

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

Mariela Inês Batista dos Santos

ANÁLISE DE GLICOPROTEÍNAS DE SUPERFÍCIE E MATRIZ EXTRACELULAR EM
ESFEROIDES DE CÉLULAS TUMORAIS DE MAMA MCF-7 APÓS TERAPIA
FOTODINÂMICA

ANALYSIS OF SURFACE GLYCOPROTEINS AND EXTRACELLULAR MATRIX IN
MCF-7 BREAST TUMOR CELL SPHEROIDS AFTER PHOTODYNAMIC THERAPY

São José dos Campos, SP
2025

Mariela Inês Batista dos Santos

ANÁLISE DE GLICOPROTEÍNAS DE SUPERFÍCIE E MATRIZ EXTRACELULAR EM
ESFEROIDES DE CÉLULAS TUMORAIS DE MAMA MCF-7 APÓS TERAPIA
FOTODINÂMICA

Dissertação de Mestrado 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 Mestre em Engenharia Biomédica.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Cristina Pacheco Soares

São José dos Campos, SP
2025

TERMO DE AUTORIZAÇÃO DE DIVULGAÇÃO DA OBRA

Ficha catalográfica

Santos, Mariela Inês Batista dos

Análise de glicoproteínas de superfície e matriz extracelular em esferoides de células tumorais de mama MCF-7 após terapia fotodinâmica / Mariela Inês Batista dos Santos; orientadora, Pacheco Soares Cristina. - São José dos Campos, SP, 2025.

1 CD-ROM, 45 p.

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

Inclui referências

1. Engenharia Biomédica. 2. Cancer. 3. Fotoquimioterapia. 4. Linhagem Celular Tumoral. I. Cristina, Pacheco Soares, orient. II. Universidade do Vale do Paraíba. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica. III. Título.

Eu, Mariela Inês Batista dos Santos, 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, 11 de Março de 2025.


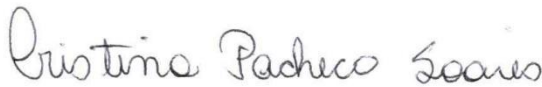

Mariela I. B. Santos

Autor(a) da Obra

Data da defesa: 04 / 02 / 2025

MARIELA INÊS BATISTA DOS SANTOS

Dissertação aprovada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre, 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 Juliana Ferreira Strixino	
Prof. ^a Dr. ^a Cristina Pacheco Soares	
Prof. ^a Dr. ^a Juliana Campos Junqueira - UNESP	

Prof.^a Dr.^a Juliana Ferreira Strixino

Diretora do IP&D – Univap

São José dos Campos, 04 de fevereiro de 2025.

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus pais, Romeu e Joelma, que sempre se empenharam a me oferecer o melhor estudo, as melhores oportunidades de vida e sempre me incentivaram a continuar obtendo conhecimento. Ao meu irmão que sempre falou pra Deus e o mundo que sua irmã faz mestrado na UNIVAP e nunca me deixou esquecer de onde viemos e de onde estamos chegando. Ao Theo e ao Mimo, meus cachorrinhos que me trazem alegria diária quando saio e quando chego em casa após algum dia de laboratório, com seus pulinhos e lambidas de alegria me fizeram mais feliz.

Aos meus amigos que estiveram nos momentos mais difíceis e felizes dessa jornada fazendo com que o caminho ficasse mais leve e divertido, as minhas amigas de laboratório que sempre fizeram o melhor para garantir que tudo estivesse dentro das conformidades e que nunca me deixaram baquear entre experimentos contaminados, resultados insatisfatórios e momentos de introspecção.

Agradeço minha orientadora que sempre acreditou no meu potencial e nunca jamais em hipótese alguma me deixou na mão, eu diria que a Cris foi como uma mãe desde agosto de 2019 onde iniciei minha caminhada científica, ao professor Newton que lecionava cursos e dava dicas preciosas para a realização de trabalhos e metodologias.

Agradeço também a tia Ana que todos os dias me concedeu a honra de ouvir suas experiências, histórias e muitos causos de nossas vidas, por sempre deixar o nosso espaço impecável na limpeza e organização.

Ademais agradeço a mim mesma por cumprir com meu propósito de vida, por sempre dar o meu melhor e ensinar as pessoas a minha volta, agradeço pela vida e pela oportunidade de estudar e cumprir com minhas responsabilidades dentro e fora do instituto.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a instituição por me conceder a honra de ser aluna desde 2005, passando pelo aprendizado infantil, fundamental, médio, superior e a pós-graduação.

Agradeço aos professores que me concederam conhecimento para que pudesse realizar meu projeto e evidenciar a importância da pesquisa.

“Só vive o propósito quem suporta o processo”

Marcos Cruz Santos

RESUMO

O câncer de mama é a forma mais comum de câncer entre as mulheres em todo o mundo. Estima-se que haja milhões de casos diagnosticados a cada ano, com um número significativo de mortes relacionadas à doença. No Brasil, o câncer de mama é o segundo mais diagnosticado, ficando atrás apenas do câncer de pele. A incidência é maior em mulheres entre 40 e 60 anos, mas também pode ocorrer em homens, embora em uma proporção muito menor. O diagnóstico precoce é essencial para melhorar as taxas de sobrevivência e oferecer tratamentos menos invasivos. A terapia fotodinâmica (TFD) é uma abordagem terapêutica promissora no tratamento do câncer de mama, esta técnica se baseia na utilização de uma substância fotossensibilizante e uma fonte de luz que gera espécies reativas de oxigênio causando danos permanentes aos compartimentos celulares. Os objetivos do trabalho se baseiam em analisar os efeitos da terapia fotodinâmica em marcadores de células epiteliais e na fisiologia de esferoides de células tumorais de mama MCF-7 e na linhagem não tumoral MCF-10A, além de estabelecer uma metodologia para o cultivo tridimensional de células. Utilizou-se linhagens celulares de câncer de mama (MCF-7), células de tecido mamário saudável (MCF-10A) e linhagem de macrófagos (RAW-264.7). Para a TFD foi utilizado a Alumínio Ftalocianina Tetrasulfonada (ALPcS₄) na concentração de 5 μM . mL⁻¹, com tempo de incubação de 1 h em estufa ao abrigo da luz, o tempo de irradiação foi de 1 minuto e 45 segundos no comprimento de onda de 660 nm. Para os testes foram feitos ensaios de taxa de atividade metabólica (MTT), ensaios de glicosilação para determinar a presença de glicoproteínas como manosamina, galactosamina e glucosamina, além de glicoproteínas de matriz extracelular como laminina e fibronectina. Testes de interação celular entre células e macrófagos, fotografias por microscópio eletrônico de varredura (MEV) e marcação de atividade nuclear e mitocondrial por microscopia confocal. Os resultados demonstram a efetividade da TFD nas células de câncer de mama, no qual a morte celular foi detectada em todos os testes feitos, os resultados foram obtidos por meios quantitativos pelo MTT e qualitativos pelas fotografias feitas em microscopia de fluorescência, confocal e de varredura. Conclui-se que as análises pós TFD dos marcadores celulares demonstraram a significativa redução da atividade de células de câncer. Sendo assim, a TFD é eficaz para a redução da população celular cancerígena.

Palavras-chave: câncer de mama; microscopia; fluorescência; glicoproteínas.

ABSTRACT

Breast cancer is the most common form of cancer among women worldwide. It is estimated that millions of cases are diagnosed each year, with a significant number of deaths related to the disease. In Brazil, breast cancer is the second most diagnosed, behind only skin cancer. The incidence is higher in women between the ages of 40 and 60, but it can also occur in men, although at a much lower rate. Early diagnosis is essential to improve survival rates and offer less invasive treatments. Photodynamic therapy (PDT) is a promising therapeutic approach in the treatment of breast cancer. This technique relies on the use of a photosensitizing substance and a light source that generates reactive oxygen species, causing permanent damage to cellular compartments. The objectives of this work are based on analyzing the effects of photodynamic therapy on markers of epithelial cells and the physiology of MCF-7 breast tumor cell spheroids and the non-tumor MCF-10A cell line, as well as establishing a methodology for the three-dimensional cultivation of cells. Breast cancer cell lines (MCF-7), healthy mammary tissue cells (MCF-10A), and macrophage cell lines (RAW-264.7) were used. For PDT, Aluminum Phthalocyanine Tetrasulfonate (AlPcS₄) was used at a concentration of 5 μM . mL^{-1} , with an incubation time of 1 hour in a light-protected incubator. The irradiation time was 1 minute and 45 seconds at a wavelength of 660 nm. For the tests, metabolic activity rate assays (MTT), glycosylation assays to determine the presence of glycoproteins such as mannose, galactosamine, and glucosamine, as well as extracellular matrix glycoproteins such as laminin and fibronectin, were performed. Cellular interaction tests between cells and macrophages, scanning electron microscopy (SEM) imaging, and nuclear and mitochondrial activity labeling by confocal microscopy were conducted. The results demonstrate the effectiveness of PDT in breast cancer cells, where cell death was detected in all tests performed. The results were obtained quantitatively through MTT assays and qualitatively through images taken with fluorescence, confocal, and scanning electron microscopy. It is concluded that the post-PDT analyses of cellular markers showed a significant reduction in cancer cell activity. Thus, PDT is effective for reducing the cancer cell population.

Keywords: breast cancer; microscopy; fluorescence; glycoproteins.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Avaliação da atividade mitocondrial MCF-7 após 24h	25
Figura 2: Avaliação da atividade mitocondrial MCF-10A após 24h.....	26
Figura 3: Teste de detecção de fluorescência de glicoproteínas em células MCF-10A	28
Figura 4: Teste de detecção de fluorescência de glicoproteínas em células MCF-7.....	30
Figura 5: Teste de detecção de fibronectina e laminina em esferoides de MCF-10A.....	32
Figura 6: Teste de detecção de fibronectina e laminina em esferoides de MCF-7.....	33
Figura 7: Marcação de fluorescência de núcleo e mitocôndrias para os esferoides da MCF-7 em interação com macrófagos	34
Figura 8: Marcação de fluorescência de núcleo e mitocôndrias para os esferoides da MCF-10A em interação com macrófagos.....	35
Figura 9: Microscopia eletrônica de varredura da linhagem MCF-7	37
Figura 10: Microscopia eletrônica de varredura da linhagem MCF-10A	38
Figura 11: Microscopia eletrônica de varredura da linhagem MCF-7	39
Figura 12: Microscopia eletrônica de varredura da linhagem MCF-10A	41
Figura 13: Marcação de fluorescência de núcleo e mitocôndrias para os esferoides da MCF- 10A.....	43
Figura 14: Figura 14: Marcação de fluorescência de núcleo e mitocôndrias para os esferoides da MCF7	43

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
2	OBJETIVOS	12
2.1	OBJETIVOS GERAIS	12
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	12
3	REVISÃO SOBRE O TEMA	13
3.1	CÂNCER DE MAMA	13
3.2	TRATAMENTOS CONVENCIONAIS	15
3.3	TERAPIA FOTODINÂMICA.....	15
3.4	LINHAGEM CELULAR MCF-7	17
4	METODOLOGIA.....	19
4.1	LINHAGENS CELULARES.....	19
4.1.2	<i>Molde de Agarose.....</i>	<i>19</i>
4.2	<i>TERAPIA FOTODINÂMICA (TFD) E IRRADIAÇÃO</i>	<i>19</i>
4.3	PLAQUEAMENTO E MANUTENÇÃO CELULAR.....	20
4.3 T	ESTE DE ATIVIDADE METABÓLICA (MTT).....	20
4.4	GLICOPROTEÍNAS DE SUPERFÍCIE.....	21
4.4.1	<i>Click-it® GalNaz, Click-it® ManNaz, Click-it® GlcNaz.....</i>	<i>21</i>
4.5	FORMAÇÕES DE MATRIZ EXTRACELULAR (MEC).....	22
4.5.1	<i>Laminina</i>	<i>22</i>
4.5.2	<i>Fibronectina.....</i>	<i>22</i>
4.6	INTERAÇÕES DAS CÉLULAS COM MACRÓFAGO.....	23
4.7	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....	23
4.8	MARCAÇÃO DE FLUORESCÊNCIA NUCLEAR E MITOCONDRIAL DOS ESFEROIDES.....	23
4.9	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	24
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
5.1	TESTE DE ATIVIDADE METABÓLICA (MTT).....	25
5.2	GLICOPROTEÍNAS DE SUPERFÍCIE.....	27
5.3	FORMAÇÃO DE MATRIZ EXTRACELULAR (MEC).....	31
5.4	INTERAÇÃO COM MACRÓFAGO	34
5.4.1	<i>Monocamada.....</i>	<i>34</i>
5.5	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....	36
5.5.1	<i>Monocamada (2D).....</i>	<i>36</i>
5.5.2	<i>Cultura Tridimensional (3D).....</i>	<i>39</i>
5.6	MARCAÇÃO DO NÚCLEO (DAPI) E MITOCÔNDRIAS (TMRM).....	41
6	CONCLUSÃO.....	45
	REFERÊNCIAS.....	46

1 INTRODUÇÃO

O câncer de mama é o segundo mais diagnosticado em território nacional, ficando atrás apenas do câncer de pele que é o mais incidente nas estatísticas atuais. Compreende-se como câncer as alterações genéticas e morfofuncionais que modificam o funcionamento de células saudáveis a ponto de realizar infiltrações nos tecidos, formação de tumor, criação de novos vasos sanguíneos para irrigação local e alterações fisiológicas locais e sistêmicas (De Santis *et al.*, 2011).

O câncer de mama está presente principalmente em indivíduos do sexo feminino, com faixa etária entre 40 e 60 anos, sem distinção de raça ou etnia. Apesar de ser expresso predominantemente em mulheres também se apresenta em indivíduos do sexo masculino apresentando uma taxa de aproximadamente 1% de todos os diagnósticos feitos. Segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA) em 2020 a taxa de mortalidade por essa doença era de 9,4 casos a cada 100 mil habitantes e em 2022 a taxa foi quase o dobro apresentando 17,5 casos a cada 100 mil habitantes (Oliveira *et al.*, 2022).

Por essa expectativa os tratamentos convencionais como quimioterapia, radioterapia e cirurgias de retiradas altamente invasivas abriram caminhos e despertaram o interesse por novos métodos de tratamento, a busca pela melhora da qualidade de vida e aderência ao tratamento para o câncer, se fez por meio de buscas na ciência por alternativas aos métodos tradicionais, abrindo-se oportunidades para a implementação da terapia fotodinâmica como alternativa as tradicionais formas de tratamento disponíveis nos sistemas de saúde (Oliveira *et al.*, 2022)

A terapia fotodinâmica (TFD) ganhou grande destaque no início do século XX, mas só nos últimos 20 anos passou a ser amplamente utilizada na prática clínica (Kharkwal *et al.*, 2011; Allison, 2014). Ela se baseia na fotobiologia e usa luz para ativar uma reação que ataca células, tecidos ou órgãos específicos. Para que essa reação aconteça, são necessários três componentes: oxigênio, um fotossensibilizante e uma fonte de luz (Agostinis *et al.*, 2011).

Os fármacos fotossensíveis reagem quando expostos a determinados comprimentos de onda de luz, o que faz com que seus elétrons se energizem e saltem para níveis mais altos. Quando esses elétrons voltam ao estado normal, eles transferem energia para o que está ao seu redor. Esse processo, descrito por Jablonski em 1933, ainda é uma referência importante na biofotônica (Jablonski, 1933; Castano; Demidova; Hamblin, 2004).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Analisar os efeitos da terapia fotodinâmica em marcadores de células epiteliais e na fisiologia de esferoides de células tumorais de mama MCF-7 e na linhagem não tumoral MCF-10A, visando contribuir para o aprimoramento de estratégias terapêuticas contra o câncer de mama.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar o impacto da terapia fotodinâmica na viabilidade de células MCF-7 e MCF-10-A:
 - MTT (Atividade metabólica);
 - Imunofluorescência de esferoides (microscopia confocal).

- Analisar as vias de glicosilação envolvidas nas alterações observadas em células MCF-7 e MCF- 10A pós-TFD por meio de:
 - Marcação e detecção de glicoproteínas como galactosamina, manosamina e glucosamina em células MCF-7 e MCF-10A após TFD por microscopia confocal.

3 REVISÃO SOBRE O TEMA

3.1 CÂNCER DE MAMA

O câncer de mama continua sendo o câncer mais comum entre as mulheres em todo o mundo (De Santis *et al.*, 2011). De acordo com o GLOBOCAN de 2018, aproximadamente 2,1 milhões de casos em todo o mundo foram diagnosticados com câncer de mama e cerca de 630.000 morreram em decorrência da doença (Bray *et al.*, 2018). O câncer de mama no Brasil e no mundo é um dos mais comuns diagnosticados, de acordo com o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) a taxa de incidência na população feminina entre 40 e 60 anos (Santos *et al.*, 2022).

De acordo com dados divulgados pelo Instituto Nacional de Câncer (INCA), são esperados 704 mil casos novos de neoplasias malignas no Brasil para cada ano no triênio 2023-2025, com destaque para as regiões Sul e Sudeste, que concentram cerca de 70% da incidência. No país, o tumor maligno predominante é o de pele não melanoma (31,3% do total de casos), seguido por mama (10,5%), próstata (10,2%), cólon e reto (6,5%), pulmão (4,6%) e estômago (3,1%) (Santos *et al.*, 2022).

Apesar da maior taxa de incidência ser em mulheres, adultas, com faixa etária entre 40 e 60 anos, sem discriminação de cor ou raça, na população masculina há relatos de casos, compreendendo aproximadamente 1% de todos os diagnósticos. O diagnóstico precoce prevê uma taxa de sobrevivência e de tratamentos eficientes não invasivos e prejudiciais à qualidade de vida do paciente (Oliveira, 2022).

No Brasil, é o segundo câncer mais diagnosticado, ficando atrás apenas do câncer de pele, há intervenção governamental para o combate e o incentivo da realização de exames anuais para a população feminina e masculina, a realização do autoexame é incentivada por órgãos públicos, redes sociais e mídias como televisão e rádios. Com o desenvolvimento da tecnologia facilidade e precocidade no diagnóstico da doença tem sido observado, entretanto, o acesso da população de baixa renda, a consultas periódicas e exames anuais como a mamografia na rede pública de saúde é deficitária, uma vez que há alta demanda, lentidão para disponibilização de vaga para consulta e insumos para a realização de tal (Soares *et al.*, 2022).

O câncer de mama é classificado em três subtipos principais com base na presença

ou ausência de marcadores moleculares: receptor hormonal positivo/ERBB2 negativo (70% dos casos), ERBB2 positivo (15%-20%) e triplo-negativo (15%). A maioria dos casos de câncer de mama não apresenta metástase no momento do diagnóstico, e o tratamento visa eliminar o tumor e prevenir a recorrência.

3.2 TRATAMENTOS CONVENCIONAIS

A terapia sistêmica para o câncer de mama não metastático varia de acordo com o subtipo: pacientes com tumores positivos para receptores hormonais recebem terapia endócrina, com uma minoria também recebendo quimioterapia; pacientes com tumores positivos para ERBB2 recebem terapia com anticorpos direcionados ao ERBB2 ou inibidores de pequenas moléculas combinados com quimioterapia; e pacientes com tumores triplo-negativos recebem apenas quimioterapia. O tratamento do câncer de mama metastático é individualizado de acordo com o subtipo, com o objetivo de prolongar a vida e aliviar os sintomas. A sobrevida média para câncer de mama triplo-negativo metastático é de cerca de 2 anos, em comparação com aproximadamente 1 ano para os outros subtipos (Waks; Winer, 2019).

Terapias alternativas vêm sendo a aposta das novas formas de tratar e promover saúde; dentre estas destaca-se a terapia fotodinâmica (TFD) cuja abordagem terapêutica utiliza um fotossensibilizador (FS) e uma fonte de luz, que ao interagir com o FS gera espécies reativas de oxigênio (ERO), em contato com compartimentos celulares como membrana plasmática, núcleo, mitocôndrias e demais organelas ocasionam danos celulares irreversíveis e irreparáveis induzindo o processo de morte celular por apoptose, necrose e autofagia (Waks; Winer, 2019).

3.3 TERAPIA FOTODINÂMICA

A utilização de TFD vem trazendo diversos avanços no tratamento de doenças conhecidas há séculos pela humanidade, auxilia na cicatrização, devido a biomodulação de tecidos, induz a morte celular de células tumorais, combate a formação de biofilme bacteriano, aplicação na Leishmaniose, entre outras, além do baixo custo e excelente resultado naquilo que lhe é proposto. (Elżbieta; Bartusik-Aebisher, 2021).

A Terapia Fotodinâmica (TFD) é um tratamento local que utiliza luz de comprimento de onda específico para ativar substâncias sensíveis à luz, chamadas fotossensibilizadores, no tecido tumoral. Esse processo pode causar a morte do tecido, por esse motivo, a TFD é indicada principalmente para o tratamento de tumores pequenos e superficiais (Elżbieta; Bartusik-Aebisher, 2021).

A TFD pode ser usada como tratamento primário para tumores localizados, especialmente quando são de pequeno porte. Também pode ser combinada com cirurgia convencional ou quimioterapia para eliminar resíduos em tumores maiores, sendo utilizada como um tratamento paliativo. Isso é possível graças à tecnologia de fibra óptica, que permite direcionar a luz com o comprimento de onda e a intensidade desejado para tumores localizados em diferentes partes do corpo. Dessa forma, é possível tratar especificamente o câncer sem prejudicar os tecidos normais ao redor da área tratada (Elżbieta; Bartusik-Aebisher, 2021).

A TFD requer três componentes principais: um fotossensibilizador que se acumula no tecido tumoral, tornando-o sensível à luz, uma fonte de luz com o comprimento de onda apropriado para ativar o fotossensibilizador, e a presença de oxigênio molecular. (Ribeiro *et al.*, 2020)

A terapia fotodinâmica, explicada pelo diagrama de Jablonski, funciona como uma espécie de reação em cadeia iniciada pela luz. Tudo começa com a aplicação de um fotossensibilizador, uma substância que tem a capacidade de absorver luz e transferir essa energia. Quando essa substância é exposta a um feixe de luz com o comprimento de onda certo, ela passa de um estado de baixa energia (chamado de estado fundamental) para um estado mais energético e instável, conhecido como estado excitado singlete (Aquino Junior; Carbinatto; Bagnato, 2023).

Como esse estado não dura muito, a molécula precisa liberar essa energia de alguma forma. Uma das maneiras é retornar diretamente ao estado original, emitindo fluorescência. Mas há outra possibilidade: a molécula pode passar para um estado chamado tripleto, que é mais duradouro e permite interações com o oxigênio ao seu redor. Quando isso acontece, ocorre um fenômeno essencial para o efeito terapêutico da TFD: a transferência de energia para as moléculas de oxigênio presentes nas células. Essa interação transforma o oxigênio em uma forma altamente reativa, chamada oxigênio singlete, que é capaz de atacar e danificar

componentes importantes das células, como membranas, proteínas e até mesmo o DNA (Aquino Junior; Carbinatto; Bagnato, 2023).

Esse processo gera um estresse oxidativo intenso, levando as células afetadas à morte. Dependendo da intensidade do dano e do tipo de célula, isso pode acontecer por apoptose (morte celular programada), necrose (quando a célula morre de forma descontrolada) ou autofagia (um processo em que a própria célula começa a se degradar). Esse mecanismo faz com que a terapia fotodinâmica seja uma ferramenta poderosa no tratamento de tumores, infecções e outras doenças, pois permite direcionar a destruição de células indesejadas de maneira precisa e minimamente invasiva (Aquino Junior; Carbinatto, Bagnato, 2023).

Existem diferentes fontes de luz artificial que podem ser utilizadas, como lâmpadas com filtros, diodos, arranjos de diodos LED/SLED luminescentes e superluminescentes, além de vários tipos de lasers. Essas fontes de luz são selecionadas de acordo com as características do fotossensibilizador e do tumor a ser tratado (Kim; Darafsheh, 2020).

Uma aplicação importante da terapia fotodinâmica é no tratamento de células cancerígenas em esferoides tridimensionais.

3.4 LINHAGEM CELULAR MCF-7

Um exemplo de células frequentemente utilizadas em estudos de terapia fotodinâmica são as células MCF-7. Ela é uma linhagem celular derivada de um carcinoma de mama humano, amplamente utilizada como modelo de câncer de mama em pesquisas, incluindo aquelas relacionadas ao anticancerígeno (Baguley; Leung, 2011).

As células MCF-7 são adequadas para estudos de resistência à terapia anti-hormônio, uma vez que são facilmente cultivadas e retêm a expressão de ER quando tratadas com essa terapia direcionada. (Sweeney *et al.*, 2013).

Os esferoides da linhagem MCF-7 são descritos como uma massa de células com núcleos desorganizados, forte interação célula-célula e ausência de formação de lúmen. Diferentes processos de morte celular ocorrem principalmente na região medular. Como muitos processos de morte celular além da necrose foram observados, sugere-se que a ‘região de morte celular’ seja um termo mais apropriado do que o ‘núcleo necrótico’. No entanto, a depuração celular gradual na região de morte celular nesses esferoides culmina em uma monocamada cortical polarizada (Sweeney *et al.*, 2013).

Durante a progressão dos tumores, há um reconhecimento do papel crucial desempenhado pela transição de um fenótipo epitelial para um mesenquimal na invasão e metástase das células tumorais. Essa transição é caracterizada pela aquisição de capacidade invasiva e migração para a corrente sanguínea por células anteriormente epiteliais, que então se tornam células mesenquimais. Esse processo é conhecido como transição epitelial-mesenquimal (TEM). Depois disso, as células passam por uma transição mesenquimal-epitelial (TME) para voltar ao seu fenótipo epitelial e colonizar um novo órgão. Além disso, as alterações metabólicas desempenham um papel significativo em todos os estágios da metástase, permitindo que as células cancerosas se adaptem às crescentes demandas de energia e sobrevivam em um ambiente hostil (Ribatti; Tamma; Annese, 2020; Fedele *et al.*, 2022).

4 METODOLOGIA

4.1 LINHAGENS CELULARES

As linhagens celulares utilizadas são células epiteliais oriundas de adenocarcinoma humano (MCF-7), células epiteliais de mama humana (MCF-10A), utilizadas como controle de células não tumorais e a linhagem de macrófago (RAW 264.7) uma linhagem celular de macrófagos que foi estabelecida a partir de tumor de camundongo. As células MCF-7 e RAW 264.7, foram rotineiramente cultivadas em garrafas de cultura celular de 25 cm² com meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium – Thermo Fisher Scientific, Gibco, Waltham, Massachusetts, EUA), suplementado com 10% (vol/vol) de soro fetal de bovino (Thermo Fisher Scientific, Gibco, Waltham, MA, EUA), 1% (vol/vol) de penicilina e estreptomicina (Thermo Fisher Scientific, Invitrogen, Waltham, MA, EUA), acondicionadas em estufa a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. As células MCF 10-A, foram cultivadas em meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium - DMEM/Ham's Nutrient Blend F12 (1:1) com 2,5 mM L-glutamina, 5% soro de cavalo, 10 µg. mL⁻¹ insulina humana, 0,5 µg/mL hidrocortisona, 10 ng. mL⁻¹ EGF, e 100 ng. mL⁻¹ toxina colérica.

4.1.2 Molde de Agarose

O molde foi obtido a partir da agarose ultrapura (Invitrogen) e tampão fosfato salino 1x (PBS). A agarose foi autoclavada e 1 g da mesma foi diluída em 50 mL de PBS, formando uma solução heterogênea por isso a solução foi aquecida em micro-ondas até que a agarose fosse totalmente dissolvida e a solução se tornasse homogênea.

Em seguida cerca de 2,5 mL de solução salina de agarose foi disposta em placa de 6 e 12 poços até que todo o fundo do poço fosse ocupado para que pudesse ser colocado o carimbo para a formação do molde (BioEdTech).

4.2 TERAPIA FOTODINÂMICA (TFD) E IRRADIAÇÃO

Para o estudo o fotossensibilizador utilizado foi a Alumínio Ftalocianina Tetrasulfonada (AlPcS₄) (Porphyrin Frontier Scientific, Logan, UT, USA) a mesma foi

diluída em Tampão Fosfato 1X (PBS) com a concentração inicial de 5 mM. mL⁻¹ armazenada ao abrigo da luz sobre a temperatura de 4°C. Para a preparação da solução de uso a solução estoque foi diluída em tampão fosfato novamente com a concentração final de 5 µM. mL⁻¹.

Para a irradiação foi utilizado o Equipamento de LED - Biopdi/IRRAD-LED 660 nm (Biopdi, São Carlos, São Paulo, Brasil), dispositivo composto por 54 LEDs em seu interior, cada LED possui 70 mW de potência, totalizando uma intensidade de 25 mW/cm², emitindo em 660 ± 5 nm e cobrindo uma área de 150 cm² por 1 minuto e 45 segundos.

4.3 PLAQUEAMENTO E MANUTENÇÃO CELULAR

Para o protocolo de irradiação os seguintes critérios de plaqueamento estabelecidos no laboratório, para cultura bidimensional (2D), onde; as células foram plaqueadas na densidade de 1x10⁴ células/poço em placas de 96 poços, 1x10⁵ células/poço em placas de 24 poços e 1x10⁶ células/poço em placas de 6 poços.

Para a cultura tridimensional (3D) as células foram plaqueadas na densidade de 1x10⁶ células/molde em placas de 12 poços e 1x10⁷ células/molde em placas de 6 poços. Após 24 h do plaqueamento o meio de cultura foi retirado e as células lavadas duas vezes com PBS.

Em seguida, a solução de alumínio ftalocianina tetrassulfonada (AlPcS₄) na concentração de 5 µM. mL⁻¹, foi adicionada e a cultura incubada por 1 h em estufa a uma temperatura de 37 °C e 5 % CO₂. Ao término deste período, a solução de AlPcS₄ foi retirada e as células foram lavadas novamente duas vezes com PBS e irradiadas. Para as culturas 3D, os esferoides, cultivados em placas de 6 ou 12 poços por 7 dias, foram incubados com solução de AlPcS₄ na concentração de 5 µM. mL⁻¹ e incubadas por 1 h em estufa a uma temperatura de 37°C e 5 % CO₂. Ao término deste período, a solução de AlPcS₄ foi retirada e os esferoides foram submetidos aos testes.

4.3 TESTE DE ATIVIDADE METABÓLICA (MTT)

As células foram incubadas com 100 µL da solução de MTT {(brometo de [3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5 difeniltetrazólio]} (Sigma) por 3 horas a 37°C sob atmosfera de 5% CO₂. Após o período foi retirado o excedente e adicionado 100 µL de Dimetilsulfóxido (DMSO), e deixado em agitação por 5 minutos ao abrigo da luz. A leitura foi efetuada no

espectrofotômetro SpectraCount (Packard) a $\lambda=570$ nm após 24 horas e 48 horas após a terapia fotodinâmica.

4.4 GLICOPROTEÍNAS DE SUPERFÍCIE

Para avaliação de glicoproteínas de superfície foram utilizados os kits de marcação Click-it™ Metabolic Glycoprotein Labeling (Thermo Fisher Scientific™) para a detecção dos açúcares galactosamina, manosamina e glucosamina, todos os kits partem do princípio de utilização de anticorpos primários produzidos em coelho para a detecção de açúcares presentes na membrana celular de células de mamíferos.

4.4.1 Click-it® GalNaz, Click-it® ManNaz, Click-it® GlcNaz

Após 24 horas da TFD, os esferoides foram lavados com tampão fosfato salino 1x (PBS) para que fossem submetidos à marcação com os kits, foi adicionado 1 mL do preparado em cada molde na proporção de 2:1000 de anticorpo primário em tampão fosfato salino 1x (PBS) e alocados em estufa a 37°C e 5% de CO₂ por 24 horas para que o anticorpo fosse incorporado.

Após o período descrito os esferoides foram novamente lavados com tampão fosfato salino 1x (PBS) e adicionou-se a solução de anticorpo secundário FTIC-conjugado na diluição de 1:1000 e acondicionados em estufa por mais 24 horas a 37°C e 5% de CO₂.

No dia seguinte a incubação com o anticorpo secundário os esferoides foram novamente lavados, e fixados em solução de paraformaldeído 4% (vol/vol) e analisadas por microscopia confocal. Os marcadores utilizados tem como comprimento de onda de emissão e excitação os seguintes parâmetros, para a detecção da galactosamina, manosamina e glucosamina a emissão é de 450 nm e excitação 340 nm. (Microscópio Confocal fluorescência LSM 700- Zeiss)

4.5 FORMAÇÕES DE MATRIZ EXTRACELULAR (MEC)

4.5.1 Laminina

A solução de anticorpo primário produzida em coelho foi estabelecida com a proporção de 1:1000 em PBS e foi adicionada nos poços contendo os esferoides submetidas a estufa por 37°C e 5% de CO₂ por 1 h, após o período de incubação os esferoides foram lavados com PBS e adicionou-se a solução de anticorpo secundário na proporção de 2:1000 em PBS-BSA 3% (vol/vol) e incubadas novamente em estufa por mais 24 h.

Após a incubação do anticorpo secundário os esferoides foram lavados com PBS para a retirada do excedente e adicionou-se a solução de fixação de paraformaldeído 4% para a estagnação das vias metabólicas para a avaliação em microscopia confocal, (Microscópio Confocal fluorescência LSM 700- Zeiss) e a realização das fotos. O comprimento de onda de emissão da laminina é de 417 nm e excitação 590 nm.

4.5.2 Fibronectina

A fibronectina é um dos componentes da MEC que através de receptores de integrina da superfície celular atua na comunicação entre o ambiente intracelular e extracelular controlando o comportamento das células.

A solução de anticorpo primário produzida em coelho foi estabelecida com a proporção de 1:1000 em PBS e foi adicionada nos poços contendo os esferoides submetidas a estufa por 37°C e 5% de CO₂ por 1 h, após o período de incubação os esferoides foram lavados com PBS e adicionou-se a solução de anticorpo secundário na proporção de 2:1000 em PBS- Albumina 3% e incubadas novamente em estufa por mais 24 h.

Após a incubação do anticorpo secundário *anti-rabbit* os esferoides foram lavados com PBS para a retirada do excedente e adicionou-se a solução de fixação de paraformaldeído 4% (vol/vol) para a estagnação das vias metabólicas para a avaliação em microscopia confocal (Microscópio Confocal fluorescência LSM 700- Zeiss) e a realização das fotos. O comprimento de onda de emissão da fibronectina é de 519 nm e excitação 495 nm.

4.6 INTERAÇÕES DAS CÉLULAS COM MACRÓFAGO

O teste de interação das células MCF-7 e MCF-10A com os macrófagos foi estabelecida a partir da cultura bidimensional, ou seja, em monocamada. Para a marcação de fluorescência dos macrófagos foi utilizado o marcador PKH26 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) diluído em meio de cultura e incubado por 24 h até ser realizada as fotografias em microscopia de fluorescência. Para a realização das fotografias foi utilizado o microscópio invertido (Model DM IL, Leica) com câmera acoplada (Model DFC 300FX, Leica). O comprimento de onda de emissão do marcador PKH26 é de 567 nm e excitação 551 nm.

4.7 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Para a realização das análises no MEV, os moldes contendo os esferoides que já haviam sido utilizados para as análises de microscopia confocal, foram submetidos ao processo de desidratação crescente em soluções de etanol e hexamethyldisilazane (HMDS). As amostras foram as mesmas utilizadas no ensaio de microscopia confocal, ou seja, após a retirada das fotografias os moldes foram submetidos aos seguintes procedimentos.

O processo de desidratação consistiu na preparação de soluções de 30%, 50%, 70% e 100% de etanol, cada poço foi adicionado 2 mL de solução pelo período de 10 minutos cada etapa, seguindo de uma solução de 50% etanol e 50% HMDS por 30 minutos e por fim HMDS puro por mais 30 minutos, após todos os passos os esferoides foram deixados em capela de exaustão para a evaporação do HMDS por 2 dias. Passado o período os moldes foram levados para o processo de metalização e retirada das fotos no microscópio eletrônico de varredura. Utilizou-se o microscópio eletrônico de varredura Zeiss EVO Ma10 acoplado com EDS da Oxford Instruments Inca Penta FET x3. Foi utilizada uma tensão de aceleração de elétrons da ordem de 20kV (Carl Zeiss - MA 10 + EDX INCA Oxford).

4.8 MARCAÇÃO DE FLUORESCÊNCIA NUCLEAR E MITOCONDRIAL DOS ESFEROIDES

Para a marcação de núcleo foi utilizado o marcador Hoechst (Thermo Fisher Scientific, Gibco, Waltham, Massachusetts, EUA) em que o mesmo foi diluído em meio de

cultura na proporção de 3:10.000, em que foi incubado por 10 minutos em estufa longe da luz e após o período lavado com PBS para retirar o excesso de corante. Para a marcação das mitocôndrias foi utilizado o Tetramethylrhodamine, Methyl Ester, Perchlorate (TMRM) - (Thermo Fisher Scientific, Gibco, Waltham, Massachusetts, EUA) também diluído em meio de cultura na proporção de 1:1.000, incubado por 30 minutos em estufa longe da luz e lavado com PBS para a retirada do excesso de corante. Para a realização das fotografias foi utilizado o microscópio invertido (Model DM IL, Leica) com câmera acoplada (Model DFC 300FX, Leica). O comprimento de onda de emissão do Hoechst é de 461 nm e excitação 350 nm, para o TMRM a emissão é de 573 nm e excitação 548 nm.

4.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para a realização das análises estatísticas dos testes foram realizadas triplicatas com o número amostral maior que três, assim a média das repetições foram utilizadas para as comparações estatísticas.

A significância estatística dos demais testes foi determinada utilizando os testes de ANOVA *one way* e *two way*, confirmados pelo teste de Tukey com a significância admitida de $P < 0,05$.

Para a realização das análises estatísticas e plotagem dos gráficos foi utilizado o *software GraphPad Prism 6®* (GraphPad Inc., La Jolla, CA).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

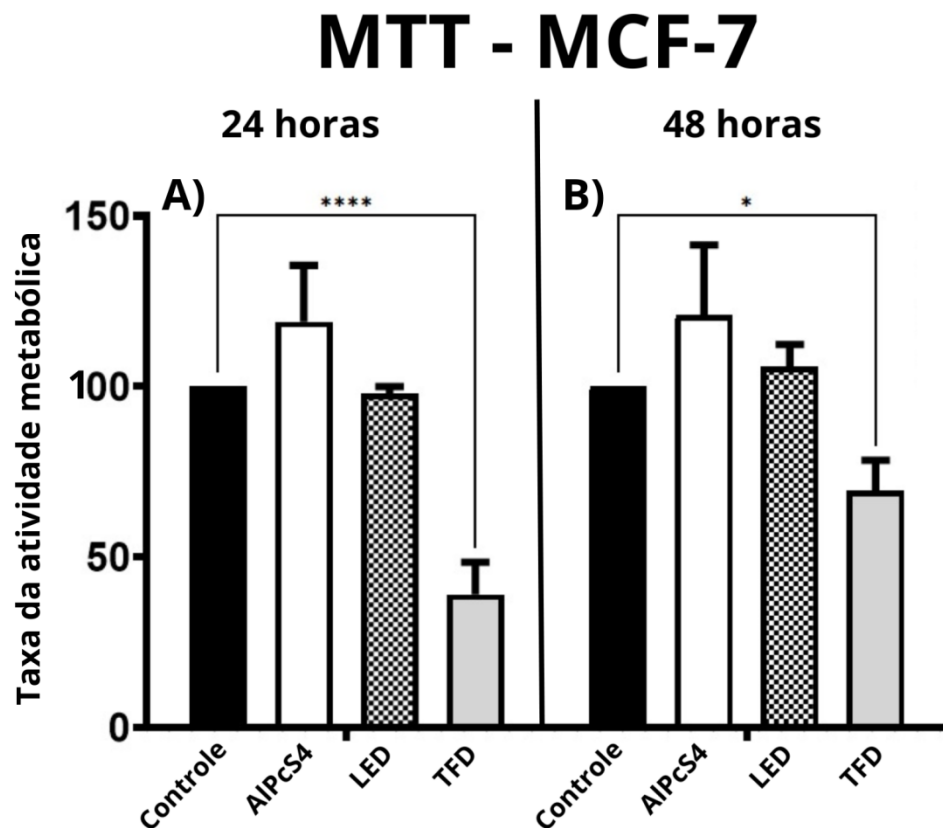
5.1 TESTE DE ATIVIDADE METABÓLICA (MTT)

A avaliação da atividade mitocondrial de células tumorais cultivadas em monocamada como dada na figura 1A, é esclarecida pela comparação da viabilidade celular entre o grupo controle e os demais grupos apresentados. Desta forma quando visualizado o grupo alumínio ftalocianina tetrasulfonada (AlPcS₄), grupo o qual as células interagiram com o fármaco sem a exposição luminosa, evidenciam uma aumento da atividade metabólica em relação ao grupo controle, esse resultado apresenta uma divergência uma vez que houve a interação entre as células e o fotossensibilizador, o esperado é que ocorresse uma diminuição da atividade metabólica por conta do acúmulo de fotossensibilizador nos compartimentos celulares, e pela interação com outras vias de metabolismo celular que pode alterar o microambiente celular levando a diminuição da taxa metabólica das células (Koechli *et al.*, 1995). O grupo LED em relação ao controle se manteve na mesma taxa de atividade metabólica.

A TFD vista no último grupo apresentado pela figura 1A demonstra a eficácia da utilização do fármaco e a sua exposição luminosa, como demonstra nos estudos de Santos *et al.*, (2024). Sua diminuição de mais de 50% da viabilidade celular da população indica o sucesso da TFD na indução da morte celular e da diminuição da taxa metabólica, este resultado é previsto pela produção de oxigênio singlete pela interação da luz e do fotossensibilizador que resulta na formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) que pode resultar lesões permanentes e irreversíveis ao material genético e as membranas mitocondriais e membrana plasmática fazendo com que as células tumorais entrem em processos de morte por apoptose ou necrose (Santos, 2024).

Na figura 1B os resultados após 48 h da irradiação, os grupos controle e AlPcS₄ se assemelham ao da figura 1A, entretanto é possível notar o aumento da taxa metabólica no grupo LED em aproximadamente 10% a mais do que no grupo apresentado na figura 1A. O grupo TFD obteve uma redução de aproximadamente 30% da sua taxa de metabolismo.

Figura 1 - Avaliação da atividade metabólica MCF-7 após 24 h e 48 h.

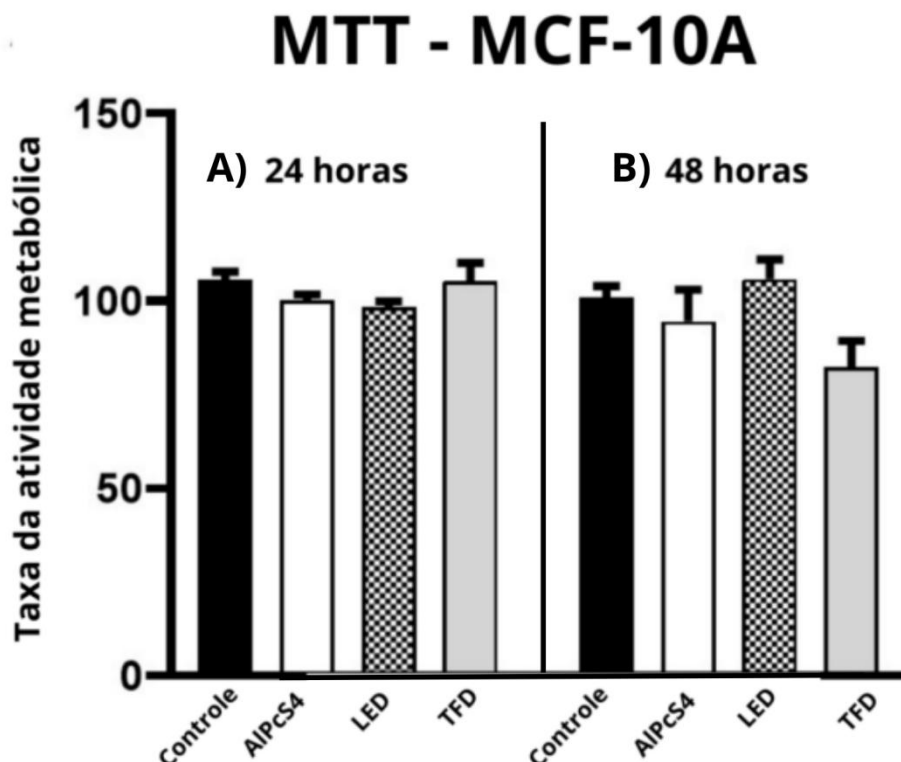


Fonte: Autora (2024)

Entretanto quando analisada a atividade mitocondrial de células não tumorais como a linhagem MCF-10A na figura 2A e 2B, os resultados obtidos demonstram que mesmo com a mesma metodologia empregada da TFD os grupos não sofreram alterações na atividade metabólica, o que caracteriza que mesmo tendo a interação com fotossensibilizador sozinho, a luz e a luz combinada com o fotossensibilizador não houve mudanças nas suas características primárias de ser um tecido saudável e sem indução de morte celular.

Esse resultado evidencia que as células saudáveis não sofrerão alterações no seu funcionamento quando houver a aplicação da TFD, enquanto nas células tumorais a ação da terapia será de induzir a morte celular e reduzir sua população.

Figura 2: Avaliação da atividade metabólica MCF-10A após 24 h e 48 h.



Fonte: Autora (2024).

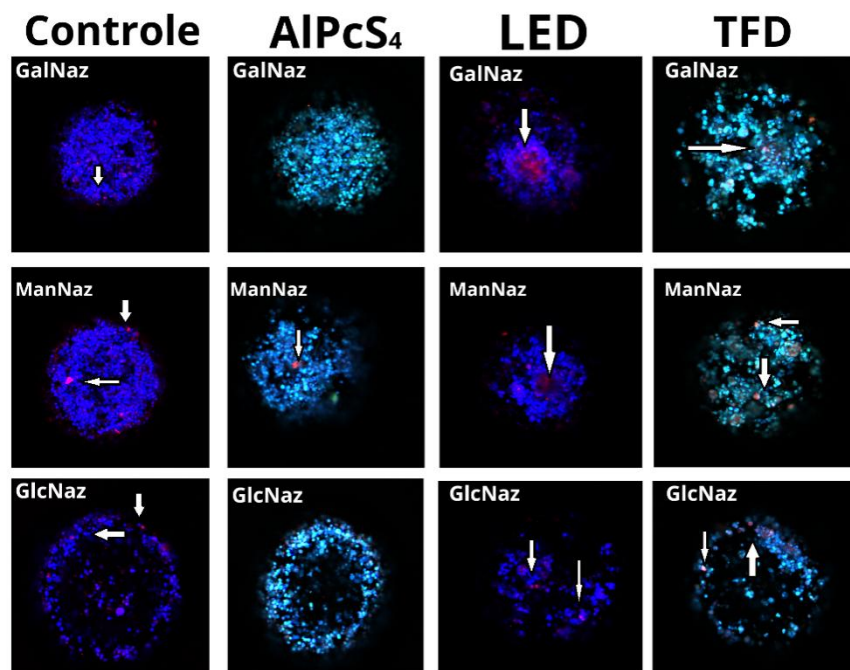
5.2 GLICOPROTEÍNAS DE SUPERFÍCIE

Conforme ilustrado na Figura 3, a linhagem celular em questão é a MCF-10A, que representa uma linhagem não tumoral. O grupo identificado como GalNaz é utilizado para detectar a galactosamina. Essa molécula se caracteriza por uma ligação terminal com azido-açúcar, consistindo em moléculas paracetiladas que se conectam a glicanos nas vias metabólicas dos mamíferos. A galactosamina está associada à síntese de carboidratos e peptídeos, e a azida promove a fixação do glicano na superfície celular, resultando na modificação das proteínas da membrana plasmática (Ding *et al.*, 2024).

No grupo controle (figura 3) é possível visualizar marcação vermelha dispersa em algumas células, indicando a presença de galactosamina, o que não é muito evidenciado no

grupo do fotossensibilizador utilizado. Em contrapartida, no grupo exposto somente à luz é possível verificar que a marcação é detectada principalmente no centro do esferoide, sugerindo que após a exposição ao LED as células foram estimuladas a produzir galactosamina, já no grupo TFD os níveis de emissão de fluorescência referente a galactosamina decaíram, o resultado similar ao resultado apresentado do grupo controle, marcação dispersa em alguma células do esferoide.

Figura 3: Teste de detecção de fluorescência de glicoproteínas em células MCF-10A. (Na imagem é possível observar as glicoproteínas sendo expressas em vermelho enquanto os núcleos são marcados em azul, o fotossensibilizador é expresso na coloração amarela demonstrando sua interação nas células. As setas apontam para onde houve o aparecimento das glicoproteínas).



Fonte: Autora (2024).

Entretanto quando analisamos a figura 4 que apresenta a linhagem de célula tumoral, MCF-7, o grupo controle apresenta regiões de emissão do vermelho, apresentando-nos as ligações presentes da galactosamina tanto nas células da borda do esferoide quanto nas células do centro, enquanto no grupo do fotossensibilizador não há região fluorescente sendo apresentada, sugerindo que AIPcS₄ inibiu a atividade de síntese dessa glicoproteína de superfície. Seguindo para os grupos expostos a luz, temos em ambos os grupos experimentais

–LED e TFD, a presença de regiões de detecção dessa glicoproteína, o grupo TFD ainda demonstra a eficácia do tratamento antitumoral apresentando deformação no formato do esferoide, o qual fica com um rompimento da morfologia esferoidal.

Em todos os grupos da linhagem não tumoral, MCF-10A, apresentados da galactosamina, os núcleos marcados em azul pelo DAPI se mantiveram com suas atividades típicas, não sendo visualizado nenhum ponto de estresse ou morte celular. Também é possível afirmar que os esferoides mesmo após a manipulação dos testes se mantiveram de forma esferoidal e sua conformidade foi mantida.

Em contrapartida no grupo ManNaz da figura 3, marcando a manosamina, glicoproteína presente nos processos de inflamação e infecção, podemos observar regiões positivas em todos os grupos experimentais de coloração avermelhada, essa glicoproteína é ocorre decorrente da ligação química entre as terminações de glicolipídios e ácido siálico presente nas membranas. O ácido siálico e suas alterações no sistema biológico estão ligadas diretamente à progressão do câncer e a metástase, isso porque a sialilação desempenha um papel importante no reconhecimento célula-célula e nas interações do microambiente celular, bem como nos processos fisiopatológicos do tecido (Scache, 2022).

No grupo controle é evidenciada a presença de pontos próximos a superfície do esferoide, assim como acontece nos grupos controle e AIPcS₄ exceto nos grupos expostos a luz, LED e TFD, o qual se observa regiões positivas de manosamina nas bordas do esferoide e no centro do esferoide.

A figura 4, quando visualizado a detecção de manosamina os grupos como o controle e o fotossensibilizador não expressaram nenhuma fluorescência, em relação aos grupos expostos a luz como LED e TFD que obtiveram focos de emissão fluorescente. Nas imagens do grupo ManNaz da figura 4 é possível observar pequenos pontos na coloração esverdeada, esses pontos são resquícios de fotossensibilizador intracelulares.

Assim como no grupo da galactosamina, os núcleos apresentam cromatina uniforme e morfologia característica, ressaltando que a linhagem MCF-10A não é tumoral e exhibe comportamento celular habitual. Todavia, na figura 4 os núcleos mostram cromatina uniforme em todos os grupos, exceto no grupo TFD, no qual também houve degradação do esferoide e de sua forma circular, comprovando o estresse sofrido pelas células durante o tratamento proposto.

Na avaliação de glicoproteínas a glucosamina terminal, GlcNaz, que tem por

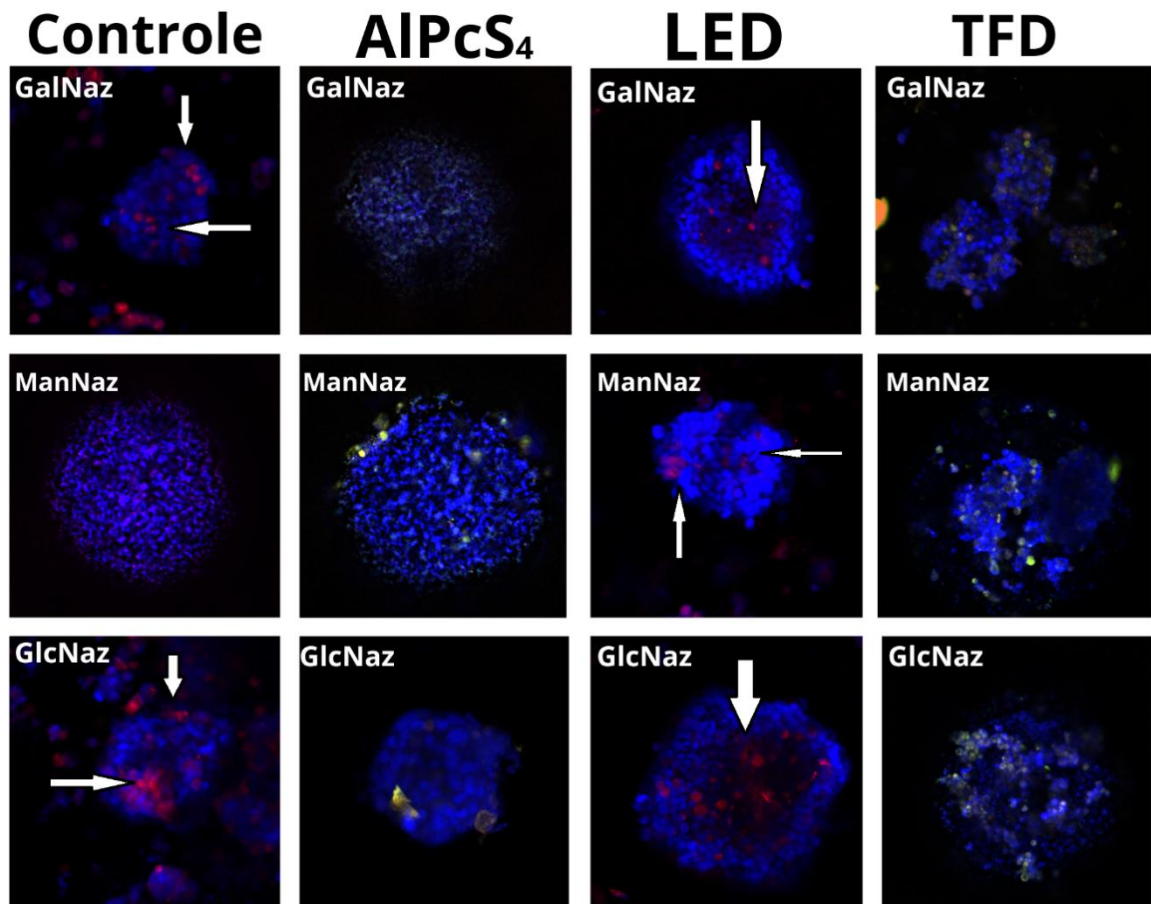
propriedade a caracterização de glicoproteínas intracelulares, ou seja, no interior da célula ocorre um processo denominado O-glicosilação (O-GlcNAc) que modifica e modula diversas vias de sinalização celular, assim como as anteriores emitirá a fluorescência na coloração avermelhada (Almeida, 2012), a figura 3 a glucosamina foi detectada em níveis reduzidos tanto nos grupos não expostos quanto nos expostos à luz. Contudo o formato esferoidal é observado ao longo dos testes, com as células juntas e aglomeradas.

Na linhagem MCF-7 é possível observar marcação de glucosamina em várias regiões do esferoide no grupo controle e no grupo LED, principalmente no centro do tumor, em contrapartida nos grupos AIPcS₄ e TFD, são observadas marcações fluorescentes verdes, indicando a presença do fotossensibilizador. O grupo TFD apresenta uma visível deterioração do esferoide. A ligação de porções N-acetilglucosamina ligada a O (*O-GlcNAc*), é sensível a várias formas de estresse celular como o choque térmico, baixa concentração de oxigênio e baixo fornecimento de nutrientes, embora os mecanismos que medeiam esta resposta estejam apenas começando a serem descritos em estudos, é possível afirmar que fisiologicamente, quando há a interrupção da homeostase no processo de O-GlcNAc, ocorre o surgimento de muitas doenças humanas, que podem incluir câncer, diabetes e doenças neurodegenerativas.

Conforme descrito por Yang e Qian (2017), quando as células sofrem algum tipo de mecanismo de estresse a quantidade de proteínas intracelulares desdobradas se elevam devido ao acúmulo na região do citoplasma e nos compartimentos celulares. Sendo não coincidentemente o alto nível de detecção de O-GlcNAc durante as respostas de indução de altos níveis de estresse.

O resultado observado com a TFD, que estimula e induz mecanismos de morte celular devido ao estresse causado pelos danos à membrana mitocondrial, lisossomos e membrana celular, os quais podem ser irreversíveis, sugere que a detecção de glucosamina é mais evidente nos grupos da linhagem tumoral em comparação à linhagem não tumoral, refletindo o metabolismo característico das células cancerígenas (Yang; Qian, 2017).

Figura 4: Teste de detecção de fluorescência de glicoproteínas em células MCF-7. (Na imagem abaixo é possível notar a expressão das glicoproteínas em vermelho enquanto os núcleos são evidenciados pela coloração azul e o fotossensibilizador em amarelo. As setas apontam para as áreas de maior concentração de aparecimento da detecção de glicoproteínas).



Fonte: Autora (2024).

5.3 FORMAÇÃO DE MATRIZ EXTRACELULAR (MEC)

Na linhagem da MCF-10A como mostrado na figura 5, o grupo controle e o grupo LED demonstraram uma baixa detecção de laminina no esferoide, representada pela coloração vermelha, enquanto nos grupos AIPcS₄ e TFD não houve marcação, ou seja, não houve a produção de MEC. Quando comparado a linhagem da MCF-7 na figura 6 apenas o grupo controle e LED demonstrou produção de MEC, sendo mais evidente no interior do esferoide.

Em consideração a atividade nuclear e a continuidade do formato esferoidal ambas as linhagens demonstraram um rompimento do esferoide ao receber os tratamentos com TFD e ao serem expostas ao fotossensibilizador, a cromatina se manteve difusa.

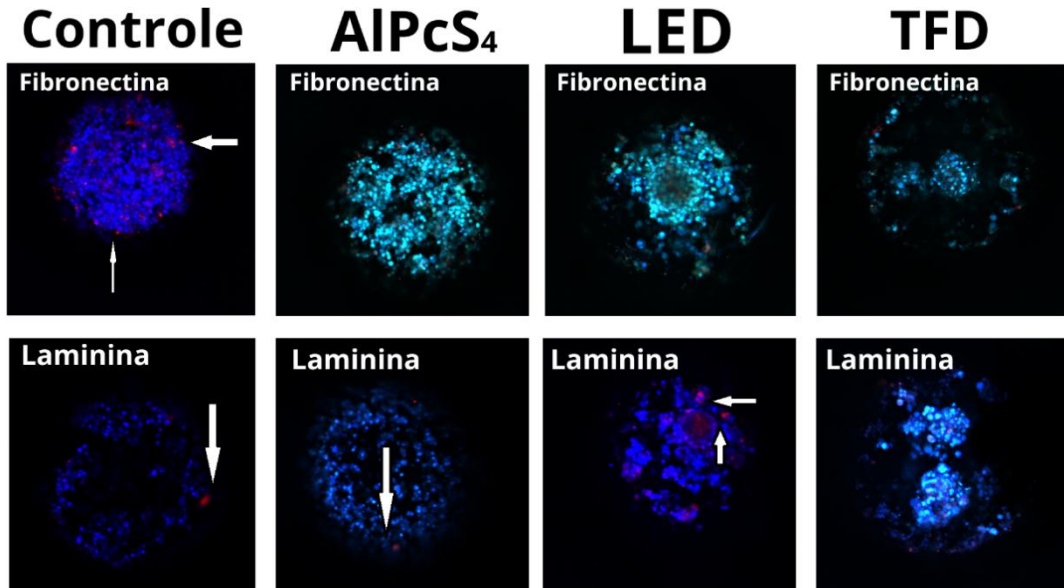
Além da laminina, outra glicoproteína que integra a indução da formação de MEC é a fibronectina. A fibronectina é uma glicoproteína extracelular que conta com pelo menos dois locais para ocorrer a adesão celular, um deles está localizado na porção central da fibronectina e é composto por uma sequência de aminoácidos, e a porção que nos é relevante, associada à adesão que interage diretamente com a MEC, a interação entre a parte adesiva central da fibronectina e a matriz extracelular se dá principalmente pela integrina $\alpha 5 \beta 1$. (Das *et al.*, 2008)

Na figura 5 a presença da fibronectina é observada em pequenos pontos localizados nos grupos controle, AlPcS₄ e LED. No entanto o grupo TFD não demonstrou nenhum foco de detecção da glicoproteína. A mesma observação ocorre na figura 6, onde há detecção da fibronectina nos três primeiros grupos exceto no grupo da terapia fotodinâmica.

A formação de matriz extracelular se dá pela presença de inúmeras proteínas, e conforme ocorre a desregulação dessas proteínas é mais fácil ocorrer a progressão do tumor e metástase, a fibronectina é um componente do mesenquima mamário não expresso no tecido adulto normal, na figura 5 é possível verificar poucos pontos de detecção no grupo controle, com ausência nos demais grupos. Altos níveis de fibronectina está associado ao mal prognóstico do câncer de mama, mudanças na produção de fibronectina contribui para que as células tenham facilidade na adesão e promovam a progressão da atividade tumoral.

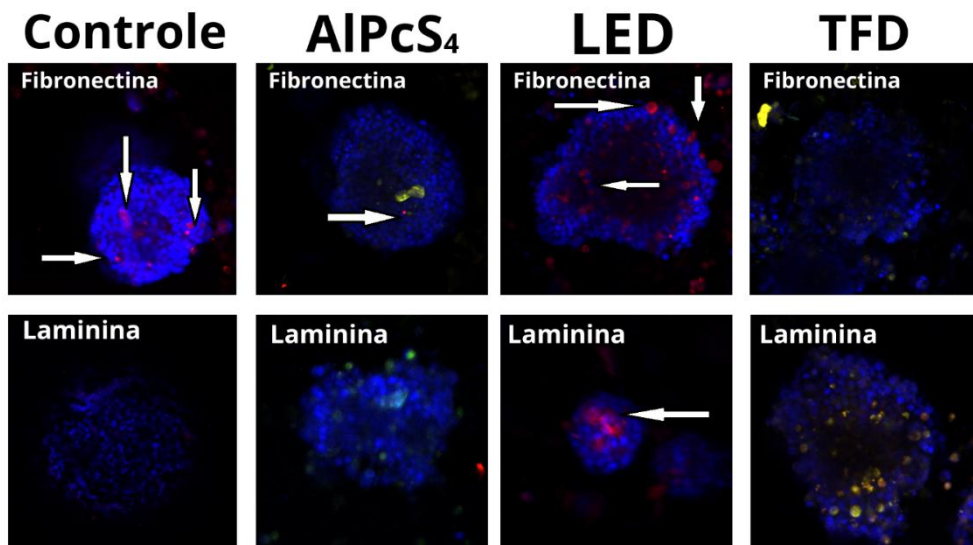
Os resultados obtidos sugerem que após a terapia fotodinâmica a detecção da fibronectina na célula tumoral MCF-7 se tornou inexistente, ou seja, após a exposição luminosa a fibronectina não foi produzida, portanto a TFD foi eficaz para impedir a produção dessa glicoproteína e induzir a morte das células.

Figura 5: Teste de detecção de fibronectina e laminina em esferoides de MCF-10A. (A imagem abaixo demonstra a marcação de glicoproteínas em vermelho e os núcleos em azul. As setas evidenciam os locais onde houve a presença das glicoproteínas).



Fonte: Autora (2024)

Figura 6: Teste de detecção de fibronectina e laminina em esferoides de MCF-7. (A imagem abaixo demonstra a marcação de glicoproteínas em vermelho e os núcleos em azul. As setas evidenciam os locais onde houve a presença das glicoproteínas. Nos grupos da AIPcS₄ e TFD há a presença da marcação do fotossensibilizador em amarelo).



Fonte: Autora (2024).

5.4 INTERAÇÃO COM MACRÓFAGO

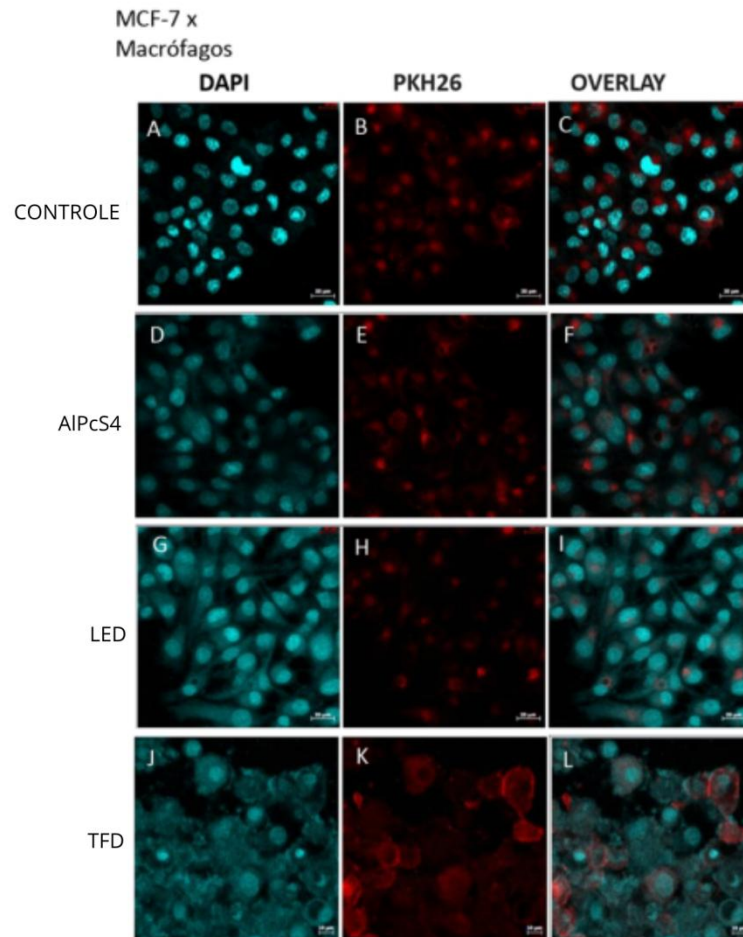
5.4.1 Monocamada

Na figura 7 e 8 são apresentadas as linhagens celulares em interação com os macrófagos que marcados com PKH26 emitem a coloração vermelha, e as células marcadas com DAPI emitem a coloração azul. A linhagem MCF-7 (figura 7) após TFD apresentou resultado positivo no qual as células do sistema imunológico reconhecem as células cancerígenas e promove a atividade de fagocitose das mesmas, na interação com macrófago quando comparadas com a linhagem MCF-10A (figura 8). A atividade fagocítica dos macrófagos pode ser observada em todos os grupos experimentais, entretanto a TFD parece favorecer o reconhecimento das células tumorais pelo macrófago, indicando a relevância da terapia fotodinâmica na resposta imunológica ao combate do câncer.

A linhagem de câncer teve um excelente resultado na interação das células do sistema imunológico quando comparadas com a linhagem não tumoral, a atividade de fagocitose pode ser observada em todos os grupos experimentais sendo relevante na terapia fotodinâmica uma vez que é nosso objeto de estudo principal, é notório a presença dos macrófagos ao entorno nas células correspondendo a resposta de combate ao câncer (Soares *et al.*, 2019).

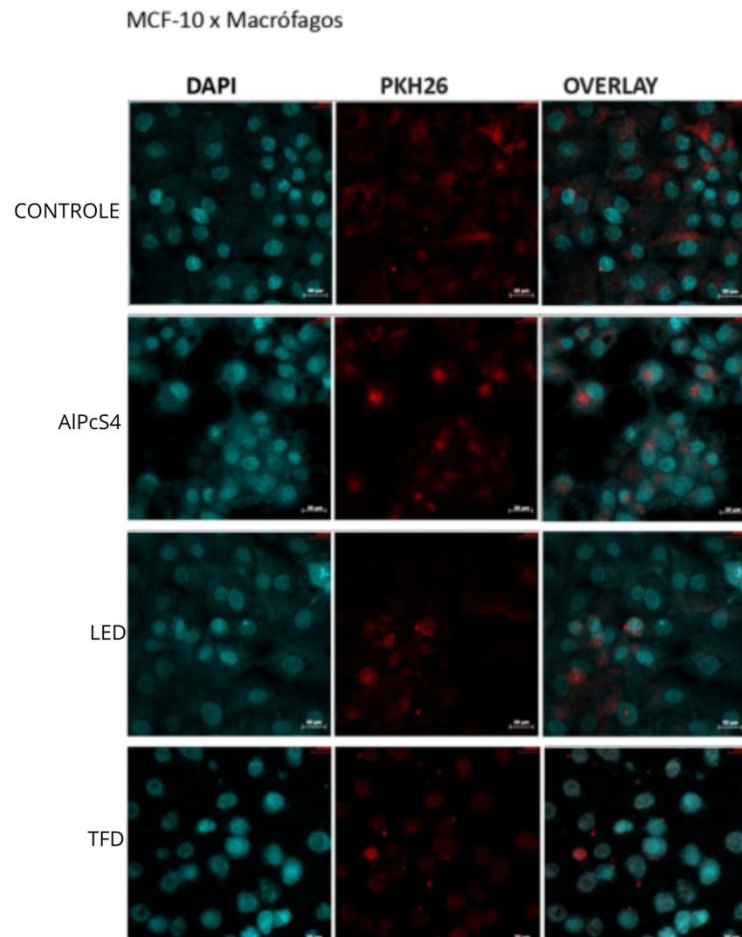
A morfologia nuclear também apresentou alteração uma vez que houve a formação de micronúcleos, como demonstrada na figura 7, onde se descreve a indução de morte celular por meio de danos ao material genético podendo ser resultante do estresse causado pelas espécies reativas de oxigênio geradas na interação do fármaco fotossensibilizante e a luz (Ferreira; Matsubara, 1997).

Figura 7: Marcação de fluorescência de núcleo e mitocôndrias para cultura em monocamada da MCF-7 em interação com macrófagos. (Na imagem os núcleos celulares aparecem marcados na coloração azul pela presença do corante DAPI enquanto os macrófagos aparecem marcados em vermelho pela presença do marcador PKH26. O *overlay* demonstra a sobreposição das duas imagens e revela o aparecimento da atividade de fagocitose).



Fonte: Autora (2024).

Figura 8: Marcação de fluorescência de núcleo e mitocôndrias para cultura em monocamada da MCF-10A em interação com macrófagos. (Na imagem os núcleos celulares aparecem marcados na coloração azul pela presença do corante DAPI enquanto os macrófagos aparecem marcados em vermelho pela presença do marcador PKH26. O overlay demonstra a sobreposição das duas imagens e revela a ausência da atividade de fagocitose).



Fonte: Autora (2024).

5.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

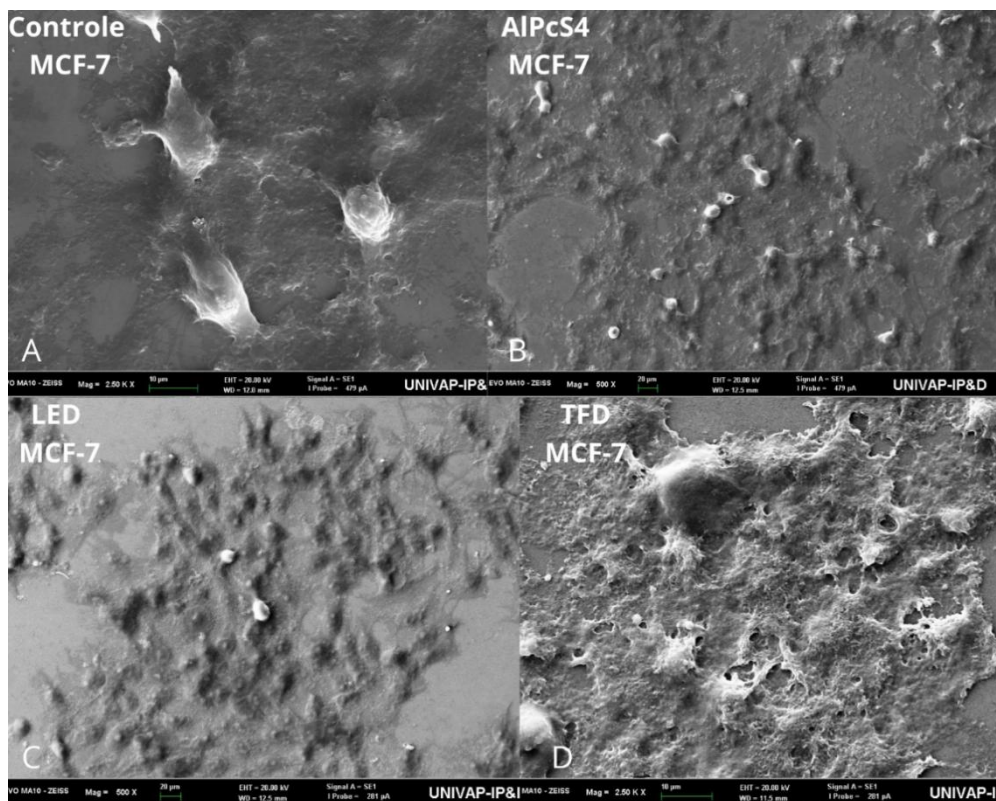
5.5.1 Monocamada (2D)

A figura 9, apresenta a linhagem tumoral MCF-7 sob microscopia eletrônica de varredura. Na figura 9A, grupo controle é possível observar que as células estão espalhadas e com a sua morfologia preservada, a membrana plasmática íntegra e de aspecto homogêneo.

Enquanto na Figura 9B grupo fotossensibilizador, as células formaram uma área tecidual, com inúmeras células próximas formando uma camada única, o volume espacial foi mantido e a membrana se manteve íntegra.

O grupo LED (Figura 9C) manteve as características gerais do grupo AIPcS₄ (Figura 9B) com a permanência da área tecidual, células aglomeradas indicando um bom estímulo de crescimento a partir da exposição luminosa pelo LED. Entretanto no grupo TFD as células sofreram modificações severas na sua morfologia, apresentando a membrana heterogênea, com aspecto rugoso e áspero, com diminuição da população celular, apresentando uma forma irregular das suas projeções celulares e diminuição do espraiamento.

Figura 9: Microscopia eletrônica de varredura da linhagem MCF-7. (As fotomicrografias evidenciam os grupos utilizados e como a TFD afeta a integridade celular, a última fotografia demonstra os danos sofridos na membrana celular e na integridade da população de células).



Fonte: Autora (2024)

Embora como visualizado na figura 9 com a linhagem MCF-7, a figura 10 apresenta fotomicrografias da linhagem MCF-10A demonstram resultados positivos frente a exposição

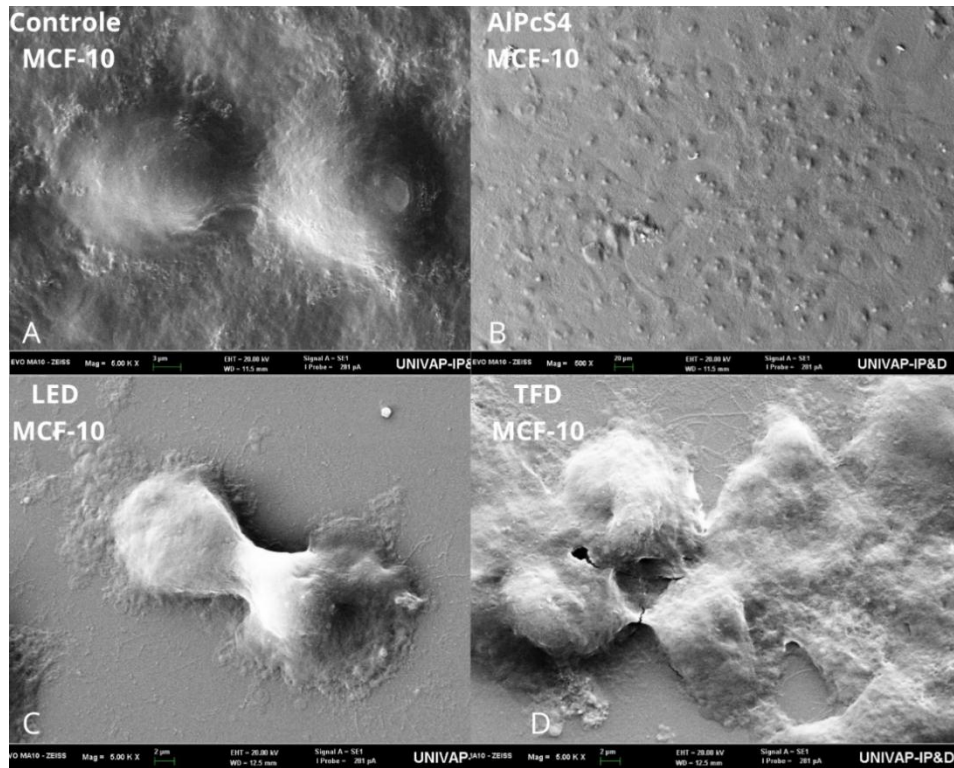
à terapia fotodinâmica uma vez que a intenção é que não haja nenhuma alteração morfológica ou funcional, fazendo com que se perceba a efetividade da terapia sob as células de câncer e a não interrupção da funcionalidade de um tecido normal e saudável.

O grupo controle na figura 10A apresenta divisão celular de uma célula saudável, com a membrana íntegra sem que tenha deformidades na superfície celular. É possível visualizar que no grupo AlPcS₄ (figura 10B) mesmo com a interação do fotossensibilizador não houve danos celulares, a membrana se manteve íntegra e as células ocupam populosamente a área observada, é visualizado o crescimento da população de forma justaposta e com as bordas celulares sem deformações.

Quando equiparado ao grupo controle, o grupo exposto ao LED (figura 10C) tem uma característica comum ocorrendo na fotografia. A divisão celular também é observada, as células apresentam bordas delimitadas, íntegras, aspecto regular e sua atividade fisiológica de divisão celular ocorre sem interferências, ou seja, a ação da luz sob as células de um tecido não tumoral contribui para que suas atividades metabólicas fossem estimuladas através da exposição luminosa, uma vez que o LED por si só tem o potencial de estimular o crescimento celular e aumentar a taxa metabólica contribuindo para o crescimento populacional de células no tecido (Corazza, 2005).

O grupo TFD (figura 10D) também fornece informações relevantes sobre a interação biológica da terapia fotodinâmica com a linhagem MCF-10A, uma vez que não são observados resultados de estresse ou lesão celular, a célula permanece íntegra, de aspecto regular e sua proliferação não é interrompida uma vez que é possível visualizar mais uma divisão celular ocorrendo.

Figura 10: Microscopia eletrônica de varredura da linhagem MCF-10A. (As fotomicrografias apresentadas demonstram a preservação da integridade da membrana celular e a morfologia com aspecto íntegro sem danos visuais).



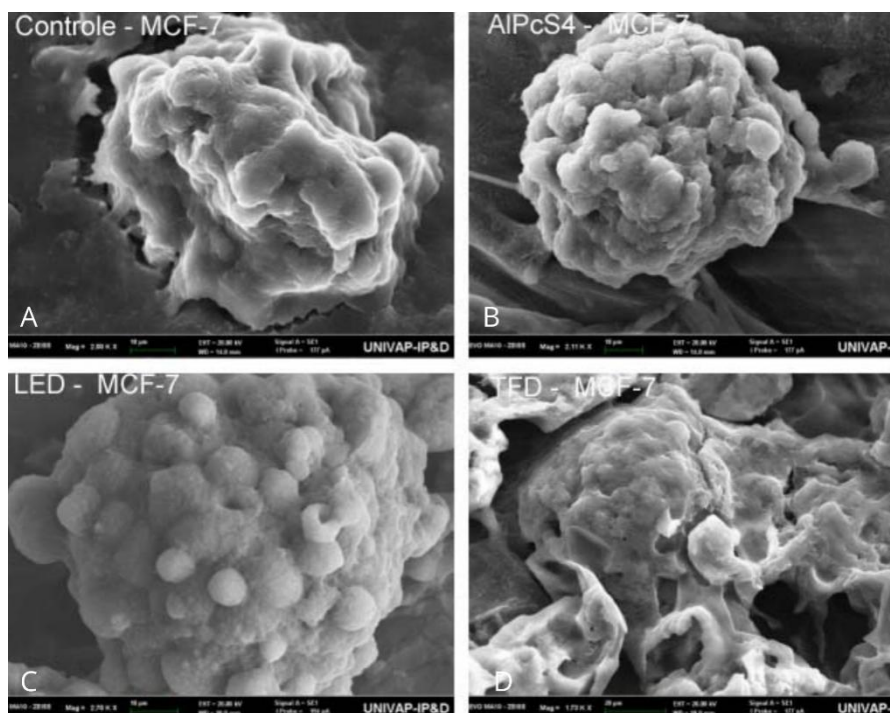
Fonte: Autora (2024).

5.5.2 Cultura Tridimensional (3D)

A figura 11 contendo as fotografias dos esferoides e seus grupos experimentais apresenta alterações perceptíveis na morfologia do grupo tratado com a TFD (figura 11D), enquanto nos demais grupos não houve mudança significativa, tanto na membrana plasmática quanto na morfologia esferoidal das amostras, ou seja, quando comparamos o grupo TFD ao controle (figura 11A) podemos observar retração celular além da deformação do esferoide.

Estudos anteriores demonstram que a TFD causa danos pela liberação de cálcio e subprodutos derivados de processos biológicos causados pela exacerbada produção de ERO no qual a célula não consegue se regular e voltar a sua homeostase ocorrendo a ablação. A ablação ocorre em todo o tecido cancerígeno submetido à TFD (Silva, 2014).

Figura 11: Microscopia eletrônica de varredura da linhagem MCF-7. A fotomicrografia abaixo demonstra a ação da TFD nas células do esferoide evidenciando a ação de danos à superfície membranosa, compactuando com a indução da morte celular afetando diretamente suas estruturas morfofuncionais.



Fonte: Autora (2024)

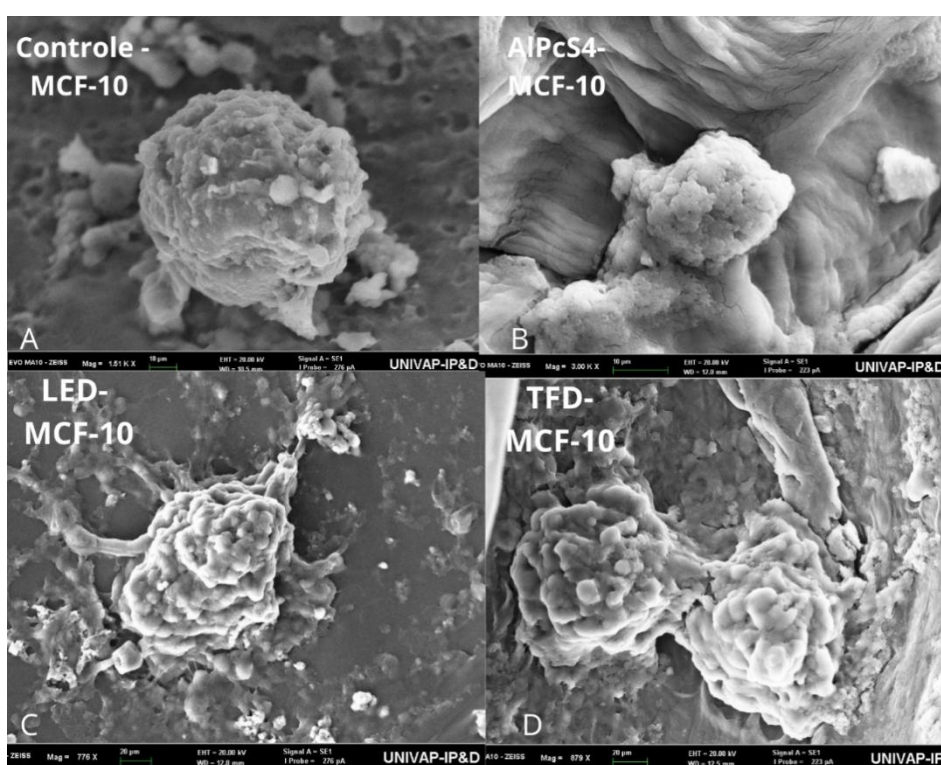
Sabendo-se que a terapia fotodinâmica não deve modificar ou subtrair células saudáveis do tecido que está atuando, podemos observar que na linhagem MCF-10A nenhum dos grupos apresentou mudanças na morfologia ou lesões na membrana, os esferoides continuaram com a sua morfologia preservada e se mantiveram em formato esférico.

Além disso, no grupo TFD representado pela figura 12D, é possível observar dois esferoides muito próximos um ao outro, com uma comunicação central demonstrando o crescimento e espraiamento das células com intuito de formar um único e grande esferoide.

A interação celular permaneceu sem alterações e o crescimento da população celular permaneceu sem interferências. Segundo Alisson (2013) a TFD é letal para células impregnadas de fotossensibilizador, o qual tem mais afinidade por células que se dividem muito rapidamente, entretanto o fotossensibilizador pode estar depositado também em células não tumorais, mas apenas tecidos com uma quantidade ideal de fotossensibilizador passará a ser excitado e sofrer as consequências da TFD, sendo assim, mesmo contendo o fármaco internalizado as células não tumorais não sofrerão as consequências da TFD.

Sendo assim, é possível afirmar que enquanto as células tumorais representadas na figura 11, foram induzidas a morte celular e apresentaram alterações na sua morfologia, enquanto as células na figura 12 não apresentaram lesões ou sequer redução na morfologia esferoidal fazendo com que se mantivesse sua integridade.

Figura 12: Microscopia eletrônica de varredura da linhagem MCF-10. A fotomicrografia abaixo demonstra a ação da TFD nas células do esferoide das células saudáveis de mama, em que se observa a preservação das estruturas externas e o não lesionamento a membrana plasmática celular.



Fonte: Autora (2024).

5.6 MARCAÇÃO DO NÚCLEO (DAPI) E MITOCÔNDRIAS (TMRM)

Na Figura 13 é observada diferença na intensidade de fluorescência dos núcleos nas imagens que contém o marcador DAPI, o grupo que expressa menor intensidade de fluorescência é o TFD, a baixa intensidade se dá possivelmente em decorrência da desestabilização do esferoide, resultante da exposição a terapia fotodinâmica uma vez que os grupos não expostos obtiveram resultados parecidos ao grupo controle, uma vez que quando

não expostos a luz como o grupo AlPcS₄ a tendência é de ser semelhante aos resultados do controle, enquanto grupos expostos tal qual o LED e TFD tendem ter diferença na intensidade de fluorescência emitida (Soares, 2019).

A atividade mitocondrial evidencia a viabilidade celular, na linhagem MCF-10A é verificado que os grupos permanecem com a sua atividade elevada, as células não tumorais demonstram que mesmo com a aplicação da TFD a intensidade da fluorescência não é diminuída concluindo-se que as células não são induzidas para a morte celular e nem ao estresse causado pela TFD (Ferreira; Matsubara, 1997).

Contudo, quando comparamos a intensidade de fluorescência da marcação da atividade mitocondrial todos os grupos apresentam o mesmo padrão de fluorescência.

Na Figura 14 foi observada atividade mitocondrial em todos os grupos experimentais, entretanto, comparado ao controle o grupo TFD apresenta menor atividade mitocondrial, indicado pela fluorescência vermelha. Ademais todos os outros grupos em comparativo ao grupo controle não demonstraram mudança na sua emissão de luz e expressão visual de coloração.

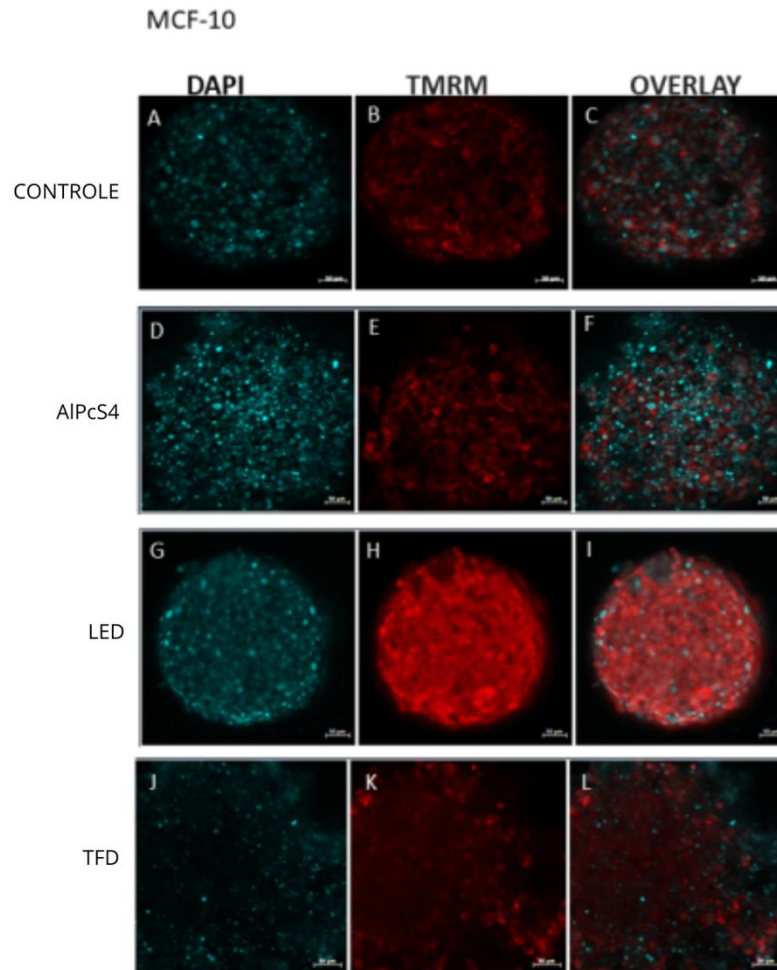
A TFD foi capaz de diminuir a atividade mitocondrial por conta da produção de espécies reativas de oxigênio que surge nas reações fotoquímicas do processo da estimulação do fotossensibilizador e da luz emitida no comprimento de onda dos 660 nm (Quarta *et al.*, 2021).

A morfologia dos esferoides também é modificada diante do processo a TFD, as células quando tem sua atividade mitocondrial diminuída a conformidade do esferoide também é modificada por conta da retração das membranas e do estresse causado pela produção de radicais livres (Soares *et al.*, 2019).

É possível observar que as células submetidas a TFD, apresentam marcação mais difusa em relação aos demais grupos, sendo possível observar uma desorganização do esferoide.

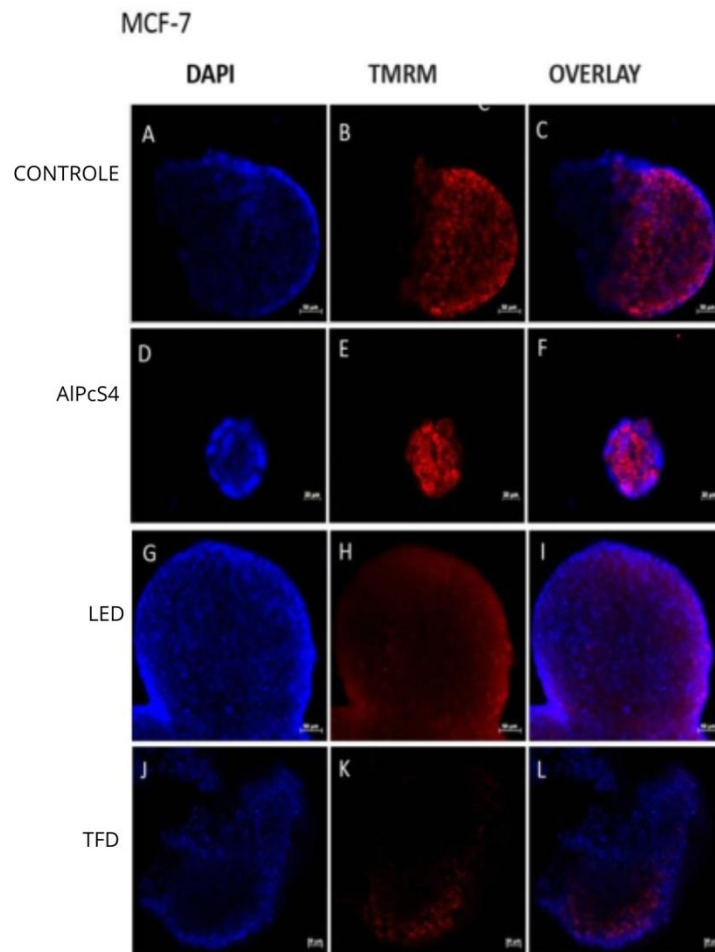
A cromatina também se manteve estável em todos os grupos experimentais apresentados na imagem, as células não tumorais diante da TFD não apresentaram atividade mitocondrial diminuída, como já demonstrado na figura 13, contudo os macrófagos realizaram fagocitose, sem distinção de células do tecido normal ou malignas.

Figura 13: Marcação de fluorescência de núcleo e mitocôndrias para os esferoides da MCF-10A. (Na imagem abaixo os núcleos estão marcados em azul pelo corante DAPI e as mitocôndrias em vermelho pelo corante TMRM, o *overlay* é a sobreposição das imagens anteriores. Os grupos apresentados demonstram resultados positivos de preservação morfológica e funcional após a TFD na utilização da TFD como método de indução a morte celular).



Fonte: Autora (2024).

Figura 14: Marcação de fluorescência de núcleo e mitocôndrias para os esferoides da MCF7. (Na imagem abaixo os núcleos estão marcados em azul pelo corante DAPI e as mitocôndrias em vermelho pelo corante TMRM, o *overlay* é a sobreposição das imagens anteriores. Os grupos apresentados demonstram resultados positivos para a indução da morte celular pela TFD, sendo observada pela redução da atividade mitocondrial e emissão de fluorescência).



Fonte: Autora (2024).

6 CONCLUSÃO

Conclui-se que, este estudo demonstrou que a terapia fotodinâmica tem efeitos significativos na indução da morte celular da linhagem de câncer MCF-7, enquanto preserva a morfofuncionalidade das células saudáveis MCF-10A e atua na modulação de marcadores de células epiteliais e na fisiologia de esferoides, indicando seu potencial tratamento para o câncer de mama.

Além disso a utilização da técnica de cultivo em moldes de agarose oferece uma metodologia consistente para estudos futuros, contribuindo para o aprimoramento das estratégias terapêuticas e uma melhor compreensão das interações celulares no câncer de mama.

REFERÊNCIAS

- AGOSTINIS, P. *et al.* Photodynamic therapy of cancer: an update. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 61, n. 4, p. 250–281, 2011.
- ALLISON, R. R. Photodynamic therapy: oncologic horizons. **Future oncology (London)**, v. 10, n. 1, p. 123–124, 2014.
- ALLISON, R. R.; MOGHISSI, K. Photodynamic therapy (PDT): PDT mechanisms. **Clinical endoscopy**, v. 46, n. 1, p. 24-29, 2013.
- ALMEIDA, A. F. F. **Detecção de O-glicanos sialibados associados ao tumor por MALDI-TOF/TOF**. 2012. 68f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Departamento de Química, Universidade de Aveiro, Aveiro, 2012.
- AQUINO JUNIOR, A. E.; CARBINATTO, F. M.; BAGNATO, V. S. Vamos entender a troca de energia na TFD: o diagrama de Jablonski. *In: Simplificando a terapia fotodinâmica: para profissionais da Saúde*. São Carlos: Gráfica IFSC/USP, 2023. p. 35-38.
- BAGULEY, B. C.; LEUNG, E. Heterogeneity of phenotype in breast cancer cell lines. *In: Breast cancer: carcinogenesis, cell growth and signalling pathways*. 2011. p. 245–256.
- BRAY, F.; FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I. Estatísticas globais de câncer 2018: GLOBOCAN estima incidência e mortalidade em todo o mundo para 36 cânceres em 185 países. **CA Câncer J. Clin.**, v. 68, n. 6, p. 394–424, 2018.
- CASTANO, A. P.; DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: part two - cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death photodiagnosis and photodynamic therapy. **Photodiagnosis Photodyn Ther.** v. 2, n. 1, p. 1-23, 2005.. doi: 10.
- CORAZZA, A. V. **Fotobiomodulação comparativa entre o laser e LED de baixa intensidade na angiogênese de feridas cutâneas de ratos**. 2005. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) Universidade de São Paulo, São Carlos, 2005.
- DAS, S. *et al.* Rapid expression and activation of MMP-2 and MMP-9 upon exposure of human breast cancer cells (MCF-7) to fibronectin in serum free medium. **Life sciences**, v. 82, n. 9–10, p. 467–476, 2008.
- DE SANTIS, C. *et al.* Estatísticas de câncer de mama. **CA Câncer J. Clin.**, v. 61, n. 6, p. 408–418, 2011.
- DING, X. *et al.* Longer fatty acid-protected GalNAz enables efficient labeling of proteins in living cells with minimized S-glyco modification. **Organic & biomolecular chemistry**, v. 22, n. 22, p. 4574–4579, 2024.
- DITTMER, A. *et al.* Human mesenchymal stem cells induce E-cadherin degradation in breast carcinoma spheroids by activating ADAM10. **Cellular and molecular life sciences: CMLS**, v. 66, n. 18, p. 3053–3065, 2009.

ELŻBIETA; DAVID; BARTUSIK-AEBISHER, D. The potential of photodynamic therapy in current breast cancer treatment methodologies. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 137, 2021.

FEDELE, M. *et al.* The epithelial–mesenchymal transition at the Crossroads between metabolism and tumor progression. **International journal of molecular sciences**, v. 23, n. 2, p. 800, 2022.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, p. 61–68, 1997.

JABLONSKI, A. Efficiency of anti-stokes fluorescence in dyes. **Nature**, v. 131, n. 3319, p. 839–840, 1933.

KARSHIEVA, S. S. *et al.* Antitumor activity of photodynamic therapy with tetracationic derivative of synthetic bacteriochlorin in spheroid culture of liver and colon cancer cells. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, v. 40, n. 103202, 2022.

KHARKWAL, G. B. *et al.* Photodynamic therapy for infections: clinical applications: **Lasers in surgery and medicine**, v. 43, n. 7, p. 755–767, 2011.

KIM, M. M.; DARAFSHEH, A. Light sources and dosimetry techniques for photodynamic therapy. **Photochemistry and photobiology**, v. 96, n. 2, p. 280–294, 2020.

KOECHLI, O. R. *et al.* Assessment of effect of photosensitizers on cytotoxicity of photodynamic therapy in human breast cancer cell cultures. **Archives of gynecology and obstetrics**, v. 256, p. 167-176, 1995.

KUCINSKA, M. *et al.* Modeling the photodynamic effect in 2D versus 3D cell culture under normoxic and hypoxic conditions. **Free radical biology & medicine**, v. 162, p. 309–326, 2021.

OLIVEIRA, D. *et al.* Assistência do enfermeiro ao homem com câncer de mama: revisão literária. **Revista de Iniciação Científica e Extensão**, v. 5, n. 2, 2022.

PAL, S. *et al.* Extracellular matrix protein laminin induces matrix metalloproteinase-9 in human breast cancer cell line mcf-7. **Cancer microenvironment: Official Journal of the International Cancer Microenvironment Society**, v. 7, n. 1–2, p. 71–78, 2014.

PEREIRA, L. C. *et al.* Mitocôndria como alvo para avaliação de toxicidade de xenobiótico. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 25, n. 1-2, p. 1-14, 2012.

QUARTA, A. *et al.* Investigation on the composition of agarose-collagen I blended hydrogels as matrices for the growth of spheroids from breast cancer cell lines. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 7, p. 963, 2021.

RIBATTI, D.; TAMMA, R.; ANNESE, T. Epithelial-mesenchymal transition in cancer: a historical overview. **Translational oncology**, v. 13, n. 6, p. 100773, 2020.

RIBEIRO, M. I. *et al.* Terapia fotodinâmica na peri-implantite: uma revisão de literatura .

Brazilian Journal of Development, v. 6, n. 8, p. 57912-57926, 2020.

SANTOS, M. de O. Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 66, n. 1, 2020.

SANTOS, M. I. B. dos. *et al.* Modulation of heat shock protein expression and cytokine levels in MCF-7 cells through photodynamic therapy. **Lasers in Medical Science**, v. 39, n. 1, p. 135, 2024.

SANTOS, T. B. D. *et al.* Prevalência e fatores associados ao diagnóstico de câncer de mama em estágio avançado. **Ciência & saúde coletiva**, v. 27, n. 2, p. 471–482, 2022.

SCACHE, J. Switching azide and alkyne tags on bioorthogonal reporters in metabolic labeling of sialylated glycoconjugates: a comparative study. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, 2022.

SILVA, A. P. da. **Avaliação histopatológica do tratamento do carcinoma espinocelular cutâneo em camundongos usando terapia fotodinâmica mediada por azul de metileno**. 2014. Tese (Doutorado em Engenharia Biomédica) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

SOARES, C. J. dos S. *et al.* Relevância das medidas preventivas para o diagnóstico precoce de câncer de mama. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 7, p. e28311730003, 2022.

SOARES, C. P. *et al.* Avaliação de proteínas de choque térmico em células neoplásicas de laringe (hep-2) após tratamento fotodinâmico. **Revista Univap on line**, v. 25, n. 48, 2019. DOI: <https://doi.org/10.18066/revistaunivap.v25i48.2259>.

SWEENEY, E. E.; MCDANIEL, R. E.; MAXIMOV, P. Y. Models and mechanisms of acquired antihormone resistance in breast cancer: significant clinical progress despite limitations. **Horm. Mol. Biol. Clin. Investig.**, v. 9, p. 143–163, 2013.

WAKS, A. G.; WINER, E. P. Breast cancer treatment: a review. **JAMA**, v. 321, n. 3, p. 288–300, 2019.

YANG, X.; QIAN, K. Protein O-GlcNAcylation: emerging mechanisms and functions. **Nature reviews molecular cell biology**, n. 7, p. 452–465, 2017.