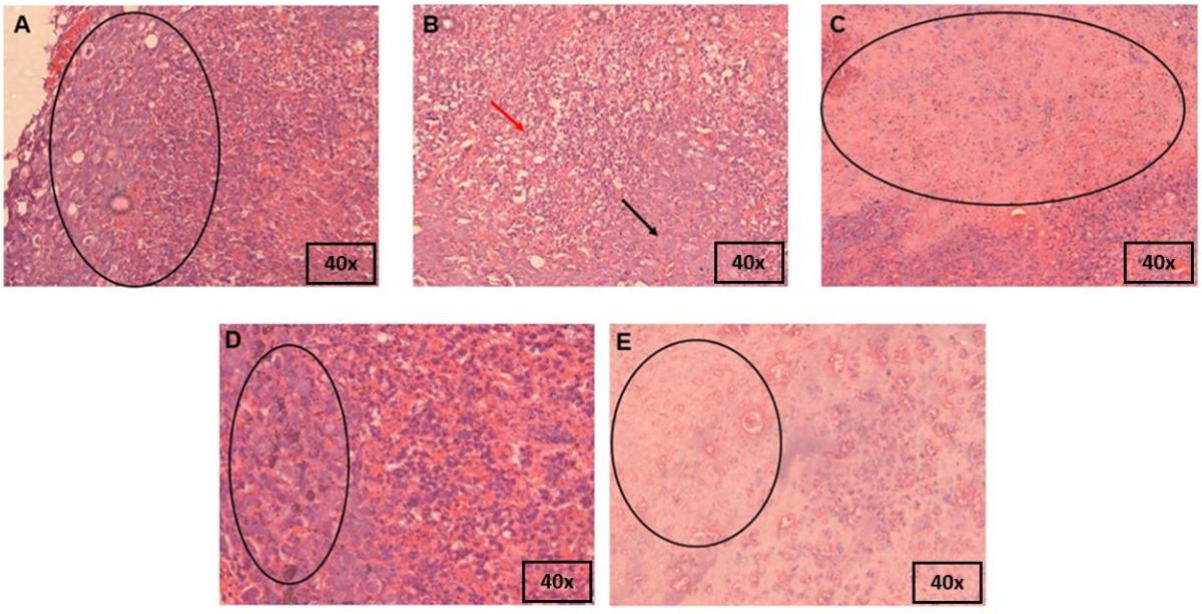
Fonte: Autora.

Nesta figura é possível observar um aglomerado de células neoplásicas, formando principalmente a periferia do tumor, conforme identificado na legenda da figura. Este aglomerado de células se apresenta com aspecto, tanto de cordões celulares, quanto com o aspecto de “blocos” de células. Também se observa aglomerados destas células na região central do tumor, em meio a áreas de necrose, as quais são caracterizadas por células com aumento da basofilia nuclear, presença de fragmentos celulares e na sequência por áreas com intensa acidofilia, onde pode perceber uma “sombra” das células neoplásicas. Então, este grupo é caracterizado

por uma intensa reação desmoplásica do tecido tumoral infiltrado, ou seja, os cordões ou blocos de células neoplásicas estão em meio a um tecido fibroso denso. As células neoplásicas são poligonais ou arredondadas, núcleo volumoso e nucléolo evidente. Também se encontra mitose nas células neoplásicas.

A figura 26 apresenta as micrografias representativas do grupo Clorina e6 associado à TFD, sendo possível observar um aglomerado de células neoplásicas também na periferia do tumor, com o mesmo aspecto morfológico das células do grupo sem tratamento (Figura 24) e em meio a tecido fibroso. Entretanto, esta reação desmoplásica do tecido tumoral infiltrado ocupa uma menor extensão, quando comparado ao grupo sem tratamento. Além disso, a maior parte das células se apresentam disfórmicas, com núcleos de menor volume, sem nucléolo evidente, com ligeira coloração azulada, juntamente com fragmentos celulares em meio ao tecido fibroso, características que se intensificam conforme se aproxima da região central do tumor. Assim também, observa-se neste grupo áreas maiores de necrose, quando comparado ao grupo sem tratamento.

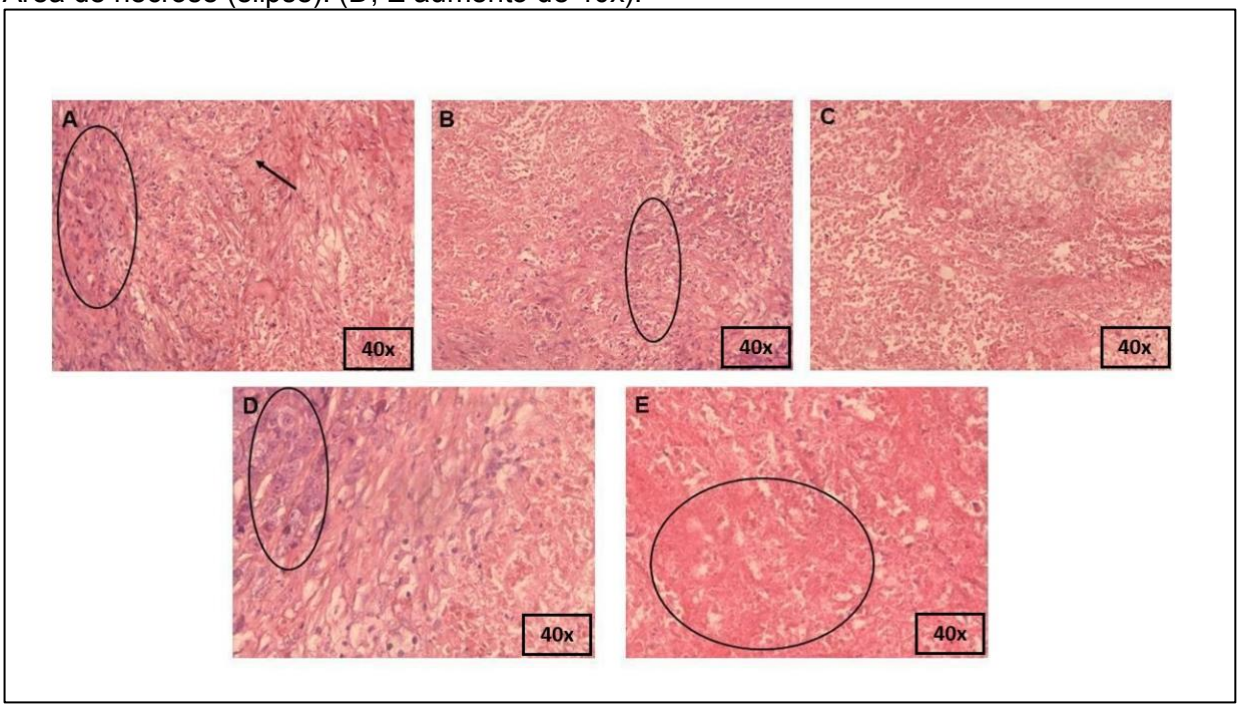
Figura 26 - Classificação Histopatológica dos Tumores grupo Grupo Clorina e6 + TFD. Coloração HE. Tecido sólido de Adenocarcinoma Mamário. (A) Área de aglomerado de células neoplásicas (elipse). (B) Células com núcleos em menor volume, sem nucléolo evidente (seta vermelha); Células com ligeira coloração azulada (seta preta). (C) Área de necrose (elipse). (A, B, C aumento de 20x). (D) Aglomerado de células neoplásicas (elipse). (E) Área de necrose (elipse). (D, E aumento de 40x).



Fonte: Autora.

A figura 27 apresenta as micrografias representativas do grupo TFD associada à NB. Neste grupo, o aglomerado de células tumorais ou a reação desmoplásica fica restrito somente à periferia do tumor. A maior parte do tumor é composta por extensas áreas de necrose, algumas ainda apresentam fragmentos celulares com intensa basofilia. Porém, a maior parte do tumor é ocupada por áreas necróticas em meio a um extenso tecido fibroso denso, as quais não apresentam quase fragmentos celulares. No grupo NB+TFD, a reação desmoplásica é restrita apenas à periferia do tumor. Áreas necróticas ocupam a maior parte do tumor, que apresenta pequenos ou nenhum fragmento celular. Comparados com os tecidos do grupo NB, os do grupo NB+TFD apresentaram danos celulares e nucleares.

Figura 27 - Classificação Histopatológica dos Tumores grupo Nanossonda Bifuncional + TFD. Coloração HE. Tecido sólido de Adenocarcinoma Mamário. (A) Área de aglomerado de células neoplásicas (elipse); Reação desmoplásica (seta). (B) fragmentos celulares (elipse). (C) Área de necrose. (A, B, C aumento de 20x). (D) Aglomerado de células neoplásicas (elipse). (E) Área de necrose (elipse). (D, E aumento de 40x).

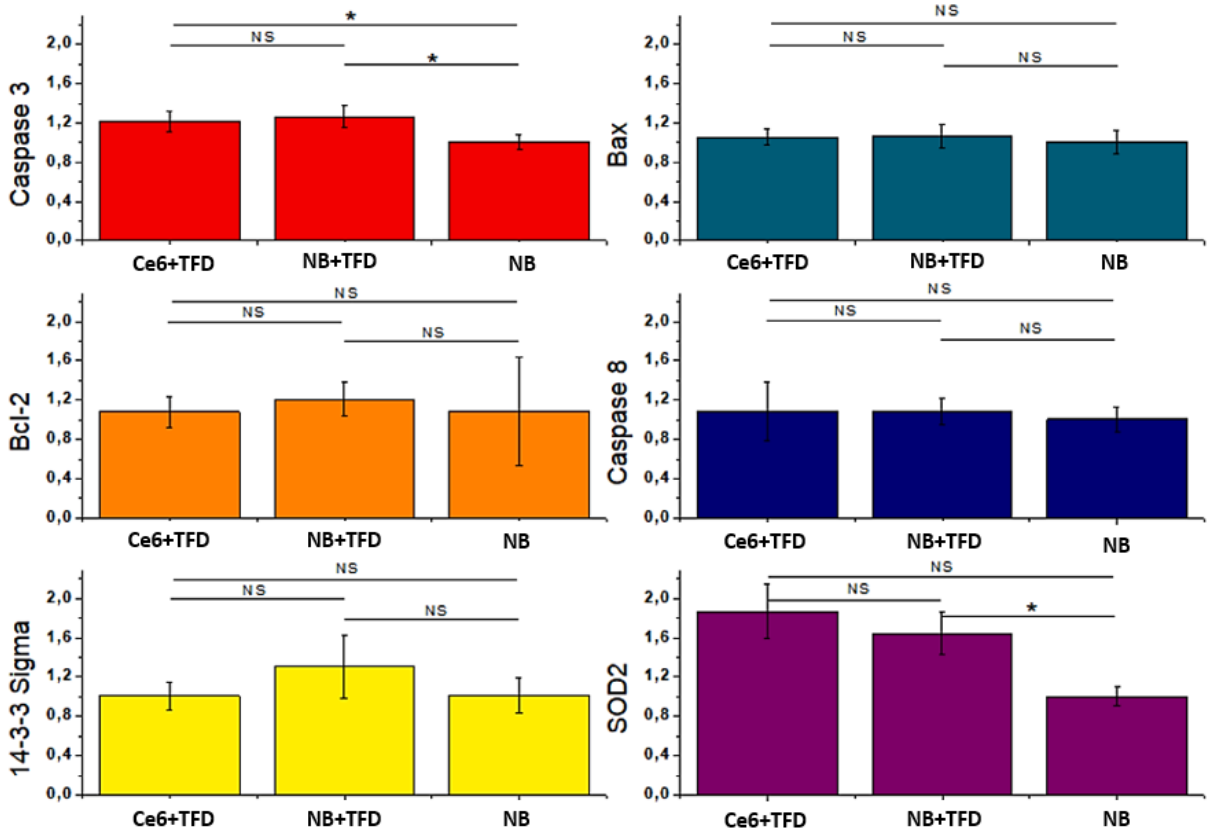


Fonte: Autora.

Na análise da expressão de proteínas apoptóticas os experimentos *in vivo* mostraram que os melhores resultados pertenciam ao grupo NB+TFD, a expressão de algumas proteínas apoptóticas foram analisadas. Dados de PCR em tempo real demonstraram que a expressão das proteínas pró-apoptóticas Bax, Bcl-2, Caspase 3 e Caspase 8, SOD2 e 14-3-3 sigma foram significativamente maiores no grupo

NB+TFD em comparação ao controle, indicativo de indução de apoptose neste grupo (Fig. 28). Eles mostram um aumento de 20% e 27% na expressão de caspase 3 (Ce6+TFD e NB+TFD, respectivamente) e um aumento de 20% na expressão de Bcl-2 no tratamento NB+TFD. Adicionalmente, dois genes relacionados a danos no DNA e estresse oxidativo (14-3-3 sigma e SOD2) foram analisados, resultando em um aumento de 30% de 14-3-3 sigma em NB+TFD e 84% e 64% para SOD2 gene com os tratamentos Ce6+TFD e NB+TFD, respectivamente.

Figura 28 - Análise por PCR quantitativa de transcrição reversa da expressão dos genes Bax, Bcl-2, Caspase 3 e Caspase 8, SOD2, 14-3-3 sigma em xenoenxerto de TNBC. A análise estatística foi realizada por meio do teste Singleplex. Os dados foram normalizados pelo nível de expressão de GAPDH. As barras representam os desvios padrão (P> 0,05, ANOVA One-Way, Teste de Tukey). O nível de expressão foi maior nas amostras NB+TFD em comparação com os grupos Ce6+TFD e NB. * - Diferença significante. NS - Não significativo.



Fonte: Autora.

4.3 DISCUSSÃO

O uso de experimentação animal está entre diferentes áreas da pesquisa contribuindo para o estudo da genética, do câncer, transplantes e imunologia. Além disso, os camundongos servem de modelo simplificado do comportamento humano,

são de fácil criação, manipulação, reprodução rápida e possui grande diversidade genética (SOARES; PONTES-DE-CARVALHO; SANTOS, 2001; FERREIRA; HOCHMAN; BARBOSA, 2005). Os camundongos da linhagem Balb/c Nude imunodeficientes são conhecidos como atímicos, sendo um dos modelos mais usados em pesquisas científicas, pois não rejeitam transplantes de doadores; transplantes xenogenéticos e não são histocompatíveis. São utilizados para estudo do câncer de fatores da transformação maligna, invasão, metástase e avaliação de resposta à terapia. As células tumorais humanas são inoculadas nos camundongos sob a pele ou no órgão de origem, o desenvolvimento do tumor se dará em 1 a 8 semanas, mas pode ser em 1 a 4 meses ou mais, permitindo estudo de terapias *in vivo* (SOARES; PONTES-DE-CARVALHO; SANTOS, 2001, RICHMOND; SU, 2008). Sendo assim, o estudo do câncer de mama utilizando camundongos imunodeficientes é uma boa alternativa para crescimento tumoral e aplicação de terapia, a qual exibe uma excelente eficiência.

A atividade antitumoral *in vivo* da NB foi investigada em camundongos enxertados com células MDA-MB-468. O complexo NB foi capaz de inibir o crescimento do tumor na dose testada. Não foram encontradas alterações significantes no peso corporal dos animais e nem nos parâmetros hematológicos analisados, indicando baixa toxicidade da droga.

O xenoenxerto realizado seguiu o padrão descrito por LI *et al.* (2016), que utilizou $5x10^6$ células da linhagem celular MDA-MB-468 no desenvolvimento do tumor triplo negativo. O crescimento tumoral pode acontecer de 1 a 8 semanas, podendo prolongar até 4 meses ou mais para atingir um volume tumoral adequado, permitindo estudo de terapias *in vivo* (SOARES; PONTES-DE-CARVALHO; SANTOS, 2001, RICHMOND; SU, 2008). Dessa maneira, o crescimento tumoral nos camundongos utilizados no projeto, levou 14 semanas para atingir o tamanho desejado para realização dos experimentos. O crescimento rápido de tumores leva a necrose coagulativa, devido ao crescimento rápido da massa tumoral, que supera a capacidade de suprimentos pelos vasos do próprio tumor. Este tipo de necrose acontece geralmente na região central do tumor, onde não é possível diferenciar os efeitos da TFD. No entanto, a necrose causada pela TFD pode ser maior e mais dispersa que a necrose coagulativa. Os fragmentos celulares liberados do processo de morte induzem infiltrados inflamatórios, devido à resposta inflamatória. Enquanto que o tecido conjuntivo em resposta ao tratamento, forma fibrose no local que era

preenchido por células tumorais, ocorrendo a morte do tumor. Embora a inoculação do flanco e glândula mamária esquerda tenha sido realizada com a mesma concentração de células, o tumor se desenvolveu melhor no flanco, quando comparado com a mama. Entretanto, isso não causou danos no resultado, pois o tumor também cresceu na mama e exibiu uma massa sólida com necrose central. A área onde foi desenvolvida a necrose pode ser decorrente de hipóxia tecidual, que está ligada a fenótipos de câncer mais agressivo, com alta capacidade de proliferação e invasão (ROFSTAD; HALSØR; 2002).

O grupo sem tratamento apresentou características de um tecido tumoral como os aglomerados celulares, nucléolos evidentes, mitoses atípicas, reação desmoplásica e infiltrados inflamatórios (Figura 24). A presença de nucléolos evidentes e diferentes morfologias importantes classificam a malignidade do tumor, que neste caso (TNBC) pode ser relacionado com pior prognóstico (ZHAO, 2018).

Os resultados mostraram que houve um aumento de regiões de necrose nas micrografias dos tumores tratados com NB+TFD em relação ao grupo controle, sendo o resultado esperado. Entretanto, as NB+TFD mostraram resultados superiores aos tumores tratados com Ce6, pois a maior parte do tumor é composta por extensas áreas de necrose, algumas ainda apresentam fragmentos celulares com intensa basofilia. Este resultado pode ser explicado comportamento hidrofóbico da Ce6, que restringe as aplicações clínicas, devido auto-aglomeração em solução aquosa, dificultando sua administração sistêmica e reduzindo os efeitos da TFD (XIAO *et al*., 2012; GRAVINA *et al*. 2018).

A TFD pode estimular mudanças na membrana plasmática, assim, no experimento de hematoxilina e eosina (H&E), observou-se que o tratamento com NB +TFD estava relacionado a uma perda mais intensa de tecido tumoral quando comparado aos outros tratamentos. A morfologia do tecido tumoral foi significativamente modificada após o tratamento com NB+TFD. Esses achados confirmam que NB+ TFD teve um efeito terapêutico significativo sobre os tumores.

Com base nesses argumentos, neste estudo, o teste quantitativo de PCR em tempo real foi utilizado para avaliar a expressão relativa de genes relacionados à apoptose para fornecer a identificação da via afetada pelo tratamento com TFD em tumores de mama a partir de amostras obtidas *in vivo*. Os resultados da PCR revelaram que a expressão de fatores apoptóticos incluindo Bax, Bcl-2, Caspase 3 e 8, SOD2, 14-3-3 Sigma aumentou significativamente no grupo NB+TFD em

comparação ao grupo controle. O aumento da expressão confirma que o encolhimento tumoral neste grupo pode estar associado à ocorrência de apoptose através das mitocôndrias. Como resultado, foi demonstrado que TFD e NB aumentaram a expressão de genes apoptóticos em células de câncer de mama. Assim, em um estudo, eles usaram composições MPEG2000-ZIF/PC (PMs) em combinação com TFD induzindo morte apoptótica em células tumorais e observaram um aumento no nível de expressão de Caspase3, Bax e Bcl-2 após TFD (CHEN *et al*. 2021). Além disso, um estudo relatou que eles usaram diidroartemisinina (DHA) em combinação com TFD para inibir a proliferação de células de câncer de mama e aumentar a expressão da proteína caspase 8, sugerindo que ela pode ativar a caspase 3 (DAI *et al*., 2021). Em outro relato, o estudo utilizou ftalocianina de zinco (M2TG3) associada à TFD para tratar diversos tumores e observou que o M2TG3 poderia causar morte celular por diversos mecanismos, dependendo da condição das culturas celulares, modelo e disponibilidade de oxigênio, revelou que a hipóxia aumentou a nível de superóxido dismutase (SOD2) (KUCINSKA *et al*., 2021). Além disso, relatos de um estudo com a proteína 14-3-3 mostrando que sua associação com a proliferação de células tumorais e apoptose indica sua presença em câncer com pior prognóstico (LI *et al*., 2014). Portanto, vale ressaltar que não foram identificados efeitos colaterais decorrentes da técnica de tratamento em camundongos, o que é uma vantagem em relação a algumas terapias convencionais, como a quimioterapia.

4.4 CONCLUSÃO DO CAPÍTULO

Os resultados da aplicação *in vivo* mostraram resultados coerentes com os registrados em *in vitro*. A utilização da TFD associadas a NB permite resultados superiores ao da Ce6, pois a análise histológica mostrou que a maior parte do tumor é composta por extensas áreas de necrose, algumas ainda apresentam fragmentos celulares com intensa basofilia. Outro resultado importante obtido pela técnica de citometria de fluxo foi aplicação da NB como nanomarcador de EGFR, permitindo diferenciar as linhagens celulares estudadas. Dessa forma, a NB pode ser utilizada como marcador específico por meio do grupo ativo EGF, como na TFD como fotossensibilizador. As nanossondas forneceram um efeito de direcionamento na entrega potencial de drogas ao tumor, exibindo biocompatibilidade avaliada por análise de contagem de leucócitos. Essa análise mostrou regressão tumoral, devido

a danos teciduais causados pela TFD, como necrose e/ou apoptose. O dano tecidual e a regressão tumoral foram avaliados por análise histopatológica e RT-qPCR, que determinaram as alterações promovidas nos marcadores que regulam a regressão tumoral, mostrando aumento da expressão de fatores apoptóticos (Bax, Bcl-2, Caspase 3 e 8, SOD2, 14- 3-3 Sigma), no grupo tratado com NB+TFD apresentando maior envolvimento. Portanto, visando a necessidade de novas tecnologias contra o câncer de mama, estudamos um tratamento menos invasivo e com menos efeitos colaterais.

5 CONCLUSÃO GERAL

Esta tese teve por objetivo avaliar a ação antitumoral e toxicológica de NB na TFD em modelo animal, visando o desenvolvimento de um método inovador para o tratamento contra o câncer de mama. Os testes *in vitro* na linhagem normal foram determinantes para as aplicações *in vivo*, na qual foi avaliado a eficiência da terapia no acometimento do tecido adjacente utilizando as NB. Foi observado maior viabilidade celular determinando alta produção das espécies reativas de oxigênio, bem como o tipo de morte celular ocasionadas pela ação das NB.

Para os animais tratados com TFD associada às NB, observamos uma regressão tumoral em virtude de danos teciduais como a necrose e/ou apoptose, que foram avaliados pelas análises histopatológicas e foram realizadas análises quantitativas pela PCR em tempo real, determinando alterações promovidas nos marcadores que regulam a regressão do tumor. Os tumores gerados nos animais apresentam características morfológicas e a expressão das proteínas apoptóticas alteradas, sendo um resultado positivo para o estudo confirmando a expressão do fator tecidual, na qual foi significativamente maior no grupo NB, quando comparada ao grupo controle.

Neste trabalho evidenciamos a terapia, visando uma excelente biocompatibilidade e citotoxicidade, em apresentamos maior acometimento no tecido maligno, minimizando os efeitos colaterais ocasionados pela quimioterapia e radioterapia em tecido normal. Lembrando que a terapia também pode ser utilizada de forma conjunta, devido à complexidade desta doença.

REFERÊNCIAS

ABRAHAMSE, Heidi; HAMBLIN, Michael R. New photosensitizers for photodynamic therapy. **Biochemical Journal**, v. 473, n. 4, p. 347-364, 2016.

ACHARYA, S.; DILNAWAZ, F.; SAHOO, S. K. Targeted epidermal growth factor receptor nanoparticle bioconjugates for breast cancer therapy. **Biomaterials**, v. 30, n. 29, p. 5737-50, Oct 2009.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, A. **Guia para condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos**. GESEF, 2013.

AGOSTINIS, P. *et al*. Photodynamic therapy of cancer: an update. **CA Cancer J Clin**, v. 61, n. 4, p. 250-81, Jul-Aug 2011.

ALLISON, R. R. *et al.* Photosensitizers in clinical PDT. **Photodiagnosis Photodyn Ther**, v. 1, n. 1, p. 27-42, May 2004.

AMINA, Sundus Jabeen; GUO, Bin. A review on the synthesis and functionalization of gold nanoparticles as a drug delivery vehicle. **International Journal of Nanomedicine**, v. 15, p. 9823, 2020.

ANIDO, Judit *et al*. ZD1839, a specific epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitor, induces the formation of inactive EGFR/HER2 and EGFR/HER3 heterodimers and prevents heregulin signaling in HER2-overexpressing breast cancer cells. **Clinical Cancer Research**, v. 9, n. 4, p. 1274-1283, 2003.

BARTHOLOMEUSZ, C. *et al*. PEA-15 inhibits tumorigenesis in an MDA-MB-468 triple-negative breast cancer xenograft model through increased cytoplasmic localization of activated extracellular signal-regulated kinase. **Clinical Cancer Research**, v. 16, n. 6, p. 1802-1811, 2010.

BACAC, Marina; STAMENKOVIC, Ivan. Metastatic cancer cell. **Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis**., v. 3, p. 221-247, 2008.

BANERJEE, S. M. *et al*. Photodynamic therapy: Inception to application in breast cancer. The Breast, v. 31, p. 105-113, 2017.

BEHZADI, Shahed *et al*. Cellular uptake of nanoparticles: journey inside the cell. **Chemical Society Reviews**, v. 46, n. 14, p. 4218-4244, 2017

BENITO, Marta *et al*. Cooperative effect of 5-aminolevulinic acid and gold nanoparticles for photodynamic therapy of cancer. **journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 102, n. 8, p. 2760-2769, 2013.

BIRNBAUM, Daniel et al. Basal and luminal breast cancers: basic or luminous?. **International journal of oncology**, v. 25, n. 2, p. 249-258, 2004.

BROWN, J. Martin. The hypoxic cell: a target for selective cancer therapy—eighteenth Bruce F. Cain Memorial Award lecture. **Cancer research**, v. 59, n. 23, p. 5863-5870, 1999.

BUSKARD, Noel A.; WILSON, Brian C. (Ed.). **The Use of Photodynamic Therapy in Cancer**: Satellite Symposium: 62nd Annual Meeting. WB Saunders, 1994.

CALIXTO, Giovana Maria Fioramonti *et al*. Nanotechnology-based drug delivery systems for photodynamic therapy of cancer: a review. **Molecules**, v. 21, n. 3, p. 342, 2016.

CALVETE, M. J.; GOMES, A. T.; MOURA, N. M. Clorinas em Terapia Fotodinâmica–Síntese e aplicações. **Revista Virtual de Química**, v. 1, n. 2, p. 92-103, 2009.

CASALINI, Patrizia *et al*. Role of HER receptors family in development and differentiation. **Journal of cellular physiology**, v. 200, n. 3, p. 343-350, 2004.

CASTANO, A. P.; DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: part one-photosensitizers, photochemistry and cellular localization. **Photodiagnosis Photodyn Ther**, v. 1, n. 4, p. 279-93, Dec 2004.

CASTANO, Ana P.; DEMIDOVA, Tatiana N.; HAMBLIN, Michael R. Mechanisms in photodynamic therapy: part two—cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, v. 2, n. 1, p. 1-23, 2005

CASTILHO, M. L. **Nanossondas Bifuncionais Fotossensíveis para o Tratamento do Câncer de Mama**. 2016. Tese (Doutorado) - Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, 2016.

CHATTERJEE, D. K.; FONG, L. S.; ZHANG, Y. Nanoparticles in photodynamic therapy: an emerging paradigm. **Advanced drug delivery reviews**, v. 60, n. 15, p. 1627-1637, 2008.

CHEN, Danyang *et al*. Development of MOF “Armor-Plated” Phycocyanin and Synergistic Inhibition of Cellular Respiration for Hypoxic Photodynamic Therapy in Patient-Derived Xenograft Models. **Advanced Healthcare Materials**, v. 10, n. 3, p. 2001577, 2021.

CHENG, Y. *et al*. Addressing brain tumors with targeted gold nanoparticles: a new gold standard for hydrophobic drug delivery? **Small**, v. 7, n. 16, p. 2301-2306, 2011.

CHOI, Kyong-Hoon *et al*. Enhanced photodynamic anticancer activities of multifunctional magnetic nanoparticles (Fe3O4) conjugated with chlorin e6 and folic acid in prostate and breast cancer cells. **Nanomaterials**, v. 8, n. 9, p. 722, 2018.

CIRQUEIRA, M. B. *et al*. Subtipos moleculares do câncer de mama. **Femina**, v. 39, n. 10, 2011.

CREIGHTON, C. J. The molecular profile of luminal B breast cancer. **Biologics**, v. 6, p. 289-97, 2012.

CRISTEA, Simona; POLYAK, Kornelia. Dissecting the mammary gland one cell at a time. **Nature communications**, v. 9, n. 1, p. 2473, 2018.

ČUNDERLÍKOVÁ, Beata; GANGESKAR, Line; MOAN, Johan. Acid–base properties of chlorin e6: relation to cellular uptake. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 53, n. 1-3, p. 81-90, 1999.

DĄBROWSKI, Janusz M. Reactive oxygen species in photodynamic therapy: mechanisms of their generation and potentiation. In: Advances in inorganic chemistry. **Academic Press**, 2017. p. 343-394.

DAI, Xiaoshuo *et al*. Dihydroartemisinin: a potential natural anticancer drug. **International Journal of Biological Sciences**, v. 17, n. 2, p. 603, 2021.

DANIEL, Marie-Christine; ASTRUC, Didier. Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. **Chemical reviews**, v. 104, n. 1, p. 293-346, 2004.

DIMRI, Goberdhan; BAND, Hamid; BAND, Vimla. Mammary epithelial cell transformation: insights from cell culture and mouse models. **Breast Cancer Research**, v. 7, p. 1-9, 2005.

DOANE, T.; BURDA, C. Nanoparticle mediated non-covalent drug delivery. **Advanced drug delivery reviews**, v. 65, n. 5, p. 607-621, 2013.

DUMAY, Eliane et al. Technological aspects and potential applications of (ultra) high-pressure homogenisation. **Trends in Food Science & Technology**, v. 31, n. 1, p. 13-26, 2013.

DYKMAN, Lev; KHLEBTSOV, Nikolai. Gold nanoparticles in biomedical applications: recent advances and perspectives. **Chemical Society Reviews**, v. 41, n. 6, p. 2256-2282, 2012.

EALIA, S. Anu Mary; SARAVANAKUMAR, M. P. A review on the classification, characterisation, synthesis of nanoparticles and their application. **In: IOP Conference Series: Materials Science and Engineering**. IOP Publishing, 2017. p. 032019.

EARP, H. Shelton *et al*. Heterodimerization and functional interaction between EGF receptor family members: a new signaling paradigm with implications for breast cancer research. Breast cancer research and treatment, v. 35, p. 115-132, 1995.

EROLES, P. *et al*. Molecular biology in breast cancer: intrinsic subtypes and signaling pathways. **Cancer Treat Rev**, v. 38, n. 6, p. 698-707, Oct 2012.

ETHIRAJAN, M. *et al*. The role of porphyrin chemistry in tumor imaging and photodynamic therapy. **Chem Soc Rev**, v. 40, n. 1, p. 340-62, Jan 2011.

FAVORETTO, S. M.; SEABRA, D. I.; OLIVATO, M. C. M. Guia de Eutanásia Para Animais de Ensino e Pesquisa. **UNIFESP: São Paulo, Brazil**, p. 29-30, 2013.

FERREIRA, Lydia Masako; HOCHMAN, Bernardo; BARBOSA, Marcus Vinícius Jardini. Modelos experimentais em pesquisa. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 20, p. 28-34, 2005.

FISHER, Anita MR; MURPHREE, A. Linn; GOMER, Charles J. Clinical and preclinical photodynamic therapy. **Lasers in surgery and medicine**, v. 17, n. 1, p. 2-31, 1995.

FLYNN, John F.; WONG, Christina; WU, Joseph M. Anti-EGFR therapy: mechanism and advances in clinical efficacy in breast cancer. **Journal of oncology**, v. 2009, 2009.

FOUAD, Yousef Ahmed; AANEI, Carmen. Revisiting the hallmarks of cancer. **American journal of cancer research**, v. 7, n. 5, p. 1016, 2017.

FRÖHLICH, Eleonore. *et al.* The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles. **International journal of nanomedicine**, v. 7, p. 5577, 2012.

GAVRINA, A. I. *et al*. Photodynamic therapy of mouse tumor model using chlorin e6-polyvinyl alcohol complex, **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 178, 2018,

GHOSH, P. *et al*. Gold nanoparticles in delivery applications. **Advanced drug delivery reviews**, v. 60, n. 11, p. 1307-1315, 2008.

GONÇALVES JÚNIORR, Homero *et al*. Survival study of triple-negative and non–triple-negative breast cancer in a Brazilian cohort. **Clinical Medicine Insights: Oncology**, v. 12, p. 1179554918790563, 2018.

GROBMYER, S. R. *et al*. The promise of nanotechnology for solving clinical problems in breast cancer. **J Surg Oncol**, v. 103, n. 4, p. 317-25, Mar 15 2011.

GROSSMAN, Robert L. et al. Toward a shared vision for cancer genomic data. **New England Journal of Medicine**, v. 375, n. 12, p. 1109-1112, 2016.

HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**., v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.

HANG, Jiliang *et al*. Generation of singlet oxygen from fragmentation of monoactivated 1, 1-dihydroperoxides. **The Journal of organic chemistry**, v. 77, n. 3, p. 1233-1243, 2012.

HAYES, Daniel F. HER2 and breast cancer—a phenomenal success story. **New England Journal of Medicine**, v. 381, n. 13, p. 1284-1286, 2019.

HENDRY, Shona et al. Assessing tumor infiltrating lymphocytes in solid tumors: a practical review for pathologists and proposal for a standardized method from the International Immuno-Oncology Biomarkers Working Group: Part 2: TILs in melanoma, gastrointestinal tract carcinomas, non-small cell lung carcinoma and mesothelioma, endometrial and ovarian carcinomas, squamous cell carcinoma of the

head and neck, genitourinary carcinomas, and primary brain tumors. **Advances in anatomic pathology**, v. 24, n. 6, p. 311, 2017.

HERSCHKOWITZ, J. I. *et al*. Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. **Genome Biol**, v. 8, n. 5, p. R76, 2007.

HUANG, Z. A review of progress in clinical photodynamic therapy. **Technology in cancer research & treatment**, v. 4, n. 3, p. 283-293, 2005.

HUBENAK, Justin R. *et al*. Mechanisms of injury to normal tissue after radiotherapy: a review. **Plastic and reconstructive surgery**, v. 133, n. 1, p. 49e, 2014

HYNES, Nancy E.; LANE, Heidi A. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. **Nature Reviews Cancer**, v. 5, n. 5, p. 341-354, 2005.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). **Incidência do câncer**: estimativa 2018. INCA: [s.l.], 2018.

IVOŠEV, Vladimir *et al*. Uptake and excretion dynamics of gold nanoparticles in cancer cells and fibroblasts. **Nanotechnology**, v. 31, n. 13, p. 135102, 2020.

JAFFÉ, Hans H.; MILLER, Albert L. The fates of electronic excitation energy. **Journal of chemical education**, v. 43, n. 9, p. 469, 1966.

JEMAL, A. *et al*. Global cancer statistics. **CA Cancer J Clin**, v. 61, n. 2, p. 69-90, Mar-Apr 2011.

JEONG, H. *et al*. Photosensitizer-conjugated human serum albumin nanoparticles for effective photodynamic therapy. **Theranostics**, v. 1, p. 230-9, 2011.

JESUS, V. P. S. *et al*. Nanoparticles of methylene blue enhance photodynamic therapy. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, v. 23, p. 212-217, 2018.

KIEVIT, F. M.; ZHANG, M. Surface engineering of iron oxide nanoparticles for targeted cancer therapy. **Acc Chem Res**, v. 44, n. 10, p. 853-62, Oct 18 2011.

KUCINSKA, Malgorzata *et al*. Modeling the photodynamic effect in 2D versus 3D cell culture under normoxic and hypoxic conditions. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 162, p. 309-326, 2021.

KWIATKOWSKI, Stanisław *et al*. Photodynamic therapy–mechanisms, photosensitizers and combinations. **Biomedicine & pharmacotherapy**, v. 106, p. 1098-1107, 2018.

KWON, Keon Woo *et al*. Label-free, microfluidic separation and enrichment of human breast cancer cells by adhesion difference. **Lab on a Chip**, v. 7, n. 11, p. 1461-1468, 2007.

LEMMON, Mark A.; SCHLESSINGER, Joseph; FERGUSON, Kathryn M. The EGFR family: not so prototypical receptor tyrosine kinases. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 6, n. 4, p. a020768, 2014.

LI, Nanlin *et al*. Overexpression of 14-3-3θ promotes tumor metastasis and indicates poor prognosis in breast carcinoma. **Oncotarget**, v. 5, n. 1, p. 249, 2014.

LI, Fiona *et al.* Evaluation of 6-([18F] fluoroacetamido)-1-hexanoic-anilide (18F-FAHA) as imaging probe in tumor xenograft mice model. In: Medical Imaging 2016: Biomedical Applications in Molecular, Structural, and Functional Imaging. International **Society for Optics and Photonics**, 2 p. 978814, 2016.

LI, Xingshu *et al*. Activatable photosensitizers: agents for selective photodynamic therapy. **Advanced Functional Materials**, v. 27, n. 5, p. 1604053, 2017.

LIOTTA, L. A.; LEE, C. W.; MORAKIS, D. J. New method for preparing large surfaces of intact human basement membrane for tumor invasion studies. **Cancer letters**, v. 11, n. 2, p. 141-152, 1980.

LIU, Yamei *et al*. Water-insoluble photosensitizer nanocolloids stabilized by supramolecular interfacial assembly towards photodynamic therapy. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1-8, 2017.

LOPES, Gabriel Lima; VATTIMO, Edoardo Filippo de Queiroz; CASTRO JUNIOR, Gilberto de. Identifying activating mutations in the EGFR gene: prognostic and therapeutic implications in non-small cell lung cancer. **Jornal Brasileiro de pneumologia**, v. 41, p. 365-375, 2015.

LUCAS, L. J.; Claudio Tellez, C.; Castilho M.L.; Lee, C.L.D.; Hupman M.A.; Vieira, L.S.; Ferreira I.; Raniero L; and Hewitt K.C. Development of a sensitive, stable and EGFR-specific molecular imaging agent for surface enhanced Raman spectroscopy. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 46, n. 5, p. 434-446, 2015.

MECHE, A.; CIMPEAN, A. M.; RAICA, M. Immunohistochemical expression and significance of epidermal growth factor receptor (EGFR) in breast cancer. **Rom J Morphol Embryol**, v. 50, n. 2, p. 217-21, 2009.

MENDELSOHN, John; BASELGA, Jose. Epidermal growth factor receptor targeting in cancer. *In*: **Seminars in oncology**. WB Saunders, 2006. p. 369-385.

MEYERS, J. D. *et al*. Peptide-Targeted Gold Nanoparticles for Photodynamic Therapy of Brain Cancer. **Part Part Syst Charact**, v. 32, n. 4, p. 448-457, Apr 2015.

MINNELLI, Cristina *et al*. Conformational insight on WT-and mutated-EGFR receptor activation and inhibition by epigallocatechin-3-gallate: Over a rational basis for the design of selective non-small-cell lung anticancer agents**. International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 5, p. 1721, 2020.

MOHANTY, C. *et al*. Receptor mediated tumor targeting: an emerging approach for cancer therapy. **Curr Drug Deliv**, v. 8, n. 1, p. 45-58, Jan 2011.

NAGANO, Tatsuya; TACHIHARA, Motoko; NISHIMURA, Yoshihiro. Mechanism of resistance to epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitors and a potential treatment strategy. **Cells**, v. 7, n. 11, p. 212, 2018.

NAKAMARU-OGISO, Eiko *et al*. Novel biochemical manipulation of brain serotonin reveals a role of serotonin in the circadian rhythm of sleep–wake cycles. **European Journal of Neuroscience**, v. 35, n. 11, p. 1762-1770, 2012.

NETWORK, C. G. A. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, v. 490, n. 7418, p. 61-70, 2012.

NICHOLSON, R.I. *et al*. EGFR and cancer prognosis, **European Journal of Cancer** 37 p. S9–S15, 2001.

NIE, S. *et al.* Nanotechnology applications in cancer. **Annu Rev Biomed Eng**, v. 9, p. 257-88, 2007.

NORMANNO, Nicola *et al*. Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. **Gene**, v. 366, n. 1, p. 2-16, 2006.

OKAWA, Takaomi *et al*. The functional interplay between EGFR overexpression, hTERT activation, and p53 mutation in esophageal epithelial cells with activation of stromal fibroblasts induces tumor development, invasion, and differentiation. **Genes & Development** 21: p.2788–2803, 2007.

OHNO, Susumu *et al*. **Evolution by gene duplication**. Springer Science & Business Media, 2013.

PACIOTTI, Giulio F.; KINGSTON, David GI; TAMARKIN, Lawrence. Colloidal gold nanoparticles: a novel nanoparticle platform for developing multifunctional tumor-targeted drug delivery vectors. **Drug development research**, v. 67, n. 1, p. 47-54, 2006.

PAN, Yu *et al*. Size-dependent cytotoxicity of gold nanoparticles. **Small**, v. 3, n. 11, p. 1941-1949, 2007.

PARHI, P.; MOHANTY, C.; SAHOO, S. K. Nanotechnology-based combinational drug delivery: an emerging approach for cancer therapy. **Drug Discov Today**, v. 17, n. 17-18, p. 1044-52, Sep 2012.

PENNICA, Diane *et al*. Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. **Nature**, v. 312, n. 5996, p. 724-729, 1984.

PERUSSI, J. R. Inativação fotodinâmica de microrganismos. **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 988, 2007.

PLAETZER, Kristjan *et al*. Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects. Lasers in medical science, v. 24, p. 259-268, 2009.

RICHMOND, Ann; SU, Yingjun. Mouse xenograft models vs GEM models for human cancer therapeutics. **Dis Model Mech**., v. 1, n. 2-3, p. 78-82, 2008.

ROBERTSON, C. A.; EVANS, D. H.; ABRAHAMSE, H. Photodynamic therapy (PDT): a short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT. **J Photochem Photobiol B**, v. 96, n. 1, p. 1-8, Jul 17 2009.

ROENGVORAPHOJ, Monic *et al*. Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors as initial therapy for non-small cell lung cancer: focus on epidermal growth factor receptor mutation testing and mutation-positive patients. **Cancer treatment reviews**, v. 39, n. 8, p. 839-850, 2013.

ROFSTAD, E. K.; HALSØR, E. F. Hypoxia-associated spontaneous pulmonary metastasis in human melanoma xenografts: involvement of microvascular hot spots induced in hypoxic foci by interleukin 8. **British journal of cancer**, v. 86, n. 2, p. 301-308, 2002.

RUSSO, Jose; LYNCH, Henry; RUSSO, Irma H. Mammary gland architecture as a determining factor in the susceptibility of the human breast to cancer. **The breast journal**, v. 7, n. 5, p. 278-291, 2001.

SIMON, H. U.; HAJ-YEHIA, A.; LEVI-SCHAFFER, F. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction**. Apoptosis**, v. 5, p. 415-418, 2000.

SCHMID, Peter *et al*. Atezolizumab and nab-paclitaxel in advanced triple-negative breast cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 379, n. 22, p. 2108-2121, 2018.

SCHMIDT-ERFURTH, U. *et al*. Photodynamic targeting of human retinoblastoma cells using covalent low-density lipoprotein conjugates. **British journal of cancer**, v. 75, n. 1, p. 54-61, 1997.

SOARES, M. B. P.; PONTES-DE-CARVALHO, L. C.; SANTOS, R. T. Banco de Embriões de Camundongos Geneticamente Modificados. Uma estratégia para a preservação da diversidade genética em modelos experimentais murinos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 20, p. 50-53, maio/jun. 2001.

STUCHINSKAYA, T. *et al*. Targeted photodynamic therapy of breast cancer cells using antibody–phthalocyanine–gold nanoparticle conjugates. **Photochemical & photobiological sciences**, v. 10, n. 5, p. 822-831, 2011.

SUN, Wenqing *et al*. Enhancing deep convolutional neural network scheme for breast cancer diagnosis with unlabeled data. **Computerized Medical Imaging and Graphics**, v. 57, p. 4-9, 2017.

TURNER, N. C.; REIS-FILHO, J. S. Basal-like breast cancer and the BRCA1 phenotype. **Oncogene**, v. 25, n. 43, p. 5846-53, Sep 25 2006.

UENO, Tasuku; NAGANO, Tetsuo. Fluorescent probes for sensing and imaging. **Nature methods**, v. 8, n. 8, p. 642-645, 2011.

VIEIRA, L. *et al*. Synthesis and characterization of gold nanostructured Chorin e6 for Photodynamic Therapy. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, v. 18, p. 6-11, 2017.

VYAS, Dinesh *et al*. Epithelial apoptosis in mechanistically distinct methods of injury in the murine small intestine. **Histology and histopathology**, v. 22, n. 6, p. 623, 2007.

XIAO, H. *et al*. Photodynamic effects of chlorin e6 attached to single wall carbon nanotubes through noncovalent interactions. **Carbon**, v. 50, n. 4, p. 1681-1689, 2012.

WANG, Pan *et al.* Anti-metastatic and pro-apoptotic effects elicited by combination photodynamic therapy with sonodynamic therapy on breast cancer both in vitro and in vivo. **Ultrasonics sonochemistry**, v. 23, p. 116-127, 2015.

WILSON, Brian C. Photodynamic therapy for cancer: principles. **Canadian journal of gastroenterology**, v. 16, n. 6, p. 393-396, 2002.

WOODBURN, J. R. The epidermal growth factor receptor and its inhibition in cancer therapy. **Pharmacology & therapeutics**, v. 82, n. 2-3, p. 241-250, 1999.

WU, Dan *et al*. A two-dimensional molecular beacon for mRNA-activated intelligent cancer theranostics. **Chemical science**, v. 6, n. 7, p. 3839-3844, 2015.

YAZDI, Mohammad Hossein *et al*. The immunostimulatory effect of biogenic selenium nanoparticles on the 4T1 breast cancer model: an in vivo study. **Biological trace element research**, v. 149, p. 22-28, 2012.

YEWALE, Chetan et al. Epidermal growth factor receptor targeting in cancer: a review of trends and strategies. **Biomaterials**, v. 34, n. 34, p. 8690-8707, 2013.

YOON, Il; LI, Jia Zhu; SHIM, Young Key. Advance in photosensitizers and light delivery for photodynamic therapy. **Clinical endoscopy**, v. 46, n. 1, p. 7-23, 2013.

ZHAO, Shen *et al*. Clinicopathologic features and prognoses of different histologic types of triple-negative breast cancer: a large population-based analysis.**European Journal of Surgical Oncology**, v. 44, n. 4, p. 420-428, 2018.

ZONG, Wei-Xing; THOMPSON, Craig B. Necrotic death as a cell fate. **Genes & development**, v. 20, n. 1, p. 1-15, 2006.

APÊNDICE A – **RESUMOS APRESENTADOS EM CONFERÊNCIAS INTERNACIONAIS**

ENCONTRO DE OUTONO **2020**
SOCIEDADE BRASILEIRA DE FÍSICA

CERTIFICATE

The Organizing Committe hereby certifies that the work "THE BIOCOMPATIBILITY OF NANOCOMPOSITES FOR HARD TISSUE REPAIRING" by P. F. A. Vieira, V. P. S. Jesus, M. L. Castilho, L. Raniero was presented in the session MEDICAL PHYSICS I of the Encontro de Outono da SBF 2020, which took place in Online from November 23 to 27, 2020.

222-581-1

November 27, 2020

SBF
SOCIEDADE BRASILEIRA DE FÍSICA

Eduardo Granado
Coordenador de Programa

Cícero Rafael Cena
Coordenador Geral

XXIV INIC
XX EPG
III CONPAT
XI INIC Jr
X INID

SOCIEDADE EM REDE:
EDUCAÇÃO, PESQUISA E DESAFIOS NOS TEMPOS ATUAIS

21, 22 e 23 de outubro de 2020
Evento online
www.inicepg.univap.br

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho intitulado "AVALIAÇÃO DA BIOCOMPATIBILIDADE DO CACH ASSOCIADO A NANOPARTÍCULAS METÁLICAS" de autoria de Paula Fonseca Antunes Vieira, Viviane Paula dos Santos Jesus, Ivone Regina de Oliveira, Andrea Fernanda Lopes e Leandro Raniero, foi apresentado no XXIV Encontro Latino Americano de Iniciação Científica (XXIV INIC), realizado na Universidade do Vale do Paraíba, nos dias 21, 22 e 23 de outubro de 2020.

São José dos Campos, 23 de outubro de 2020.

Prof. Dr. Leandro José Raniero
Pró-reitor de Pós-graduação e Pesquisa

Parceiros: CNPq FAPESP CAPES UniVap Realização: UniVap FUNDAÇÃO VALEPARAIBANA DE ENSINO

XXIV INIC
XX EPG
III CONPAT
XIV INIC Jr
X INID
SOCIEDADE EM REDE:
EDUCAÇÃO, PESQUISA E DESAFIOS NOS TEMPOS ATUAIS
21, 22 e 23 de outubro de 2020
Evento online
www.inicepg.univap.br
CERTIFICADO
Certificamos que o trabalho intitulado "NANOMARCADORES PARA DIAGNÓSTICO DE MUTAÇÕES CELULARES ASSOCIADAS AO GENE EGFR" de autoria de Paula Fonseca Antunes Vieira, Viviane Paula dos Santos Jesus, Maiara Lima Castilho e Leandro Raniero, foi apresentado no XXIV Encontro Latino Americano de Iniciação Científica (XXIV INIC), realizado na Universidade do Vale do Paraíba, nos dias 21, 22 e 23 de outubro de 2020.
São José dos Campos, 23 de outubro de 2020.
Prof. Dr. Leandro José Raniero
Pró-reitor de Pós-graduação e Pesquisa
Parceiros:
Realização:

ICONNANO
2021 ONLINE
CERTIFICATE
POSTER PRESENTATION
We certify that the scientific paper entitled "In Vitro Mtt Assay Of Magnetic Nanoparticles Negatively Charged By Surfactant", authored by Viviane Paula Dos Santos Jesus, Nathanne Cristina Vilela Rost, Paula Fonseca Antunes Vieira, Maiara L. Castilho, Leandro Raniero, was presented as a poster, at the Second International Conference of Nanoscience and Nanobiotechnology, which took place virtually on May, 26th - 28th, 2021.
May 28th, 2021.
Ricardo Bentes de Azevedo
Chairman of the Organizing Committee

ICONNANO

2021 ONLINE

CERTIFICATE

POSTER PRESENTATION

We certify that the scientific paper entitled **"Calcium Aluminate Cement Associated to Metallicnanoparticles as Bone Repairing Potential"**, authored by **Paula F. A. Vieira, Viviane P. dos S. Jesus, Ivone R. Oliveira, Andrea F. Lopes, Maiara L. Castilho, Leandro Raniero**, was presented as a poster, at the Second International Conference of Nanoscience and Nanobiotechnology, which took place virtually on May, 26th - 28th, 2021.

May 28th, 2021.

Ricardo Bentes de Azevedo

Chairman of the Organizing Committee

5TH EDITION OF NANOTECHNOLOGY, NANOMEDICINE & OPTICS PHOTONICS HYBRID CONFERENCE

OCTOBER 06-07 2022
PARIS, FRANCE

Analysis of the diagnostic potential of nanosensors in breast cancer 3D tumor

Paula Fonseca Antunes Vieira[1*], Viviane Paula dos Santos Jesus[1], Marcela Aparecida Cândido[1] and Leandro Raniero[2]

[1]Vale do Paraíba University, Brazil

[2]Research Professor and currently Research Dean at Vale do Paraíba University, Brazil

Over expression of the Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) has been associated with malignancies with a worse prognosis, and the EGF protein activates its signaling pathways, which regulate cellular functions. As a result, the EGFR receptor is being investigated for a wide range of tumor diagnostics, encouraging the development of novel methods to improve quality and efficiency. Nanomaterials can recognize cancer cells by targeting certain biochemical pathways, highlighting nanomedicine's potential. Three-dimensional (3D) cell culture has arisen as an alternative to in vivo experiments for the formation of a heterogeneous microenvironment and the representativeness of the cellular mechanisms present in malignancies. Cell-cell and cell-extracellular matrix interaction is enhanced in 3D cell culture, preserving tissue shape and structure. In this regard, among the several types of 3D environment development that are conceivable, micro molded agarose allows large-scale reproducibility. In this study, breast cancer spheroids were created on micro molded agarose by the MDA-MB-468 strain. By functionalizing the EGF protein and Chlorine e6 (Ce6) in gold nanoparticles, the nanosensors were synthesized and applied to the spheroids for the detection of EGFR. The EGF protein is delivered to the EGFR receptor through active targeting, and Ce6 serves as a fluorescent flag molecule. The tumors were cultivated for 21 days after being cast in 2% agarose molds. Flow cytometry was used to detect the presence of fluorescence and the cell death pathways after the nanosensors were applied. Annexin V (AnnV) and propidium iodide (PI) staining were used to assess cell death pathways in viable (AnnV- PI-), apoptotic (AnnV+ PI-), and necrotic (AnnV+ PI+) cells. The characterization of this tissue reveal the presence of fluorescence and the absence of substantial apoptosis and necrosis deaths.

APÊNDICE C – RESUMOS APRESENTADOS EM CONFERÊNCIAS NACIONAIS

18º Congresso Saúde e Qualidade de Vida do Cone Leste Paulista
Qualivitae

os desafios do ENVELHECIMENTO Saudável

Certificamos que PAULA FONSECA ANTUNES VIEIRA, VIVIANE PAULA DOS SANTOS JESUS com o orientador LEANDRO RANIERO apresentaram o trabalho "AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MITOCONDRIAL DE LINHAGENS CELULARES COM MUTAÇÕES ASSOCIADAS AO GENE EGFR APÓS APLICAÇÃO DE NANOMARCADORES POTENCIALMENTE DIAGNÓSTICOS" no 18° Congresso de Saúde e Qualidade de Vida do Cone Leste Paulista realizado na Universidade do Vale do Paraíba, entre os dias 01 e 04 de Setembro de 2020.

São José dos Campos, 04 de Setembro de 2020.

Profª. Drª. Emília Angela Lo Schiavo Arisawa
Presidente Qualivitae 2020

FCS FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE *Excelência no Cuidar*

UniVap Universidade do Vale do Paraíba

Verifique o código de autenticidade **2613226.0319125.5.8.317553971015446** em https://www.even3.com.br//documentos

II CONGRESSO DIGITAL DE NANOBIOTECNOLOGIA E BIOENGENHARIA

CERTIFICADO

Certificamos que **Viviane Paula dos Santos Jesus** participou do minicurso **OrtogOnBlender Básico**, com carga horária de 2 horas, no **II Congresso Digital de Nanobiotecnologia e Bioengenharia** (II CDNB) organizado pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e pelas *startups* Bioprint3D e CyclePrint3D no período de 01 a 04 de junho de 2021.

Luciano Paulino da Silva
Coordenador do II CDNB
Pesquisador Embrapa

Beatriz Santos Carvalho
Vice Coordenadora do II CDNB
CEO Bioprint3D e CyclePrint3D

Embrapa · Grupo NanoBiotec · CP3D · Bioprint3D