

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

Paula Fonseca Antunes Vieira

**Aplicação de bionossensor para diagnóstico da superexpressão
do EGFR *in vitro***

**Bionanosensors application for *in vitro* diagnosis of EGFR
overexpression**

São José dos Campos
2023

Paula Fonseca Antunes Vieira

**Aplicação de bionanossensor para diagnóstico da superexpressão
do EGFR *in vitro***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade do Vale do Paraíba, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Biomédica.

Orientador: Prof. Dr. Leandro José Raniero

São José dos Campos
2023

TERMO DE AUTORIZAÇÃO DE DIVULGAÇÃO DA OBRA

Ficha catalográfica

Vieira, Paula Fonseca Antunes
Aplicação de bionanossensor para diagnóstico da
superexpressão do EGFR in vitro / Paula Fonseca Antunes Vieira;
orientador, Prof. Dr. Leandro José Raniero. - São José dos
Campos, SP, 2023.
1 CD-ROM, 101 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. Nanomedicina. 3. Nanotecnologia.
4. Fluorescência. I. Raniero, Prof. Dr. Leandro José, orient. II.
Universidade do Vale do Paraíba. Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Biomédica. III. Título.

Eu, Paula Fonseca Antunes Vieira, 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, 28 de Abril de 2023.

Paula Vieira

Autor(a) da Obra

Data da defesa: 07 / 03 / 2023

PAULA FONSECA ANTUNES VIEIRA

**“APLICAÇÃO DE BIONANOSSENSOR PARA DIAGNÓSTICO DA
SUPEREXPRESSION DO EGFR *in vitro*”.**

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 Cristina Pacheco Soares | <i>Cristina Pacheco Soares</i> |
| Prof. Dr. Leandro José Raniero | <i>Leandro José Raniero</i> |
| Prof. ^a Dr. ^a Andrea Porto Carreiro Campos | <i>Andrea Porto Carreiro Campos</i> |

Prof.^a Dr.^a Lúcia Vieira

Diretora do IP&D – Univap

São José dos Campos, 07 de março de 2023.

Dedico o presente estudo à família de
coração. Por todo amor e carinho que
recebi durante a elaboração desse
estudo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais Line Rousy e Marcos Vieira por terem me dado a vida. Agradeço por me ensinarem o quão importante é a educação, acadêmica ou não. Por acreditarem em mim em momentos que nem eu mesma acreditei. Por terem me dado todo o suporte e apoio durante toda a vida. Por terem me guiado até este momento em que apresento minha pesquisa. À minha família como um todo, cada integrante dela, que a faz única e especial. Amo todos vocês, com todas as características que os diferenciam. Agradeço por cada momento especial que compartilhamos, por todo o apoio que me deram.

Ao meu companheiro Marvin Bassani, por fazer parte da minha vida intensamente, ter me dado todo o suporte que eu poderia desejar, por compartilhar sua família maravilhosa comigo e por todo o amor envolvido nesta relação.

A todos os meus amigos de vida, que contribuíram em cada momento que precisei, fizeram sua missão em minha vida e eventualmente escolheram permanecer ou sair dela. Com certeza eu não seria a pessoa que sou hoje se não fosse por vocês. Só tenho a agradecer. Em especial aos amigos João Paulo Queiroz, Raphael Montemor e Igor Martins, por terem acompanhado meu caminho desde a graduação bem de perto, por terem se tornado parte da minha família e por compartilhar comigo os presentes e angústias da vida. Amo vocês.

À amiga Amanda Cerquearo por ter suportado comigo todos os perrengues do mestrado. Por ter chorado comigo, mas também ter juntas, esboçado muitos sorrisos. Obrigada por ter sido minha dupla mais que especial em todos esses anos desde a graduação. Que seu caminho seja brilhante como você.

A todos do Laboratório de Nanossensores e grupos de pesquisa associados, que compartilharam o dia a dia, estando sempre dispostos a ajudar e transmitindo seus conhecimentos. Obrigada pela colaboração de cada um de vocês na minha formação. Em especial às amigas do grupo de pesquisa Viviane, Marcela, Nathanne, Ingrid e Luz, por dividirem comigo os momentos bons e ruins, sendo uma rede de apoio. São mulheres fortes e inteligentes às quais eu tenho muito orgulho e admiração. Trilhem seus caminhos com toda essa garra que possuem. Com certeza eu não seria a mesma sem a influência de vocês.

À Viviane Jesus, por ter me passado todos os seus conhecimentos acerca do mundo da cultura de células. Muito obrigada por toda a amizade, (muita) paciência e

ensinamentos (acadêmicos e não acadêmicos) e por estar presente em minha vida durante todos esses anos. Foi ótimo aprender com você e junto a você. Você é uma pessoa de luz e que merece todas as graças de Deus. Que Mariah, seu anjo, olhe por todos nós. O mundo é seu (e agora da Antonella também)!

À Marcela Cândido, por ter embarcado de cabeça comigo nos momentos de alegria e desespero. Obrigada por me permitir aprender muito com você. Você é maravilhosa, uma cientista brilhante que conquistará muito em sua carreira. Obrigada por me permitir compartilhar o meu dia a dia no LNS (e fora dele também) com você. Obrigada pelos aprendizados e perrengues que passamos juntas do outro lado do Oceano Atlântico. A Europa com certeza tem mais café e batata frita sem a gente. Como sempre dizemos uma à outra, calma que vai dar certo!

À Nathanne Rost, por ter sido minha primeira inspiração científica dentro do LNS. Eu admiro demais todo o seu conhecimento e a sua capacidade de ensinar física pura a uma biomédica. Nunca vou me esquecer de cada risada que dei com você. Obrigada por deixar os dias mais leves e por compartilhar o seu amor por viajar. Obrigada por sempre ter me dado apoio, por ter me levado na Disney e por compartilhar sua família de coração. Je suis très fier de toi ! Sempre estarei aqui para comemorar cada uma de suas conquistas, mesmo que seja em outro continente!

À Ingrid Fontoura, por ter sempre me mostrado a persistência e a calma. Ter me mostrado o quanto a auto recompensa é importante e que cada um tem seu tempo. Não vejo a hora de te visitar em seu futuro laboratório aos pés da praia lá na Bahia, assim como deseja.

À Luz Stefany, por ter acrescentado tanto no meu dia a dia. Obrigada por todas as conversas, desabafos e brincadeiras. Por todo o conhecimento latino-americano compartilhado. Por dividir os momentos bons e ruins. Por trazer toda sua energia. Tenho certeza de que se tornará uma cientista da física (graduação, mestrado e doutorado) maravilhosa!

Ao meu orientador Prof. Dr. Leandro Raniero. Muito obrigada por ter me acolhido em seu laboratório com apenas 18 anos, no início de minha graduação e ter permanecido comigo até hoje. Por todas as correções, sugestões e chamadas de atenção que eu não havia entendido, mas agora vejo tamanha importância. Por toda a paciência que teve em me ensinar. Por ter acreditado em meu potencial e ter me lapidado. Por todas as oportunidades, ensinamentos, apoio, brincadeiras, conselhos e conversas jogadas fora. Por todo o carinho que teve comigo. Tenho muita admiração

pela pessoa e pesquisador que você é. Espero um dia me tornar tão boa cientista quanto você.

A todos os funcionários do IP&D, faculdades e biblioteca central, que com certeza fizeram parte deste caminho trilhado com tanto carinho. Em especial à Priscila Leite, por ter cedido uma boa parte do seu tempo para as conversas, discussões de ideias, ensinamentos e toda a ajuda. Por ter feito mais do que o necessário por este e outros projetos.

A todos os professores envolvidos no Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, que, de certa forma, me ajudaram a tomar decisões importantes. À professora Cristina Pacheco-Soares, por toda a ajuda com os equipamentos, reagentes e discussões de ideias. Sua colaboração com este trabalho com certeza rendeu muito conhecimento.

Aos profissionais Maryanna, Thiago, Mariana, Breno, Laís, Natasha, Ian, Elen, Gabriela, Leonardo e Mauro, todo o meu reconhecimento de tamanha importância e influência do trabalho de vocês em minha vida pessoal e profissional.

À Universidade do Vale do Paraíba. Sou muito grata por todas as oportunidades oferecidas, por todos os profissionais incríveis com os quais tive contato e pude absorver um pouco do vasto conhecimento cedido.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida (Número do Processo: 88887.649530/2021-00).

A todos, muito obrigada.

Nada disso seria possível sem a colaboração de cada um de vocês.

Un chercheur scientifique dans son laboratoire n'est pas un simple technicien:
c'est aussi un enfant placé devant des phénomènes naturels qui
impressionnent comme s'il s'agissait d'un conte de fées.

Marie Skłodowska Curie (1867-1934)

RESUMO

O Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico (EGFR) é codificado pelo gene *EGFR*. A superexpressão do receptor EGFR pode estar ligada a malignidades com pior prognóstico e suas vias de sinalização EGFR são ativadas pela proteína EGF, regulando as ações celulares. Como resultado, o receptor EGFR está sendo estudado para uma variedade de diagnósticos de tumores, estimulando o desenvolvimento de abordagens inovadoras para aumentar a qualidade e a eficiência dos exames diagnósticos. Os nanomateriais podem reconhecer células cancerígenas por direcionamento específico de vias moleculares, ressaltando a importância da nanomedicina. Neste estudo, bionanossensores foram sintetizados para detecção da EGFR, pelo processo de funcionalização da proteína EGF e Clorina e6 (Ce6) em nanopartículas de ouro. Essas nanopartículas utilizam o direcionamento ativo para entrega da proteína EGF ao receptor EGFR, e a Ce6 serve como uma molécula marcadora fluorescente. Bionanossensores foram examinados *in vitro* em linhagens celulares MDA-MB-468 e M059J. A distribuição, absorção, internalização e intensidade de fluorescência dos bionanossensores *in vitro* foi determinada por Microscopia Confocal e Citometria de Fluxo. Os resultados mostram que ambas as linhagens celulares analisadas acumulam bionanossensores, no entanto, a MDA-MB-468 possui maior intensidade devido às suas propriedades de superexpressão do receptor EGFR. Os achados apontam para propriedades ideais para a concepção de um diagnóstico inovador, cuja acurácia se dará pela detecção de células superexpressas do receptor de EGFR em estágios precoces do câncer.

Palavras-chave: Bionanossensores. Nanomedicina. EGFR. EGF. Ce6. Fluorescência.

ABSTRACT

The Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) is encoded by the *EGFR* gene. EGFR receptor overexpression may be linked to malignancies with a worse prognosis and its EGFR signaling pathways are activated by the EGF protein, regulating cellular actions. As a result, the EGFR receptor is being studied for a variety of tumor diagnoses, spurring the development of innovative approaches to increase quality and efficiency. Nanomaterials can recognize cancer cells by targeting specific molecular pathways, underscoring the importance of nanomedicine. In this study, bionanosensors were synthesized for the detection of EGFR, by the process of functionalization of the EGF protein and Chlorine e6 (Ce6) in gold nanoparticles. These nanoparticles use active targeting to deliver the EGF protein to the EGFR receptor, and Ce6 serves as a fluorescent marker molecule. Bionanosensors were examined *in vitro* in MDA-MB-468 and M059J cell lines. The distribution, absorption, internalization, and fluorescence intensity of the bionanosensors *in vitro* was determined by Confocal Microscopy and Flow Cytometry. The results show that both analyzed cell lines accumulate bionanosensors, however, MDA-MB-468 has greater intensity due to its EGFR receptor overexpression properties. These findings point to ideal properties for the conception of an innovative diagnosis, due to the detection of EGFR receptor overexpressed cells.

Keywords: Bionanosensor. Nanomedicine. EGFR. EGF. Ce6. Fluorescence.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 – Esquema de representação dos membros da família EGFR, regiões estruturais e cascata de eventos intracelulares..... | 23 |
| Figura 2 - Receptores membros da família ERBB e seus ligantes, da família de fatores de crescimento epidérmico (EGF)..... | 24 |
| Figura 3 – Esquema representativo da expressão normal e da mutação do EGFR.. | 25 |
| Figura 4 – Taxas de incidência de câncer no Brasil em a) mulheres e b) homens no triênio 2020-2022. | 26 |
| Figura 5 – Esquema representativo dos métodos diagnósticos invasivos e não-invasivos para a detecção da mutação do EGFR. | 29 |
| Figura 6 – Esquema representativo da formação da nanomedicina e seu principal produto. | 31 |
| Figura 7 – Escala nanométrica com apresentação de alguns materiais. | 32 |
| Figura 8 – Análise imunoenzimática pelo teste de ELISA. | 35 |
| Figura 9 – Representação do mecanismo de funcionamento do citômetro de fluxo. | 36 |
| Figura 10 – Estrutura química da Clorina e6..... | 38 |
| Figura 11 – Fluxograma experimental resumido. | 39 |
| Figura 12 – Esquema de síntese das AuNPs..... | 40 |
| Figura 13 – Esquema de síntese do complexo Ce6-Cisteamina..... | 41 |
| Figura 14 – Esquema de síntese do complexo Ce6-Cisteamina..... | 42 |
| Figura 15 – Estrutura simplificada dos complexos EGF- α -ácido lipoico e Clorina e6-cisteamina e a formação do bionanossensor. | 43 |
| Figura 16 – Esquema do processo de síntese dos bionanossensores. | 44 |
| Figura 17 – Diferenças de tecidos com baixa ou alta superexpressão de EGFR..... | 45 |
| Figura 18 – Processo de fabricação de micromoldes de agarose e esferoide. | 46 |
| Figura 19 – Processo de corte das amostras por criostato. | 47 |
| Figura 20 – Processo de preparo das amostras para a leitura da morfologia superficial. | 49 |
| Figura 21 – Espectros de UV-visível da formação a) do bionanossensor sintetizado; b) do complexo EGF- α -ácido lipóico funcionalizado às AuNPs; c) do complexo Clorina e6-cisteamina; d) a sobreposição dos espectros para análise das bandas. | 57 |

| | |
|--|----|
| Figura 22 – Processo de cultivo dos esferoides, em a) moldes recém-fabricados; b) molde equilibrado sem adição de células; c) molde com esferoides após 21 dias de incubação. Os esferoides formados após 21 dias de incubação, em aumentos de d) 4x; e) 10x; f) 20x..... | 58 |
| Figura 23 – Crescimento dos esferoides..... | 59 |
| Figura 24 – Análise histológica dos esferoides em aumentos de a)20x; b) 40x e; c) 100x. | 59 |
| Figura 25 – Fotomicrografias da Microscopia Eletrônica de Varredura em aumentos de: a) 200x; b) 1000x e c) 3000x..... | 61 |
| Figura 26 – Fotomicrografia dos esferoides com marcações de DAPI e anticorpos de paxilina e actina..... | 63 |
| Figura 27 - Fotomicrografia dos esferoides com marcações de DAPI e anticorpos de fibronectina e β -integrina..... | 63 |
| Figura 28 - Fotomicrografia dos esferoides com marcações de DAPI e anticorpos de laminina e e-caderina..... | 65 |
| Figura 29 – Fotomicrografia dos esferoides com marcações de DAPI e fusão de anticorpos..... | 65 |
| Figura 30 – Atividade mitocondrial após aplicação do bionossensor em linhagens celulares MDA-MB-468 e M059J..... | 66 |
| Figura 31 – Resultados brutos da análise da via de morte celular em esferoides..... | 67 |
| Figura 32 – Análise da via de morte celular em esferoides..... | 68 |
| Figura 33 – Fotomicrografia de fluorescência confocal das linhagens MDA-MB-468 e M059J. | 69 |
| Figura 34 - Fotomicrografia de fluorescência confocal dos esferoides..... | 70 |
| Figura 35 - Análise do pico de intensidade de fluorescência nas linhagens celulares MDA MB-468 e M059J. O gráfico revela o tempo de incubação em horas no eixo x por pico de intensidade de fluorescência no eixo y. Os círculos representam a linha celular MDA-MB-468 e os quadrados representam a linha celular M059J. Sumarização de todas as regiões de intensidades de fluorescência. | 72 |
| Figura 36 - Análise do pico de intensidade de fluorescência nos esferoides. O gráfico revela o tempo de incubação em horas no eixo x por pico de intensidade de fluorescência no eixo y. Sumarização de todas as regiões de intensidades de fluorescência. | 73 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 – Detalhamento de grupos experimentais para a marcação de proteínas dos esferoides. | 50 |
| Tabela 2 – Detalhamento de grupos experimentais para a análise da atividade metabólica em monocamada. | 51 |
| Tabela 3 – Detalhamento de grupos experimentais para a análise da via de morte celular em esferoides. | 52 |
| Tabela 4 – Detalhamento de grupos experimentais para a análise da internalização dos bionanossensores no microambiente celular..... | 54 |
| Tabela 5 – Detalhamento de grupos experimentais para a análise da via de morte celular em esferoides. | 55 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-------------------------------|--|
| Aids | Síndrome da Imunodeficiência Humana |
| AR | Anfirregulina |
| AuNPs | Nanopartículas de ouro |
| BTC | Betacelulina |
| Ce6 | Clorina e6 |
| CO₂ | Dióxido de carbono |
| EGF | Proteína do Fator de Crescimento Epidérmico, do inglês <i>Epidermal Growth Factor</i> |
| EGFR | Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico, do inglês <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i> |
| EHT | Tensão de Aceleração dos Elétrons, do inglês <i>Electron High Tension</i> |
| EPR | Epiregulina |
| ER | Receptor de Estrogênio, do inglês <i>Estrogen Receptor</i> |
| GCO | Observatório Global de Câncer, do inglês <i>Global Cancer Observatory</i> |
| HB-EGF | Fator de Crescimento semelhante ao EGF ligado a Heparina |
| INCA | Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva |
| MEV | Microscopia Eletrônica de Varredura |
| NRG1 | Neuregulina 1 |
| NRG2 | Neuregulina 2 |
| NRG3 | Neuregulina 3 |
| NRG4 | Neuregulina 4 |
| NSCLC | Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas, do inglês <i>Non-Small Cell Lung Cancer</i> |
| PBS | Tampão Fosfato Salino, do inglês <i>Phosphate Saline Buffer</i> |
| PR | Receptor de Progesterona, do inglês <i>Progesterone Receptor</i> |
| RM | Ressonância Magnética |
| RTK | Receptores Tirosina Quinase, do inglês <i>Receptor Tyrosine Kinase</i> |
| sEGFR | Superexpressão de EGFR |
| SUS | Sistema Único de Saúde |
| TGFα | Fator de Crescimento Transformante Alfa, do inglês <i>Transforming Growth Factor Alpha</i> |

TNBC Câncer De Mama Triplo Negativo, do inglês *Triple-Negative Breast Cancer*

WD Detector sem Janelas, do inglês *Windowless Detector*

SUMÁRIO

| | | |
|--------------|--|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 20 |
| 1.1 | OBJETIVOS..... | 22 |
| 2 | REVISÃO DE LITERATURA..... | 23 |
| 2.1 | RECEPTOR DO FATOR DE CRESCIMENTO EPIDÉRMICO | 23 |
| 2.2 | MUTAÇÕES NO GENE <i>EGFR</i> E DOENÇAS ASSOCIADAS..... | 25 |
| 2.3 | TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS PARA DETECÇÃO DE MUTAÇÕES NO GENE EGFR..... | 28 |
| 2.4 | NANOTECNOLOGIA E BIONANOSSENSORES..... | 30 |
| 2.5 | MÉTODOS DIAGNÓSTICOS EM CITOMETRIA DE FLUXO | 35 |
| 2.6 | CLORINA E6 | 37 |
| 3 | MATERIAL E MÉTODOS..... | 39 |
| 3.1 | SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS BIONANOSSENSORES..... | 39 |
| 3.2 | CULTURA CELULAR | 44 |
| 3.2.1 | Cultura celular em monocamada | 45 |
| 3.2.2 | Cultura celular tridimensional | 46 |
| 3.3 | ANÁLISE HISTOLÓGICA DO MICROAMBIENTE CELULAR TRIDIMENSIONAL | 47 |
| 3.4 | ANÁLISE MORFOLÓGICA DO MICROAMBIENTE CELULAR TRIDIMENSIONAL | 48 |
| 3.5 | MARCAÇÃO DE PROTEÍNAS DOS ESFEROIDES POR IMUNOFLOURESCÊNCIA | 49 |
| 3.6 | ANÁLISE DA ATIVIDADE METABÓLICA EM MONOCAMADA..... | 51 |
| 3.7 | ANÁLISE DA VIA DE MORTE CELULAR EM ESFEROIDES | 52 |
| 3.8 | ANÁLISE DA INTERNALIZAÇÃO DOS BIONANOSSENSORES NO MICROAMBIENTE CELULAR..... | 53 |
| 3.9 | DETERMINAÇÃO DA INTENSIDADE DE FLUORESCÊNCIA EMITIDA PELO BIONANOSSENSOR..... | 55 |
| 4 | RESULTADOS | 57 |
| 4.1 | SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS BIONANOSSENSORES..... | 57 |
| 4.2 | ANÁLISE HISTOLÓGICA DO MICROAMBIENTE CELULAR TRIDIMENSIONAL | 58 |

| | | |
|-----|--|-----------|
| 4.3 | ANÁLISE MORFOLÓGICA DO MICROAMBIENTE CELULAR TRIDIMENSIONAL | 60 |
| 4.4 | MARCAÇÃO DE PROTEÍNAS DOS ESFEROIDES POR IMUNOFLORESCÊNCIA | 62 |
| 4.5 | ANÁLISE DA ATIVIDADE METABÓLICA EM MONOCAMADA | 66 |
| 4.6 | ANÁLISE DA VIA DE MORTE EM ESFEROIDES..... | 67 |
| 4.7 | ANÁLISE DA INTERNALIZAÇÃO DOS BIONANOSSENSORES NO MICROAMBIENTE CELULAR..... | 68 |
| 4.8 | DETERMINAÇÃO DA INTENSIDADE DE FLUORESCÊNCIA EMITIDA PELO BIONANOSSENSOR..... | 71 |
| 5 | DISCUSSÃO | 74 |
| 6 | CONCLUSÃO..... | 79 |
| | REFERÊNCIAS | 80 |
| | APÊNDICE A – ARTIGO “CHLORIN E6-EGF CONJUGATED GOLD NANOPARTICLES AS A NANOMEDICINE BASED THERAPEUTIC AGENT FOR TRIPLE NEGATIVE BREAST CANCER” PUBLICADO NO PERÍODO. | 84 |
| | APÊNDICE B – ARTIGO “TRIPLE-NEGATIVE BREAST CANCER TREATMENT IN XENOGRAFT MODELS BY BIFUNCTIONAL NANOPROBES COMBINED TO PHOTODYNAMIC THERAPY” PUBLICADO NO PERÍODO..... | 85 |
| | APÊNDICE C – ARTIGO “NANOMARKERS FLUORESCENCE: IN VITRO ANALYSIS FOR EGFR OVEREXPRESSED CELLS IN TRIPLE-NEGATIVE BREAST CANCER AND MALIGNANT GLIOBLASTOMA” PUBLICADO NO PERÍODO. | 86 |
| | ANEXO A – ESPECIFICAÇÕES DO FABRICANTE MICROTISSUES, INC SOBRE A FABRICAÇÃO DOS MICROMOLDES DE AGAROSE. | 87 |
| | ANEXO B – ESPECIFICAÇÕES DO FABRICANTE MICROTISSUES, INC SOBRE A MANIPULAÇÃO DOS ESFEROIDES FORMADOS EM MICROMOLDES DE AGAROSE. | 88 |
| | ANEXO C – ESPECIFICAÇÕES DO REAGENTE DE ANTICORPO ANTI-PAXILINA COMERCIALIZADO PELA SIGMA..... | 89 |
| | ANEXO D – ESPECIFICAÇÕES DO REAGENTE DE ANTICORPO ANTI-ACTINA COMERCIALIZADO PELA SIGMA. | 90 |

| | |
|--|------------|
| ANEXO E – ESPECIFICAÇÕES DO REAGENTE DE ANTICORPO ANTI-FIBRONECTINA COMERCIALIZADO PELA SIGMA..... | 91 |
| ANEXO F – ESPECIFICAÇÕES DO REAGENTE DE ANTICORPO ANTI-β-INTEGRINA COMERCIALIZADO PELA SIGMA. | 92 |
| ANEXO G – ESPECIFICAÇÕES DO REAGENTE DE ANTICORPO ANTI-LAMININA COMERCIALIZADO PELA SIGMA | 93 |
| ANEXO H – ESPECIFICAÇÕES DO REAGENTE DE ANTICORPO ANTI- E-CADERINA COMERCIALIZADO PELA SIGMA..... | 94 |
| ANEXO I – RESUMOS APRESENTADOS EM CONFERÊNCIAS INTERNACIONAIS..... | 95 |
| ANEXO J – RESUMOS APRESENTADOS EM CONFERÊNCIAS NACIONAIS | 100 |

1 INTRODUÇÃO

O Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico (EGFR) é uma glicoproteína que pertence à subclasse do receptor tirosina quinase (HYNES; LANE, 2005; KJAER *et al.*, 2018; SAIYAROS *et al.*, 2019). No contexto genômico, o gene EGFR codifica este receptor, que é expresso em vários órgãos, incluindo placenta, pulmão, pele e tireoide (HYNES; LANE, 2005; KJAER *et al.*, 2018; SAIYAROS *et al.*, 2019).

O EGFR é situado na membrana celular e possui três regiões estruturais: extracelular, transmembrana e intracelular. O domínio extracelular serve como um domínio de ligação extracelular. Esta região é especializada para ligantes como a EGF. O domínio transmembranar lipofílico permeia a membrana celular, aumentando a comunicação intracelular e extracelular. O domínio intracelular é uma região hidrofóbica intracelular que está envolvida na atividade da tirosina quinase (HYNES; LANE, 2005; KJAER *et al.*, 2018; SAIYAROS *et al.*, 2019; YANG *et al.*, 2017). O EGFR é ativado por ligantes específicos extracelulares, como a proteína EGF. A ativação do domínio extracelular ocorre pela ligação e dimerização ligante-receptor. A dimerização gera sinais intracelulares que são transduzidos por processos moleculares, ativando uma cascata de sinalização e transcrevendo genes. A ativação da via aumenta as funções celulares, como proliferação, adesão, diferenciação e invasão (HYNES; LANE, 2005; KJAER *et al.*, 2018; SAIYAROS *et al.*, 2019; SUN *et al.*, 2017).

A mutação do gene ou distúrbio atípico dessa via pode causar a ativação anormal do gene EGFR. Visto que os éxons 18 a 21 do gene EGFR codificam a atividade da tirosina quinase deste receptor, e a ativação anormal pode resultar na superexpressão do receptor EGFR (sEGFR). A sEGFR leva à sinalização mitogênica e a uma variedade de ações celulares, que promovem a formação de tumores, com o aumento do potencial de proliferação celular, da angiogênese e a resistência à apoptose. A quebra de complexos de junção prejudica a adesão celular e contribui para a motilidade e o fenótipo invasivo (HYNES; LANE, 2005; KJAER *et al.*, 2018; SAIYAROS *et al.*, 2019; SUN *et al.*, 2017; YANG *et al.*, 2018).

Como resultado, as mutações do gene EGFR causam os fenótipos mais agressivos em algumas doenças, como glioblastoma, câncer de pulmão e câncer de mama (LEMMON; SCHLESSINGER; FERGUSON, 2014). A sEGFR é encontrada em 60% dos pacientes com glioblastoma primário e em 10% dos casos de glioblastoma secundário (LEMMON; SCHLESSINGER; FERGUSON, 2014; XU *et al.*, 2017). O

câncer de pulmão de células não pequenas também é afetado pela mutação do gene EGFR, que é responsável por 85% dos pacientes com câncer de pulmão, com uma taxa de sobrevida em 5 anos de 17% (LEMMON; SCHLESSINGER; FERGUSON, 2014; ROENGVORAPHOJ *et al.*, 2013). Porém, a sEGFR é associada a 50% das ocorrências de câncer de mama triplo negativo, sendo caracterizado pela alta taxa de crescimento, recorrência e metástase (LEMMON; SCHLESSINGER; FERGUSON, 2014; SUN *et al.*, 2017; UENO; ZHANG, 2011).

A biologia molecular e a imuno-histoquímica são abordagens amplamente utilizadas para a detecção do gene EGFR. Após investigação anatomopatológica, a biologia molecular mapeia sequências específicas de genes somáticos. Este método é bem conhecido para diagnóstico de genes e subtipagem (GOMES *et al.*, 2018; KARLOVICH *et al.*, 2016; RAMOS *et al.*, 2019). Na imuno-histoquímica, os anticorpos monoclonais associados a cromógenos identificam a expressão de proteínas, que estão relacionadas aos genes expressos da amostra, identificando variáveis prognósticas e preditivas da doença (GOMES *et al.*, 2018; KARLOVICH *et al.*, 2016; RAMOS *et al.*, 2019; SUN *et al.*, 2017; YANG *et al.*, 2018).

Dessa forma, a comunidade científica tem buscado o desenvolvimento de novas tecnologias para os procedimentos padrão na área da saúde, aumentando a especificidade e a sensibilidade dos diagnósticos. Como resultado, vários estudos buscam desenvolvimento de técnicas para detecção do EGFR, principalmente na área da nanomedicina (FURRER *et al.*, 2016; GOMES *et al.*, 2018; KARLOVICH *et al.*, 2016; RAMOS *et al.*, 2019; ROENGVORAPHOJ *et al.*, 2013; SUN *et al.*, 2017; XU *et al.*, 2017).

Embora o gene EGFR tenha sido extensivamente estudado para o diagnóstico de diversas mutações, a sEGFR em células ainda é pouco explorada no campo da nanomedicina. O objetivo deste estudo é investigar bionanossensores fluorescentes na detecção do EGFR, por meio de ensaios *in vitro*, em cultura celular 2D e 3D. Estes bionanossensores são compostos por complexos de proteína EGF e Clorina e6 (Ce6) que foram funcionalizados em nanopartículas de ouro (AuNPs). Essas AuNPs são carreadoras da Ce6 e da proteína EGF para ligar a EGFR, enquanto que a Ce6 funciona como uma molécula marcadora, exibindo fluorescência sob excitação de luz (AMIRSHAGHAGHI *et al.*, 2019; KJAER *et al.*, 2018; PELAZ *et al.*, 2017; SAIYAROS *et al.*, 2019; TENG *et al.*, 2021; VAN DER MEEL *et al.*, 2019). É importante ressaltar que este é o primeiro trabalho em cultura 3D do grupo de pesquisa.

1.1 OBJETIVOS

Analisar o comportamento *in vitro* de fluorescência dos bionanossensores nas linhagens celulares MDA-MB-468 e M059J e assim investigar seu potencial diagnóstico, em cultura celular 2D e 3D. Os objetivos específicos são:

- a) Sintetizar o bionanossensor e caracterizá-lo por espectroscopia de UV- Visível;
- b) Desenvolver a cultura 3D e caracterizar os esferoides por histologia, MEV e imunofluorescência;
- c) Aplicar o bionanossensor nas linhagens celulares MDA-MB-468 e M059J, em cultura celular 2D e 3D;
- d) Analisar a atividade metabólica nas culturas celulares em monocamada, pelo ensaio de MTT;
- e) Analisar a via de morte celular em esferoides, pela citometria de fluxo;
- f) Analisar a internalização do bionanossensor nas células, pela microscopia de fluorescência e confocal;
- g) Determinar a intensidade de fluorescência emitida pelo bionanossensor, pela citometria de fluxo.

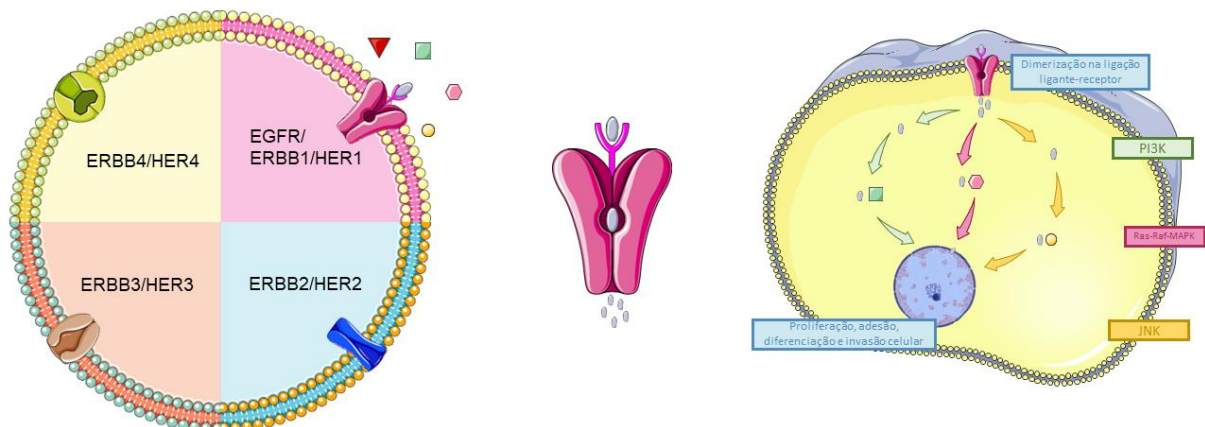
2 REVISÃO DE LITERATURA

A literatura científica acerca dos principais assuntos (câncer, diagnóstico, nanotecnologia) abordados nesta dissertação é muito extensa. Com isso, o estado da arte das questões abordadas é descrito neste capítulo de revisão de literatura, por uma estrutura conceitual que enfatiza a importância do desenvolvimento de novos métodos diagnósticos. Neste caso, diagnósticos específicos com uso da nanotecnologia para os cânceres com superexpressão de EGFR.

2.1 RECEPTOR DO FATOR DE CRESCIMENTO EPIDÉRMICO

O EGFR é uma glicoproteína que pertence à subclasse de receptores tirosina quinase (RTK). A subclasse I dos RTKs é composta por quatro membros, apresentados na Figura 1: EGFR/ERBB1/HER1, ERBB2/HER2, ERBB3/HER3 e ERBB4/HER4. Todos estes membros possuem uma região extracelular de ligação para os ligantes específicos, uma região transmembrana entre as regiões extra e intracelular; e uma região citoplasmática responsável pela atividade tirosina-quinase (CHEN *et al.*, 2021; HYNES; LANE, 2005; LEMMON; SCHLESSINGER; FERGUSON, 2014).

Figura 1 – Esquema de representação dos membros da família EGFR, regiões estruturais e cascata de eventos intracelulares.

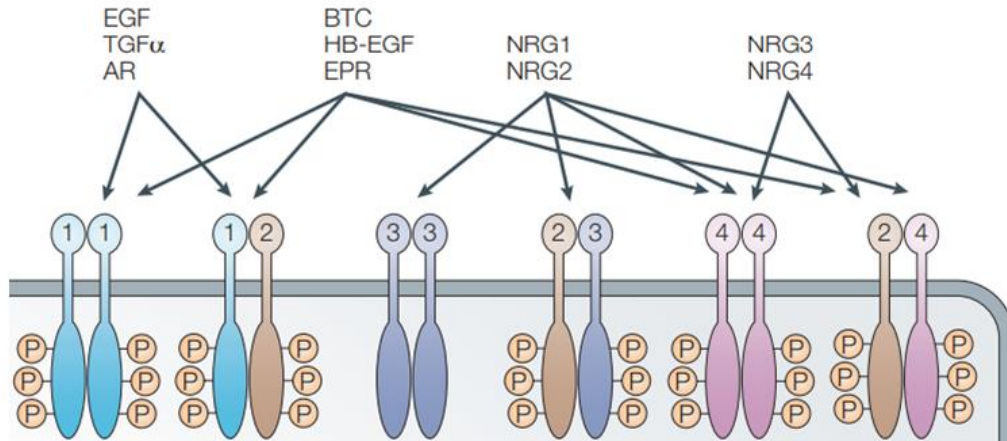


Fonte: Elaborado pela autora (2022).

A Figura 2 apresenta os receptores da classe ERBB e seus ligantes, membros da família de fatores de crescimento epidérmico. Os ligantes específicos para o EGFR

são o EGF, TGF α , AR, BTC, HB-EGF e EPR (HYNES; LANE, 2005; KJAER *et al.*, 2018).

Figura 2 - Receptores membros da família ERBB e seus ligantes, da família de fatores de crescimento epidérmico (EGF).



Nota: EGF - fator de crescimento epidérmico, TGF α - fator de crescimento transformante alfa, AR - anfirregulina, BTC - betacelulina, HB-EGF - fator de crescimento semelhante ao EGF ligado a heparina, EPR – epiregulina, NRG1 - neuregulina 1, NRG2 - neuregulina 2, NRG3 - neuregulina 3, NRG4 - neuregulina 4.

Fonte: Adaptado de Hynes; Lane (2005).

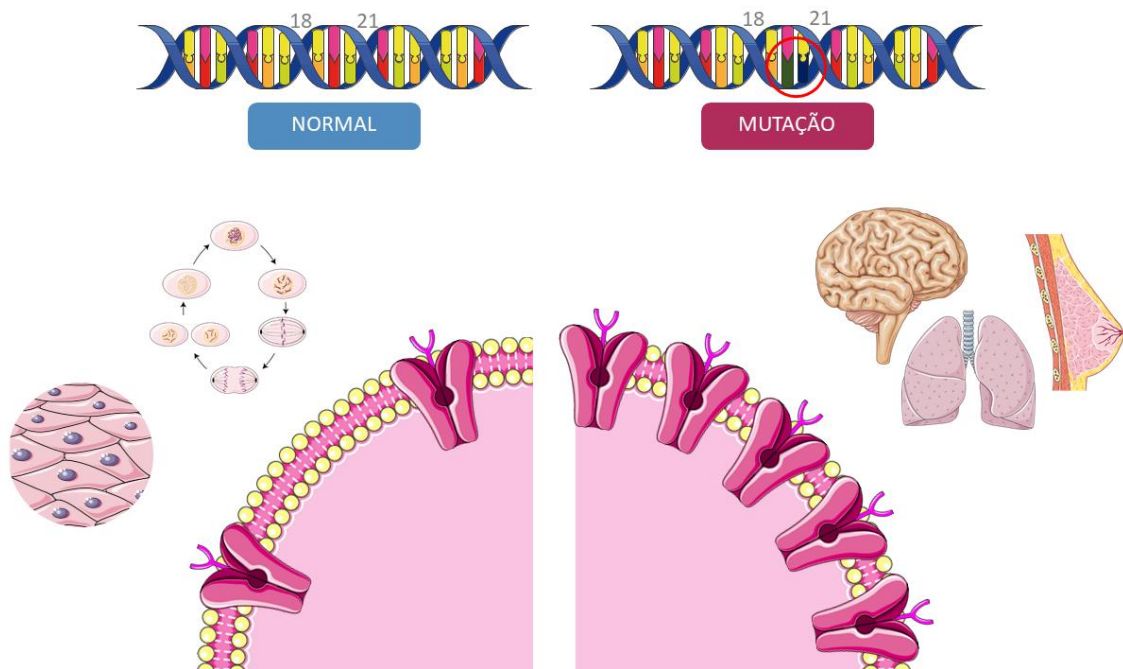
A associação entre o ligante e o receptor pelos domínios I e III da região extracelular, induz a ativação dos receptores e sua consequente dimerização (Figura 1). A dimerização pode acontecer entre homodímeros (receptores iguais, como EGFR/EGFR) ou heterodímeros (receptores diferentes, como ERBB2/ERBB4). Esta dimerização resulta na internalização do receptor e consequente fosforilação de resíduos específicos de tirosina na região intracelular. Esta fosforilação ancora várias proteínas, desencadeando a transdução de sinais e a consequente cascata de eventos intracelulares. Logo, o complexo ligante-receptor é internalizado, o ligante degradado e o receptor retorna para o domínio original da membrana, dando início a um novo processo de sinalização (HYNES; LANE, 2005; KARLOVICH *et al.*, 2016; KJAER *et al.*, 2018; SUN *et al.*, 2017).

O processo de sinalização pode mediar sinalizações mitogênicas e promover o *downregulation*, ou seja, controlar a expressão na membrana plasmática. O controle da sinalização mitogênica e o *downregulation* controlam respostas biológicas como a proliferação, adesão, diferenciação, migração celular, além da modulação da apoptose (Figura 1) (SUN *et al.*, 2017). Dessa forma, mutações e superexpressões deste receptor são frequentemente relacionadas a doenças hiperproliferativas, como o câncer (CHEN *et al.*, 2021; HARDBOWER *et al.*, 2017; HYNES; LANE, 2005).

2.2 MUTAÇÕES NO GENE *EGFR* E DOENÇAS ASSOCIADAS

O gene *EGFR* codifica o EGFR, expresso em vários tecidos de origem epitelial, mesenquimal e neuronal, conforme apresentado pela Figura 3 (FAGERBERG *et al.*, 2013; SAIYAROS *et al.*, 2019). Logo, visto que os éxons 18 a 21 do gene *EGFR* codificam a atividade da tirosina quinase do receptor, a ativação anormal pode resultar no descontrole das sinalizações mitogênicas e *downregulation*, desencadeando a superexpressão do receptor EGFR (FAGERBERG *et al.*, 2013; HYNES; LANE, 2005; KJAER *et al.*, 2018; SUN *et al.*, 2017).

Figura 3 – Esquema representativo da expressão normal e da mutação do EGFR.



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

A superexpressão e ativação de EGFR pode ocorrer por diversos mecanismos. Entre eles, estão o aumento exacerbado da produção de ligantes específicos; ativação do receptor por deleção múltipla de éxons¹ ou mutações missense²; aumento da proteína do receptor pela amplificação de genes; e o mau funcionamento da degradação do receptor. A superexpressão e ativação do EGFR acentuam os traços característicos das células cancerígenas, como aumento da

¹ Perda ou deleção de parte do DNA.

² Alteração de uma das bases do DNA, codificando um aminoácido diferente.

sobrevivência celular, proliferação e invasão (LI *et al.*, 2019; XU *et al.*, 2017; YANG *et al.*, 2018).

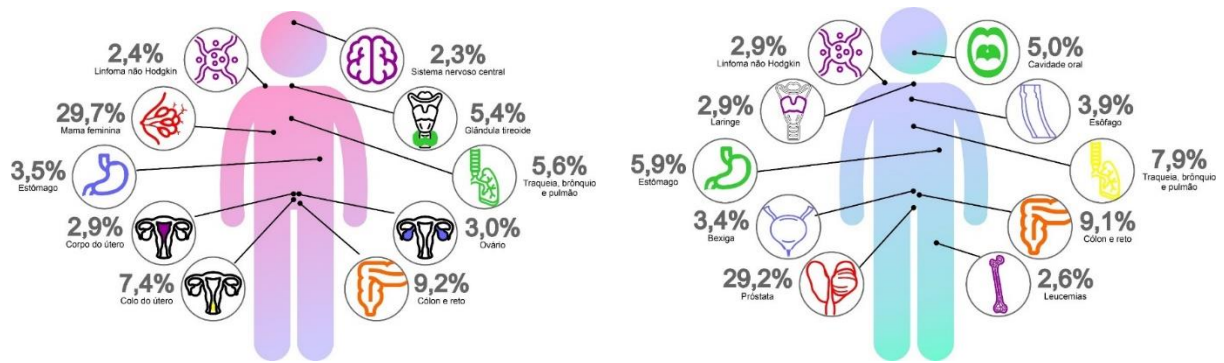
A superexpressão do EGFR (sEGFR) leva a um conjunto de ações celulares que promovem a formação de tumores, que podem ser comumente relacionados a proliferação celular, resistência à apoptose e angiogênese, quebra de complexos de junção prejudicando a adesão celular, contribuição para a motilidade e fenótipo invasivo. Como resultado, a sEGFR derivada das mutações do gene *EGFR*, sendo muito comum em algumas doenças como o câncer, como os de pulmão, o glioblastoma e o câncer de mama (Figura 3) (GOMES *et al.*, 2018; KJAER *et al.*, 2018; LEMMON; SCHLESSINGER; FERGUSON, 2014; SAIYAROS *et al.*, 2019; SUN *et al.*, 2017).

Segundo o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), o câncer é o principal problema mundial de saúde pública. Sendo considerado uma entre as quatro principais causas de morte prematura, ou seja, antes dos 70 anos de idade. A incidência e mortalidade do câncer aumentam com o envelhecimento, crescimento populacional e fatores de risco. Estes fatores, associados ao desenvolvimento socioeconômico, como a incorporação de hábitos e atitudes associados à urbanização, como o sedentarismo, alimentação inadequada, entre outros, intensifica ainda mais a incidência (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2019).

Com isso, o INCA provê estimativas de novos casos de incidência de câncer no Brasil, para todos os anos, considerando 19 localizações primárias específicas no corpo humano. A estimativa foi desenvolvida com base em modelos de predição de curto prazo ou pela razão incidência/mortalidade, de metodologia análoga às estimativas realizadas para o Global Cancer Observatory³ pela Organização Mundial de Saúde (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2019). Na Figura 4 é mostrado as taxas de incidência de câncer em mulheres (Figura 4a) e homens (Figura 4b) para o triênio 2020-2022.

Figura 4 – Taxas de incidência de câncer no Brasil em a) mulheres e b) homens no triênio 2020-2022.

³GCO. Plataforma da International Agency for Research on Cancer (Organização Mundial da Saúde), apresenta estatísticas globais de câncer, para controle e pesquisa.



Nos cânceres de pulmão de células não pequenas (NSCLC, do inglês *non-small cell lung cancer*), a sEGFR está igualmente presente. As mutações são mais comuns na região intracelular do receptor, o que corresponde, geneticamente, em deleções no éxon 19 e uma mutação no éxon 21. Ambas as mutações são responsáveis por aproximadamente 80-90% das mutações detectadas no EGFR. O NSCLC é responsável por mais de 85% dos casos de câncer de pulmão em adenocarcinomas (40%), carcinoma de células escamosas (25%) e carcinoma de grandes células (10%). Aproximadamente 15% dos pacientes com câncer de pulmão apresentam doença localizada, i.e., sendo um câncer de alto índice metastático. Logo, a taxa global de sobrevivência, em 5 anos, é de apenas 17% para todos os estágios do NSCLC. As mutações de ativação do EGFR para esta doença são mais comuns em mulheres, não fumantes e adenocarcinoma (LEMMON; SCHLESSINGER; FERGUSON, 2014; LI *et al.*, 2019; ROENGVORAPHOJ *et al.*, 2013; YANG *et al.*, 2018).

A sEGFR é encontrada em aproximadamente 60% dos glioblastomas primários e em 10% dos glioblastomas secundários, caracterizando fenótipos de glioblastoma mais agressivos. Além da superexpressão, vários mecanismos induzem a ativação anormal de EGFR em glioblastomas, como a expressão autócrina⁴ aumentada de ligantes específicos. A amplificação e mutação do gene *EGFR* também aumenta a ativação do receptor EGFR, presente em mais de 57% dos glioblastomas. Destas, as mutações de EGFR de domínio extracelular são mais comumente observadas em glioblastoma (LEMMON; SCHLESSINGER; FERGUSON, 2014; XU *et al.*, 2017).

⁴ Ligante liberado no meio extracelular ativa a própria célula que o liberou.

No mundo, mais de 1,5 milhão de mulheres (25% de todas as mulheres com câncer) são diagnosticadas com câncer de mama todos os anos. Os fatores de risco mais comuns são gênero, envelhecimento, histórico familiar, mutações genéticas e estilo de vida pouco saudável (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2019; LEMMON; SCHLESSINGER; FERGUSON, 2014; SUN *et al.*, 2017).

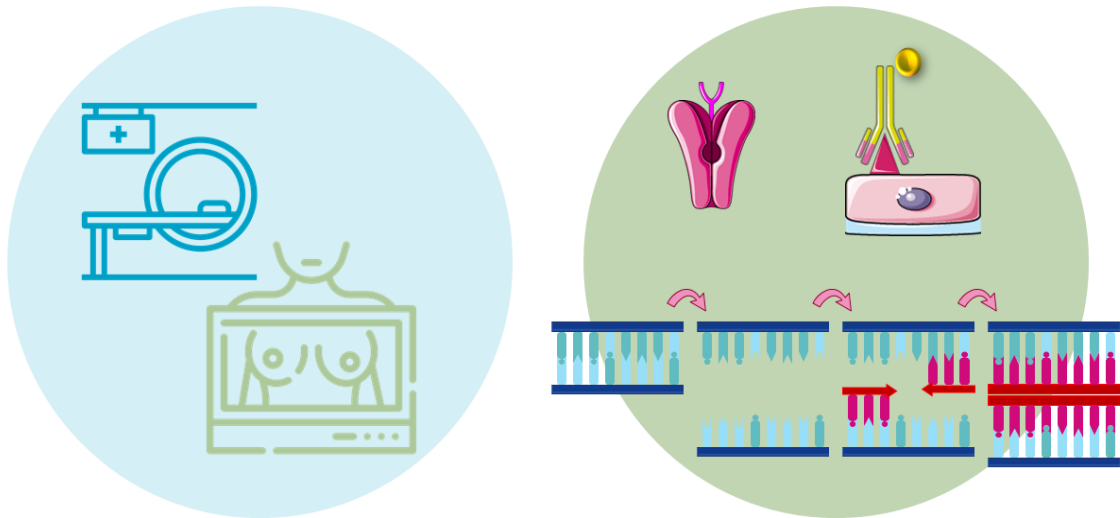
O câncer de mama triplo negativo (TNBC, do inglês triple-negative breast cancer) possui como característica “negativo” para: receptor de estrogênio (ER-), receptor de progesterona (PR-) e HER2 (HER2-). O TNBC representa pelo menos 20% dos cânceres de mama, é altamente proliferativo, agressivo e possui o pior prognóstico quando comparado a outros subtipos de câncer de mama (como o HER2+ ou ER+). Mais de 50% dos casos de TNBC apresentam sEGFR. A causa de morte de pacientes com TNBC é frequentemente devido a recorrência/reincidência (30-40% dos casos de TNBC), que se apresenta como metástase (CHEN *et al.*, 2021; SUN *et al.*, 2017).

A metástase do câncer de mama pode ocorrer em órgãos distantes, como ossos, fígado, pulmão e cérebro, o que explica principalmente a dificuldade no tratamento e cura. A metástase deste tumor causa mais de 90% das mortes por câncer. Portanto, o diagnóstico precoce da doença pode levar a um bom prognóstico e uma alta taxa de sobrevida (CHEN *et al.*, 2021; SUN *et al.*, 2017).

2.3 TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS PARA DETECÇÃO DE MUTAÇÕES NO GENE EGFR

As superexpressões e mutações de EGFR podem ser detectadas por meio de uma variedade de métodos, invasivos ou não-invasivos, representados na Figura 5. Atualmente, ainda não há consenso ou recomendação para a implementação de testes padronizados na prática clínica, destinados a detecção de mutações de EGFR (KJAER *et al.*, 2018; ROENGVORAPHOJ *et al.*, 2013; SUN *et al.*, 2017).

Figura 5 – Esquema representativo dos métodos diagnósticos invasivos e não-invasivos para a detecção da mutação do EGFR.



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Entre os métodos não-invasivos, a mamografia e a ressonância magnética (RM) são ferramentas de rastreamento amplamente utilizadas para o câncer de mama (Figura 5). A RM é mais sensível que a mamografia em alguns casos, devido às limitações de detecção da mamografia em mamas densas e em mulheres até 50 anos. No entanto, não há benefícios identificados da RM no prognóstico de pacientes ou na taxa de detecção de recorrência do tumor. Ademais, a especificidade da RM para diagnóstico de cânceres de mama é inferior à mamografia. A ultrassonografia direta de mama também é uma opção, mas requer alta experiência do operador (LEMMON; SCHLESSINGER; FERGUSON, 2014; SUN *et al.*, 2017).

Dentre os métodos invasivos, a biologia molecular e a imuno-histoquímica são abordagens atualmente disponíveis para a detecção do gene EGFR (Figura 5). Após investigação anatomopatológica, a biologia molecular mapeia sequências específicas de genes somáticos. Na imuno-histoquímica, a expressão de proteínas relacionadas aos genes da amostra é identificada por anticorpos monoclonais específicos marcados com cromógenos, que identificam as variáveis prognósticas e preditivas da doença (GOMES *et al.*, 2018; KARLOVICH *et al.*, 2016; RAMOS *et al.*, 2019). Porém, estas técnicas requerem grandes porções de amostra, mão de obra especializada e demanda tempo de processamento, mas existe limitações na identificação de mutações incomuns.

Entretanto, os procedimentos padrão estão em constante desenvolvimento, de forma a aumentar a especificidade e a sensibilidade dos diagnósticos. Os

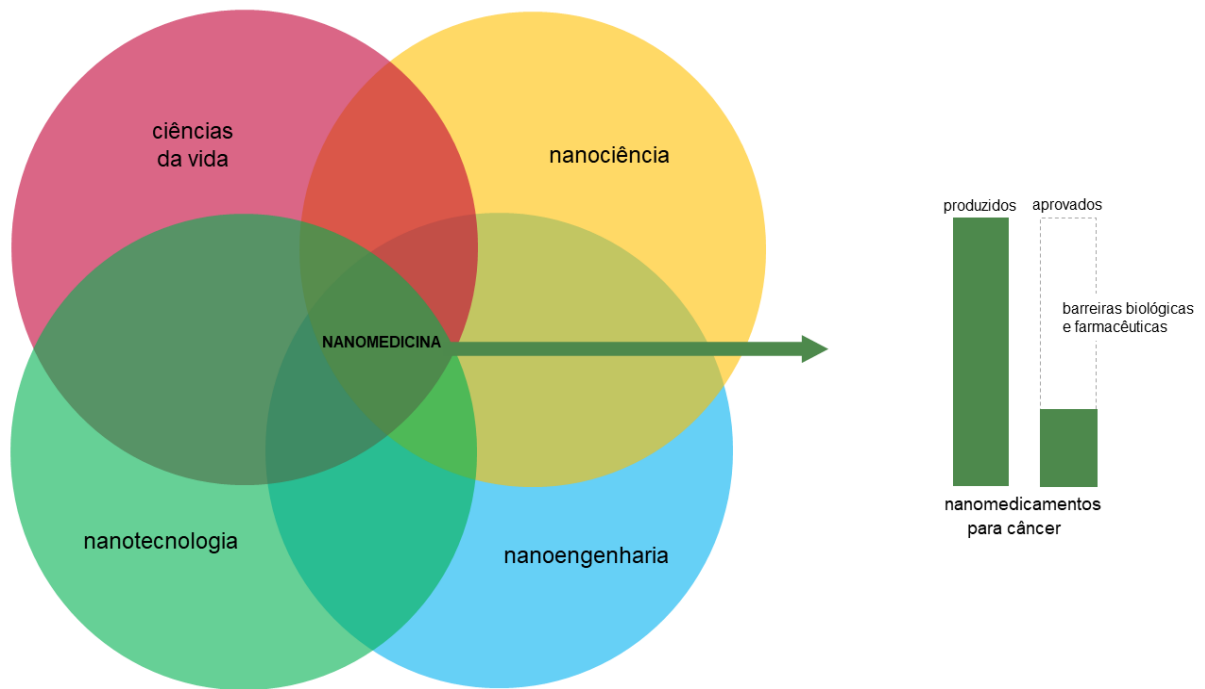
preditores mais confiáveis da sensibilidade do EGFR são as mutações que envolvem o próprio EGFR. O diagnóstico de mutações somáticas da região intracitoplasmática (responsável pela atividade tirosina quinase) do EGFR no diagnóstico de NSCLC tem sido cada vez mais utilizado. Embora não haja um consenso sobre a escolha do métodos de detecção das mutações do EGFR, a National Comprehensive Cancer Network (NCCN) recomenda o teste de mutação de EGFR para adenocarcinomas, células grandes e NSCLC (CHEN *et al.*, 2021; KJAER *et al.*, 2018; ROENGVORAPHOJ *et al.*, 2013). Como resultado, a precisão da detecção do receptor EGFR é extremamente útil na prática de saúde. Com isso, há a necessidade de elucidar um biomarcador robusto, independentemente da heterogeneidade do tumor para um avanço no tratamento dos cânceres com sEGFR.

A nanotecnologia vem revolucionando o tratamento e diagnóstico de doenças, corroborando para diagnósticos mais rápidos e precisos. Esta área de atuação junto a saúde é conhecida como nanomedicina (FURRER *et al.*, 2016; GOMES *et al.*, 2018; KARLOVICH *et al.*, 2016; RAMOS *et al.*, 2019; ROENGVORAPHOJ *et al.*, 2013; SUN *et al.*, 2017; XU *et al.*, 2017).

2.4 NANOTECNOLOGIA E BIONANOSSENSORES

A nanotecnologia engloba a observação, manipulação e controle de materiais na escala nanométrica (1 a 100nm; $1\text{nm} = 10^{-9}\text{m}$). Esta compreende ciência, engenharia e tecnologia, em que, fenômenos únicos intrínsecos permitem novas aplicações em vários campos de estudo, como a química, física, biologia, medicina, engenharia e eletrônica (BAYDA *et al.*, 2020; HE; DENG; HWANG, 2019).

Figura 6 – Esquema representativo da formação da nanomedicina e seu principal produto.



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

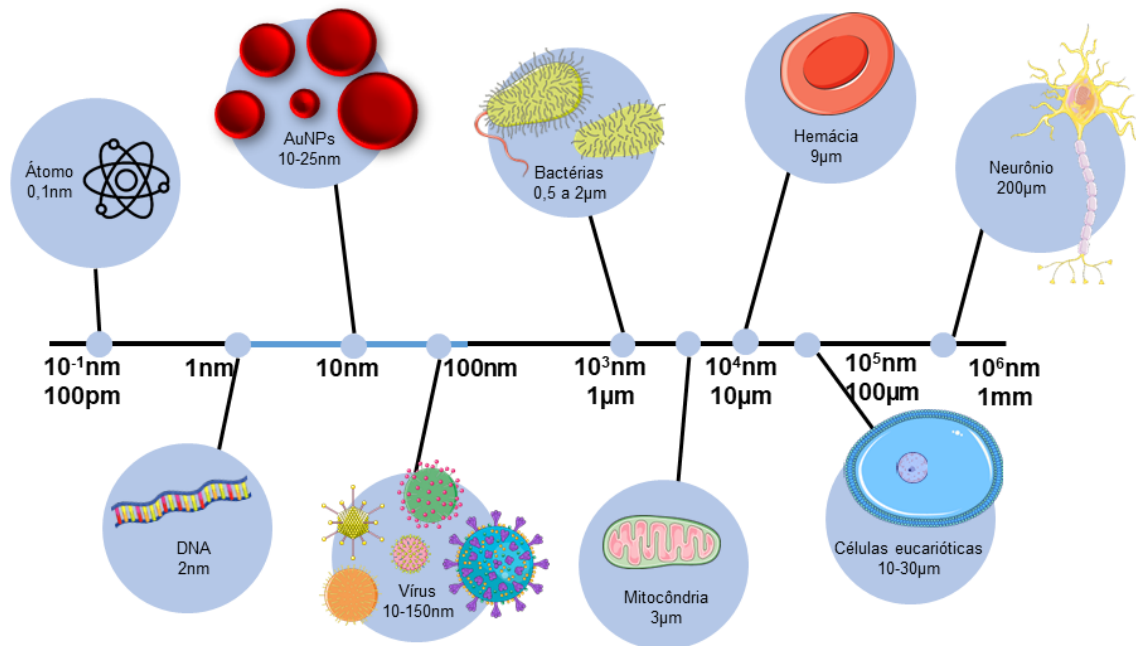
Os materiais nanoestruturados podem ser sintetizados por duas metodologias diferentes, sendo elas *top-down* e *bottom-up*. Dentro da metodologia *top-down*, um material é fragmentado até atingir tamanho nanométrico. Por outro lado, dentro da metodologia *bottom-up*, um material é construído dentro da nanoescala, átomo por átomo ou molécula por molécula, por síntese química ou física. Estes materiais podem ser nanopartículas, nanocompósitos, nanorobôs, nanotubos, etc (BAYDA *et al.*, 2020).

As nanopartículas são utilizadas desde o século IV a.C., e desde então têm sido utilizadas nas mais diversas áreas. Um dos mais antigos exemplos famosos é a taça de Licurgo, que se apresenta na cor verde na luz refletida e vermelha quando em luz transmitida. Esta taça possui composição de vidro em duas cores, dado a presença de nanopartículas de ouro e prata em diâmetros de 50 a 100 nm. Estas também foram largamente encontradas em vitrais de antigas catedrais (BAYDA *et al.*, 2020).

Dentre o histórico de progresso em nanotecnologia, é possível destacar algumas técnicas e equipamentos, como o microscópio de força atômica, microscopia eletrônica de transmissão, microscopia eletrônica de varredura, difração de raios-x, entre outros. Apesar do uso interdisciplinar, essas técnicas correspondem à evolução dentro da física. Outras áreas, como a química, biologia, as engenharias e a ciência da computação se beneficiam igualmente. Dentro da biologia, por exemplo, as

medidas de um anticorpo, uma bactéria ou um vírus foram coletadas devido ao avanço da nanotecnologia (BAYDA *et al.*, 2020). A figura 7 apresenta alguns materiais na escala nanométrica.

Figura 7 – Escala nanométrica com apresentação de alguns materiais.



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Desde o século XX, a nanotecnologia tem sido extensivamente aplicada na área biomédica, dado o desenvolvimento de nanoestruturas inteligentes de ação direta em interações biomoleculares. Estas nanoestruturas podem contornar os obstáculos que impedem o sucesso das abordagens farmacológicas tradicionais. Por isso, a bionanotecnologia é considerada um dos campos mais intrigantes de aplicação da nanociência. Nas últimas décadas, as aplicações biológicas da nanotecnologia têm crescido cada vez mais objetos de estudo, oferecendo excelentes resultados. Alguns exemplos são as nanoestruturas utilizadas para entrega de drogas (drug delivery), medicina regenerativa, oncologia, combate de infecções bacterianas, vacinas, doenças degenerativas, toxicologia, diagnósticos por imagem e detecção de biomarcadores (BAYDA *et al.*, 2020; CONTERA; DE LA SERNA; TETLEY, 2021).

A nanotecnologia se envolve em um campo interdisciplinar com a nanociência e a nanoengenharia, dando origem à nanomedicina. Esta abrange uma ampla gama de pesquisa e desenvolvimento, que se difere de outros tipos de medicina (PELAZ *et al.*, 2017).

Dentro da área oncológica, pode ser observado que a maior parte dos piores prognósticos são devido a um diagnóstico tardio. Dessa forma, a complexidade desta patologia requer um diagnóstico mais simples e precoce (CONTERA; DE LA SERNA; TETLEY, 2021). Assim, a nanomedicina aplicada aos estudos do câncer se expandiu exponencialmente nos últimos anos. Entretanto, existe um hiato entre os avanços das pesquisas e a aplicabilidade na prática clínica. Este número relativamente pequeno de nanomedicamentos cancerígenos aprovados para uso clínico, se deve às múltiplas barreiras biológicas e farmacêuticas, como perfusão, permeabilidade e internalização tumoral, bem como a distribuição para as células alvo (PELAZ *et al.*, 2017; VAN DER MEEL *et al.*, 2019).

Progressos notórios têm sido estudados na oncologia, aperfeiçoando as técnicas teranósticas tradicionais para cânceres agressivos. Estes avanços foram atingidos direcionando ao tumor diversas moléculas funcionais, como nanopartículas, anticorpos e outros agentes citotóxicos. Dessa forma, é possível entender que os nanomateriais podem ser empregados na modulação de processos biológicos, principalmente atuando nas limitações das técnicas atuais (BAYDA *et al.*, 2020; CONTERA; DE LA SERNA; TETLEY, 2021; PELAZ *et al.*, 2017).

O uso de vários nanomateriais ou de um bionanossensor funcionalizado com agentes terapêuticos pode permitir o diagnóstico e tratamento com eficácia aprimorada. Tradicionalmente, os bionanossensores são usados para modular a biodistribuição e o acúmulo de quimioterápicos administrados sistemicamente, melhorando assim o equilíbrio entre sua eficácia e toxicidade (PELAZ *et al.*, 2017; VAN DER MEEL *et al.*, 2019).

Os nanomateriais podem ser utilizados de diversas formas para o diagnóstico de cânceres. As nanopartículas metálicas, especialmente as AuNPs, tem sido cada vez mais utilizada na nanomedicina, destacando-se na oncologia. Estas podem ser utilizadas como um bionanossensor para diagnóstico não invasivo da doença, limitando os efeitos colaterais (CONTERA; DE LA SERNA; TETLEY, 2021).

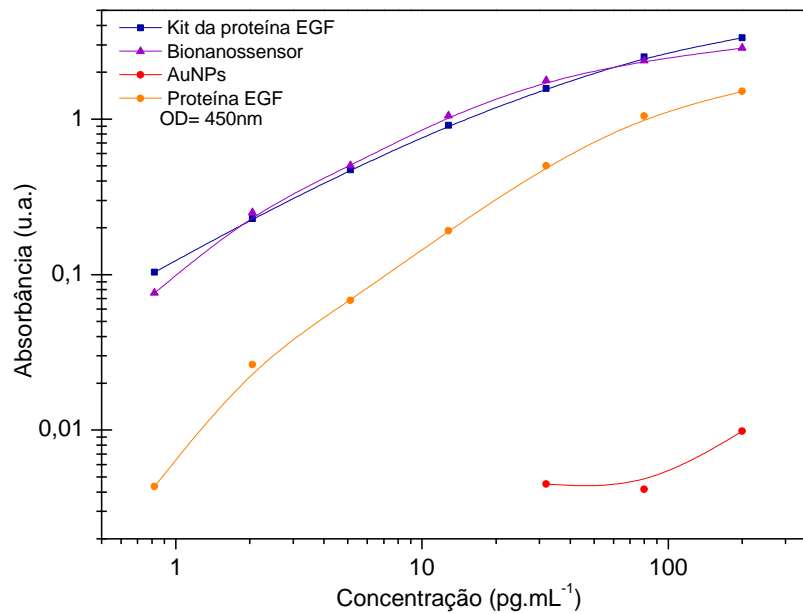
Neste contexto, as propriedades físicas e químicas das AuNPs podem ser controladas alterando o tamanho e morfologia da nanoestrutura. Além disso, as AuNPs têm natureza óptica dependente de tamanho e forma, devido à oscilação coerente de elétrons livres, o chamado efeito de ressonância de plasmônica de superfície (SPR), podendo ser empregados em biossensores (XU *et al.*, 2021; YANG *et al.*, 2022).

As AuNPs se tornam promissoras no carreamento de drogas, uma vez que possuem elevada área superficial em relação ao volume. A afinidade química superficial permite sua funcionalização, por exemplo, com drogas, ácidos nucleicos, proteínas ou peptídeos, anticorpos, ligantes direcionados, entre outras. Sua funcionalização deve-se à presença das cargas negativas na superfície e pela forte afinidade por grupos tiol, amino e carboxílico (YANG *et al.*, 2022). Os bionanossensores atuam como nanomedicamentos direcionados, que dependem do reconhecimento ativo de receptores superexpressos em sítios patológicos. A inserção de proteínas em bionanossensores minimiza a toxicidade sistêmica e o direcionamento ativo de ligantes intensifica a absorção pelas células cancerígenas (VAN DER MEEL *et al.*, 2019).

Uma das proteínas que podem ser utilizadas na funcionalização do bionanossensor, no contexto da superexpressão do EGFR é a EGF, que possui ligante específico para o ERBB1 (KJAER *et al.*, 2018; PELAZ *et al.*, 2017; SAIYAROS *et al.*, 2019; VAN DER MEEL *et al.*, 2019). A análise imunoenzimática via *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) determina a presença da proteína EGF em bionanomarcadores por anti-EGF utilizando o EGF ELISA Kit (RayBiotech, ELH-EGF-1). A funcionalização do EGF- α -ácido lipóico em AuNPs pode modificar as propriedades de ligação (ligante-receptor) da proteína EGF e EGFR (CASTILHO, 2017).

Em estudos de análise imunoenzimática feitos previamente pelo grupo (Figura 8), o ELISA investigou a especificidade e sensibilidade da proteína EGF funcionalizada no bionanossensor, sendo o Kit EGF estabelecido como parâmetro de controle.

Figura 8 – Análise imunoenzimática pelo teste de ELISA.



Nota: Gráfico de absorção em 450nm para a proteína EGF em soluções antes da aplicação nas células. O gráfico demonstra a concentração de EGF em pg/mL no eixo X pela absorbância em 450nm no eixo Y. A solução EGF Kit foi utilizada como controle, pois possui curva de calibração por fabricante.

Fonte: Adaptado de Castilho (2017).

A solução de AuNPs, de proteína EGF e a curva de absorção do bionanossensor em comparação com o EGF Kit não revelam nenhuma diminuição nas propriedades de ligação ligante-receptor da proteína EGF e EGFR. A proteína EGF seguiu os padrões do fabricante, porém, sua absorbância foi inferior ao kit EGF. A proteína EGF funcionalizada a AuNPs (como bionanossensor) foi altamente ativa ao anti-EGF, seguindo o padrão do kit. Portanto, a funcionalização da proteína EGF para AuNPs melhorou suas características de interação, quando comparada à proteína EGF isolada (CASTILHO, 2017; LUCAS *et al.*, 2015).

Embora o gene *EGFR* tenha sido extensivamente estudado para o diagnóstico de diversas mutações, a superexpressão do receptor EGFR em células ainda é pouco explorada no campo da nanomedicina (PELAZ *et al.*, 2017; VAN DER MEEL *et al.*, 2019).

2.5 MÉTODOS DIAGNÓSTICOS EM CITOMETRIA DE FLUXO

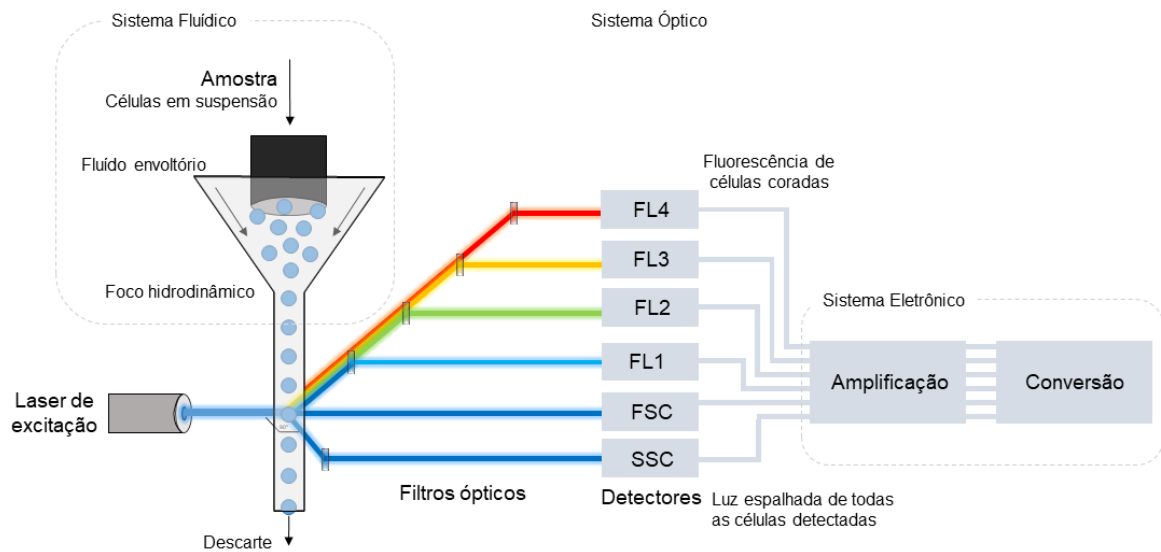
A citometria de fluxo providencia análises rápidas e multi-paramétricas de partículas suspensas em solução salina, enquanto elas fluem rapidamente por feixes de luz. Essas partículas devem possuir entre 0,2 e 50 μm e podem ser ácidos nucleicos, células, pequenas moléculas orgânicas, proteínas ou microrganismos. Cada partícula da amostra em suspensão passa pelos três sistemas que compõem o citômetro de fluxo, o fluídico, óptico e eletrônico (COSTA, 2020; MCKINNON, 2019).

O sistema fluídico permite que as partículas sejam conduzidas do tubo de amostras com o auxílio do fluido envoltório, como representado pela Figura 9. As partículas suspensas são dispostas em um foco hidrodinâmico, que as alinha uma a uma e conduz até o conjunto de feixes de luz, no sistema óptico (COSTA, 2020; MCKINNON, 2019).

Na porção do sistema óptico, os lasers de excitação incidem sobre a partícula e são direcionados para o núcleo da amostra. A partícula analisada dispersa a luz e moléculas presentes emitem fluorescência. As lentes do equipamento coletam a luz dispersada e a fluorescência emitida. Na citometria de fluxo, a luz dispersada/espalhada por todas as células detectadas é medida por dois detectores ópticos: dispersão frontal (Forward Scatter, FSC), que detecta a dispersão ao longo do caminho do laser, e dispersão lateral (Side Scatter, SSC), que mede a dispersão em um ângulo de noventa graus em relação ao laser. Os detectores FL, detectam a fluorescência de células coradas, de acordo com as partículas e corantes utilizados (COSTA, 2020; MCKINNON, 2019).

Ao final da leitura, os dados sobre as partículas são coletados pelo sistema eletrônico por amplificação, convertendo a luz em sinais eletrônicos proporcionais à fluorescência, gerando dados numéricos (COSTA, 2020; MCKINNON, 2019). A figura 9 apresenta uma representação do mecanismo de funcionamento de um citômetro de fluxo.

Figura 9 – Representação do mecanismo de funcionamento do citômetro de fluxo.



Nota: FSC = Forward Scatter. SSC= Side Scatter. FL= Fluorescência.
Fonte: Elaborado pela autora (2023).

A citometria de fluxo é uma técnica extensivamente empregada em diferentes áreas dentro da pesquisa científica biológica, como a virologia, imunologia, biologia celular, microbiologia e oncologia. Entretanto, a técnica é utilizada em laboratórios clínicos para o monitoramento de doenças infecciosas. No Brasil, esta técnica é utilizada pelo Sistema Único de Saúde (SUS) para quantificar a carga viral do HIV e o percentual de linfócitos T CD4+ e T CD8+, no monitoramento da síndrome da imunodeficiência humana (Aids) (COSTA, 2020; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003; MINISTÉRIO DA SAÚDE *et al.*, 2021).

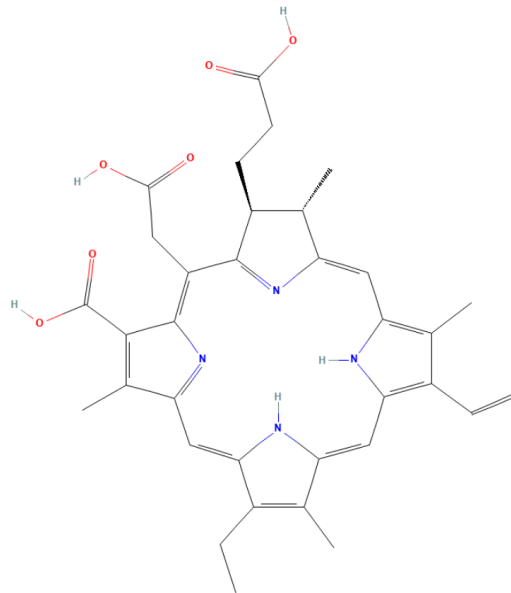
Dessa forma, o emprego do citômetro de fluxo na detecção de marcadores tumorais viabiliza o diagnóstico precoce, dado que este já é utilizado pelos sistemas público e privado de saúde, o que pode ser um grande aliado para minimizar esta situação de saúde pública.

2.6 CLORINA E6

A Ce6 é um fotossensibilizador de segunda geração utilizado nas práticas clínicas, caracterizado pela eficácia de alta sensibilidade e rápida eliminação do organismo (estrutura química apresentada pela Figura 10). A Ce6 exibe fluorescência sob excitação de luz entre 660-670nm e possui ação penetrante superior em tecidos humanos, quando comparada aos lasers convencionalmente utilizados (cerca de

630nm) em fotossensibilizadores de primeira geração (AMIRSHAGHAGHI *et al.*, 2019; TENG *et al.*, 2021).

Figura 10 – Estrutura química da Clorina e6.



Fonte: National Center for Biotechnology Information (2022).

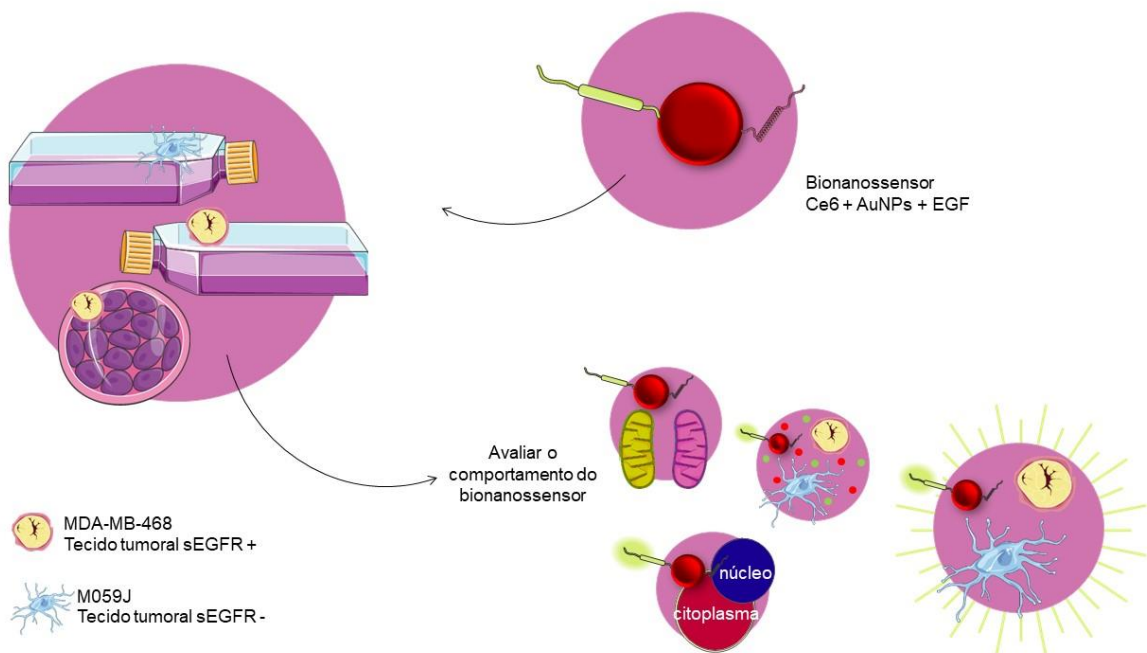
A Ce6 apresenta eficácia terapêutica melhorada e efeitos colaterais reduzidos em comparação com fotossensibilizadores convencionais derivados de hematoporfirina. Entretanto, o uso da Ce6 nas práticas clínicas tem sido limitado pela baixa solubilidade em água. Inúmeros tipos de carreadores têm sido desenvolvidos para a funcionalização da Ce6 com o intuito de superar a baixa solubilidade em água, porém, a eficiência tende a ser suprimida. Além disso, a síntese reprodutível pode ser um grande desafio. Neste contexto há a necessidade de desenvolver novas formulações envolvendo a Ce6 que sejam estáveis, reprodutíveis e capazes de fornecer Ce6 aos tumores de forma eficiente (AMIRSHAGHAGHI *et al.*, 2019; TENG *et al.*, 2021).

Este estudo objetivou investigar a fluorescência *in vitro* de bionanossensores compostos por complexos de proteína EGF e Ce6 funcionalizadas em AuNPs. Essas nanopartículas direcionam ativamente a proteína EGF para o receptor EGFR e a Ce6 atua como uma molécula marcadora, exibindo fluorescência sob excitação de luz (AMIRSHAGHAGHI *et al.*, 2019; KJAER *et al.*, 2018; PELAZ *et al.*, 2017; SAIYAROS *et al.*, 2019; TENG *et al.*, 2021; VAN DER MEEL *et al.*, 2019).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Inicialmente, os complexos EGF- α -ácido lipóico e Ce6-cisteamina foram sintetizados e funcionalizados às AuNPs para o desenvolvimento dos bionanossensores. Esta solução foi caracterizada pela análise de espectroscopia de UV-visível para determinação das bandas de absorção de cada solução e na funcionalização delas. Após a caracterização, os bionanossensores foram estudados *in vitro* nas linhagens celulares MDA-MB-468 e M059J para avaliar o comportamento do bionanossensor, por meio da análise da atividade metabólica, via de morte celular, do microambiente celular e a determinação da intensidade de fluorescência. Cada um destes processos será descrito nas próximas seções. A figura 11 apresenta um resumo do fluxograma experimental deste estudo.

Figura 11 – Fluxograma experimental resumido.

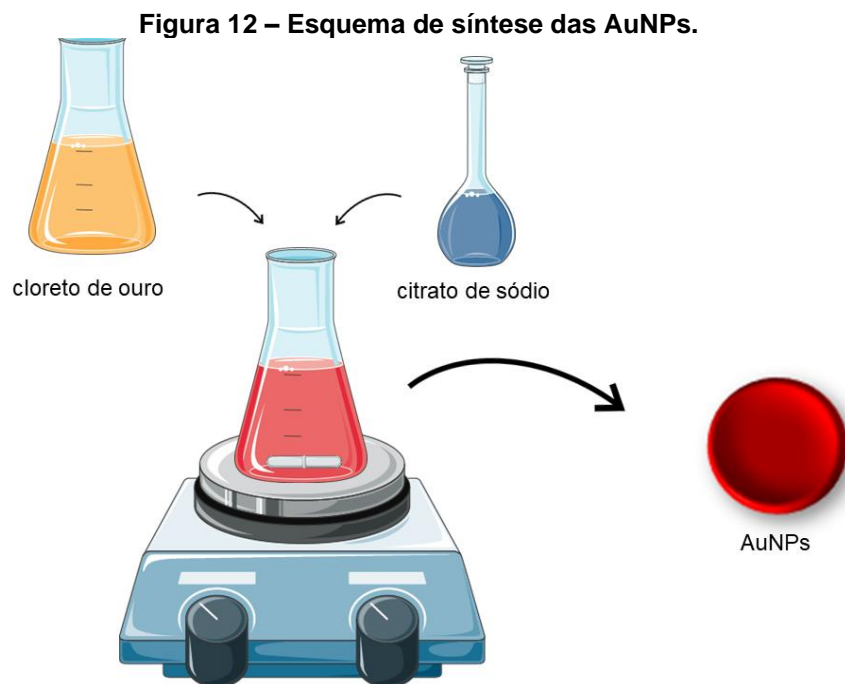


Fonte: Elaborado pela autora (2022).

3.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS BIONANOSSENSORES

A síntese dos bionanossensores foi feita com base em metodologias previamente estabelecidas pelo grupo (BHATTACHARJEE *et al.*, 2018; CASTILHO *et al.*, 2021; CASTILHO; HEWITT; RANIERO, 2017).

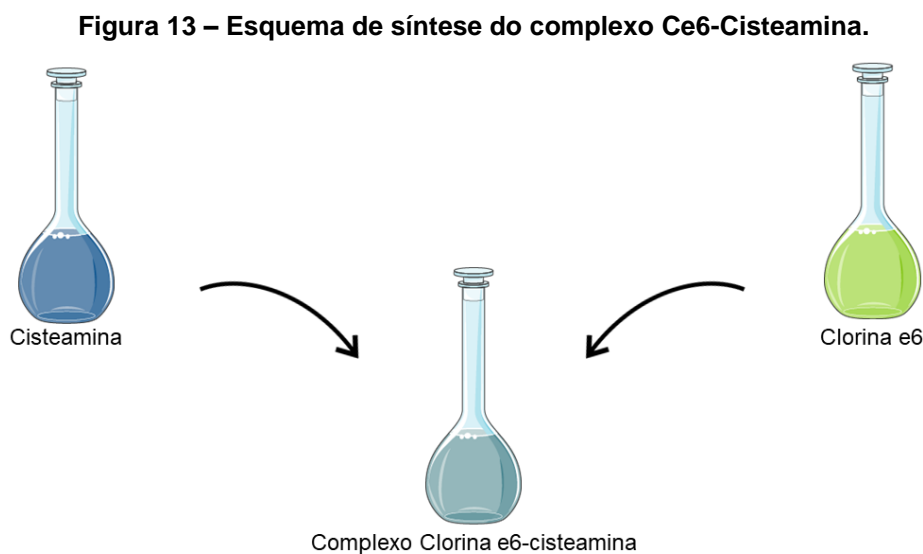
A síntese das AuNPs, representada pela Figura 12, foi realizada com base nos estudos de Lee e Meisel, para obtenção de coloides esféricos de aproximadamente 20nm (LEE; MEISEL, 1982). Em suma, uma solução de cloreto de ouro (III) trihidratado ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, Sigma Aldrich, 520918, 0,048%) foi aquecida sob agitação constante até atingir o ponto de ebulição em balão volumétrico de três pescoços acoplado a um condensador. Em seguida, o citrato de sódio tribásico dihidratado ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Sigma Aldrich, S4641, 1%) foi adicionado, com a temperatura de ebulição da solução mantida por mais 1h. Após o período de estabilização, o aquecimento foi cessado e a solução mantida sob agitação até atingir a temperatura ambiente. Dentre as etapas do processo, a síntese por bottom up passa por mudanças de colorações divididas em fases amarelo, transparente, acinzentado e vermelho escuro na solução coloidal final. Esta foi armazenada a 4°C, ao abrigo da luz.



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Para a síntese do complexo Clorina e6-Cisteamina, os grupos carboxílicos da Clorina e6 foram ativados. Para isso, a Clorina e6 (5 mg/mL) foi diluída em uma solução de volumes iguais de NaOH 0,1M e Metanol (v/v). O pH foi ajustado para 6,2 e então as soluções de Sulfo-NHS (40,7 mg/mL) e EDC (16mg/mL), foram adicionadas. Em seguida, a solução foi deixada sob baixa agitação constante por 30

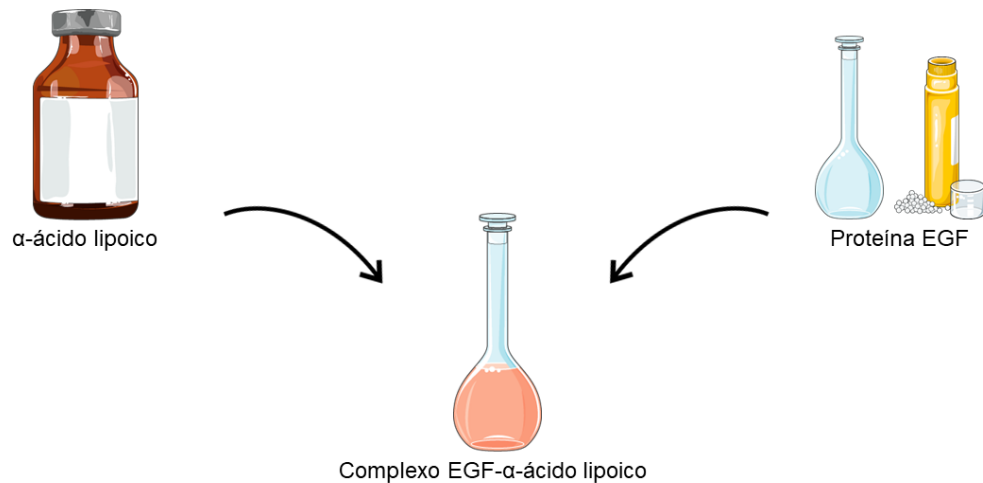
minutos. Em seguida, a cisteamina (0,62 mg/mL) foi adicionada, e o pH da solução foi ajustado para 7,0. A reação foi colocada sob baixa agitação constante por 2 horas. Após esta incubação, o pH foi ajustado para acima de 9. A solução foi incubada por mais 30 minutos. Em suma, a clorina e6 foi funcionalizada à cisteamina pela química carbodiimida, ligando uma amina a um radical carboxílico. Esta é esquematizada pela Figura 13 (CASTILHO; HEWITT; RANIERO, 2017).



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Para a síntese do complexo EGF- α -ácido lipóico, a proteína de fator de crescimento epidérmico (EGF) foi reconstituída em ácido acético (10mM) e diluída em PBS 1x (1mg/mL). A molécula de α -ácido lipóico foi diluída em volumes iguais de metanol e solução tampão fosfato-salino (PBS 1x, 10mM, pH 7,2). A solução diluída de α -ácido lipóico foi adicionada às soluções de Sulfo-NHS e EDC, ativando os grupos carboxílicos presentes na solução de α -LA e assim, ligar a EGF ao α -LA a partir da reação química via carbodiimida. A solução foi mantida em agitação constante por 30 minutos. Após a incubação, a solução de EGF foi adicionada à solução. Então, esta foi mantida em agitação constante por 2 horas. Em seguida, o pH da solução foi ajustado para acima de pH 9,0. A solução foi mantida em agitação constante por mais 30 minutos. Em suma, o α -ácido lipóico foi ligado a proteína EGF (LUCAS *et al.*, 2015), ligando uma amina a um radical carboxílico e assim, formado o complexo EGF- α -ácido lipóico. Esta é representada pela estrutura rosa esquematizada na Figura 14 (BHATTACHARJEE *et al.*, 2018; LEE *et al.*, 2016; LUCAS *et al.*, 2015).

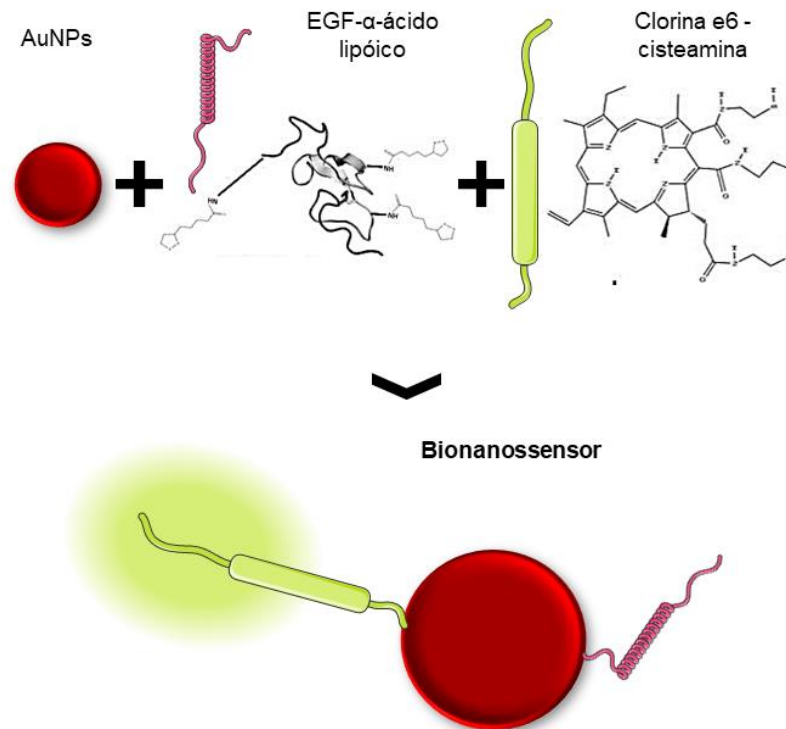
Figura 14 – Esquema de síntese do complexo Ce6-Cisteamina.



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

No processo final, os complexos clorina e6-cisteamina e EGF- α -ácido lipóico foram purificados após a modificação química, por uma série de lavagens em água ultrapura, removendo os subprodutos formados durante a síntese do complexo. A clorina e6 e a EGF foram quimicamente modificadas para funcionalizar às AuNPs, compondo o bionanossensor, conforme esquematizado na Figura 15. A funcionalização foi feita para um recobrimento de 50% Clorina e6-cisteamina e 50% EGF- α -ácido lipóico, almejando recobrir totalmente a superfície (BHATTACHARJEE *et al.*, 2018; CASTILHO *et al.*, 2021; CASTILHO; HEWITT; RANIERO, 2017).

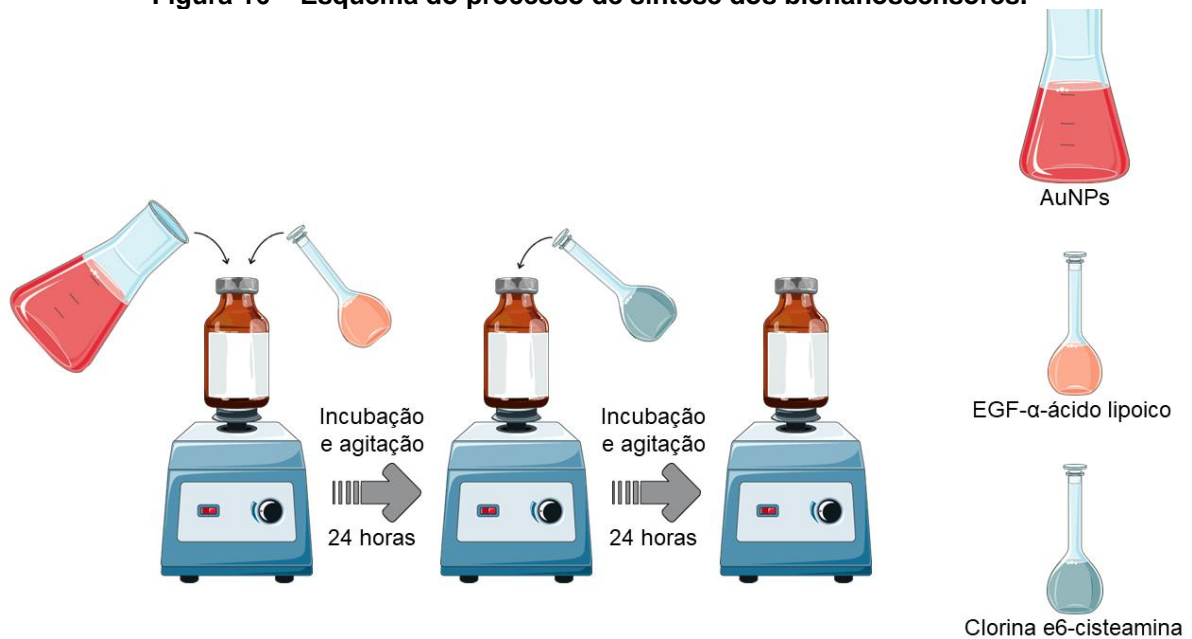
Figura 15 – Estrutura simplificada dos complexos EGF- α -ácido lipóico e Clorina e6-cisteamina e a formação do bionanossensor.



Nota: O círculo vermelho representa as nanopartículas de ouro. A estrutura verde representa o complexo Clorina e6-Cisteamina. A estrutura rosa representa o complexo EGF- α -ácido lipóico.
Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Para a primeira parte, o complexo EGF- α -ácido lipóico foi funcionalizado às AuNPs, recobrando 50% das partículas. Sendo assim, as duas soluções foram adicionadas em um frasco e a nova solução foi incubada a temperatura ambiente por 24h, mantida em baixa agitação constante. Na segunda parte, o linker clorina e6-cisteamina foi funcionalizada às AuNPs, para recobrir os 50% restantes de área superficial da partícula. Para isso, após as 24 horas da incubação das AuNPs com o complexo EGF- α -ácido lipóico, a solução do complexo de clorina e6-cisteamina foi adicionada à solução, onde permaneceu por mais 24h incubada a temperatura ambiente em baixa agitação constante. A esquematização do processo está ilustrada na Figura 16.

Figura 16 – Esquema do processo de síntese dos bionanossensores.



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Em suma, a síntese dos bionanossensores ocorreu pela incubação das soluções. As soluções de AuNPs ($2,49 \times 10^{12}$ AuNPs/mL) e as soluções dos complexos clorina e6-cisteamina e EGF- α -ácido lipóico foram incubadas a temperatura ambiente em agitação constante por 48h (BHATTACHARJEE *et al.*, 2018; CASTILHO *et al.*, 2021; CASTILHO; HEWITT; RANIERO, 2017). Após a incubação, as amostras foram purificadas por diversos ciclos de lavagem em água ultrapura e centrifugação a 13000 rpm por 4 minutos. Os bionanossensores foram quantificados e caracterizados utilizando o espectrofotômetro DeNovix DS-11 (DeNovix Inc.). O espectro de UV-visível revelou comprimentos de onda específicos e bandas de absorção dos produtos das amostras.

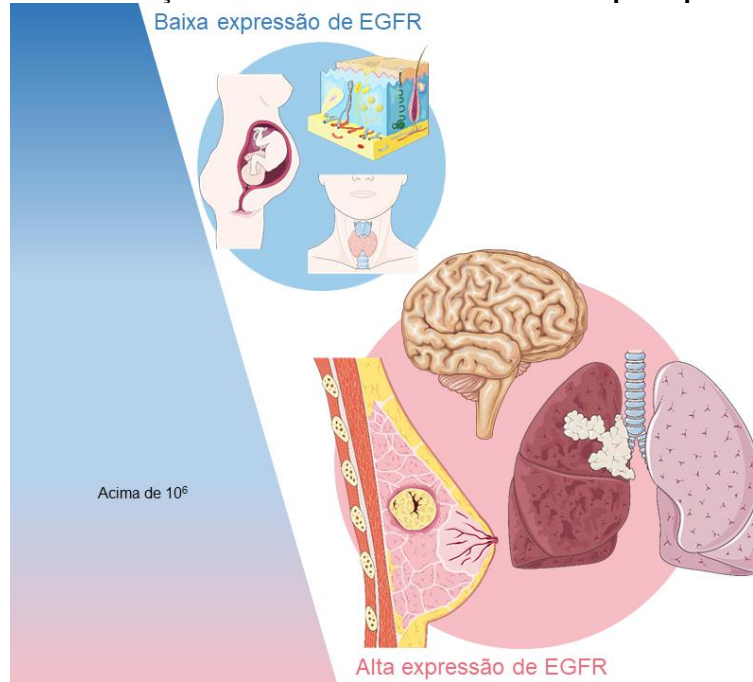
3.2 CULTURA CELULAR

Os bionanossensores foram testados *in vitro* nas linhagens celulares MDA-MB-468 (câncer de mama triplo-negativo, monocamada e esferoides) e M059J (glioblastoma maligno, monocamada) adquiridos no Banco de Células do Rio de Janeiro.

A maior parte dos tipos celulares possuem uma média de 2×10^4 a 2×10^5 receptores de EGFR por célula, enquanto as células que possuem superexpressão

do receptor EGFR possuem cerca de 10^6 receptores EGFR por célula, como mostrado na figura 17 (BRANDT *et al.*, 2006). A linhagem celular MDA-MB-468 possui características de sEGFR; as quais, o receptor EGFR é presente em 1×10^6 por célula. A linhagem celular M059J não apresenta aspectos de superexpressão de receptor EGFR (HO; LIN, 2018; LICCARDI; HARTLEY; HOCHHAUSER, 2014).

Figura 17 – Diferenças de tecidos com baixa ou alta superexpressão de EGFR.



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

3.2.1 Cultura celular em monocamada

A cultura celular em monocamada ou bidimensional (2D) foi realizada com as linhagens celulares MDA-MB-468 e M059J.

A linhagem celular MDA-MB-468 foi cultivada em meio de cultura L-15 completo (Leibovitz, Sigma Life Science, L4386), suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (Sigma Aldrich, F2561).

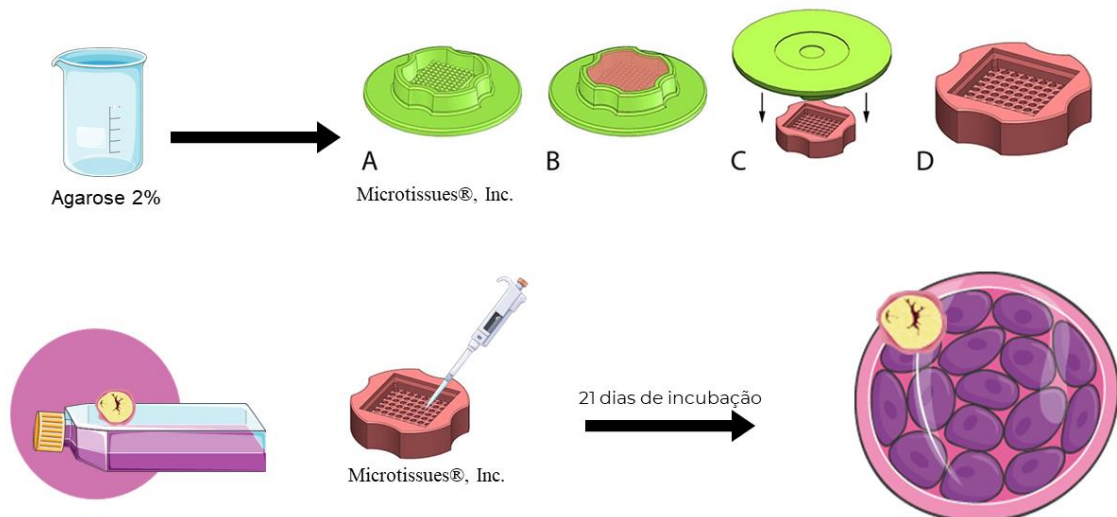
A linhagem celular M059J foi cultivada em meio de cultura completo DMEM/F-12 (Sigma Life Science, D8900), suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino e 0,05 mM de aminoácidos não-essenciais. As células foram incubadas a 37 °C em uma atmosfera de 95% (ThermoFisher Scientific, series 8000 Water-Jacketed CO₂ Incubator).

Nos experimentos realizados com a cultura em monocamada, cada replicata (n=1) foi feita com uma alíquota de células a uma concentração de 1×10^5 , depositada em placas experimentais.

3.2.2 Cultura celular tridimensional

A cultura celular tridimensional (3D) formou esferoides com a linhagem MDA-MB-468. Estes foram gerados utilizando agarose ultrapura micromoldada (3D Petri Dish®; MicroTissues, Inc). Em que géis de agarose a 2% (Ultrapure agarose, Invitrogen) foram moldados produzindo microressecções. Neste processo, a agarose estéril (agarose ultrapura 2% em salina 0,9% NaCl) foi aquecida até atingir entre 60 e 70°C. Esta foi pipetada nos micromoldes estéreis. Após a solidificação da agarose em temperatura ambiente, o micromolde foi removido com cuidado. Os moldes foram transferidos para as placas a serem utilizadas, que permaneceram por 45 minutos sob luz UV. Os géis foram então equilibrados com meio de cultura completo por dois processos de 20 minutos cada.

Figura 18 – Processo de fabricação de micromoldes de agarose e esferoide.



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Após o equilíbrio dos géis, as células foram retiradas das garrafas de monocultura com uma solução de Tripsina-EDTA a 0,025%, centrifugadas a 2000 rpm por 10 minutos e ressuspensas para a densidade celular de 1×10^5 . As células foram pipetadas nos géis e o meio de cultura restante foi adicionado. Ao longo de 20 dias de

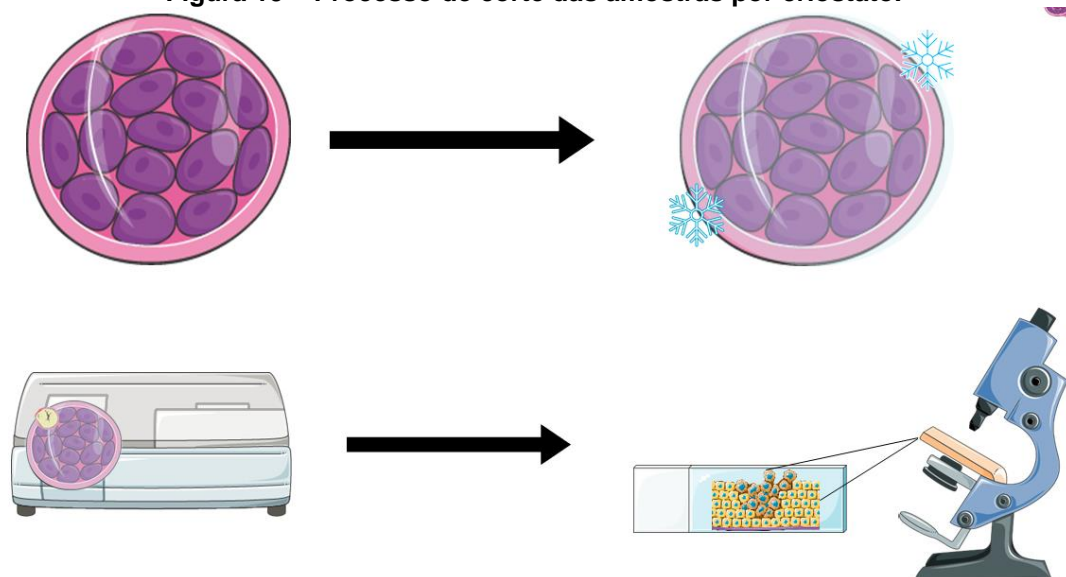
incubação, as células dentro das microressecções se formaram espontaneamente em agregados, recuperados dos géis por centrifugação e/ou pipetagem manual e foram então movidos para as placas de experimentos.

Nos experimentos realizados com os esferoides, cada replicata (n=1) foi feita com um esferoide após 21 dias de incubação, alocado em placas experimentais.

3.3 ANÁLISE HISTOLÓGICA DO MICROAMBIENTE CELULAR TRIDIMENSIONAL

Ao final dos 21 dias de incubação dos esferoides, os micromoldes de agarose foram submetidos à criotomia (CM1100, Leica Biosystems). Neste processo, mostrado pela Figura 19, o criostato foi resfriado até -20°C (temperatura ideal para cortes em tecidos mamários, conforme indicação do fabricante) e os micromoldes foram alocados no porta amostra com o meio de congelamento (Tissue Freezing Medium, Leica Biosystems) para resfriamento. Este meio de congelamento é altamente viscoso e solúvel em água, sendo assim, uma excelente escolha para o suporte de tecidos durante a criotomia. Em seguida, foram depositadas na câmara de congelamento. Após a solidificação completa do material, os blocos foram seccionados para obtenção de vários cortes com cerca de $5\mu\text{m}$ de espessura, os quais foram depositados em uma lâmina de vidro.

Figura 19 – Processo de corte das amostras por criostato.



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

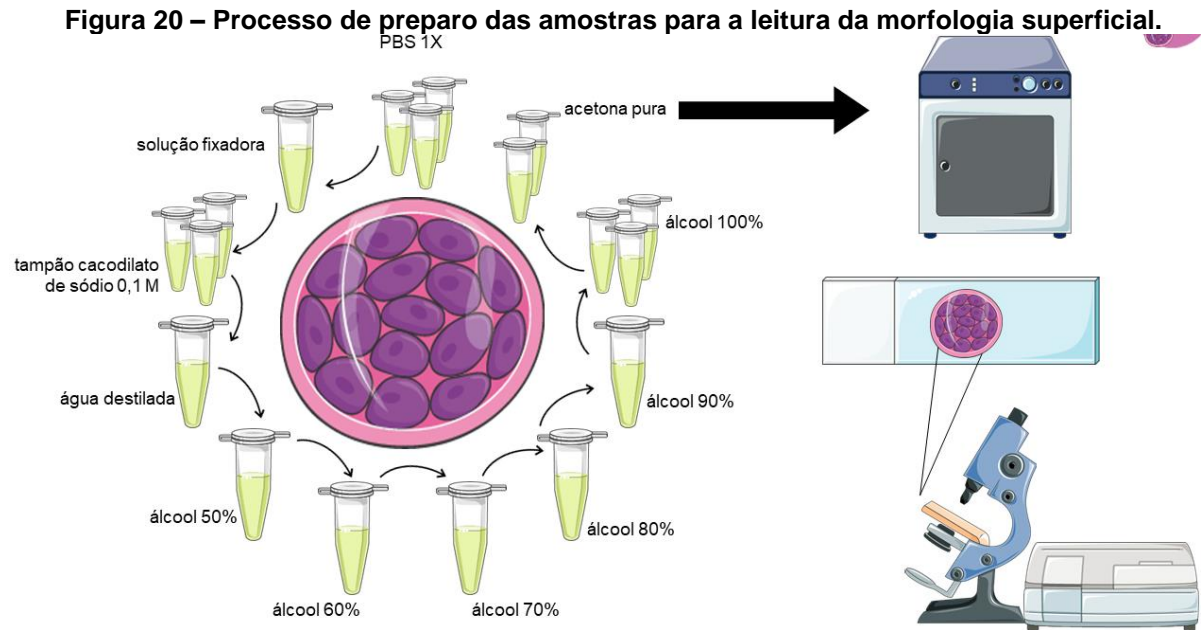
A coloração em hematoxilina-eosina (H&E) foi utilizada para coloração das amostras pré-fixadas nas lâminas. Este procedimento permite a visualização do citoplasma e núcleo das células para análise do tecido formado *in vitro*. Para isso, as amostras passaram por uma lavagem em água destilada, a fim de remover algum resíduo presente na amostra. Em seguida, foi banhada em Hematoxilina de Meyer por 2 minutos, lavadas novamente em água destilada para remover todo o excesso do produto e banhada em Eosina amarelada por 1 minuto. Após este processo de coloração, as amostras foram lavadas novamente em água destilada, retirando o excesso de umidade em um papel absorvente. Para a desidratação da amostra, foram feitas duas lavagens em álcool absoluto com 3 mergulhos de 4 segundos cada. Para o processo de diafanização, as amostras foram embebidas em xilol puro por duas vezes em 2 mergulhos de 4 segundos.

A montagem da lâmina foi feita utilizando lamínulas e um meio de montagem à base de xilol, o Bálsamo do Canadá Sintético (Soldan, Pró-Cito, Brasil). Sendo assim, uma gota do Bálsamo do Canadá foi colocada sobre o corte e a lamínula foi posicionada para cobrir a amostra. A lamínula foi comprimida com firmeza sobre o corte, fazendo com que o meio de montagem se espalhasse formando uma película fina entre lâmina e lamínula. Após a estabilização do meio de montagem, lâmina e lamínula foram firmemente aderidas uma à outra.

3.4 ANÁLISE MORFOLÓGICA DO MICROAMBIENTE CELULAR TRIDIMENSIONAL

A microscopia eletrônica de varredura foi realizada a fim de analisar a morfologia dos esferoides cultivados. Ao final dos 21 dias de incubação dos esferoides, estes foram transferidos para uma placa de petri e lavados com solução de PBS 1X por 3 vezes. A solução fixadora (tampão cacodilato de sódio 0,1M + Glutaraldeído 2,5% + Paraformaldeído 2%) foi adicionada e as placas foram deixadas em incubação por duas horas em temperatura ambiente, ao abrigo da luz. Após esta incubação, a solução fixadora foi retirada e foram feitas três lavagens de 5 minutos em tampão cacodilato de sódio 0,1 M. Após este banho, os esferoides foram lavados em água destilada para a desidratação etílica gradual. Esta foi feita mergulhando os esferoides em banhos álcool de 50%, 60%, 70%, 80%, 90% e três vezes de 100%, sendo 15 minutos para cada banho. Após a desidratação etílica, foram realizados dois

banhos de acetona pura e o material foi levado para secagem. Depois de secas, as amostras foram dispostas na metalizadora (EMITECH 5550X), onde receberam deposições de ouro. Para a leitura, foi utilizado o equipamento Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV - Zeiss EVO MA10), EHT = 20 kV; WD = 11mm. Todo o processo foi esquematizado na Figura 20.



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

3.5 MARCAÇÃO DE PROTEÍNAS DOS ESFEROIDES POR IMUNOFLUORESCÊNCIA

A marcação das proteínas dos esferoides feita pela análise de microscopia de fluorescência via imunofluorescência verificou a presença de proteínas de adesão célula-célula, estrutura celular e formação de matriz extracelular nos esferoides da linhagem celular MDA-MB-468. Ao final dos 21 dias de incubação dos esferoides, estes foram alocados nas placas experimentais, conforme a Tabela 1.

Tabela 1 – Detalhamento de grupos experimentais para a marcação de proteínas dos esferoides.

| Grupo | Anticorpos Primários | | | | | | Anticorpos Secundários | |
|-------|----------------------|-------------|--------------------------|---------------|-------------------|---------------|------------------------|-----------------|
| | Anti-E-caderina | Anti-Actina | Anti- β -integrina | Anti-Laminina | Anti-Fibronectina | Anti-Paxilina | Anti-camundongo IgG | Anti-coelho IgG |
| 1 | X | - | - | - | - | - | X | - |
| 2 | - | X | - | - | - | - | - | X |
| 3 | - | - | X | - | - | - | X | - |
| 4 | - | - | - | X | - | - | - | X |
| 5 | - | - | - | - | X | - | - | X |
| 6 | - | - | - | - | - | X | X | - |

Nota: Em que “X” = presente e “-” = ausente. Anti-E-caderina = anticorpo de camundongo, 67A-4, Santa Cruz. Anti-Actina = anticorpo de coelho, A2663, Sigma Aldrich. Anti- β -integrina = anticorpo de camundongo, I8638-2ML, Sigma Aldrich. Anti-Laminina = anticorpo de coelho, L9393-5ML, Sigma Aldrich. Anti-Fibronectina = anticorpo de coelho, F3648-5ML, Sigma Aldrich. Anti-Paxilina = anticorpo de camundongo, P1093-5ML, Sigma Aldrich. Anti-camundongo IgG = Anti-Mouse IgG (molécula inteira) – anticorpo peroxidase produzido em cabra. Anti-coelho IgG = Anti-Rabbit IgG (molécula inteira) – anticorpo peroxidase produzido em cabra.

Todos os grupos foram incubados à 37°C em uma atmosfera de 95% por 5 h com o meio de cultura ou meio de cultura e bionanossensor, conforme indicado pela Tabela 1. Ao final da primeira incubação, todos os grupos experimentais foram fixados com uma solução de tampão PHEM (10,36g de Pipes, 3,25g de Hepes, 1,9g de EGTA, 0,27g de MgCl₂) + Paraformaldeído 4% + Triton X-100 0,5%, em uma segunda incubação à temperatura ambiente por 10 minutos. Em seguida, as amostras foram lavadas em tampão PHEM + BSA 0,1%. A terceira incubação foi feita por 1 h a 37°C, com anticorpos primários E-caderina, Actina, β -integrina, Laminina e Fibronectina em diluição 1:1000, conforme descrito na Tabela 1. A quarta incubação foi feita com anticorpos secundários anti-camundongo e anti-coelho em diluição 1:5000, conforme descrito na Tabela 1. Após o tempo de incubação, os esferoides foram levados imersos em PBS 1X para leitura no microscópio de fluorescência confocal.

As fotomicrografias foram registradas no microscópio de fluorescência confocal ZEISS LSM 700 laser-scanning (Carl Zeiss AG, Germany), utilizando a objetiva Zeiss Plan-apochromat 63x/1.4 Oil Iris M27. As fotomicrografias foram obtidas utilizando uma linha de laser a 405 nm (5 mW) para o DAPI (emissão de 435 nm) e um laser line de 639 nm (5 mW) para a Ce6 (emissão de 669 nm). Após a aquisição,

as fotomicrografias foram processadas no software ZEISS ZEN 2 Microscope (VIEIRA *et al.*, 2022).

3.6 ANÁLISE DA ATIVIDADE METABÓLICA EM MONOCAMADA

A análise da atividade metabólica foi utilizada para determinar o status metabólico das células cultivadas em monocamada após a incubação com os bionanossensores. O ensaio colorimétrico de MTT (Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio, Sigma Aldrich, M5655) foi feito para investigar a atividade metabólica das linhagens MDA-MB-468 e M059J após a aplicação dos bionanossensores. Este teste busca o estado funcional da cadeia metabólica, na qual é utilizada para determinar o potencial citotóxico da amostra. Dessa forma, ao incubar o MTT com células vivas, este tem o substrato quebrado pelas enzimas mitocondriais oxidoreductase dependentes de NADH, alterando sua cor amarela para azul escuro (cristais de formazan. De acordo com a ISO 10993-5/2009, as drogas aplicadas *in vitro* que resultam em atividade metabólica abaixo de 70%, são consideradas citotóxicas (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 2009). Este teste é baseado na redução do sal tetrazolium em cristais de formazan pelas enzimas desidrogenases mitocondriais (LI *et al.*, 2012). A análise possuiu quatro grupos, conforme descrito na Tabela 2.

Tabela 2 – Detalhamento de grupos experimentais para a análise da atividade metabólica em monocamada.

| Grupo | Linhagem celular | Bionanossensor ($\mu\text{g/mL}$) | MTT |
|----------|------------------|--|-----|
| Teste | MDA-MB-468 | 103,9 | X |
| Controle | MDA-MB-468 | - | X |
| Teste | M059J | 103,9 | X |
| Controle | M059J | - | X |

Nota: Em que “X” = presente e “-” = ausente. As drogas (bionanossensor) contém as concentrações utilizadas.

Todos os grupos foram incubados à 37°C em uma atmosfera de 95% por 1h, 3h e 5h. Após os tempos de incubação, todos os grupos foram incubados por 4h com uma solução de MTT a 2mg/mL, à temperatura de 37°C em uma atmosfera de 95%. Os cristais de formazan foram diluídos com uma solução de dimetilsulfóxido, para a

solubilização completa do precipitado formado. Os dados foram coletados no espectrofotômetro SpectraCount™ (Packard) em um comprimento de onda de 570nm.

3.7 ANÁLISE DA VIA DE MORTE CELULAR EM ESFEROIDES

A análise da via de morte celular em esferoides via citometria de fluxo foi utilizada para analisar o status das células após a incubação com os bionanossensores. Após a formação dos esferoides, estes foram alocados em placas experimentais a 37°C. Para a análise da via de morte celular via citometria de fluxo, a solução dos bionanossensores foi incubada às células em um tempo de 5 horas de incubação. A Tabela 3 detalha os grupos experimentais. Alguns controles foram preparados, na ausência de quaisquer drogas testadas, em overdose de DMSO, com clorina e6 e com AuNPs. Após o tratamento, as células dos esferoides foram desagregadas entre si por uma solução de tripsina-EDTA à 0,025% e transferidas para microtubos eppendorf. As células foram lavadas com PBS 1x e centrifugadas a 2.000 rpm por 10 minutos. Após a lavagem, as células foram ressuspensas em 100µL de tampão de ligação à Anexina 1x. Foram adicionadas a cada uma dessas amostras 5µL de anexina V-FITC e 100 µg/mL de solução de iodeto de propídio. As células foram incubadas à temperatura ambiente durante 20 minutos.

Tabela 3 – Detalhamento de grupos experimentais para a análise da via de morte celular em esferoides.

(continua)

| Grupo | Bionanossensor (µg/mL) | Clorina e6 (µg/mL) | AuNPs (part/mL) | DMSO | Anexina V-FITC | Solução de Iodeto de Propídio |
|-------------------|---------------------------|-----------------------|--------------------|------|----------------|----------------------------------|
| Controle Positivo | - | - | - | X | X | X |
| Controle Negativo | - | - | - | - | X | X |
| Teste 1 | 103,9 | - | - | - | X | X |
| Teste 2 | 200 | - | - | - | X | X |
| Teste 3 | 300 | - | - | - | X | X |
| Controle Ce6 1 | - | 2 | - | - | X | X |
| Controle Ce6 2 | - | 4 | - | - | X | X |

Tabela 3 – Detalhamento de grupos experimentais para a análise da via de morte celular em esferoides.

(conclusão)

| Grupo | Bionanosensor ($\mu\text{g/mL}$) | Clorina e6 ($\mu\text{g/mL}$) | AuNPs (part/mL) | DMSO | Anexina V-FITC | Solução de Iodeto de Propídio |
|------------------|---------------------------------------|------------------------------------|----------------------|------|----------------|----------------------------------|
| Controle Ce6 3 | - | 6 | - | - | X | X |
| Controle AuNPs 1 | - | - | $5,3 \cdot 10^{12}$ | - | X | X |
| Controle AuNPs 2 | - | - | $10,8 \cdot 10^{12}$ | - | X | X |
| Controle AuNPs 3 | - | - | $16,2 \cdot 10^{12}$ | - | X | X |

Nota: Em que “X” = presente e “-” = ausente. As drogas (bionanosensor, clorina e6 e AuNPs) contém as concentrações utilizadas.

Após o período de incubação, foram adicionados 400 μL de tampão de ligação à anexina 1x em cada uma das amostras e então, essas foram mantidas no gelo até a leitura. As células coradas foram analisadas por citometria de fluxo, medindo a emissão de fluorescência a 530nm e 575nm usando excitação de 488nm. Detecção do espalhamento da luz: Forward ($0^\circ \pm 13^\circ$) e Side ($90^\circ \pm 13^\circ$). Filtros ópticos de detecção de emissão: FL1 533/30 nm (eg, FITC/GFP); FL2 585/40 nm (eg, PE/PI); FL3 > 670 nm (eg, PerCP, PerCP-Cy5.5, PE-CyTM7); FL4 675/25 nm (eg, APC). Os dados coletados foram processados no software BD Accuri C6 system (VIEIRA *et al.*, 2022).

3.8 ANÁLISE DA INTERNALIZAÇÃO DOS BIONANOSSENSORES NO MICROAMBIENTE CELULAR

A análise de microscopia confocal foi realizada para certificar a internalização dos bionanosensores nas linhagens celulares MDA-MB-468 e M059J. A análise foi feita em todos os grupos experimentais descritos na Tabela 4. Após 24 h de incubação à 37°C para aderência das células da cultura em monocamada em lamínulas nos fundos dos poços e a formação dos esferoides, o meio de cultura destes foi substituído por um meio de cultura contendo as amostras a serem analisadas, de acordo com a Tabela 4. Todos os grupos foram incubados à 37°C em uma atmosfera de 95% por 1 h, 2 h, 3 h, 4 h e 5 h.

Tabela 4 – Detalhamento de grupos experimentais para a análise da internalização dos bionanossensores no microambiente celular.

| Grupo | Linhagem celular | Cultura | Bionanossensor (µg/mL) |
|----------|------------------|-------------|---------------------------|
| Teste | MDA-MB-468 | Monocultura | 103,9 |
| Controle | MDA-MB-468 | Monocultura | - |
| Teste | M059J | Monocultura | 103,9 |
| Controle | M059J | Monocultura | - |
| Teste | MDA-MB-468 | Esferoide | 103,9 |
| Controle | MDA-MB-468 | Esferoide | - |

Nota: Em que “X” = presente e “-” = ausente. As drogas (bionanossensor) contém as concentrações utilizadas.

Para as lamínulas onde a monocultura foi aderida, ao final dos tempos de incubação com os bionanossensores, a placa de experimento foi centrifugada a 2000 rpm por 10 minutos. Os poços foram lavados com PBS 1x. Em seguida, 500µl de Paraformaldeído a 4% foram adicionados e deixados em incubação à temperatura ambiente por 20 minutos. A lamínula foi removida do fundo dos poços da placa de experimentos com auxílio de uma agulha pequena e uma pinça. A lamínula foi lavada em solução de PBS 1x e grudada em uma lâmina de microscopia com uma gota (aproximadamente 8 µl) de ProLong Gold Antifade Mountant com marcador de DNA azul DAPI (DAPI, ThermoFisher Scientific) (CASTILHO *et al.*, 2021). O DAPI (2-(4-Amidino-fenil)-6-indolecarbamidina dicloridrato) se liga ao DNA nas regiões A-T, promovendo uma melhor análise do núcleo celular.

Ao final dos tempos de incubação com os bionanossensores, os esferoides foram lidos em meio fresco. Para isso, o meio de cultura contendo os bionanossensores foi retirado e estes foram lavados com meio de cultura. Em seguida, foi adicionada a solução de tetrametilrodamina (TMRM - T668, Life Technologies, Invitrogen, ThermoFisher Scientific) a 10 nM/mL, diluída em meio de cultura Leibovitz por 30 minutos à 37°C. Após esta incubação, uma segunda foi feita em uma solução de corante Hoechst (H3570, Invitrogen, ThermoFisher Scientific) a 300 nM/mL também diluído em meio de cultura Leibovitz por aproximadamente 20 minutos à 37°C. Após as duas incubações, todo o meio de cultura foi retirado e PBS 1x foi adicionado para a leitura.

As fotomicrografias foram registradas no microscópio de fluorescência confocal ZEISS LSM 700 laser-scanning (Carl Zeiss AG, Germany), utilizando a objetiva Zeiss Plan-apochromat 63x/1.4 Oil Iris M27. As fotomicrografias foram obtidas utilizando uma linha de laser a 405 nm (5 mW) para o DAPI (emissão de 435 nm) e um laser line de 639 nm (5 mW) para a Ce6 (emissão de 669 nm). Após a aquisição, as fotomicrografias foram processadas no software ZEISS ZEN 2 Microscope (VIEIRA *et al.*, 2022).

3.9 DETERMINAÇÃO DA INTENSIDADE DE FLUORESCÊNCIA EMITIDA PELO BIONANOSSENSOR

A análise de citometria de fluxo foi realizada para investigar a intensidade de fluorescência dos bionanosensores nas linhagens celulares MDA-MB-468 e M059J, além de um estudo prévio sobre o desempenho da fluorescência do bionanosensor em ambiente 3D. A análise foi feita em todos os grupos experimentais descritos na Tabela 5. Após 24 h de incubação à 37°C para aderência das células da cultura em monocamada nos fundos dos poços e a formação dos esferoides, o meio de cultura destes foi substituído por um meio de cultura contendo as amostras a serem analisadas, de acordo com a Tabela 5. Alguns controles foram preparados, na ausência de quaisquer drogas testadas, com clorina e6 e com AuNPs.

Tabela 5 – Detalhamento de grupos experimentais para a análise da via de morte celular em esferoides.

(continua)

| Grupo | Linhagem celular | Cultura | Bionanos sensor (µg/mL) | Clorina e6 (µg/mL) | AuNPs (part/mL) |
|----------------|------------------|-------------|-------------------------|--------------------|----------------------|
| Controle | | | - | - | - |
| Teste | MDA-MB-468 | Monocultura | 103,9 | - | - |
| Controle Ce6 | | | - | 2 | - |
| Controle AuNPs | | | - | - | 5,3.10 ¹² |
| Controle | | | - | - | - |
| Teste | M059J | Monocultura | 103,9 | - | - |
| Controle Ce6 | | | - | 2 | - |

Tabela 6 – Detalhamento de grupos experimentais para a análise da via de morte celular em esferoides.

| (conclusão) | | | | | |
|------------------|------------------|------------|-------------------------|--------------------|-----------------------|
| Grupo | Linhagem celular | Cultura | Bionanos sensor (µg/mL) | Clorina e6 (µg/mL) | AuNPs (part/mL) |
| Controle AuNPs | | | - | - | 5,3.10 ¹² |
| Controle | | | - | - | - |
| Teste 1 | | | 103,9 | - | - |
| Teste 2 | | | 200 | - | - |
| Teste 3 | | | 300 | - | - |
| Controle Ce6 1 | MDA-MB-468 | Esferoides | - | 2 | - |
| Controle Ce6 2 | | | - | 4 | - |
| Controle Ce6 3 | | | - | 6 | - |
| Controle AuNPs 1 | | | - | - | 5,3.10 ¹² |
| Controle AuNPs 2 | | | - | - | 10,8.10 ¹² |
| Controle AuNPs 3 | | | - | - | 16,2.10 ¹² |

Nota: Em que “X” = presente e “-” = ausente. As drogas (bionanosensor, clorina e6 e AuNPs) contêm as concentrações utilizadas.

Após o tratamento, os esferoides foram desagregados entre si e as células desagregadas das placas por uma solução de tripsina-EDTA à 0,025%. Cada solução foi transferida para microtubos eppendorf. As células foram lavadas com PBS 1x e centrifugadas a 2.000 rpm por 10 minutos. Após a lavagem, as células foram ressuspensas em 500µL de solução PBS 1x. As células foram analisadas por citometria de fluxo Accuri™ C6 Plus (BD Biosciences), medindo a emissão de fluorescência a 530nm e 575nm usando excitação de 488nm. Detecção do espalhamento da luz: Forward (0°±13°) e Side (90°±13°). Filtros ópticos de detecção de emissão: FL1 533/30 nm (eg, FITC/GFP); FL2 585/40 nm (eg, PE/PI); FL3 > 670 nm (eg, PerCP, PerCP-Cy5.5, PE-Cy™7); FL4 675/25 nm (eg, APC). Os dados coletados foram processados no software BD Accuri C6 system (VIEIRA *et al.*, 2022).

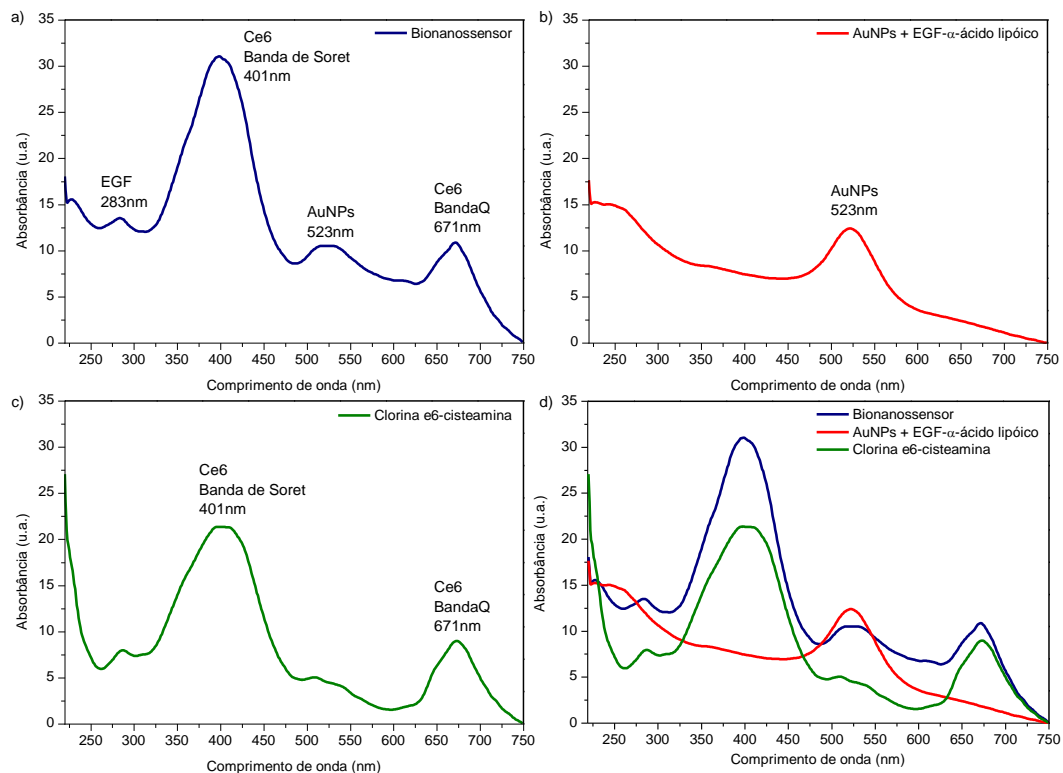
4 RESULTADOS

Nesta seção são apresentados os resultados obtidos no desenvolvimento desta dissertação. Estes foram divididos com relação a análise, com o início na caracterização dos bionanossensores e seguindo para as caracterizações celulares e análise de fluorescência.

4.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS BIONANOSSENSORES

A espectroscopia de UV-visível foi empregada na caracterização e quantificação da síntese dos bionanossensores. A figura 21 apresenta os espectros de UV-Visível das amostras utilizadas, providenciando as bandas de absorção dos complexos e do bionanossensor, como demonstrado em estudos prévios do grupo (CASTILHO *et al.*, 2021; CASTILHO; HEWITT; RANIERO, 2017; VIEIRA *et al.*, 2017). Essas bandas incluem proteína EGF (283 nm), AuNPs (523 nm) e Ce6 (Banda de Soret - 401 nm e Banda Q - 671 nm).

Figura 21 – Espectros de UV-visível da formação a) do bionanossensor sintetizado; b) do complexo EGF- α -ácido lipóico funcionalizado às AuNPs; c) do complexo Clorina e6-cisteamina; d) a sobreposição dos espectros para análise das bandas.

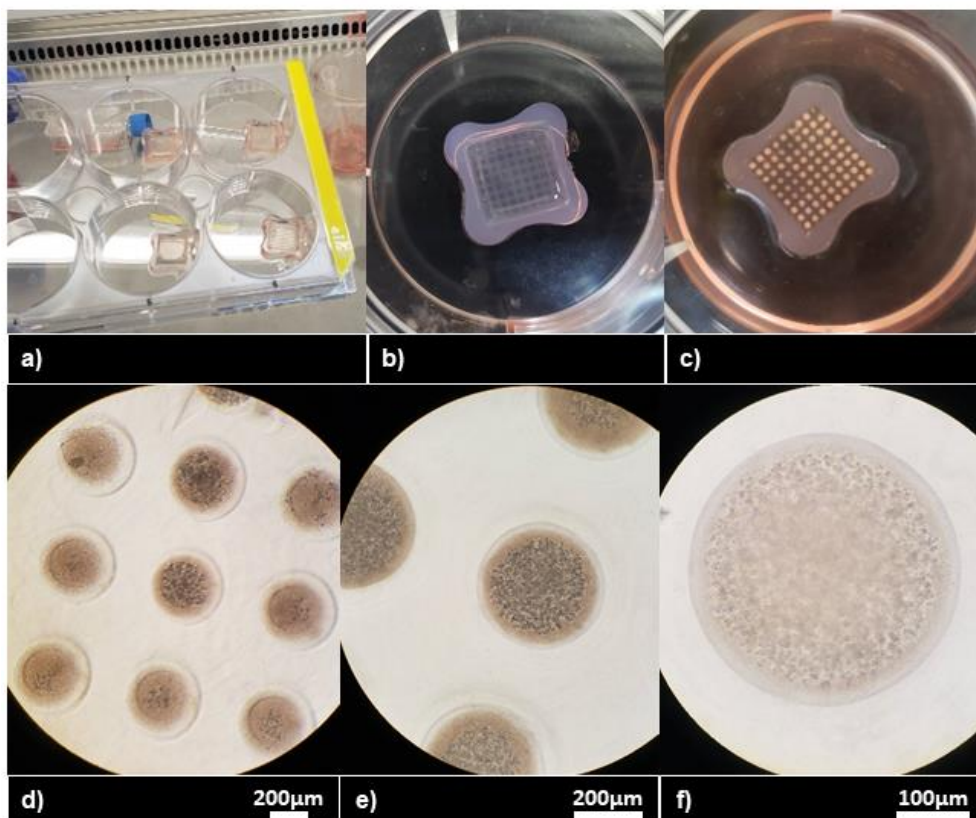


Fonte: Dados da pesquisa (2022).

4.2 ANÁLISE HISTOLÓGICA DO MICROAMBIENTE CELULAR TRIDIMENSIONAL

Os esferoides foram cultivados por 21 dias em incubação a 37°C. A figura 22 apresenta os passos deste processo desde a fabricação dos moldes até o fim da cultura destes. Neste processo, a Figura 22a mostra os moldes recém-fabricados dentro da placa, após equilíbrio com o meio de cultura ainda sem adição de células. Em 22b pode ser observado o molde equilibrado, ainda sem adição de células, porém em maior tamanho. Nesta imagem podemos observar as microressecções onde as células são depositadas e que então, formarão os esferoides. A Figura 22c apresenta o mesmo molde da Figura 22b, entretanto, após os 21 dias de incubação. É possível observar uma massa branca em cada uma das microressecções, que correspondem aos esferoides alocados sem adesão. As Figuras 22d, 22e e 22f apresentam os esferoides formados após os 21 dias de incubação, em aumentos de 4x, 10x e 20x, respectivamente.

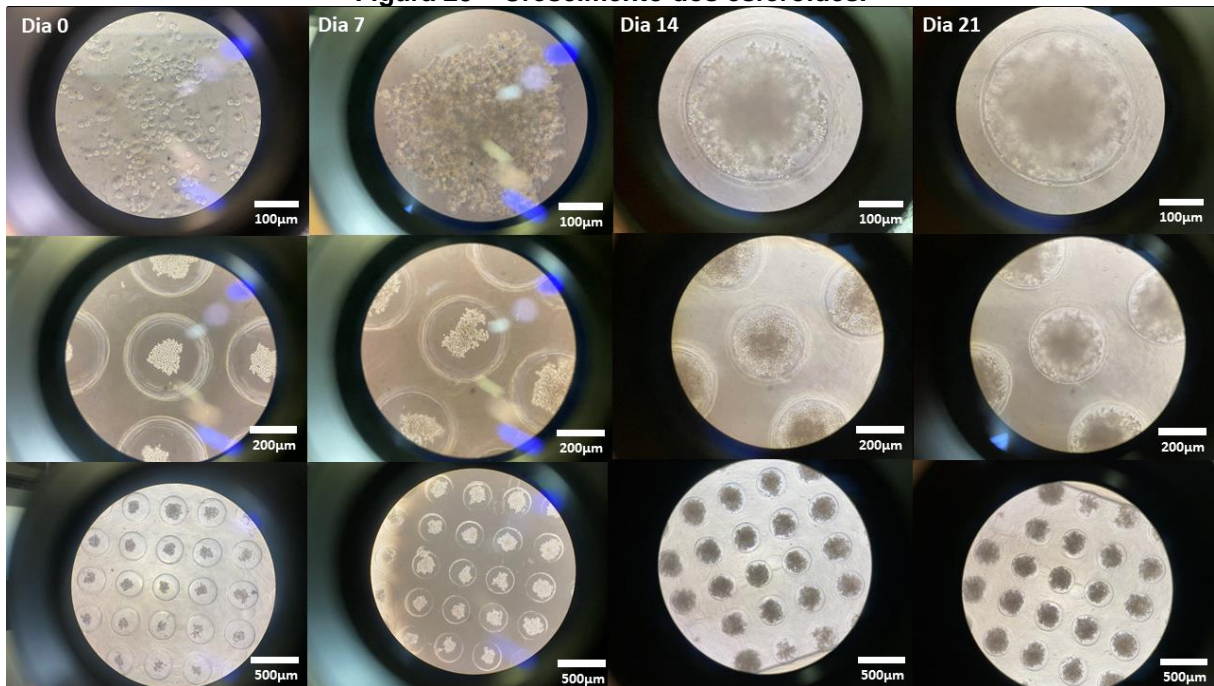
Figura 22 – Processo de cultivo dos esferoides, em a) moldes recém-fabricados; b) molde equilibrado sem adição de células; c) molde com esferoides após 21 dias de incubação. Os esferoides formados após 21 dias de incubação, em aumentos de d) 4x; e) 10x; f) 20x.



Fonte: Dados da pesquisa (2022).

No decorrer dos 21 dias de incubação, os esferoides foram monitorados e imagens foram capturadas e concentradas na Figura 23. Nesta, é possível identificar os esferoides pelas objetivas de 4x, 10x e 20x em 0, 7, 14 e 21 dias. O tempo zero foi considerado o momento de deposição das células e o 21º dia, o último da incubação.

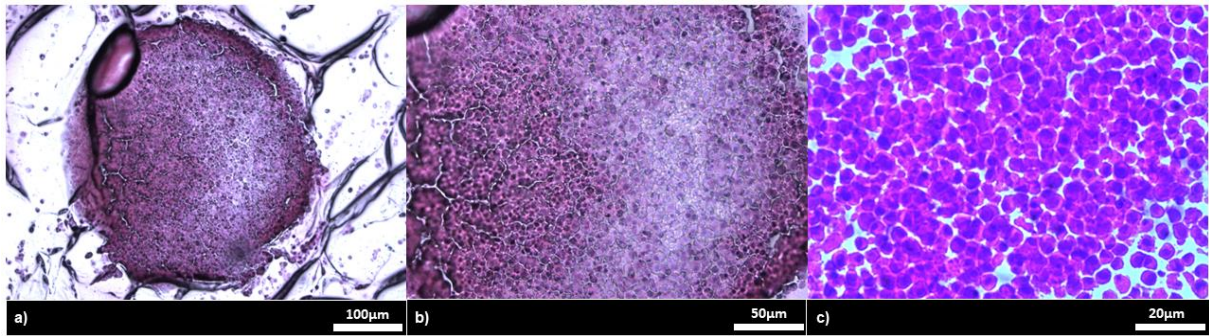
Figura 23 – Crescimento dos esferoides.



Fonte: Dados da pesquisa (2022).

A figura 24 apresenta os resultados da análise histológica dos esferoides após o fim da incubação. Estes foram seccionados em um criostato de mesa e corados com hematoxilina e eosina, conforme descrito na seção 3.3. Na figura 24a é possível observar a totalidade do esferoide em objetiva de 4x, com a presença de partes do molde de agarose em seu contorno. Em 24b é possível ter uma percepção geral do tecido pelo aumento de 40x. Em 24c, o aumento de 100x nos permite observar as características celulares e teciduais mais importantes, como a comunicação célula-célula e célula-matriz extracelular.

Figura 24 – Análise histológica dos esferoides em aumentos de a)20x; b) 40x e; c) 100x.

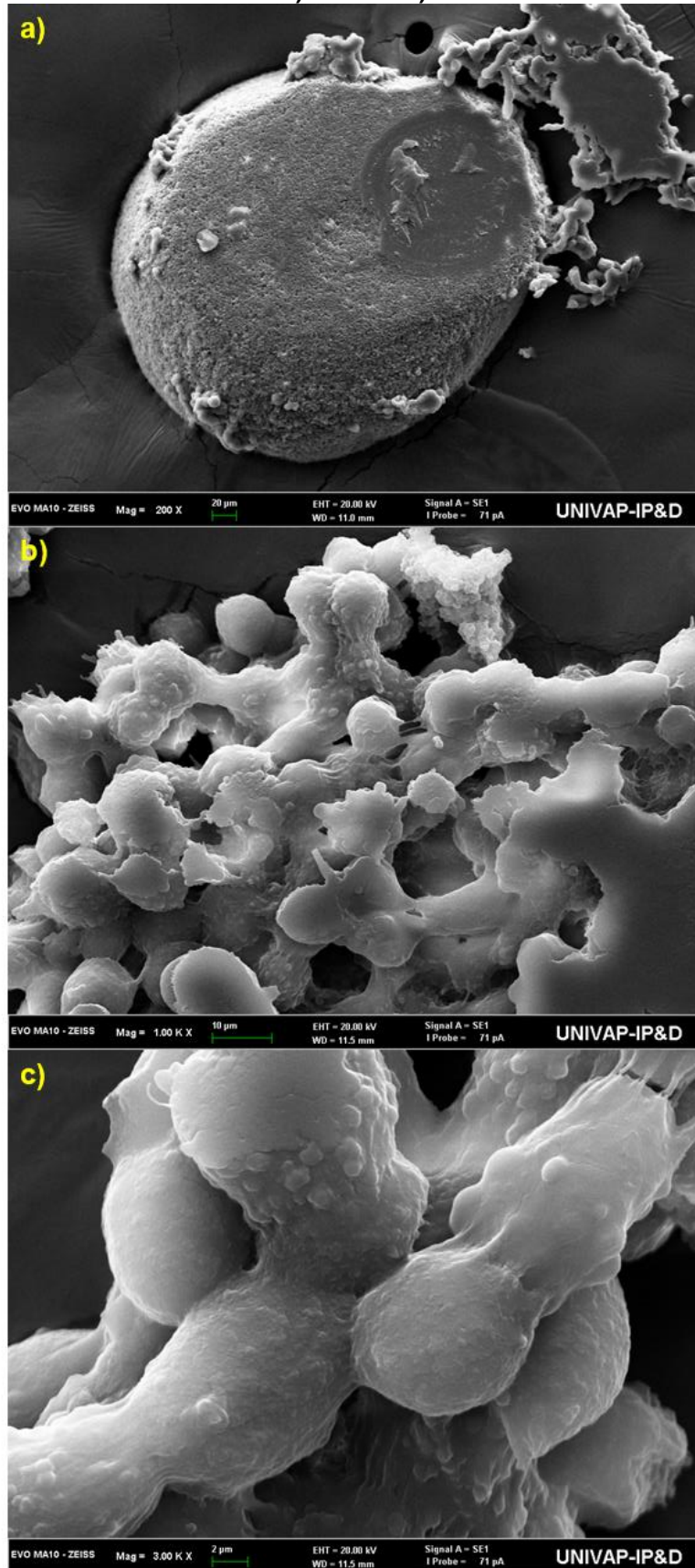


Fonte: Dados da pesquisa (2022).

4.3 ANÁLISE MORFOLÓGICA DO MICROAMBIENTE CELULAR TRIDIMENSIONAL

A morfologia superficial dos esferoides está destacada na Figura 25. Nesta figura, é possível observar o esferoide formado em diferentes magnitudes.

Figura 25 – Fotomicrografias da Microscopia Eletrônica de Varredura em aumentos de: a) 200x; b) 1000x e c) 3000x.



Fonte: Dados da pesquisa (2022).

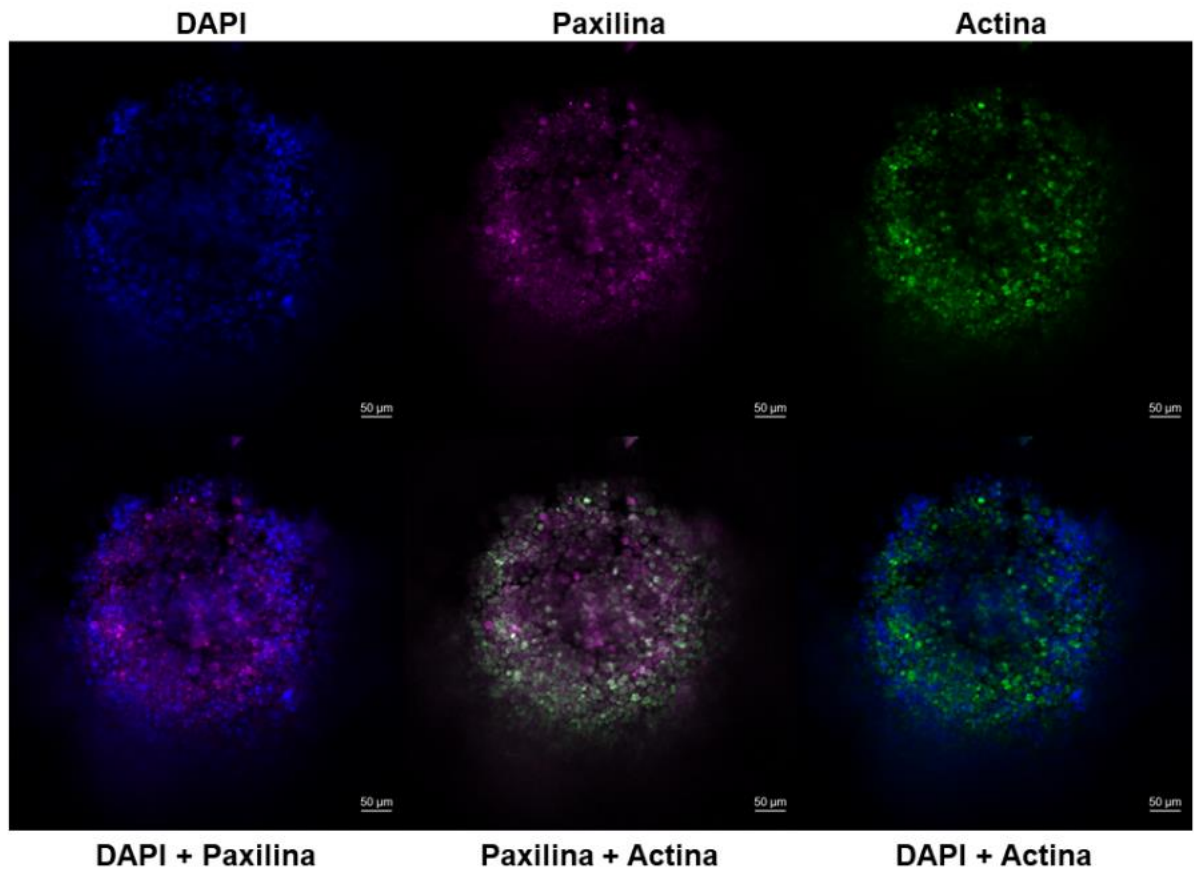
A Figura 25a possibilita a visualização completa do esferoide, em um aumento de 200x. Nesta figura, é possível observar a morfologia e o formato esferoidal com alguns prolongamentos. A Figura 25b apresenta um aumento de 1000x em um ponto central da amostra, onde é possível observar as células e sua organização tecidual, com junções célula-célula. A Figura 25c apresenta as células para uma visualização mais detalhada, onde é possível observar pequenas estruturas pertencentes ao microambiente.

4.4 MARCAÇÃO DE PROTEÍNAS DOS ESFEROIDES POR IMUNOFLUORESCÊNCIA

A marcação de proteínas dos esferoides foi realizada por meio da análise de microscopia de fluorescência com marcação de anticorpos específicos. Foram marcados os anticorpos: E-caderina, actina, β -integrina, laminina, fibronectina e paxilina. Ademais, o corante DAPI se liga ao DNA, emitindo fluorescência azul revelando o núcleo da célula como referência, evidenciando assim, quaisquer outras marcações feitas nas células.

A figura 26 apresenta o corante DAPI com a marcação dos anticorpos paxilina e actina, em que a paxilina é encontrada no citoesqueleto e a actina em microfilamentos.

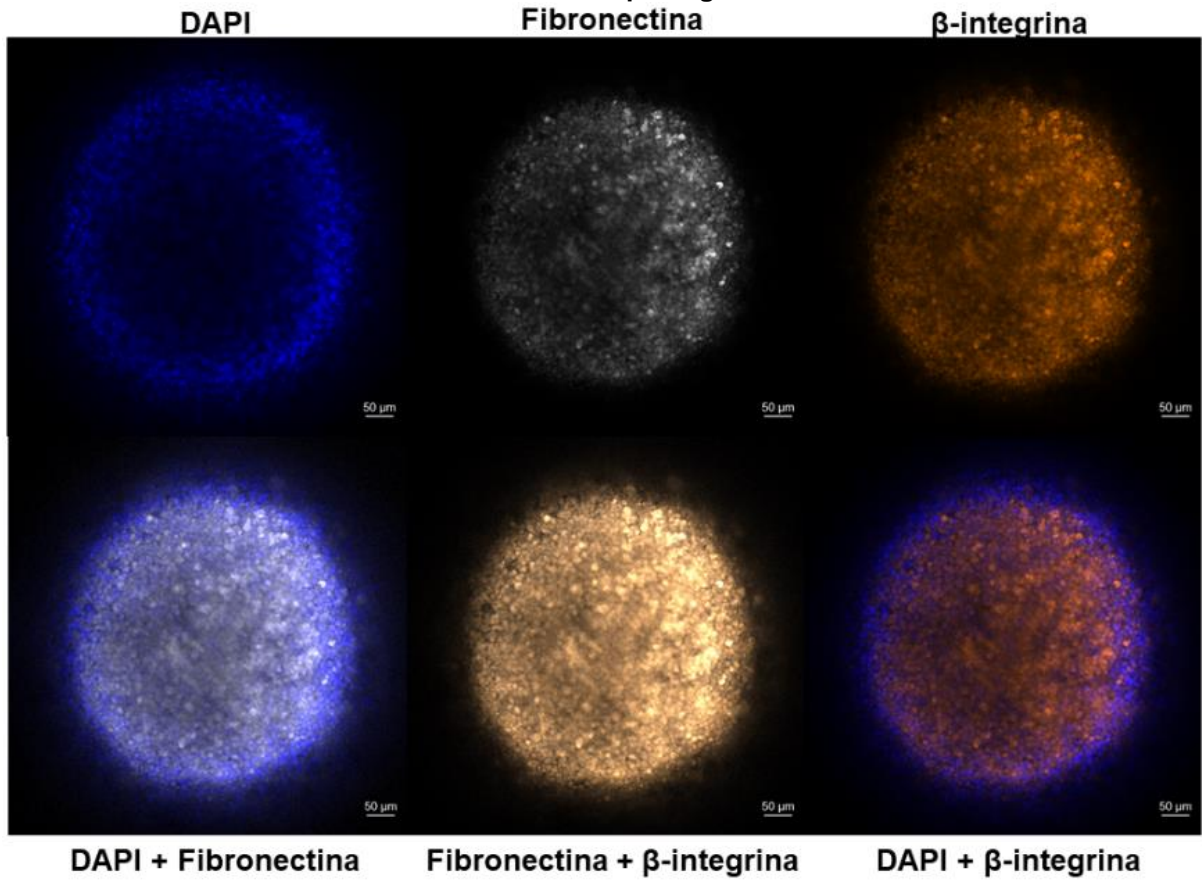
Figura 26 – Fotomicrografia dos esferoides com marcações de DAPI e anticorpos de paxilina e actina.



Fonte: Dados da pesquisa (2023).

A figura 27 apresenta o corante DAPI com a marcação dos anticorpos anti-fibronectina e anti- β -integrina, em que a fibronectina e a β -integrina são glicoproteínas encontradas na matriz extracelular.

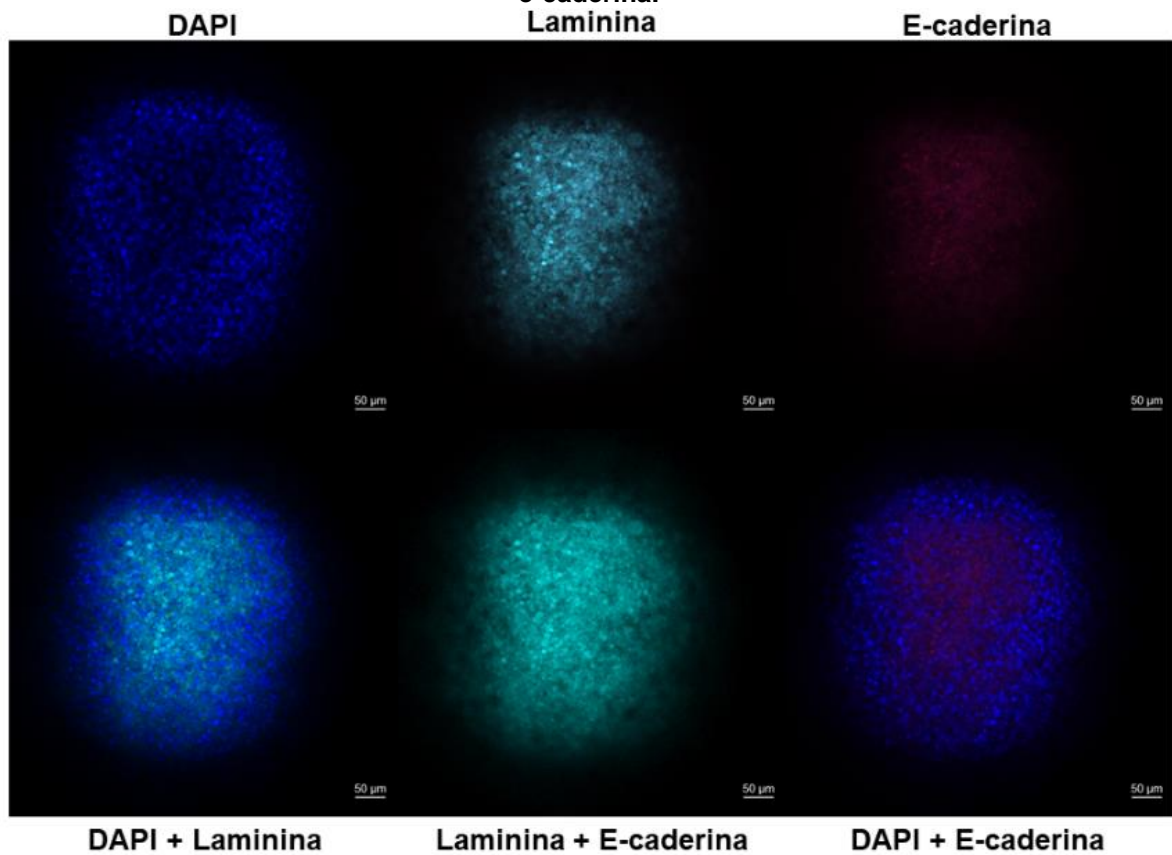
Figura 27 - Fotomicrografia dos esferoides com marcações de DAPI e anticorpos de fibronectina e β -integrina.



Fonte: Dados da pesquisa (2023).

A figura 28 apresenta o corante DAPI com a marcação dos anticorpos laminina e e-caderina, em que ambas são constituintes da membrana celular.

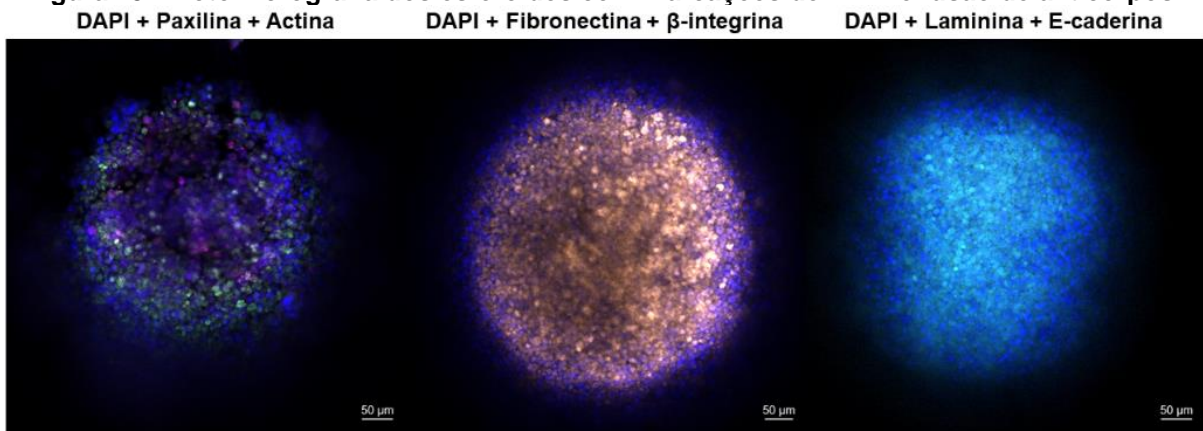
Figura 28 - Fotomicrografia dos esferoides com marcações de DAPI e anticorpos de laminina e e-caderina.



Fonte: Dados da pesquisa (2023).

A figura 29 apresenta a fusão dos anticorpos, em que é possível observar a estrutura da célula (Figura 29a), a estrutura da matriz extracelular (Figura 29b) e a estrutura das membranas celulares (Figura 29c).

Figura 29 – Fotomicrografia dos esferoides com marcações de DAPI e fusão de anticorpos.

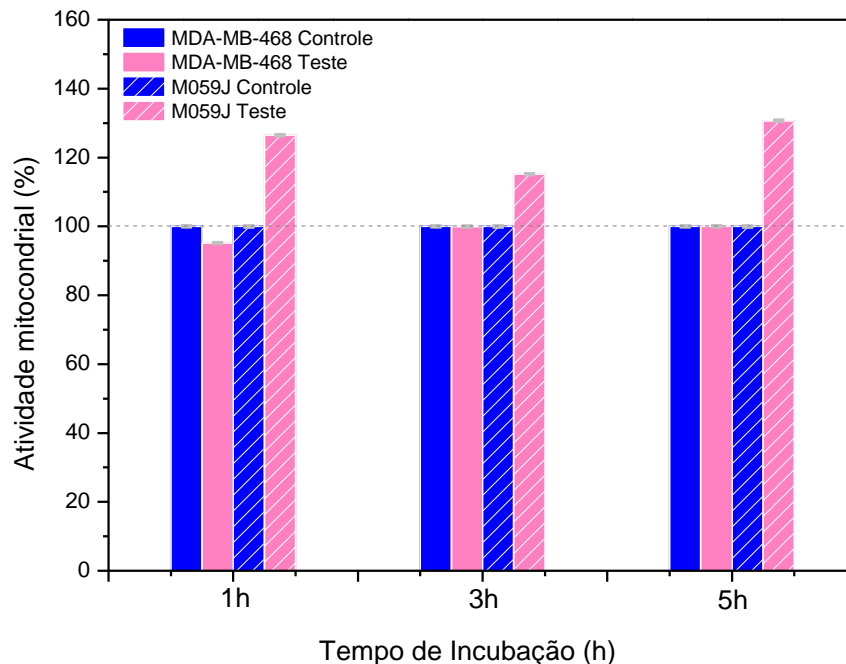


Fonte: Dados da pesquisa (2023).

4.5 ANÁLISE DA ATIVIDADE METABÓLICA EM MONOCAMADA

O teste de MTT foi realizado para investigar a variação do percentual de atividade mitocondrial após a aplicação dos bionanossensores, que foram estudados nos tempos de incubação de 1 h, 3 h e 5 h nas linhagens celulares MDA-MB-468 e M059J. Os resultados deste teste são apresentados na figura 30. Os grupos controle demonstram um padrão de atividade mitocondrial de 100% em ambas linhagens e tempos de incubação, estabelecendo um parâmetro de avaliação para os grupos de aplicação de bionanossensores. A linhagem celular MDA-MB-468 revela baixa variação do percentual de atividade mitocondrial comparado ao grupo controle, apresentando um resultado de 95-100%. Ademais, a linhagem celular M059J indica uma variação de porcentagem da atividade mitocondrial entre 115-130%, não expressando nenhuma redução desta em nenhum grupo.

Figura 30 – Atividade mitocondrial após aplicação do bionanossensor em linhagens celulares MDA-MB-468 e M059J.



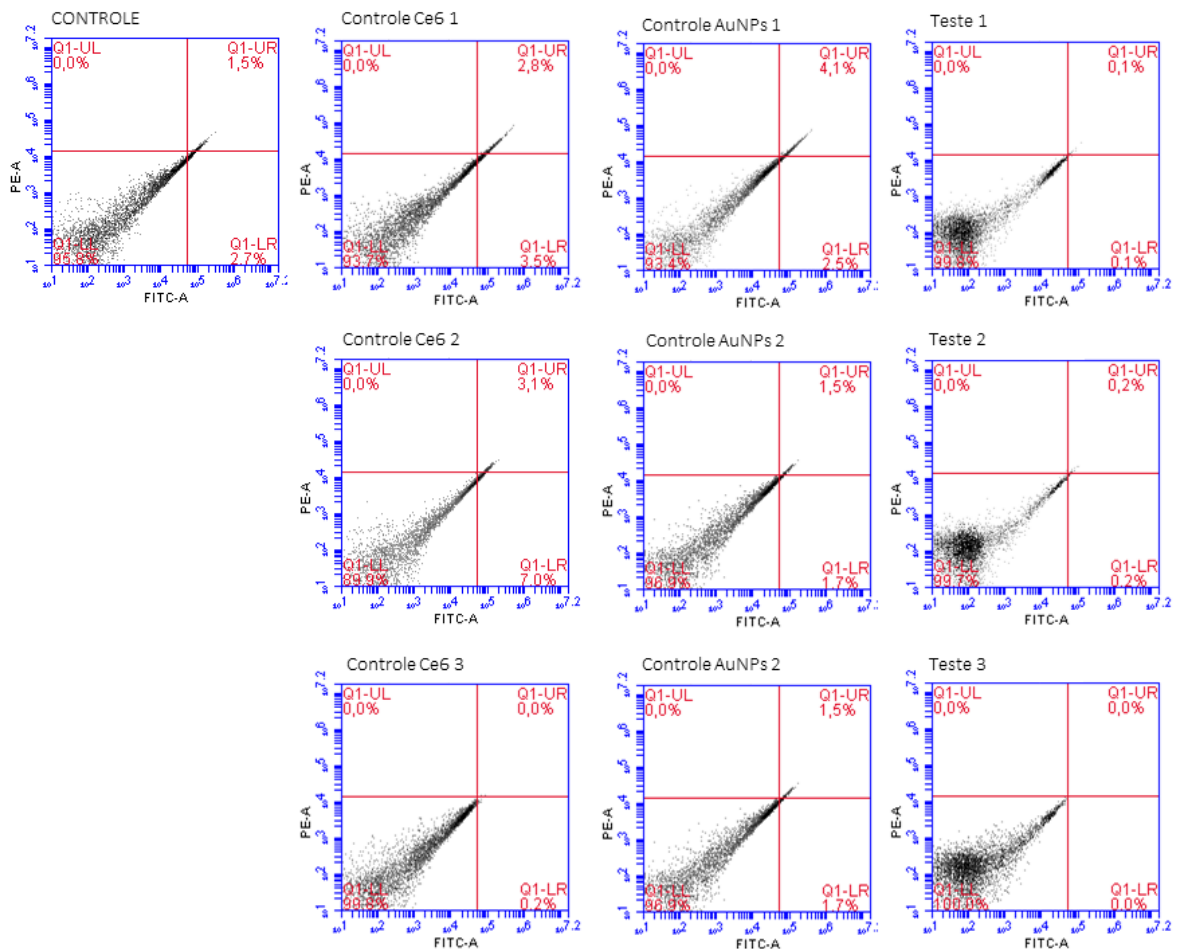
Nota: O gráfico demonstra o tempo de incubação em horas no eixo x por porcentagem de atividade mitocondrial no eixo y.

Fonte: Dados da pesquisa (2022).

4.6 ANÁLISE DA VIA DE MORTE EM ESFEROIDES

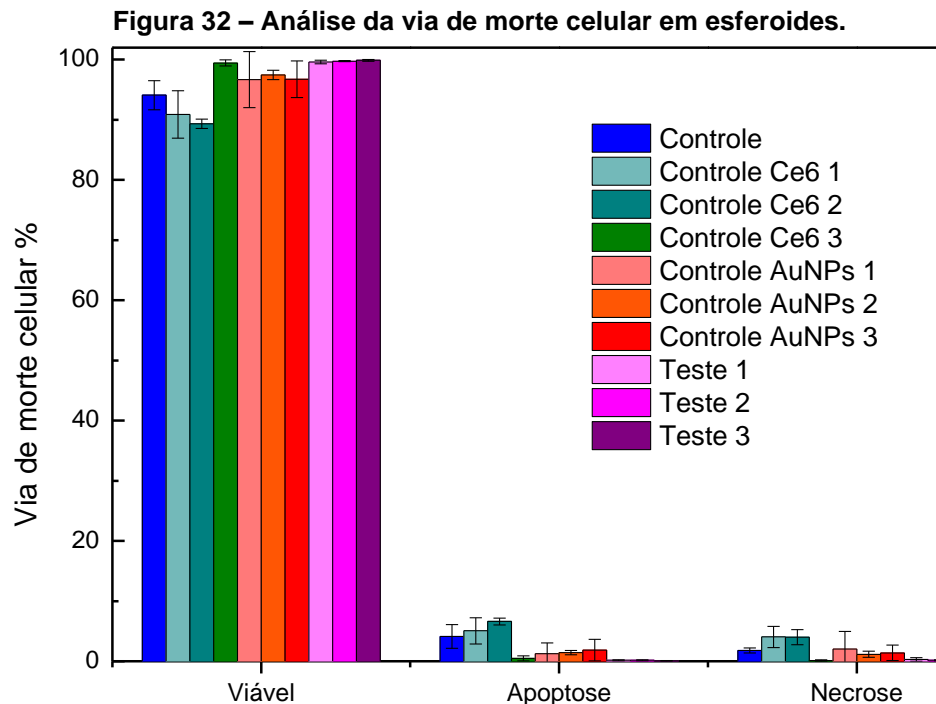
Para os esferoides, foi feito um teste de identificação da via de morte celular via citometria de fluxo, sendo assim, utilizada para analisar o status das células após a incubação com os bionanossensores. A Figura 31 apresenta os resultados brutos desta análise.

Figura 31 – Resultados brutos da análise da via de morte celular em esferoides.



Fonte: Dados da pesquisa (2022).

Para melhor entendimento e efeitos de comparação, os dados foram compilados e colocados no gráfico apresentado pela figura 32. Este quantifica as porcentagens de células viáveis, apoptóticas e necróticas em cada grupo experimental.

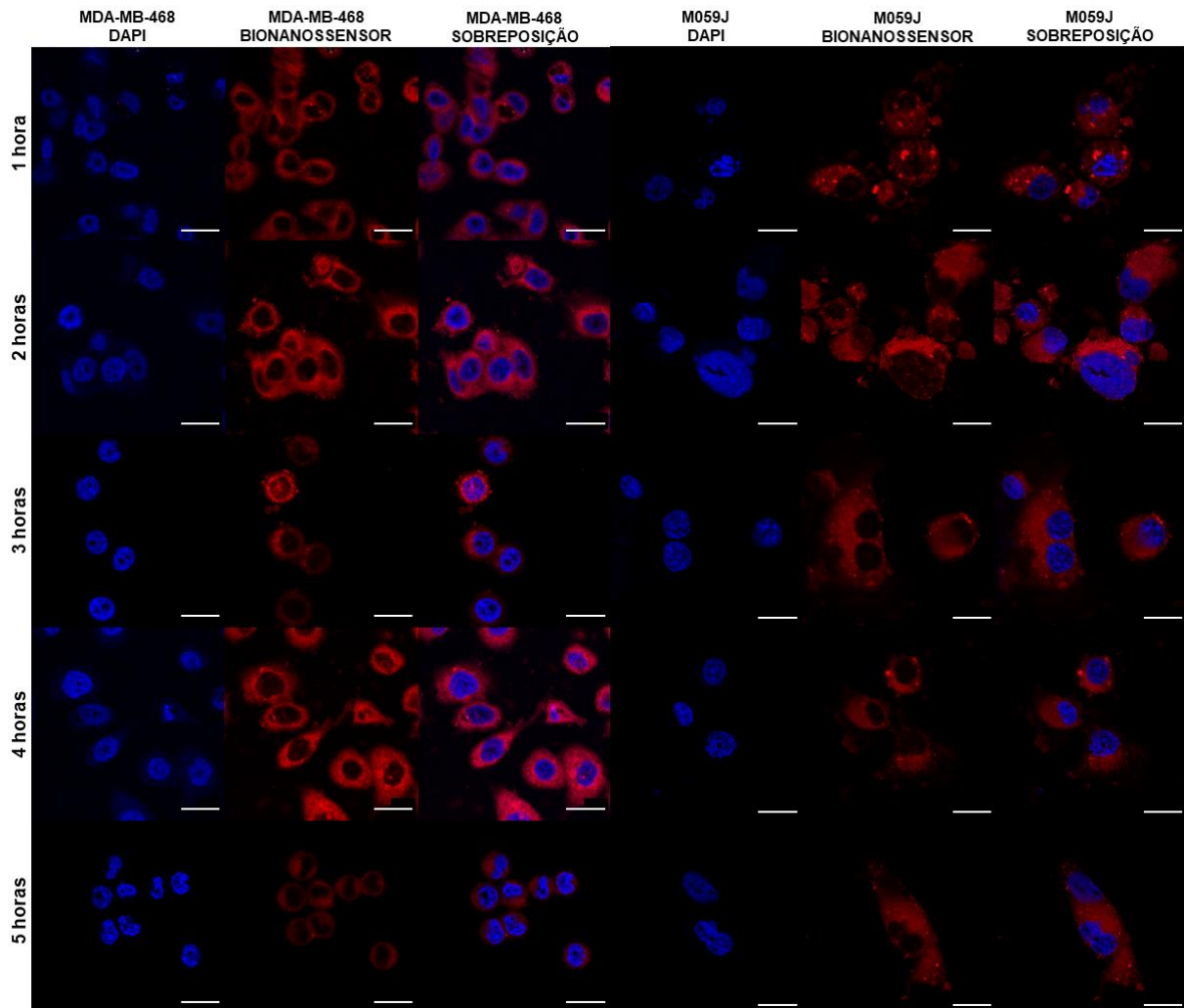


Fonte: Dados da pesquisa (2022).

4.7 ANÁLISE DA INTERNALIZAÇÃO DOS BIONANOSSENSORES NO MICROAMBIENTE CELULAR

A análise de microscopia de fluorescência confocal investigou a internalização dos bionanossensores nas linhagens celulares MDA-MB-468 e M059J (Figura 33). A marcação DAPI, conforme descrito no item 4.4., revela o núcleo da célula como referência, neste aspecto, para mostrar a ausência de fluorescência vermelha no núcleo. A fluorescência vermelha indica a presença de bionanossensores no citoplasma. Portanto, a fusão de rotulagem DAPI e bionanossensor é crucial para a detecção de células. A fluorescência em azul revela o DAPI anelado ao DNA no núcleo celular. A fluorescência em cor vermelha revela os bionanossensores no citoplasma celular. As colunas indicam DAPI isolado, bionanossensor isolado e a sobreposição entre eles, respectivamente, da esquerda para a direita. As linhas indicam as fotomicrografias de um mesmo tempo de incubação, sendo 1h, 2h, 3h, 4h e 5h, respectivamente, de cima para baixo.

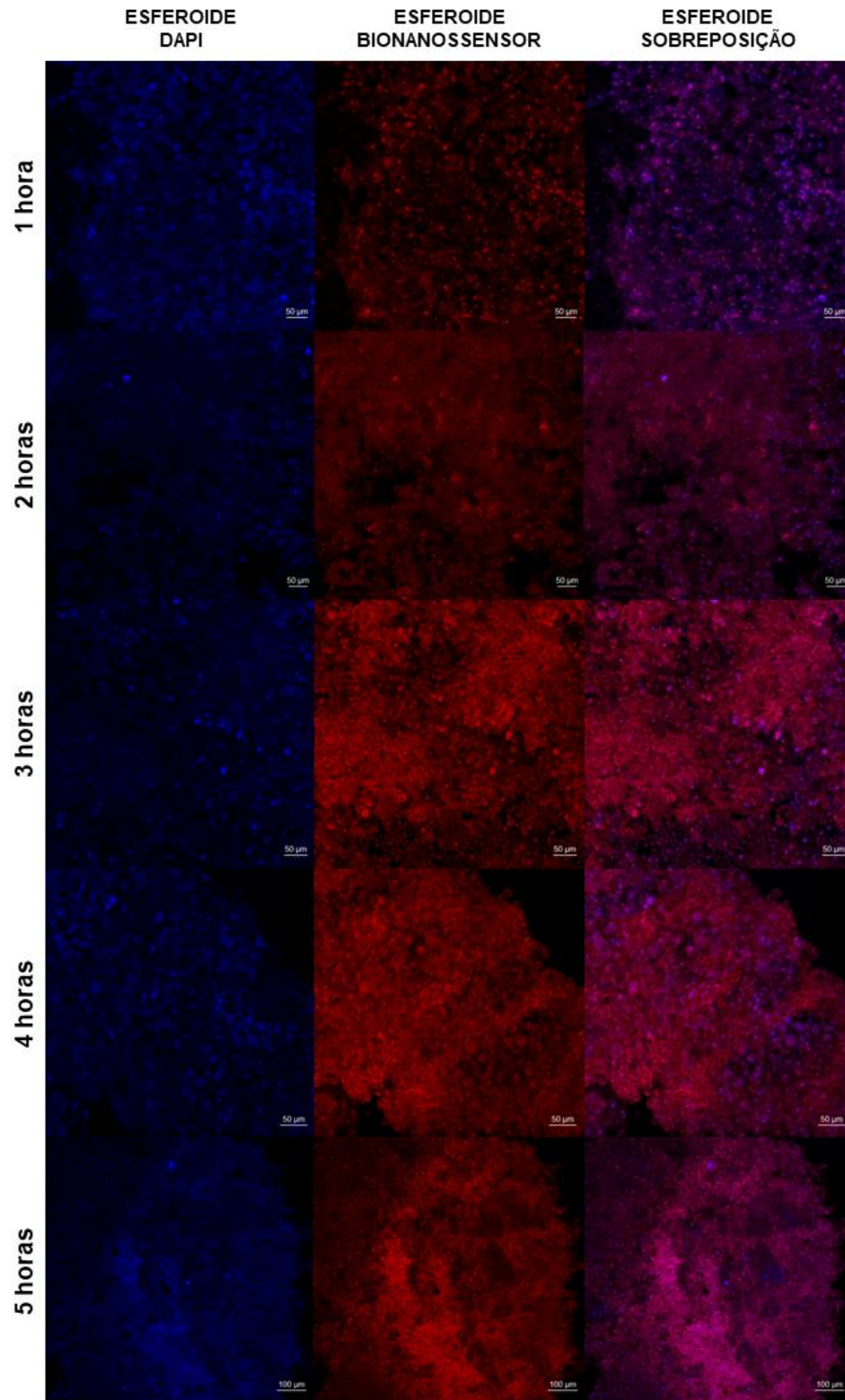
Figura 33 – Fotomicrografia de fluorescência confocal das linhagens MDA-MB-468 e M059J.



**Nota: Barra de escala = 20 μ m.
Fonte: Dados da pesquisa (2022).**

A Figura 34 apresenta a internalização dos bionanossensores no microambiente celular dos esferoides. A fluorescência vermelha indica a presença de bionanossensores no citoplasma. A fluorescência em azul revela o DAPI anelado ao DNA no núcleo celular. A fluorescência em cor vermelha revela os bionanossensores no citoplasma celular. As colunas indicam DAPI isolado, bionanossensor isolado e a sobreposição entre eles, respectivamente, da esquerda para a direita. As linhas indicam as fotomicrografias de um mesmo tempo de incubação, sendo 1h, 2h, 3h, 4h e 5h, respectivamente, de cima para baixo.

Figura 34 - Fotomicrografia de fluorescência confocal dos esferoides.



Fonte: Dados da pesquisa (2022).

4.8 DETERMINAÇÃO DA INTENSIDADE DE FLUORESCÊNCIA EMITIDA PELO BIONANOSSENSOR

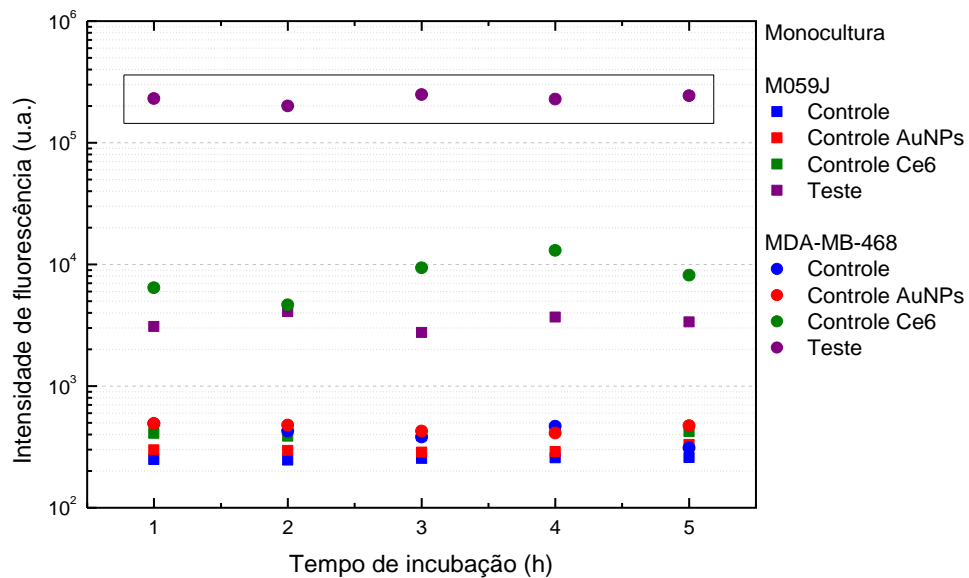
A análise de citometria de fluxo investigou intensidade de fluorescência do bionanosensor nas linhagens celulares MDA-MB-468 e M059J, como mostrado na Figura 35. O estudo foi realizado com tempos de incubação de 1 h, 2 h, 3 h, 4 h e 5 h, contemplando dez mil eventos (células analisadas) por grupo e por tempo de incubação.

A linhagem celular MDA-MB-468 revela um padrão de intensidade de fluorescência entre os grupos. Os grupos controle MDA-MB-468 e AuNPs MDA-MB-468 apresentam uma intensidade de fluorescência entre 10^2 e 10^3 . Enquanto isso, o grupo Ce6 MDA-MB-468 oferece uma intensidade de fluorescência de 10^4 . O grupo bionanosensor MDA-MB-468 apresenta a maior fluorescência da linhagem, entre 10^5 e 10^6 .

A linhagem celular M059J também revelou um padrão de intensidade de fluorescência entre grupos. Os grupos controle M059J e AuNPs M059J apresentaram uma intensidade de fluorescência entre 10^1 e 10^3 . O grupo Ce6 M059J emitiu uma intensidade de fluorescência na ordem de 10^3 . Enquanto isso, o bionanosensor M059J demonstrou a maior intensidade de fluorescência entre grupos, variando entre 10^2 e 10^5 .

A Figura 35 resume os resultados obtidos da intensidade de fluorescência em função do tempo de incubação, permitindo uma comparação entre grupos.

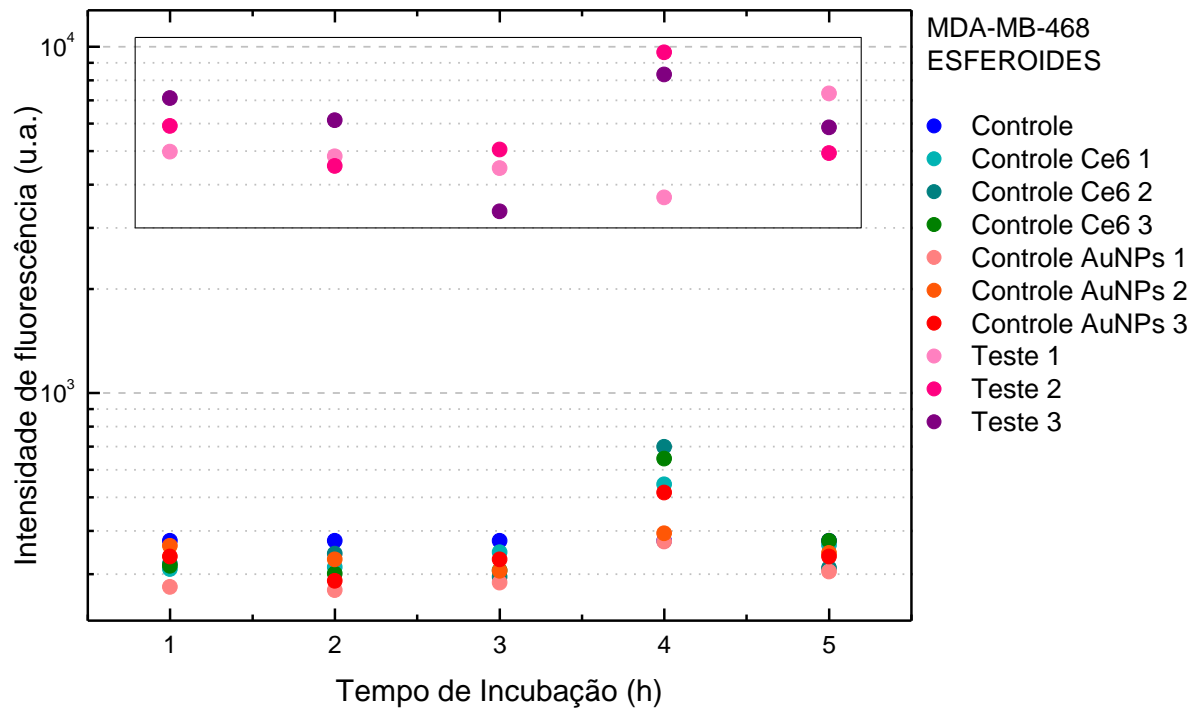
Figura 35- Análise do pico de intensidade de fluorescência nas linhagens celulares MDA-MB-468 e M059J. O gráfico revela o tempo de incubação em horas no eixo x por pico de intensidade de fluorescência no eixo y. Os círculos representam a linha celular MDA-MB-468 e os quadrados representam a linha celular M059J. Sumarização de todas as regiões de intensidades de fluorescência.



Fonte: Dados da pesquisa (2022).

A análise de intensidade de fluorescência emitida pelo bionanossensor também foi realizada nos esferoides, apresentado pela Figura 36. Neste caso, o padrão se repete, em que há uma distância grande de fluorescência entre os grupos em que os bionanossensores foram incubados e todos os outros grupos.

Figura 36 - Análise do pico de intensidade de fluorescência nos esferoides. O gráfico revela o tempo de incubação em horas no eixo x por pico de intensidade de fluorescência no eixo y. Sumarização de todas as regiões de intensidades de fluorescência.



Fonte: Dados da pesquisa (2022).

5 DISCUSSÃO

A sEGFR como mutação do gene EGFR desencadeia o fenótipo mais agressivo e de pior prognóstico de algumas doenças como glioblastoma, câncer de pulmão e câncer de mama. Até o momento, as técnicas disponíveis para o diagnóstico do gene EGFR incluem biologia molecular e imuno-histoquímica. No entanto, requer profissionais altamente especializados e custos elevados, o que muitas vezes inviabiliza o acesso. Como resultado, vários estudos e tecnologias mostraram-se promissores no desenvolvimento de técnicas de detecção de EGFR mais eficazes, que são altamente relevantes para a prática clínica. Neste sentido, a nanomedicina permite a síntese de bionanossensores específicos de EGFR, utilizando AuNPs para transportar a proteína EGF para EGFR, detectada por fluorescência Ce6 (FURRER *et al.*, 2016; GOMES *et al.*, 2018; HYNES; LANE, 2005; KARLOVICH *et al.*, 2016; KJAER *et al.*, 2018; LEMMON; SCHLESSINGER; FERGUSON, 2014; OHNO *et al.*, 2013; PELAZ *et al.*, 2017; RAMOS *et al.*, 2019; ROENGVORAPHOJ *et al.*, 2013; SUN *et al.*, 2017; UENO; ZHANG, 2011; VAN DER MEEL *et al.*, 2019).

A síntese de bionanossensores é baseada na funcionalização dos complexos Ce6-cisteamina e EGF- α -ácido lipóico em AuNPs. Os bionanossensores desenvolvidos são detectados por medidas de fluorescência, devido à presença do fluoróforo Ce6, que fluoresce na presença de luz, adequado para um fotodiagnóstico (CASTILHO *et al.*, 2021; VIEIRA *et al.*, 2017). Os complexos produzidos, AuNPs e os bionanossensor sintetizados podem ser caracterizados pela espectroscopia UV-visível, sendo possível determinar a eficácia da funcionalização, bem como a integridade dos componentes por meio das bandas de absorção (CASTILHO *et al.*, 2021; LEE; MEISEL, 1982; VIEIRA *et al.*, 2017). VIEIRA *et al.* e CASTILHO *et al.* produziram as nanosondas AuNP-Ce6 e EGF-AuNP-Ce6 (respectivamente) para Terapia Fotodinâmica (CASTILHO; HEWITT; RANIERO, 2017; VIEIRA *et al.*, 2017). Os resultados encontrados neste estudo corroboram com este estudo, apresentando uma reprodutibilidade no protocolo (CASTILHO; HEWITT; RANIERO, 2017; VIEIRA *et al.*, 2017).

A fabricação dos micromoldes de agarose foram feitos de acordo com as especificações do fabricante MicroTissues, Inc (Anexo A). As incubações foram feitas a uma densidade de 10^5 , também seguindo o protocolo do fabricante (Anexo B). Todas as etapas foram registradas na seção de resultados. O desenvolvimento do esferoide,

sustentado pelas observações microscópicas, sugere que as células são depositadas nas microressecções e se espalham. Após alguns dias elas estão completamente unidas novamente e então sim começam a crescer em uma esfera (LAUAND, 2015; MORA, 2018).

A histologia feita em criostato e corada por hematoxilina e eosina nortearam a formação efetiva de um tecido, dada a possibilidade de observar a comunicação entre células e entre célula e matriz extracelular. Como um terceiro passo, os esferoides foram fixados e então, sua superfície foi analisada pelo microscópio eletrônico de varredura. É possível observar as formações e prolongamentos celulares superficiais. As células apresentaram características teciduais como o contato com as membranas das células adjacentes com a presença de junções aderentes e desmossomos (LAUAND, 2015; MORA, 2018).

A marcação de proteínas nos esferoides formados é feita via imunofluorescência. Nesta técnica, proteínas específicas são marcadas com anticorpos ligados a moléculas fluorescentes. Isto permite que as proteínas sejam localizadas em tecidos ou células cultivadas. Neste sentido, com a formação dos esferoides, este ensaio foi feito para verificar a presença de proteínas de estrutura, adesão e formação de matriz extracelular. Foram utilizados os anticorpos anti-paxilina, anti-actina, anti-fibronectina, anti- β -integrina, anti-laminina e anti-e-caderina (as especificações dos fabricantes estão em anexo).

A paxilina é um componente do citoesqueleto encontrado nas extremidades das fibras aderidas e é comumente relacionada às contrações musculares (Anexo C). A actina reage com fibras de estresse de fibroblastos e cora as bandas I do músculo esquelético, principal constituinte dos filamentos finos musculares e microfilamentos em células não-musculares (Anexo D). A fibronectina desempenha um papel estrutural na morfologia celular e organização do citoesqueleto (Anexo E). A ligação da integrina regula a adesão celular, forma, motilidade, sinalização intracelular e expressão gênica (Anexo F). A laminina é uma glicoproteína constituinte das membranas basais (Anexo G). A e-caderina compreende uma família de moléculas de adesão dependentes de Ca^{2+} que mediam a ligação célula-célula para a manutenção da estrutura e morfogênese do tecido (Anexo H).

Dessa forma, esta identificação de proteínas de adesão, estrutura e comunicação corrobora com os dados de histologia e MEV, apontando a presença de fatores cruciais no cultivo de um tecido. A presença desses fatores sugere

seguramente a comunicação célula-célula e célula-matriz extracelular. Além disso, como o meio de cultura não possui componentes exógenos, ou seja, foi cultivado com o mesmo meio de cultura da monocultura, evitando interferências externas (LAUAND, 2015).

As linhagens celulares MDA-MB-468 e M059J apresentaram em seus grupos controles uma atividade mitocondrial de 100%, o que estabeleceu um parâmetro de avaliação para os grupos que continham bionanossensores. O grupo teste de células MDA-MB-468 apresentou atividade mitocondrial de 95 % com 1h de incubação e 100 % para 3 h e 5 h de incubação. Para 1 h de incubação foi observado uma redução no percentual da atividade mitocondrial em 5 %, quando comparado ao grupo controle, resultados estes que caracterizam nenhum dano celular. O grupo de teste de células M059J apresentou uma atividade mitocondrial de quase 127 %, 115 % e 130 % para uma 1h, 3 h e 5 h de incubação, respectivamente. A porcentagem revelada no grupo celular M059J indica que os bionanossensores também não causaram danos nessa linhagem.

Em resumo, a variação percentual da atividade mitocondrial não foi significativamente reduzida e não foi citotóxica devido a valores superiores a 70%, indicando que a membrana celular está completamente operacional, capaz de internalizar o biomarcador e com potencial para aplicação *in vivo* (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 2009).

Esses achados são consistentes com DING *et al.* e KUMARI *et al.*, que analisaram o percentual de variação da atividade mitocondrial e a avaliação de citotoxicidade após aplicação de Ce6. Ambos estudos observaram ausência de redução na viabilidade celular quando Ce6 era conjugada, em comparação com dose livre de Ce6 (DING *et al.*, 2018; KUMARI *et al.*, 2019). Sendo que em baixas concentrações, a Ce6 não apresenta danos às células. Desta forma, os bionanossensores podem ser utilizados para diagnóstico *in vivo*, durante procedimentos que necessitem localizar tecidos com maior número de EGFR.

A análise da via de morte celular nos esferoides pode ser correlacionada com esses resultados. Da mesma forma em que os bionanossensores não causaram redução da viabilidade celular nas estruturas em monocamada, o resultado se repete nos esferoides. É possível observar as altas taxas de células viáveis quando os bionanossensores são aplicados nos esferoides, mantidas em relação ao controle de células. Este teste também pode mostrar resultados de apoptose e necrose. Assim,

revela que independente do grupo teste, as células dos esferoides não obtiveram taxas significativas de apoptose ou necrose, mantendo-se predominantemente viáveis, com taxas acima de 90% (AMARAL, 2010; LAUAND, 2015).

A presença e a eficácia da internalização de bionanossensores em monocultura e em esferoides foi investigada como um diagnóstico qualitativo. Nas fotomicrografias apresentadas, a fluorescência vermelha demonstrou a captação de bionanossensores em ambas as linhagens celulares no citoplasma, dados estes que corroboram com os resultados obtidos de CASTILHO *et al.* (2021). O estudo de DING *et al.* (2018) mostrou uma comparação entre Ce6 livre e funcionalizada, na qual, demonstra que o Ce6 funcionalizado possui maior intensidade de fluorescência na análise de microscopia confocal (AMARAL, 2010).

Considerando esses achados, a fluorescência azul apresenta o marcador DAPI fornecendo manchas de DNA no núcleo das células, orientando a localização dos bionanossensores. Enquanto isso, a fluorescência vermelha revela a internalização efetiva dos bionanossensores e sua distribuição no citoplasma celular. A sobreposição (DAPI + bionanossensor) demonstra fácil detecção do bionanossensor nas células, reafirmando seu potencial diagnóstico (AMARAL, 2010; DING *et al.*, 2018).

Além disso, o estudo não apresenta nenhum sinal de variação morfológica celular, tanto nas células cultivadas em monocultura quanto nas células cultivadas como esferoides, o que indica nenhum sinal de citotoxicidade apoiando os dados dos ensaios de análise da atividade metabólica e da via de morte em esferoides. Além disso, as células em ambas as linhagens celulares e cultivos revelaram estabilização na fluorescência ao longo do tempo (DING *et al.*, 2018). Estes resultados apresentam a internalização do marcador é internalizado, entretanto, a diferença populacional quantitativa da discriminação da sEGFR foi determinada pela citometria de fluxo.

Assim, a intensidade de fluorescência de bionanossensores em monocultura (MDA-MB-468 e M059J) e em cultura tridimensional foi determinada por citometria de fluxo para obtenção de um diagnóstico quantitativo. Ambas as linhagens e culturas celulares apresentam um padrão de intensidade de fluorescência entre os grupos, entretanto a intensidade do bionanossensor foi significativamente maior na linhagem celular MDA-MB-468, tanto em monocultura quanto em cultura tridimensional devido às suas características de sEGFR.

Em ambos casos, o grupo controle e o grupo AuNPs apresentam a menor intensidade de fluorescência. Enquanto isso, o Grupo Ce6 e o Grupo Bionanossensor demonstram maiores intensidades de fluorescência, atribuídas às propriedades físicas do fluoróforo. Os grupos Ce6 foram utilizados para um controle de fluorescência, para melhor análise do padrão de fluorescência do bionanossensor. No entanto, os grupos de bionanossensores apresentaram a maior intensidade de fluorescência, apresentando-se acima de todos os grupos.

A fluorescência mais aumentada mostrou a seletividade dos bionanossensores devido ao direcionamento ativo do EGF, pois aumentou significativamente a absorção pelas células-alvo. De acordo com MORITA *et al.* o precursor do fotossensibilizador ácido 5-aminolevulínico (5-ALA) (usado em cirurgias neurológicas guiadas) foi aplicado para detecção do câncer de mama, nas linhagens celulares MCF7, MDA-MB-231 e MCF10A. O precursor do 5-ALA é clinicamente estabelecido em procedimentos intraoperatórios em tumores cerebrais e apresentou intensidade de fluorescência entre 10^2 e 10^4 (MORITA *et al.*, 2019). Assim, os bionanossensores gerados neste estudo apresentaram uma fluorescência duas ordens de grandeza maior do que o 5-ALA, variando de 10^5 a 10^6 . Devido à intensidade de fluorescência e à falta de efeito de citotoxicidade, o bionanossensor tem potencial para ser usado para operações diagnósticas *in vitro*.

Considerando esses achados, os bionanossensores produzidos possuem relevante potencial diagnóstico *in vitro*, sustentado em um ensaio performado em esferoides, mais próximo de uma realidade *in vivo*. A sensibilidade e especificidade da proteína EGF permite que ela se ligue ao EGFR, direcionando o bionanossensor para o alvo. A Ce6 por ser uma molécula fluorescente, fluoresce na presença de luz e as AuNPs possuem papel de carreador, permitindo a funcionalização com EGF e Ce6 (AMIRSHAGHAGHI *et al.*, 2019; TENG *et al.*, 2021). Portanto, estes resultados sugerem que o bionanossensor é altamente ativado em células cancerosas com superexpressão do receptor EGFR, e pouco ativado em células com expressão regular. Para confirmação desta abordagem, sugere-se a realização de estudos *in vivo* ou *ex vivo*, entretanto inferimos que esses resultados são promissores no diagnóstico precoce de células superexpressas de EGFR, como visto no câncer de mama triplo negativo.

6 CONCLUSÃO

O processo de funcionalização de AuNPs aos complexos Ce6-cisteamina e EGF- α -ácido lipóico, desenvolveu bionanossensores fluorescentes. A funcionalização da proteína EGF para AuNPs não afetou as interações ligante-receptor, nem apresentou dano celular; portanto, os bionanossensores são adequados para aplicações *in vitro*. As células foram capazes de internalizar o bionanossensor, sustentado pela localização citoplasmática e marcação nuclear. Em ambas linhagens e modos de cultivo, os bionanossensores foram internalizados eficientemente. Ademais, os bionanossensores foram distribuídos pelo meio de cultura com eficiência em se propagar para todas as células inclusive no ambiente 3D, o que sugere um direcionamento ativo para os alvos desejados, que revelaram forte intensidade de fluorescência. Portanto, foi desenvolvido um bionanossensor fluorescente potencialmente específico para o diagnóstico de células superexpressas do receptor EGFR *in vitro*, com um grande potencial para análise *in vivo*.

REFERÊNCIAS

- AMARAL, J. B. DO. **CÉLULAS MCF-7 COMO MODELO 3D NO ESTUDO DE CÂNCER DE MAMA HUMANO**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2010.
- AMIRSHAGHAGHI, A. *et al.* Chlorin e6-Coated Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticle (SPION) Nanoclusters as a Theranostic Agent for Dual- Mode Imaging and Photodynamic Therapy. **Scientific Reports**, v. 9, n. October 2018, p. 1–9, 2019.
- BAYDA, S. *et al.* **The history of nanoscience and nanotechnology: From chemical-physical applications to nanomedicine**. **Molecules**MDPI AG, , 2020.
- BHATTACHARJEE, T. T. *et al.* FTIR study of secondary structure changes in Epidermal Growth Factor by gold nanoparticle conjugation. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1862, n. 3, p. 495–500, 2018.
- BRANDT, B. *et al.* Mechanisms of egfr gene transcription modulation: Relationship to cancer risk and therapy response. **Clinical Cancer Research**, v. 12, n. 24, p. 7252–7260, 2006.
- CASTILHO, M. L. **NANOSSONDAS BIFUNCIONAIS FOTOSSENSIBILIZADORAS PARA O TRATAMENTO DO CÂNCER DE MAMA**. [s.l.] Universidade do Vale do Paraíba, 2017.
- CASTILHO, M. L. *et al.* Chlorin e6-EGF conjugated gold nanoparticles as a nanomedicine based therapeutic agent for triple negative breast cancer. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 33, n. December 2020, p. 102186, 2021.
- CASTILHO, M. L.; HEWITT, K. C.; RANIERO, L. FT-IR characterization of a theranostic nanoprobe for photodynamic therapy and epidermal growth factor receptor targets. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 240, p. 903–908, 2017.
- CHEN, X. *et al.* Prognostic Role of EGFR / p-EGFR in Patients With Nasopharyngeal Carcinoma: A Meta-Analysis. **Frontiers in oncology**, v. 11, n. August, p. 1–11, 2021.
- CONTERA, S.; DE LA SERNA, J. B.; TETLEY, T. D. **Biotechnology, nanotechnology and medicine**. **Emerging Topics in Life Sciences**Portland Press Ltd, , 1 dez. 2021.
- COSTA, R. N. **Introdução à citometria de fluxo: Um manual básico para iniciantes**. Curitiba: Independently published, 2020.
- DING, Y. *et al.* Highly Biocompatible Chlorin e6-Loaded Chitosan Nanoparticles for Improved Photodynamic Cancer Therapy. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 10, n. 12, p. 9980–9987, 2018.
- FAGERBERG, L. *et al.* Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics. **Molecular and Cellular Proteomics**, v. 13, n. 2, p. 397–406, 2013.

FURRER, D. *et al.* Tissue Microarray Is a Reliable Tool for the Evaluation of HER2 Amplification in Breast Cancer. **Anticancer Research**, v. 36, n. 1, p. 4661–4666, 2016.

GOMES, R. V. *et al.* Expressão do receptor do fator de crescimento epitelial (EGFR) em colangiocarcinomas: fatores preditivos e sobrevida. **Revista do Colegio Brasileiro de Cirurgios**, v. 45, n. 3, p. 1–9, 2018.

HARDBOWER, D. M. *et al.* EGFR-mediated Macrophage Activation Promotes Colitis-associated Tumorigenesis. **Oncogene**, v. 36, n. 27, p. 3807–3819, 2017.

HE, X.; DENG, H.; HWANG, H. MIN. **The current application of nanotechnology in food and agriculture**. **Journal of Food and Drug Analysis** Elsevier Taiwan LLC, , 1 jan. 2019.

HO, S. R.; LIN, W. C. RNF144A sustains EGFR signaling to promote EGF-dependent cell proliferation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 293, n. 42, p. 16307–16323, 2018.

HYNES, N. E.; LANE, H. A. ERBB RECEPTORS AND CANCER: The complexity of targeted inhibitors. **Nature Reviews**, v. 5, n. May, p. 341–354, 2005.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Estimativa 2020: Incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: MINISTÉRIO DA SAÚDE INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA), 2019.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **Biological evaluation of medical devices**. **International Organization for Standardization**, 2009.

KARLOVICH, C. *et al.* Assessment of EGFR Mutation Status in Matched Plasma and Tumor Tissue of NSCLC Patients from a Phase I Study of Rociletinib (CO-1686). **Clin Cancer Res**, v. 22, n. 10, p. 2386–2395, 2016.

KJAER, I. M. *et al.* Prognostic and predictive value of EGFR and EGFR-ligands in blood of breast cancer patients : a systematic review. **Clin Chem Lab Med**, v. 56, n. 5, p. 688–701, 2018.

KUMARI, P. *et al.* Development of chlorin e6-conjugated poly(ethylene glycol)-poly(D,L-lactide) nanoparticles for photodynamic therapy. **Nanomedicine**, v. 14, n. 7, p. 819–834, 2019.

LAUAND, C. **Avaliação da proliferação e migração celular mediadas pela ativação do EGFR em linhagens celulares de câncer de pulmão cultivadas como monocamadas e esferoides**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2015.

LEE, C. L. D. *et al.* Epidermal Growth Factor Receptor-Specific Nanoprobe Biodistribution in Mouse Models. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 105, n. 1, p. 25–30, 2016.

LEE, P. C.; MEISEL, D. Adsorption and surface-enhanced Raman of dyes on silver and gold sols. **Journal of Physical Chemistry**, v. 86, n. 17, p. 3391–3395, 1982.

LEMMON, M. A.; SCHLESSINGER, J.; FERGUSON, K. M. The EGFR family: Not so prototypical receptor tyrosine kinases. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 6, p. 1–18, 2014.

LI, W. *et al.* The role of EGFR mutation as a prognostic factor in survival after diagnosis of brain metastasis in non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis. **BMC Cancer**, v. 19, n. 145, p. 1–9, 2019.

LI, Y. *et al.* Screening of anti-cancer agent using zebrafish: Comparison with the MTT assay. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 422, n. 1, p. 85–90, 2012.

LICCARDI, G.; HARTLEY, J. A.; HOCHHAUSER, D. Importance of EGFR/ERCC1 interaction following radiation-induced DNA damage. **Clinical Cancer Research**, v. 20, n. 13, p. 3496–3506, 2014.

LUCAS, L. J. *et al.* 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.

MCKINNON, K. M. Flow cytometry: An overview. **Current Protocols in Immunology**, v. 2018, n. 120, p. 5.1.1-5.1.11, 1 fev. 2019.

MORA, T. D. ESTABELECIMENTO DE ESFEROIDES MULTICELULARES TIPO TECIDO ADIPOSEO: ASPECTOS MORFO-FUNCIONAIS Florianópolis. p. 1–106, 2018.

MORITA, M. *et al.* Fluorescence-based discrimination of breast cancer cells by direct exposure to 5-aminolevulinic acid. **Cancer Medicine**, v. 8, n. 12, p. 5524–5533, 2019.

OHNO, S. I. *et al.* Systemically injected exosomes targeted to EGFR deliver antitumor microrna to breast cancer cells. **Molecular Therapy**, v. 21, n. 1, p. 185–191, 2013.

PELAZ, B. *et al.* Diverse Applications of Nanomedicine. **ACS Nano**, v. 11, p. 2313–2381, 2017.

RAMOS, I. A. DE S. *et al.* Phylogeography of msp4 genotypes of *Anaplasma marginale* in beef cattle from the Brazilian Pantanal. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 28, n. 3, p. 451–457, jul. 2019.

ROENGVORAPHOJ, M. *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.

SAIYAROS, K. *et al.* Detection of epidermal growth factor receptor (EGFR) gene mutation in formalin fixed paraffin embedded tissue by polymerase chain reaction-single strand conformational polymorphism (PCR-SSCP) in non-small cell lung cancer in the northeastern region of Tha. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 20, n. 5, p. 1339–1343, 2019.

SUN, Y. S. *et al.* Risk factors and preventions of breast cancer. **International Journal**

of **Biological Sciences**, v. 13, n. 11, p. 1387–1397, 2017.

TENG, C. W. *et al.* Combined Fluorescence-Guided Surgery for Glioblastoma Multiforme using Cyanine and Chlorin Nanocluster. **Journal of Neurooncology**, v. 149, n. 2, p. 243–252, 2021.

UENO, N. T.; ZHANG, D. Targeting EGFR in Triple Negative Breast Cancer. **Journal of Cancer**, v. 2, n. 1, p. 324–328, 2011.

VAN DER MEEL, R. *et al.* Smart cancer nanomedicine. **Nature Nanotechnology**, v. 14, n. 11, p. 1007–1017, 1 nov. 2019.

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.

VIEIRA, P. *et al.* Specific nanomarkers fluorescence: in vitro analysis for EGFR overexpressed cells in triple-negative breast cancer and malignant glioblastoma. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 39, p. 102997, set. 2022.

XU, H. *et al.* Epidermal growth factor receptor in glioblastoma (Review). **Oncology Letters**, v. 14, n. 1, p. 512–516, 2017.

XU, Y. *et al.* Application of nanotechnology in the diagnosis and treatment of bladder cancer. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 19, n. 393, p. 1–18, 2021.

YANG, J. *et al.* Significance of Phosphorylated Epidermal Growth Factor Receptor and Its Signal Transducers in Human Soft Tissue Sarcoma. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 1159, p. 1–13, 2017.

YANG, Y. *et al.* Multifunctional Gold Nanoparticles in Cancer Diagnosis and Treatment. **International Journal of Nanomedicine**, v. 17, n. April, p. 2041–2067, 2022.

YANG, Z. Y. *et al.* Predictive biomarkers for EGFR tyrosine kinase inhibitors in treatment of advanced non-small- cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. **Hong Kong Med J**, v. 24, n. 4, p. 34–37, 2018.

APÊNDICE A – ARTIGO “CHLORIN E6-EGF CONJUGATED GOLD NANOPARTICLES AS A NANOMEDICINE BASED THERAPEUTIC AGENT FOR TRIPLE NEGATIVE BREAST CANCER” PUBLICADO NO PERÍODO.



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 Nanomateriais, 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 Biotecnologia, 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: lranielero@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.

APÊNDICE B – ARTIGO “TRIPLE-NEGATIVE BREAST CANCER TREATMENT IN XENOGRIFT MODELS BY BIFUNCTIONAL NANOPROBES COMBINED TO PHOTODYNAMIC THERAPY” PUBLICADO NO PERÍODO.

Photodiagnosis and Photodynamic Therapy 38 (2022) 102796

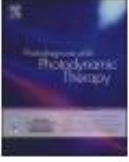


ELSEVIER

Contents lists available at [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)

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. Shalvina 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 Biomaterials Laboratory, Research and Development Institute, University of Vale do Paraíba, UNIVAP, São Paulo, Brazil



ARTICLE INFO

Keywords:
Photodynamic 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, 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 nanoprobes (BN), used in PDT as 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: lrniero@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.

APÊNDICE C – ARTIGO “NANOMARKERS FLUORESCENCE: IN VITRO ANALYSIS FOR EGFR OVEREXPRESSED CELLS IN TRIPLE-NEGATIVE BREAST CANCER AND MALIGNANT GLIOBLASTOMA” PUBLICADO NO PERÍODO.

Photodiagnosis and Photodynamic Therapy 39 (2022) 102997



Contents lists available at ScienceDirect

Photodiagnosis and Photodynamic Therapy

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



Specific nanomarkers fluorescence: *in vitro* analysis for EGFR overexpressed cells in triple-negative breast cancer and malignant glioblastoma

Paula Vieira^a, Viviane Jesus^a, Marcela Aparecida Cândido^a, Cristina Pacheco-Soares^b,
Maiara Castilho^c, Leandro Raniero^{a,*}

^a Nanosensors Laboratory, Research & Development Institute, Vale do Paraíba University, 12244-000 São José dos Campos, São Paulo, Brazil

^b Dynamics of Cellular Compartments Laboratory, Research & Development Institute, Vale do Paraíba University, 12244-000 São José dos Campos, São Paulo, Brazil

^c Bionanotechnology Laboratory, Research & Development Institute, Vale do Paraíba University, 12244-000 São José dos Campos, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
EGFR
Nanomedicine
EGF
Ce6
Fluorescence

ABSTRACT

Background: Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR receptor) is encoded by the *EGFR* gene. EGFR receptor signaling pathways are activated by EGF protein, regulating cell actions. Overexpression of EGFR receptor may be linked to malignancies with a poor prognosis. As a result, EGFR receptor is being studied for a variety of tumor diagnostics, spurring the development of innovative approaches to increase quality and efficiency. Nanomaterials can recognize cancer cells by specifically targeting of molecular pathways, underscoring the importance of nanomedicine. In this study, we synthesized EGFR-specific nanomarkers by functionalizing EGF protein and Chlorin e6 in gold nanoparticles. These nanoparticles use active targeting to deliver EGF protein to EGFR receptor, and Chlorin e6 serves as a fluorescent marker molecule.

Methods: Nanomarkers were examined *in vitro* in MDA-MB-468 and M059J cell lines. Confocal microscopy and flow cytometry were used to examine the distribution, uptake, internalization, and fluorescence intensity of nanomarkers *in vitro*.

Results: The results show that both lines examined accumulate nanomarkers. However, MDA-MB-468 had the highest intensity due to its EGFR receptor overexpression properties.

Conclusion: The findings point to ideal properties for detecting EGFR receptor overexpressed cells.

1. Introduction

The Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR receptor) is a glycoprotein that belongs to the receptor tyrosine kinase subclass [1,2]. The *EGFR* gene from the ErbB gene family (ErbB1/EGFR/HER1) encodes EGFR receptor in a genomic context. Furthermore, the *EGFR* gene is expressed in various organs, including the placenta, lung, skin, and thyroid [3–5].

EGFR receptor is placed on the cell membrane's surface and has three structural regions: N-terminal, transmembrane, and C-terminal [6]. The N-terminal domain serves as an extracellular binding domain. This region is specialized for ligands such as EGF, TGF- α , amphiregulin, and betacellulin. The lipophilic transmembrane domain permeates the cell membrane, increasing intracellular and extracellular communication. The C-terminal domain is an intracellular hydrophobic region that is involved in tyrosine kinase activity [1–3,6].

EGFR receptor is activated by extracellular specific ligands such as EGF protein. Extracellular domain activation occurs through ligand-receptor binding and dimerization [1,2,4]. Dimerization generates intracellular signals that are transduced by molecular processes, activating a signaling cascade and transcribing genes [1,2,4]. The pathway activation enhances cell functions such as proliferation, adhesion, differentiation, and invasion [7,8].

This pathway's atypical condition or disorder may cause abnormal *EGFR* gene activation. Since *EGFR* gene exons 18 to 21 encode receptor tyrosine kinase activity, abnormal activation may result in EGFR receptor overexpression. EGFR receptor overexpression leads to mitogenic signaling and a variety of cellular actions that promote tumor formation. Increased cell proliferation potential, resistance to apoptosis and angiogenesis, junction complexes breakdown impairing cell adhesion, contributes to motility and invasive phenotype [3,9,10].

As a result, *EGFR* gene mutations cause the most aggressive

* Corresponding author at: Nanosensors Laboratory - Research & Development Institute of Vale do Paraíba University, 2911 Shishima Hifumi Avenue, 12244-000 São José dos Campos, São Paulo, Brazil.

E-mail addresses: cpsoares@univap.br (C. Pacheco-Soares), mcastilho@univap.br (M. Castilho), lrnaniero@univap.br (L. Raniero).

<https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2022.102997>

Received 24 January 2022; Received in revised form 28 June 2022; Accepted 29 June 2022

Available online 1 July 2022

1572-1000/© 2022 Elsevier B.V. All rights reserved.

ANEXO A – ESPECIFICAÇÕES DO FABRICANTE MICROTISSUES, INC SOBRE A FABRICAÇÃO DOS MICROMOLDES DE AGAROSE.



Casting, Equilibrating and Seeding the 3D Petri Dish®

1. Rinse micro-molds for casting 3D Petri Dishes® in dH₂O.
2. Place micro-molds for casting 3D Petri Dishes® in container suitable for autoclave sterilization.
3. Measure 1g of high quality pure agarose powder and place into a dry 100 ml autoclave-safe glass bottle. Be sure bottle and agarose powder are dry with no liquid or moisture. Screw on lid so that it is secure, but still loose.
4. Autoclave micro-molds for casting 3D Petri Dishes® and bottle with agarose powder for 30 minutes on dry cycle.
5. In a biosafety cabinet using aseptic technique, add 50 ml of sterile saline [0.9% (w/v) NaCl] to the bottle containing sterilized agarose powder. Screw on lid so that it is secure, but still loose. Swirl bottle to mix agarose powder.
6. Use microwave oven to boil and completely dissolve the agarose powder. Stop microwave every 10 seconds and swirl bottle to help dissolve the agarose. Be sure there are no small bits of translucent undissolved agarose.

CAUTION: Molten agarose is very hot, can boil over when the bottle is swirled and can cause severe skin burns. Always use appropriate personal protection (gloves, oven mitt, eye protection and lab coat) when working with molten agarose.

7. Allow molten agarose to cool to about 60-70°C. In a biosafety cabinet using aseptic technique, pipette 500 µl of molten agarose into a **12-series** micro-mold or 330 µl into a **24-series** micro-mold. Avoid creating bubbles while mixing or pipetting agarose.
8. Remove any small bubbles that may be trapped in the small features of the micro-mold by pipetting or gentle scrapping before the agarose gels.
9. After the agarose has gelled, carefully flex the micro-mold to remove the 3D Petri Dish®. Do not over flex the micro-mold as it can crack the 3D Petri Dish®. Some practice may be necessary to remove the 3D Petri Dish® from the micro-mold. Transfer 3D Petri Dish® to a 12 well or 24 well tissue culture plate.
10. To equilibrate the 3D Petri Dish®, add cell culture medium (2.5ml/well for 12 well plate and 1.0ml/well for 24 well plate). Incubate for 15 minutes or longer. Remove culture medium and replace with fresh medium. Repeat once more to equilibrate the 3D Petri Dish® with culture medium.
11. Trypsinize cells, count and prepare the desired cell seeding number in the specified volume for the 3D Petri Dish® of choice (see **Tables 1-4**).
12. Remove culture medium surrounding outside of the 3D Petri Dish® and tilt the tissue culture plate so that the medium from the cell seeding chamber of the 3D Petri Dish® can also be carefully removed.

For Research Use Only, Not for Clinical, Diagnostic or Therapeutic Use.

www.microtissues.com

As demais informações podem ser adquiridas e/ou visualizadas em microtissues.com/protocols.

ANEXO B – ESPECIFICAÇÕES DO FABRICANTE MICROTISSUES, INC SOBRE A MANIPULAÇÃO DOS ESFEROIDES FORMADOS EM MICROMOLDES DE AGAROSE.



Harvesting Multi-cellular Microtissues from the 3D Petri Dish®

The multi-cellular microtissues do not adhere to the gel, so they are easy to harvest from the 3D Petri Dish®. Use a micro-pipette to carefully squirt culture medium into the seeding chamber to dislodge the microtissues from the micro-wells. The microtissues are then harvested by drawing them up into the micro-pipette. The harvested microtissues can be washed and processed for subsequent applications (RT-PCR, Western blots, histology, immunostaining). This method is easy, fast and works very well for spheroids. For some applications, the following centrifuge method may be useful.

1. Remove cell culture medium surrounding the 3D Petri Dish® containing the multi-cellular microtissues.
2. Place fresh cell culture medium into the well of a **new** 12 or 24 well plate depending on the size of the 3D Petri Dish® used (1.0mL for 12 series or 0.5ml for 24 series).
3. Carefully remove the 3D Petri Dish® with a sterile spatula or sterile tweezers. **Invert** the 3D Petri Dish® into the well of the new plates. Be careful to not create air bubbles between the upside down 3D Petri Dish® and the bottom of the new culture plate. Cover the plate and place the 6-well plate in a swinging bucket rotor in a centrifuge and spin for 5 minutes at 500 rpm.
4. After centrifugation, view the inverted 3D Petri Dish® under the microscope to ensure that the multi-cellular microtissues have been released.
5. Remove the empty 3D Petri Dish® with a sterile spatula or sterile tweezers.
6. The harvested multi-cellular microtissues remaining in the cell culture medium can be washed and further processed depending on the application. (Immuno-staining, Western blot, RT-PCR, etc).

For Research Use Only, Not for Clinical, Diagnostic or Therapeutic Use.

www.microtissues.com

As demais informações podem ser adquiridas e/ou visualizadas em microtissues.com/protocols.

ANEXO C – ESPECIFICAÇÕES DO REAGENTE DE ANTICORPO ANTI-PAXILINA COMERCIALIZADO PELA SIGMA.



3050 Spruce Street
Saint Louis, Missouri 63103 USA
Telephone 800-325-5832 • (314) 771-5765
Fax (314) 286-7828
email: techserv@sial.com
sigmas-aldrich.com

Product Information

MONOCLONAL ANTI-PAXILLIN

Clone PXC-10
Mouse Ascites Fluid

Product No. P 1093

Product Description

Monoclonal Anti-Paxillin (mouse IgG1 isotype) is derived from the PXC-10 hybridoma produced by the fusion of mouse myeloma cells and splenocytes from an immunized mouse. A carboxy-terminal part of recombinant chicken paxillin (a.a. 305-559) was used as the immunogen. The isotype is determined using Sigma ImmunoType™ Kit (Product Code ISO-1) and by a double diffusion immunoassay using Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Reagents (Product Code ISO-2).

Monoclonal Anti-Paxillin recognizes an epitope located in the LIM1 domain of the paxillin molecule. The product reacts in immunoblotting (68 kDa and a lower band at approx. 40 kDa) and in immunocytochemistry. Cross-reactivity has been observed with human, bovine, hamster, rat and chicken paxillin.

Monoclonal Anti-Paxillin may be used for the localization of paxillin using various immunochemical assays such as immunoblot and immunocytochemistry. Cellular adhesion to the extracellular matrix is critically involved in many processes including normal and transformed cell growth, migration, metastasis, lymphocyte extravasation and also in force transmission during muscle contraction.¹⁻⁴ Paxillin (68 kDa), is a cytoskeletal component found in the focal adhesions at the ends of actin stress fibers, but not in adherens junctions of the cells. Paxillin interacts with several proteins including members of the *src* family of tyrosine kinases, the transforming protein *v-crk*, the cytoskeletal protein vinculin, and the tyrosine kinase, focal adhesion kinase (FAK). This interaction has suggested a function for paxillin as a molecular adaptor, responsible for the recruitment of structural and signaling molecules to focal adhesions. The paxillin molecule has a single binding site for vinculin, and at least two binding sites for FAK, that are separated by an intervening sequence of 100

amino acids.¹ Upon transformation by RSV, 20-30% of the paxillin molecules are phosphorylated on tyrosine. In addition, the cellular distribution of paxillin becomes more diffuse, suggesting that phosphorylation of paxillin may have a role in the disassembly of focal adhesions and stress fibers during transformation.⁵ The availability of monoclonal antibody reacting specifically with paxillin enables the subcellular detection and localization of paxillin.

Reagents

The product is provided as ascites fluid with 15 mM sodium azide as a preservative.

Precautions

Due to the sodium azide content a material safety sheet (MSDS) for this product has been sent to the attention of the safety officer of your institution. Consult the MSDS for information regarding hazardous and safe handling practices.

Product Profile

A minimum working dilution of at 1:500 is determined by immunoblotting using a cultured human cell line extract.

In order to obtain best results, it is recommended that each user determine the optimal working dilution for individual applications by titration assay.

Storage

For continuous use, store at 2-8 °C for up to one month. For extended storage freeze in working aliquots. Repeated freezing and thawing is not recommended. Storage in frost-free freezers is not recommended. If slight turbidity occurs upon prolonged storage, clarify the solution by centrifugation before use.

ANEXO D – ESPECIFICAÇÕES DO REAGENTE DE ANTICORPO ANTI-ACTINA COMERCIALIZADO PELA SIGMA.



3050 Spruce Street
Saint Louis, Missouri 63103 USA
Telephone (800) 325-5832 (314) 771-5765
Fax (314) 286-7828
email: techserv@sial.com
sigma-aldrich.com

Product Information

Anti-Actin

Developed in Rabbit
Delipidized Whole Antiserum

Product No. **A 2668**

Product Description

Anti-Actin is developed in rabbit using actin isolated from chicken back muscle as the immunogen. The antiserum has been treated to remove lipoproteins.

Rabbit Anti-Actin reacts with pure actin by counter immunoelectrophoresis. By indirect immunofluorescent labeling, it reacts with the stress fibers of cultured fibroblasts from chicken, mouse, rat or human. Rabbit Anti-Actin also stains the I-bands of stretched skeletal muscle.

Actin is the major constituent of thin filaments in muscle and of the microfilaments in non-muscle cells. It is present in all eukaryotic cells and its organization may vary from one cell to another depending on the origin of the cell and its physiological state. Actin exists as either of two major forms, a monomeric form (G-actin) or in a filamentous form (F-actin).

Reagents

Rabbit Anti-Actin is supplied as a liquid containing 0.1% sodium azide as preservative.

Precautions

Due to the sodium azide content a material safety data sheet (MSDS) for this product has been sent to the attention of the safety officer of your institution. Consult the MSDS for information regarding hazards and safe handling practices.

Product Profile

Protein concentration is determined by Biuret.

A minimum working dilution of 1:40 was determined by indirect immunofluorescent labeling of cultured chicken fibroblasts.

In order to obtain best results, it is recommended that each individual user determine their optimum working dilution by titration assay.

Storage

For continuous use, store at 2-8 °C. For extended storage, the solution may be frozen in working aliquots. Repeated freezing and thawing is not recommended. Storage in "frost-free" freezers is not recommended. If slight turbidity occurs upon prolonged storage, clarify the solution by centrifugation before use.

PCS/KMR 06/02

Sigma brand products are sold through Sigma-Aldrich, Inc.
Sigma-Aldrich, Inc. warrants that its products conform to the information contained in this and other Sigma-Aldrich publications.
Purchaser must determine the suitability of the product(s) for their particular use. Additional terms and conditions may apply.
Please see reverse side of the invoice or packing slip.

ANEXO E – ESPECIFICAÇÕES DO REAGENTE DE ANTICORPO ANTI-FIBRONECTINA COMERCIALIZADO PELA SIGMA.

SIGMA-ALDRICH®

sigma-aldrich.com

3050 Spruce Street, St. Louis, MO 63103 USA
Tel: (800) 521-8956 (314) 771-5765 Fax: (800) 325-5052 (314) 771-5757
email: techservice@sial.com sigma-aldrich.com

Product Information

Anti-Fibronectin

produced in rabbit, affinity isolated antibody

Catalog Number **F3648**

Product Description

Antiserum is produced in rabbit using purified human fibronectin as the immunogen. Affinity isolated antibody is obtained from antiserum by immunospecific purification which removes essentially all rabbit serum proteins, including immunoglobulins, which do not specifically bind to human fibronectin.

The antiserum is determined to be immunospecific for human fibronectin by immunofluorescent labeling of human fibroblast cell cultures, ELISA and immunoblotting. In immunoblotting, a specific band of fibronectin at 220 kDa is observed (another band at 94 kDa may also be present) using human fibronectin.

When used in immunoelectrophoresis, the antibody shows 1-2 arcs of precipitation versus normal human plasma.

This product may be used for immunohistochemical localization of fibronectin in normal, inflamed and neoplastic tissues, for detection of fibronectin on cultured cells and structure and function studies of fibronectins in human and animal body fluids, tissues and cells.

Affinity isolated antibody to human fibronectin can be used for immunofluorescent and immunoperoxidase staining of cultured cells, frozen sections and formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. Other fixatives, e.g. methacarn and ethanol, may also be used.

Fibronectin (FN) is a multifunctional, extracellular matrix glycoprotein composed of two nearly identical disulfide-bound polypeptides of molecular weight 220 kDa. Cellular fibronectin is structurally and antigenically similar to cold insoluble globulin from plasma, therefore polyclonal antibodies to either form usually crossreact.

Careful analysis of the fibronectin molecule indicates that it contains several functionally and structurally distinct domains which may bind to cell surfaces, collagen, fibrinogen or fibrin, complement, glycosaminoglycans, proteoglycans and heparin.

Numerous studies have shown that fibronectin may enhance cell adhesion and spreading and affect the routes of cell migration both *in vivo* and in culture. Moreover, it has been shown that upon malignant transformation many cells lose most of their surface bound fibronectin. Fibronectin has been shown to also play a role in cellular morphology, cytoskeletal organization, phagocytosis, hemostasis, embryonic differentiation and wound repair. Fibronectin is produced by a wide variety of epithelial and mesenchymal cells *in vitro* including: fibroblasts, chondrocytes, myoblasts, Schwann cells, macrophages, hepatocytes and intestinal epithelial cells. Cellular fibronectin is present in many tissues including spleen, lymph node, tonsil, blood vessel walls, liver, kidney, muscle, skin, brain and peripheral nerves. It is found in basement membranes and in loose connective tissue stroma. It is also present in platelet α -granules and is expressed on the platelet surface after activation.

Reagent

Supplied as a solution in 0.01 M phosphate buffered saline, pH 7.4, containing 1% bovine serum albumin and 15 mM sodium azide as a preservative.

Precautions

This product is for R&D use only, not for drug, household, or other uses. Please consult the Material Safety Data Sheet for information regarding hazards and safe handling practices.

Storage/Stability

For continuous use, store at 2-8 °C for up to one month. For extended storage, the solution may be frozen in working aliquots. Repeated freezing and thawing, or storage in "frost-free" freezers, is not recommended. If slight turbidity occurs upon prolonged storage, clarify the solution by centrifugation before use.

ANEXO F – ESPECIFICAÇÕES DO REAGENTE DE ANTICORPO ANTI- β -INTEGRINA COMERCIALIZADO PELA SIGMA.



Saint Louis, Missouri 63103 USA
Telephone (800) 325-5832 (314) 771-5765
Fax (314) 286-7828
email: techserv@sial.com
sigma-aldrich.com

ProductInformation

MONOCLONAL ANTI- β -1-CHICKEN INTEGRIN

Clone W1B10

Purified Immunoglobulin

Product Number I 8638

Product Description

Monoclonal anti- β -1-Chicken Integrin (mouse IgG1 isotype) is derived from the W1B10 hybridoma produced by the fusion of mouse myeloma cells and splenocytes from BALB/c mice immunized with purified chicken integrin from fibroblasts of 11 day old chicken embryos. The isotype is determined using Sigma ImmunoType™ Kit (Product Code ISO-1) and by a double diffusion immunoassay using Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Reagents (Product Code ISO-2).

Monoclonal anti- β -1-Chicken Integrin recognizes an epitope on the extracellular side of the avian integrin complex. Clone W1B10 inhibits adhesion of embryo and tendon fibroblasts as well as skeletal myoblasts to both laminin and fibronectin. Using immunoprecipitation techniques with the ³⁵S-labeled extracts of chicken embryo muscle cells the antibody precipitates the integrin complex. When run on SDS-PAGE under reducing and denaturing conditions, the precipitant appears as a broad band in the molecular weight range of 140 kDa. Using a Western blotting technique from gels run on SDS-PAGE under non-reducing conditions this clone localizes the integrin β -1 subunit bands of 100 kD (immature form) and 110 kDa (mature form) along with bands around 140 kDa (non-covalently associated α subunits). W1B10 is a monoclonal antibody probe that recognizes the avian integrin, a cell surface receptor for extracellular matrix (ECM) molecules like fibronectin, laminin, vitronectin and collagen types I and IV.¹ Clone W1B10, as a second generation integrin monoclonal antibody, recognizes the avian integrin complex.

Chicken integrin is a heterodimer consisting of the common β -1 subunit and two α subunits (α -5 or α -3). Integrin binding to ECM ligands regulates cell adhesion, shape, motility, intracellular signalling and gene expression.² The β -1 subunit of chicken integrin is a 803-amino acid transmembrane glycoprotein consisting of a large extracellular domain and a short cytoplasmic domain.³ The monoclonal anti- β -1 chicken integrin antibody (clone W1B10) has been used to inhibit chicken muscle cell adhesion in cell cultures.^{4,5}

Reagents

The product is provided as (Protein A) purified antibody in 0.01M phosphate buffered saline pH 7.4, containing 1% BSA and 0.1% sodium azide (see MSDS)* as a preservative.

Precautions and Disclaimer

Due to the sodium azide content a material safety data sheet (MSDS) for this product has been sent to the attention of the safety officer of your institution. Consult the MSDS for information regarding hazards and safe handling practices.

Storage/Stability

For extended storage, freeze in working aliquots. For continuous use, store at 2-8 °C for up to one month. Repeated freezing and thawing is not recommended. Storage in "frost-free" freezers is not recommended. If slight turbidity occurs upon prolonged storage, clarify the solution by centrifugation before use.

ANEXO G – ESPECIFICAÇÕES DO REAGENTE DE ANTICORPO ANTI- LAMININA COMERCIALIZADO PELA SIGMA

SIGMA-ALDRICH®

sigma-aldrich.com

3050 Spruce Street, St. Louis, MO 63103 USA
Tel: (800) 521-8956 (314) 771-5765 Fax: (800) 325-5052 (314) 771-5757
email: techservice@sial.com sigma-aldrich.com

Product Information

Anti-Laminin
produced in rabbit, affinity isolated antibody

Catalog Number **L9393**

Product Description

Anti-Laminin is produced in rabbit using laminin purified from the basement membrane of Englebreth Holm-Swarm (EHS) mouse sarcoma as the immunogen. The antibody is isolated from antiserum by immunospecific methods of purification. Antigen specific isolation removes essentially all rabbit serum proteins, including immunoglobulins that do not specifically bind to laminin.

Specificity of the anti-laminin antibodies is determined by dot blot immunoassay. In the dot blot immunoassay the rabbit anti-laminin antibody reacts with laminin but not with fibronectin, vitronectin, collagen IV, or chondroitin sulfate types A, B, and C. The affinity isolated antibody to laminin will react with laminin of human, mammal, avian, reptilian, and amphibian sources.

Laminin is a ubiquitous non-collagenous connective tissue glycoprotein that is a major constituent of basement membranes.

Anti-Laminin may be used in immunohistochemistry for marking blood vessel walls in different species, classification of various disease processes involving basement membranes, identification of the origin of human tumors and their classification, and for distinguishing between non-invasive and invasive lesions. The antibody may be used to monitor levels of laminin in biological fluids and for experimental production of basement membrane lesions *in vivo*.

Reagent

Supplied in a solution of 0.01 M phosphate buffered saline, pH 7.4, containing 1% BSA, with 15 mM sodium azide as a preservative.

Concentration: 0.5 mg/ml

Precautions and Disclaimer

This product is for R&D use only, not for drug, household, or other uses. Please consult the Material Safety Data Sheet for information regarding hazards and safe handling practices.

Storage

For continuous use, store at 2-8 °C for up to one month. For extended storage, solution may be frozen in working aliquots. Repeated freezing and thawing, or storage in "frost-free" freezers, is not recommended. If slight turbidity occurs upon prolonged storage, clarify by centrifugation before use.

Product Profile

Dot Blot: a working dilution of at least 1:1,000 was determined using laminin at 50 ng per dot.

Immunohistochemistry: a working dilution of at least 1:30 was determined using formalin-fixed, paraffin-embedded human and animal tissues.

Note: In order to obtain best results it is recommended that each individual user determine their working dilution by titration assay.

DS,PHC 01/15-1

ANEXO H – ESPECIFICAÇÕES DO REAGENTE DE ANTICORPO ANTI- E-CADERINA COMERCIALIZADO PELA SIGMA

SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC.

E-cadherin (67A4): sc-21791



BACKGROUND

Cadherins comprise a family of Ca^{2+} -dependent adhesion molecules that function to mediate cell-cell binding critical to the maintenance of tissue structure and morphogenesis. Members of this family of adhesion proteins include rat cadherin K (and its human homolog, cadherin-6), R-cadherin, B-cadherin, E/P cadherin and cadherin-5. The classical cadherins, E-, N- and P-cadherin, consist of large extracellular domains characterized by a series of five homologous NH_2 -terminal repeats. The most distal of these cadherins is thought to be responsible for binding specificity, transmembrane domains and carboxy terminal intracellular domains. The relatively short intracellular domains interact with a variety of cytoplasmic proteins, such as β -catenin, to regulate cadherin function.

CHROMOSOMAL LOCATION

Genetic locus: CDH1 (human) mapping to 16q22.1.

SOURCE

E-cadherin (67A4) is a mouse monoclonal antibody raised against human breast carcinoma cell line T471.

PRODUCT

Each vial contains 200 μg IgG₁ kappa light chain in 1.0 ml of PBS with < 0.1% sodium azide and 0.1% gelatin.

E-cadherin (67A4) is available conjugated to agarose (sc-21791 AC), 500 μg /0.25 ml agarose in 1 ml, for IP; to HRP (sc-21791 HRP), 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$, for WB, IHC(P) and ELISA; to either phycoerythrin (sc-21791 PE), fluorescein (sc-21791 FITC), Alexa Fluor[®] 488 (sc-21791 AF488), Alexa Fluor[®] 546 (sc-21791 AF546), Alexa Fluor[®] 594 (sc-21791 AF594) or Alexa Fluor[®] 647 (sc-21791 AF647), 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$, for WB (RGB), IF, IHC(P) and FCM; and to either Alexa Fluor[®] 680 (sc-21791 AF680) or Alexa Fluor[®] 790 (sc-21791 AF790), 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$, for Near-Infrared (NIR) WB, IF and FCM.

In addition, E-cadherin (67A4) is available conjugated to either PerCP (sc-21791 PerCP) or Alexa Fluor[®] 405 (sc-21791 AF405), 100 tests in 2 ml, for IF, IHC(P) and FCM.

Alexa Fluor[®] is a trademark of Molecular Probes, Inc., Oregon, USA

APPLICATIONS

E-cadherin (67A4) is recommended for detection of E-cadherin of human origin by Western Blotting (starting dilution 1:200, dilution range 1:100-1:1000), immunoprecipitation [1-2 μg per 100-500 μg of total protein (1 ml of cell lysate)], immunofluorescence (starting dilution 1:50, dilution range 1:50-1:500) and flow cytometry (1 μg per 1×10^6 cells).

Suitable for use as control antibody for E-cadherin siRNA (h): sc-35242, E-cadherin shRNA Plasmid (h): sc-35242-SH and E-cadherin shRNA (h) Lentiviral Particles: sc-35242-V.

Molecular Weight of mature E-cadherin: 120/80 kDa.

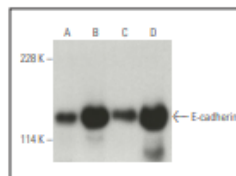
Molecular Weight of E-cadherin precursor: 135 kDa.

Positive Controls: PC-3 cell lysate: sc-2220, LNCaP cell lysate: sc-2231 or Caco-2 cell lysate: sc-2262.

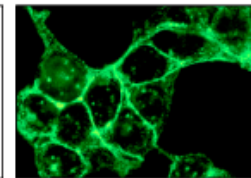
STORAGE

Store at 4° C, ****DO NOT FREEZE****. Stable for one year from the date of shipment. Non-hazardous. No MSDS required.

DATA



E-cadherin (67A4) HRP, sc-21791 HRP. Direct western blot analysis of E-cadherin expression in A-431 (A), LNCaP (B), PC-3 (C) and Caco-2 (D) whole cell lysates.



E-cadherin (67A4): sc-21791. Immunofluorescence staining of methanol-fixed MCF7 cells showing membrane staining.

SELECT PRODUCT CITATIONS

- Trautmann, A., et al. 2001. The differential fate of cadherins during T-cell-induced keratinocyte apoptosis leads to spongiosis in eczematous dermatitis. *J. Invest. Dermatol.* 117: 927-934.
- Bhatia, S., et al. 2013. Demarcation of stable subpopulations within the pluripotent hESC compartment. *PLoS ONE* 8: e57276.
- Buhrmann, C., et al. 2014. Curcumin suppresses crosstalk between colon cancer stem cells and stromal fibroblasts in the tumor microenvironment: potential role of EMT. *PLoS ONE* 9: e107514.
- Fraveto, A., et al. 2015. Sensitivity of human intrahepatic cholangiocarcinoma subtypes to chemotherapeutics and molecular targeted agents: a study on primary cell cultures. *PLoS ONE* 10: e0142124.
- Hurtado-Alvarado, G., et al. 2016. $\text{A}_{2\text{A}}$ adenosine receptor antagonism reverses the blood-brain barrier dysfunction induced by sleep restriction. *PLoS ONE* 11: e0167236.
- Li, J., et al. 2017. The four-transmembrane protein MAL2 and tumor protein D52 (TPD52) are highly expressed in colorectal cancer and correlated with poor prognosis. *PLoS ONE* 12: e0178515.
- Wang, H., et al. 2018. Invasiveness-triggered state transition in malignant melanoma cells. *J. Cell. Physiol.* 234: 5354-5361.
- Rivero, S., et al. 2019. TBL1 is required for the mesenchymal phenotype of transformed breast cancer cells. *Cell Death Dis.* 10: 95.
- Liu, D., et al. 2020. ASPP1 deficiency promotes epithelial-mesenchymal transition, invasion and metastasis in colorectal cancer. *Cell Death Dis.* 11: 224.
- Pan, K., et al. 2021. SPARC promotes pancreatic cancer cell proliferation and migration through autocrine secretion into the extracellular milieu. *Oncol. Lett.* 21: 485.

RESEARCH USE

For research use only, not for use in diagnostic procedures.

ANEXO I – RESUMOS APRESENTADOS EM CONFERÊNCIAS INTERNACIONAIS



ENCONTRO DE OUTONO 2020
SOCIEDADE BRASILEIRA DE FÍSICA

CERTIFICATE

The Organizing Committee 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




Eduardo Granado
Coordenador de Programa



Cícero Rafael Cena
Coordenador Geral



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 "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:    

Realização:  

XXIVINIC
 XX,EPG
 III,CONPAT
 XIVINIC Jr
 X,INID



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

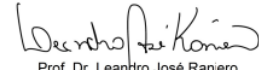
21, 22 e 23 de outubro de 2020

Evento online
www.inicepg.univap.br

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho intitulado "APLICAÇÕES TERANÓSTICAS DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE FERRO" de autoria de Nathanne Cristina Vilela Rost, Marcela Aparecida Cândido, Paula Fonseca Antunes Vieira, Leandro Raniero e Carlos Rinaldi, foi apresentado no XX Encontro Latino Americano de Pós-Graduação (XX EPG), 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:



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 "APLICAÇÕES TERANÓSTICAS DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE FERRO" de autoria de Nathanne Cristina Vilela Rost, Marcela Aparecida Cândido, Paula Fonseca Antunes Vieira, Leandro Raniero e Carlos Rinaldi desenvolvido na instituição University of Florida e Universidade do Vale do Paraíba foi premiado na área Engenharias no XX Encontro Latino Americano de Pós-Graduação (XX EPG), 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:





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:





FUNDAÇÃO VALEPARAIBANA DE ENSINO



ICONNANO

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 Azevedo
Ricardo Bentes de Azevedo
Chairman of the Organizing Committee

analityca Agilent CNPq CAPES Fapccf SPECTRAi nno BIOTECNOLOGIA USP FOCIME

2021 ONLINE



ICONNANO

CERTIFICATE
POSTER PRESENTATION

We certify that the scientific paper entitled "**The Cytotoxicity of the Water-Based Suspension of Iron Oxide Nanoparticles Stabilized by Sodium Citrate**", authored by **Marcela A. Cândido, Paula F. A. Vieira, Nathanne C. V. Rost, Giulia C. Gonçalves, 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 Azevedo
Ricardo Bentes de Azevedo
Chairman of the Organizing Committee

analityca Agilent CNPq CAPES Fapccf SPECTRAi nno BIOTECNOLOGIA USP FOCIME

2021 ONLINE



ICONNANO

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
Ricardo Bentes de Azevedo
Chairman of the Organizing Committee



ANEXO J – RESUMOS APRESENTADOS EM CONFERÊNCIAS NACIONAIS




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 18º 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.

Arisawa
Prof.ª Dr.ª **Emília Angela Lo Schiavo Arisawa**
Presidente Qualivitaê 2020




CERTIFICADO

APRESENTAÇÃO DE TRABALHO

III CDNB

Certificamos que **Paula Fonseca Antunes Vieira** apresentou o trabalho intitulado **Caracterização do microambiente tumoral de mama 3D desenvolvido em agarose micro moldada** de autoria de Paula Fonseca Antunes Vieira, Marcela Aparecida Cândido, Cristina Pacheco-Soares, Leandro Raniero no **III Congresso Digital de Nanobiotecnologia e Bioengenharia (III CDNB)** organizado pela Embrapa Recursos Genéticos e Bioetecnologia no período de 07 a 10 de junho de 2022.

Luciano Paulino da Silva
LUCIANO PAULINO DA SILVA
Coordenador da Comissão
Organizadora do III CDNB
Pesquisador Embrapa




CERTIFICADO

APRESENTAÇÃO DE TRABALHO

III CDNB

Certificamos que **Marcela Aparecida Cândido** apresentou o trabalho intitulado **Determinação da via de morte celular obtida por SPIONs com terapia fototérmica** de autoria de Marcela Aparecida Cândido, Paula Fonseca Antunes Vieira, Cristina Pacheco-Soares, Leandro Raniero no **III Congresso Digital de Nanobiotecnologia e Bioengenharia (III CDNB)** organizado pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia no período de 07 a 10 de junho de 2022.

Luciano Paulino da Silva
LUCIANO PAULINO DA SILVA
Coordenador da Comissão
Organizadora do III CDNB
Pesquisador Embrapa

