



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós Graduação em Biologia Animal



**Indução de morte celular imunogênica por terapia
fotodinâmica mediada por cloreto de alumínio-ftalocianina
incorporado a nanoemulsão em células de câncer de mama
murino**

MOSAR CORRÊA RODRIGUES

BRASÍLIA - DF

2018

MOSAR CORRÊA RODRIGUES

**Indução de morte celular imunogênica por terapia
fotodinâmica mediada por cloreto de alumínio-ftalocianina
incorporado a nanoemulsão em células de câncer de mama
murino**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal da Universidade de Brasília, como requisito final à obtenção do título de Doutor em Biologia Animal.

Área de concentração: Nanociências e Nanobiotecnologia.

ORIENTADOR: PROFESSOR DOUTOR LUIS ALEXANDRE MUEHLMANN

Dedico este trabalho a todas as mulheres que passam ou já passaram pela batalha contra o câncer de mama, em especial, as guerreiras Márcia Cristina e Mariana Fröner.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelas oportunidades de aprender e compartilhar tantas experiências boas nessa vida.

Ao meu orientador e amigo, Professor Doutor Luis Alexandre Muehlmann. Muito obrigado por todos esses anos de cumplicidade, ensinamentos e amizade verdadeira. Luis, muito obrigado por me fazer acreditar sempre no meu potencial, fazendo com que eu explore o meu melhor. Obrigado também pela companhia e parceria para além do ambiente de trabalho, ensinando-me igualmente muitas coisas no laboratório da vida. Você terá sempre em mim um admirador de sua pessoa e do profissional que é.

Ao Professor Doutor Ricardo Bentes de Azevedo, pela amizade e postura tão profissional para conduzir o Laboratório de Nanobiotecnologia. Chefe, muito obrigado por depositar em mim a confiança de desenvolver este trabalho. Aproveito para agradecer também a oportunidade que me concedeu de morar em Leipzig, na Alemanha, durante este processo de doutorado, e ter tido a oportunidade de vivenciar a cultura e a rotina em outro país, serei eternamente grato.

À Professora Doutora Irina Estrela-Lopes e seu grupo, que me recebeu tão profissionalmente na Universidade de Leipzig, Alemanha.

Ao nosso grupo de pesquisa Imuno Nano (Athayde, Camila, Giulia, Kissia, Luis, Rayane, Victor Mello e Victor Hugo). Filhos de Luis, meu muito obrigado pelo companheirismo e cumplicidade de sempre. Essa nossa parceria é o que torna esse grupo tão promissor, e que venham muitas publicações. Em especial agradeço a Rayane Ganassin pela amizade desde o início. Ray tenho uma admiração muito grande por você como pessoa e profissional, obrigado por ter sido sempre uma companhia fundamental nessa jornada.

Aos meus estagiários pela contribuição e a oportunidade de dividir o que aprendi durante toda essa jornada. Em especial ao Victor Mello. Victor, o mundo é pequeno para tamanho talento e do profissionalismo que você tem. Obrigado por tudo!

À querida e insubstituível Dona Zélia, por meio de quem agradeço também a todos os colegas do laboratório de Nanobiotecnologia que, de uma forma ou de outra, contribuíram muito para minha evolução como pesquisador e para meu crescimento como ser humano.

À Universidade de Brasília e seus professores. Em especial ao Professor Doutor João Paulo Longo.

Ao Programa de Pós-graduação em Biologia Animal, pela oportunidade. Em especial à Professora Doutora Maria de Fátima.

À Faculdade de Ceilândia (FCE), onde pude vivenciar uma das experiências mais incríveis da minha vida até agora e que me fez concretizar a minha maior paixão, a de ser Professor. Obrigado a todos os alunos e funcionários, que sempre foram muito amáveis e gentis. Em especial aos professores Marcelo, Juliano, Elaine, Jamila e Daniela Kaiser por serem tão compreensivas e acolhedoras durante o tempo que lecionei junto com elas.

Às agências de fomento: Capes, CNPq, INCT e FAPDF, pelo financiamento de todo esse trabalho.

Aos meus pais Ilton e Marlúcia. Papai e Mamãe, muito obrigado pelo amor, carinho e dedicação. Serei eternamente agradecido a Deus por ter me permitido nesta vida ser filho de pessoas tão íntegras, humildes e especiais. Amo muito vocês!

Aos meus irmãos Raquel, Rosângela, Wilton, Willian, Wanderson e AnaVictória. Meus queridos, nem utilizando todas as palavras e formas de expressão do mundo eu conseguirei dizer o quão feliz e amado me sinto com vocês. Aproveito essa oportunidade para agradecer à minha amada irmã e colega de profissão Rosângela. Dinda, minha amiga, companheira e confidente, eu tenho muito que lhe agradecer por todo cuidado e carinho de sempre. Te admiro muito, sua paixão pela sala de aula é, sem dúvidas, meu principal combustível para ser um professor cada vez melhor.

Aos meus sobrinhos e sobrinhas. Minhas princesas Isadora, Sofia e Aruna e meus príncipes Isaac e Elias. Meus pequenos, vocês são razão de toda alegria e amor desse mundo. Aproveito a oportunidade para agradecer também ao amor que já explode no meu peito pela espera do bebê afilhado. Já muito amado(a).

Ao meu companheiro e amigo Daniel de Castro. Dão, muito obrigado por sempre estar ao meu lado e me fazer enxergar o mundo com mais amadurecimento. Poder compartilhar contigo essa história me torna cada dia mais grato por tamanho carinho. Agradeço também pelas correções — quase sempre em cima da hora — do meu português ainda em construção.

Ao meu cunhado Charles. Obrigado pelo incentivo de sempre seguir em frente.

Às minhas cunhadas Mirian, Paula e Fernanda e ao meu cunhado Francisco pelos momentos de descontração e palavras de incentivo.

Aos meus presentes da vida. Minha querida Dona Cidinha, que sempre tão amável e gentil, me faz sentir tão bem. Aproveito para agradecer a toda sua família que me recebeu de braços abertos e sempre me fez sentir um de vocês. Meus primos, em especial a Pry, parceira de todas as horas. Meus compadres Aline e Zé, aproveito para agradecer a confiança e bênção de ser padrinho da filha de vocês, nossa princesa Alice. Meus amigos de toda hora Jaqueline, Robertinho, Nayane, Elaine, Débora e Geovanne que tornaram bem mais divertida essa jornada.

Aos meus presentes da UnB. Amigos especiais que fizeram com que essa jornada do doutorado fosse mais tranquila e feliz. Em especial meu amado amigo Fred pelo seu companheirismo e por sempre compartilhar comigo um pouco da sua tranquilidade, nos momentos mais turbulentos. Fred, você foi peça fundamental durante essa jornada. Obrigado pelas palavras de conforto durante os momentos difíceis e muito obrigado pela amizade. À minha amiga Ariane Pandolfo que, desde o primeiro contato, não mediu esforços para ser sempre uma amiga muito querida. Ari amo nossos encontros cheios de risos e cumplicidade. Ao meu amigo-irmão Douglas Souza que mesmo de longe, transmite a mim toda torcida para meu sucesso nessa jornada. À minha colega e amiga Jaqueline Vaz. Jaque, minha estagiária da vida! Obrigado por toda ajuda, prestatividade

e, acima de tudo, pelo seu companheirismo. À queria Alícia que tão gentilmente me ajudou no citômetro.

Aos funcionários do IB, que sempre se preocuparam em manter nosso espaço de trabalho limpo e organizado para que os resultados fosse sempre os melhores. Em especial às queridas secretárias do IB pós Dani, Kelly, Nathália, Sarah e Silvia, pelo respeito e pelo coleguismo de sempre.

Aos laboratórios. Em especial ao laboratório de Microscopia Confocal. À sala de cultivo de células, cedida pela Professora Doutora Carolina Lucci. Ao laboratório de Medicina e Biofísica da Universidade de Leipzig na Alemanha. Ao laboratório de Software e Instrumentação em Física Aplicada do Instituto de Física da UnB, em especial ao Professor Doutor Paulo E. N. de Souza e aos estudantes Rodrigo Barbosa e Pedro Alencar, pelo LED utilizado neste estudo.

Enfim, meu muito obrigado a todas as pessoas que, de uma forma direta ou indireta, contribuíram para realização desse trabalho e para o sucesso destes resultados aqui apresentados.

"Imaginar é mais importante que saber, pois o conhecimento é limitado enquanto a imaginação abraça o Universo."

ALBERT EINSTEIN

Resumo

A nanobiotecnologia, que aplica técnicas, princípios biológicos e nanotecnológicos para melhorar a compreensão e transformação dos biosistemas, é oferecida como proposta de inovação tecnológica para tratamento do câncer. Dentre os avanços da nanobiotecnologia nos diversos setores do campo da saúde, destacam-se aqueles aplicados à terapia fotodinâmica (TFD), modalidade terapêutica minimamente invasiva e cujo uso é clinicamente aprovado para o tratamento de diferentes tipos de doenças oncológicas e não oncológicas. A TFD é capaz não apenas de destruir o tumor devido à sua toxicidade direta às células cancerosas, mas também de causar infarto do tecido canceroso por destruir a microvasculatura tumoral, bem como por ativar o sistema imunitário contra antígenos tumorais. Diante disso, o objetivo principal deste estudo foi avaliar a indução de morte celular imunogênica (MCI) causada pela TFD mediada por nanoemulsão com cloreto de alumínio-ftalocianina (TFD-NE-AIFtCl) em células de câncer de mama murino *in vitro* e *in vivo*. Para tanto, foi realizada a produção de um novo lote da NE-AIFtCl, que foi caracterizado e teve a estabilidade para suas propriedades coloidais, fotofísicas e físico-química avaliada. Concomitantemente aos testes de estabilidade, a NE-AIFtCl foi utilizada para avaliação do perfil de internalização pelas células 4T1, bem como para a avaliação de qual via de endocitose estava sendo utilizada para internalização, além da investigação de sua colocalização subcelular. Após a avaliação dos perfis de internalização, da via endocítica e da colocalização, as células 4T1 foram submetidas a diferentes protocolos da TFD-NE-AIFtCl, variando os tempos e doses de energia (J/cm^2). As células 4T1 foram avaliadas quanto à via de morte desencadeada pela exposição a TFD-NE-AIFtCl. Foi verificada também a emissão de padrões moleculares associados a dano (DAMP) —HSP70, HSP90, Calreticulina, HMGB1 e IL-1 β —, fator-chave para a indução de morte celular imunogênica (MCI). Por fim, após a avaliação dos perfis de liberação desses DAMP, as células pré-tratadas com TFD-NE-AIFtCl foram utilizadas como vacina em camundongos da espécie Balb-C a fim de verificar a ativação de uma resposta antitumoral. Para tanto, após as vacinações, os animais foram submetidos ao enxerto de células 4T1 viáveis, e monitorados quanto ao surgimento de tumor, volume tumoral e sobrevida durante todo experimento. O tempo de 15 minutos foi suficiente para identificação do FS AIFtCl dentro das células 4T1 e essa internalização foi dependente de caveolinas. Os resultados obtidos quanto à internalização e à colocalização subcelular do FS AIFtCl nas organelas núcleo, lisossomos, mitocôndrias e no retículo endoplasmático (RE) demonstraram diferenças na retenção do FS AIFtCl. Sendo que, os tempos de 15, 30 e 45 minutos apresentaram uma maior quantidade de FS AIFtCl nas organelas supracitadas, quando comparados com os tempos de 60, 120 e 240 minutos. Os diferentes protocolos da TFD-NE-AIFtCl aplicados nas células foram eficazes quanto à diminuição da viabilidade das células 4T1. Vale ressaltar ainda que à medida em que o tempo e a dose de energia foram variados, houve variação do perfil de morte e da via de morte ocasionada (apoptose/necrose). Os tratamentos com TFD-NE-AIFtCl 9,01 nM 25 J/cm^2 apresentaram maior perfil de apoptose, o que refletiu numa maior emissão de DAMP: HSP70, HSP90, Calreticulina, HMGB1 e IL-1 β , quando comparados com os demais protocolos. Esses resultados apresentados pelo tratamento com TFD-NE-AIFtCl 9,01 nM 25 J/cm^2 se refletiram também, na avaliação *in vivo*, sendo verificada uma maior resistência dos animais quanto ao surgimento do tumor, a apresentação de menores volumes tumorais e maior sobrevida. Contudo, o presente estudo conclui que os diferentes protocolos de TFD-NE-AIFtCl aplicados às células 4T1 foram capazes de fazer a emissão dos DAMP — sendo esse requisito chave para ação de uma ativação de MCI e uma ativação antitumoral — porém, essas emissões ocorreram de formas diferentes mediante

as alterações de tempo de dose de energia. Conclui-se também que a aplicação da TFD-NE-AIFtCl 9,01 nM 25 J/cm² mais branda demonstrou melhores resultados quanto ao surgimento e desenvolvimento do tumor, além de apresentarem uma maior taxa de sobrevivência.

Palavras-chave: Nanobiotecnologia. Apoptose. Padrões Moleculares Associados a Danos. Morte Celular Imunogênica.

Abstract

Nanobiotechnology, which applies techniques, biological principles and nanotechnologies that improve the understanding and transformation of biosystems, is offered as a proposal of technological innovation for the treatment of cancer. Among the advances in nanobiotechnology in the various sectors of the health field, the most important are those applied to photodynamic therapy (PDT), a minimally invasive therapeutic modality and whose use is clinically approved for the treatment of different types of oncological and non-oncological diseases. PDT is capable not only of destroying the tumor due to its direct toxicity to the cancer cells but also by causing infarction of the cancerous tissue by destroying the tumor microvasculature as well as by activating the immune system against tumor antigens. Therefore, the main objective of these studies was to evaluate the induction of immunogenic cell death (ICD) of nanoemulsion-mediated PDT with aluminum chloride-phthalocyanine (PDT-NE-AIFtCl) in murine breast cancer cells *in vitro* and *in vivo*. For this, the production of a new batch of NE-AIFtCl was carried out, which was characterized and had its stability for its colloidal, photophysical and physicochemical properties evaluated. In parallel to the stability tests, NE-AIFtCl was used to evaluate the internalization profile by 4T1 cells, as well as to evaluate which pathway of endocytosis was being used for internalization, and to evaluate its subcellular colocalization. After the evaluation of the internalization profiles, the endocytic pathway and colocalization, the 4T1 cells were submitted to different protocols of the PDT-NE-AIFtCl, varying the time and energy doses (J/cm^2). 4T1 cells were evaluated for the path of death triggered by exposure to PDT-NE-AIFtCl. DAMPs—HSP70, HSP90, Calreticulin, HMGB1 and IL-1 β —, a key factor for the induction of immunogenic cell death (ICD), were also verified. Finally, after evaluation of the release profiles of these DAMPs, cells that we pretreated with PDT-NE-AIFtCl were used as vaccine in mice of the Balb-C species in order to verify the activation of an antitumor response. To do this, after the vaccinations, the animals were submitted to the grafting of viable 4T1 cells and monitored for appearance of tumor, tumor volume and survival throughout the experiment. The time of 15 minutes was sufficient for identification of the FS AIFtCl within the 4T1 cells and this internalization was dependent on caveolinas. The results obtained on the internalization and the subcellular colocalization of FS AIFtCl in the nucleus, lysosomes, mitochondria and in the endoplasmic reticulum (ER) showed differences in the retention of FS AIFtCl. The times of 15, 30 and 45 minutes showed a higher amount of FS AIFtCl in the aforementioned organelles when compared with the times of 60, 120 and 240 minutes. The different protocols of PDT-NE-AIFtCl applied in cells were effective in decreasing the viability of the 4T1 cells. It is worth noting that as time and energy dose were varied, there was variation of the death profile and of the way of death (apoptosis / necrosis). Treatments with 9.01 nM PDT-25 J/cm^2 had a higher apoptosis profile, which reflected in a higher emission of DAMPs: HSP70, HSP90, Calreticulin, HMGB1 and IL-1 β , when compared to the other protocols. These results presented by the treatment with PDT-NE-AIFtCl 9.01 nM 25 J/cm^2 also reflected in the *in vivo* evaluation, which demonstrated a greater resistance of the animals regarding the appearance of the tumor, the presentation of smaller tumor volumes and greater survival rates. However, the present study concludes that the different PDT-NE-AIFtCl protocols applied to the 4T1 cells were able to make the DAMPs emission — this being a key requirement for the action of ICD activation and antitumor activation —; it is worth mentioning that these emissions occurred in different ways regarding modification in time and energy doses. It was also concluded that the application of the milder 9,01 nM 25 J/cm^2

cm² PDT-NE-AIFtCl demonstrated better results regarding the occurrence and development of the tumor, besides presenting better survival rates.

Keywords: Nanobiotechnology. Apoptosis. Molecular Patterns Associated with Damage. Immunogenic Cell Death.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Principais fatores de risco para o surgimento do câncer. UV – ultravioleta
- Figura 2:** Representação dos tipos de massa tumoral formada por células neoplásicas.
- Figura 3:** Etapas de desenvolvimento do câncer.
- Figura 4:** Progressão tumoral. Após o surgimento de uma célula neoplásica ocorre uma gama de fatores que são induzidas para proporcionar o desenvolvimento de uma massa tumoral.
- Figura 5:** Esquema do mecanismo de ação da TFD.
- Figura 6:** Estrutura química da ftalocianina.
- Figura 7:** Ilustração da aplicação da TFD em um tumor de mama.
- Figura 8:** Ativação de respostas à má formação de proteínas.
- Figura 9:** Estresse oxidativo no RE e ativação da apoptose pelas proteínas IRE1 α , ATF6 e PERK.
- Figura 10:** Ativação de morte celular imunogênica (MCI) pela terapia fotodinâmica (TFD).
- Figura 11:** Representação do mecanismo de ativação de morte celular imunogênica (MCI) ocasionada pelo estresse no RE após TFD.
- Figura 12:** Etapas do preparo da nanoemulsão incorporada ao cloreto de alumínio-ftalocianina (NE-AIFtCl).
- Figura 13:** Teste de internalização da NE-AIFtCl pelas células 4T1 pelo método de citometro de fluxo.
- Figura 14:** Teste para verificação da via pela qual a NE-AIFtCl foi incorporada pelas células 4T1.
- Figura 15:** Teste de colocalização subcelular (núcleo, lisossomos, mitocôndria e retículo endoplasmático) do AIFtCl pelas células 4T1 utilizando a técnica microscopia confocal.
- Figura 16:** Avaliação do efeito da TFD-NE-AIFtCl (0-1 μ M) na viabilidade celular de 4T1.
- Figura 17:** Avaliação do efeito da TFD-NE-AIFtCl utilizando as concentrações CC50 de cada tempo.

Figura 18: Avaliação do efeito de citotoxicidade do quimioterápico Mitoxantrona (MTX) sob diferentes concentrações contra células 4T1.

Figura 19: Avaliação da via de morte pelo método AO e PI após 4 horas dos tratamentos MTX e diferentes protocolos da TFD-NE-AIFtCl nas células 4T1.

Figura 20: Fotomicrografia das células da linhagem 4T1 marcadas com alaranjado de acridina (AO) e iodeto de propídeo (PI) analisadas em microscópio de fluorescência EVOS.

Figura 21: Avaliação da via de morte pelo método Anexina V e PI após 24 horas dos tratamentos.

Figura 22: Identificação do estresse oxidativo utilizando o reagente CellROX[®] ocasionado pela exposição das células 4T1 a TFD-NE-AIFtCl.

Figura 23: Teste para detecção dos padrões moleculares associados a danos (DAMP).

Figura 24: Teste para detecção e quantificação no sobrenadante de células 4T1 para IL-1 β e HMGB1 após 24 e 48 horas de serem submetidos a diferentes protocolos da TFD-NE-AIFtCl.

Figura 25: Aplicação da TFD-NE-AIFtCl em animais como tumor de mama enxertado no flanco esquerdo de animais da linhagem Balb-C.

Figura 26: Vacinação dos animais *Balb-C* com células 4T1 submetidas a diferentes protocolos da TFD-NE-AIFtCl.

Figura 27: Desenho representativo da NE-AIFtCl e suas propriedades coloidais. Imagem obtida de Rodrigues 2014.

Figura 28: Estabilidade coloidal da NE-AIFtCl no período de quatro anos.

Figura 29: Estabilidade fotofísica do AIFtCl associado à nanoemulsão (NE-AIFtCl).

Figura 30: Fluorescência da NE-AIFtCl.

Figura 31: Produção de espécies reativas de oxigênio pelo método benzofurano para o FS AIFtCl associado à nanoemulsão (NE-AIFtCl).

Figura 32: Intensidade de fluorescência de AIFtCl em células 4T1 expostas à NE-AIFtCl.

Figura 33: Internalização do AIFtCl (NE-AIFtCl) por células 4T1 expostas a diferentes inibidores de endocitose.

Figura 34: Perfil de internalização e colocalização da NE-AIFtCl nas células 4T1 marcadas para lisossomos, retículo endoplasmático, mitocôndria e núcleo.

Figura 35: Viabilidade de células 4T1 24 horas após a aplicação de diferentes concentrações de NE-AIFtCl como mediadora da TFD.

Figura 36: Diferentes concentrações citotóxicas que ocasionaram morte de 50% e de 90% das células 4T1 após a exposição à NE-AIFtCl por 15 minutos seguida da irradiação nos tempos representados no *eixo x* (TFD-NE-AIFtCl).

Figura 37: Viabilidade celular de 4T1 sob diferentes densidades de energia (fluência J/cm²) expostas às CC50 15 minutos e irradiadas após os tempos.

Figura 38: Marcação pelo método AO/PI das células 4T1 após 4 horas da aplicação dos diferentes protocolos da TFD-NE-AIFtCl.

Figura 39: Avaliação via de morte pelo método AO/PI em células 4T1 submetidas a diferentes protocolos da TFD mediada pela NE-AIFtCl.

Figura 40: Avaliação via de morte pelo método Anexina V/PI em células 4T1 submetidas a diferentes protocolos da TFD mediada pela NE-AIFtCl.

Figura 41: Imagens de microscopia de fluorescência da produção de espécies reativas causada pela TFD mediada pelas NE-AIFtCl (1 µM) irradiada com uma fluência de 25 J/cm².

Figura 42: Expressão da marcação da proteína HSP70 por células 4T1 após diferentes protocolos da TFD-NE-AIFtCl.

Figura 43: Emissão na membrana plasmática da proteína HSP70 em células 4T1 submetidas a diferentes protocolos da TFD-NE-AIFtCl.

Figura 44: Exposição da marcação da proteína HSP90 por células 4T1 após diferentes protocolos da TFD-NE-AIFtCl.

Figura 45: Marcação da proteína HSP90 em células 4T1 submetidas a diferentes protocolos da TFD-NE-AIFtCl.

Figura 46: Marcação da proteína calreticulina em células 4T1 após diferentes protocolos da TFD-NE-AIFtCl.

Figura 47: Emissão na membrana plasmática do DAMP Calreticulina em células 4T1 submetidas a diferentes protocolos da TFD-NE-AIFtCl.

Figura 48: Concentração de IL-1β no meio de cultivo 24 horas após células 4T1 serem expostas a diferentes protocolos da TFD-NE-AIFtCl.

Figura 49: Concentração de HMGB1 no sobrenadante 48 horas após células 4T1 serem expostas a diferentes protocolos da TFD-NE-AIFtCl.

Figura 50: Volume tumoral após tratamento com TFD-NE-AIFtCl em animais Balb-C com tumor de mama enxertado no flanco esquerdo do tipo 4T1.

Figura 51: Avaliação da área do pulmão por meio de método de Microtumografia. Linha azul: animais tratados com PBS; linha vermelha: animais tratados com TFD-NE-AIFtCl; e linha verde: animais saudáveis.

Figura 52: Porcentagem de animais livres de tumor após receberem inóculo de células 4T1 viáveis no flanco esquerdo.

Figura 53: Volume tumoral dos animais após serem submetidos ao inóculo de células 4T1 viáveis no flanco esquerdo.

Figura 54: Sobrevida dos animais durante todo o tempo do experimento.

Figura 55: Toxicidade dos inibidores de endocitose nas células 4T1.

Figura 56: Análise de colocalização do AIFtCl com lisossomos de células 4T1.

Figura 57: Análise de colocalização do AIFtCl com RE de células 4T1.

Figura 58: Análise de colocalização do AIFtCl com mitocôndria de células 4T1.

Figura 59: Análise de colocalização do AIFtCl com núcleo de células 4T1.

Figura 60: Efeito citotóxico causado por diferentes concentrações do quimioterápico MTX (0-10 μ M) em células 4T1.

Figura 61: Emissão na membrana plasmática da proteína HSP70 em células 4T1 submetidas a diferentes protocolos da TFD-NE-AIFtCl.

Figura 62: Emissão na membrana plasmática da proteína HSP90 em células 4T1 submetidas a diferentes protocolos da TFD-NE-AIFtCl.

Figura 63: Emissão na membrana plasmática da Calreticulina em células 4T1 submetidas a diferentes protocolos da TFD-NE-AIFtCl.

LISTA DE FLUOXOGRAMAS

Fluxograma 1: Preparo e etapas de caracterização e aplicação da NE-AIFtCl – cloreto de alumínio-ftalocianina associado a nanoemulsões. Em amarelo: Caracterização coloidal: DH – diâmetro hidrodinâmica; Zt – potencial zeta; e PDI – índice de polidispersão. Em Verde: Caracterização fotofísica: absorvância e fluorescência. Em vermelho: Avaliação na produção de ROS – espécies reativas de oxigênio. Em Roxo: Testes biológicos: *in vitro* nas linhagens de carcinoma mamário murino – 4T1 e fibroblastos murino – NIH 3T3; *in vivo* camundongos da linhagem Balb-C.

Fluxograma 2: Etapas de desenvolvimento do estudo *in vitro* utilizando células 4T1 submetidas a diferentes protocolos da TFD-NE-AIFtCl. Siglas: NE-AIFtCl - cloreto de alumínio-ftalocianina associado a nanoemulsões; ≠ - diferente; [] – concentrações; 15' - 15 minutos; CC – concentração citotóxica; MTT - brometo de 3 (4,5 dimetiliazol-2il)-2,5-difenil-tetrazólio; IL-1 β – Interleucina 1 beta; *High-Mobility Group Box 1*; *Heat Shock Protein*. AO – alaranjado de acridina; PI – iodeto de propídeo.

Fluxograma 3: Etapas de desenvolvimento do estudo *in vivo* utilizando camundongos fêmeas das espécies Balb-C. Os testes foram divididos em duas etapas, sendo a primeira etapa o enxerto de células 4T1 viáveis e tratamento com TFD-NE-AIFtCl após o surgimento do tumor. Segunda etapa, independente da primeira, os animais foram vacinados com células 4T1 pré-tratadas com diferentes protocolos da TFD-NE-AIFtCl e depois realizado o teste de imunização com o enxerto de células 4T1 viáveis.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Lista de equipamentos.

Tabela 2: Lista de materiais.

Tabela 3: Lista de reagentes.

Tabela 4: Comprimentos de ondas ajustados para acessar os picos de absorção e emissão fluorescência do FS associado à nanoformulação (NE-AIFtCl).

Tabela 4: Faixas espectrais ajustadas para detecção das fluorescências dos marcadores subcelulares e do FS AIFtCl

LISTA DE ABREVIÇÕES

4T1	Carcinoma mamário murino
Al	Alumínio
AlFtCl	Cloreto de alumínio-ftalocianina
AO	Alaranjado de acridina
ATF4	Fator de transcrição ativa 4
ATF6	Fator de transcrição ativa 6
BAK/BAX	Proteínas pró-apoptóticas
BCL2	Fator de ativação de autofagia
BIM/BH-3	Proteínas pró-apoptóticas
CC50	Concentração citotóxica que ocasionou 50% de morte nas células 4T1
CC90	Concentração citotóxica que ocasionou 90% de morte nas células 4T1
CD8+	Células T
CHOP	Fator pró-apoptótico
CO₂	Câmara de gás carbônico
CRT	Calreticulina
Ct c	Complexo citocromo C
C/D	células foram congeladas e descongeladas por três vezes
DAMP	Padrão molecular associado a dano
DBF	1,3-difenil-isobenzofurano
DC	Células dendríticas
DH	Diâmetro hidrodinâmico
DLS	Dispersão dinâmica de luz
DMSO	Dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo
EIFα	Eukaryotic initiation factor 2 α
Em	Emissão de fluorescência
ERAD	Proteínas associadas ao RE
ERRO	Espécies reativas de oxigênio
Ex	Excitação
FS	Fotossensibilizante
G	Gramas
G	Giro
HMGB1	High-Mobility Group Box 1
HSP70	Proteína de choque térmico 70
HSP90	Proteína de choque térmico 90

IL-1β.	Interleucina 1 β .
INCA	Instituto Nacional de Câncer
PDI	Índice de polidispersão
IRE1	inositol-requiring enzyme 1
J/cm²	Dose de energia em Jaules por centímetro ao quadrado
kV	Kilovolts
Kg	Kilogramas
LED	Diodo emissor de luz
mA	Miliampere
MAM	Membrana associada a mitocôndria
Mb	Membrana basal
MCF7	Adenocarcinoma mamário humano
MCI	Morte celular imunogênica
Mg	Miligramas
MTT	brometo de 3 (4,5 dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil-tetrazólio
MTX	Mitoxantrona
ml	Mililitros
Ne+ve	Porcentagem de pixels positivos
NE	Nanoemulsão
Nm	Nanômetros
Nm	Nanomolar
PBS	Solução salina
PDM	Protuto das diferenças da média
PERK	Protein kinase RNA-like ER kinase
Ph	Potencial hidrogênico
PI	Iodeto de propídeo
R	Coefficiente de Sobreposição Mander's
RE	Retículo endoplasmático
RPMI1610	Meio de cultura celular
Rr	Coefficiente de Correlação de Pearson's
SFB	Soro fetal bovino
SI	Sistema imunitário
S1P	sphingonise-1
S2P	sphingonise-2
TFD	Terapia fotodinâmica
UPR	Proteínas mal formadas
VI	Vasos linfáticos
Vs	Vasos sanguíneos
UV	Ultravioleta

Zp	Potencial zeta
µg	Microgramas
µl	Microlitros
µM	Micromolar
Λ	Lambda

SUMÁRIO

1 Introdução	1
1.1 Câncer	1
1.1.1 Câncer de mama	5
1.2 Nanobiotecnologia no tratamento do câncer de mama: Terapia Fotodinâmica	8
1.3 Morte Celular Imunogênica: Padrões Moleculares Associados a Dano	11
2 Objetivo Geral	20
2.1 Objetivos Específicos	20
2.1.1 NE- <i>AlFtCl</i> : obtenção, caracterização e estabilidade	20
2.1.2 Investigação <i>in vitro</i> da TFD-NE- <i>AlFtCl</i> em células de carcinoma mamário murino (4T1)	20
2.1.3 Investigação <i>in vivo</i> da TFD-NE- <i>AlFtCl</i> em camundongos fêmeas da espécie Balb-c e avaliação de resposta antitumoral por meio de ensaio de vacinação	21
3 Métodos	22
3.1 Preparo e caracterização NE- <i>AlFtCl</i>	25
3.1.1 Caracterização e Estabilidade da NE- <i>AlFtCl</i>	27
3.1.1.1 Propriedades Coloidais das NE- <i>AlFtCl</i>	27
3.1.1.2 Propriedades fotofísicas das NE- <i>AlFtCl</i>	27
3.1.1.3 Propriedades físico-química da NE- <i>AlFtCl</i> .	28
3.2 Experimentos biológicos <i>in vitro</i> : carcinoma mamário murino (4T1)	28
3.2.1 Manutenção da linhagem celular	29
3.2.1.1 Estabelecimento de subculturas celulares	30
3.2.1.2 Determinação da viabilidade celular pelo método MTT	31
3.2.2 Visualização da incorporação intracelular de NE- <i>AlFtCl</i> nas células 4T1 por citometria de fluxo	31
3.2.3 Avaliação das vias de endocitose.	33
3.2.4 Visualização da incorporação intracelular de NE- <i>AlFtCl</i> e análise de sua colocalização com organelas de células 4T1	34
3.2.4.1 Obtenção e análise das imagens pelo programa ImageJ	36

3.2.5 TFD-NE- <i>AlFtCl</i> <i>in vitro</i>	37
3.2.5.1 Efeito da TFD-NE- <i>AlFtCl</i> sob diferentes concentrações do <i>AlFtCl</i> : obtenção das CC50 e CC90	37
3.2.5.2 Efeito da TFD-NE- <i>AlFtCl</i> sob diferentes densidades de energia utilizando as CC50 de cada tempo da seção 3.2.5.1	38
3.2.6 Teste de viabilidade para Mitoxantrona	39
3.2.7 Análise de morte celular pelo método AO/PI	40
3.2.8 Análise de morte celular pelo método Anexina V/PI	43
3.2.9 Teste para detecção do estresse oxidativo celular após à TFD-NE- <i>AlFtCl</i> por Microscopia de Fluorescência	44
3.2.10 Detecção e quantificação de DAMPs após a TFD-NE- <i>AlFtCl</i>	46
3.2.10.1 Detecção da exposição de Calreticulina, HSP70 e HSP90 após 1 hora da aplicação da TFD-NE- <i>AlFtCl</i>	46
3.2.10.2 Interleucina 1 beta (<i>IL-1β</i>) e High mobility molecule box-1 (<i>HMGB1</i>)	47
3.3 Testes <i>in vivo</i>	48
3.3.1 Ensaio de TFD-NE- <i>AlFtCl</i> em camundongos fêmeas (<i>Balb-C</i>) com tumor 4T1	49
3.3.2 Ensaio de vacinação em camundongos fêmeas (<i>Balb-C</i>) utilizando células 4T1 submetidas a diferentes protocolos de TFD-NE- <i>AlFtCl</i>	51
3.4 Testes estatísticos	52
4 Resultados e Discussão	57
5 Conclusão	90
Referências	92
ANEXOS	102
Anexo I: Avaliação do efeito citotóxico dos inibidores de endocitose utilizados.	103
Anexo II: Internalização do <i>AlFtCl</i> com o RE das células 4T1 expostas à NE- <i>AlFtCl</i> Internalização do <i>AlFtCl</i> com os lisossomos das células 4T1 expostas à NE- <i>AlFtCl</i>	104
Anexo III: Resultados da diluição seriada do quimioterápico MTX e obtenção da CC50.	107
Anexo IV: Imagnes com a marcação da proteína HSP70	108
Anexo V: Imagnes com a marcação da proteína HSP90	112

<i>Anexo VI: Imagnes com a marcação de CRT</i>	116
<i>Anexo VI: Declaração de autorização do uso de animais para os experientos</i>	120

1 Introdução

1.1 Câncer

A enfermidade câncer é oriunda de desordens celulares desencadeadas por alterações no material genético de vários tipos celulares. Essas alterações podem ser desencadeadas por fatores genéticos, epigenéticos e/ou ambientais. Uma vez iniciada essa diferenciação celular e a promoção da doença, as células cancerosas, também denominadas de células neoplásicas, começam a se proliferar de forma descontrolada¹⁻³.

Os principais fatores de risco para o aparecimento de células cancerosas estão, em sua maioria, relacionados ao ambiente e a hábitos. De acordo com INCA 2018, os principais fatores de risco relacionados ao surgimento do câncer geralmente estão relacionados à exposição aos principais fatores carcinogênicos representado na **Figura 1**. Fatores de risco podem ser ambientais ou genéticos (hereditário). O meio ambiente responsabiliza por cerca de 90% da transformação de células normais em células neoplásicas. Transformações essas que podem ser desencadeadas pelo excesso à exposição aos raios ultravioleta (UV); má alimentação (ex.: frituras); uso de álcool em excesso e regularmente; tabagismo; exposição a agentes químicos e radioativos e etc. Já os outros 10% restantes estão relacionadas hereditariedade, ou seja, histórico familiar do mesmo tumor.

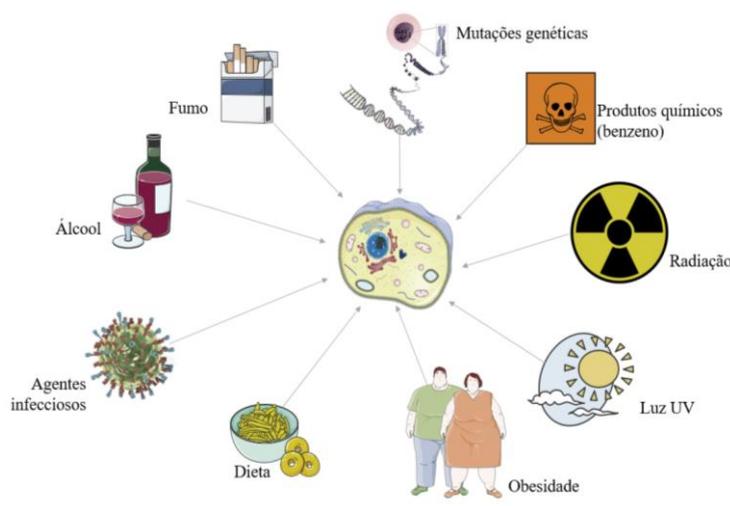


Figura 1: Principais fatores de risco para o surgimento do câncer. UV - ultravioleta.

Evitar a exposição a esses fatores de risco ajuda a dificultar que as células normais do organismo passem por mutações que podem torná-las células cancerosas³. Porém, se isso ocorrer, dá-se início à multiplicação descontrolada dessas células neoplásicas e conseqüentemente à formação de uma massa tumoral. Tumores podem se apresentar de duas maneiras: como uma massa tumoral do tipo benigna ou como uma massa tumoral do tipo maligna (**Figura 2**)^{2,3}.

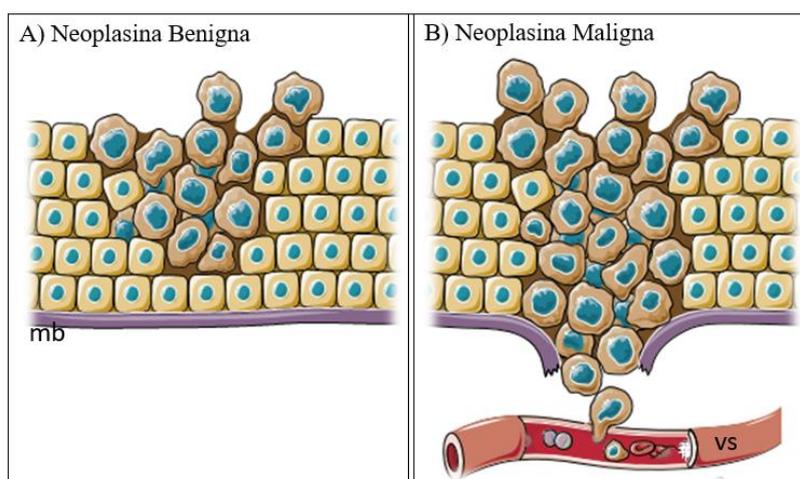


Figura 2: Representação dos tipos de massa tumoral formada por células neoplásicas. **A)** representação de células neoplásicas benignas se multiplicando sem romper a membrana basal (mb). **B)** representação das células neoplásicas malignas: multiplicação de células cancerosas malignas rompendo a mb e invadindo vasos sanguíneos (vs) e vasos linfáticos (vl).

As neoplasias do tipo benignas caracterizam-se pelo aparecimento de uma massa tumoral que não apresenta a capacidade de se disseminar para outras partes do corpo, ou seja, a proliferação dessas células não ultrapassa a membrana basal (*in situ*) (**Figura 2A**). Já as neoplasias do tipo malignas possuem a capacidade de romper a membrana basal e de invadir tecidos adjacentes. A capacidade de disseminação das células malignas para outros tecidos do organismo é responsável por cerca de 90% das mortes em pacientes com câncer, sendo essa característica dos tumores malignos denominada de metástase (**Figura 2B**)¹⁻⁴.

Mesmo com a exposição a fatores de risco, em alguns casos, é possível contar com o não surgimento do câncer, uma vez que existe uma gama de fatores relacionados à iniciação, à promoção e à proliferação da célula cancerosa até sua disseminação. Quanto antes o câncer diagnosticado, maiores as chances de reverter o crescimento e até a disseminação da doença. Recentemente Fouad e Aanei (2017) publicaram uma revisão que descreve as sete principais etapas do surgimento do câncer após as células sofrerem diferenciação (**i**, **ii** e **iii**), sendo elas: **1**) crescimento seletivo e avanço da proliferação da célula cancerosa; **2**) alterações ocasionadas pelo estresse favorecendo o desenvolvimento do câncer; **3**) formação de vasos sanguíneos (angiogênese) – vascularização; **4**) invasão e metástase; **5**) alterações metabólicas⁵; **6**) alterações no microambiente, tornando-o favorável para célula cancerosa, **7**) modulação imunitária (**Figura 3**)^{2,5}.

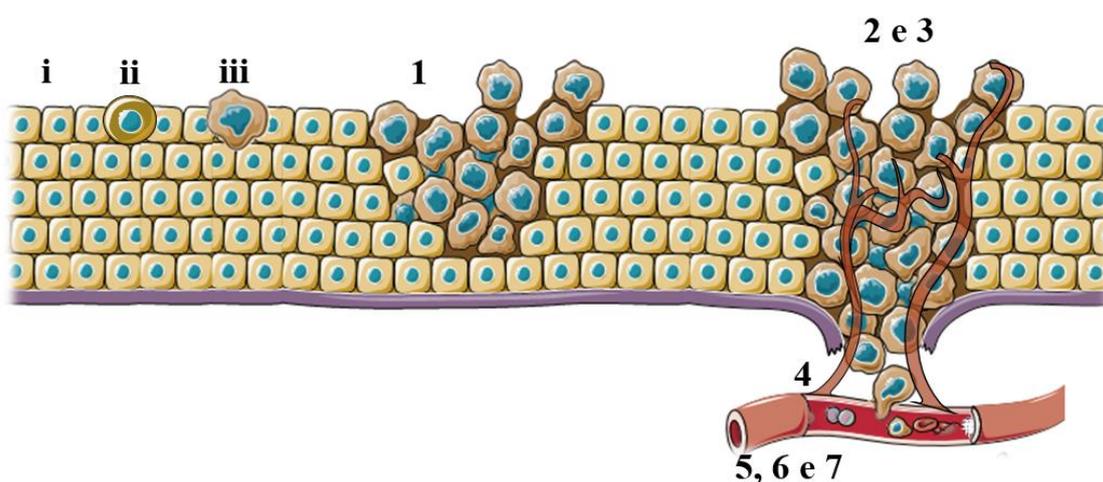


Figura 3: Etapas de desenvolvimento do câncer. i – representação de uma célula normal; ii – célula com alteração genética; iii – célula cancerosa. Em seguida as sete etapas que caracteriza o câncer: 1 – proliferação; 2 – modulação do meio; 3 - angiogênese; 4; disseminação das células cancerosas; 5 – alterações no metabolismo; 6 – alterações no microambiente e por fim 7 – modulação imunitária.

A células cancerosas são capazes de alterar o meio para o desenvolvimento desenfreado de novas células malignas. Na **Figura 4** estão representados os fatores que proporcionam o desenvolvimento contínuo e desenfreado das células cancerosas, descrito por Hanahan e Weinberg no ano de 2011. De acordo com esses autores, as células tumorais são capazes de induzir sinais que promovem a manutenção proliferativa por meio de sinais parácrinos, são capazes também de serem inativas a supressores de crescimento. Além disso, as células cancerosas ou neoplásicas adquirem uma capacidade

de mortalidade replicada e resistência a morte pela instabilidade genômica oriunda de mutações genéticas. Com essa multiplicação descontrolada ocorre a formação de uma massa tumoral que necessita continuamente de nutrientes e oxigênio, sendo assim, para que chegue os suprimentos necessários no tumor, as células cancerosas irão liberar fatores que proporcionaram a formação de novos vasos sanguíneos. Vale ressaltar que além da chegada de suprimentos ao tecido tumoral por meio dos vasos sanguíneos neoformados, ocorre também a disseminação de células tumorais por esses vasos que podem cair na corrente sanguínea e formar novos sítios tumorais em tecidos adjacentes, desencadeando um processo metastático. As células cancerosas também são capazes de desencadear uma evasão ao sistema imunitário, por meio de uma imunoeedição contra as respostas de células de defesa, sendo este um dos principais fatores para dificuldade de tratamento da doença¹⁻⁵.

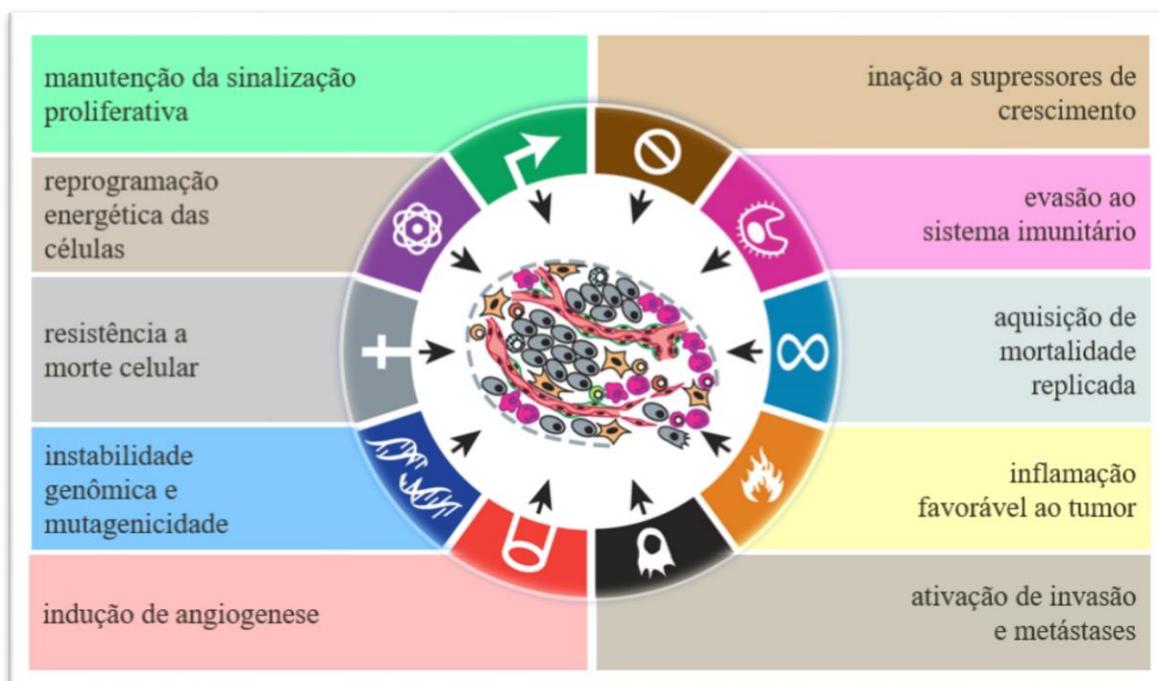


Figura 4: Progressão tumoral. Após o surgimento de uma célula neoplásica ocorre uma gama de fatores que são induzidas para proporcionar o desenvolvimento de uma massa tumoral. Na figura estão representados esses principais fatores relacionados a multiplicação desenfreada das células tumorais; a capacidade das células de resistirem a morte; alta mutagenicidade que se refere a uma instabilidade genômica; ativação de neoangiogênese e assim formação de novos vasos para suprir a massa tumoral com nutrientes e oxigênio; capacidade de invadir demais tecidos por meio da metástase; evasão ao sistema imunitário bem como a modulação da resposta imunitária. Imagem adaptada de Hanahan e Weinberg, 2011.

De acordo com INCA, somente no Brasil para o ano de 2018, estima-se a ocorrência de aproximadamente 600 mil novos casos de câncer, número que deve se repetir também em 2019. Desse montante, o câncer de pele não-melanoma

responsabiliza-se por cerca de 28% dos novos casos. Já os restantes 72% de novos casos de câncer no Brasil seguem a ordem de maior prevalência para o de próstata, pulmão, mama feminina e colorretal, respectivamente. Dentre os tipos de câncer mais ocorrentes no Brasil destaca-se câncer de mama feminino, que corresponde 13,4 % do total de novos casos de câncer no Brasil para o ano de 2018³.

1.1.1 Câncer de mama

O câncer de mama é uma enfermidade oriunda pela multiplicação anormal das células da mama, que desencadeia a formação de um tumor. É o segundo tipo de neoplasia mais comum entre mulheres no Brasil e no mundo, ficando atrás apenas do câncer de pele não melanoma³. Segundo INCA, somente para o ano de 2018 há uma estimativa pelo surgimento de aproximadamente 59 mil novos casos de câncer de mama em mulheres, somente no Brasil, número esse que se repete para o ano de 2019. O surgimento da doença pode estar ligado a idade da mulher, sendo este um fator primordial para o aparecimento do câncer de mama, uma vez que a chance de surgir a doença aumenta à medida que a mulher envelhece. Hereditariedade, em menor proporção, é outro fator está ligado ao surgimento da doença, uma vez que cerca de 4-9% dos casos de câncer de mama são geralmente causados pela mutação nos genes das proteínas *BRCA1* e *BRCA2*. A expressão desses genes aumenta muito o risco do aparecimento da doença, principalmente em mulheres que têm casos na família com câncer de mama ou câncer de ovário³.

Os hábitos de vida é outro fator relacionado ao surgimento do câncer de mama em mulheres. Uso do tabaco, vida sedentária e uma má alimentação estão relativamente mais susceptíveis ao aparecimento da doença. Vale ressaltar também que mulheres que tiveram início da ovulação muito cedo ou fim muito tardia estão mais sujeitas a terem câncer de mama. Mulheres que nunca tiveram filhos (nuliparidade) ou que tiveram gestação tardia — com mais de 30 anos — com ciclos menstruais irregulares e obesas estão também mais susceptíveis ao surgimento do câncer de mama. Em homens o diagnóstico do câncer de mama é muito raro, porém é possível³⁻⁵.

Exames periódicos como o toque e a mamografia auxiliam na descoberta precoce da doença. Os diagnósticos do câncer de mama em estágios iniciais refletem significativamente em um bom prognóstico da doença com taxa de aproximadamente de 65% de sobrevivência das pacientes. No entanto, o número de mulheres que morrem antes do fim do tratamento ainda é alto e continua crescendo. Atualmente os tratamentos convencionais utilizados para a eliminação do câncer de mama consistem principalmente em quimioterapia, radioterapia, cirurgia, hormonioterapia e em imunoterapia^{3, 6-9}. O estágio da doença pode determinar qual tratamento será aplicado nas mulheres com câncer de mama, outros fatores que são determinantes para os tipos de tratamento é o desenvolvimento e localização do tumor, sendo assim, os tratamentos convencionais aqui citados podem ser usados de forma combinada^{3, 6-9}.

Uma das formas de tratamento é por meio de processo cirúrgico que consiste na remoção total ou parcial da mama com tumor, esse processo é denominado de mastectomia. Dependendo do tamanho do tumor ocorre também a remoção dos nódulos linfáticos adjacentes. Existem casos em que é necessário a retirada dos ovários quando nos estágios metastáticos, dependendo do estágio em que se encontra o câncer. No entanto, a mastectomia traz efeitos adversos como a diminuição da autoestima com a mutilação do órgão; fraqueza no braço próximo à cirurgia e suor nas mãos³⁻⁵.

A radioterapia que é um tratamento oncológico baseado em radiações ionizantes para destruir células tumorais. A radioterapia é considerada como tratamento comum e primário, aproximadamente 50% dos pacientes que são submetidos a este tipo de tratamento para o câncer de mama, associam a radioterapia durante a quimioterapia. No entanto, a eficiência da radioterapia é controlada utilizando um cálculo prévio da radiação e do tempo da exposição do paciente. O tempo de radiação irá depender do estágio, bem como o tamanho que se encontra o tumor. Mesmo com os cálculos prévio da irradiação, pode ocorrer danos aos tecidos saudáveis, por se tratar de uma técnica pouco específica. A aplicação em tecidos saudáveis traz efeitos colaterais após sua aplicação. Os riscos de desenvolvimento de toxicidades crônicas oriundas ao tratamento com radioterapia podem aparecer tempos após a aplicação. Os efeitos nocivos oriundos da radioterapia em tecidos normais são caracterizados pelo surgimento de inchaços nos membros superiores como edemas, disfunção da junta superior, que pode levar a uma alteração na qualidade de vida do paciente, a radioterapia também pode desencadear complicações mais graves como carditoxidade⁷⁻⁹.

A quimioterapia que é amplamente utilizada para tratamento de doenças causadas por agentes biológicos, como câncer. Este tipo de tratamento é bastante utilizado pelo quimioterápico ser capaz de atingir preferencialmente células com elevadas taxas de proliferação — células cancerosas. No entanto, a quimioterapia para o tratamento de células cancerosas desencadeia efeitos colaterais, que muitas das vezes são irreversíveis como: comprometimento nas funções cognitivas, morte de células sanguíneas, queda de cabelo (alopecia), alterações gastrointestinais, perda de apetite e em alguns casos até infertilidade, dentre outros, decorrentes da ação de quimioterápicos em células normais, ou seja, células não alvos do tratamento⁶⁻⁸.

Outras formas de tratar o câncer de mama são por meio de técnicas denominadas de tratamentos específicos para células tumorais como a hormonioterapia e a imunoterapia. A hormonioterapia é utilizada como uma técnica adjuvante, podendo ser utilizada antes ou após o processo de retirada do tumor por meio de cirurgia. Essa aplicação pode ser vantajosa, pois diminuiu a produção de estrogênio, conhecido como um combustível para o desenvolvimento de células cancerosas na mama. No entanto, efeitos colaterais como enjoos, náuseas, irregularidade nos períodos menstruais, alterações do endométrio, diminuição da libido, dores de cabeça, calores intensos e vagina ressecada podem ser desencadeados com aplicação dessa terapia^{2 e 3}. Já aqueles aplicados com imunoterapia tem despertado bastante interesse em pesquisas do mundo todo, uma vez que a imunoterapia utiliza recursos do próprio organismo para combater tumores primários⁹.

Imunoterapia consiste na ativação de moduladores que realizam uma atividade imunitária, desencadeando assim uma resposta pelo sistema imunitário no combate das células cancerosas. Vale ressaltar também que a imunoterapia revela novos caminhos para o desenvolvimento de novos fármacos ou de fármacos já descritos como quimioterápicos, não sendo somente utilizadas para o tratamento do câncer, mas ativadores de respostas imunogênicas no combate do tumor primário, combate a focos metastáticos e até na recidiva do mesmo tumor por meio de células de memória. Entretanto, a imunoterapia ainda é um tratamento que está na fase pré-clínica, precisando assim ser mais bem compreendida para aplicação efetiva¹⁰⁻¹².

Neste sentido, o uso de tratamentos que ativam de forma eficaz o sistema imunitário de pacientes oncológicos é um objetivo comum em pesquisas no mundo todo. Ressalta-se também que a utilização de terapias oncológicas associadas com a

nanobiotecnologia vem demonstrando resultados promissores no que se diz respeito ao tratamento do câncer, bem como na eliminação de focos metastáticos por intermédio da ativação de uma resposta imunogênica. Dessa forma, a busca por novas técnicas de tratamento para o câncer é um objetivo de diferentes estudos na área de oncologia¹⁰. Neste sentido, o presente estudo ressalta a utilização da Terapia Fotodinâmica (TFD) como um subárea da nanobiotecnologia como um tratamento contra células de câncer de mama. A TFD é uma técnica segura e eficaz e pouco invasiva que é aprovada pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para tratamento de doenças oncológicas e não oncológicas¹⁰⁻¹⁹.

1.2 Nanobiotecnologia no tratamento do câncer de mama: Terapia Fotodinâmica

A nanobiotecnologia, que aplica técnicas, princípios biológicos e nanotecnológicos que permitem melhorar a compreensão e transformação das biosistemas, apresenta-se como proposta de inovação tecnológica. Muitos estudos utilizam ferramentas da nanobiotecnologia para aumentar a eficiência terapêutica de fármacos^{10,11}. Dentre os avanços da nanobiotecnologia nos diversos setores do campo da saúde, destacam-se aqueles aplicados à terapia fotodinâmica (TFD), modalidade terapêutica minimamente invasiva e cujo uso é clinicamente aprovado para o tratamento de diferentes tipos de doenças oncológicas e não oncológicas¹².

A TFD é baseada na combinação de três componentes atóxicos: oxigênio molecular, fotossensibilizante e luz de comprimento de onda específico. Apenas quando combinados estes elementos induzem efeitos tóxicos aos tecidos e células-alvo com base na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO)¹³⁻²⁰ (**Figura 5**).

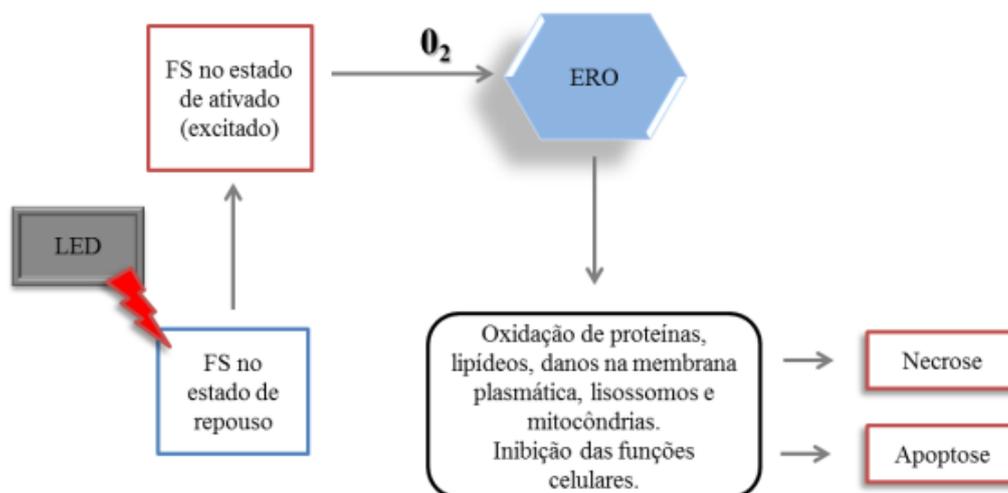


Figura 5: Esquema do mecanismo de ação da TFD. O FS é excitado com luz em comprimento de onda específico ocorrendo, a partir do O_2 tecidual, a formação de espécies reativas de oxigênio que são tóxicas a células tumorais. ERO: espécies reativas de oxigênio; FS: fotossensibilizante. Imagem retirada de Rodrigues, 2014.

O mecanismo de ação dos FS na TFD é atribuído à transformação da energia luminosa a energia química, essencial para a geração das ERO. Desta forma, o FS é uma peça-chave indispensável para o êxito da TFD. No entanto, para atingir esse sucesso, o FS dependerá de algumas características, essenciais, como: **1)** pureza química; **2)** acúmulo preferencial em tecidos tumorais; **3)** ativação em comprimentos de onda específicos; **4)** capacidade de geração de elevadas quantidades de espécies reativas de oxigênio (ERO); **5)** rápida eliminação tecidual o que minimiza os danos a tecidos normais, e **6)** atóxicos sem a exposição luminosa^{13,16 e 21}.

FS do tipo ftalocianinas são bastante utilizados como mediadores da TFD como tratamento de diversas doenças, devido a suas propriedades fotoquímicas e fotofísicas. Ftalocianinas apresentam alto coeficiente de absorção espectral na faixa de comprimentos de onda longos – 650-850 nm. Esse comprimento de onda corresponde ao intervalo da região do vermelho visível que tem maior poder de penetração. Devido a essas características, a aplicabilidade desses FS para o tratamento de diversas doenças, dentre elas o câncer, tem demonstrado resultados bastante promissores no meio acadêmico^{16, 22 e 23}.

A maioria dos FS, como no caso das ftalocianinas, são caracterizados como aromáticos e de natureza hidrofóbica (**Figura 6**). Desta forma, sua disposição em meios fisiológicos faz com que esses se agreguem reduzindo seu rendimento quântico de forma

significativa na produção de ERO – principal fator citotóxico da TFD. Neste contexto, a associação de fototerápicos a sistemas nanoparticulados melhora a atividade de FS em meios fisiológicos^{10,13,16 e 24}.

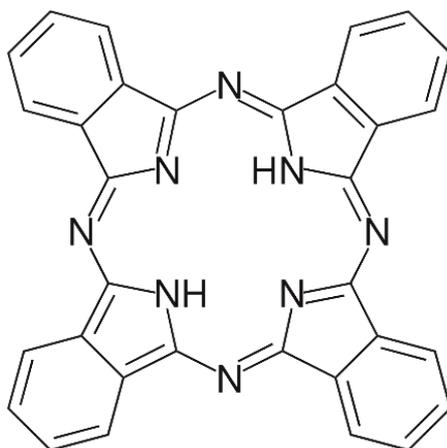


Figura 6: Estrutura química da ftalocianina.

Muitos estudos têm demonstrado uma maior eficiência do FS associado a nanopartículas tanto em testes *in vitro*, quanto em testes *in vivo*. De acordo com Muehlmann e colaboradores (2011), a utilização do FS cloreto de alumínio-ftalocianina associado a nanopartículas poliméricas como mediador da TFD apresentou maior eficiência contra células de câncer de mama MCF7 quando comparado como o mesmo FS na sua forma livre. Essa melhor eficiência do FS está diretamente relacionada à nanopartícula à qual foi associado. Dentre os diferentes tipos de nanopartículas destacam-se as nanoemulsões, que são de fácil obtenção, produzidas com componentes de baixo custo e que se apresentam bastante estáveis em meios biológicos sob diferentes temperaturas^{13 e 16}.

Sendo assim, diversas pesquisas têm demonstrado que a TFD é capaz não apenas de destruir o tumor devido à sua toxicidade direta às células cancerosas, mas também por causar infarto do tecido canceroso por destruir a microvasculatura tumoral, e por ativar o sistema imunitário contra antígenos tumorais^{19,25-29}. Particularmente, a ativação do sistema imunitário pela TFD e por quimioterápicos diversos tem sido objeto de investigação intensa nos últimos anos, pois, se induzida de maneira adequada, pode eventualmente levar à destruição não apenas do tumor primário, mas também de

metástases, estabelecendo uma proteção imunitária sistêmica de longa duração contra possível recorrência do mesmo câncer^{19, 26 e 30} (**Figura 7**).

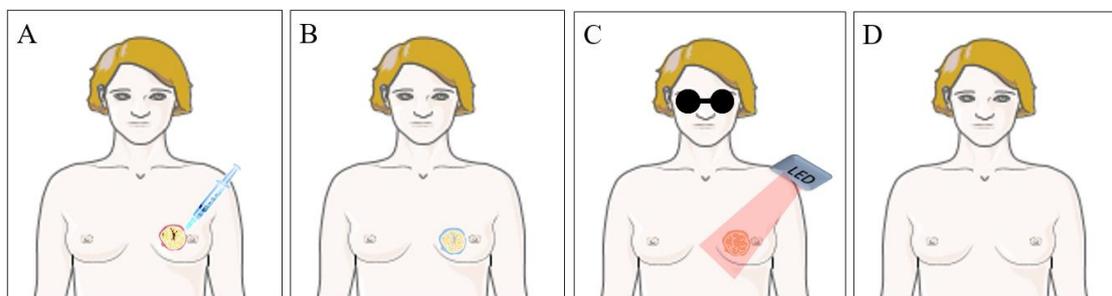


Figura 7: Ilustração da aplicação da TFD em um tumor de mama. **A)** injeção local do FS; **B)** acumulo de FS na massa tumoral; **C)** exposição do tumor ao LED com comprimento de onda específica; **D)** erradicação do tumor.

1.3 Morte Celular Imunogênica: Padrões Moleculares Associados a Dano

O retículo endoplasmático (RE) é uma organela intracelular complexa e dinâmica que desempenha funções extremamente importantes nas células eucariotas, tais como: dobragem de proteínas e translocação, armazenamento de Ca^{2+} e metabolismo de lipídeos e carboidratos. O desequilíbrio dessas funções pode ser desencadeado por agentes causadores de estresse oxidativo na organela (ex.: mitoxantrona^{19, 26-28}, doxorubicina³¹⁻³³ e TFD^{19, 26-28}). Estresse oxidativo no RE pode levar à liberação desregulada do Ca^{2+} , alterações no acumulo de lipídeos ou carboidratos que acarretará na má formação de proteínas. Proteínas mal formadas se acumulam no lúmen da organela, ocasionando estresse no retículo endoplasmático³⁵⁻³⁸.

Durante o estresse no retículo endoplasmático, três proteínas de transmembrana são ativadas: ATF6 (do inglês *activating transcription factor 6*); PERK (do inglês *protein kinase RNA-like ER kinase*); e IRE1 (do inglês *inositol-requiring enzyme 1*). Essas proteínas iniciam uma cascata de sinalização que coletivamente constitui uma resposta a proteínas mal formadas – UPR (do inglês *Unfolded Protein Response*)³⁵⁻³⁸. Quando isso ocorre, uma de duas vias é tomada pelo retículo endoplasmático: **1)** tentar restabelecer a homeostasia na organela por meio da resposta das UPR – esse restabelecimento dependerá da quantidade de proteínas mal formadas que

se encontram no retículo endoplasmático; 2) conduzir à morte celular por apoptose, caso não ocorra o reparo na organela.³⁵

Uma forma de reverter o estado de estresse no RE é por meio da clivagem da proteína transmembrana ATF6 (**Figura 8**). Com isso ocorre o desprendimento da proteína ATF6 do RE quando este inicia um estado de estresse. Após se desprender, ATF6 trafega até o complexo de Golgi onde será fragmentada (ATF6N) e retida. A liberação ocorre somente após a clivagem de duas proteases, S1P e S2P (do inglês *sphingonise-1 ou 2 phosphatase*). Essas proteases clivam na região citosólica transmembrana (complexo de Golgi) liberando assim fragmentos de ATF6N que, por sua vez, é translocada até o núcleo. No núcleo, ATF6N irá impulsionar uma transcrição gênica para formação de mais chaperonas (ex.: calreticulina, GRP78/BiP e GRP94) no RE e mais componentes de degradação de proteínas associadas ao RE (ERAD), para com isso tentar estabilizar a homeostase na organela³⁵⁻³⁷.

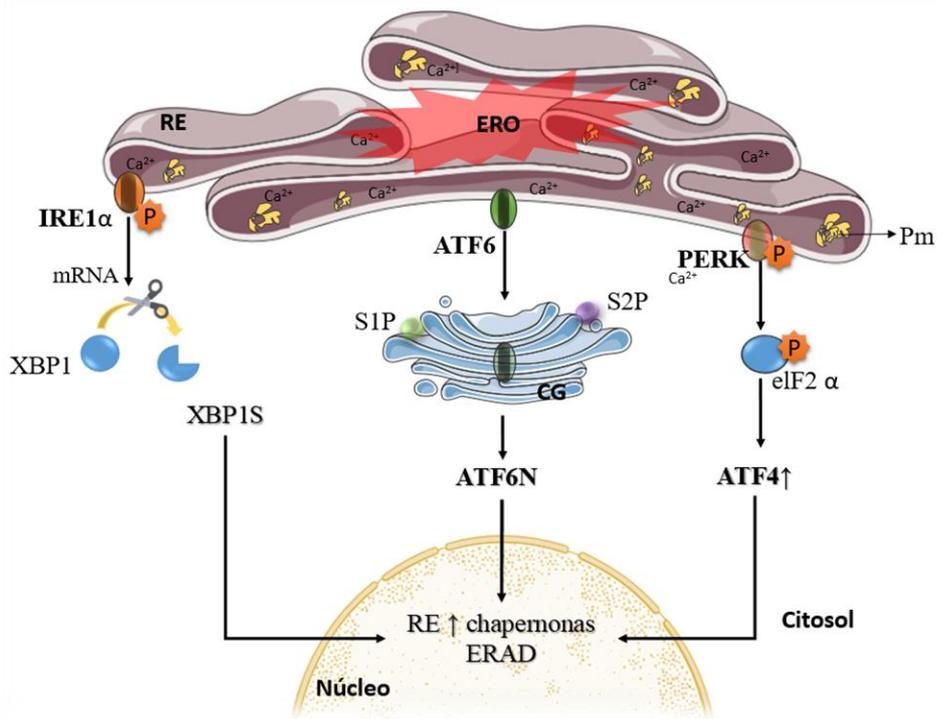


Figura 8: Ativação de respostas a má formação de proteínas - UPR: IRE1 α , ATF6 e PERK para restabelecer a homeostasia do RE após sofrer estresse oxidativo. **A)** IRE1 α . **B)** ATF6. **C)** PERK. RE – retículo endoplasmático; CG – complexo de Golgi; Pm – proteínas mal formadas.

Outra forma utilizada pelas UPR é pela proteína transmembrana IRE1 α . Durante o estresse no retículo endoplasmático, essa proteína se dimeriza e se

autofosforila, com isso favorece a mudança de conformação que ativará domínios de endorribonuclease. Desta forma, a ativação de IRE1 α catalisa o processamento não convencional do mRNA que codifica XBP-1 em XBO-1S (*splicing*). Essa codificação ativa uma síntese lipídica através de fatores de transcrição no núcleo. Com isso, ocorre a regulação da expressão de genes relacionados com impulso do dobramento de proteínas mal formadas, além de facilitar a entrada de proteínas para o RE como por exemplo as ERAD^{35,36-38} (**Figura 8**).

Outra proteína presente na tentativa da regulação da homeostase é proteína PERK. Essa proteína também dimeriza e autofosforila quando ocorre estresse no retículo endoplasmático. No caso dessa proteína, sua autofosforilação favorece uma outra proteína denominada de eIF2 α que também é fosforilada (do inglês *eukaryotic initiation factor 2 α* – eIF2 α s). Assim, eIF2 α s desencadeia a tradução seletiva do fator de transcrição conhecido como ATF4. O ATF4 fará então a regulação de genes envolvidos também no dobramento de proteínas, no metabolismo de aminoácidos e regulação ao estresse oxidativo^{19 e 38} (**Figura 8**).

No entanto, dependendo do grau de estresse ocasionado no RE a retomada à homeostasia pode ser irreversível acarretando assim na segunda via tomada pela UPR, ativar uma morte celular por apoptose. Isso acontece quando um grande número de proteínas mal formadas são acumuladas no lúmen do retículo endoplasmático, e a UPR não consegue reverter a situação. O processo utilizado pela UPR é bastante parecido, porém, em vez de ativar fatores para acelerar o processo de formação das proteínas no lúmen do retículo endoplasmático, a UPR irá ativar um outro fator, o fator de pró-apoptótico denominado de CHOP³⁶⁻⁴⁰ (**Figura 9**).

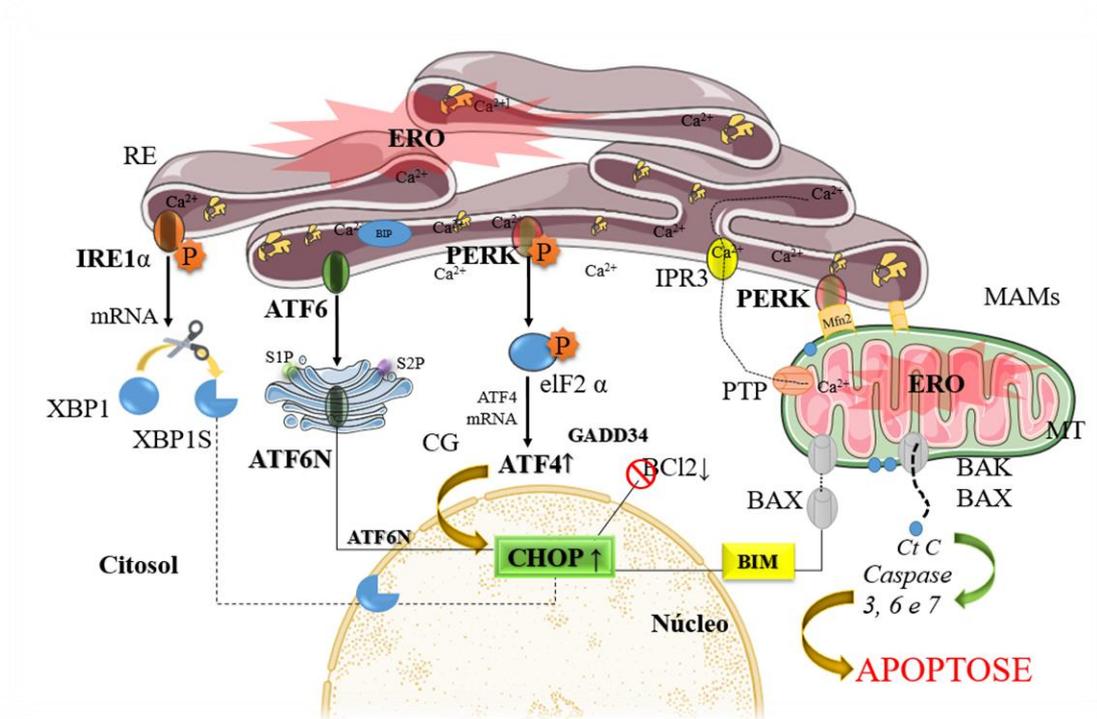


figura 9: Estresse oxidativo no RE e ativação de morte por apoptose pelas proteínas IRE1 α , ATF6 e PERK.

A proteína PERK sinaliza por meio de eIF2 α -ATF4 da UPR a produção dos fatores de transcrição pro-apoptótico denominado de CHOP. CHOP irá então mediar apoptose ativando assim a superexpressão da proteína BIM/BH-3, que irá assim ativar as proteínas BAX e BAK. Essas duas proteínas ativadas irão se ligar à membrana da mitocôndria e com isso liberar complexo citocromo C (Ct c) no citosol da célula. Ct c no citosol se encarregará de ativar proteínas apoptossomos, esses então ativarão caspases (ex.: caspases 3) iniciando assim a apoptose celular^{19,32 e 38}. Vale ressaltar ainda que CHOP também age na proteína BCL2 (fator de ativação de autofagia), inibindo sua ação.

PERK também pode ativar apoptose de outra forma, ligando-se à membrana da mitocôndria por meio do receptor Mfn2, evento denominado de MAM – processo de ligação das membranas da mitocôndria e do retículo endoplasmático. Essa ligação entre RE e mitocôndria permite uma rápida transferência de sinais de ERO – hidroperóxidos lipídicos do RE para mitocôndria. Essa transferência acarreta também na liberação de Ct c que pode se ligar ao RE ou ativar caspases. Desta forma, ocorre a indução de BAX ou BAK na membrana da mitocôndria, com isso liberando mais Ct c e assim é desencadeada uma apoptose mitocondrial (**Figura 9**). ATF6 e IRE α também irão ativar CHOP por meio

dos fragmentos de ATF6N ou da proteína XBP1S e com isso desencadear a apoptose^{35 e 40}.

O estresse oxidativo desencadeado no RE não apenas ativa morte celular por apoptose, mas também é capaz de ativar uma morte celular imunogênica (MCI). Isso acontece porque, dentro do lúmen do retículo endoplasmático, existem proteínas específicas que auxiliam no dobramento de novas proteínas que são formadas na organela como por exemplo a calreticulina, GRP78/BiP; GRP94³⁸. Elas são denominadas de “chaperonas”, fazem a função de acompanhantes de proteínas recém-formadas no retículo e auxiliam na sua liberação no citoplasma pelas proteínas de membrana mencionadas aqui (IRE1 α , ATF6 e PERK)³⁵. Uma vez em estresse contínuo como mencionado acima, essas proteínas chaperonas não conseguem estabelecer o dobramento das proteínas, com isso, elas são emitidas do RE para o citosol e, em seguida, são expostas na membrana plasmática da célula. E é por meio desta exposição que as chaperonas mudam de função, sendo denominadas agora de padrões moleculares associados a dano (DAMP)^{19,20,26-28 e 40}.

E é nesse sentido que muitas pesquisas têm sido voltadas para o retículo endoplasmático, buscando meios de atingir a organela e, com isso, ativar o mecanismo de regulação da emissão de DAMP, bem como da atuação destes na MCI.

De acordo com Garg e Agostinis (2014), a resposta antitumoral exercida pela TFD pode ser induzida por uma resposta de morte celular imunogênica (MCI), através da emissão de padrões moleculares associados a dano celular (DAMP) (**Figura 10**). A MCI é induzida com ocorrência combinada de EROs e estresse no RE (ER), sendo altamente imunogênica^{19,20,26,27 e 40}. Contudo, o efeito do estresse no RE ocasionado pela TFD pode estar diretamente relacionado com localização subcelular do FS. O FS é o fator-chave para o desencadeamento de uma difusão (aproximadamente 220 nm) das espécies reativas moleculares dentro ou próximo do retículo endoplasmático, influenciando assim à emissão desses DAMPs^{29 e 42-44}. Além da localização do FS, a dose de energia (J/cm²) aplicada em células submetidas à TFD, também é um fator importante para determinar o tipo de morte das células, o que conseqüentemente interfere na emissão dos DAMPs (Wang et al. 2015).

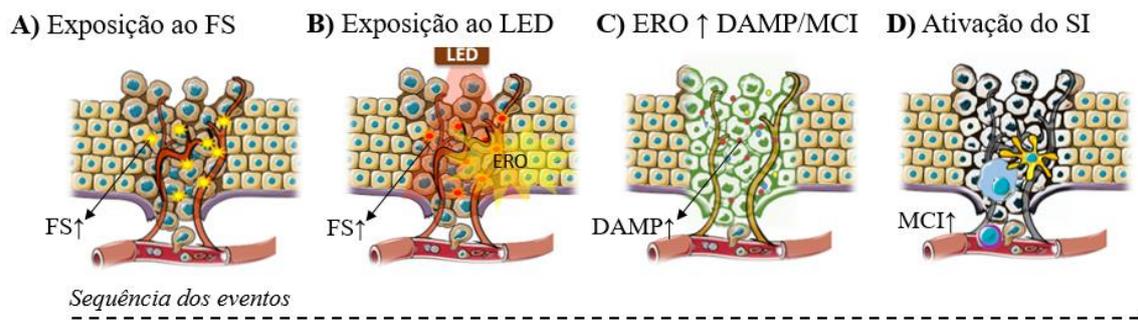


Figura 10: Ativação de morte celular imunogênica (MCI) pela terapia fotodinâmica (TFD). **A)** exposição da massa tumoral ao fotossensibilizante (FS); **B)** exposição à luz com comprimento de onda específico - excitação do FS - FS↑ - excitação do FS e produção de espécies reativas de oxigênio (EROs); **C)** oxidação dos componentes celulares, estresse no retículo endoplasmático, infarto da vascularização do tumor e morte celular imunogênica – liberação de padrões moleculares relacionados a danos (DAMPs); **D)** Ativação do sistema imunitário (inato → adaptativo) pela TFD, maturação de macrófagos e células dendríticas seguida da ativação de células T – memória antitumoral.

De acordo com Koberlik et al. (2015), a emissão dos DAMPs os tornam imunoativadores potentes em células em processo de estresse, dano ou morte²⁶. Normalmente esses DAMPs desempenham funções específicas enquanto permanecem sequestrados pelas células. Fora das células esses DAMPs são capazes de ativar vários receptores de células do sistema imunitário, que incluem as famílias de receptores de reconhecimento padrão. São capazes também de potencializar efeitos pró-inflamatórios como a maturação e ativação de células apresentadoras de antígenos, tais como as células dendríticas e macrófagos, que por fim ativam células T (CD8+), criando uma imunidade antitumoral como representado na **Figura 11**^{26, 29 e 40}.

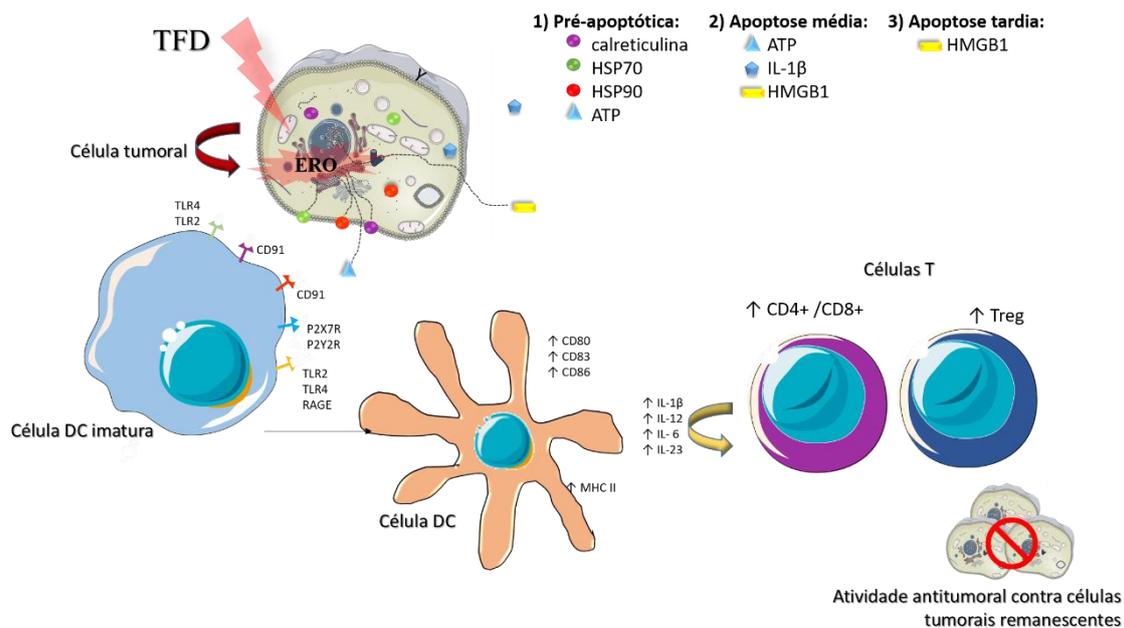


Figura 11: Representação do mecanismo de ativação de morte celular imunogênica (MCI) ocasionada pelo estresse no RE após TFD. Estresse no RE agudo leva a emissão de proteínas como: calreticulina, HSP70, HSP90 expostas na membrana e ATP é liberado no meio extracelular, isso ocorre na fase pré-apoptótica. Esses DAMPs tem a função de acionar uma resposta inflamatória e com isso permitir o reconhecimento de células, como por ex.: células apresentadoras de antígeno – células dendríticas (DC). Nas células dendríticas ainda imaturas contém receptores para os DAMP, uma vez ligados, ocorre a maturação das células que então ativará células linfocitárias (ex.: células T CD4+/CD8+ e Treg) por meio de processos pró-inflamatórios. Células T por sua vez criarão uma atividade antitumoral contra células do mesmo tumor remanescentes. Figura adaptada⁴⁰.

Os DAMPs são os fatores-chave para essa resposta imunogênica. Dentre os diferentes tipos de DAMPs descritos na literatura, o presente estudo destaca: High-Mobility Group Box 1(HMGB1); calreticulina (CRT); Proteínas de choque térmico (HSP70 e 90) e IL-1β.

Calreticulina é uma proteína chaperona bastante importante na formação de novas proteínas, homeostasia do Ca^{2+} e em processos de sinalização dentro do retículo endoplasmático^{45 e 46}. Outras duas chaperonas encontradas no lúmen do RE são as GRP78/BiP e GRP94, que pertencem às classes das famílias HSP 70 e 90 (do inglês *Heat Shock Protein*), respectivamente⁴⁷⁻⁴⁹. Essas proteínas estão relacionadas a funções vitais e específicas dentro da célula, como: regulação da maioria das proteínas; funcionamento como receptores de hormônios; e atuação nas de vias sinalização e também em resposta ao estresse celular⁴⁷⁻⁵¹. No entanto, quando essas proteínas são deslocadas para a etapas superfície da membrana plasmática de células que sofreram estresse, essas chaperonas atuam como potentes ativadoras de uma resposta imunitária, funcionando assim como DAMP, essenciais na ativação de MCI^{19,26, 40 e 52}.

Em estudo feito Garg et al. (2013), observou-se observaram altas taxas de exposição de calreticulinas, HSP70 e HSP 90 em células cancerosas sendo esta exposição detectada poucas horas após as células serem submetidas à TFD⁵². Em um estudo recente realizado por Tanaka et al. (2016), foi demonstrado que o tratamento com TFD mediado pelo FS G-Chlorin induziu morte celular imunogênica *in vivo*, onde eles verificaram que essa imunogenicidade foi devida à exposição de calreticulina e liberação de HMGB1⁵³. Garg et al. (2016) ressaltam ainda que as liberações dessas proteínas foram fundamentais na resposta à imunização de camundongos da espécie Balb-C. Neste estudo foram utilizadas células da linhagem CT26 submetidas à TFD mediada por Hipericina. HSPs também estão relacionadas na ativação da liberação de IL-1 β , potente mediador inflamatório.⁴¹

A interleucina-1 beta (IL-1 β) pertencem a uma classe de citocinas pró-inflamatórias. Muitos estudos têm relacionado a liberação de IL-1 β com a emissão de DAMP o que acarreta em uma amplificação dos efeitos associados à imunidade, sobremaneira em resposta inata e adaptativa a danos em células alvo⁵⁴. Sua produção é dose dependente da emissão de DAMP. IL-1 β liberada funciona como moduladora da atividade imunitária em células leucocitárias, desta forma promovendo a liberação de outros moduladores inflamatórios como citocinas e quimiocinas (TNF- α , MIP-2, NF-kB além de outras interleucinas – IL-1, IL-6, IL-12 e IL-23) importantes na ativação de resposta imuno adaptativa^{40,55 e 56}.

A proteína HMGB1 é um dos principais DAMPs relacionados à MCI, no entanto, sua liberação e ação na ativação de células do sistema imunitário ocorrerá muito tempo depois de ser desencadeada a morte por apoptose em células submetidas a algum tipo de estresse⁵⁶⁻⁵⁸. Antes de ser liberada por algum processo que desencadeia a MCI, a proteína HMGB1 desempenha funções específicas dentro do núcleo de células eucariotas. HMGB1 funciona como uma chaperona auxiliando na conformação da estrutura e dinâmica dos nucleossomos, no aumento da afinidade de transcrição gênica (ex.: p53, p73, NF-kB e em receptores de estrogênio), auxilia também no reparo de danos às moléculas de DNA, na recombinação gênica e na homeostase da telomerase⁵⁶. No entanto, HMGB1 liberado por células que desencadeiam um MCI é extremamente seletivo na ativação da resposta imunitária^{58 e 59}. HMGB1 tem função de alarme, atraindo e consequentemente maturando células dendríticas e macrófagos que, por sua vez, ativam células T^{19,40 e 56}.

Diante do exposto, a nanobiotecnologia tem mostrado um grande potencial para melhorar o tratamento e o diagnóstico de diversas doenças, dentre elas o câncer. E das diversas aplicações biomédicas utilizando os nanomateriais destaca-se o seu uso como sistemas carreadores de fármaco e, também, o uso destes carreadores de FS como mediador da TFD. Sendo assim, o desenvolvimento de pesquisas relacionadas a nanobiotecnologia no tratamento de doenças oncológicas, em especial, do câncer de mama, vem crescendo nos últimos anos e apresentando resultados promissores. Desta forma, o FS cloreto de alumínio-ftalocianina é apresentado como uma alternativa para a aplicação como mediador da TFD no tratamento de células de câncer de mama com estudos *in vitro* e *in vivo*. Além disso, outro diferencial deste trabalho é avaliação da resposta imunitária desencadeada pela TFD com emissão de padrões moleculares a dano, fator-chave para morte celular imunogênica.

2 Objetivo Geral

O objetivo principal deste estudo é investigar por meio de diferentes protocolos de Terapia Fotodinâmica mediada por cloreto de alumínio-ftalocianina associado à nanoemulsões (TFD-NE-AIFtCl) como indutor da liberação de padrões moleculares associados a dano (DAMP) e consequentemente ativação de uma morte celular imunogênica (MCI) em células de carcinoma mamário murino (4T1), bem como investigar a ação de resposta antitumoral em animais da espécie Balb-c por meio de vacinação com células 4T1 pré-tratadas.

2.1 – *Objetivos Específicos*

2.1.1 *NE-AIFtCl: obtenção, caracterização e estabilidade*

- Preparar um novo lote da nanoformulação contendo FS cloreto de alumínio-ftalocianina (AIFtCl) e avaliar a caracterização para as propriedades coloidais como: diâmetro hidrodinâmico (DH), índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta (Zp). Avaliar também as propriedades fotofísicas (absorção e emissão de fluorescência) e físicoquímicas (produção de ERO) do AIFtCl incorporado pelas nanoemulsões (NE-AIFtCl) em meios aquosos.

2.1.2 *Investigação in vitro da TFD-NE-AIFtCl em células de carcinoma mamário murino (4T1)*

- Investigar o perfil de incorporação intracelular do FS AIFtCl e identificar a colocalização subcelular para as organelas lisossomos, RE, mitocôndrias e núcleo;
- Verificar também por qual(is) via(s) de endocitose ocorre a internalização de NE-AIFtCl;

- Avaliação do efeito citotóxico da TFD-NE-AIFtCl, sob diferentes concentrações e tempos de exposição: obtenção das concentrações que ocasionaram 50% e 90% de morte das células, CC50 e CC90, respectivamente;
- Avaliação do efeito citotóxico da TFD-NE-AIFtCl CC50, sob diferentes doses de energia luminosa;
- Detecção da geração de espécies reativas no meio intracelular durante a TFD-NE-AIFtCl;
- Análise do tipo de morte ocasionado pela TFD-NE-AIFtCl,
- Estudo do potencial de indução de morte celular imunogênica (MCI) com análise da presença de DAMPs: Calreticulina, HSP70, HSP90, IL-1 β e HMGB1;

2.1.3 Investigação in vivo da TFD-NE-AIFtCl em camundongos fêmeas da espécie Balb-c e avaliação de resposta antitumoral por meio de ensaio de vacinação

- Investigação do efeito da TFD-NE-AIFtCl em animais com tumor 4T1 implantado no flanco esquerdo. Monitoramento do volume tumoral e avaliação de metástases no pulmão por microtomografia.
- Ensaio de vacinação em animais Balb-c com células 4T1 pré-tratadas por diferentes protocolos da TFD-NE-AIFtCl: avaliar o perfil de imunização nos animais após as vacinas e submissão do teste com inóculo de células 4T1 viáveis. Monitoramento da resistência do surgimento do tumor, bem como avaliar o volume tumoral e a sobrevida dos animais.

3 Métodos

A lista de equipamentos, materiais e reagentes utilizados neste estudo estão descritos nas **Tabelas 1, 2 e 3**.

Tabela 1: Equipamentos utilizados para realização dos experimentos.

Equipamentos	Modelo	Fabricante
Agitador Magnético	Q221M	Quimis, BRA
Autoclave	Vitae 12	Cristófoli, BRA
Balança analítica	AA200	Denver Instrument, USA
Banho Maria	240-2	J. Prolab, BRA
Banho ultra sônico	T-14	Thornton, BRA
Centrifuga de Bancada	Excelsa baby	Fanem, BRA
Centrifuga com rotot de placas	Universal 320R	LtettichZentrifugen, ALE
Citômetro	FACSVerse	BD, USA
Espectrofotômetro	Spectramax M2	Molecular devices, USA
Estufa	TLZ 10	DeLeo, BRA
Fluxo Laminar	CFLV 12	Veco, BRA
Incubadora de CO ₂	3425	Thermo S. Inc., USA
LED	XL001WP01NRC600	Shenzhen S. O. Co., CHI
Microscópio EVOS	FL	Thermo S. Inc., USA
Microscópio de luz invertido	Ck 2	Olympus, JPN
Microscópio Confocal	SP5	Leica, BRA
Refrigerador	DC39	Eletrolux, BRA
Zetasizer	ZS90	Malven/Reino Unido

Tabela 2: Materiais utilizados para realização dos experimentos.

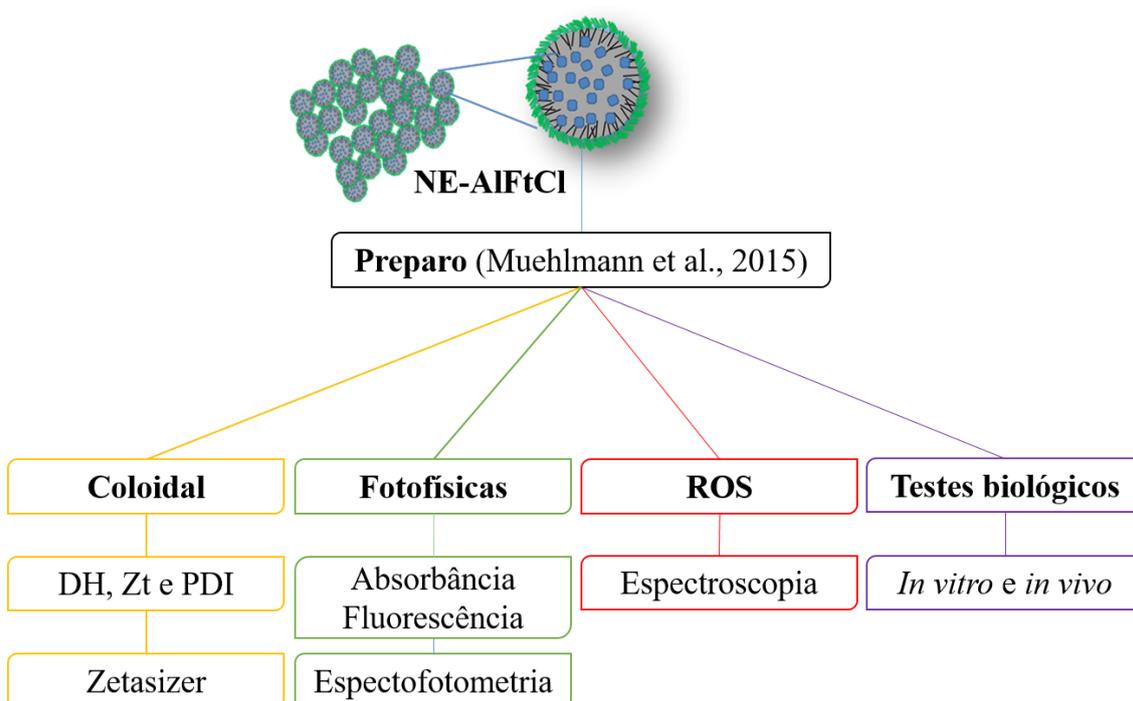
Materiais	Fabricante
Microtubos	TPP, CHE
Filtro para seringa (0,22 μ m)	TPP, CHE
Frascos de cultura (25 cm ³ e 75 cm ³)	TPP, CHE
Hemocitômetro de Neubauer	C. A. Hausser e Son, USA
Lâminas para microscopia	Bioslide
Lamínulas para microscopia	Ecaxta Perfecta, BRA
Lamínulas redondas	Glasscyto
Micropipetas	Gilson, Inc., USA
Micropipeta Multicanal	Gilson, Inc., USA
Microplacas (12 e 96 poços)	TPP, CHE
Ponteiras para micropipetas	Axygen, USA
Seringas	AdvantivE, NLD

Tabela 3: Reagentes utilizados para realização dos experimentos.

Reagentes	Fabricante
1,4-difenil-isobenzofurano (DBF)	Sigma-Aldrich Co., USA
4',6-diamidino-e-fenilindol (DAPI)	Sigma-Aldrich Co., USA
Amilorida	Sigma-Aldrich Co., USA
Antibiótico (penicilina e Estreptomicina)	Gibco, USA
Azída sódica	Sigma-Aldrich Co., USA
Azul de Trypan	Sigma-Aldrich Co., USA
Bicarbonato de Sódio	Sigma-Aldrich Co., USA
Clorofórmio PA	Sigma-Aldrich Co., USA
Citocalasina	Sigma-Aldrich Co., USA
DMSO	M. Chemiclas, USA
Etanol 98 GL	Sigma-Aldrich Co., USA
ER-Tracker	Life, USA
Filipina	Sigma-Aldrich Co., USA
HMGB1	ABCAM, USA
HSP70/90	ABCAM, USA
IgG 488	ABCAM, USA
IL-1 β	Life, USA
Lyso-Tracker	Life, USA
Kolliphor ELP	Sigma-Aldrich Co., USA
MTT	Invitrogen, USA
MitoTracker	Life, USA
Nistatina	Sigma-Aldrich Co., USA
Óxido de fenilarsina	Sigma-Aldrich Co., USA
PBS	Laborclin, BRA
RPMI	Gibco, USA
Tripsina-EDTA	Gibco, USA

3.1 Preparo e caracterização da NE-AIFtCl

No **Fluxograma 1**, estão representados os processos aplicados com a utilização da NE-AIFtCl após a obtenção de um novo lote como descrito em Muehlmann et al. (2015)¹⁶. Após a obtenção da NE-AIFtCl foram realizados testes coloidais para caracterização e estabilidade; testes fotofísicos e físicoquímicos além da aplicação da NE-AIFtCl como mediadora da TFD em testes *in vitro* e *in vivo*.



Fluxograma 1: Preparo e etapas de caracterização e aplicação da NE-AIFtCl – cloreto de alumínio-ftalocianina associado a nanoemulsões. Em amarelo: Caracterização coloidal: DH – diâmetro hidrodinâmica; Zt – potencial zeta; e PDI – índice de polidispersão. Em Verde: Caracterização fotofísica: absorvância e fluorescência. Em vermelho: Avaliação na produção de ROS – espécies reativas de oxigênio. Em Roxo: Testes biológicos: *in vitro* nas linhagens de carcinoma mamário murino – 4T1 e fibroblastos murino – NIH 3T3; *in vivo* camundongos da linhagem Balb-C.

3.1.1 Preparo da nanoemulsão incorporada ao cloreto de alumínio-ftalocianina (NE-AIFtCl)

As nanoemulsões com cloreto de alumínio-ftalocianina (NE-AIFtCl) utilizadas neste estudo foram preparadas pelo método de nanoemulsificação espontânea

descrito por Muehlmann et al. (2015)¹⁶. Para tanto, no preparo da nanoformulação contendo o FS AlFtCl foi utilizado o Kolliphor[®] EPL (surfactante) como tensoativo e óleo de rícino como solubilizante do FS, na proporção de 3:1, respectivamente (**Figura 12**).

O esquema de preparo da nanoformulação NE-AlFtCl foi dividido nas seguintes etapas representadas na **Figura 12**, onde: **A**) disposição em um béquer do Kolliphor[®] (9 g) e o óleo de rícino (3 g). Em seguida o béquer contendo os excipientes tensoativo e óleo foi colocado sob agitação (300 RPM) com temperatura de 50 °C por 10 minutos – até formar uma mistura homogênea. **B**) Após homogeneização dos excipientes adicionou-se o FS AlFtCl (0,0023 g) solubilizado em 4 mL de etanol, sendo mantido os parâmetros de agitação e temperatura por mais 30 minutos. Esse processo foi mantido por esse tempo para que ocorresse toda a evaporação do solvente. **C**) Após a evaporação do solvente, foram adicionados 10 mL de água destilada. Com a adição da água ocorreu a nanoemulsificação, ou seja, a formação das nanotículas de óleo em água, sendo estabilizada pelo tensoativo e ficando o FS retido dentro da fase oleosa. **D**) Representação das nanoemulsões incorporadas ao FS cloreto de alumínio-ftalocianina (NE-AlFtCl). A concentração final de FS AlFtCl foi de 40 µM.

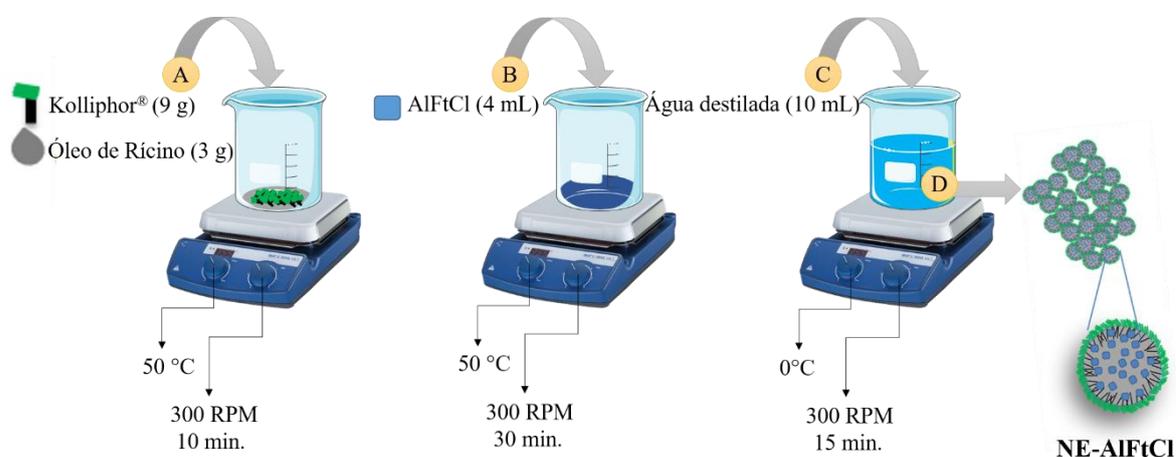


Figura 12: Etapas do preparo da nanoemulsão incorporada ao cloreto de alumínio-ftalocianina (NE-AlFtCl). Esta figura foi uma adaptação de Rodrigues 2015. **A**) adição dos excipientes: Kolliphor[®] e óleo de rícino; **B**) adição do FS AlFtCl. **C**) adição de água destilada. **D**) NE-AlFtCl pronta na concentração de 40 µM referente ao AlFtCl.

3.1.1 Caracterização e Estabilidade da NE-AIFtCl

3.1.1.1 Propriedades Coloidais das NE-AIFtCl

As variáveis físicas como o diâmetro hidrodinâmico (DH), índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta (Zt) da nanoformulação (NE-AIFtCl) foram verificadas logo após o preparo. Para tanto, neste experimento foram utilizados 20 µL de NE-AIFtCl diluídos em 980 µL de PBS. O diluído foi posto em cubetas e analisado. As análises foram feitas utilizando o equipamento Zetasizer (Zetasizer, ZS90, Malvern), pelo método de dispersão dinâmica de luz (DLS). Esse teste foi realizado uma vez por ano durante o tempo de quatro anos.

3.1.1.2 Propriedades fotofísicas das NE-AIFtCl

Para análise fotofísica do AIFtCl associado à NE foram utilizadas a mesma diluição descrita na **seção 3.1.2.1**. Para tanto, as avaliações espectrais de absorção e emissão de fluorescência foram analisadas utilizando o equipamento Espectrofotômetro. Para essa análise foram ajustados os parâmetros de leitura como descritos na **Tabela 4**. Esse teste foi realizado uma vez por ano durante o tempo de quatro anos.

Tabela 4: Comprimentos de ondas ajustados para acessar os picos de absorção e emissão fluorescência do FS associado à nanoformulação (NE-AIFtCl).

	Faixas espectrais
Absorbância (nm)	$\lambda = \text{Em. } 400\text{-}800$
Fluorescência (nm)	$\lambda = \text{Ex. } 350; \text{Em. } 400\text{-}750$

NE-AIFtCl: nanoemulsão contendo cloreto de alumínio-ftalocianina. nm: nanômetro. Em: emissão. Ex: excitação. λ significa comprimento de onda.

Outro teste fotofísico realizado foi a avaliação da excitação em relação à emissão de fluorescência do FS AIFtCl associado à NE. Desta forma, a NE-AIFtCl foi

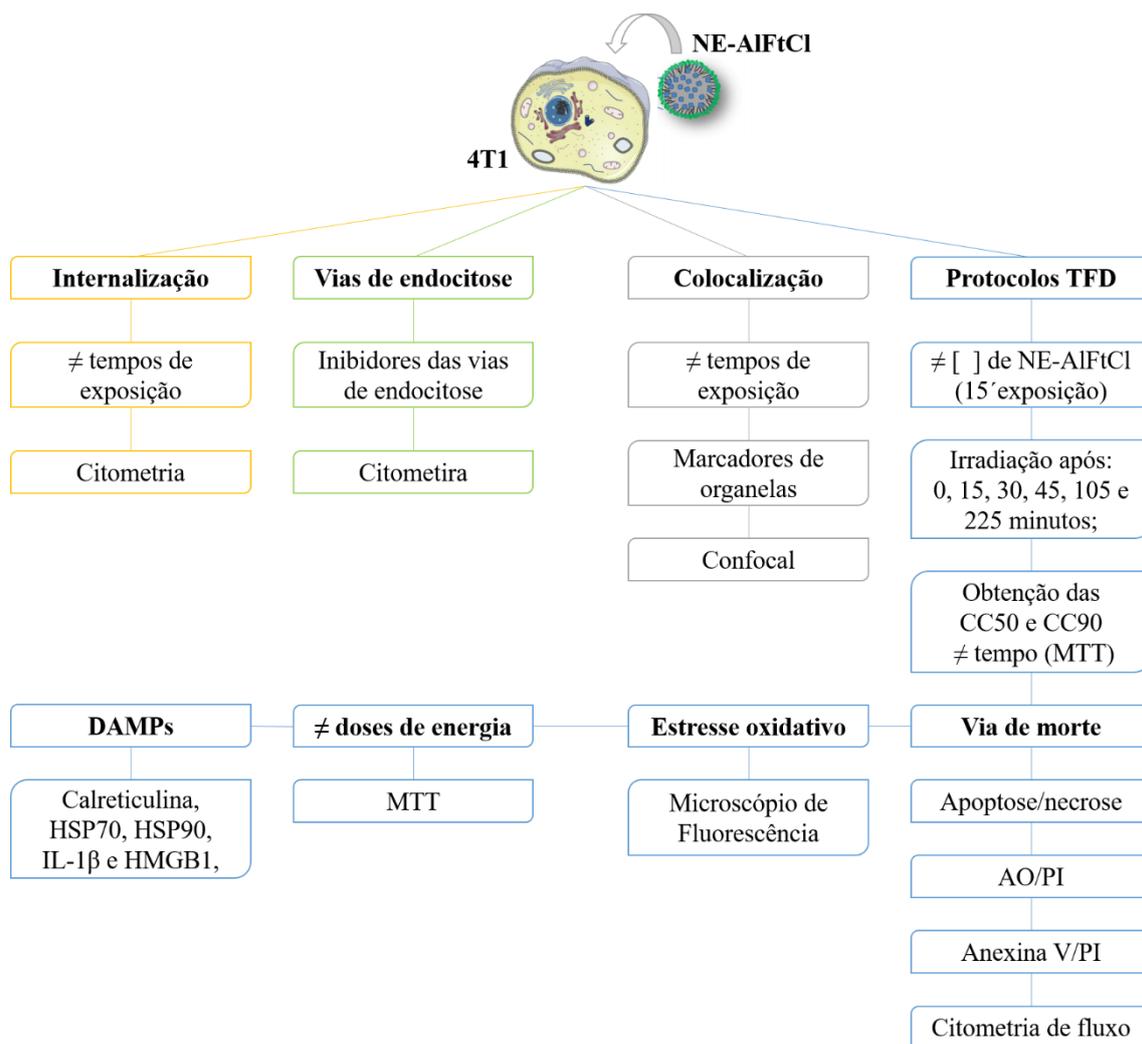
diluída na concentração de 1 μM referente ao AlFtCl e colocada em uma placa de 96 poços, em seguida excitada em 300 nm sendo quantificada a emissão em 600 nm. Esse processo foi repetido, sendo que a excitação foi ajustada com intervalos 50 nm e a emissão de fluorescência foi ajustada a cada 10 nm. Para esse experimento foi utilizado o equipamento Espectrofotômetro.

3.1.1.3 Propriedades físico-química da NE-AlFtCl

O teste de avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) pela NE-AlFtCl foi realizado de acordo com método descrito por Rodrigues et al. 2015. Brevemente, 100 μL de NE-AlFtCl (0,5 μM) foram colocados em poços de uma microplaca de 96 poços e imediatamente lida a absorção (414 nm) com auxílio de um espectrofotômetro com leitora de placas – valor de absorbância. Em seguida, adicionou-se 10 μL da solução do reagente 1,3-difenil-isobenzofurano (DBF) às nanoformulações de cada poço e feito uma nova leitura – valores de absorbância referentes à produção de EROs⁶⁰. As NE-AlFtCl com DBF foram então irradiadas a cada 15 segundos e foi a leitura da placa para absorbância em 414 nm. Esse procedimento se repetiu até que houvesse a estabilização da absorbância das amostras.

3.2 Experimentos biológicos *in vitro*: carcinoma mamário murino (4T1)³

Os experimentos *in vitro* foram realizados utilizando a linhagem de carcinoma mamário murino – 4T1. Para tanto, todos os testes realizados com 4T1 estão representados no **Fluxograma 2**.



Fluxograma 2: Etapas de desenvolvimento do estudo *in vitro* utilizando células 4T1 submetidas a diferentes protocolos da TFD-NE-AIFtCl. Siglas: NE-AIFtCl - cloreto de alumínio-ftalocianina associado a nanoemulsões; ≠ - diferente; [] - concentrações; 15' - 15 minutos; CC - concentração citotóxica; MTT - brometo de 3 (4,5 dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil-tetrazólio; IL-1β - Interleucina 1 beta; *High-Mobility Group Box 1*; *Heat Shock Protein*. AO - alaranjado de acridina; PI - iodeto de propídeo.

3.2.1 Manutenção da linhagem celular

A linhagem celular utilizada neste estudo foi preservada em criotubo contendo 5% de DMSO e 95% de soro fetal bovino (SFB), sendo devidamente identificada e armazenada em tanque de nitrogênio líquido. Alíquotas dessas suspensões celulares na concentração de 2×10^6 células/mL foram retiradas do tanque de nitrogênio líquido e descongeladas a 37 °C. Em fluxo laminar (esterilizado - álcool 70% e luz UV por 15 minutos), a alíquota foi transferida para tubo de centrifugação de 15 mL, adicionando-se mais 1 mL de meio (RPMI 1610) e, em seguida, foi centrifugada a 750 G

por três minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensão em 1 mL de meio de cultura fresco, que, por sua vez, foi transferido para garrafas de cultivo celular de 25 cm³, identificadas e mantidas em incubadora a 37 °C e atmosfera 5% CO₂ e 80% de umidade. O meio de cultura utilizado foi RPMI 1610, tamponado com bicarbonato de sódio, pH 7,2 e suplementado com 10% (v/v) SFB, penicilina 100 UI/mL e estreptomicina 100 µg/mL. O cultivo foi mantido em incubadora a 37 °C e atmosfera 5% CO₂ e 80% de umidade e, quando necessário, o meio de cultivo foi trocado.

3.2.1.1 Estabelecimento de subculturas celulares

O estabelecimento de subculturas foi feito a partir da remoção da monocamada das células confluentes das garrafas de 25 cm³ para cultivo inicial e transferência de menor densidade para uma nova garrafa de 75 cm³. Quando as células atingiam uma confluência de aproximadamente 80%, foram desassociadas enzimaticamente com 4 mL do reagente Tripsina-EDTA 0,25%, deixadas em incubadora por três minutos – processo de determinação das passagens das células. Após o desprendimento das células, foram adicionados 4 mL de meio de cultura para neutralizar a tripsina e, em seguida, o conteúdo da garrafa foi transferido para um tubo de centrifugação de 15 mL e centrifugado a 750 g por três minutos. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas com 1 mL de meio de cultura. Para determinação da quantidade de células viáveis, 10 µL da suspensão foram adicionados a 90 µL de azul de tripan (0,4% em PBS) – este corante não é capaz de penetrar em células que apresentam a membrana plasmática intacta. Do preparado contendo o corante, 10 µL foram retirados e aplicados em hemocitômetro de *Neubauer*. A concentração de células foi determinada baseando-se em seus quadrantes laterais e de acordo com a equação abaixo:

$$\frac{\text{n}^\circ \text{ de células contadas}}{\text{n}^\circ \text{ de quadrantes}} \times \text{fator de diluição} \times 10^4 \text{ células/mL}$$

Após a contagem celular, 20% da suspensão foi repassada para uma nova garrafa. O meio de cultivo foi trocado a cada 72 horas, aproximadamente. Para a realização dos experimentos, após a quantificação, as células foram transferidas para microplacas de cultura de acordo com o experimento a ser realizado. Quando utilizadas as microplacas de 12 poços, foi utilizada a concentração de 5×10^5 células por poço, já nas microplacas de 96 poços a concentração utilizada era de 1×10^4 células por poço.

3.2.1.2 Determinação da viabilidade celular pelo método MTT

Todos os testes de viabilidade celular foram feitos utilizando o método de avaliação colorimétrica de brometo de 3 (4,5 dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT), descrita por Mosmann (1983)⁶¹. Após os tratamentos propostos, as células foram expostas à solução de MTT em meio de cultivo. Essa solução em células viáveis interage com as desidrogenases mitocondriais como a succinil desidrogenase, promovendo a redução do reagente MTT a um composto denominado formazan, caracterizado pela coloração púrpura e pela insolubilidade em meios hidrofílicos. A viabilidade celular é indicada pela quantificação da produção de cristais de formazan de acordo com a presença de desidrogenases ativas. Após os tratamentos nos tempos estabelecidos, o meio de cultura foi substituído por um novo meio contendo MTT a 10%. O preparado era incubado a 37 °C e atmosfera de 5% CO₂ e 80% de umidade. A solução contendo MTT foi removida após duas horas e 200 µL de DMSO foram adicionados para a solubilização do formazan. A partir da medida do espectro de absorbância com comprimento de onda de 595 nm, obtido em espectrofotômetro conjugado à leitora de microplacas, a produção de formazan foi quantificada e, portanto, determinada a viabilidade celular.

3.2.2 Visualização da incorporação intracelular de NE-AIFtCl nas células 4T1 por citometria de fluxo

Para visualização da internalização da NE-AIFtCl, pelas células 4T1 foi padronizada uma concentração de 1 µM. A realização deste teste foi de acordo com as etapas representadas pelas letras na **Figura 13**, sendo: **A)** Plaqueamento das células 4T1

em microplaca de 12 poços como descrito na **seção 3.2.1.1. B)** Após 24 horas de crescimento em incubadora, o meio das células foi removido e adicionou-se 1 mL de NE-AIFtCl na concentração de 1 μ M por 15 minutos na incubadora. **C)** Findo o tempo de incubação o meio contendo NE-AIFtCl foi descartado e as células lavadas com PBS gelado por 2 vezes (PBS 2X) e adicionou meio RPMI fresco. Para análise da presença do AIFtCl foram escolhidos os tempos de 0; 15; 30; 45; 105 e 240 minutos após os 15 minutos de exposição das células a NE-AIFtCl, denominados de T0, T15, T30, T45, T105 e T225, respectivamente. **D)** Ao fim de cada tempo determinado foi realizada a remoção das células utilizando tripsina EDTA. **E)** As células, junto com o sobrenadante, foram dispostas em criotubos devidamente identificados e centrifugados para remoção da tripsina e lavadas com PBS 2X. **F)** Após a centrifugação foi feito o descarte do sobrenadante e as células foram analisadas no citometro de fluxo (633 nm). **G)** Os resultados foram tratados pelo programa FlowJO e plotados utilizando GraphPrisms7.

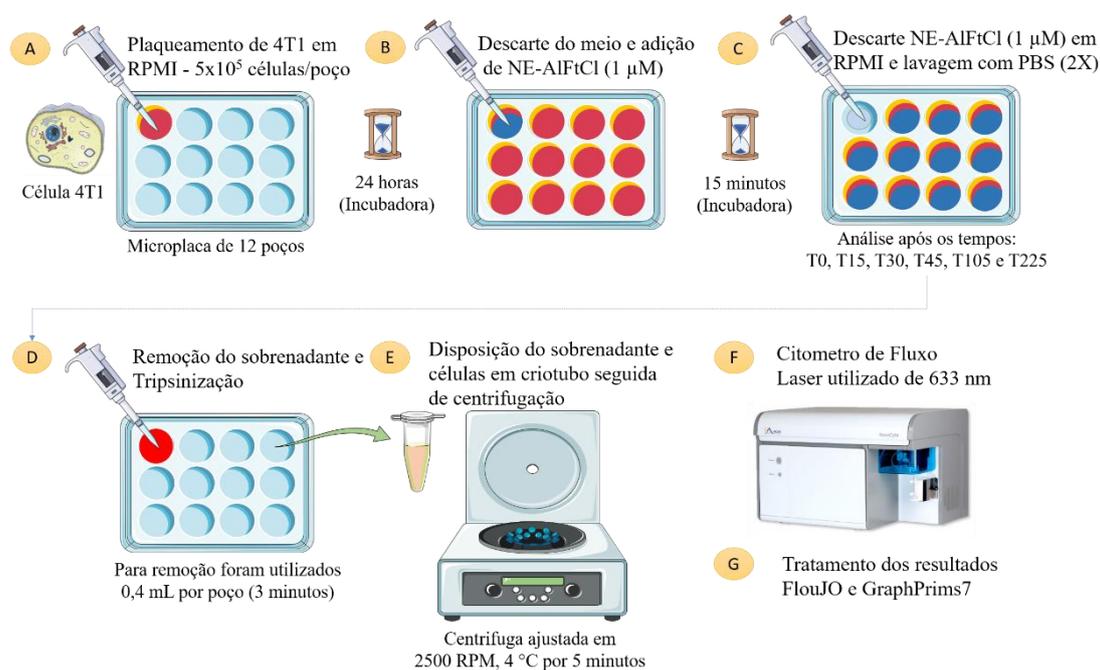


Figura 13: Teste de internalização da NE-AIFtCl pelas células 4T1 pelo método de citometro de fluxo.

3.2.3 Avaliação das vias de endocitose

A verificação da via ou vias de endocitose utilizadas pelas células 4T1 para interiorizar a NE-AIFtCl foi feita de acordo com um protocolo descrito na literatura (Zeng, et al. 2012)⁶². A realização deste teste foi de acordo com as etapas representadas pelas letras na **Figura 14**, sendo: **A)** Plaqueamento das células 4T1 em microplaca de 12 poços como descrito na **seção 3.2.1.1**. **B)** Após 24 horas de crescimento em incubadora, o meio das células foi removido e adicionou-se os inibidores de endocitose por 30 minutos: azida sódica (100 mM); filipina (1 µg/mL); nistatina (20 µg/mL); óxido de fenilarsina (0,2 µM); citocalasina D (1 µM); amilorida (0,2 mM); e mantidas em 4 °C. Células não expostas aos inibidores ou a 4 °C. **C)** Findo o tempo de incubação, o meio contendo NE-AIFtCl foi descartado e as células lavadas com PBS 2X seguida da adição de meio RPMI fresco. Para análise da presença por qual (is) via (s) ocorreu a endocitose de AIFtCl. **D)** As células foram a removidas das placas utilizando tripsina EDTA e postas em criotubos devidamente identificados. **E)** Os criotubos foram centrifugados para remoção da tripsina e lavadas com PBS gelado. **F)** Após a centrifugação foi feito o descarte do sobrenadante e as células foram analisadas no citômetro de fluxo (633 nm). **G)** Os resultados foram tratados pelo programa FlowJO e plotados utilizando GraphPrisms7.

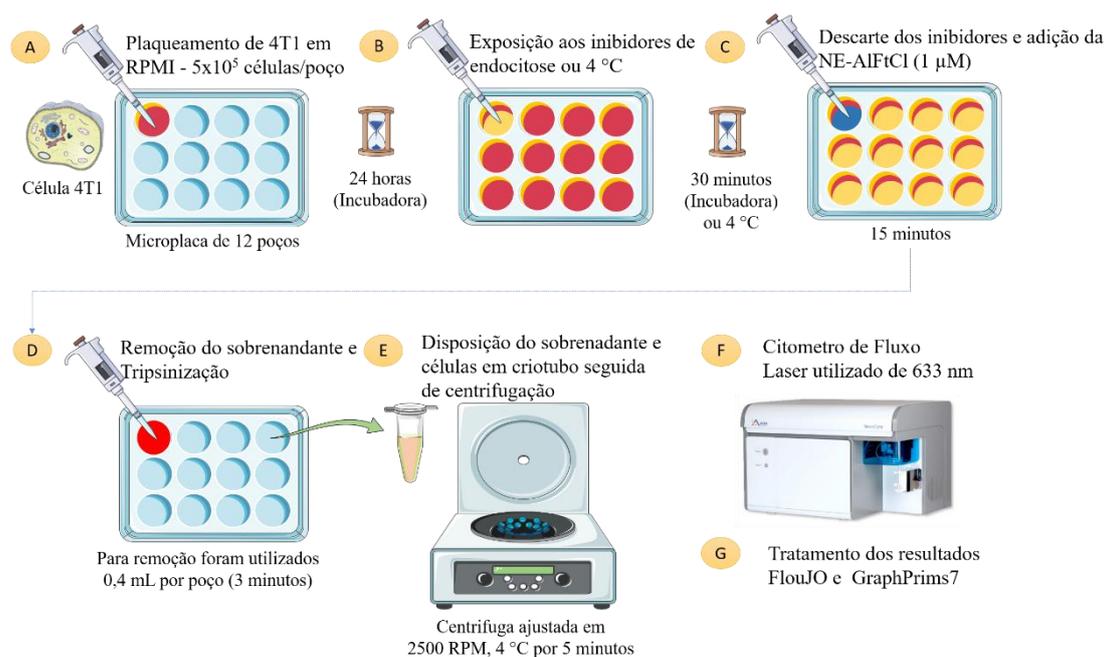


Figura 14: Teste para verificação da via pela qual a NE-AIFtCl foi incorporada pelas células 4T1.

3.2.4 Visualização da incorporação intracelular de NE-AIFtCl e análise de sua colocalização com organelas de células 4T1

Para visualização da internalização da NE-AIFtCl, pelas células 4T1 foi padronizada uma concentração de 1 μM . A realização deste teste se deu de acordo com as etapas representadas pelas letras na **Figura 15**, sendo. **A)** Plaqueamento das células 4T1 em microplaca de 12 poços contendo uma lamínula de 0,22 mm por poço como descrito na **seção 3.2.1.1**. **B)** Após 24 horas de crescimento em incubadora, o meio das células foi removido e adicionou-se 1 mL de NE-AIFtCl na concentração de 1 μM por 15 minutos na incubadora. **C)** Findo o tempo de incubação o meio contendo NE-AIFtCl foi descartado e as células lavadas com PBS gelado por 2 vezes (PBS 2X) e adicionou-se meio RPMI fresco. Para análise da presença do AIFtCl foram escolhidos os tempos de 0; 15; 30; 45; 105 e 240 minutos (T0, T15, T30, T45, T105 e T225, respectivamente) após os 15 minutos de exposição das células à NE-AIFtCl. **D)** Ao final de cada tempo, as células foram marcadas para lisossomos, retículo endoplasmático, mitocôndria – exposição de 30 minutos e núcleo exposição de 5 minutos – e, em seguida analisadas quanto à presença do AIFtCl e sua localização intracelular. **E)** Após a exposição aos marcadores, a lamínula foi removida com auxílio de uma pinça e colocada em uma lâmina. **F)** Seguida da montagem das lâminas foi feita a identificação de colocalização

pela técnica de microscopia confocal. O microscópio Confocal foi ajustado quanto às faixas espectrais utilizadas descritas na **Tabela 5. G**). As imagens obtidas foram tratadas utilizando os programas PhotoShop CC2015, ImageJ e a concentração do FS AIFtCl presente em cada subunidade celular tratada pelo GraphPrisms7.

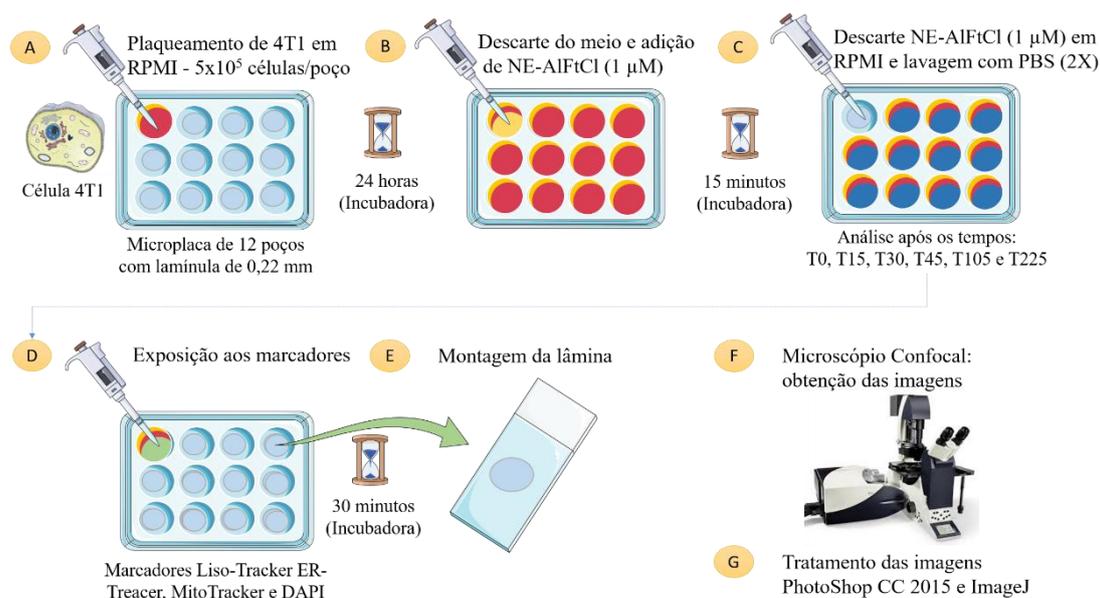


Figura 15: Teste de colocalização subcelular (núcleo, lisossomos, mitocôndria e retículo endoplasmático) do AIFtCl pelas células 4T1 utilizando a técnica microscopia confocal.

Tabela 5: Faixas espectrais ajustadas para detecção das fluorescências dos marcadores subcelulares e do FS AIFtCl.

	Faixas espectrais		
	Emissão (nm)	Excitação (nm)	Laser de Diodo (nm)
DAPI	358	461	
ER-Tracker[®]	374	430	405/violeta
LysoTracker[®]	373	422	
ER-Tracker[®]	390	516	514/amarelo
AIFtCl	600	700	633/vermelho

nm

nanômetros; AIFtCl – Cloreto de alumínio-ftalocianina

3.2.4.1 Obtenção e análise das imagens pelo programa ImageJ

As imagens foram obtidas em alta resolução utilizando microscópio confocal de varredura a laser ajustado com objetiva HCX PL APO 63x/1.40-0.60 CS-BL (imersão a óleo), resolução 1024x1024 pixels e com frequência de 100 Hz. Todas as imagens foram obtidas em TIFF (Tagged Image File Format). Após a obtenção das imagens, foi utilizado o programa Adobe Photoshop CC 2015 para ajuste da opacidade e montagem da colocalização (merge). As análises das imagens foram feitas utilizando o programa ImageJ (NIH, USA).

Para verificar se o AIFtCl se colocalizava com as organelas, foi utilizado o programa de processamento de imagens ImageJ. Primeiramente, foram feitas as divisões dos canais: canal vermelho (AIFtCl), canal verde (MitoTracker®) e canal azul (ER-Tracker®, LysoTracker® e DAPI). Em seguida, as imagens foram colocadas na escala de cinza – pluginImage, Type 8-bit –, já que a escala de cinza facilita a análise da localização da marcação e contagem dos pixels através do histograma da imagem (escala de 0-255). O próximo passo foi analisar a intensidade de correlação das imagens – plugin Colocalisation, Intensity Correlation Analysis.

Essa análise permite a verificação do valor total de pixels colocalizados nas duas imagens analisadas. A intensidade de colocalização foi obtida através da porcentagem de pixels positivos (Ne+ve). Os valores dos pixels são representados pelo Produto das Diferenças da Média (PDM), ou seja, o $PDM = (\text{intensidade do vermelho} - \text{intensidade média vermelho}) \times (\text{intensidade do verde/azul} - \text{intensidade média verde/azul})$.

Também foram feitas as avaliações da colocalização utilizando o Coeficiente de Correlação de Pearson's (Rr) e o Coeficiente de Sobreposição Mander's (R)⁶³, como descrito em Manders, et al. (2009)⁶⁴. O coeficiente de Pearson's (Rr) é referente à correlação da distribuição de intensidades entre dois canais fluorescentes, sendo que essa correlação pode ser analisada pela variação de -1 a +1, ou seja: valores negativos indicam que não há correlação entre as duas imagens; valores 0 e próximos a 0 indicam baixa correlação; e valores próximos a 1 indicam que houve correlação (0,9 – 1: correlação muito forte; 0,7-0,9: correlação forte; 0,5-0,7: correlação moderada; 0,3-0,5: correlação fraca; 0,0-0,3: desprezível). O coeficiente de Mander's (R) é referente à sobreposição de

dois canais fluorescentes normalizando as diferenças de intensidade entre eles, sendo que essa correlação varia de 0 a 1, onde valores próximos a 0 referenciam baixa colocalização e valores próximos a 1, alta colocalização.

3.2.5 TFD-NE-AIFtCl in vitro

3.2.5.1 Efeito da TFD-NE-AIFtCl sob diferentes concentrações do AIFtCl: obtenção das CC50 e CC90

Este teste foi realizado de modo a avaliar a eficácia da TFD-NE-AIFtCl e obter a concentração citotóxica que ocasiona 50% e 90 % de morte (CC50 e CC90), como descrito em Rodrigues (2014). Por tanto, a realização deste teste foi de acordo com as etapas representadas pelas letras na **Figura 16**, sendo: **A)** Plaqueamento das células 4T1 em microplaca de 96 poços como descrito na **seção 3.2.1.1**. **B)** Após 24 horas de crescimento das células em incubadora, foi descartado e as células foram expostas a diferentes concentrações NE-AIFtCl (0-1 μ M) por 15 minutos. Findo o tempo de exposição aguardou-se os tempos de 0; 15; 30; 45; 105 e 240 minutos (T0, T15, T30, T45, T105 e T225, respectivamente). **D)** Após o final de cada tempo escolhido, as células foram irradiadas com LED 660 nm por 10 minutos chegando a uma densidade de energia de 25 J/cm². Finalizada a exposição das células ao LED, as microplacas foram colocadas na incubadora e aguardou-se o tempo de 24 horas. Findo do tempo, foi realizado o teste colorimétrico MTT, descrito na **seção 3.2.1.2**, brevemente representado nas letras **E**, **F** e **G**. **E)** o meio foi descartado e adicionou-se solução de MTT. **F)** Descarte da solução contendo MTT e adição de DMSO. **G)** As placas foram lidas utilizando-se uma leitora de placas ajustada à absorvância em 595 nm. Por fim, **H)** Os resultados obtidos foram tratados utilizando os programas Excel e GraphPrisms7.

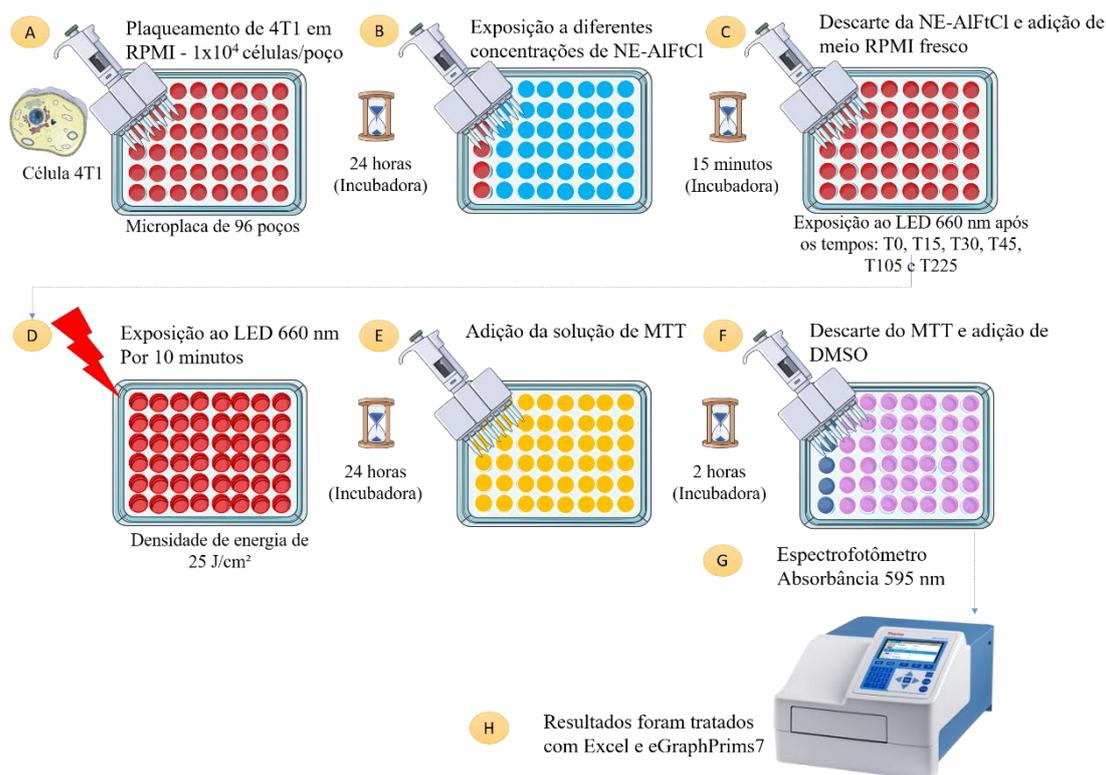


Figura 16: Avaliação do efeito da TFD-NE-AIFtCl (0-1 μ M) na viabilidade celular de 4T1. Obtenção das concentrações citotóxicas que causaram morte de 50% e 90% das células (CC50 e CC90) nos diferentes tempos: T0, T15, T30 T45, T105 e T225.

3.2.5.2 Efeito da TFD-NE-AIFtCl sob diferentes densidades de energia utilizando as CC50 de cada tempo da seção 3.2.5.1

Este teste foi realizado de modo a avaliar se diferentes doses de energia ocasiona diferenças na viabilidade das células submetidas à TFD-NE-AIFtCl. A realização deste teste foi de acordo com as etapas representadas pelas letras na **Figura 17**, sendo: **A)** Plaqueamento das células 4T1 em microplaca de 96 poços como descrito na **seção 3.2.1.1**. **B)** Após 24 horas de crescimento das células em incubadora, foi descartado o sobrenadante e as células foram expostas por 15 minutos as diferentes concentrações CC50 NE-AIFtCl encontradas na **seção 3.2.6.1** (T0, T15, T30, T45, T105 e T225). **C)** as células foram lavadas com PBS 2X e meio novo foi adicionado. Fim do tempo de exposição aguardou-se os tempos de T0, T15, T30, T45, T105 e T225. **D)** Após o final de cada tempo escolhido, as células foram irradiadas com LED 660 nm. As diferentes densidades de energia foram acessadas de acordo com o tempo de exposição das células 4T1 ao LED, sendo encontradas as diferentes doses de energia quando

irradiados por: 1 (2,54 J/cm²), 5 (13,98 J/cm²), 10 (25,88 J/cm²), 15 (38,77 J/cm²), 20 (52,12 J/cm²) e 25 minutos (67,56 J/cm²). Finalizada a exposição das células ao LED, as microplacas foram colocadas na incubadora e aguardou-se o tempo de 24 horas. Findo do tempo, foi realizado o teste colorimétrico MTT, descrito na seção 3.2.1.2, brevemente representado nas letras E, F e G. E) O meio foi descartado e adicionou-se solução de MTT. F) Descarte da solução contendo MTT e adição de DMSO. G) As microplacas foram lidas utilizando uma leitora de placas ajustada à absorvância em 595 nm. H) Os resultados obtidos foram tratados utilizando os programas Excel e GraphPrisms7.

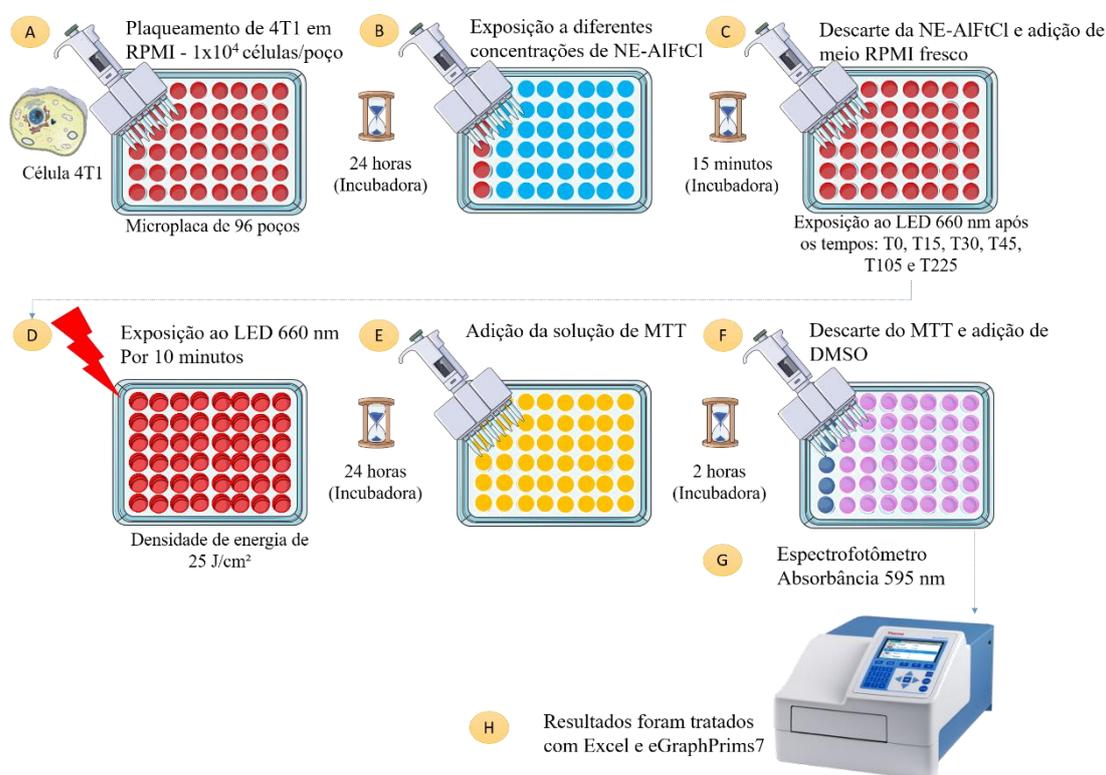


Figura 17: Avaliação do efeito da TFD-NE-AIFtCl utilizando as concentrações CC50 de cada tempo avaliado na seção 3.2.6.1 (T0, T15, T30, T45, T105 e T225) variando as densidades de energia (J/cm²) na viabilidade celular de 4T1. As diferentes doses de energia foram acessadas por diferentes tempos de irradiação, sendo: 1 (2,54 J/cm²), 5 (13,98 J/cm²), 10 (25,88 J/cm²), 15 (38,77 J/cm²), 20 (52,12 J/cm²) e 25 minutos (67,56 J/cm²).

3.2.6 Teste de viabilidade para Mitoxantrona

Este teste foi realizado de modo a avaliar o efeito citotóxico do quimioterápico Mitoxantrona (MTX) com diferentes concentrações. O quimioterápico

MTX foi dissolvido em DMSO e as concentrações foram ajustadas para verificação do teste de viabilidade. A realização deste teste foi de acordo com as etapas representadas pelas letras na **Figura 18**, sendo: **A)** Plaqueamento das células 4T1 em microplaca de 96 poços como descrito na **seção 3.2.1.1**. **B)** Após 24 horas de crescimento das células em incubadora, foi descartado e as células foram expostas a diferentes concentrações de MTX (0-10 μM) por 30 minutos. **C)** Findo o tempo de exposição, as células foram lavadas com PBS 2X e meio novo foi colocado. Aguardou-se o tempo de 24 horas. **D)** Findo do tempo, foi realizado o teste colorimétrico MTT, descrito na **seção 3.2.1.2**, brevemente representado nas letras **E e F**. **E)** O meio foi descartado e adicionou-se solução de MTT e deixado por 2 horas; ao final deste tempo o MTT foi descartada e adicionou-se DMSO. **F)** As placas foram lidas utilizando uma leitora de placas ajustada à absorvância em 595 nm. Os resultados obtidos foram tratados utilizando os programas Excel e GraphPrisms7.

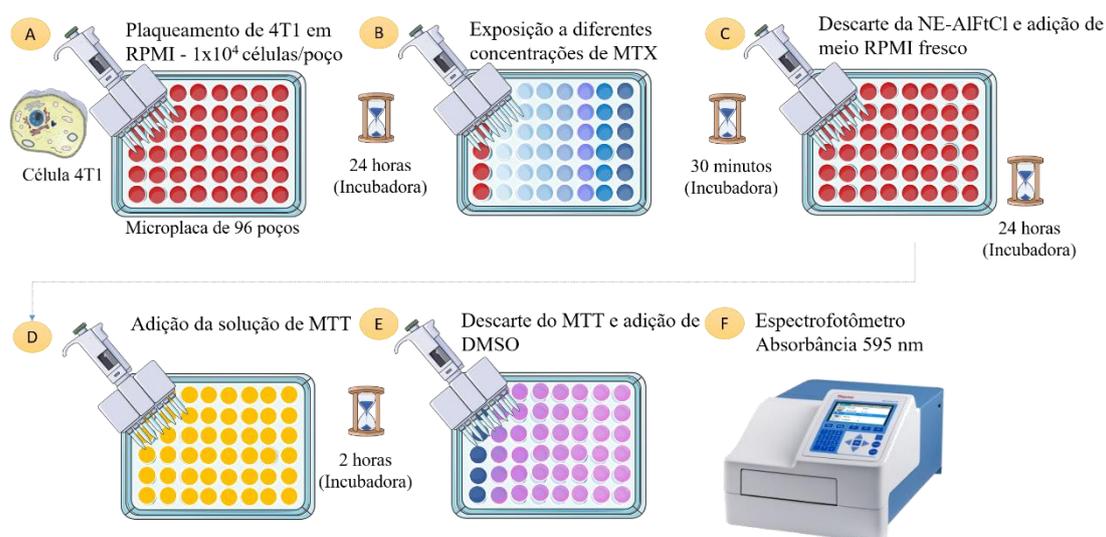


Figura 18: Avaliação do efeito de citotoxicidade do quimioterápico Mitoxantrona (MTX) sob diferentes concentrações contra células 4T1.

3.2.7 Análise de morte celular pelo método AO/PI

Este teste foi realizado de modo a avaliar qual a via de morte celular ocasionada por diferentes protocolos de TFD-NE-AIFtCl. Como controles de apoptose e

necrose, foram utilizados os tratamentos com mitoxantrona (MTX – 1,5 μM) e as células foram congeladas e descongeladas por três vezes (C/D), respectivamente. A realização deste teste foi de acordo com as etapas representadas pelas letras na **Figura 19**, sendo: **A)** Plaqueamento das células 4T1 em microplaca de 12 poços como descrito na **seção 3.2.1.1**. **B)** Após 24 horas de crescimento das células em incubadora, foi descartado o meio e as células 4T1 foram expostas aos tratamentos, sendo: **1)** células sem tratamento; **2)** Com mitoxantrona (exposição a 1,5 μM por 30 minutos); **3)** diferentes protocolos de TFD-NE-AlFtCl nas concentrações de 9,01 nM (CC50) ou de 19,4 nM (CC90) – CC50 referentes ao T15, por 15 minutos, aguardou-se o tempo de mais 15 minutos e as células foram expostas ao LED 660 nm nas fluências de 25 J/cm² ou 67 J/cm²; **4)** células congeladas e descongeladas 3 vezes (C/D). **C)** Após o fim de cada tratamento as células foram lavadas com PBS (2X) e adicionou-se meio fresco. Para avaliação da via de morte, aguardou-se o tempo de 4 horas em incubadora. **D)** Findo o tempo, as células foram fixadas com Álcool 70% a 4 °C por uma hora. **E)** Após a fixação, as células foram removidas e dispostas em critotubos devidamente identificados e centrifugados para descartar o solvente e foi feita a ressuspensão das células com 0,2 mL de PBS. **F)** Exposição das células aos marcadores Laranja de Acridina (AO – 5 $\mu\text{g/mL}$) e Iodeto de Propídeo (PI – 20 $\mu\text{g/mL}$) por 5 minutos em temperatura ambiente (TA). **G)** as imagens das marcações foram obtidas com auxílio do microscópio de fluorescência EVOS. **H)** tratamento das imagens, foram contadas 300 células para cada tratamento sendo estas identificadas de acordo com a coloração da marcação como representado pela **Figura 20** nesta seção.

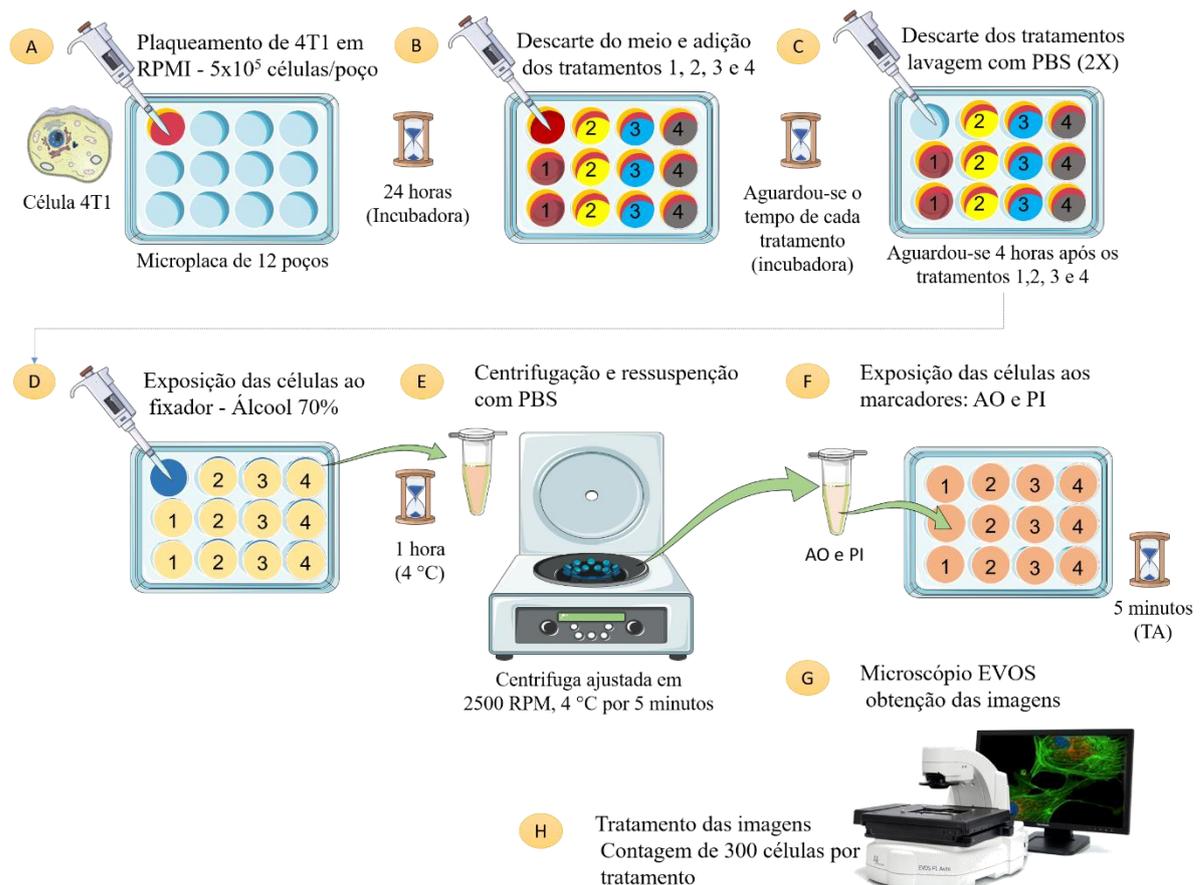


Figura 19: Avaliação da via de morte pelo método AO e PI após 4 horas dos tratamentos MTX e diferentes protocolos da TFD-NE-AIFtCl nas células 4T1. AO – alaranjado de acridina; PI – iodeto de protídeo. **1)** células sem tratamento; **2)** Com mitoxantrona (exposição a $1,5 \mu\text{M}$ por 30 minutos); **3)** Diferentes protocolos de TFD-NE-AIFtCl nas concentrações de $9,01 \text{ nM}$ (CC50) ou de $19,4 \text{ nM}$ (CC90) – CC50 referentes ao T15, por 15 minutos, aguardou-se o tempo de mais 15 minutos e as células foram expostas ao LED 660 nm nas fluências de 25 J/cm^2 ou 67 J/cm^2 ; **4)** células congeladas e descongeladas 3 vezes (C/D).

Para detecção e quantificação do número de células em processo de apoptose ou necrose, foi realizada a avaliação do perfil de marcação para AO/PI descrita por Kasibhatla et al. (2006)⁶⁵. Essa verificação foi realizada por meio de duplo cego para que não houvesse resultados tendenciosos – por três pessoas. Desta forma, as imagens foram divididas em pastas identificadas por letras sortidas e passadas a três pessoas que realizaram as contagens em relação às cores referentes à marcação, sendo: contagem de células verdes, contagem de células amarelas/laranjas e contagem de células vermelhas. O marcador AO faz marcação tanto de células viáveis quanto de células mortas, já o marcador PI cora apenas células mortas, ou seja, que perdeu a integridade da membrana. Neste contexto, as formas de identificação foram divididas em três estágios representados na **Figura 20**, sendo:

A) célula viável – marcação em verde uniforme tanto o núcleo quanto citoplasma;

B) célula em apoptose – membrana plasmática parcialmente degradada, o que permite a entrada do PI. Formação de corpos apoptóticos com a fragmentação e a condensação da cromatina (seta branca). As células apresentam uma coloração alaranjada.

C) célula necrótica – a célula fica uniformemente marcada de vermelho, isso se dá pela alteração na membrana que permite a entrada do PI.

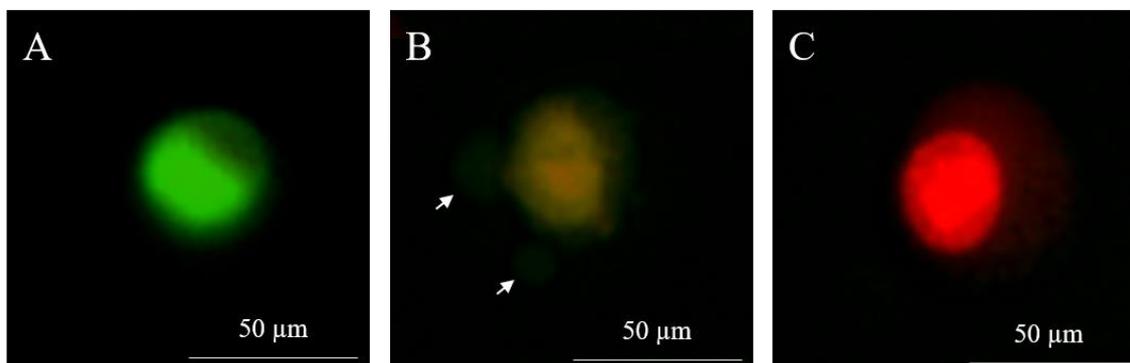


Figura 20: Fotomicrografia das células da linhagem 4T1 marcadas com alaranjado de acridina (AO) e iodeto de propídeo (PI) analisadas em microscópio de fluorescência EVOS. **A)** célula viável; **B)** célula apoptótica (as setas indicam a formação dos corpos apoptóticos); e **C)** célula necrótica.

3.2.8 Análise de morte celular pelo método Anexina V/PI

Este teste foi realizado de modo a avaliar qual a via de morte celular ocasionada por diferentes protocolos de TFD-NE-AIFtCl. Como controles de apoptose e necrose, foram utilizados os tratamentos com MTX e C/D, respectivamente como descrito na seção 3.2.7. A realização deste teste foi de acordo com as etapas representadas pelas letras na **Figura 21**, sendo: **A)** Plaqueamento das células 4T1 em microplaca de 12 poços como descrito na **seção 3.2.1.1**. **B)** Após 24 horas de crescimento das células em incubadora, foi descartado e as células 4T1 foram expostas aos tratamentos **1, 2, 3 e 4** descritos na **seção 3.2.8**. **C)** Após o fim de cada tratamento, as células foram lavadas com PBS (2X) e adicionou-se meio fresco. Para avaliação da via de morte aguardou-se o tempo de 24 horas em incubadora. **D)** Ao fim de cada tratamento determinado, foi realizada a

remoção das células utilizando tripsina EDTA. **E)** As células junto com o sobrenadante foram dispostas em criotubos devidamente identificados e centrifugados para remoção da tripsina e lavadas com PBS 2X. **F)** Após a centrifugação foi feito o descarte do sobrenadante e as células expostas aos marcadores Anexina V (5 μ L) e PI (10 μ L) por 5 minutos a temperatura ambiente. **G)** As células foram levadas ao Citômetro de Fluxo e analisadas quanto à exposição da proteína fosfatidilserina referente ao sinal de apoptose pelo marcador Anexina V (488 nm) e perda da integridade da membrana celular referente ao sinal de necrose pelo marcador PI (570 nm). **H)** Os resultados obtidos foram tratados utilizando FlouJO e GraphPrisms7.

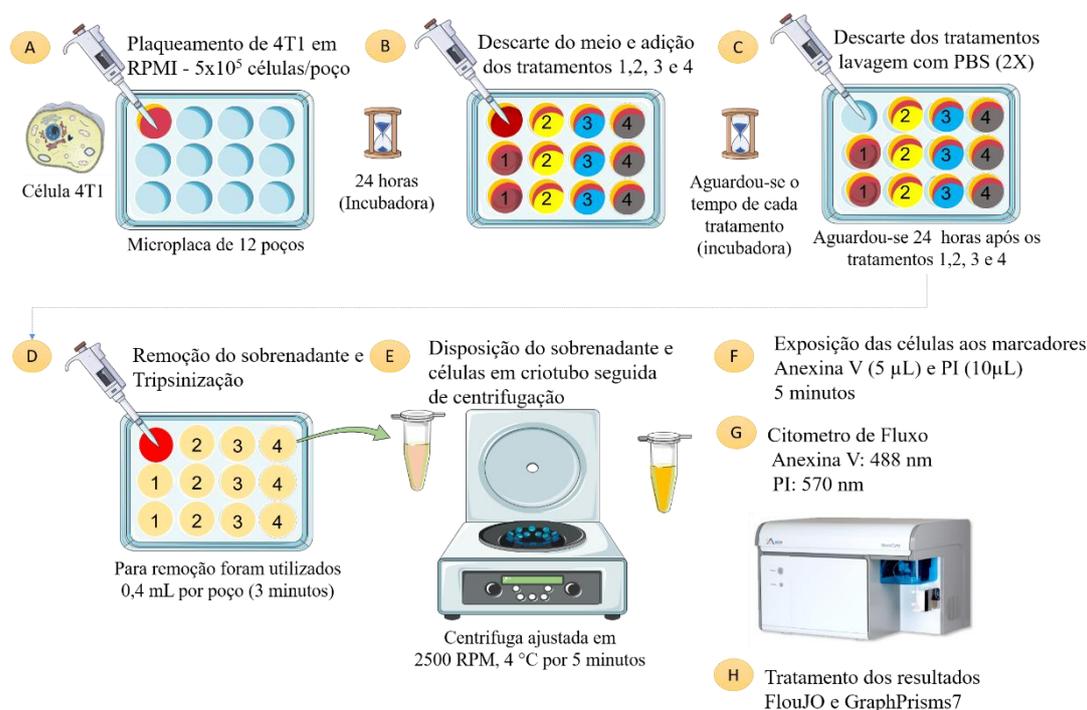


Figura 21: Avaliação da via de morte pelo método Anexina V e PI após 24 horas dos tratamentos: **1)** células sem tratamento; **2)** Com mitoxantrona (exposição a 1,5 μ M por 30 minutos); **3)** Diferentes protocolos de TFD-NE-AlFtCl nas concentrações de 9,01 nM (CC50) ou de 19,4 nM (CC90) – CC50 referentes ao T15, por 15 minutos, aguardou-se o tempo de mais 15 minutos e as células foram expostas ao LED 660 nm nas fluências de 25 J/cm² ou 67 J/cm²; **4)** células congeladas e descongeladas 3 vezes (C/D).

3.2.9 Teste para detecção do estresse oxidativo celular após à TFD-NE-AlFtCl por Microscopia de Fluorescência

A detecção do estresse oxidativo por microscopia de fluorescência nas células 4T1 submetidas à TFD-NE-AlFtCl ($0,5 \mu\text{M}$) foi feita utilizando-se o KIT CellROX[®] Oxidative Stress Reagents (*Life Technologies*). A realização deste teste foi de acordo com as etapas representadas pelas letras na **Figura 22**, sendo: **A**) Plaqueamento das células 4T1 em microplaca de 12 poços contendo uma lamínula $0,22 \text{ mm}$ em cada poço como descrito na **seção 3.2.1.1**. **B**) Após 24 horas, as células 4T1 foram expostas à NE-AlFtCl por 15 minutos e conseqüentemente lavadas com PBS (2x). **C**) Em seguida, o reagente CellROX[®] foi adicionado na concentração de $5 \mu\text{M}$ e deixado incubado por 30 minutos a $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Findo do tempo de incubação com reagente, as células foram novamente lavadas com PBS (2x). **D**) Marcação do núcleo utilizando o marcador DAPI (5 minutos) e lavadas com PBS (2X); **E**) As lamínulas contendo as células foram montadas em uma lâmina. **F**) Em seguida, a lâmina foi analisada utilizando um microscópio de fluorescência. Para que fosse possível identificar a fluorescência referente ao estresse oxidativo, as imagens foram obtidas basicamente ao mesmo tempo em que foram irradiadas com LED 660 nm .

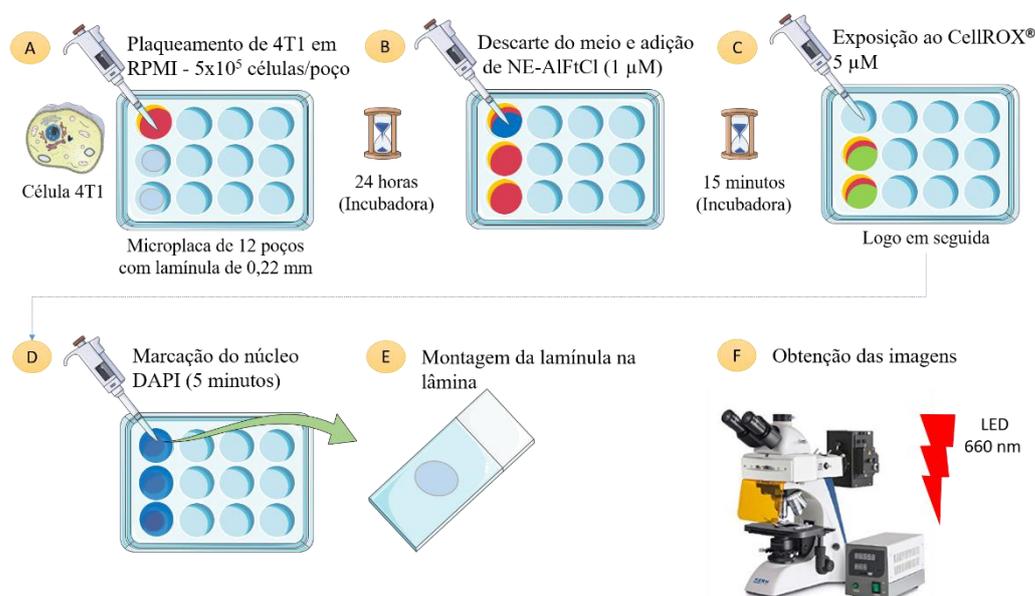


Figura 22: Identificação do estresse oxidativo utilizando o reagente CellROX[®] ocasionado pela exposição das células 4T1 a TFD-NE-AlFtCl.

3.2.10 Detecção e quantificação de DAMPs após a TFD-NE-ALFtCl

3.2.10.1 Detecção da exposição de Calreticulina, HSP70 e HSP90 após 1 hora da aplicação da TFD-NE-ALFtCl

A detecção da exposição dos DAMPs calreticulina (CTR), HSP70 e HSP90 foram feitas através da técnica de imuno-histoquímica utilizando um microscópio de fluorescência EVOS. A realização destes testes foi de acordo com as etapas representadas pelas letras na **Figura 23**, sendo: **A)** Plaqueamento das células 4T1 em microplaca de 12 poços contendo uma lamínula de 0,22 mm por poço como descrito na **seção 3.2.1.1**. **B)** Após 24 horas de crescimento das células em incubadora foi descartado e as células 4T1 foram expostas aos tratamentos **1, 2, 3 e 4** descritos na **seção 3.2.8**. Foram utilizadas também células permeabilizadas com TritonX100 0,1% por 15 minutos, a fim de avaliar a marcação interna da Calreticulina, HSP70 e HSP90. **C)** Após o fim de cada tratamento, as células foram lavadas com PBS (2X) e adicionou-se meio fresco. Aguardou-se o tempo de 1 (uma) hora, com as células mantidas em incubadora. **D)** Findo o tempo de incubação, as células foram fixadas com Álcool 70% gelado por 20 minutos – 4 °C. **E)** Findo o tempo de fixação as células foram, expostas aos anticorpos primários para anti-CRT/ anti-HSP70 ou anti-HSP90 por 1 hora em estufa com temperatura regulada a 37 °C (testes independentes) seguida da lavagem com PBS gelado (2X). **F)** Após a exposição aos respectivos anticorpos primários, adicionou-se o anticorpo secundário anti-IgG 488 por 30 minutos em temperatura ambiente. Toda essa etapa foi realizada ao abrigo da luz e, ao fim do tempo proposto, foi realizada a lavagem com PBS (2X); **G)** As células foram analisadas por microscopia de fluorescência utilizando o Microscópio de Fluorescência EVOS. O núcleo das células também foi marcado utilizando o marcador DAPI - não representado na figura, como descrito na **seção 3.2.5**. **H)** As imagens obtidas foram tratadas utilizando os programas PhotoShop CC2015, ImageJ e a concentração do FS ALFtCl presente em cada subunidade celular tratado pelo GraphPrisms7.

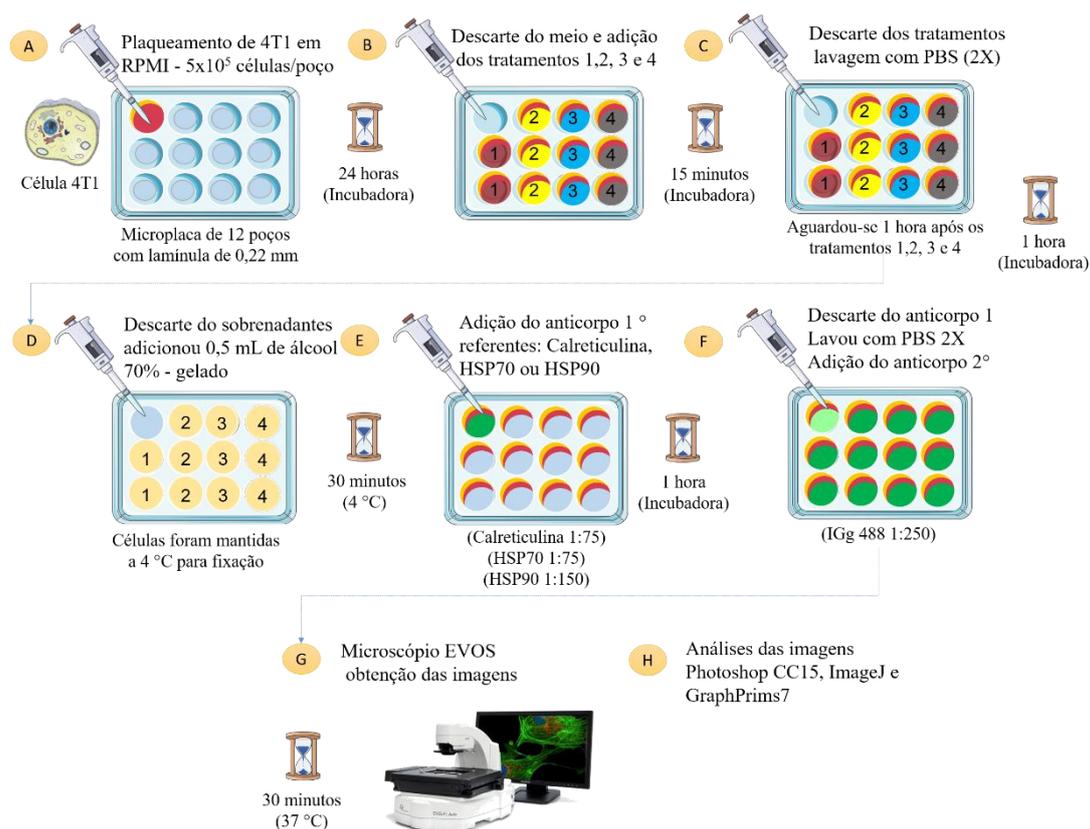


Figura 23: Teste para detecção dos padrões moleculares associados a danos (DAMP): Calreticulina, HSP70 ou HSP90 por imuno-histoquímica 1 hora após as células serem submetidas aos tratamentos: **1)** células sem tratamento; **2)** Com mitoxantrona (exposição a 1,5 μ M por 30 minutos); **3)** Diferentes protocolos de TFD-NE-AIFtCl nas concentrações de 9,01 nM (CC50) ou de 19,4 nM (CC90) – CC50 referentes ao T15, por 15 minutos, aguardou-se o tempo de mais 15 minutos e as células foram expostas ao LED 660 nm nas fluências de 25 J/cm² ou 67 J/cm²; **4)** células congeladas e descongeladas 3 vezes (C/D).

3.2.10.2 Interleucina 1 beta (*IL-1 β*) e High mobility molecule box-1 (*HMGB1*)

A detecção da exposição dos DAMPs *IL-1 β* e *HMGB1* foi feita através da técnica de ELISA de acordo com a descrição dos fabricantes. A realização destes testes foi de acordo com as etapas representadas pelas letras na **Figura 24**, sendo: **A)** Plaqueamento das células 4T1 em microplaca de 12 poços como descrito na **seção 3.2.1.1**. **B)** Após 24 horas de crescimento das células em incubadora, foi descartado e as células 4T1 foram expostas aos tratamentos **1, 2, 3** e **4** descritos na **seção 3.2.8**. **C)** Após o fim de cada tratamento, as células foram lavadas com PBS (2X) e adicionou-se meio fresco. Aguardou-se o tempo de 24 horas e 48 horas para detecção de *IL-1 β* e *HMGB1*, sendo as células mantidas em incubadora. **D)** Foi coletado o sobrenadante e posto em criotubos devidamente, identificados. **E)** Os criotubos contendo o sobrenadante de cada tratamento

foi centrifugados por 5 minutos com 1000 RPM e temperatura de 25 °C. **F)** A detecção da emissão dos DAMPs IL-1 β e HMGB1 foram feitas pela técnica de ELISA descrita pelos fabricantes. **G)** A absorbância foi obtida por espectrofotometria em 450 nm, para ambas análises. **H)** Os dados obtidos foram tratados utilizando Excel e GraphPrims7.

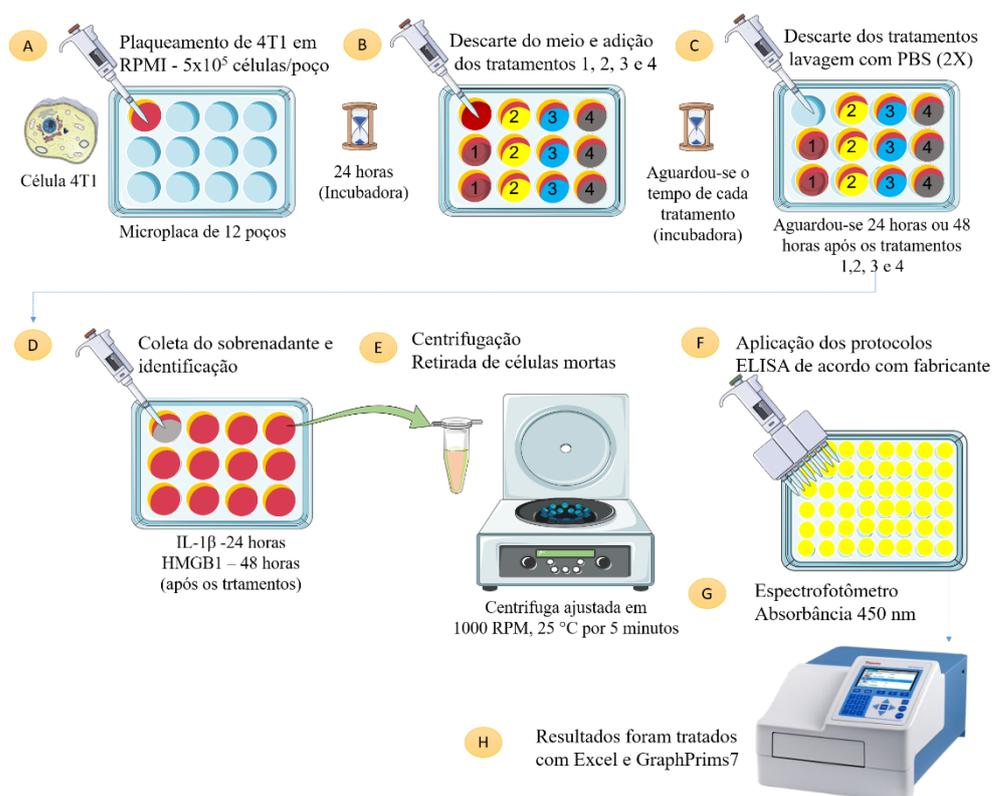
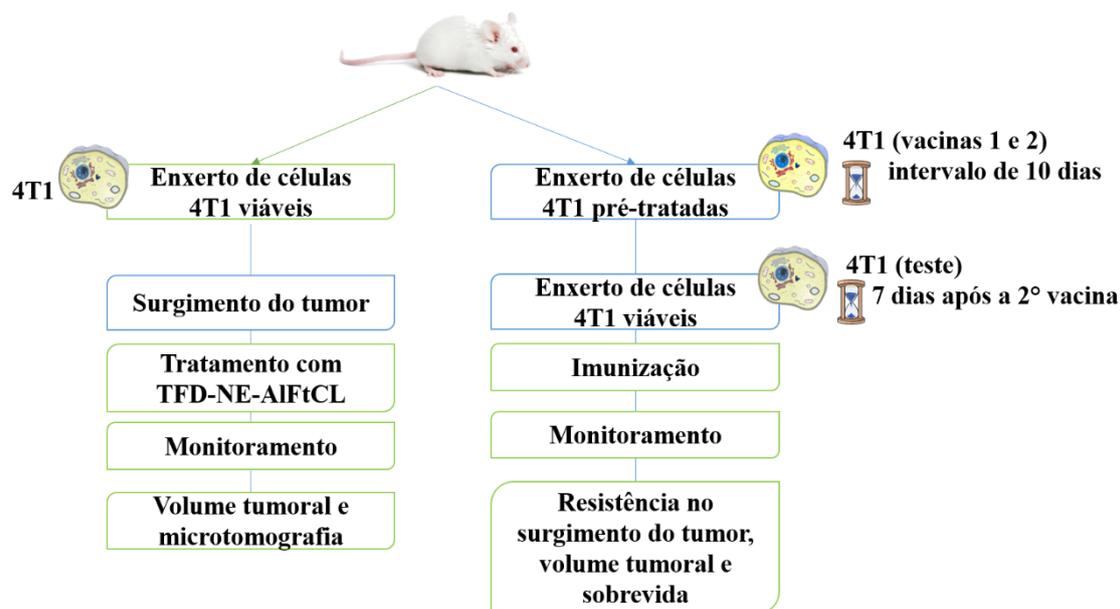


Figura 24: Teste para detecção e quantificação no sobrenadante de células 4T1 para IL-1 β e HMGB1 após 24 e 48 horas de serem submetidos a diferentes protocolos da TFD-NE-AIFtCl, respectivamente. Os tratamentos aplicados: **1)** células sem tratamento; **2)** com mitoxantrona (exposição a 1,5 μ M por 30 minutos); **3)** Diferentes protocolos de TFD-NE-AIFtCl nas concentrações de 9,01 nM (CC50) ou de 19,4 nM (CC90) – CC50 referentes ao T15, por 15 minutos, aguardou-se o tempo de mais 15 minutos e as células foram expostas ao LED 660 nm nas fluências de 25 J/cm² ou 67 J/cm²; **4)** células congeladas e descongeladas 3 vezes (C/D).

3.3 Testes *in vivo*

Os experimentos *in vivo* foram realizados em camundongos fêmeas da espécie Balb-C. Todos os testes realizados neste estudo com animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade de Brasília (CEUA), com número de protocolo: UnBDoc 5529/2015 (**Anexo VI**). Para tanto, todos os testes realizados estão representados no **Fluxograma 3**.



Fluograma 3: Etapas de desenvolvimento do estudo *in vivo* utilizando camundongos fêmeas da espécie Balb-C. Os testes foram divididos em duas etapas, sendo a primeira etapa o enxerto de células 4T1 viáveis e tratamento com TFD-NE-AIFtCl após o surgimento do tumor. Segunda etapa, independente da primeira, os animais foram vacinados com células 4T1 pré-tratadas com diferentes protocolos da TFD-NE-AIFtCl e depois realizado o teste de imunização com o enxerto de células 4T1 viáveis.

3.3.1 Ensaio de TFD-NE-AIFtCl em camundongos fêmeas (Balb-C) com tumor 4T1

Para a realização deste estudo foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem Balb-C. A realização deste teste foi de acordo com as etapas representadas pelas letras na **Figura 25**, sendo: **A)** As células utilizadas no inóculo foram da linhagem 4T1, preparadas como descrito na seção **3.2.1.1**. **B)** Os animais recebem no flanco esquerdo o enxerto de células 4T1 na concentração de 2×10^4 células/animal. A partir do dia da inóculo os animais foram monitorados diariamente. No 14º dia após o enxerto, observou-se um volume tumoral em todos os animais de cada grupo de aproximadamente 1 mm^3 . **C)** Após o surgimento de uma massa tumoral palpável, os tratamentos foram realizados, sendo: **grupo 1** animais que receberam 0,2 mL de PBS no tumor (*in situ*); **grupo 2 e 3** animais que receberam 0,2 mL de NE-AIFtCl ($5 \mu\text{M}$) no tumor (*in situ*), porém os animais do **grupo 3** após 30 minutos de exposição à NE-AIFtCl foram expostos por 20 minutos a irradiação utilizando um LED de 660 nm chegando a uma fluência de $52,12 \text{ J/cm}^2$. **D)** Após a realização dos tratamentos, os animais foram monitorados quanto ao volume

tumoral e microtomografados para verificação de metástases no pulmão. Nos procedimentos realizados nas etapas **B** e **C**, os animais foram anestesiados utilizando uma solução de Cetamina (80 mg/kg) e Xilasina (10 mg/kg).

As avaliações utilizando o microtomografia foram obtidas utilizando um microtomógrafo Skyscan 1076 MicroCT (Skyscan, Kontich, Bélgica). Para as análises de digitalização dos animais, o equipamento foi ajustado para 50 kV, 100 mA e 35 - p pixel tamanho com um filtro Al de 0,5 mm, um passo de rotação de 0,7 e uma média de frame de 4. A reconstrução foi realizada utilizando o *software* NRecon (Skyscan, Kontich, Bélgica) para reconstrução e CTAn *software* (Skyscan, Kontich, Bélgica) para análise de imagens. As fatias foram analisadas com o *software* Dataviewer (Skyscan, Kontich, Bélgica).

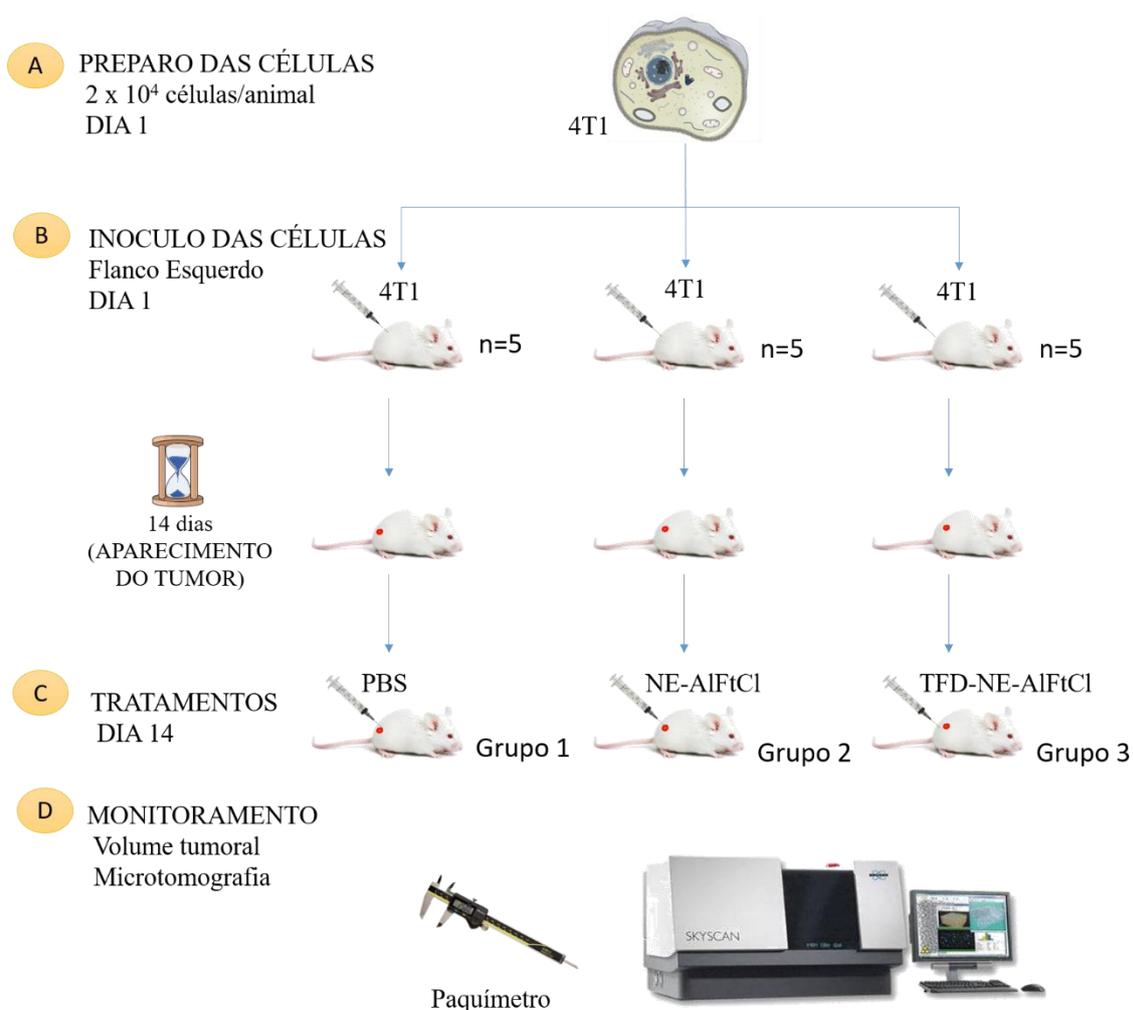


Figura 25: Aplicação da TFD-NE-AIFtCl em animais como tumor de mama enxertado no flanco esquerdo de animais da linhagem Balb-C.

3.3.2 Ensaio de vacinação em camundongos fêmeas (Balb-C) utilizando células 4T1 submetidas a diferentes protocolos de TFD-NE-AIFtCl

Para realização deste estudo foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem Balb-C. A realização deste teste foi de acordo com as etapas representadas pelas letras na **Figura 26**, sendo: **A)** As células da linhagem 4T1 foram dispostas em placas de 12 poços como descrito na seção **3.2.1.1** e em seguida foram submetidas aos diferentes tratamentos e enxertadas nos animais divididos em sete grupos, sendo: **1)** PBS sem células – **grupo 1**; **2)** células submetidas ao congelamento e descongelamento (3 X) – **grupo 2**; **3)** células tratadas como MTX - **grupo 3**; **4)** células tratadas como TFD-NE-AIFtCl (CC50 9,01 nM – 25 J/cm²) - **grupo 4**; **5)** células tratadas como TFD-NE-AIFtCl (CC90 19,46 nM – 25 J/cm²) - **grupo 5**; **6)** células tratadas como TFD-NE-AIFtCl (CC50 9,01 nM – 67 J/cm²) - **grupo 6**; **7)** células tratadas como TFD-NE-AIFtCl (CC90 19,46 nM – 67 J/cm²) - **grupo 7**; **B)** Após as células serem submetidas aos diferentes tratamentos e protocolos de TFD aguardou-se o tempo de 4 horas, findo o tempo as células foram removidas da microplaca utilizando um *Screper* contadas como descrito na seção **3.2.1.1** e vacinadas no flanco direito dos animais referentes a cada grupo; **C)** Após 10 dias da primeira vacina repetiu-se os tratamentos e os animais foram novamente submetidos a vacinação das células pré-tratadas; **D)** Após a segunda vacina, aguardou-se o período de sete dias e então os animais de todos os grupos receberão o inóculo no flanco esquerdo de células 4T1 viáveis, a fim de testar se os protocolos de TFD foram capazes de ativar uma resposta imunitária nos animais; **E)** Após a realização das vacinas e do teste os animais foram monitorados quanto o volume tumoral utilizando um paquímetro digital. Nos procedimentos realizados nas etapas **B**, **C** e **D** os animais foram anestesiados utilizando um solução de Cetamina (80 mg/kg) e Xilasina (10 mg/kg).

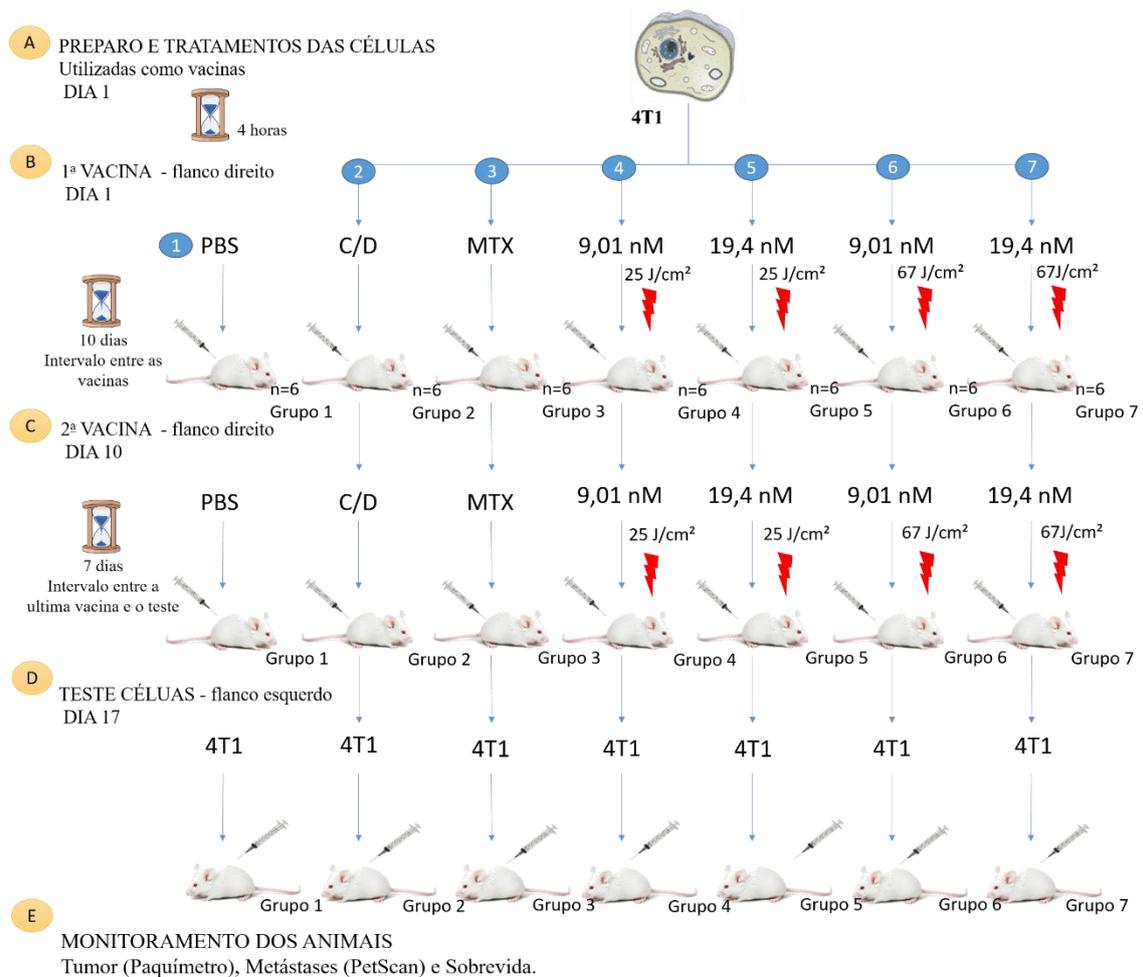


Figura 26: Vacinação dos animais *Balb-C* com células 4T1 submetidas a diferentes protocolos da TFD-NE-AIFtCl.

3.4 Testes estatísticos

Os dados foram avaliados por meio de estatística paramétrica ou não paramétrica de acordo com a distribuição da normalidade. Para os dados paramétricos foi realizada ANOVA (análise de Variância) seguido do teste Tukey-Kramer e os não paramétricos foram analisados com o teste de Kruskal-Wallis, seguindo do teste de Dunn. O programa estatístico utilizado foi GraphPad Prims 7 (GraphPad software, EUA). Valores outlier, ou seja, isolados, foram descartados pelo program Grubbs.

4 Resultados e Discussão

A formulação de nanoemulsão contendo cloreto de alumínio-ftalocianina (NE-AlFtCl) utilizada neste estudo foi produzida por meio da técnica de nanoemulsificação espontânea, descrita por Muehlmann et al. (2015)¹⁶. Após o preparo da nanoformulação, foram verificadas as características coloidais, especificamente diâmetro hidrodinâmico (DH), índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta (Zp) (**Figura 27**).

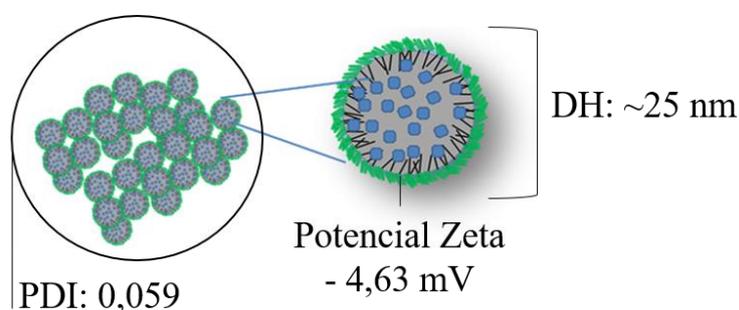


Figura 27: Desenho representativo da NE-AlFtCl e suas propriedades coloidais. Imagem obtida de Rodrigues 2014.

A caracterização das propriedades coloidais de nanopartículas é um parâmetro indispensável quando se trata da utilização desses nanomateriais como carreadores de fármacos para uso terapêutico⁶⁶. Para tanto, os resultados aqui encontrados (**Figura 27**) demonstraram que as NE-AlFtCl apresentaram características coloidais favoráveis como DH, PDI e Zp condizentes com o descrito na literatura, o que as referenciam como nanomulsões^{10,13, 16 e 66}. Vale ressaltar ainda que essas variáveis físicas se mantiveram estáveis por um período de quatro anos após o preparo da nanoformulação, como representado na **Figura 28**. Foi igualmente verificada a manutenção do DH abaixo de 30 nm, não sendo observada variação significativa entre os tempos analisados (**Figura 28A**). Observou-se também que há uma monodispersividade da nanoformulação com PDI abaixo de 0,12, para estes resultados; não foram verificadas diferenças significativas após os diferentes tempos de avaliação. Para os resultados referentes ao potencial zeta (Zp), não foram observadas diferenças entre os tempos avaliados, mantendo assim uma carga negativa durante todo o período de avaliação (**Figura 28B**). Desta forma, esses resultados

da estabilidade corroboram o demonstrado por Muehlmann et al. (2015)¹⁶, que registraram uma estabilidade por 365 dias da mesma nanoformulação em diferentes condições de armazenamento: 4 °C, temperatura ambiente e em 37 °C. Rodrigues et al. (2015)¹³ demonstraram resultados similares utilizando uma NE contendo extrato de cajuru, porém neste estudo a NE não se apresentou estável quando armazenada nas condições de 37 °C. As NE-AlFtCl utilizadas neste estudo foram armazenadas a temperatura ambiente.

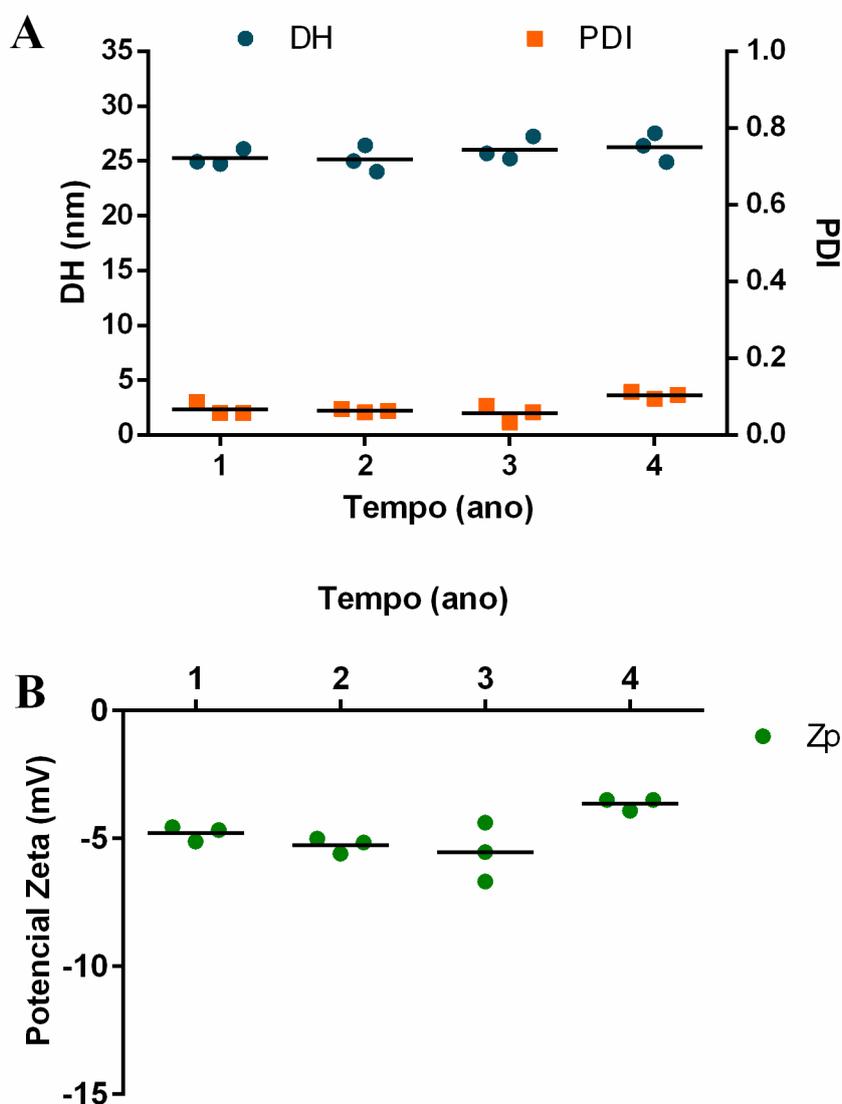


Figura 28: Estabilidade coloidal da NE-AlFtCl no período de quatro anos. **A)** diâmetro hidrodinâmico – DH e índice de polidispersividade – PDI. **B)** potencial zeta – Zp. mV – mili volts.

Muito além das propriedades coloidais, as nanopartículas precisam apresentar outras características favoráveis para seu uso em terapias, como: **1)** estabilidade em meios biológicos; **2)** não toxicidade – isso dependerá do porque utilizar nanopartículas; **3)** manutenção das propriedades do fármaco carregado; **4)** fácil manuseio; **5)** estabilidade sob diferentes condições de tempo e temperatura; **6)** de fácil obtenção; e **7)** acessibilidade e baixo custo^{10, 13, 15 e 66}. Diante disso, o próximo passo foi verificar se as propriedades físico-químicas do FS AlFtCl foram alteradas com sua associação à NE.

Os resultados referentes às propriedades fotofísicas do FS AlFtCl associado à nanoemulsão apresentaram picos de absorção e emissão de fluorescência de 676 e 680 nm, respectivamente. Após essa constatação, o mesmo lote de NE-AlFtCl caracterizado teve esses parâmetros analisadas anualmente. Os resultados representados na **Figura 29** demonstram que, quando avaliado pelo maior pico de absorção ou emissão de fluorescência do FS AlFtCl associado à nanoemulsão, não foram observadas diferenças significativas para o período de tempo analisado. Esses resultados demonstram a eficiência da NE na proteção das propriedades fotofísicas do FS AlFtCl.

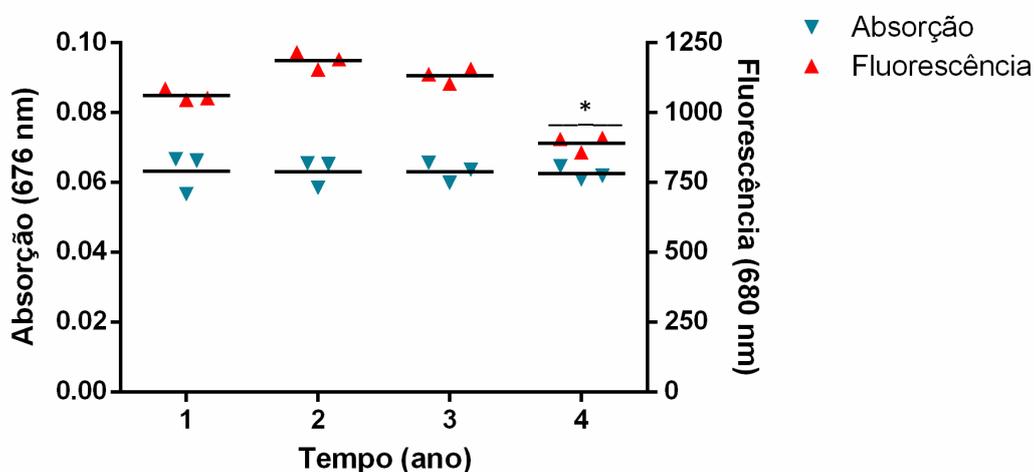


Figura 29: Estabilidade fotofísica do AlFtCl associado à nanoemulsão (NE-AlFtCl). Cor azul claro refere aos resultados de absorção (676 nm) e a cor vermelha é referente aos picos de emissão de fluorescência (680 nm).

A maioria dos FS, como por exemplo as ftalocianinas, é de natureza quimicamente hidrofóbica, o que dificulta sua disposição em meios biológicos^{16,22 e 67}. Sendo assim, a disposição destes em meios aquosos pode levar à agregação e conseqüentemente acarretar na perda das suas propriedades fotofísicas, bem como suas

propriedades fotoquímicas^{13, 16, 23 e 68}. Sendo assim, também foi verificado se ocorreu a estabilização das propriedades fotofísicas e físico-químicas do FS AlFtCl associado à NE. Desta forma, observou-se que a formulação NE-AlFtCl apresentou picos de 676 e 680 nm referentes à absorção e emissão de fluorescência (excitação em 350 nm), respectivamente, propriedades que são atribuídas ao FS AlFtCl¹⁶. Além disso, quando avaliada a estabilidade desses valores de absorção (676 nm) e de emissão de fluorescência (680 nm) por um período de quatro anos, verificou-se a manutenção dessas propriedades fotofísicas, não sendo observadas diferenças significativas durante todo o período de teste para valores de absorção e apenas no último ano houve diferença de valores para avaliação da fluorescência (**Figura 29**). Um outro fator chave para manutenção das propriedades fotofísicas dos FS está diretamente atribuído à forma de armazenamento, uma vez que sua exposição à luz irá acarretar na degradação^{13, 16 e 22}.

Também foi verificado o perfil de absorção sobre a emissão de fluorescência. Os resultados obtidos dessa avaliação estão representados na **Figura 30**. Nesse sentido, observou-se que, quando a NE-AlFtCl é excitada com um comprimento de onda de 660 nm, há pico de emissão em 680 nm (representado pela seta de cor branca). Demonstrando, assim, um maior pico na região do vermelho.

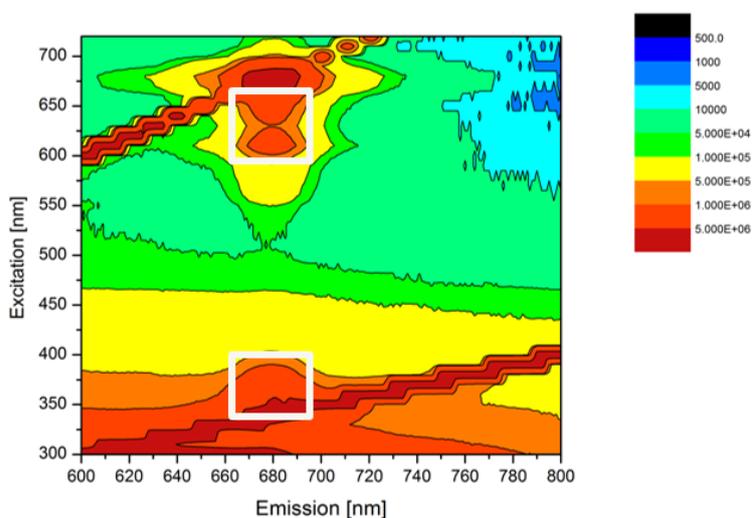


Figura 30: Fluorescência da NE-AlFtCl. Os quadros de cor branca referem-se ao maior pico de emissão de fluorescência na região do vermelho em 680 nm quando excitado em aproximadamente 350 nm e 630 nm.

Dos muitos FS utilizados hoje como agentes terapêuticos, os que absorvem luz na região do vermelho ganham destaque¹⁶. Isso se deve ao fato de a luz no comprimento de onda na região do vermelho possuir grande capacidade de permear estruturas biológicas^{13, 16 e 22}. Como já esperado e demonstrado nesse estudo (**Figura 30**), o FS AlFtCl apresenta essa propriedade^{16 e 22}. Sendo assim, esse perfil de absorção e emissão de fluorescência de FS permite otimizar o uso desses fototerápicos como mediadores terapêuticos^{13 e 16}.

Para tanto, o próximo passo foi avaliar o perfil de produção de ERO pela NE-AlFtCl após ser irradiada com LED com λ 660 nm. Os resultados estão representados na **Figura 31**. A NE-AlFtCl foi analisada uma vez a cada ano e verificou-se que a eficiência fotoquímica do FS na produção de ERO foi mantida, não sendo demonstradas diferenças significativas entre os períodos avaliados. Já quando comparado com o controle de NE-AlFtCl não exposto ao benzofurano (cor azul), como esperado, foram detectadas diferenças significativas a partir do tempo de 10 segundos após irradiação, já que a NE-AlFtCl é inativa na ausência de luz.

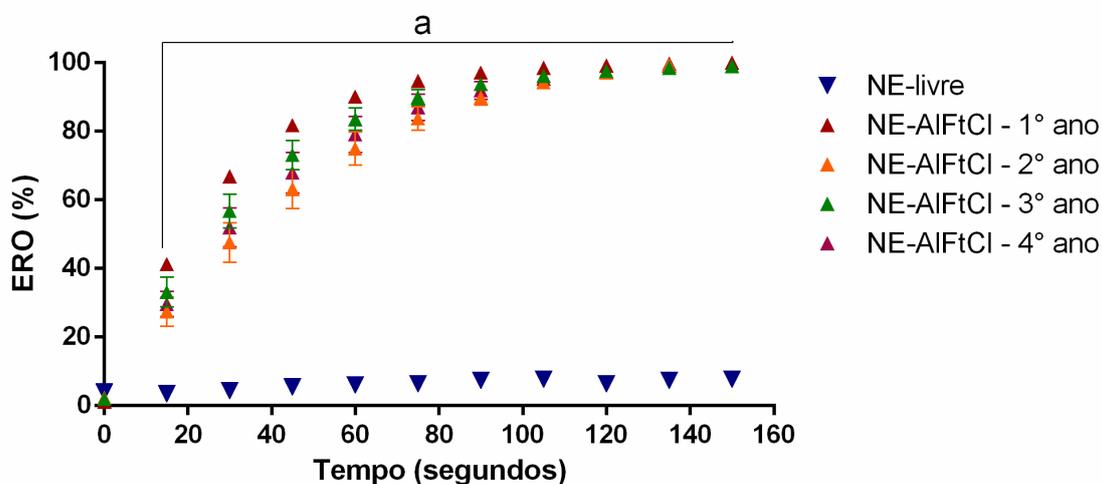


Figura 31: Produção de espécies reativas de oxigênio pelo método benzofurano para o FS AlFtCl associado à nanoemulsão (NE-AlFtCl). A cor azul refere-se à NE-AlFtCl analisado sem a exposição ao benzofurano. A NE-AlFtCl foi posta junto ao reagente benzofurano e irradiada por diferentes tempos com LED 660 nm e verificada a absorbância em 411 nm, cor vermelha, laranja, verde e roxa referem-se às análises feitas após o período de 1, 2, 3 e 4 anos, respectivamente.

A eficiência da TFD está intimamente ligada às propriedades físico-químicas dos FS¹⁶. Os FS apresentam a capacidade de absorver luz (comprimento de onda

específico - nm) e transmitir a energia luminosa absorvida para o oxigênio molecular contido em tecidos-alvo (ex. tecido canceroso), alterando o estado energético da molécula de oxigênio — que, antes em um estado fundamental, passará para um estado excitado, o que o torna mais reativo, formando assim as ERO.^{16, 19, 26,69-73}. As ERO são os fatores-chave para a eficiência terapêutica dos FS quando utilizado como mediadores da TFD em células tumorais^{16 e 20}. De acordo com Muehlmann et al. (2015)¹⁶, o FS AlFtCl apresenta elevado rendimento quântico para a produção de ERO quando associado a nanomemulsões. Neste presente estudo, foi verificada a eficiência da produção de ERO pelo FS AlFtCl associado à nanoemulsão em meio aquoso pelo método descrito por Spiller et al. (1998), utilizando o reagente 1,3-difenil-isobenzofurano (DBF). O DBF é um reagente degradado pelo oxigênio singlete e outras ERO, o que pode ser mensurado pela queda na intensidade de seu pico de absorbância em comprimento de onda de 411 nm^{13, 16 e 60}. Conforme observado, a capacidade de produção de ERO por NE-AlFtCl permaneceu estável durante o período de 48 meses (**Figura 31**), indicando que esta formulação deve manter sua eficácia na TFD durante este período sob as condições de armazenamento descritas nos métodos.

Os resultados supracitados reforçam a ideia de que a associação de FS hidrofóbicos, como FS AlFtCl, a nanoestruturas dispersíveis aperfeiçoa a sua atividade por manter suas propriedades fotofísicas e fisico-químicas em meios aquosos^{10, 13, 16 e 22}. Além disso, idealmente, a nanoestrutura deve aumentar o acúmulo do FS em tecidos ou células-alvo^{10,23 e 29}, e levar a uma distribuição intracelular do FS que melhore o seu desempenho terapêutico^{19,26, 29, 40, 44, 73-75}. Weijer et al. (2015)²⁹ ressaltam que a internalização de FS livres por meio de difusão livre ou de vias endocíticas de células eucarióticas, seguida de sua distribuição pelas estruturas subcelulares, é afetada pelas propriedades fisico-químicas destas moléculas²⁹. Ainda, caso o FS seja veiculado por alguma nanoestrutura, seu destino intracelular pode ser alterado em relação ao da mesma molécula livre¹⁰. O FS AlFtCl é hidrofóbico e se agrega em meios aquosos, o que dificulta a sua internalização por células^{16 e 17}. Além disso, o destino intracelular do FS afeta sobremaneira sua eficácia e mesmo a ativação do sistema imunitário contra antígenos tumorais após a aplicação da TFD. Neste contexto, a nanotecnologia tem sido uma ferramenta útil para melhorar as diferentes características de fármacos anticâncer, não somente para atingir a massa tumoral, mas também para alcançar determinados compartimentos subcelulares, ou seja, organelas específicas de células cancerosas, conforme descrito em uma revisão produzida por nosso grupo de pesquisa¹⁰.

Para tanto, o objetivo principal deste estudo foi aprofundar o conhecimento sobre os mecanismos de ação da TFD-NE-AIFtCl, mais especificamente aqueles ligados às vias de morte celular e de ativação do sistema imunitário tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Para tanto, o primeiro passo foi verificar o perfil de internalização do NE-AIFtCl pelas células 4T1. Desta forma, foi padronizado o tempo de 15 minutos de exposição à formulação e feita análise de colocalização do AIFtCl com as principais organelas celulares em diferentes tempos pós-exposição. Assim, foi observada uma rápida internalização do FS AIFtCl pelas células 4T1 após os 15 minutos de exposição à NE-AIFtCl (1 μ M), analisados nos tempos 0, 15, 30, 45, 105 e 225 minutos (T0, T15, T30, T45, T105 e T225, respectivamente) (**Figura 32**). Células não expostas à NE-AIFtCl foram utilizadas como controle (barra de cor preta – \emptyset). Para todos os tempos analisados, foi observada uma internalização significativa ($p < 0,01$) do FS AIFtCl pelas células 4T1 em comparação com o controle. Porém, nos menores tempos, T0 e T15, foi observada maior intensidade de fluorescência, não sendo observada diferença significativa entre esses dois tempos (**Figura 32**). Já na análise de comparação de T0 com T30, T45, T105 e T225, foi observada uma internalização significativamente maior ($p < 0,05$) do FS AIFtCl pelas células 4T1.

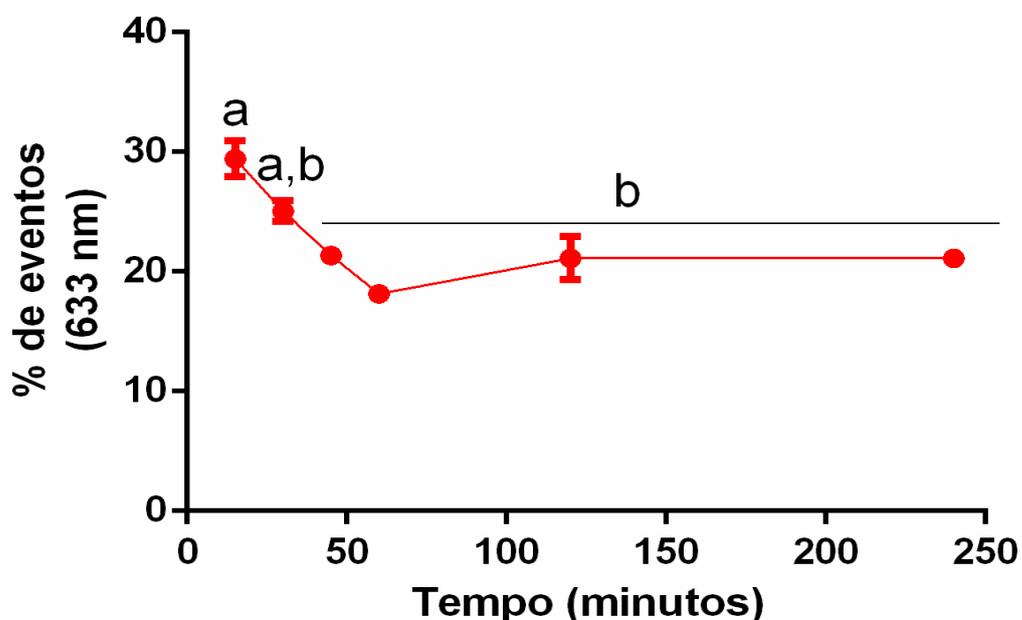


Figura 32: Intensidade de fluorescência de AIFtCl em células 4T1 expostas à NE-AIFtCl. A intensidade de fluorescência foi acessada utilizando laser de 633 nm e a detecção foi realizada entre 650 e 700 nm. Letras iguais correspondem grupos sem diferença estatística. Dados plotados como \pm Erro Padrão da Média (EPM) para triplicatas.

Após a verificação da internalização do FS AlFtCl, o passo seguinte foi a avaliação das vias endocíticas envolvidas na internalização da NE-AlFtCl pelas células 4T1. Desta forma, os resultados obtidos por meio de citometria de fluxo (excitação em 633 nm e emissão em 680 nm) com a exposição das células 4T1 aos inibidores de endocitose, a 4 °C por 30 minutos antes da exposição à NE-AlFtCl, estão representados na **Figura 33**. Como controle positivo foram utilizadas células expostas à NE-AlFtCl sem inibidores e como controle negativo células que não foram expostas à NE-AlFtCl nem aos inibidores de endocitose (Ø). Somente foi observada diferença significativa da quantidade de FS AlFtCl interiorizada quando as células foram expostas ao inibidor nistatina ($p < 0,01$).

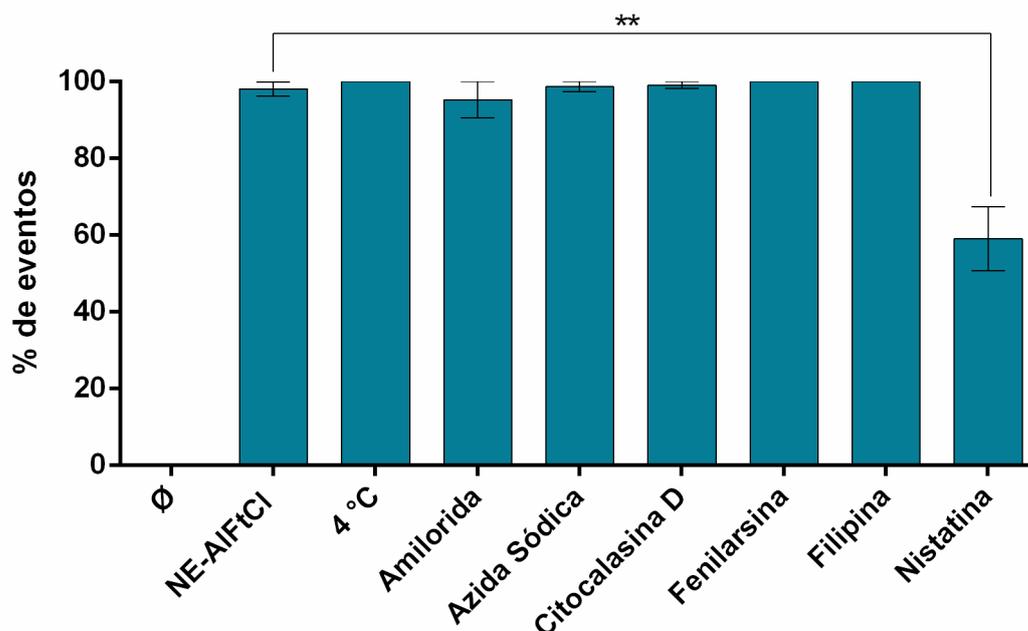


Figura 33: Internalização do AlFtCl (NE-AlFtCl) por células 4T1 expostas a diferentes inibidores de endocitose. Células 4T1 sem exposição à NE-AlFtCl e inibidores de endocitose foram utilizadas como controle negativo (Ø); células 4T1 expostas à NE-AlFtCl por 15 minutos sem inibidores de endocitose foram utilizadas como controle positivo (NE-AlFtCl); os inibidores utilizados foram: 4 °C; Amilorida; Azida Códica; Citocalasina D; Fenilarsina; Filipina e Nistatina. Sobrescrito (*) significa diferença significativa $p < 0,01$. Dados plotados como \pm EPM para triplicatas.

A avaliação da endocitose de FS associados à NP têm ganhado destaque em pesquisas relacionadas ao câncer, pois a via endocítica é uma variável importante no mecanismo de ação do fármaco^{10 e 29}. Células tratadas com inibidores de diferentes vias endocíticas e expostas à NE-AlFtCl foram usadas para este estudo. A azida sódica inibe

a endocitose por vias dependentes de ATP⁷⁶; a filipina e a nistatina são inibidores da via por caveolina; o óxido de fenilarsina inibe vias mediadas por clatrina; e a citocalasina D e a amilorida são inibidores de pinocitose.⁷⁷ O uso dos inibidores supracitados para bloquear vias de endocitose é amplamente mencionado na literatura⁷⁷⁻⁸². No entanto, a toxicidade destes inibidores contra células 4T1 não é descrita. Diante disso, a exposição das células 4T1 a diferentes concentrações de inibidores por 30 minutos, tempo descrito como suficiente para inibição das vias endocíticas desempenhada por cada inibidor^{77 e 78}. Os inibidores azida sódica e filipina demonstraram perfil citotóxico em todas as concentrações testadas, apresentando diferenças significativas quando comparadas ao controle de células não expostas aos inibidores. Já os inibidores nistatina (40 e 80 µg/mL) e amilorida (0,2 e 0,4 mM), foram significativamente citotóxicos apenas nas concentrações mais altas. Os outros dois inibidores utilizados, óxido de fenilarsina e citocalasina D, não apresentaram citotoxicidade significativa para todas as concentrações utilizadas (conferir em **Anexo I**). Diante desses resultados, foram escolhidas as concentrações de cada inibidor que ocasionou menor efeito citotóxico nas células, levando também em consideração concentrações que executam o efeito^{77 e 78}. No entanto, o inibidor nistatina foi o único que reduziu a internalização do FS AlFtCl quando identificado por citometria de fluxo (laser - 633 nm). Esse inibidor age por meio da depleção do colesterol existente na membrana da célula e que é fundamental para a formação das cavéolas⁷⁹. Lajoie e Nabi (2007)⁸⁰ ressaltam que a endocitose mediada por cavéola é feita pela invaginação na membrana plasmática em forma de balão com diâmetro entre 50-100 nm. Santos et al. (2011)⁸¹, destacam ainda que o inibidor nistatina age por meio da depleção do colesterol existente na membrana da célula e que é fundamental para a formação das cavéolas^{79 e 81}. Quando utilizado o inibidor nistatina, foi observada uma redução de 40,95±11,06% na internalização celular do FS AlFtCl se comparado ao controle positivo (células expostas à NE-AlFtCl sem inibidores). Esses resultados sugerem que a internalização utilizada pelas células 4T1 pode envolver, em certa extensão, a via das caveolinas. No entanto, este resultado não é corroborado pelo efeito observado com o uso da nistatina, a qual também inibe a via das caveolinas, mas por meio do bloqueio das quinases envolvidas nesta via^{79 e 81}. Alguns autores sugerem que endocitose por caveolinas é uma via de escape à degradação lisossomal⁷⁹, o que poderia reduzir a degradação dos componentes da NE-AlFtCl internalizada^{82 e 87}. Porém, o provável mecanismo de internalização da NE-AlFtCl deve ser permeação através da membrana, de maneira independente, de vias de endocitose, já que a sua permeação foi

mantida mesmo quando as células foram expostas à azida ou à temperatura de 4 °C. Essa fácil permeação pode ser relacionada a um efeito porador da membrana exercido pela nanoemulsão⁸⁸⁻⁹⁰.

O passo seguinte neste trabalho foi avaliar a localização subcelular do AlFtCl nas células 4T1 expostas à NE-AlFtCl como descrito nos métodos utilizando o programa *ImageJ*^{63, 87 e 91}. Para tanto, o perfil de colocalização subcelular obtida do FS AlFtCl nas organelas das células 4T1: lisossomos, retículo endoplasmático, mitocôndria e núcleo estão representadas na **Figura 34** e as imagens obtidas com microscópio confocal, utilizadas para quantificar o perfil de colocalização subcelular podem ser conferidas em **Anexo II**. Desta forma, os tempos de T0 e T15 demonstraram as maiores porcentagens de retenção do FS AlFtCl nas subunidades das células 4T1, sendo verificados valores de 86,93 e 84,93%, respectivamente. No T0, foi observado que o AlFtCl ficou retido em maior concentração na mitocôndria ($33,03 \pm 10,21\%$), seguido dos lisossomos ($30,24 \pm 2,99\%$), RE ($18,59 \pm 1,02\%$) e núcleo ($5,07 \pm 2,34\%$) (**Figura 34**, 1ª coluna: 0 minuto). No tempo de T15, o maior percentual de retenção manteve-se na mitocôndria ($36,79 \pm 7,56\%$), seguido do RE ($25,66 \pm 5,28\%$), lisossomos ($17,87 \pm 3,09\%$) e núcleo ($4,22 \pm 2,68\%$) (**Figura 34**, 2ª coluna: 15 minutos). No núcleo, foi observada uma menor retenção significativa ($p < 0,05$) comparada com as outras organelas nos dois tempos supracitados. Verificou-se também que no tempo de 0 minuto pós-exposição nos lisossomos e no retículo endoplasmático, foi observada uma diferença significativa ($p < 0,05$) da retenção do AlFtCl entre as organelas. Essa mesma diferença foi observada entre lisossomos e mitocôndria no tempo de 15 minutos pós-exposição.

A 3ª coluna da **Figura 34** é referente ao tempo de T30 pós-exposição das células 4T1 à NE-AlFtCl. Para esse tempo foi observada uma diminuição da retenção do FS AlFtCl nas organelas analisadas, apresentando um perfil de internalização do AlFtCl de 74,04%. Em relação às duas primeiras colunas, essa diminuição foi de 12,89 e 10,91% em relação aos tempos de T0 e T15, respectivamente. O perfil de retenção se manteve nas mitocôndrias ($22,15 \pm 3,27\%$), seguido dos lisossomos ($21,15 \pm 6,21\%$), RE ($19,28 \pm 9,30\%$) e núcleo ($11,47 \pm 2,56\%$). No tempo de T15, somente entre a mitocôndria e o núcleo foi observada diferença significativa da colocalização do AlFtCl ($p < 0,05$).

Em T45, T105 e T225, houve diminuição da intensidade de fluorescência do AlFtCl nas células 4T1, de 46,66; 35,47 e 45,65%, respectivamente, em relação ao tempo de 0 minuto (1ª coluna). Nos tempos de 45 e 105 minutos, houve maior retenção do

AlFtCl nos lisossomos ($17,02 \pm 6,21\%$ e $19,23 \pm 10,21\%$), seguido da mitocôndria ($9,71 \pm 7,36\%$ e $13,28 \pm 3,54\%$), RE ($10,79 \pm 5,47\%$ e $10,19 \pm 3,33\%$) e núcleo ($2,73 \pm 2,46\%$ e $8,71 \pm 2,01\%$), respectivamente. Sendo que, no tempo de 45 minutos pós-exposição, foram verificadas diferenças significativas ($p < 0,05$) nos lisossomos, em comparação com a mitocôndria e o núcleo (**Figura 34**, 4ª coluna). No tempo de 105 minutos pós-exposição, foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) nos lisossomos em comparação com o RE e núcleo (**Figura 34**, 5ª coluna). Já o tempo de 225 minutos pós-exposição apresentou maior retenção do AlFtCl no RE ($13,79 \pm 3,54\%$), seguido dos lisossomos ($11,91 \pm 3,81\%$), mitocôndria ($9,37 \pm 4,48\%$) e núcleo ($6,27 \pm 3,08\%$). Comparando a colocalização do AlFtCl entre as diferentes organelas no tempo de 225 minutos, foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) somente para RE e núcleo (**Figura 34**, 6ª coluna).

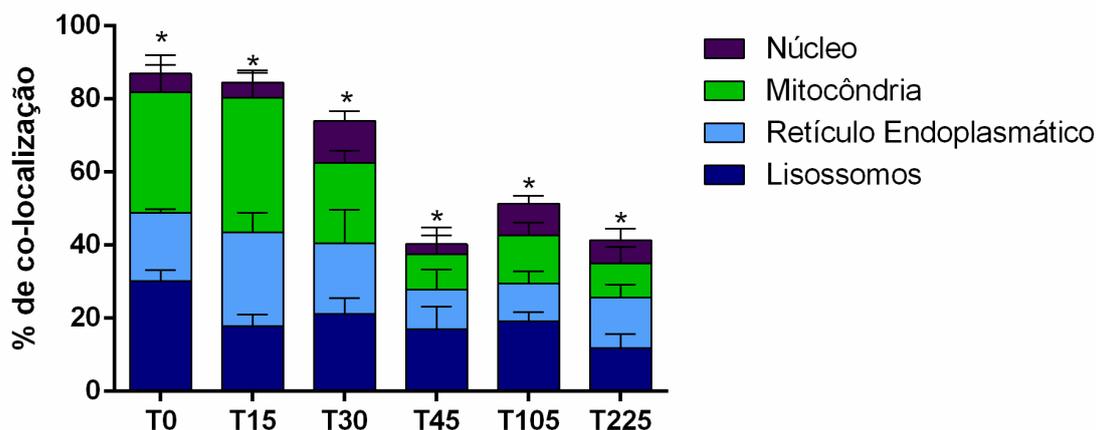


Figura 34: Perfil de internalização e colocalização da NE-AlFtCl nas células 4T1 marcadas para lisossomos, retículo endoplasmático, mitocôndria e núcleo. **A** - barras na cor azul claro representam a colocalização nos lisossomos; azul escuro, no retículo endoplasmático; verde, na mitocôndria; e em roxo, no núcleo. O eixo x refere-se ao tempo de análise após as células serem expostas à NE-AlFtCl por 15 minutos. Sobrescrito (*) indica correlação estatisticamente significativa, $p < 0,05$. Dados plotados como \pm EPM para quintuplicatas.

Considerando-se que ainda não há na literatura uma descrição detalhada do perfil de internalização, retenção e localização do FS AlFtCl nanoestruturado (NE-AlFtCl) em organelas de células cancerosas, o presente trabalho torna-se uma referência importante na área de TFD. De fato, conforme descrito nos resultados, o perfil de retenção do FS AlFtCl em lisossomos, retículo endoplasmático, mitocôndria e núcleo foi afetado pelo tempo após a exposição à formulação, mostrando que há uma dinâmica de

distribuição intracelular do FS internalizado (conferir em **Anexo II**). Quando avaliamos tempo T0, a retenção do FS AlFtCl foi maior na mitocôndria, seguida por lisossomos, RE e no núcleo (**Figura 34**). Para os tempos T15 e T30, a maior retenção do FE AlFtCl se manteve nas mitocôndrias, enquanto caiu nos lisossomos e aumentou no RE. No núcleo foi observada a menor retenção em todos os tempos avaliados, conforme resultados previamente publicados na literatura.^{16 e 23} A maior retenção observada nas mitocôndrias das células 4T1 também foi observada no estudo feito por Weijer et al. (2015)²⁹, no qual foi demonstrado que a exposição de células A431 por 10 minutos à zinco-ftalocianina (ZnFt) incorporada a lipossomos catiônicos levou a uma intensa colocalização com mitocôndrias após 30 minutos do tempo de exposição²⁹. Neste mesmo estudo, observaram também que, após exposição por 4 horas ou 24 horas, o FS apresentou-se difusamente distribuído pelo citoplasma das células. Lan et al. (2016)⁷³ também demonstraram que células HepG2 expostas por 2 horas ao ZnFt (8 µM) estabilizado com Cremophor® apresentaram-se colocalizada tanto com mitocôndrias quanto com lisossomos^{73 e 86}. Mroze et al. (2011)⁹² ressaltam ainda que derivados de ftalocianina, quando internalizados por células eucarióticas, são preferencialmente retidos na mitocôndria e/ou nos lisossomos. Outros estudos também demonstraram que FS em sua forma livre ou associados NPs são preferencialmente retidos nas mitocôndria e lisossomos, corroborando os achados desse presente estudo^{29, 44, 73-75}. Allen e et al. (1991)⁹³ reforçam ainda que os fatores que influenciam a localização subcelular, principalmente na mitocôndria ou nos lisossomos, estão relacionados à carga positiva líquida e às características anfifílicas de certos FS. O estudo relata ainda que os FS aniônicos são preferencialmente retidos nos lisossomos, enquanto os FS catiônicos são dirigidos por eletroforese para a mitocôndria, já que as mitocôndrias possuem um espaço interno muito mais negativamente carregado que o de outras organelas^{29, 94 e 95}.

A diminuição significativa na retenção do FS AlFtCl pelos lisossomos pode estar relacionada a dois fatores: **1)** dependendo da via de endocitose, pode ocorrer a degradação do NE-AlFtCl pelas enzimas lisossomais; **2)** pode ter ocorrido a liberação do NE-AlFtCl contido nos lisossomos para o citosol. Vale ressaltar ainda que a via de endocitose identificada relatada neste estudo pode ter influenciado diretamente nessa diminuição. Nishiyama et al. (2005)⁹⁶ estudaram um método para a indução da fuga endossomal com associação de FS AlFtCl a NPs poliméricas.⁹¹ Eles observaram que, após a irradiação do FS, ocorreu a produção de EROs e, conseqüentemente, a ruptura da vesícula endossomal, liberando o seu conteúdo para o citosol. Evitar as vias

endolisossomais é um dos paradigmas para o desenvolvimento de nanoestruturas que atinjam o retículo endoplasmático, a mitocôndria e o complexo de Golgi, uma vez que os lisossomos são organelas envolvidas na degradação de vários materiais endocitados – como já referenciado nesta seção. O resultado da diminuição do FS AlFtCl nos lisossomos sugere que o FS AlFtCl transitou dos lisossomos para o citosol, sendo, em seguida, retido pelo retículo endoplasmático e mitocôndria.^{10, 29 e 43} O escape do FS AlFtCl dos lisossomos para o citosol pode acontecer pelo rompimento dos lisossomos pelo surfactante que compõe a NE-AlFtCl. Porém, esta hipótese ainda resta a ser estudada experimentalmente.

No núcleo das células 4T1 foi verificada a menor retenção do FS AlFtCl em todos os tempos avaliados. Outros estudos também demonstraram a baixa afinidade do AlFtCl pelo núcleo^{13, 16, 22, 71,74 e 75}. De acordo com Muehlmann et al. (2014)¹⁷, células MCF-7 e 4T1 expostas ao FS AlFtCl associado à NPs poliméricas não foram retidas pelo núcleo, sendo apenas verificada uma alta deposição do FS no citoplasma após 15 minutos de exposição. Macdonald e Dougherty (2001)⁹⁷ ressaltam ainda que a baixa retenção de FS no núcleo é considerada favorável, uma vez que, danos oxidativos diretos ao DNA poderiam ocasionar alterações genéticas que potencialmente favoreceriam o desenvolvimento de novos clones de células neoplásicas eventualmente resistentes à TFD ou a quimioterápicos⁹⁸.

Nos tempos de T45 e T105 foram observadas as menores concentrações de FS AlFtCl nas células 4T1, sendo que, na mitocôndria e no retículo endoplasmático, essas diminuições foram significativas em relação ao tempo T15. Já nos lisossomos, a intensidade de retenção do FS AlFtCl não apresentou alterações significativas e no núcleo foi demonstrado no tempo T45 a menor deposição do FS AlFtCl. Baseando-se na literatura, Taiten et al. (2003)⁴³ observaram em células MCF-7 expostas ao FS Foscan[®] – 0,1 µg/mL (meta-tetra(hidroxifenil)clorina) – uma baixa retenção nos lisossomos e na mitocôndria após 3 horas de exposição, apresentando também uma alta deposição no retículo endoplasmático e no complexo de Golgi avaliados pelo mesmo tempo.⁴³ Um outro estudo, feito por Marchal et al. (2007)⁹⁸ demonstrou um resultado bastante similar ao discutido acima. O Foscan[®] – na concentração de 0,25 µg/mL – foi mais retido pelo retículo endoplasmático nas células MCF-7, juntamente com uma baixa retenção na mitocôndria. Essa mesma retenção foi observada quando avaliada 3, 12 e 24 horas após a exposição¹⁰⁰. No presente estudo, o maior tempo de exposição avaliado foi o tempo de T225 (4 horas), nesse tempo foram apresentadas as menores concentrações do FS AlFtCl

nos lisossomos e na mitocôndria, corroborando o estudo supracitado. No retículo endoplasmático, no tempo de T225, também houve uma redução significativa da concentração de FS AlFtCl. Segundo Garg et al. (2016)⁴¹, estudos relacionados à localização subcelular de FS no retículo endoplasmático têm atraído bastante interesse de pesquisas relacionadas à ativação de morte celular imunogênica.^{20, 39-41 e 51}

Os perfis apresentados pelas células 4T1 em relação à internalização, à via de endocitose e à retenção subcelular do FS AlFtCl associado à NE foram fundamentais para o melhor entendimento dos diferentes protocolos de TFD neste estudo. Estudos da TFD *in vitro* e *in vivo* visam a não citotoxicidade dos FSs na sua forma livre ou mesmo aqueles associados às nanopartículas^{13, 16 e 29}. Sendo assim, o efeito citotóxico da TFD-NE-AlFtCl na viabilidade das células 4T1 foi verificado a fim de obter as concentrações citotóxicas que ocasionaram 50 e 90 % de mortes das células. Os resultados obtidos estão representados na **Figura 35** correspondentes aos tempos T0, T15, T30, T45, T105 e T225 pelas letras **A, B, C, D, E e F**, respectivamente. Não foi observada morte em intensidade estatisticamente significativa nas células 4T1 mantidas no escuro após exposição a todas as concentrações de NE-AlFtCl (**Figura 35, A-F** linhas de cor preta). Este resultado é positivo, visto que sistemas fotossensibilizantes devem ser inócuos na ausência de luz^{13, 16, 22, 23, 29 e 96}. No entanto, quando as células foram irradiadas após a exposição à NE-AlFtCl, foram observadas diminuições significativas na viabilidade celular de maneira dependente da concentração de NE-AlFtCl (**Figura 35, A-F** linhas azuis). No estudo realizado por Muehlmann et al. (2015)¹⁶, foi verificado que a exposição de células MCF-7 e MCF-10A a diferentes concentrações de NE-AlFtCl e irradiadas por 10 minutos levou a uma diminuição significativa de sua viabilidade, de maneira dependente da concentração de FS AlFtCl¹⁶ corroborando os resultados aqui apresentados. Outros estudos também demonstraram que o FS AlFtCl associado a diferentes tipos de nanopartículas levou a uma diminuição na viabilidade tanto de células tumorais quanto de não tumorais quando expostas a luz^{16, 17 e 22}.

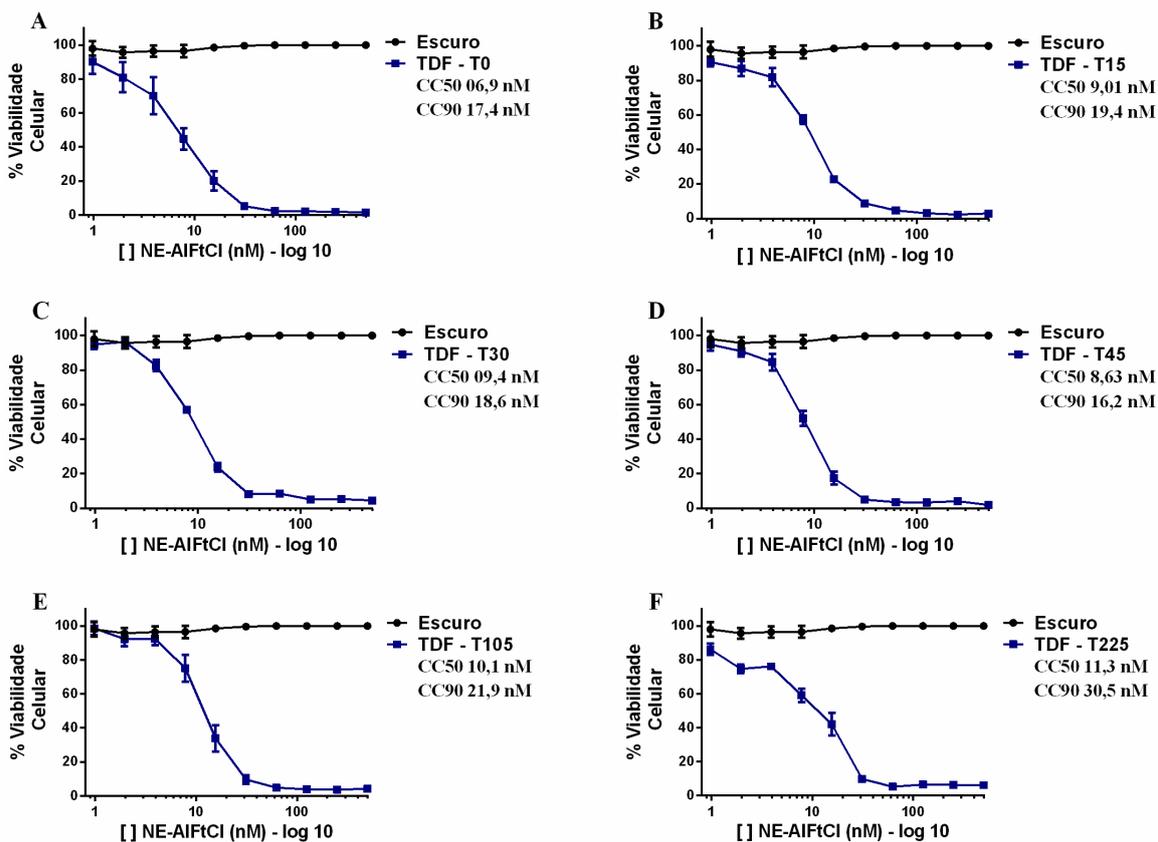


Figura 35: Viabilidade de células 4T1 24 horas após a aplicação de diferentes concentrações de NE-AIFtCl como mediadora da TFD. **A** - controle de células 4T1 expostas a diferentes concentrações de NE-AIFtCl mantidas no escuro (linha preta – controle referente a todos os tratamentos – **B, C, D, E e F**) ou aplicação de NE-AIFtCl seguida de irradiação por 10 minutos com luz de comprimento de onda de 660 nm e fluência de 25,88 J/cm² (TFD-NE-AIFtCl). Nos grupos que receberam TFD-NE-AIFtCl, as células foram primeiramente expostas à NE-AIFtCl por 15 minutos, e então mantidas no escuro até o momento em que a irradiação foi aplicada, nos tempos especificados nos gráficos: **A**) 0 minutos; **B**) 15 minutos; **C**) 30 minutos; **D**) 45 minutos; **E**) 105 minutos; e **F**) 225 minutos. O eixo x refere-se ao tempo de irradiação após 15 minutos de exposição das células a diferentes concentrações de NE-AIFtCl. Os subscritos (*), (**) e (***) indicam diferença estatisticamente significativa, $p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente. Dados plotados como \pm EPM para triplicatas. Eixo Y representa a % de viabilidade celular e X representa as diferentes concentrações de NE-AIFtCl em nM.

Com os resultados obtidos em relação ao efeito citotóxico da TFD-NE-AIFtCl nas células 4T1, foi possível calcular a concentração citotóxica que ocasionou a morte de 50% e 90% das células (CC50 e CC90, respectivamente), os resultados estão descritos no **Figura 36**. Apenas o tempo de 45 minutos não apresentou diferença significativa quando comparados os valores de CC50 (colunas brancas) com CC90 (colunas cinzas). Entretanto, foram identificadas diferenças significativas ($p < 0,01$) entre as concentrações de CC50 e CC90 para os demais tempos analisados.

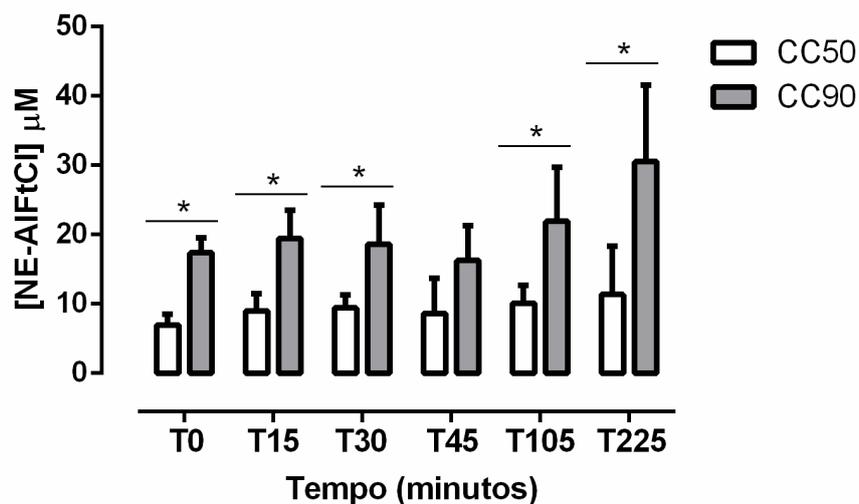


Figura 36: Diferentes concentrações citotóxicas que ocasionaram morte de 50% e de 90% das células 4T1 após a exposição à NE-AIFtCl por 15 minutos seguida da irradiação nos tempos representados no *eixo x* (TFD-NE-AIFtCl).

Em um estudo feito por Muehlmann et al. (2011)²², observou-se que, em células MCF-7 e 4T1 expostas à FS AIFtCl associado à NPs poliméricas seguida de irradiação, CC50 de 0,3 e 1,8 µM, respectivamente. De acordo com Radomska-Soukharev (2007)⁹⁸, a estabilidade das nanopartículas é essencial para preservar as propriedades de FS carregados. Sendo assim, as baixas CC50 encontradas nesse estudo em comparação com de Muehlmann et al. (2011)²², estão diretamente relacionadas à eficiência da nanoemulsão utilizada¹⁷.

A citotoxicidade da TFD-NE-AIFtCl sob diferentes densidades de energia (J/cm²) também foi avaliada. Os resultados demonstraram que apenas na menor fluência utilizada, de 2,54 J/cm² (referente a um minuto de irradiação), não houve diminuição significativa na viabilidade das células 4T1 quando comparadas com o controle representado pelo eixo Y (**Figura 37, A-F**). Em contrapartida, as demais fluências utilizadas apresentaram diferenças significativas ($p < 0,01$) quando comparadas com o controle, demonstrando uma maior citotoxicidade à medida que o tempo de irradiação, e consequentemente a fluência, foi aumentada. Como esperado^{17, 19,29,44 e 85}, a redução na viabilidade celular foi proporcional à dose de energia utilizada, maior a dose aplicada e consequentemente maior efeito citotóxico nas células (**Figura 37**). De acordo com Muehlmann et al. (2011)¹⁷, a variação da dose de energia influenciou diretamente na porcentagem de células mortas bem como na via de morte utilizada após a submissão a TFD.

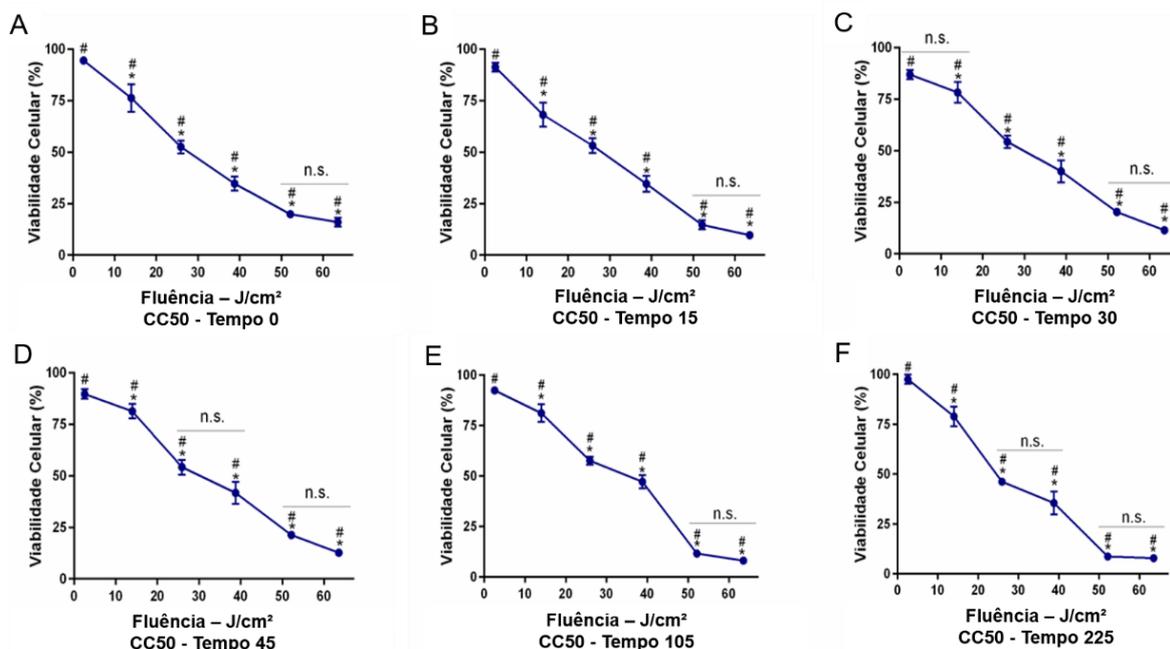


Figura 37: Viabilidade celular de 4T1 sob diferentes densidades de energia (fluência J/cm^2) expostas às CC50 15 minutos e irradiadas após os tempos. **A)** CC50 T0 (6,99 nM); **B)** CC50 T15 (9,01 nM); **C)** CC50 T30 (9,44 nM); **D)** CC50 T45 (8,36 nM); **E)** CC50 T105 (10,13 nM); **F)** CC50 T225 (11,37 nM). NE-AIFtCl - nanoemulsões com cloreto de alumínio-ftalocianina; CC50 - concentração que ocasionou 50% de morte nas células. Subscritos (*) indica correlação estatisticamente significativa, $p < 0,01$, das diferentes fluências em relação ao controle (eixo Y); (#) indica correlação estatisticamente significativa, $p < 0,01$, entre as diferentes fluências testadas; n.s. indica que não houve diferença significativa. Os dados estão apresentados com média \pm E. P. M. para quintuplicatas.

A eficiência da TFD está relacionada tanto a dose de energia utilizada quanto à localização subcelular do FS, já que FS retidos no citoplasma danificam importantes estruturas de células cancerosas, apresentando uma alta citotoxicidade fotodinâmica^{16, 29} e⁹⁴. Vale ressaltar também que danos causados a organelas podem desencadear morte celular por apoptose, necrose ou autofagia⁹⁹. Muehlmann et al. (2011)¹⁷, demonstraram que células MCF-7 e 4T1 submetidas à TFD-NPs-AIFtCl sofreram morte celular por necrose e apoptose²². Ndhundhuma et al. (2011)⁴⁴ acrescentam ainda que a localização subcelular do FS AIFtCl pode influenciar no fator-chave para otimizar a TFD, sendo demonstrado que quando o FS AIFtCl retido na mitocôndria das células HepG2, foi observada morte por apoptose, porém com maior retenção nos lisossomos foi observada a indução de uma resposta necrótica e apoptótica^{22 e 44}.

No presente estudo, a avaliação de qual ou quais vias de morte desencadeada pelos diferentes protocolos da TFD-NE-AIFtCl foi avaliada. Vale ressaltar que o tratamento com à TFD para o tempo T15 (CC50 e CC90) foi escolhido devido a maior

retenção de FS AlFtCl no retículo endoplasmático quando avaliado por confocal (**Figura 37**). Baseando-se na literatura, o estresse no retículo endoplasmático ocasionado pela TFD tanto desencadeia morte por apoptose nas células, como essa via de morte está intimamente relacionada também ao desencadeamento MCI pela emissão de DAMP^{19, 20, 24-28, 40-42}.

No entanto, com a verificação da contagem de células pela marcação em diferentes cores, como demonstrado na **Figura 38**, foi possível comparar a proporção de células em apoptose (barras alaranjadas) ou em necrose (barras avermelhadas) nos diferentes tratamentos aplicados e os resultados estão esboçados na **Figura 39**.

Para tanto, foi verificado que os tratamentos com MTX e TFD-NE-AlFtCl 9,01 nM – 25 J/cm² apresentaram maiores números de células apoptóticas que necróticas, não sendo observada diferença significativa entre eles (**Figura 39**). Para a TFD-NE-AlFtCl 9,01 nM 25 J/cm² foi verificada uma porcentagem de 63,39% de células em apoptose e de 26,71% de células necróticas. Vale ressaltar ainda que, quando a dose de energia foi aumentada de 25 J/cm² para 67 J/cm² utilizando a mesma concentração de FS de 9,01 nM, foram observados valores contrários, sendo 57,45% de células necróticas contra 17,44% de células em apoptose. Com o aumento da concentração do FS AlFtCl de 9,01 nM para 19,4 nM e fluência de 25 J/cm², observou-se uma proporção de 74,93% de células necróticas para 19,31% de células apoptóticas. Além disso, quando alterada a fluência de 25 para 67 J/cm² também foi observada morte das células mais por necrose que apoptose sendo que: para 9,01 nM e fluência de 67 J/cm² a porcentagem de células necróticas foi de 75,6% para apenas 7,48% de células apoptóticas. Os controles utilizados como MTX para apoptose apresentaram 87,25% de células apoptóticas para 2,27% de células necróticas. E o controle para necrose aplicado de C/D apresentou quase 100% de células necróticas (**Figura 39**). Esses tratamentos com MTX e C/D são amplamente utilizados como controles de apoptose e necrose, respectivamente^{19,20 e 26}.

Além do mais, a utilização do teste AO/PI para identificação de DNA fragmentado permitiu uma compreensão prévia do tipo de morte que foi desencadeada pelos diferentes protocolos da TFD-NE-AlFtCl. A partir desses resultados, o próximo passo foi identificar a presença da exposição de fosfolípídeos na membrana como as fosfatidilserinas, sendo essa exposição um indicativo de morte celular por apoptose^{22, 44 e 65}.

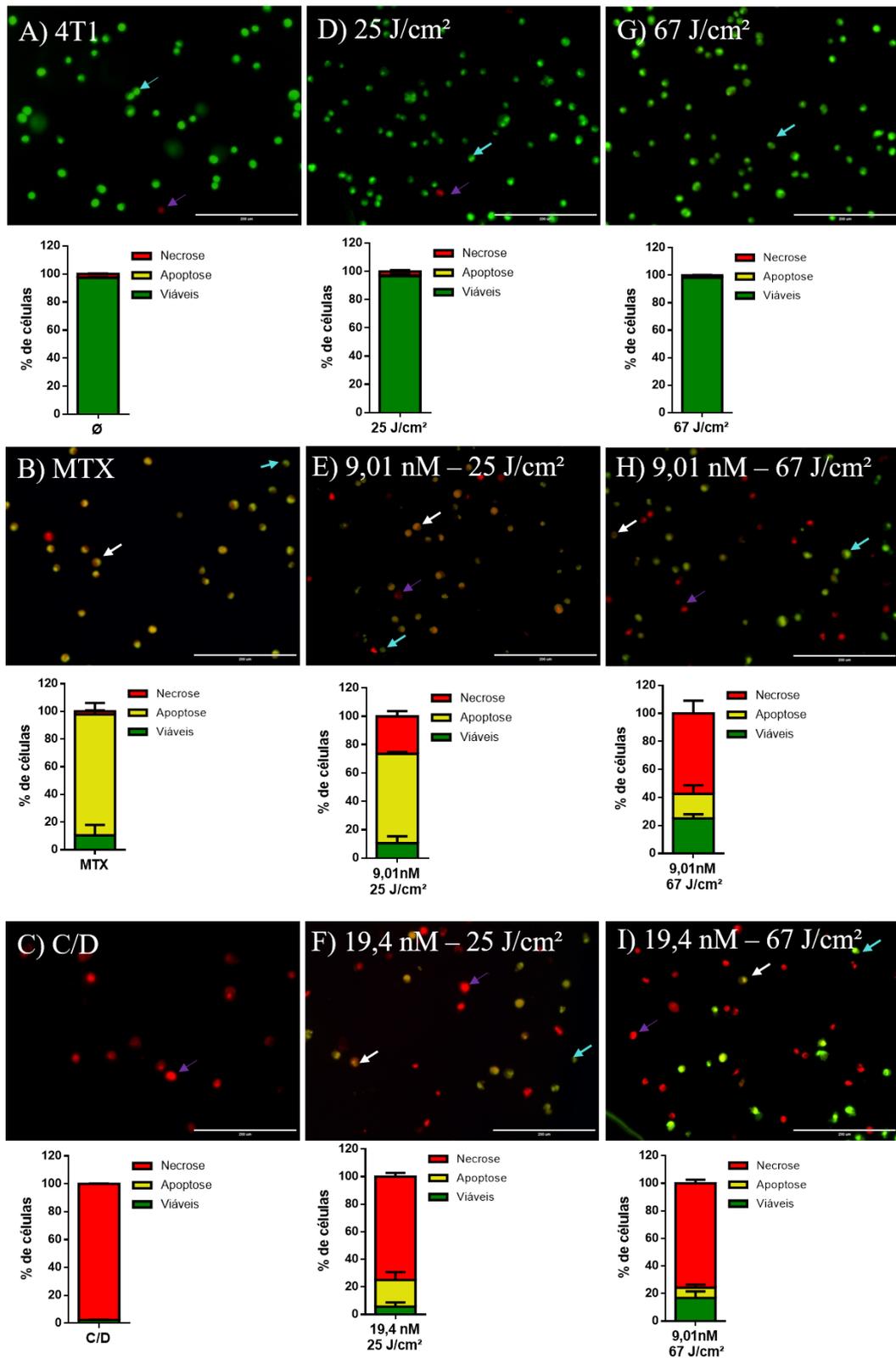


Figura 38: Marcação pelo método AO/PI das células 4T1 após 4 horas da aplicação dos diferentes protocolos da TFD-NE-AIFtCl. **A)** controle sem tratamento; **B)** controle apoptose tratadas com MTX (1,5 μM); **C)** controle necrose tratadas com C/D (3X); **D)** expostas ao LED 660 nm por 10 minutos (25 J/cm²); **E)** TFD-NE-AIFtCl 9,01 nM – 25 J/cm²; **F)** TFD-NE-AIFtCl 19,4 nM – 25 J/cm²; **G)** expostas ao LED 660 nm por 25 minutos (67 J/cm²); **H)** TFD-NE-AIFtCl 9,01 nM – 67 J/cm²; e **I)** TFD-NE-AIFtCl 19,4 nM – 67 J/cm². Gráficos ao lado de cada letra representam porcentagem de células, sendo: coluna verde células viáveis; laranja células apoptóticas, e vermelho células necróticas. As setas azuis são referentes às células

viáveis; setas brancas células apoptóticas, e setas roxas células necróticas. Os dados estão apresentados com média \pm E. P. M. para quintuplicatas.

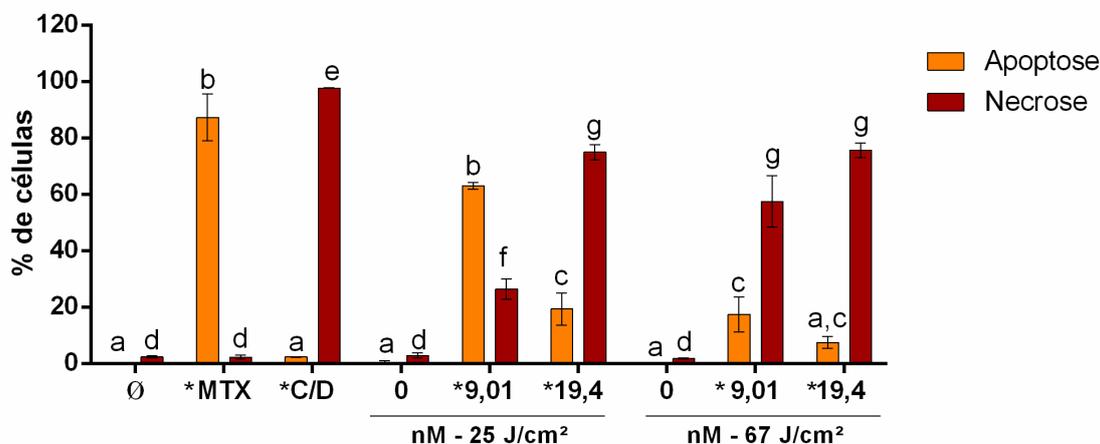


Figura 39: Avaliação via de morte pelo método AO/PI em células 4T1 submetidas a diferentes protocolos da TFD mediada pela NE-AIFtCl. Barras de cor alaranjada representam células apoptóticas e barras de cor vermelha escura representam porcentagem de células necróticas. Sobrescrito (*) representa diferença significativa para $p < 0,001$ em relação às células apoptóticas e necróticas do mesmo grupo. Letras iguais representam resultados sem diferenças significativas entre os grupos, sendo: **a, b e c** para células em apoptose e **d, e, f e g** células em necrose. Os dados estão apresentados com média \pm E. P. M. para quintuplicatas. Os dados estão apresentados com média \pm E. P. M. para quintuplicatas.

De acordo com Garg et al. (2016)¹⁹, a TFD pode promover a ativação de morte por apoptose por meio da ativação de caspases – do inglês *cysteine-dependent aspartate-specific proteases*. As caspases são capazes de sinalizar para apoptose e são responsáveis por clivar em subprodutos, como isso, levam à condensação e fragmentação nuclear, ativação de proteínas como BAX, PARP, p53, diminui a expressão de proteínas inibidoras de apoptose, como a Bcl-2, além de exposição de fosfolípidos na membrana, como as fosfatidilserinas, que serão responsáveis por executar uma sinalização para células do sistema imunitário^{40, 56 e 103}. No presente estudo o fosfolípido fosfatidilserina foi identificado exposto por células 4T1 submetidas aos diferentes protocolos da TFD-NE-AIFtCl após 24 horas do tratamento (**Figura 40**). As células submetidas aos tratamentos com TFD-NE-AIFtCl 9,01 nM – 25 J/cm² e MTX apresentaram maiores proporções significativas ($p < 0,001$) de apoptose quando comparadas com células em necrose. Vale ressaltar ainda que, comparando o tratamento utilizando a TFD-NE-AIFtCl 9,01 nM – 25 J/cm², foi significativamente mais eficiente para causar apoptose que a MTX utilizada como controle apoptose e todos os outros tratamentos ($p < 0,001$). Já os tratamentos com C/D e TFD-NE-AIFtCl 19,4 nM – 67 J/cm² apresentaram efeitos contrários ao supracitado, ocasionando nas células mais morte por necrose que por

apoptose, sendo observadas diferenças significativas dentro do mesmo grupo analisado e em relação a todos os outros tratamentos ($p < 0,001$) (**Figura 40**). Dessa forma esses resultados demonstram que a via de morte desencadeada pela TFD-NE-AIFtCl é dependente da dose de energia, sobremaneira da concentração do FS AIFtCl utilizado^{16, 17, 22, 23 e 56}.

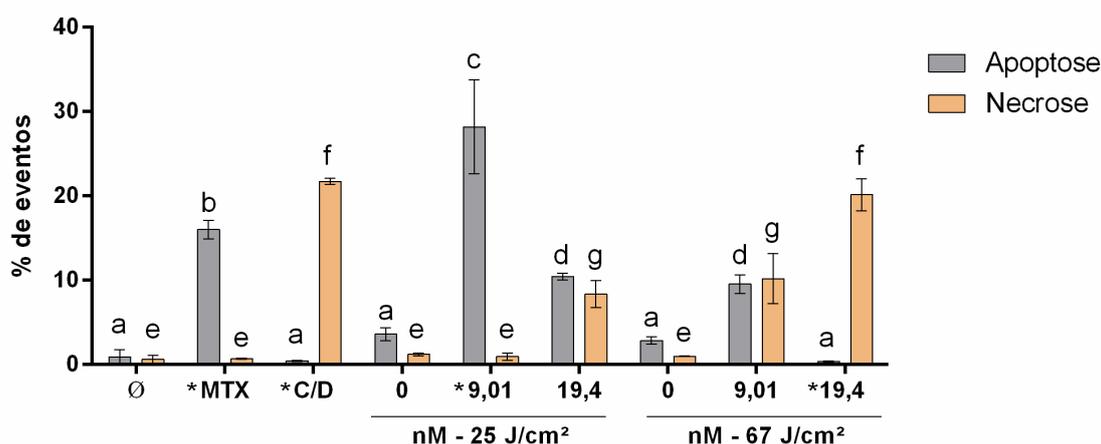


Figura 40: Avaliação via de morte pelo método Anexina V/PI em células 4T1 submetidas a diferentes protocolos da TFD mediada pela NE-AIFtCl. Barras de cor cinza representam células apoptóticas e barras de rosa claro representam porcentagem de células necróticas. Subscrito (*) representa diferença significativa para $p < 0,001$ em relação às células apoptóticas e necróticas do mesmo grupo. Letras iguais representam resultados sem diferenças significativas entre os grupos, sendo: **a,b,c e d** para células em apoptose e **e,f e g** células em necrose. Os dados estão apresentados com média \pm E. P. M. para quintuplicatas.

Células tumorais submetidas a protocolos da TFD sofrem estresse oxidativo por meio da produção de ERO que são formadas durante a exposição à luz de células com FS^{19, 26 e 51}. Sendo assim, a localização subcelular do FS pode influenciar diretamente na potencialização do efeito da TFD, uma vez alojado em organelas-chave como, por exemplo, retículo endoplasmático, mitocôndrias, complexo de Golgi, lisossomos e ou mesmo no citosol^{10, 19,20 e 51}. Como visto nesse estudo, o FS AIFtCl foi detectado em diferentes compartimentos da células 4T1, como mitocôndrias e RE e nos lisossomos. Essa retenção nas organelas anteriormente mencionadas foi essencial para análise do estresse oxidativo identificado neste estudo nas células 4T1 submetidas a TFD-NE-AIFtCl nas células 4T1 (**Figura 41**). O FS AIFtCl nanoestruturado apresentou alta capacidade de produzir ERO em meio aquoso, como previamente demonstrado^{16 e 17}, também sendo verificada essa no meio intracelular. Na **Figura 41**, representados os resultados referentes ao estresse oxidativo ocasionado pela TFD-NE-AIFtCl (1 μ M –

LED 660 nm) nas células 4T1. A marcação em verde representada pela imagem **A** é referente à produção das ERO com a marcação do reagente utilizado. Observou-se também que a concentração utilizada neste experimento ocasionou a destruição dos núcleos marcados em azul (**Figura 41 - B**).

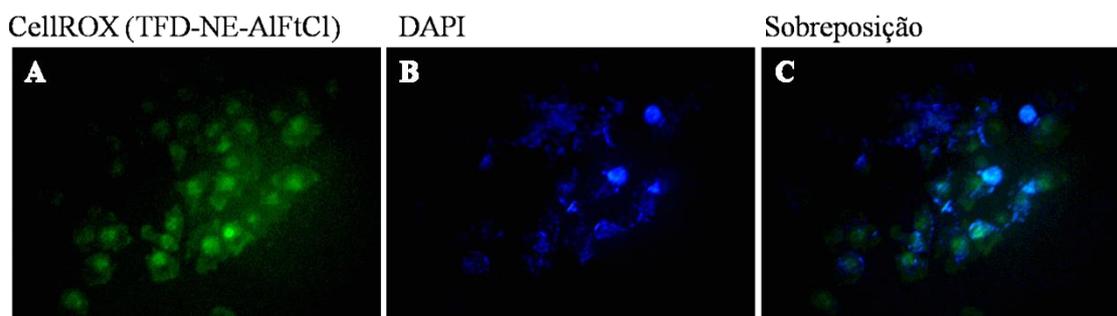


Figura 41: Imagens de microscopia de fluorescência da produção de espécies reativas causada pela TFD mediada pelas NE-AIFtCl (1 μM) irradiada com uma fluência de 25 J/cm^2 . **A** - Presença de estresse oxidativo marcado em verde pelo reagente CellROX[®] green na concentração de 5 μM ; **B** - marcação do núcleo com DAPI; **C** - sobreposição das imagens **A** e **B**. NE-AIFtCl: nanoemulsões com cloreto de alumínio-ftalocianina.

Como evidenciado nos resultados, a presença do FS AIFtCl nas células 4T1, seguida da sua fotoativação com o LED levou à produção de espécies reativas (**Figura 41**). Alexandratoua et al. (2005)¹⁰⁴ também demonstraram estresse oxidativo em células de fibroblasto humano submetidas à TFD-ZnPc livre (4,7 μM). Em um outro estudo, Garg et al. (2016)²⁹ observaram que o tratamento de células GL261 com Hyp-TFD produziu estresse oxidativo intracelular^{19,40-42}. O estresse oxidativo causado pelo tratamento com TFD em células tumorais pode induzir e potencializar a MCI em células cancerosas^{26 e 29}. Vale ressaltar ainda que há emissão de DAMPs durante e após o estresse oxidativo¹⁰⁵.

No presente, foi verificado o perfil de emissão de DAMP (Calreticulina; HSP70; HSP90; IL-1 β e HMGB1) pelas células 4T1 após serem submetidas aos diferentes protocolos da TFD-NE-AIFtCl. Para tanto, foi verificado que, logo após uma hora da TFD, ocorreu a emissão dos DAMPs: calreticulina; HSP70 e HSP90. Evento esse caracterizado por células apoptóticas em fase de MCI^{19,20,26-28, 40-42}.

Os resultados obtidos em relação à marcação da proteína HSP70 pelas células 4T1 submetidas a diferentes protocolos da TFD-NE-AIFtCl estão representados na **Figura 42** e as imagens utilizadas para quantificação da % de fluorescência emitida referente a HSP70 detectada estão demonstradas na **Figura 43**. Células 4T1 permeabilizadas com Triton X100 0,1% foram utilizadas como controle positivo para

marcação de HSP70 dentro das células e células sem permeação utilizadas como controle negativo para exposição da HSP70. Os resultados obtidos mostraram que as células submetidas à TFD-NE-AIFtCl 9,01 nM 25 J/cm² apresentaram exposição da HSP70 significativamente maior quando comparada com o controle de células não permeabilizadas e com os demais protocolos da TFD aplicados (**Figura 42**). Esses resultados foram similares aos apresentados pelas células submetidas ao tratamento com MTX – utilizado com controle positivo para expor HSP70. Para tanto, foi observado que as células submetidas a MTX (1,5 µM) e TFD-NE-AIFtCl 9,01 nM – 25 J/cm² apresentaram um maior perfil de marcação de HSP70, não sendo observada diferença significativa entre esses grupos.

No entanto, essa proporção da marcação de HSP70 para os grupos supracitados em relação aos demais foi significativa maior ($p < 0,05$) (**Figura 42**). Vale ressaltar ainda que as células submetidas aos tratamentos com MTX (1,5 µM) e TFD-NE-AIFtCl 9,01 nM – 25 J/cm² não foram permeabilizadas, sendo assim, a marcação da proteína HSP70 foi majoritariamente na superfície das células (**Figura 43 – linhas C e E**, respectivamente). Conferir imagens em maior aumento em **Anexo IV**.

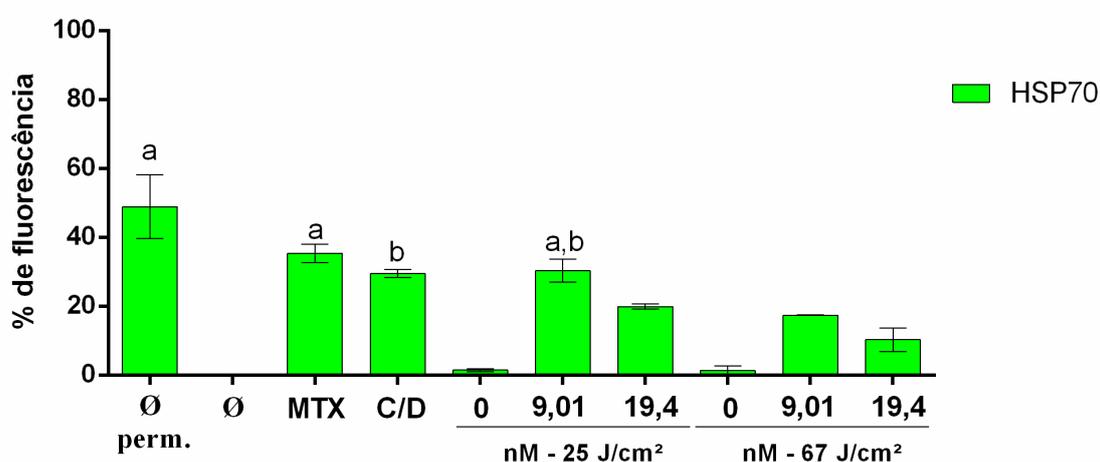


Figura 42: Expressão da marcação da proteína HSP70 por células 4T1 após diferentes protocolos da TFD-NE-AIFtCl. Ø perm. - células controle permeabilizadas com TritonX100 0,1%; Ø - células controle sem permeação; MTX –mitoxantrona (1,5 µM); C/D – células congeladas e descongelas (3X); 0, 9,01 e 19,4 nM – 25 J/cm² - concentração e fluência aplicada nas células; 0, 9,01 e 19,4 nM – 67 J/cm² - concentração e fluência aplicada nas células. Letra iguais indicam que não houve diferença estatística. Dados plotados como ± EPM para triplicatas.

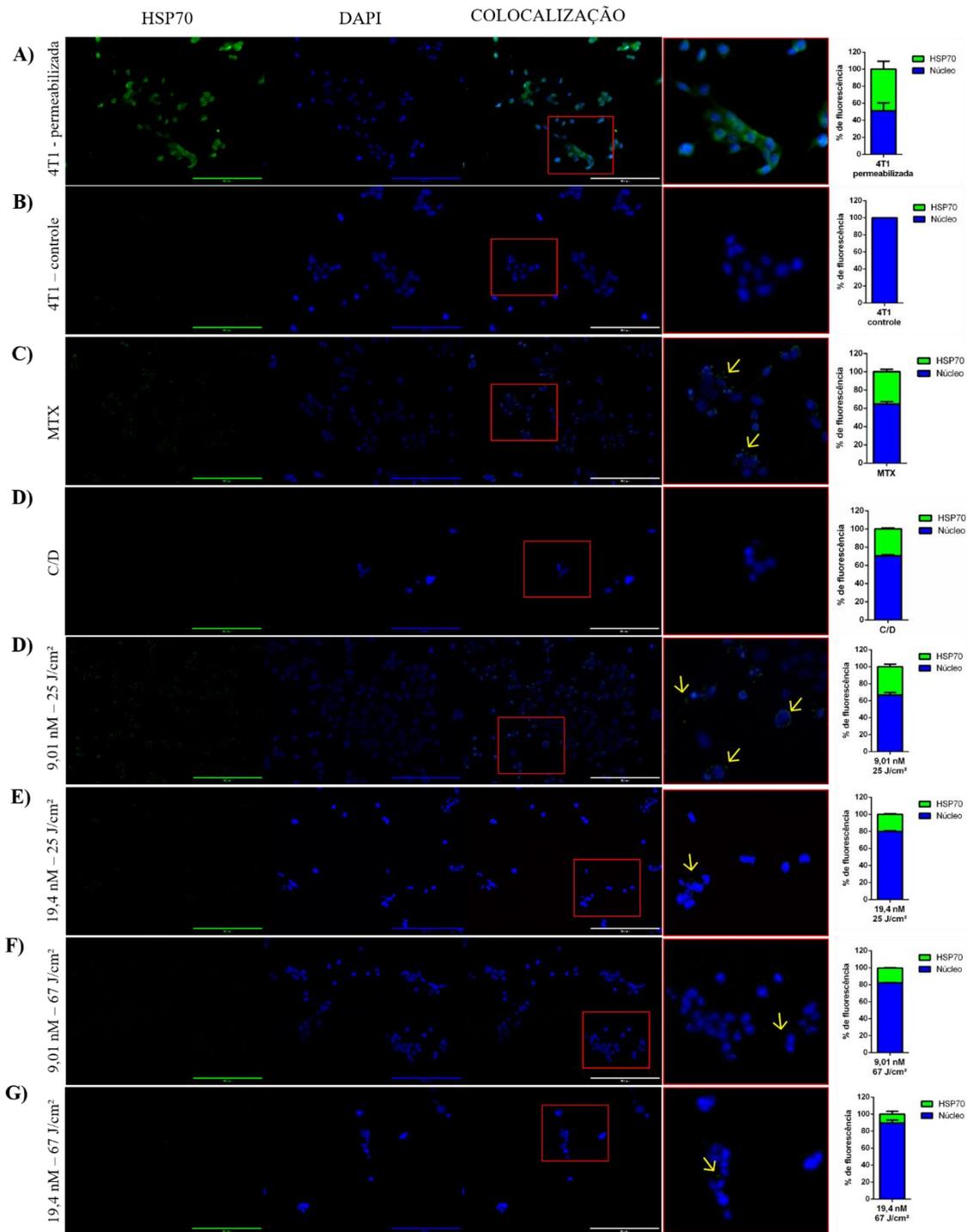


Figura 43: Emissão na membrana plasmática da proteína HSP70 em células 4T1 submetidas a diferentes protocolos da TFD-NE-AIFtCl. **A)** linha referente a células 4T1 permeabilizadas com Triton X100 (0,01%); **B)** células 4T1 não permeabilizadas; **C)** células tratadas com MTX (1,5 µM); **D)** células submetidas a C/D; **E-H)** aplicação dos diferentes protocolos da TFD alterando concentração e dose de energia. Os gráficos à direita são referentes ao perfil de marcação do DAPI para núcleo em azul com HSP70 na cor verde. Quadro vermelho indica o aumento da imagem e as setas amarelas indicam HSP70 exposto. Dados plotados como \pm EPM para triplicatas.

Os resultados obtidos em relação à marcação da proteína HSP90 pelas células 4T1 submetidas a diferentes protocolos da TFD-NE-AIFtCl foram bem parecidos com os

apresentados pela emissão de HSP70. Na **Figura 44**, estão respresentadas a proporção de liberação de HSP90 e as imagens utilizadas para quantificação da % de fluorescência emitida referente à HSP90 detectada estão demonstradas na **Figura 45**. Células 4T1 permeabilizadas com Triton X100 0,1% e marcadas para HSP90 foram utilizadas como controle positivo e células 4T1 submetidas a marcação para HSP90 não permeabilizadas foram utilizadas como controle negativo. Para tanto, os resultados obtidos para células não permeabilizadas submetidas a C/D, MTX (1,5 μ M) e TFD-NE-AIFtCl 9,01 nm – 25 J/cm² apresentaram um perfil de marcação de HSP90 similar ao de células permeabilizadas (**Figura 44**). No entanto, a exposição de HSP90 nas células 4T1 submetidas a MTX (1,5 μ M) e TFD-NE-AIFtCl 9,01 nm – 25 J/cm² apresentou-se mais na superfície da membrana celular (**Figura 45 – linhas C e E**). Já nas células permeabilizadas e submetidas ao tratamento de C/D essa marcação se deu mais no citoplasma e no núcleo (**Figura 45 – linhas A e D**). Os tratamentos com TFD-NE-AIFtCl 9,01 nM e 19,04 nM apresentaram resultados similares ao C/D, porém em proporção significativamente menor (**Figura 45**). Conferir imagines em maior aumento em **Anexo V**.

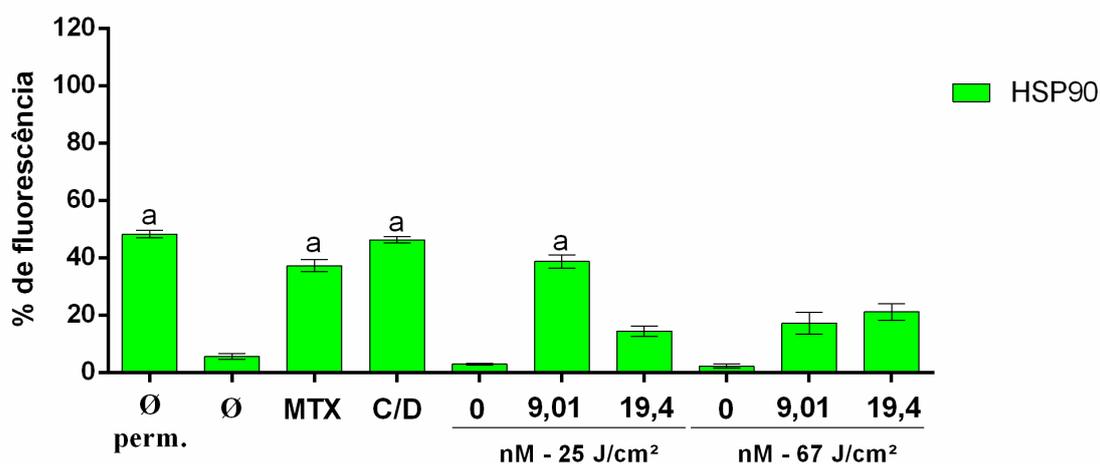


Figura 44: Exposição da marcação da proteína HSP90 por células 4T1 após diferentes protocolos da TFD-NE-AIFtCl. Ø perm. - células controle permeabilizadas com TritonX100 0,1%; Ø - células controle sem permeação; MTX -mitoxantrona (1,5 μ M); C/D - células congeladas e descongelas (3X); 0, 9,01 e 19,4 nM – 25 J/cm² - concentração e fluência aplicadas nas células; 0, 9,01 e 19,4 nM – 67 J/cm² - concentração e fluência aplicadas nas células. Letras iguais indicam que não houve diferença estatística. Dados plotados como \pm EPM para triplicatas.

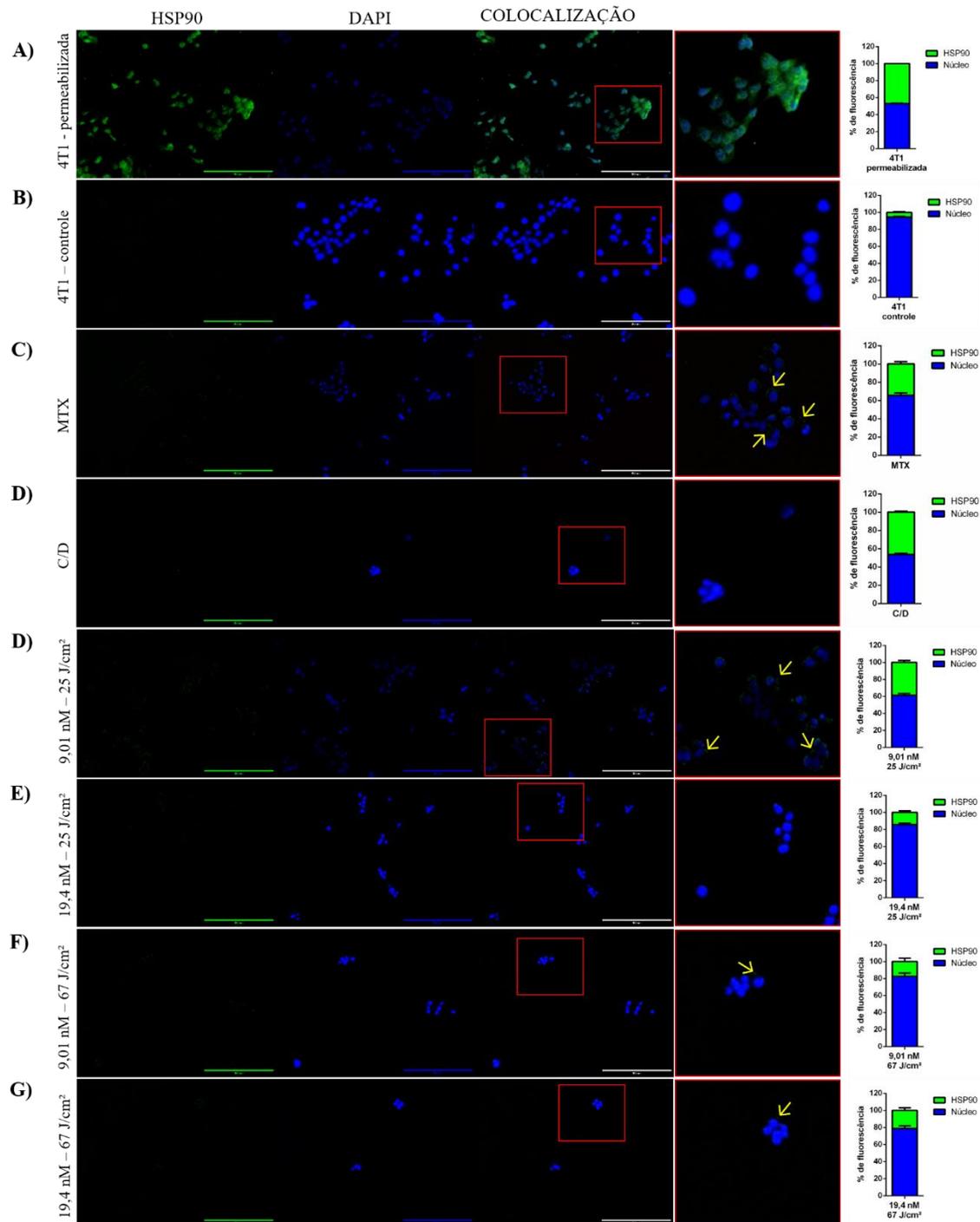


Figura 45: Marcação da proteína HSP90 em células 4T1 submetidas a diferentes protocolos da TFD-NE-AIFtCl. **A)** linha referente a células 4T1 permeabilizadas com Triton X100 (0,01%); **B)** células 4T1 não permeabilizadas; **C)** células tratadas com MTX (1,5 μ M); **D)** células submetidas a C/D; **E-H)** aplicação dos diferentes protocolos da TFD alterando concentração e dose de energia. Os gráficos à direita são referentes ao perfil de marcação do DAPI para núcleo em azul com HSP70 na cor verde. Dados plotados como \pm EPM para triplicatas.

Os resultados obtidos em relação à marcação da proteína calreticulina pelas células 4T1 submetidas a diferentes protocolos da TFD-NE-AIFtCl estão representados na **Figura 46** e as imagens utilizadas para quantificação da % de fluorescência emitida

referente a calreticulina detectada estão demonstradas na **Figura 47**. Células 4T1 permeabilizadas com Triton X100 0,1% e marcadas para calreticulina foram utilizadas como controle positivo e células 4T1 submetidas à marcação para calreticulina não permeabilizadas foram utilizadas como controle negativo. Células permeabilizadas apresentaram altas taxas da proteína calreticulina no núcleo e citoplasma, sendo identificada uma expressão significativa ($p < 0,01$) em relação aos demais tratamentos (**Figura 46**). Entretanto, os resultados obtidos com a análise das imagens de células 4T1 submetidas aos tratamentos MTX (1,5 μM) e TFD-NE-AIFtCl 9,01 nM – 25 J/cm² foi observada a exposição da proteína na superfície das células, sendo a quantidade significativamente mais elevada (0,05) que os outros protocolos da TFD (**Figura 46**). Conferir imagens em maior aumento em **Anexo VI**.

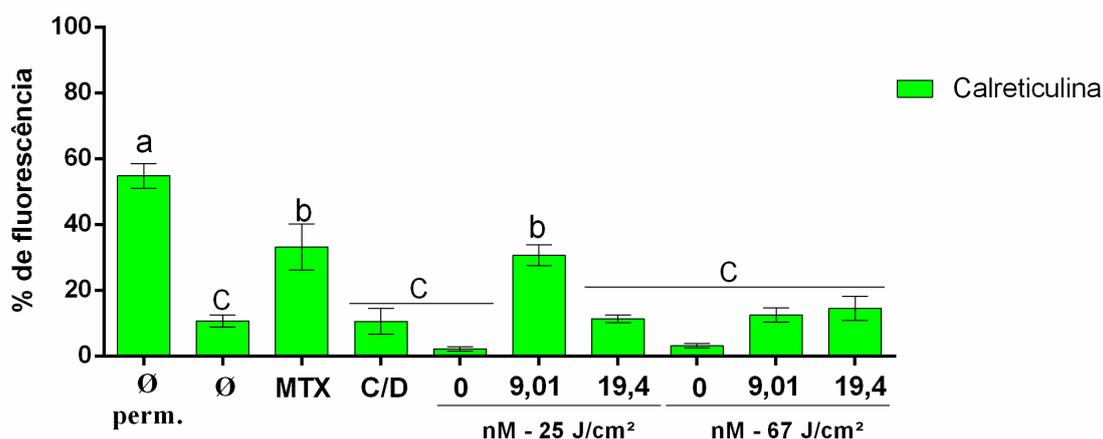


Figura 46: Marcação da proteína calreticulina em células 4T1 após diferentes protocolos da TFD-NE-AIFtCl. Ø perm. - células controle permeabilizadas com TritonX100 0,1%; Ø - células controle sem permeação; MTX -mitoxantrona (1,5 μM); C/D - células congeladas e descongeladas (3X); 0, 9,01 e 19,4 nM – 25 J/cm² - concentração e fluência aplicada nas células; 0, 9,01 e 19,4 nM – 67 J/cm² - concentração e fluência aplicada nas células. Letras iguais indicam que não houve diferença estatística. Dados plotados como \pm EPM para triplicatas.

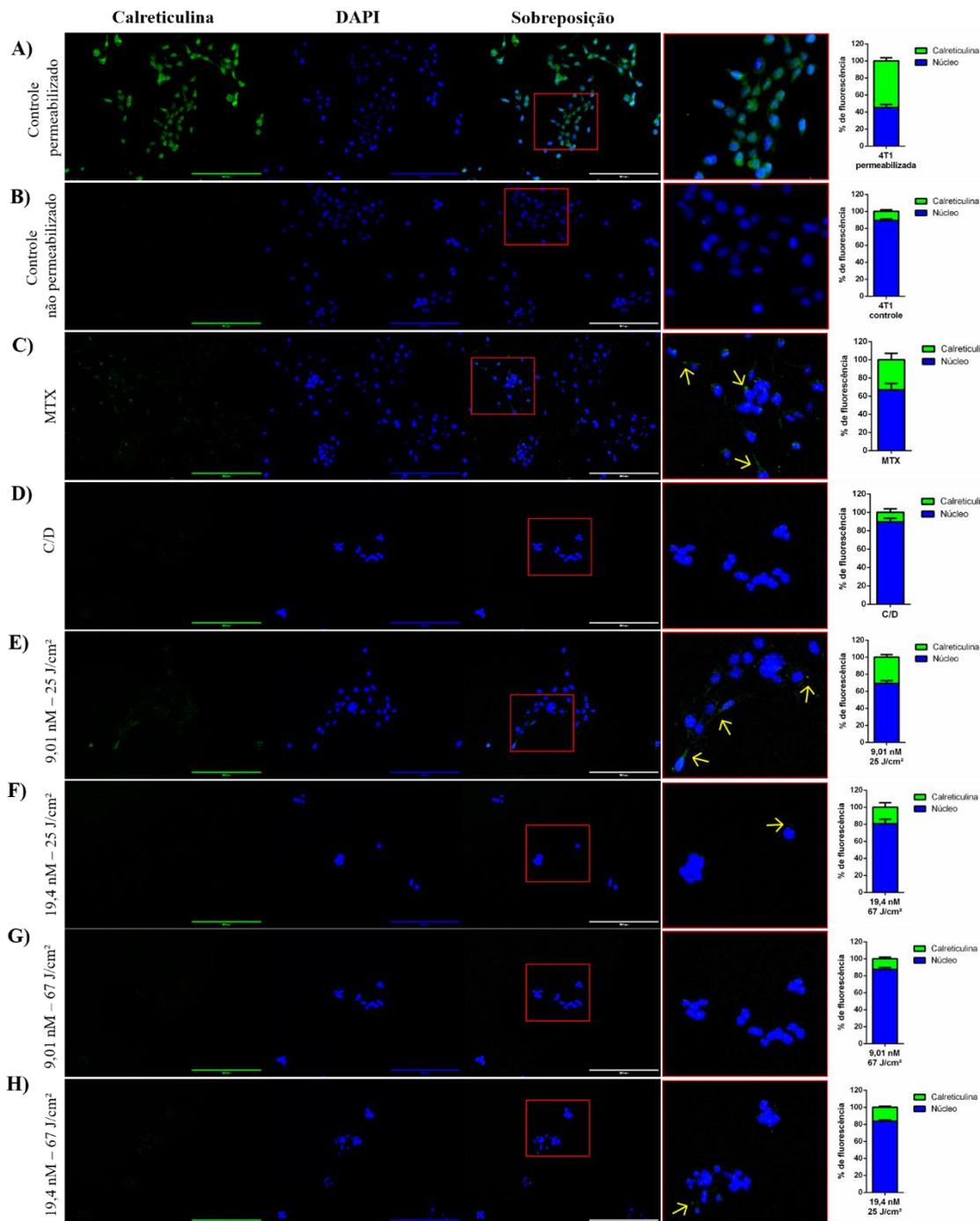


Figura 47: Emissão na membrana plasmática do DAMP Calreticulina em células 4T1 submetidas a diferentes protocolos da TFD-NE-AIFtCl. **A)** linha referente a células 4T1 permeabilizadas com Triton X100 (0,01%); **B)** células 4T1 não permeabilizadas; **C)** células tratadas com MTX (1,5 μ M); **D)** células submetidas a C/D; **E-H)** aplicação dos diferentes protocolos da TFD alterando concentração e dose de energia. Os gráficos à direita são referentes ao perfil de marcação do DAPI para núcleo em azul com Calreticulina na cor verde. Dados plotados como \pm EPM para triplicatas

De um modo geral a emissão e exposição de HSP70, HSP90 e calreticulina apresentaram-se diferentes em relação aos diversos protocolos da TFD-NE-AIFtCl aplicados às células 4T1. Como visto neste estudo, a TFD-NE-AIFtCl pode ocasionar

diferentes perfis de morte nas células 4T1 e isso afeta diretamente na ação desencadeada pela MCI na emissão de DAMP. Para tanto foi verificado que quando as células foram submetidas à TFD mais branda (9,01 nM – 25 J/cm²) ocorreu a exposição da calreticulina, bem como de HSP70 e HSP90 nas superfícies das células (**Figuras 46, 42 e 44**). Já essa menor eficiência nos demais protocolos da TFD (quando aumentadas as concentrações do FS AlFtCl ou a dose de energia) pode estar relacionada à via de morte por necrose que ocorreu em maior proporção nesses tratamentos, onde foi observada a presença em menor intensidade dos DAMP aqui citados, além de ser observada a presença destes no núcleo das células 4T1^{19 e 20}. Vale ressaltar que somente a emissão dessas proteínas não as tornam ativadoras de uma resposta imunogênica. Proteínas como calreticulina, por exemplo, desempenham funções específicas no retículo endoplasmático das células, funcionando como champeronas/acompanhantes de outras proteínas que são formadas no retículo endoplasmático.^{26 e 42} Proteínas malformadas se acumulam no RE dificultando assim a ligação à champerona calreticulina, com isso ocorre a emissão da calreticulina para citosol das células que, conseqüentemente, são expostas na membrana plasmática^{19, 29, 42 e 51}. Células que expõem a calreticulina durante a MCI são reconhecidas por células fagocitárias, como as células dendríticas, que têm como função apresentar antígenos. Essas, por sua vez, irão apresentar os antígenos processados da célula tumoral por meio de MHC II, que são reconhecidos por células T citotóxicas CD4⁺, criando assim uma imunidade antitumoral.⁴⁰ Outros estudos também demonstram essa eficiência de ativação de MCI desencadeada pela exposição de HSP70^{19 e 27} e HSP90^{19, 26 e 40}. De acordo com o Garg et al. (2015)²⁹, a utilização do quimioterápico MTX e o processo de C/D (congelamento e descongelamento das células 3X) foram utilizados como controles. Sendo o MTX como controle positivo para emissão de DAMPs^{19 e 51} e C/D controle negativo para emissão de DAMPs^{20, 41 e 43}.

Após 24 horas da TFD, também foi avaliada a liberação de outro indutor de reposta imunitária. A proteína IL-1 β foi detectada significativamente no sobrenadante das células submetidas à TFD-NE-AlFtCl 9,01 nM 25 J/cm² ou MTX quando comparadas como os demais protocolos da TFD e controles (**Figura 48**). Para tanto, foi observada a liberação de IL-1 β apenas nas células submetidas à exposição de MTX (barra laranja – utilizada como controle positivo) e quando aplicada à TFD com NE-AlFtCl (9,01 nM – 25 J/cm² - barra rosa), não sendo detectada diferença significativa entre esses tratamentos. Entretanto, em comparação com o controle de células não tratadas (\emptyset), essa liberação foi

significativamente maior ($p < 0,01$). Para os demais tratamentos não foram observadas liberações significativas da IL-1 β .

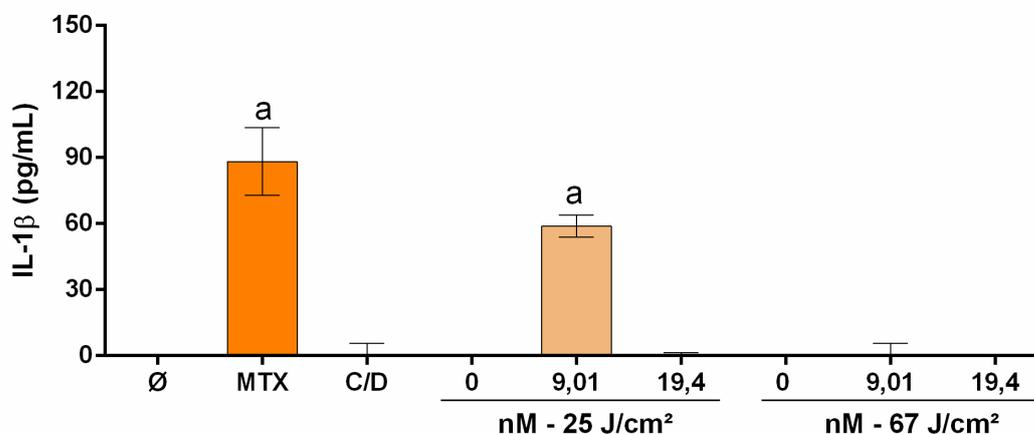


Figura 48: Concentração de IL-1 β no meio de cultivo 24 horas após células 4T1 serem expostas a diferentes protocolos da TFD. Células controle sem tratamento (\emptyset); MTX –mitoxantrona (1,5 μ M); C/D – células congeladas e descongeladas (3X); nM – nanomolar; J/cm² - densidade de energia. Letras iguais indicam que não houve diferença estatística. Dados plotados como \pm EPM para triplicatas.

A liberação de IL-1 β pode modificar a atividade de muitos tipos de células do sistema imunitário, como monócitos, macrófagos, neutrófilos e linfócitos, além de promover a liberação de outras citocinas e quimiocinas importantes na ativação de respostas imunitárias adaptativas.^{19, 26 e 27} A presença de IL-1 β no meio extracelular pode também promover a ativação de outros DAMPs, como por exemplo HMGB1. Sha et al. (2008) demonstraram que o DAMP HMGB1, na presença de IL-1 β , promove uma resposta inflamatória, ativando significativamente a produção de TFN- α (fator de necrose tumoral) e MIP-2 (do inglês *Macrophage inflammatory protein 2*) em macrófagos e neutrófilos em camundongos¹⁰³.

Outro DAMP identificado neste estudo foi a HMGB1 (**Figura 49**). A proteína HMGB1 foi detectada após 48 horas da TFD em todos os protocolos aplicados, essa liberação foi significativa em comparação com o controle de células sem tratamento e em relação às células submetidas a morte por necrose – C/D. No entanto o tratamento das células com TFD-NE-AIFtCl 9,01 25 J/cm² apresentou liberação significativamente maior que os tratamentos TFD-NE-AIFtCl 9,01 67 J/cm² e TFD-NE-AIFtCl 19,4 67 J/cm². O tratamento com MTX demonstrou maior perfil de liberação da proteína HMGB1, porém em comparação ao TFD-NE-AIFtCl 9,01 25 J/cm² essa liberação não foi significativa.

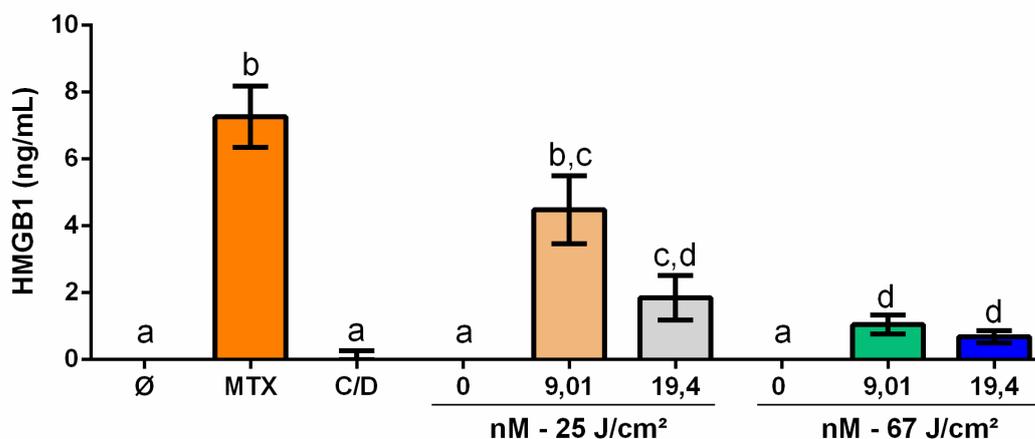


Figura 49: Concentração de HMGB1 no sobrenadante 48 horas após células 4T1 serem expostas a diferentes protocolos da TFD. Células controle sem tratamento (Ø); MTX –mitoxantrona (1,5 µM); C/D – células congeladas e descongeladas (3X); nM – nanomolar; J/cm² - densidade de energia. Dados plotados como ± EPM para triplicatas.

Panzarini et al. (2014)²⁷ identificaram a presença da HMGB1 no sobrenadante de células HeLa 24 horas após o seu tratamento com TFD mediada pelo FS RBAC (acetato de rosa de bengala). HMGB1 desempenha funções específicas no núcleo das células, estando associada aos nucleossomos, onde executa a função de guardião do DNA²⁷. Células em processo de apoptose condensam a cromatina e com isso dificultam a liberação de HMGB1⁸⁶. Por esse motivo, a proteína HMGB1 é liberada apenas no processo de apoptose tardia, pois muito depois do início da apoptose a cromatina descondensa e conseqüentemente a liberação de HMGB1 ocorre. Outros trabalhos também descrevem a liberação tardia da proteína HMGB1 após diferentes aplicações da TFD^{20, 26 e 53}. Assim, a proteína HMGB1 fora da célula atua como um potente ativador de resposta imunitária, ou seja, funciona como DAMP^{19, 20, 25-28, 40-44, 53 e 108}. O DAMP HMGB1 liberado por células em processo de MCI funciona como um alarme, atraindo células DC e macrófagos^{20, 53 e 56}. Após o reconhecimento, essas células se tornam ativas (maduras) e responsáveis por ativar células T^{40 e 56}.

As células 4T1 submetidas aos diferentes protocolos da TFD-NE-AIFtCl apresentam perfis de morte imunogênica diferentes quando aumentado a concentração do FS AIFtCl e/ou aumentada a dose de energia (J/cm²). Sendo assim, diante da caracterização da emissão dos DAMP supracitados o intuito do estudo foi verificar a eficiência da TFD-NE-AIFtCl como ativadora de uma resposta imunogênica em

camundongos após serem vacinados com células 4T1 pré-tratadas com TFD-NE-AIFtCl. Muitos estudos têm demonstrado essa eficiência de células submetidas a TFD e utilizadas como vacinas na imunização em animais^{19, 20, 40-44}.

No presente estudo também foi verificada a eficiência da TFD-NE-AIFtCl *in vivo* utilizando camundongos fêmeas com tumor 4T1 implantado no flanco Balb-C. Os resultados obtidos após o tratamento com TFD-NE-AIFtCl estão representados na **Figura 50**. Observa-se que os animais submetidos a TFD-NE-AIFtCl (linha vermelha) não apresentaram crescimento do tumor após o tratamento, apresentando uma diferença significativa quando comparado com os animais tratados com PBS e NE-AIFtCl (sem irradiar), que apresentaram crescimento exponencial do tumor, representados pelas linhas azul e preta, respectivamente. A medição do tumor foi interrompida no 28º dia após aparecimento do tumor.

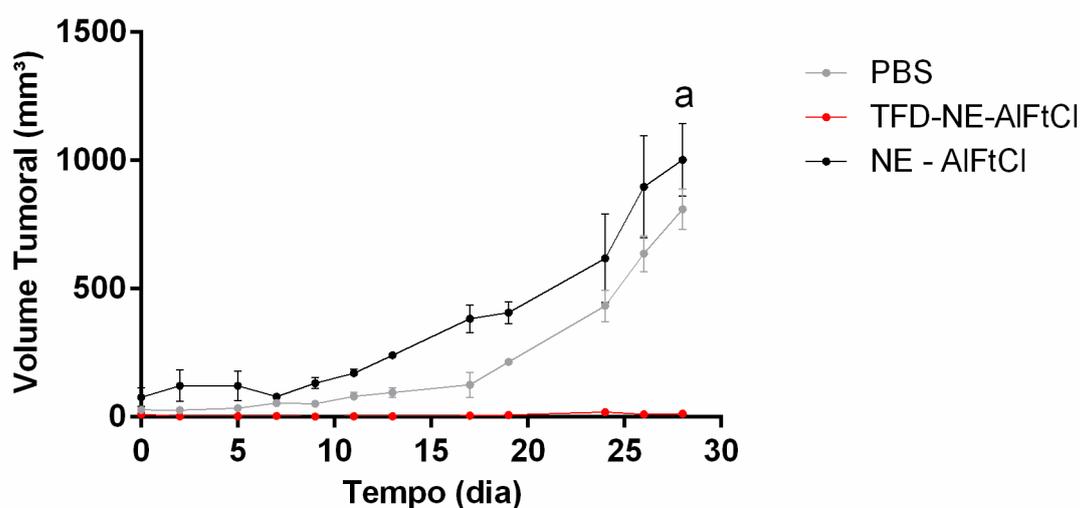


Figura 50: Volume tumoral após tratamento com TFD-NE-AIFtCl em animais Balb-C com tumor de mama enxertado no flanco esquerdo do tipo 4T1. Tempo () indica o dia que surgiram tumores nos animais que foram clinicamente palpáveis. Linha cinza: animais tratados somente com PBS; Linha vermelha: animais tratados com TFD-NE-AIFtCl (5 μ M - 52,12 J/cm²) linha preta: animais tratados com NE-AIFtCl (5 μ M - não irradiados). Subscritos (*) indicam diferença significativa ($p < 0,001$).

Resultados apresentados na literatura têm demonstrado que a TFD apresenta não só a eficiência na redução e eliminação de tumores primários como visto aqui nesse estudo, mas também é capaz eliminar e conseqüentemente diminuir metástases, e com isso aumentar a sobrevivência dos animais submetidos a esse tipo de tratamento^{56 e 109}. Tumor do tipo 4T1 apresentam-se bastante agressivos após serem enxertados nos camundongos

Balb-C¹⁰⁹. O crescimento e a disseminação dessas células a partir de um tumor primário é rápida e na maioria das vezes inevitável¹⁰⁹. Com isso, o maior problema enfrentado nos tratamentos de câncer atualmente está relacionado a essa eficiência adquirida por tumores malignos em formar outros focos tumorais oriundos de células denominadas de metastáticas^{1 e 5}. Nesse sentido esse estudo também propôs a avaliação desse perfil metastático após o tratamento com a TFD-NE-AIFtCl. Desta forma, os resultados obtidos estão representados na **Figura 51**, onde os animais que foram submetidos à TFD-NE-AIFtCl apresentaram uma diminuição seguida da normalização da área do pulmão, — órgão com bastante foco de metástase pelas células 4T1 — não apresentaram tecido metastático (linha vermelha) até o fim do tratamento. No entanto, os animais que foram tratados apenas com PBS apresentaram aumento na área pulmonar, estando relacionados à presença de tecido metastático no órgão avaliado (linha azul). O volume pulmonar de animais tratados ou não tratados foi comparado com o de animais virgens (linha verde).

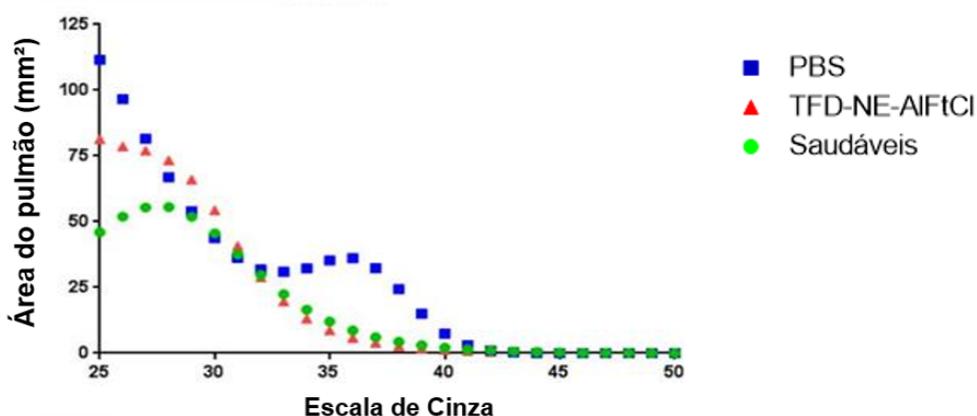


Figura 51: Avaliação da área do pulmão por meio de método de Microtumografia. Linha azul: animais tratados com PBS; linha vermelha: animais tratados com TFD-NE-AIFtCl; e linha verde: animais saudáveis.

A metástase é a maior causadora de morte em pacientes oncológicos. Cerca de 90% dos óbitos ocasionados pelo câncer é devido a metástase. E é por isso que as pesquisas relacionadas as doenças oncológicas direcionam o principal objetivo na busca para melhorar essa condição^{19,23 e 56}. O número de estudos relacionados à ativação de resposta imunitária a partir de células tumorais previamente tratadas vem ganhando bastante espaço no mundo da pesquisa^{26, 39, 41,52 e 53}. Como mencionada aqui, as células que sofrem morte celular imunogênica (MCI) são capazes de ativar uma resposta

imunitária por meio da emissão de moléculas denominadas de DAMP. Por tanto, baseando em alguns dados da literatura estudos com células tumorais pré-tratadas com TFD *in vitro* e aplicadas em animais, têm demonstrado resultados promissoras na ativação de uma resposta imunitária antitumoral para o tumor tratado^{26, 39, 41, 52, 52 e 110}. Desta forma, para análise do efeito da vacinação dos animais após os tratamentos descritos na seção 3.3.2, avaliou-se por quanto tempo o maior número de animais por grupo ficaria livres de tumor pós aplicação das células 4T1 viáveis (**Figura 52**). Para tanto, os animais vacinados por duas vezes (intervalo de 10 dias) com células pré-tratadas com MTX (roxo) e TFD-NE-AIFtCl 9,01 nM – 25 J/cm² (azul) apresentaram maior resistência para o aparecimento do tumor após serem submetidos ao enxerto de células 4T1 viáveis em relação ao tempo. Essa resistência foi significativa ($p < 0,01$) quando comparada com os animais submetidos a aplicação de PBS (vermelho) ou de células pré-tratadas com C/D (preto) e TFD-NE-AIFtCl 19,4 nM – 67 J/cm² (marrom).

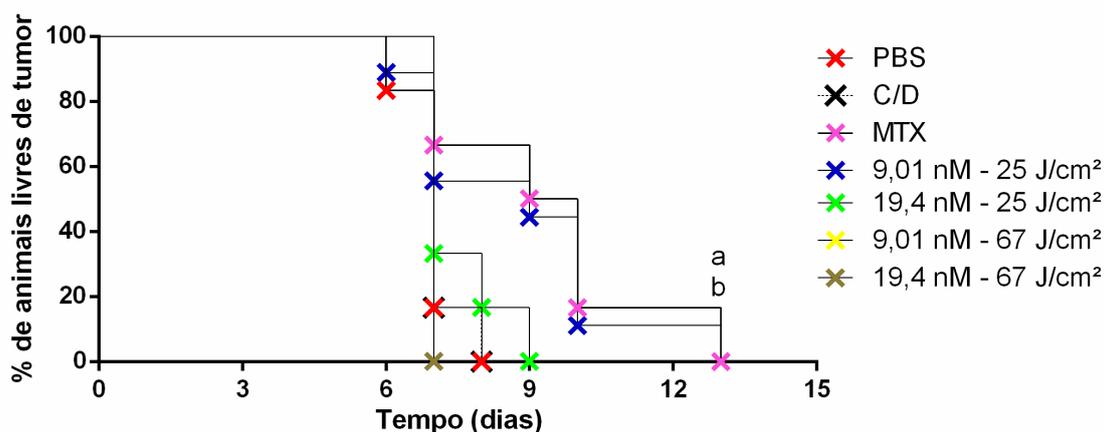


Figura 52: Porcentagem de animais livres de tumor após receberem inóculo de células 4T1 viáveis no flanco esquerdo. O inóculo de células viáveis foi feito sete dias após os animais serem submetidos as vacinas 1 e 2 com células 4T1 pré-tratadas (dia 0 – eixo x). As vacinas foram aplicadas no flanco direito dos animais com intervalo de dez dias entre a vacina 1 e 2, utilizando células 4T1 pré-tratadas, sendo representadas aqui como: somente PBS (vermelho) – sem células; C/D (preto); MTX (roxo); diferentes protocolos de TFD-NE-AIFtCl com fluência de 25 J/cm²: 9,01 nM (azul) e 19,4 nM (verde); TFD-NE-AIFtCl com fluência de 67 J/cm²: 9,01 nM (amarelo) e 19,4nM (marrom). As letras a e b correspondem a diferença significativa ($p < 0,01$) do grupo MTX e 9,01 nM-15 J/cm² em relação aos grupos PBS, C/D e 19,4 nM -67 J/cm², respectivamente

Esses resultados apresentados na **Figura 52** podem estar relacionados com a via de morte ocasionada nos diferentes tratamentos da TFD aqui aplicados. Sendo que, a células que foram submetidas a TFD-NE-AIFtCl 9,01 nM 25 J/cm² apresentaram número expressivamente maior de células em apoptose que necrose, efeito esse contrário para as

demais TFD aplicadas. Sabe-se que células que sofrem morte por necrose não apresentam a capacidade de ativar uma MCI, isso por não emitirem de forma ativa os DAMP, o que consequentemente não apresentaram eficiência de ativar uma resposta antitumoral^{29,53,56 e 107}. Vale ressaltar ainda que o grupo de animais vacinados com células 4T1 pré-tratadas com MTX apresentaram resultados similares em relação a essa resistência do surgimento do tumor do grupo TFD-NE-AIFtCl 9,01 nM 25 J/cm. A utilização da MTX como ativador de MCI é amplamente descrita na literatura, sendo esse tipo de tratamento um controle positivo para imunização de animais com células pré-expostas a esse quimioterápico⁴⁰⁻⁴². Um outro ponto avaliado foi no crescimento do volume dos tumores apresentados pelos animais submetidos as vacinas com células pré-tratadas com TFD diferentes protocolos -NE-AIFtCl. Desta forma, o TFD-NE-AIFtCl 9,01 nM 25 J/cm² e MTX aplicados demonstraram melhores resultados, sendo observada um menor crescimento do volume tumoral (mm³) para ambos os grupos (**Figura 53**). Entre esses grupos não foram observadas diferenças significativas do volume tumoral, porém em comparação com os demais tratamentos essa diminuição foi significativamente menor quando^{20 e 56}. Esses resultados refletiram sobremaneira diretamente na sobrevivência dos animais, pois foi verificado que os animais submetidos as vacinas utilizando células 4T1 submetidas a TFD-NE-AIFtCl 9,01 nM 25 J/cm² e MTX apresentaram porcentagem de animais com vida maiores que os demais tratamentos.

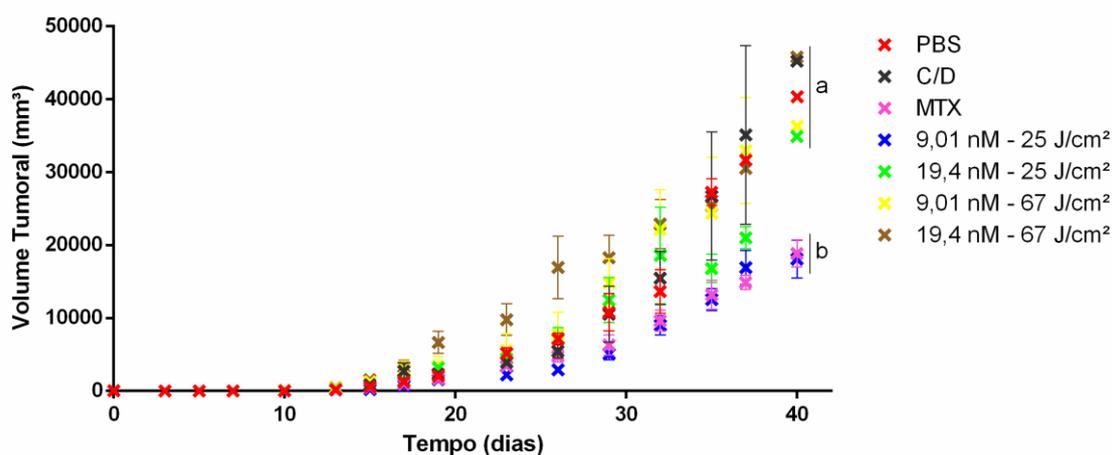


Figura 53: Volume tumoral dos animais após serem submetidos ao inóculo de células 4T1 viáveis no flanco esquerdo. Grupo dos animais submetidos as vacinas 1 e 2 referentes aos grupos: somente PBS (vermelho) – sem células; C/D (preto); MTX (roxo); diferentes protocolos de TFD-NE-AIFtCl com fluência de 25 J/cm²: 9,01 nM (azul) e 19,4 nM (verde); TFD-NE-AIFtCl com fluência de 67 J/cm²: 9,01 nM (amarelo) e 19,4nM (marrom). As letras a e b correspondem a diferença significativa ($p < 0,01$) do grupo MTX e 9,01 nM-15 J/cm² em relação aos demais grupos.

A eficiência da TFD está inteiramente relacionada a concentração do FS AIFtCl utilizado, bem como a dose de energia aplicada. O comportamento das vias de morte ocasionados nas células nos testes *in vitro* refletem de forma significativa os resultados aqui apresentados *in vivo*^{20, 56 e 109}. Vale mencionar ainda que o tratamento mais brando com TFD-NE-AIFtCl 9,01 nM e 25 J/cm² utilizado neste estudo apresentou os melhores resultados esperados. Os resultados achados neste estudo sugerem que essa maior resistência apresentada pela TFD-NE-AIFtCl 9,01 nM 25 J/cm² esta relaciona com maior eficiência da liberação dos DAMP (calreticulina, HSP70, HSp90, IL-1 β e HMGB1) apresentado pelas células nos ensaios *in vitro*. Vale ressaltar ainda que para esses animais foram observadas uma maior resistência de sobrevivida (**Figura 54**).

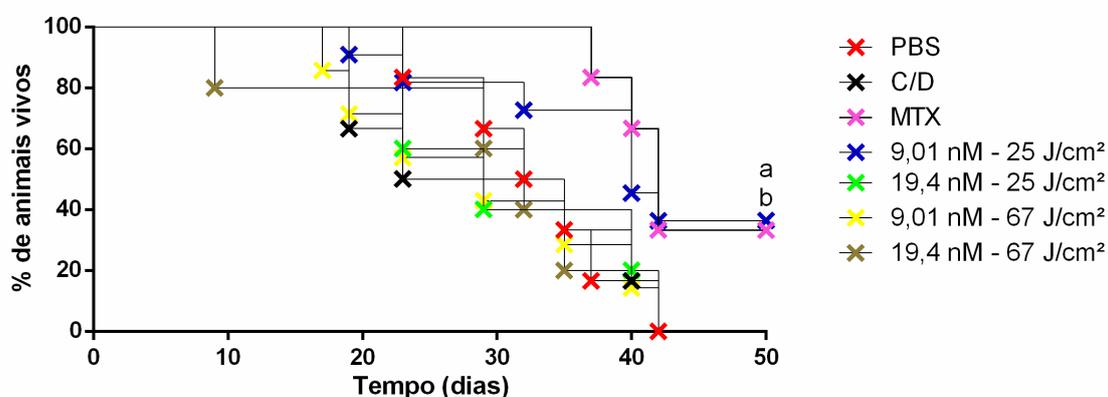


Figura 54: Sobrevivida dos animais durante todo o tempo do experimento. Grupo dos animais submetidos as vacinas 1 e 2 referentes aos grupos: somente PBS (vermelho) – sem células; C/D (preto); MTX (roxo); diferentes protocolos de TFD-NE-AIFtCl com fluência de 25 J/cm²: 9,01 nM (azul) e 19,4 nM (verde); TFD-NE-AIFtCl com fluência de 67 J/cm²: 9,01 nM (amarelo) e 19,4nM (marrom). As letras a e b correspondem a diferença significativa ($p < 0,01$) do grupo MTX e 9,01 nM-15 J/cm² em relação aos demais grupos.

Os resultados *in vivo* aqui achados podem estar relacionadas com a capacidade de células tumorais de suprir respostas imunes através do aumento de acúmulo de células supressoras derivadas de mieloides (MDSC)¹¹⁰⁻¹¹³. Essas células são capazes de ocasionar a supressão de células imunitárias, como por exemplo células T¹¹¹⁻¹¹⁴. No presente estudo não foi avaliado a presença das células MDSC ou supressão de Células T. No entanto, de acordo com Elkabets et al. (2010)¹¹⁴, a presença de IL-1 β derivadas de células tumorais 4T1 funcionou como ativador de MDSC, quando este foi liberado no microambiente tumoral. Desta forma, sugere-se que a presença de IL-1 β pode ter influenciado na progressão do tumor após os tratamentos com TFD-NE-AIFtCl 9,01 nM e 25 J/cm² e MTX (usado como controle), vale ressaltar ainda que esses dois grupos

apresentaram melhores resultados de sobrevida, apresentaram maior sobrevida que os demais grupos avaliados ($p < 0,01$) (**Figura 54**).

A TFD tem se apresentado como uma alternativa segura, eficaz e ainda pouco explorada para o tratamento do câncer, porém, ainda carece de melhorias para que possa ser usada em larga escala no tratamento do câncer, principalmente no que se refere a ativação do SI. Os achados deste estudo contribuem de forma significativa na melhoria do entendimento da ação da TFD, bem como no perfil de ativação de MCI em células cancerosas. Vale ressaltar que a utilização da nanobiotecnologia neste estudo, permitiu uma melhora significativa nos resultados aqui obtidos como carreador da FS AlFtCl. Assim, os achados deste estudo apresentam uma abordagem significativa para o tratamento do câncer, uma doença que ainda é responsável pela morte ou degradação do nível de vida de milhões de pessoas no mundo. E mais, o presente estudo pode conduzir ao desenvolvimento de tratamentos mais eficazes e seguros contra o câncer de mama por meio da ativação de uma resposta imunitária antitumoral mais eficiente e duradoura.

5 Conclusão

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que:

➤ NE-AIFtCl

- Apresenta DH de ~25 nm, com PDI abaixo de 0,15 e carga negativa;
- Apresenta pico de absorção e emissão em 676 nm e 680 nm, respectivamente;
- Eficiente na produção de ERO;
- Apresentou estabilidade coloidal, fotofísica e físico-química por um período de quatro anos.

➤ TFD-NE-AIFtCl *in vitro* → células de carcinoma mamário murino 4T1

- Rápida interiorização do NE-AIFtCl por células 4T1 com apenas 15 minutos de exposição;
- Diminuição significativa na interiorização quando inibiu endocitose via cânveolas, sugerido ser essa uma das vias de interiorização do NE-AIFtCl;
- Apresentou maior retenção/colocalização subcelular nas organelas mitocôndria, lisossomos, RE e em menor proporção no núcleo. Apresentando-se em diferentes concentrações nas organelas avaliadas em relação ao tempo;
- NE-AIFtCl não foi citotóxica no escuro em células 4T1.
- A TFD-NE-AIFtCl foi citotóxica contra as células 4T1, apresentando diferentes CC50 e CC90, dependendo do tempo ocasionando nas células morte por apoptose e necrose;
- TFD -NE-AIFtCl em células 4T1 é dependente da dose de energia e da concentração de FS-AIFtCl aplicadas (CC50);
- TFD-NE-AIFtCl induziu a produção de espécies reativas nas células 4T1.
- TFD-NE-AIFtCl induziu a emissão de DAMPs: Calreticulina, HSP70 e HSP90 1 hora após a exposição ao LED 660nm e emissão de HMGB1 48 horas após a exposição ao LED 660nm. Evento este característico de MCI;
- Liberação do mediador inflamatório IL-1 β 24 horas após 24 horas a exposição ao LED 660 nm;

➤ TFD-NE-AIFtCl *in vivo* → fêmeas Balb-C

- Erradicação do tumor de células 4T1 no flanco dos animais após TFD-NE-AIFtCl;

- Diminuição de tecido metastático nos pulmões dos animais submetidos à TFD-NE-AIFtCl;
- Células 4T1 pré-tratadas com TFD-NE-AIFtCl 9,01 J/cm² 25 J/cm² apresentou um grau de imunização significante: apresentando maior resistência no surgimento do tumor, menor desenvolvimento do tumor e melhor sobrevida dos animais deste grupo;

Referências

1. Fouad Y. A.; Aanei C. Revisiting the hallmarks of cancer. **AM J. Cancer Res**, v. 5, p. 1016-1036, 2017.
2. Ye X.; Weinberg R. A. Epithelial-mesenchymal plasticity: a central regulator of cancer progression. **Trends cell Biol.** V. 11, p.675-686, 2015.
3. INCA - Instituto Nacional do Câncer (2018). Recuperado de <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/inca/portal/home>
4. NIH – National Institutes of Health (2018). Recuperado de <https://search.nih.gov/search?utf8=%E2%9C%93&affiliate=nih&query=cancer&commit=Search>. Data de acesso: 25 de maio de 2018.
5. Weinberg R. A.; Hanahan D. Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell.** v. 5, p. 646-674. 2011.
6. Taylor, C. W.; Kirby, A. M. Cardiac Side-effects From Breast Cancer Radiotherapy. **Clinical Oncology.** v. 11, p. 621-629. 2015.
7. Galluzzi, L.; Buque, A.; Kepp, O.; Zitvogel, L.; Kroemer, G. Immunological Effects of Conventional Chemotherapy and Targeted Anticancer Agents. **Cancer Cell Review.** v. 28, p. 345-356. 2015.
8. Galea, M. Benign breast disorders. **Surgery (Oxford).** v. 34, p.19-24, 2016.
9. Falco, M.; Masojc, B.; Rolla, M.; Czekaa, A.; Pietruszewska, J.; Rubik-Leszczynska, A.; Lewocki, M.; Łukowiaka, M.; Kramb, A. Risk factors for seroma evacuation in breast cancer patients treated with intraoperative radiotherapy. **Reports of Practical Oncology and Radiotherapy.** v. 21, p. 225-31, 2016.
10. Joanitti, G. A. ; Ganassin, R. ; Rodrigues, M. C. ; Longo, J. P. F. ; Jiang, C. ; Gu, J. ; Pinto, S. M. L. ; Santos, M. F. M. A. ; Azevedo, R. B. ; Muehlmann, L.A. Nanostructured systems for the organelle-specific delivery of anticancer drugs. **Mini-Reviews in Medical Chemistry.** v.17, p. 224-236. 2015.
11. da Silva, C. G.; Rueda, F.; Löwik, C. W.; Ossendorp, F.; Cruz, L. J. Combinatorial prospects of nano-targeted chemoimmunotherapy. **Biomaterials.** v. 83, p. 308-20, 2016.
12. FDA – Food and Drug Administration (2018). Recuperado de <https://google2.fda.gov/search?q=PDT&client=FDAgov&site=FDAgov&lr=&proxystylesheet=FDAgov&requiredfields>. Data de acesso: 27 de maio de 2018.
13. Rodrigues, M. C.; Muehlmann, L. A.; Longo, J. P. F.; Silva, R. C.; Graebner, I. B.; Degtarev, I. A.; Lucci, C.M.; Azevedo, R. B.; Garcia, M. P. Photodynamic Therapy Based on *Arrabidaea chica* (Crajiuru) Extract Nanoemulsion: In vitro Activity against

- Monolayers and Spheroids of Human Mammary Adenocarcinoma MCF-7 Cells. **Nanomedicine & Nanotechnology**. v. 6, p. 286-293. 2015.
14. Dolmans, D.; Fukuma, D.; Jain, R. Photodynamic therapy for cancer. **Nature Reviews Cancer**. v. 3, p. 380-387, 2003.
 15. Robertson, C.; Hawkins, D.; Abrahams, H. Phoyodynamic therapy (PDT): A short review on cellular mechanisms and cancer research applications for TFD. **J Phot Photobiology B: Biology**. v. 96, p. 1-8, 2009.
 16. Muehlmann, L. A.; Rodrigues, M. C.; Longo, J. P. F.; Garcia, M. P.; Py-Daniel, K. R.; Veloso, A. B.; de Souza, P. E. N.; da Silva, S. W.; Azevedo, R. B. Aluminium-phthalocyanine chloride nanoemulsions for anticancer photodynamic therapy: Development and in vitro activity against monolayers and spheroids of human mammary adenocarcinoma MCF-7 cells. **Journal of Nanobiotechnology**. v.13, p. 36-47, 2015.
 17. Muehlmann, L. A.; MA, B. C. ;Longo, J. P. F.; Santos, M. F. M. A. ; Azevedo R. B. Aluminum phthalocyanine chloride associated to poly(methyl vinyl ether-co-maleic anhydride) nanoparticles as a new third-generation photosensitizer for anticancer photodynamic therapy. **International Journal of Nanomedicine** (Online). v. 7, p. 1199, 2014.
 18. Xu, J.; Gao, J.; Wei, Q. Combination of Photodynamic Therapy with Radiotherapy for Cancer Treatment. **Journal of Nanomaterials**. v. 2016, p. 2016.
 19. Garg A. D.; Vandenberk, L.; Koks, C. A.; Verschuere, T.; Goll, V. S. W. Agostinis, P. Next-generation immunogenic dendritic cell vaccines achieve a danger signaling and T cell-driven eradication of high-grade glioma. **Klinische Pädiatrie**. v. 228, 2016.
 20. Garg A. D.; Agostinis P.; ER stress, autophagy and immunogenic cell death in photodynamic therapy-induced anti-cancer immune responses. **Photochemical e Photobiological Sciences**. v. 13, p. 274-87, 2014.
 21. Berlanda J.; Kiesslich T.; Engelhardt V., Kremmer B.; Plaetzser K. Comparative in vitro study on the characteristic of different photosensitizers employed in PDT. **J J Phot Photobiology B: Chemistry**. v. 3, p. 173-180. 2010.
 22. Muehlmann L. A.; Joanitti G.A.; Silva J.R.; Longo J.P.F.; Azevedo R.B. Liposomal photosensitizers: potential platforms for anticancer photodynamic therapy. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 44, p. 729-37, 2011.
 23. Longo J. P. F.; Lozzi S. P.; Simioni P. C.; Tedesco R. B.; Azevedo R. B. Photodynamic therapy with aluminum-chloro-phtalocyanine induces necrosis and vascular damage in mice tougue tumors. **Journal of Phorochemistry and Photobiology B: Biology**. v. 94, p. 143-46, 2009.

24. Paszko E.; Ehrhardt C.; Senge M.O.; Kelleher D.P.; Reynolds J.V. Nanodrug applications in photodynamic therapy, **Photodiagn. Photodyn.** v. 8, p.14–29, 2011.
25. Castano, A. P.; Mroz, P.; Hamblin, M. R. Photodynamic therapy and anti-tumor immunity. **Nature Reviews Cancer.** v. 6, p. 535-45, 2006.
26. Korbelik, M.; Banáth, J.; Saw, J. M.; Zhang, W.; Čiplyš E. Calreticulin as Cancer Treatment Adjuvant: Combination with Photodynamic Therapy and Photodynamic Therapy-Generated Vaccines. **Frontiers in Oncology.** v. 5, p. 234-253. 2015.
27. Panzarini, E.; Inguscio, V.; Fimia, G. M.; Dini, L. Rose Bengal Acetate PhotoDynamic Therapy (RBAC-PDT) Induces Exposure and Release of Damage-Associated Molecular Patterns (DAMPs) in Human HeLa Cells. **Plos One.** v. 9, p. 321-333. 2014.
28. Zhang, Q.; Li, Y.; Shi, S.; Zhou, S.; Fu, S.; Zhang, Q.; Yang, X.; Fu, R.; Lu, L. Hypericin-photodynamic therapy induces human umbilical vein endothelial cell apoptosis. **Scientific Reports.** v. 5, p. 224-231. 2015.
29. Weijer, R.; Broekgaarden, M.; Kos, M.; van Vught, R.; Rauws, E. A. J.; Breukink, E.; van Gulik, T. M.; Heger, M. Enhancing photodynamic therapy of refractory solid cancers: Combining second-generation photosensitizers with multi-targeted liposomal delivery. **Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews.** v. 23, p. 103–131, 2015.
30. Preise, D. Scherz A., Salomon, Y. Antitumor immunity promoted by vascular occluding therapy: lessons from vascular-target photodynamic therapy (VTP). **Photochemical and photobiological Sciences.** v.10, p. 681-688, 2010.
31. Kawano M.; Tanaka K.; Itonaga I. et al. Dendritic Cells Combined With Doxorubicin Induces Immunogenic Cell Death And Exhibits Antitumor Effects For Osteosarcoma. **Oncol-Lett.** v.3. p. 2169-2175. 2016.
32. Zitvogel L.; Kepp O.; Kroemer G. Immune parameters affecting the efficacy of chemotherapeutic regimens. **Nat Rev Clin Oncol.** v. 8, p. 151-160. 2011.
33. Fucikova J.; Kralikova P.; Fialova A.; Brtnicky T.; Rob L.; Bartunkova J.; Spísek R. Human tumor cells killed by anthracyclines induce a tumor-specific immune response. **Cancer Res.** v.71, p. 4821-4833. 2011.
34. Rubio-Patiño C.; Bossowski J. P.; Chevet E.; Ricci J. Reshaping the Immune Tumor Microenvironment Through IRE1 Signaling. **Cell Press Reviews.** 2018.
35. Quentin T.; Steinmetz M.; Poppe A.; Thomas S. Metformin differentially activates ER stress signaling pathways without inducing apoptosis. **Disease Models & Mechanisms.** v. 5, p. 259-269, 2012.
36. Healy S. J.; Gorman A. M.; Mousavi P.; Gupta S.; Samali A. Targeting the endoplasmic reticulum-stress response as an anticancer strategy. **Eur. J Pharmacol.** v.3, p. 234-246, 2009.

37. Zhang J.; Jiang Y.; Jia Z.; Gong W. et al. Association of elevated GRP78 expression with increased lymph node metastasis and poor prognosis in patients with gastric cancer. **Clin Exp Metastasis**. v. 7, p. 401-10. 2006.
38. Li J.; Lee A. S. Stress induction of GRP78/BiP and its role in cancer. **Curr Mol Med**. p.45-54, 2006.
39. Garg A. D.; Agostinis P.; ER stress, autophagy and immunogenic cell death in photodynamic therapy-induced anti-cancer immune responses. **Photochemical and Photobiological Sciences**. v. 13, p. 274-87, 2014.
40. Garg A. D.; Martin S.; Golab J.; Agostinis P. Danger signalling during cancer cell death: origins, plasticity and regulation. **Cell Death Differ**. v.21, p. 26-38. 2014.
41. Garg A. D.; Vandenberg, L.; Koks, C. A.; Verschuere, T.; Goll, V. S. W. Agostinis, P. Next-generation immunogenic dendritic cell vaccines achieve a danger signaling and T cell-driven eradication of high-grade glioma. **Klinische Pädiatrie**. v. 228, 2016.
42. Agostinis, P.; Berg, K.; Cengel, K. A.; Foster, T. H.; Girotti, A. W.; Gollnick, S. O.; Hahn, S. M.; Hamblin, M. R.; Juzeniene, A.; Kessel, D.; Korbelik, M.; Moan, J.; Mroz P.; Nowis, D.; Piette, J.; Wilson, B. C.; Golab, J. Photodynamic therapy of cancer: an update. **A Cancer Journal for Clinicians**. v. 61, p. 250–81, 2011.
43. Teiten M. H.; Bezdetnaya, L.; Morlie`re, Santus, R.; Guillemin, F. Endoplasmic reticulum and Golgi apparatus are the preferential sites of Foscan's localization in cultured tumour cells. **British Journal of Cancer**. v. 88, p. 146–52, 2003.
44. Ndhundhumaa, I.; Hauserb, C.; Scalfi-Happb, C.; Rückb, A.; Steinerb, R. Subcellular co-localization of aluminum (III) phthalocyanine chloride tetrasulphonate with fluorescent markers in the human melanoma cell-line HT-144. **Medical Laser Application**. v. 26, p. 93-100, 2011.
45. Krause K-H.; Michalak M. Calreticulin. **Cell**. v. 88, p. 439-443. 1997.
46. Leach M. R.; Williams D. B. Calnexin and Calreticulin, Molecular Chaperones of the Endoplasmic Reticulum. **Madame Curie Bioscience Database**. 2013.
47. Elsner L.; Muppala V.; Gehrmann M.; Lozano J.; Malzahn D.; Bickeboller H. et al. The heat shock protein HSP70 promotes mouse NK cell activity against tumors that express inducible NKG2D ligands. **J Immunol**. v. 179, p. 5523–5533. 2007.
48. Eustace BK, Jay DG. Extracellular roles for the molecular chaperone, hsp90. **Cell Cycle**. v. 3, p. 1098–1100. 2004.
49. Mayer M. P.; Bukau B. Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism. **Cell Moll Life Sci**. v. 65, p. 670-684. 2005.

50. Schopf F. H.; Biebl M. M.; Buchner J. The HSP90 chaperone machinery. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**. v. 18, p. 345–360. 2017.
51. van Vliet, A. R., Martin, S., Garg, A. D., and Agostinis, P. The PERKs of damage-associated molecular patterns mediating cancer immunogenicity: From sensor to the plasma membrane and beyond. **Semin. Cancer Biol.** v. 33, 74–85, 2015.
52. Garg, A. D.; Dudek, A. M.; Agostinis, P. Calreticulin surface exposure is abrogated in cells lacking, chaperone-mediated autophagy-essential gene, LAMP2A. **Cell Death & Disease**. v. 4, 2013.
53. Tanaka M.; Kataoka H.; Yano S.; Sawada T.; Akashi H. et al. Immunogenic cell death due to a new photodynamic therapy (PDT) with glycoconjugated chlorin (G-chlorin). *Oncotarget*. v.30, p. 47242-47251. 2016.
54. Lopez-Castejon G.; Brough D. Understanding the mechanism of IL-1 β secretion. **Cytokine Growth Factor Rev.** v. 22, p.189–195. 2011.
55. Kim B.; Lee Y.; Kim E.; Kwak A.; Ryoo S. et al. The Interleukin-1 α Precursor is Biologically Active and is Likely a Key Alarmin in the IL-1 Family of Cytokines. **Frontiers in immunology**. 2013.
56. Bruchard M.; Mignot G.; Derangère V.; Chalmin F.; Chevriaux A.; Végran F.; Boireau W.; Simon B.; Ryffel B.; Connat JL.; et al: Chemotherapy-triggered cathepsin B release in myeloid-derived suppressor cells activates the Nlrp3 inflammasome and promotes tumor growth. **Nat Med**. v.19, p. 57-64. 2013.
57. Kang R.; Zhang Q.; Zeh H. J.; Lotze L. M. T.; Tang D. HMGB1 in Cancer: Good, Bad, or Both?. **Clin Cancer Res**. v. 19. 2013.
58. Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, Criollo A, Ortiz C, Lidereau R, Mariette C, Chaput N, Mira JP, Delaloue S, et al: The interaction between HMGB1 and TLR4 dictates the outcome of anticancer chemotherapy and radiotherapy. **Immunol Rev**. v. 220, p. 47-59. 2007.
59. Liang R.; Liu L.; HE H.; Chen Z.; Han Z.; Luo Z.; Wu Z.; Zheng M.; Ma Z.; Cai L. Oxygen-boosted immunogenic photodynamic therapy with gold nanocages@manganese dioxide to inhibit tumor growth and metastases. **Biomaterials**. v.177, p. 149-160. 2018.
60. Spiller W.; Kliesch H.; Wohrele D.; Hackbarth S.; Roder B. Singlet oxygen quantum yields of different photosensitizers in polar solvents and micellar solution. **Journal of Porphyrins and Phtalocyanine**. v. 2, p. 145, 1998.
61. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal Immunol. Methods**. v. 16, p. 55-63, 1983.

62. Zeng, X.; Zhang, Y. Nyström, A. M. Endocytic Uptake and Intracellular trafficking of Bis-MPA-Based Hyperbranched Copolymer Micelles in Breast Cancer Cells. **Biomacromolecules**. v. 12, p. 3814-22, 2012.
63. Manders, E.; Stap, J.; Brakenhoff, G.; van Driel, R.; Aten, J. Dynamics of three-dimensional replication patterns during the S-phase, analysed by double labelling of DNA and confocal microscopy. **Journal of Cell Science**. v. 103, p. 857-862, 1992.
64. Manders, E. M. M.; Verrbeek, F. J. Aten, J. A. Measurement of co-localization of objects in dual-colour confocal images. **Journal of Microscopy**. v. 169, p. 375-82, 1993.
65. Kasibhatla S.; Amarante-Mendes G. P.; Finucane D.; Brunner T.; Bossy-Wetzel E.; Green D. R. Acridine Orange/Ethidium Bromide (AO/EB) Staining to Detect Apoptosis. **CSH protocols**. 2006.
66. Baek, S. Y.; Na, K. A nano complex of hydrophilic phthalocyanine and polyethylenimine for improved cellular internalization efficiency and phototoxicity **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v.101, p. 493–500, 2013.
67. Cametin M.; Moreno.; Matin M. J.; Schofield c. l.; Chambrier I. et al. Delivery of a hydrophobic phthalocyanine photosensitizer using PEGylated gold nanoparticle conjugates for the in vivo photodynamic therapy of amelanotic melanoma. **Photochemical e Photobiological Sciences**. v.5. 2016.
68. Wang M.; Thanou M. Targeting nanoparticles to cancer. **Pharmacological Research**.v. 62, p. 90-9, 2010.
69. Chen Y.; Yang X.; Zhao L.; Almásy L.; Garamus V. M.; Willumeit R.; Zou A. Preparation and characterization of a nanostructured lipid carrier for a poorly soluble drug. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**. v. 455, p. 36-43, 2014.
70. Allison R. R.; Downie G. H.; Cuenca R.; Hu X-H.; Childs C. J. H. Sibata C. H. Photosensitizers in clinical PDT. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**. v. 1, p. 27-42, 2004.
71. Breymayer J.; Rück A.; Ryabova A. V.; Loschenov V. B.; Steiner R. W. Fluorescence Investigation of the Detachment of Aluminium Phthalocyanine Molecules from Aluminium Phthalocyanine Nanoparticles in Monocytes/Macrophages and Skin Cells and their Localization in Monocytes/Macrophages. **Photodiagnosis and Photodynamica Therapy**. p. 1-43, 2014.
72. Dietrich J.; Bledowski C.; Kaiser J. Neural correlates of chemotherapy-related cognitive impairment. **Cortex**. v. 54, p. 33-50, 2014.

73. Lan W.; Liu F., Ke M., Lo P.; Fong, W.; Ng, D. K.P.; Huang, J. The effects of formulation and serum albumin on the in vitro photodynamic activity of zinc(II) phthalocyanines substituted with sulfonated quinolineoxy groups. **Dyes and Pigments**. v.128, p. 215-25, 2016.
74. Liu J.; Li, J.; Yuan, X.; Wang, W.; Xue, J. In vitro photodynamic activities of zinc(II) phthalocyanines substituted with pyridine moieties. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**. v. 13, p. 341-43, 2016.
75. Lopez T.; Ortiz, E.; Alvarez, M.; Navarrete, J.; Odriozola, J. A.; Martinez-Ortega, F.; Pérez-Mozo, E. A.; Escobar, P.; Espinoza, K. A.; Rivero, I. A. Study of the stabilization of zinc phthalocyanine in sol-gel TiO₂ for photodynamic therapy applications. **Nanomedicine**. v. 6, p. 777-85, 2010.
76. Sato, T.; Vries, R. G.; Snippert, H. J.; van de Wetering, M.; Barker, N.; Stange, D. E.; van Es J. H.; Abo A.; Kujala, P.; Peters, P. J.; Clevers, H. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. **Nature**. v. 14, p. 262-5, 2009.
77. Zeng, X., & Zhang, Y. (2012). Endocytic Uptake and Intracellular trafficking of Bis-MPA-Based Hyperbranched Copolymer Micelles in Breast Cancer Cells.
78. Zeng, X.; Morgenstern, R.; Nyström, A. M. Biomaterials Nanoparticle-directed sub-cellular localization of doxorubicin and the sensitization breast cancer cells by circumventing GST-Mediated drug resistance q. **Biomaterials**. v. 35, p. 1227-39, 2014.
79. Anderson, R. G. W. The caveolae mambrane system. **Biochemistry**. v. 67, p. 199-225, 1998.
80. Lajoie, P.; Nabi, I. R. Regulation of ralf-dependent endocytosis. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**. v. 11, p. 644-53, 2007.
81. Santos, C.; Rogriguez, F.; Garcia, V.; Moravčíková, D.; Berkeš, D.; Daich, A.; Levade T.; Baudoin-Dehoux, C.; Ballereau, S.; Génisson, Y. Identification of novel CERT ligands as potential ceramide trafficking inhibitors. **ChemBiochem**. v. 24, p. 2522-8, 2014.
82. Alvarez-Trabado J.; López-García A.; Martín-Pastor M.; Diebold Y.; Sanchez A. Ester Nanoparticles (SENS) as a Novel Topical Ocular Drug Delivery System: Design, Optimization, and in Vitro/Ex Vivo Evaluation. **Int J Pharm**. p. 3-30. 2018.
83. Muthuraman A. Chapter 3°:The current perspectives of nanoparticles in cellular and organ-specific drug targeting in biological system. **Nanostructures for the engineering of cells, tissues and organs**. p.105-154. 2018.

84. Sahay, A.; Scobie, K. N.; Hill, A. S.; O'Carroll, C. M.; Kheirbek, M. A.; Burghardt, N.; Fenton, A. A.; Dranovsky, A.; He, R. Increasing adult hippocampal neurogenesis is sufficient to improve pattern separation. 2011.
85. Ali, S.; Khurshid, A.; Maqsood, M. Rafib, M.; Khanb, J. A.; Zaidi, S. S. Z.; Mohammada, S.; Ikram, M. Study of low doses cisplatin synergistic effect on photodynamic outcome of aluminum phythalocyanine on soft tissue sarcoma (RD) cell line. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**. v. 12, p. 146-9, 2015.
86. Canton I.; G Battaglia. Encocytosis at the nanoscale. **Chem Soc Rev**. v. 41, p. 18-39. 2012.
87. Li, Q.; Lau, A.; Morris, T. J.; Guo, L.; Fordyce, C. B.; Stanley, E. F. A Syntaxin 1, G_αo, and N-Type Calcium Channel Complex at a Presynaptic Nerve Terminal: Analysis by Quantitative Immunocolocalization. **Journal of Neurosciences**. v. 24, p. 4070-81. 2004.
88. Khachane P. V.; Jain A. S.; et al. Cationic nanoemulsions as potential carriers for intracellular delivery. **Saudi Pharmaceutical Journal**. v.23, p. 199-194, 2015.
89. Miyake, M., Kakizawa Y., et al. Membrane permeation fo giant unilamellar vesicles and corneal epithelial cells with lipophilic vitamin nanoemulsions. **Colloids Surf. B Biointerfaces**. v. 169, p. 444-452, 2018.
90. Ghosh V.; Saranya S. et al. Cinnamon oil nanoemulsion formulation by ultrasonic emulsification: investigation of its bactericidal activity. **J Nanosci Nanotechnol**. v. 13, p. 114-122, 2013.
91. Dunn, K. W.; Kamocka, M. M.; McDonald, J. H. A practical guide to evaluating colocalization in biological microscopy. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**. v. 300, p. 723–742, 2011.
92. Mroze , P.; Yaroslavsky, A.; Kharkwal, G. B.; Hamblin, M. R.; Cell Death Pathways in Photodynamic Therapy of Cancer. **Cancers**. v. 23, 2516-39, 2011.
93. Allen, T. M., Austin, G. A.; Chonn, A.; Lin, L.; Lee, K. C. Uptake of liposomes by cultured mouse bone marrow macrophages: influence of liposome composition and size. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**. v. 1061, p. 56-64, 1991.
94. Rugolo, M.; Lenaz, G., Monitoring of the mitochondrial and plasma membrane potentials in human fibroblasts by tetraphenylphosphonium ion distribution. **Journal of bioenergetics and biomembranes**. v. 19, p. 705-18, 1987.
95. Tardivo, J. P.; Del Giglio, A.; de Oliveira, C. S.; Gabrielli, D. S.; Junqueira, H. C.; Tada, D. B.; Severino, D.; de Fátima Turchiello, R.; Baptista, M. S., Methylene blue in photodynamic therapy: From basic mechanisms to clinical applications. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**. v. 3, p. 175-91, 2005.

96. Nishiyamal, N.; Iriyama, A.; Jang, W.; Miyata, K.; Itakal, K.; Inoue, Y.; Takahashi, H.; Yanagi, Y.; Tamaki, Y.; Koyama, H.; Kataoka, K. Light-induced gene transfer from packaged DNA enveloped in a dendrimeric photosensitizer. **Nature Materials**. v. 4, p. 934-41, 2005.
97. MacDonald, I. J.; Dougherty T. J. Basic principles of photodynamic therapy. **Journal of Porphyrins Phthalocyanines**. v. 5: 105–29, 2001.
98. Marshall, A. J.; Zhang, T.; Al-Alwan, M. Regulation of B-lymphocyte activation by the PH domain adaptor protein Bam32/DAPP1. **Biochemical Society Transactions**. v. 35, p. 181-2, 2007.
99. Galimberti G. N. Daylight Photodynamic Therapy Versus 5-Fluorouracil for the Treatment of Actinic Keratosis: A Case Series. **Dermatol Ther**. v.8, p. 137-141. 2018.
100. Li-qiang C.; Hua W.; Si-li N.; Chun-hua T. A clinical study of HMME-PDT therapy in Chinese pediatric patients with port-wine stain. **Photodiagnosis Photodynamic Therapy**. v.23, p. 102-105. 2018
101. Radomska-Soukharev, A. Stability of lipid excipients in solid lipid nanoparticles. **Adv. Drug Deliv. Rev.** v. 59, p. 411-18, 2007.
102. Firczuk, H.; Kannambath, S.; Pahle, J.; Claydon, A.; Beynon, R.; Duncan, J.; Westerhoff, H.; Mendes, P.; McCarthy, J. E. An in vivo control map for the eukaryotic mRNA translation machinery. **Molecular Systems Biology**. v. 9, 2013.
103. Thorsson V.; Gibbs D. L.; Brown S. D.; Wolf D.; Bortone D. S.; et al. The Immune Landscape of Cancer. **Immunity**. v.48, p. 812-830. 2018.
104. Alexandratoua, E.; Yovaa, D.; Loukas, S. A confocal microscopy study of the very early cellular response to oxidative stress induced by zinc phthalocyanine sensitization. **Free Radical Biology & Medicine**. v. 39, p. 1119 – 27, 2005.
105. D'Eliseo, D.; Manzi, L.; Merendino, L.; Velotti. Docosahexaenoic acid inhibits invasion of human RT112 urinary bladder and PT45 pancreatic carcinoma cells via down-modulation of granzyme B expression. **The Journal of Nutritional Biochemistry**. v. 23, p. 452-7, 2012.
106. Sha, Y.; Zmijewski, J.; Xu, Z.; Abraham, E. HMGB1 develops enhanced proinflammatory activity by binding to cytokines. **The Journal of Immunology**. v. 180, 2531-37, 2008.
107. Kroemer, G.; Galluzzi, L.; Kepp, O.; Zitvogel, L. Immunogenic cell death in cancer therapy. **Annu Rev Immunol**. v. 31, p. 51–72, 2013.
108. He S.; Cheng J.; Sun L.; Wang C. et al. HMGB1 released by irradiated tumor cells promotes living tumor cell proliferation via paracrine effect. **Cell death and disease**. v.9. 2018.

109. Longo J. P. F.; Muehlmann L. A. Miranda A. L.; Portilho F; A.; Souza L. R.; Silva J. R.; Lacava Z. G. M.; Bocca A. L.; Chaves S. B.; Azevedo R. B. Prevention of sistant lung metastasis after photodynamic therapy application in a breast câncer tumor model. **Journal of Biomedical Nanotechnology**. v.12, p. 689-699, 2016.
110. Korbélik M, Banáth J, Saw KM. Immunoregulatory Cell Depletion Improves the Efficacy of Photodynamic Therapy-Generated Cancer Vaccines. Hamblin MR, Huang Y-Y, eds. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 16., 2015.
111. Marvel D.; Gabrilovich D. I. Myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment: expect the unexpected. **The Journal of Clinical Investigation**. v. 125, 2015.
112. Youn J-I, Nagaraj S, Collazo M, Gabrilovich DI. Subsets of Myeloid-Derived Suppressor Cells in Tumor Bearing Mice. **Journal of immunology**. v. 181, p. 5791-5802, 2008.
113. Elizabeth A. Vasievich E. A.; Huang L. The Suppressive Tumor Microenvironment: A Challenge in Cancer Immunotherapy **Mol. Pharmaceutics**. v. 8, p 635–641, 2011.
114. Galluzzi L.; Buqué O. K.; Zitvogel L.; Kroemer G. Immunogenic cell death in cancer and infectious disease. **Nature Reviews Immunology**. v.17, p. 97-111. 2017.

ANEXOS

Anexo I: Avaliação do efeito citotóxico dos inibidores de endocitose utilizados.

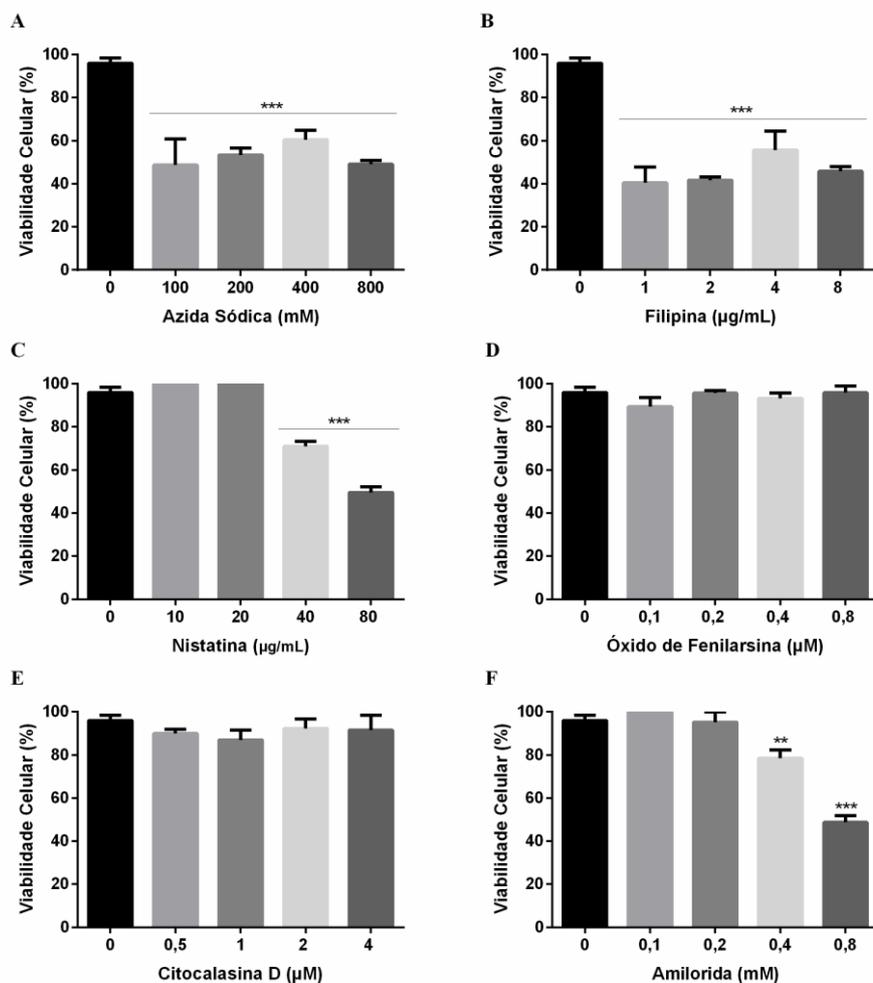


Figura 55: Toxicidade dos inibidores de endocitose nas células 4T1. **A** - azida sódica (0; 100; 200; 400 e 800 mM); **B** - filipina (0; 1; 2; 4 e 8 µg/mL); **C** - nistatina (0; 10; 20; 40 e 80 µg/mL); **D** - óxido de fenilarsina (0; 0,1; 0,2; 0,4 e 0,8 µM); **E** - citocalasina D (0; 0,5; 1; 2 e 4 µM); e **F** - amilorida (0; 0,1; 0,2; 0,4 e 0,8 mM). Os sobrescritos ** e *** indicam diferença estatisticamente significativa, $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente, em relação ao controle. Dados plotados como \pm EPM para quintuplicatas.

Anexo II: Internalização do AIFtCl com o RE das células 4T1 expostas à NE-AIFtCl
Internalização do AIFtCl com os lisossomos das células 4T1 expostas à NE-AIFtCl

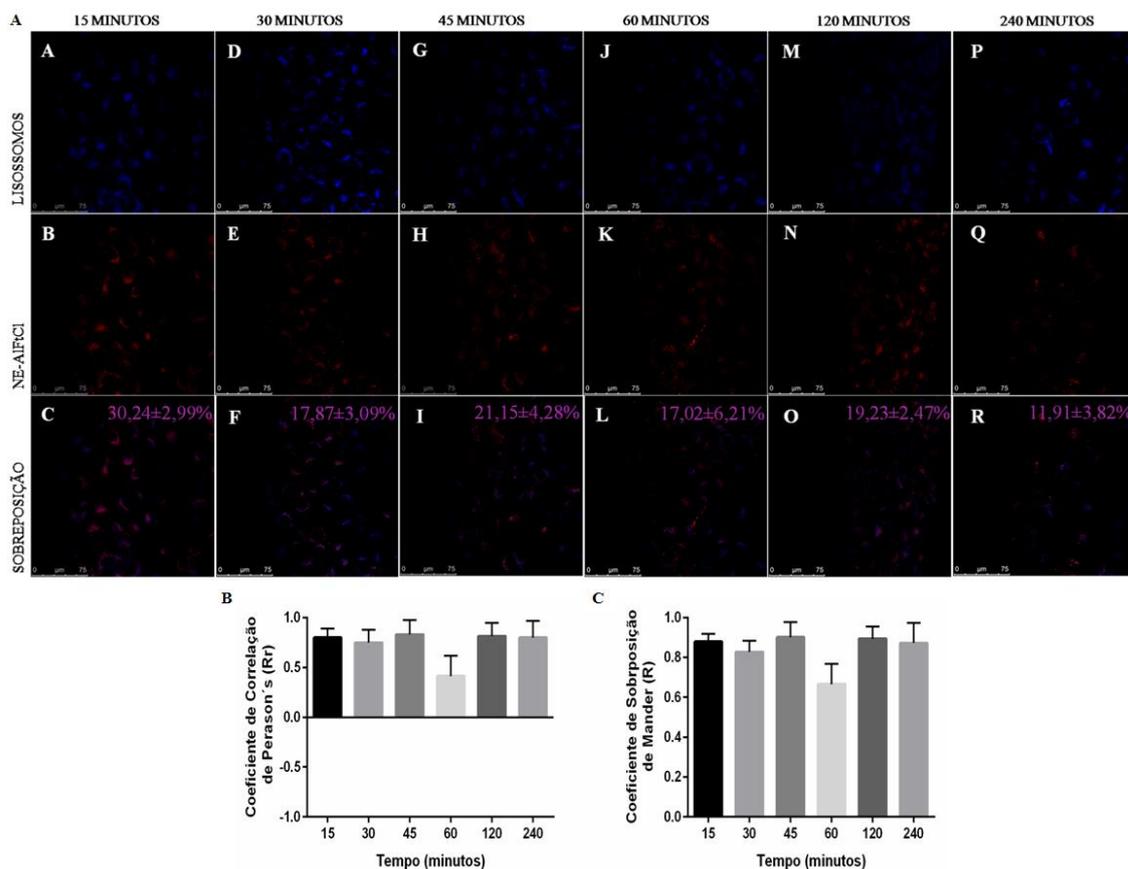


Figura 56: Análise de colocalização do AIFtCl com lisossomos de células 4T1. **A** - Fotos obtidas em diferentes tempos após a exposição à NE-AIFtCl. A primeira fileira de imagens, representadas pelas letras A, D, G, J, M e P, mostra a marcação de lisossomos com *LysoTracker*[®] blue; as imagens da segunda fileira, representadas pelas letras B, E, H, K, N e Q, são referentes à fluorescência AIFtCl; e as imagens da terceira fileira, que estão representadas pelas letras C, F, I, L, O e R, são referentes à sobreposição das imagens da primeira fileira com a segunda. A porcentagem de colocalização está apresentada no canto superior das imagens C, F, I, L, O e R. A análise de colocalização foi feita no programa ImageJ (*Intensity Correlation Analysis*). Cada imagem é representativa de uma quintuplicata de amostras analisadas. **B** - Valores dos coeficientes da análise da intensidade de correlação do perfil de colocalização da NE-AIFtCl com os lisossomos nos diferentes tempos avaliados (eixo x). Valores de coeficiente de correlação de Pearson's (*Rr*). **C** - Valores de coeficiente de Mander's (*R*). Os dados estão apresentados com média ± EPM para quintuplicatas.

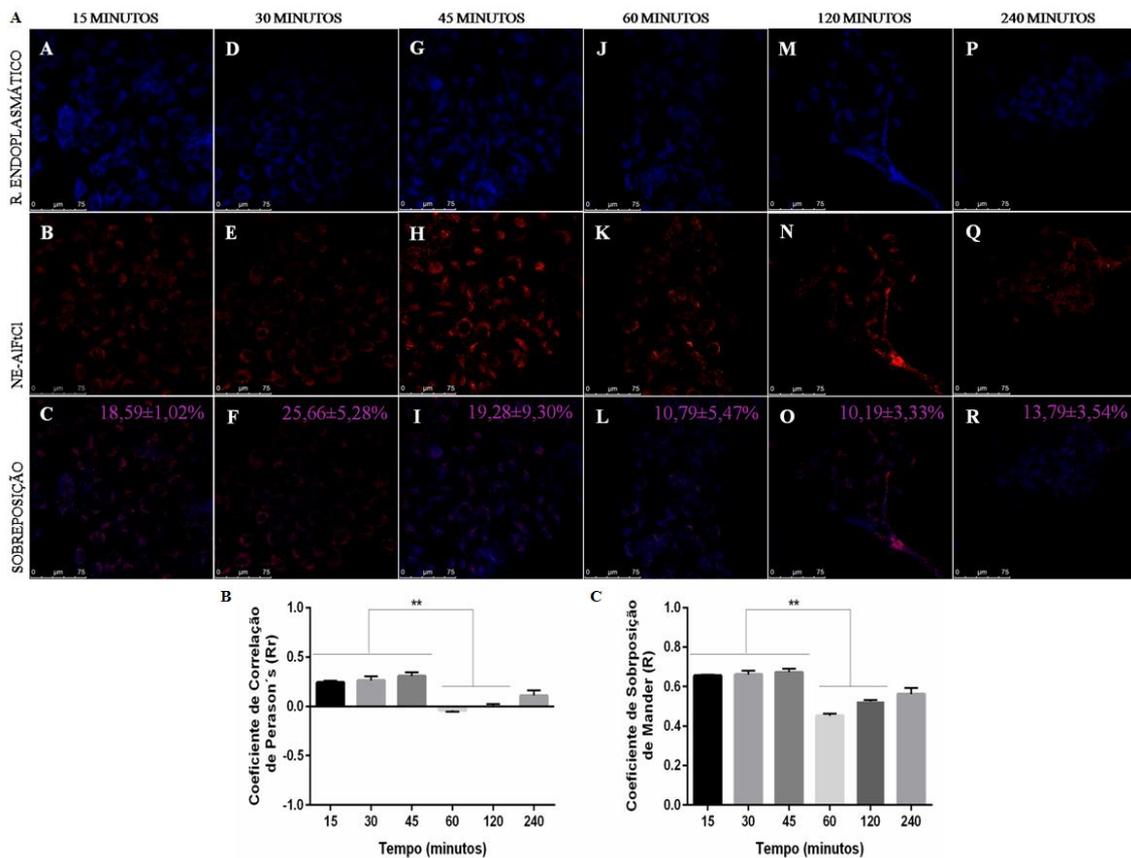


Figura 57: Análise de colocalização do AIFtCl com RE de células 4T1. **A** - Fotos obtidas em diferentes tempos após a exposição à NE-AIFtCl. A primeira fileira de imagens, representadas pelas letras A, D, G, J, M e P, mostra a marcação do RE com *ER-Tracker® blue*; as imagens da segunda fileira, representadas pelas letras B, E, H, K, N e Q, são referentes à fluorescência AIFtCl; e as imagens da terceira fileira, que estão representadas pelas letras C, F, I, L, O e R, são referentes à sobreposição das imagens da primeira fileira com a segunda. A porcentagem de colocalização está apresentada no canto superior das imagens C, F, I, L, O e R. A análise de colocalização foi feita no programa ImageJ (*Intensity Correlation Analysis*). Cada imagem é representativa de uma quintuplicata de amostras analisadas. **B** - Valores dos coeficientes da análise da intensidade de correlação do perfil de colocalização da NE-AIFtCl com o RE nos diferentes tempos avaliados (eixo x). Valores de coeficiente de correlação de Pearson's (*Rr*). **C** - Valores de coeficiente de Mander's (*R*). Os dados estão apresentados com média ± EPM para quintuplicatas. Subscrito (**) indica correlação estatisticamente variável, $p < 0,01$. Os dados estão apresentados com média ± EPM para quintuplicatas.

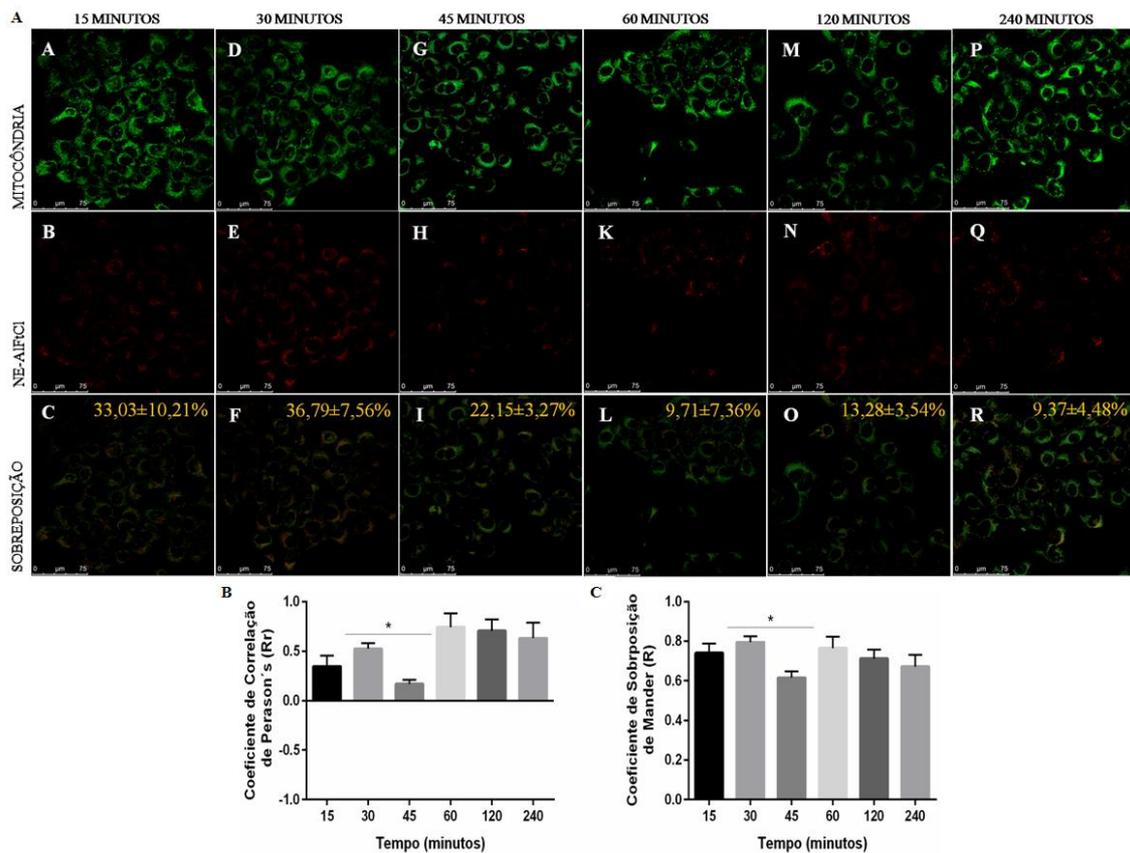


Figura 58: Análise de colocalização do AIFtCl com mitocôndria de células 4T1. **A** - Fotos obtidas em diferentes tempos após a exposição à NE-AIFtCl. A primeira fileira de imagens, representadas pelas letras A, D, G, J, M e P, mostra a marcação de mitocôndria com *MitoTracker*[®] blue; as imagens da segunda fileira, representadas pelas letras B, E, H, K, N e Q, são referentes à fluorescência AIFtCl; e as imagens da terceira fileira, que estão representadas pelas letras C, F, I, L, O e R, são referentes à sobreposição das imagens da primeira fileira com a segunda. A porcentagem de colocalização está apresentada no canto superior das imagens C, F, I, L, O e R. A análise de colocalização foi feita no programa ImageJ (*Intensity Correlation Analysis*). Cada imagem é representativa de uma quintuplicata de amostras analisadas. **B** - Valores dos coeficientes da análise da intensidade de correlação do perfil de colocalização da NE-AIFtCl com a mitocôndria nos diferentes tempos avaliados (eixo x). Valores de coeficiente de correlação de Pearson's (*Rr*). **C** - Valores de coeficiente de Mander's (*R*). Os dados estão apresentados com média ± EPM para quintuplicatas. Subscrito (**) indica correlação estatisticamente variável, $p < 0,01$. Os dados estão apresentados com média ± EPM para quintuplicatas.

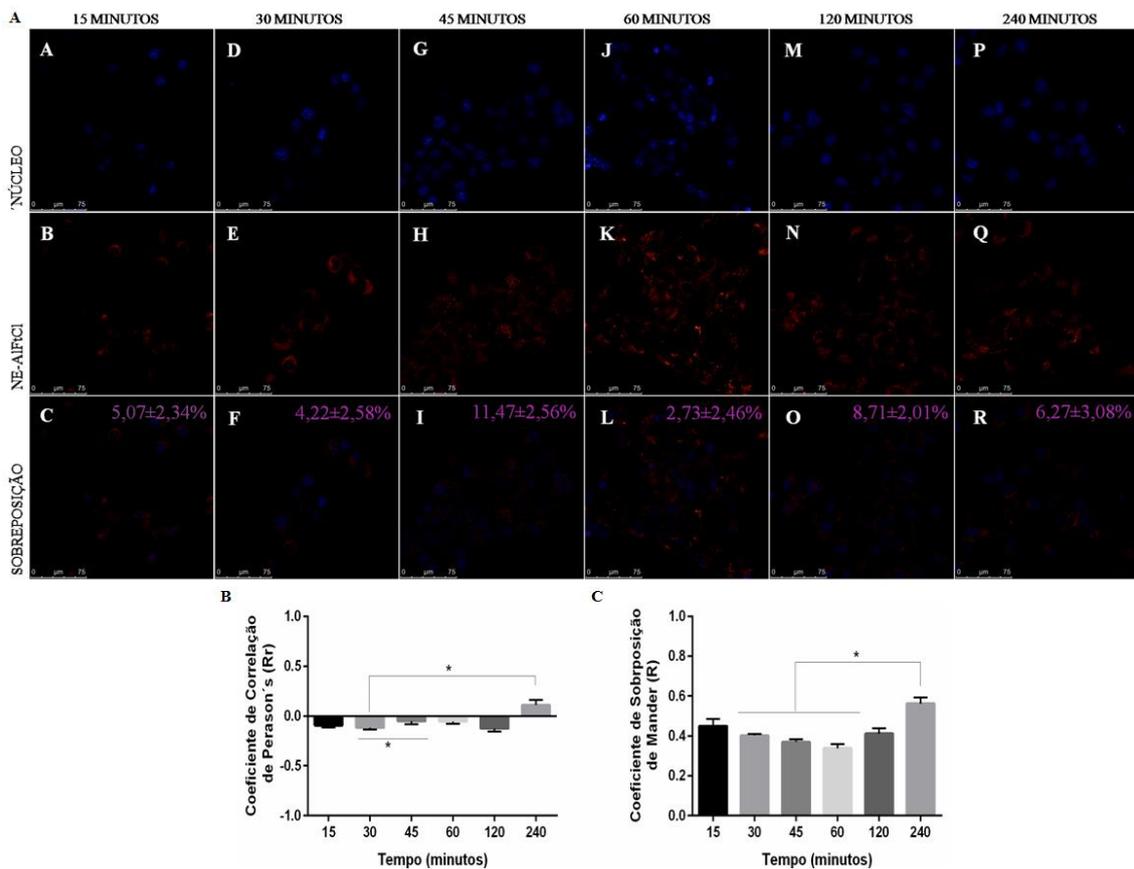


Figura 59: Análise de colocalização do AIFtCl com núcleo de células 4T1. **A** - Fotos obtidas em diferentes tempos após a exposição à NE-AIFtCl. A primeira fileira de imagens, representadas pelas letras A, D, G, J, M e P, mostra a marcação do núcleo com *DAPI*; as imagens da segunda fileira, representadas pelas letras B, E, H, K, N e Q, são referentes à fluorescência AIFtCl; e as imagens da terceira fileira, que estão representadas pelas letras C, F, I, L, O e R, são referentes à sobreposição das imagens da primeira fileira com a segunda. A porcentagem de colocalização está apresentada no canto superior das imagens C, F, I, L, O e R. A análise de colocalização foi feita no programa ImageJ (*Intensity Correlation Analysis*). Cada imagem é representativa de uma quintuplicata de amostras analisadas. **B** - Valores dos coeficientes da análise da intensidade de correlação do perfil de colocalização da NE-AIFtCl com o núcleo nos diferentes tempos avaliados (eixo x). Valores de coeficiente de correlação de Pearson's (*Rr*). **C** - Valores de coeficiente de Mander's (*R*). Dados plotados como \pm EPM. Subscrito (**) indica correlação estatisticamente variável, $p < 0,01$. Os dados estão apresentados com média \pm EPM para quintuplicatas.

Anexo III: Resultados da diluição seridada do quimioterápico MTX e obtenção da CC50.

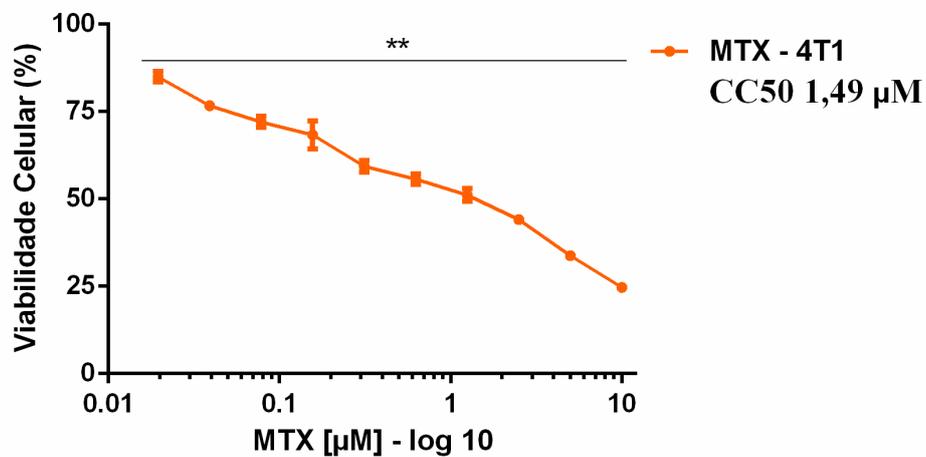
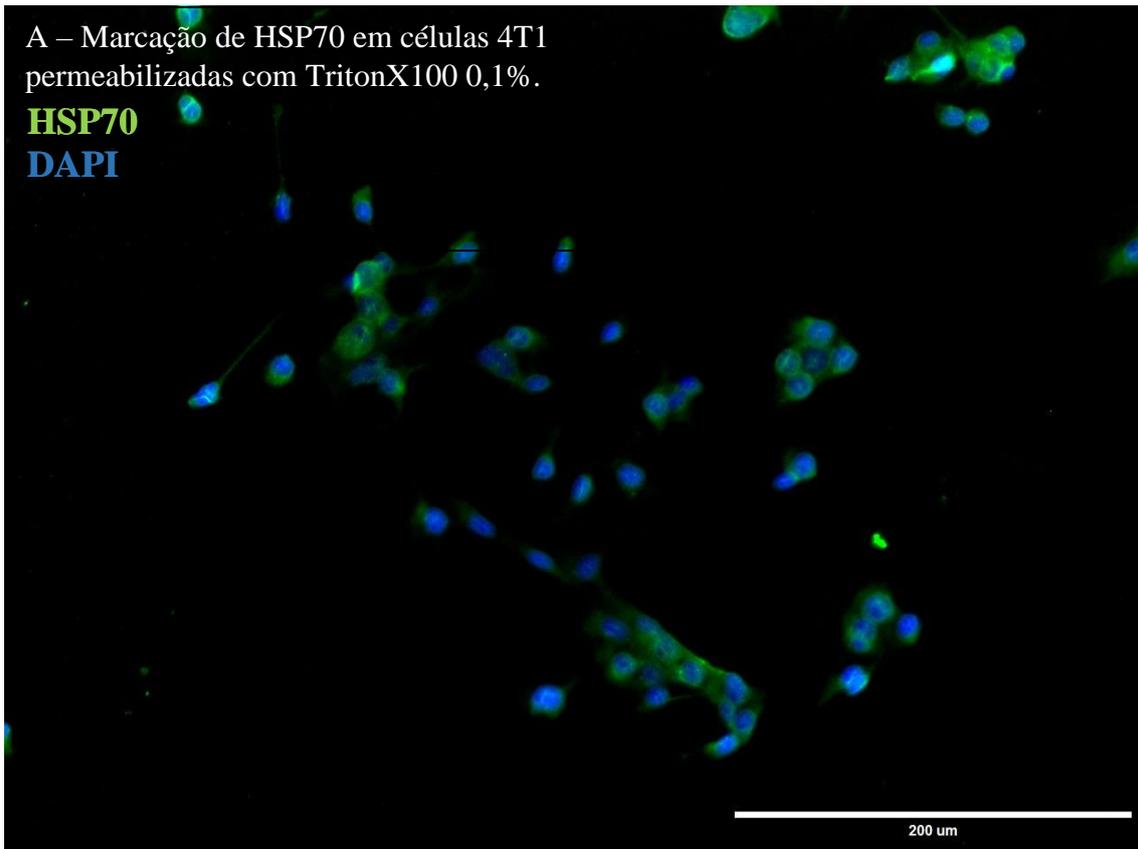


Figura 60: Efeito citotóxico causado por diferentes concentrações do quimioterápico MTX (0-10 µM) em células 4T1. Subscrito (**) refere à diferença estatística de $p < 0,01$. Eixo y refere-se a células que não foram expostas à MTX, utilizada como controle.

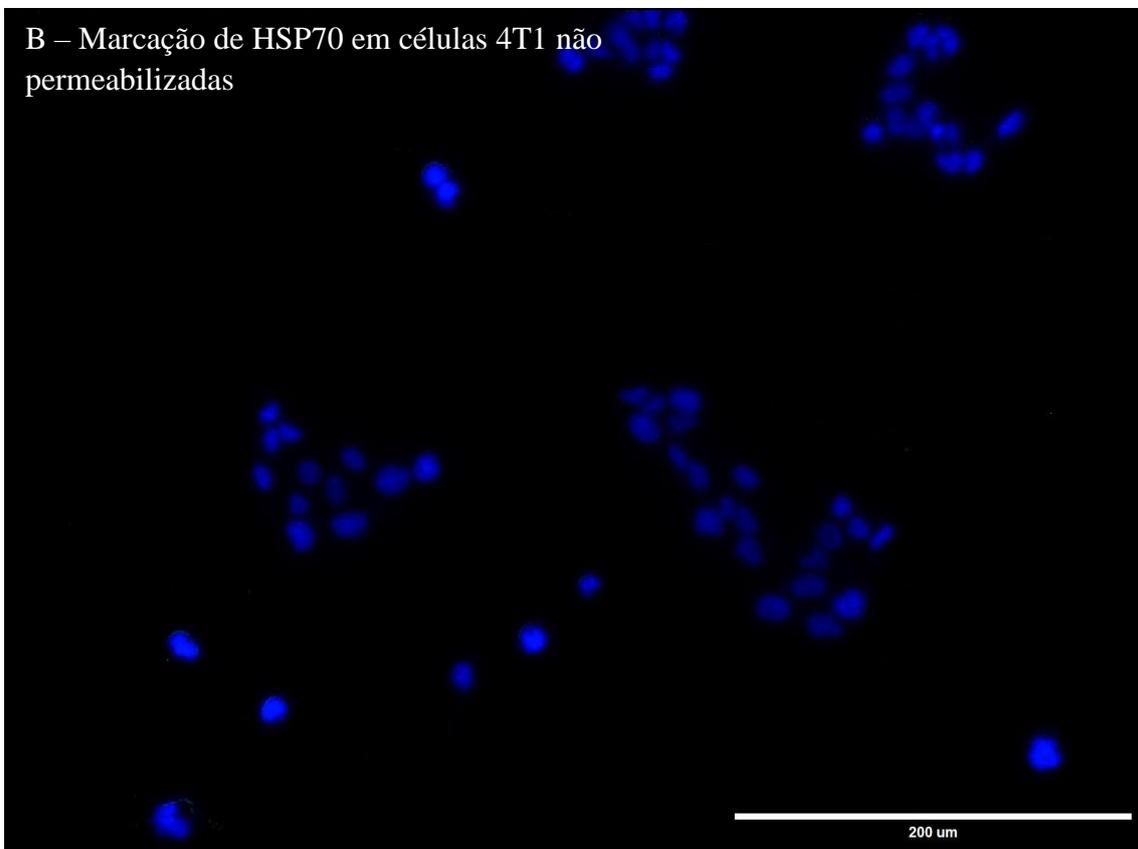
Anexo IV: Imagnes com a marcação da proteína HSP70 (Figura 61).

A – Marcação de HSP70 em células 4T1 permeabilizadas com TritonX100 0,1%.

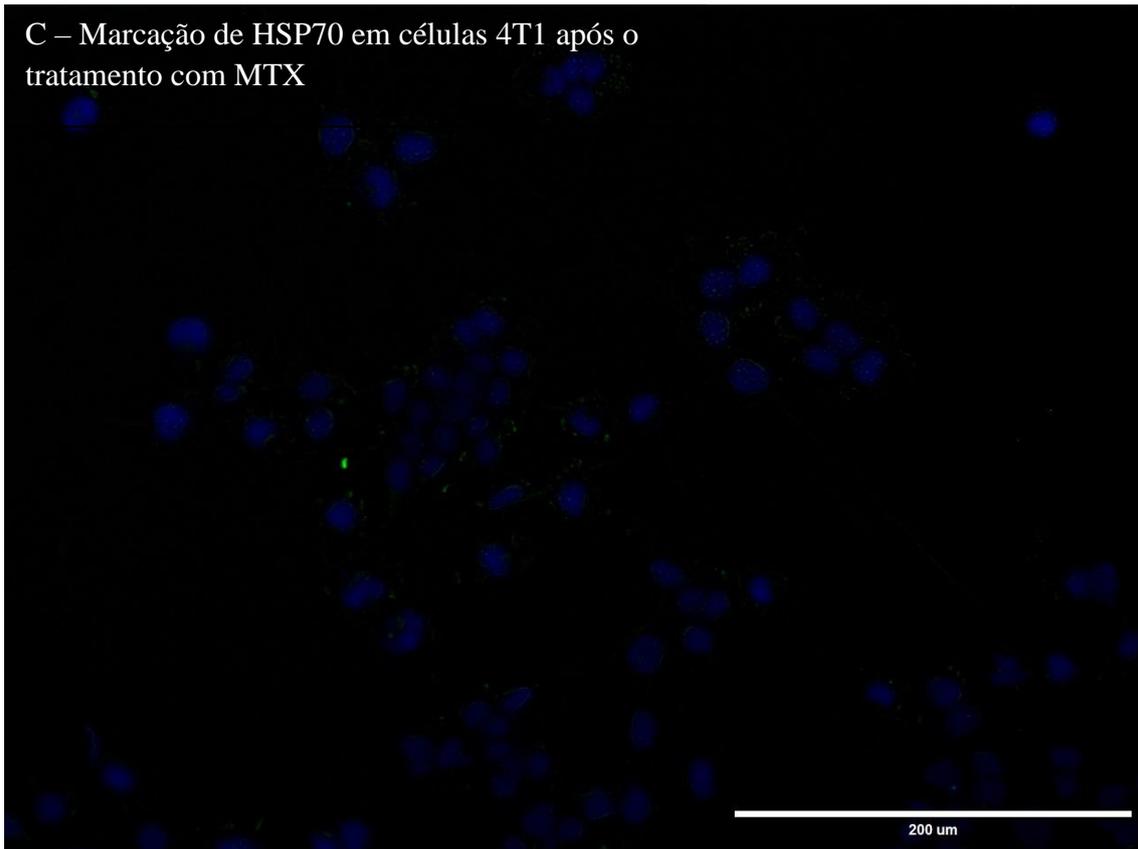
HSP70
DAPI



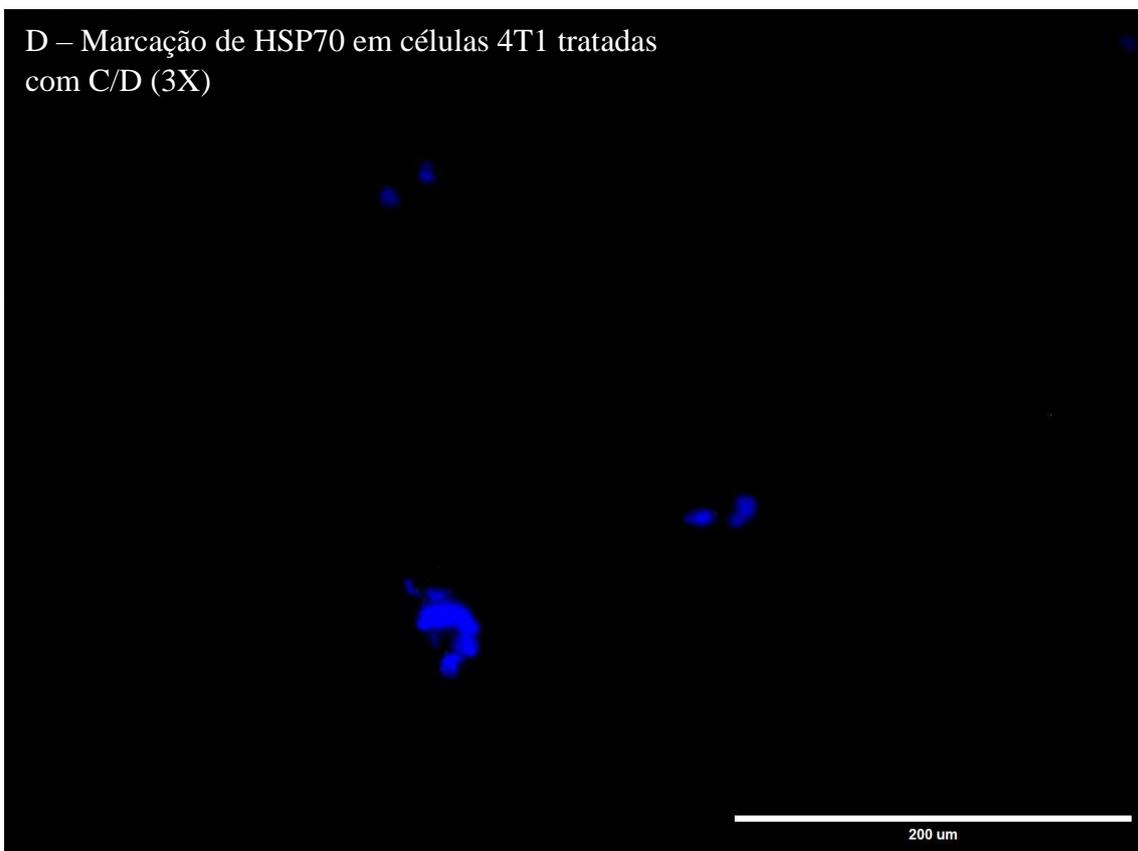
B – Marcação de HSP70 em células 4T1 não permeabilizadas



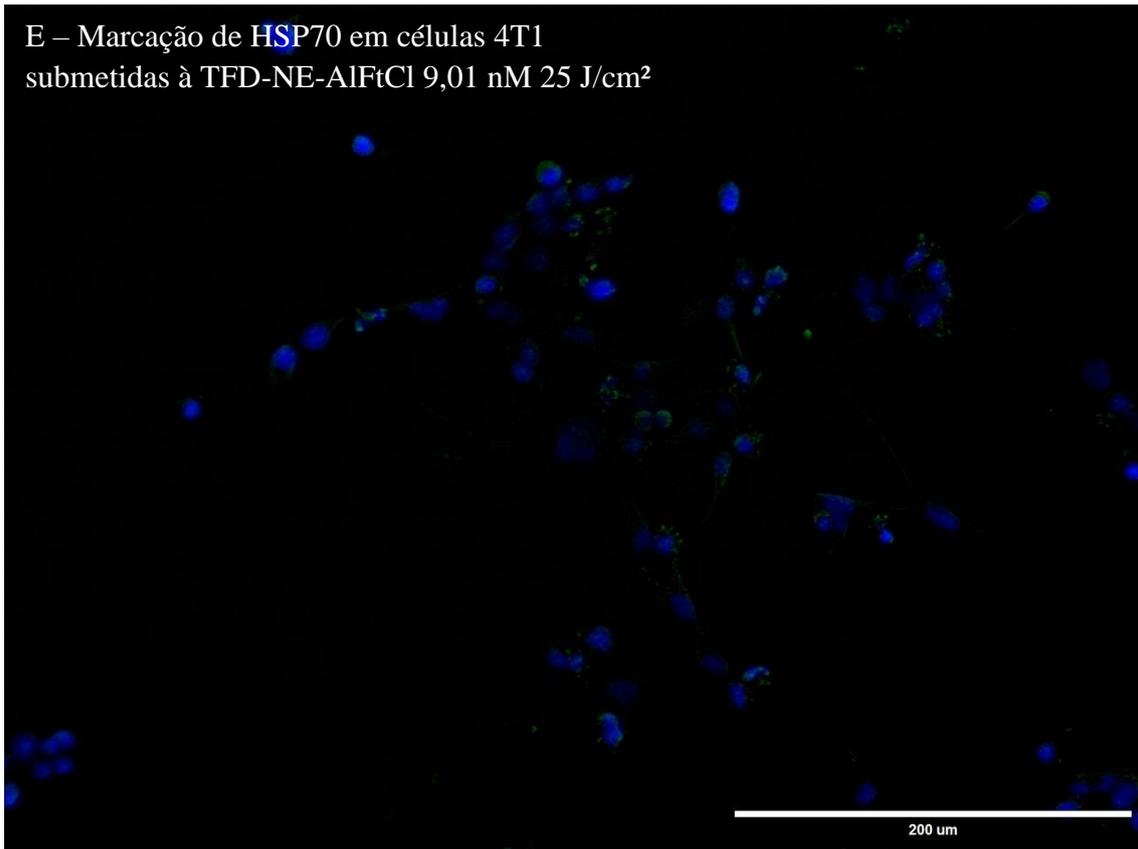
C – Marcação de HSP70 em células 4T1 após o tratamento com MTX



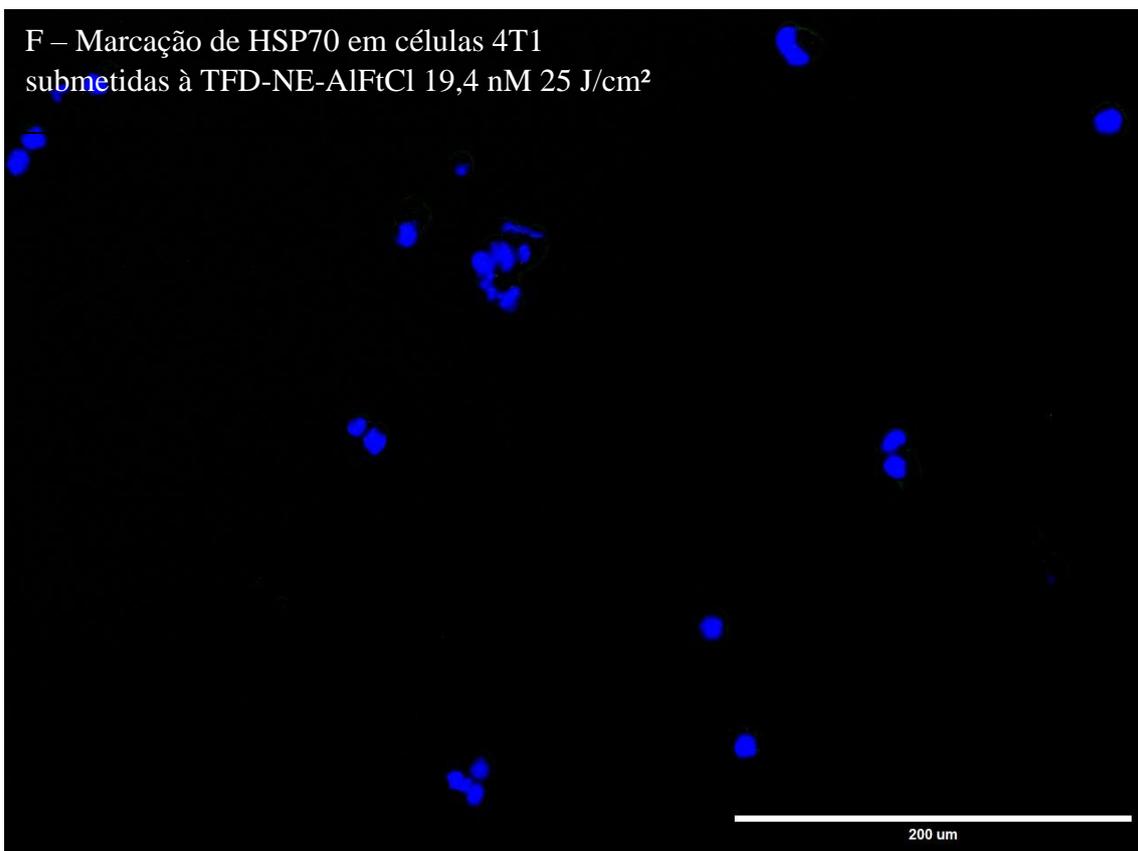
D – Marcação de HSP70 em células 4T1 tratadas com C/D (3X)



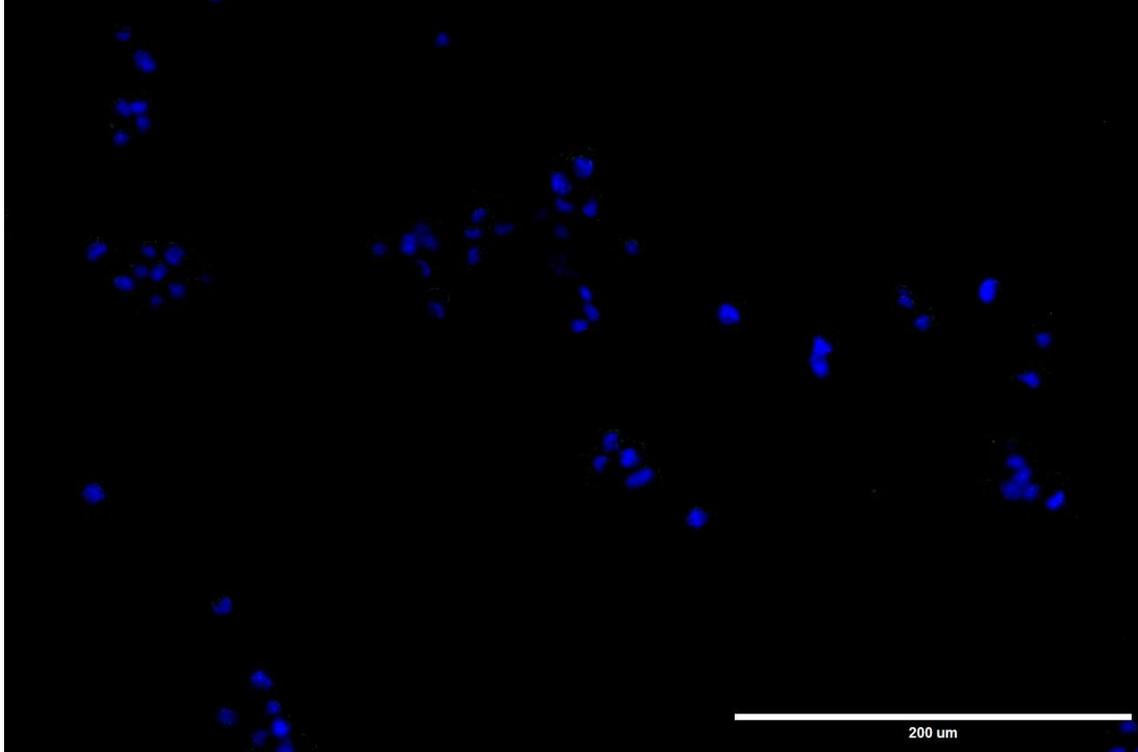
E – Marcação de HSP70 em células 4T1 submetidas à TFD-NE-AIFtCl 9,01 nM 25 J/cm²



F – Marcação de HSP70 em células 4T1 submetidas à TFD-NE-AIFtCl 19,4 nM 25 J/cm²



G – Marcação de HSP70 em células 4T1 submetidas à TFD-NE-AlFtCl 9,01 nM 67 J/cm²



H – Marcação de HSP70 em células 4T1 submetidas à TFD-NE-AlFtCl 19,4 nM 67 J/cm²

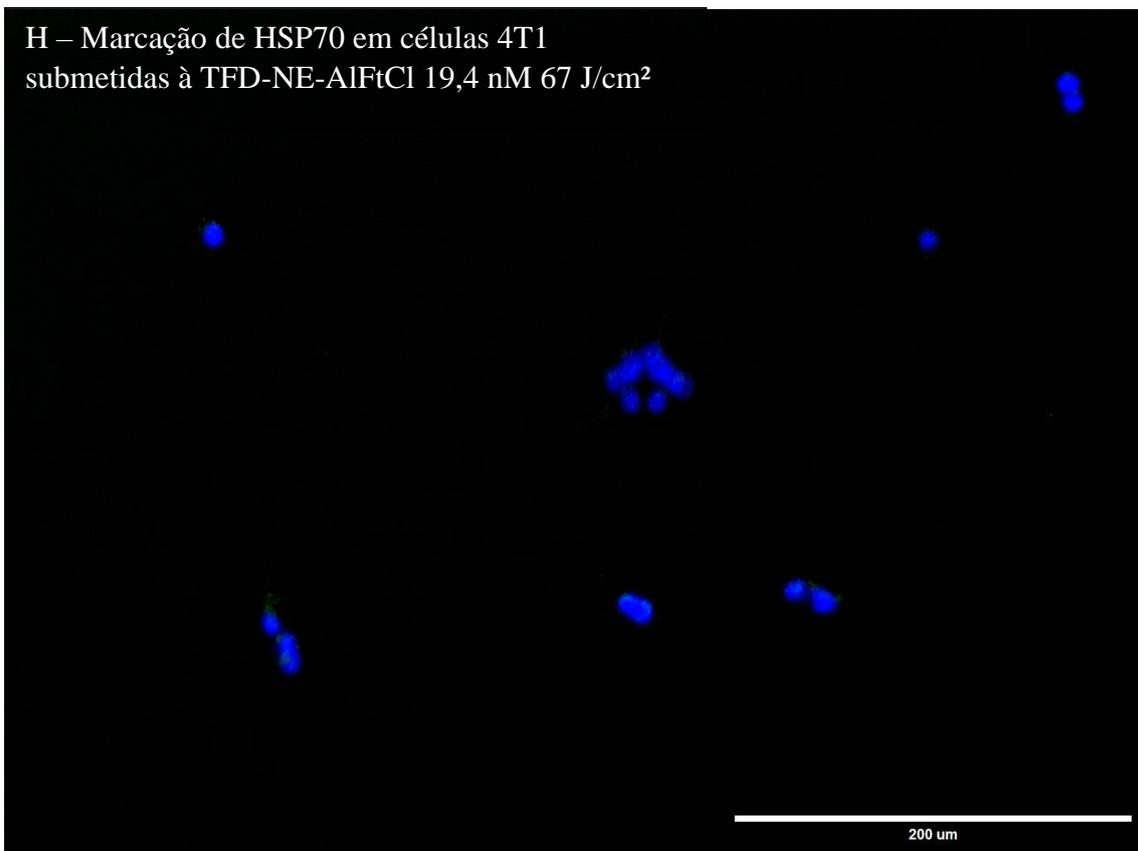
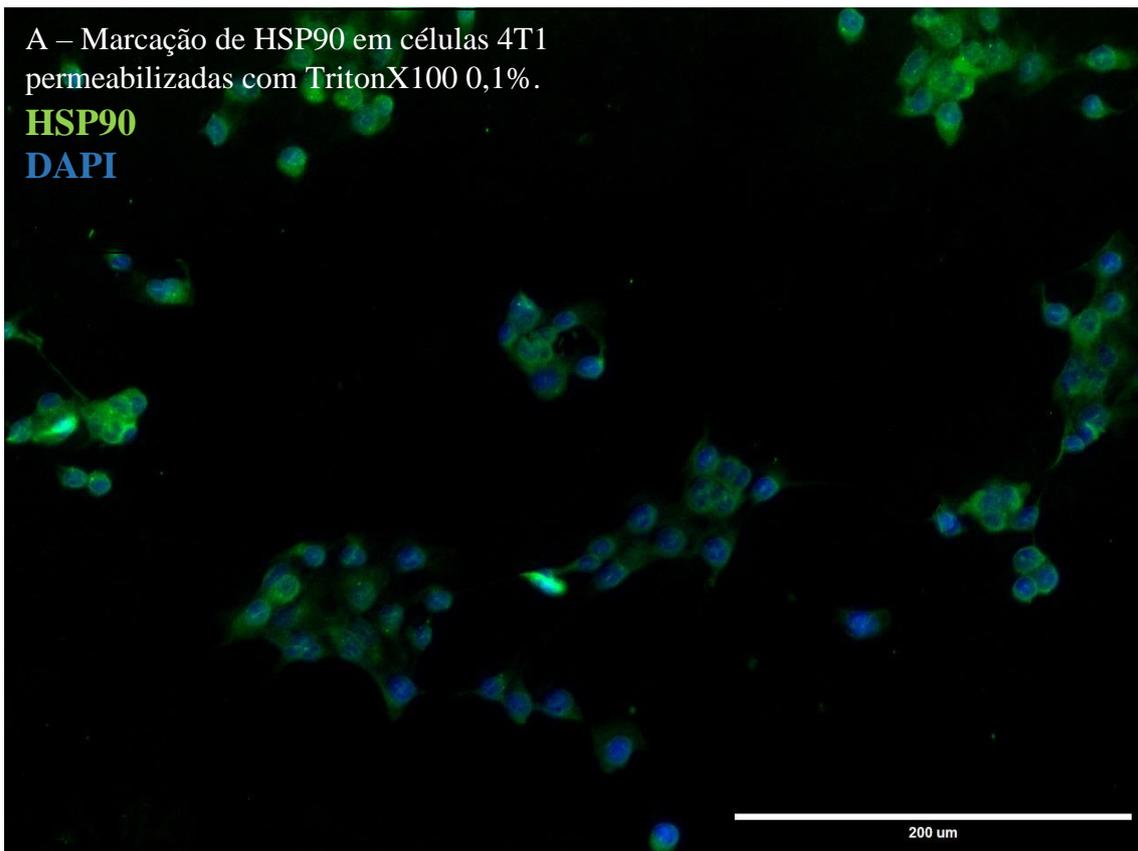


Figura 61: Emissão na membrana plasmática da proteína HSP70 em células 4T1 submetidas a diferentes protocolos da TFD-NE-AlFtCl. **A)** células 4T1 permeabilizadas com Triton X100 (0,01%); **B)** células 4T1 não permeabilizadas; **C)** células tratadas com MTX (1,5 μ M); **D)** células submetidas a C/D; **E-H)** aplicação dos diferentes protocolos da TFD alterando concentração e dose de energia.

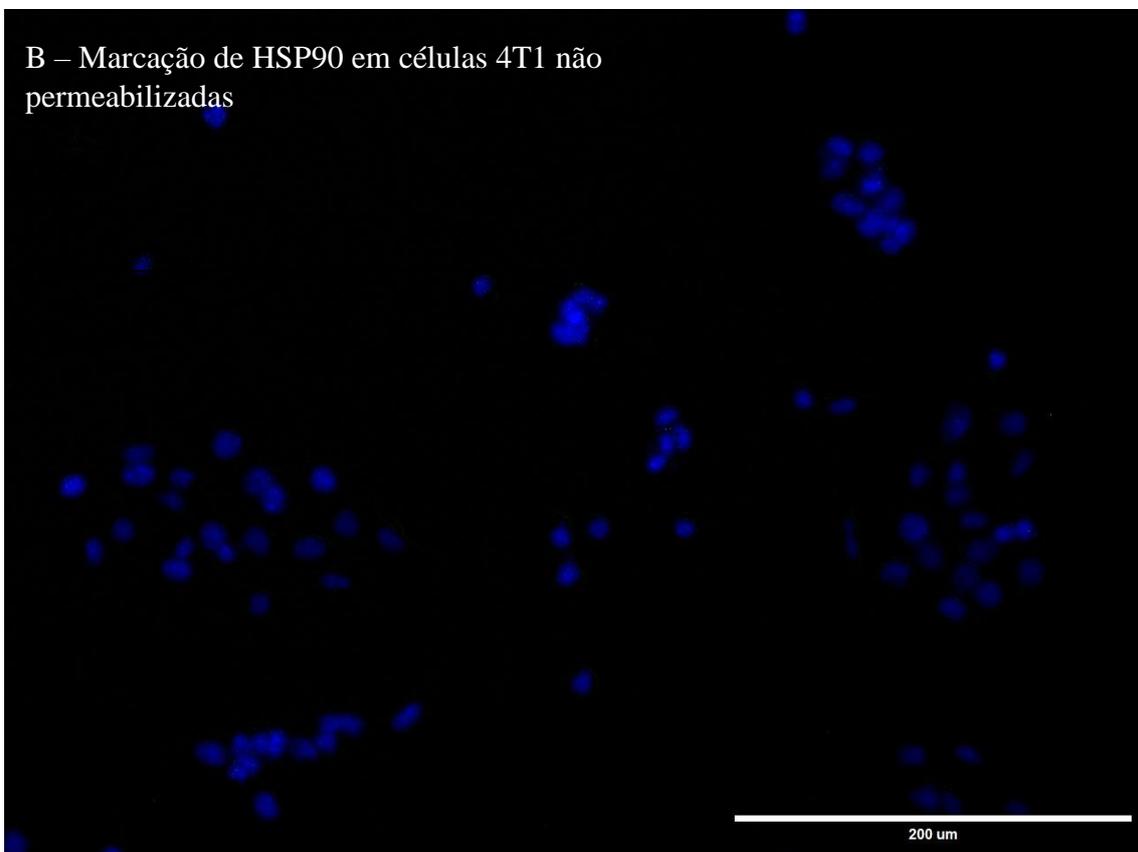
Anexo V: Imagens com a marcação da proteína HSP90 (**Figura 62**).

A – Marcação de HSP90 em células 4T1 permeabilizadas com TritonX100 0,1%.

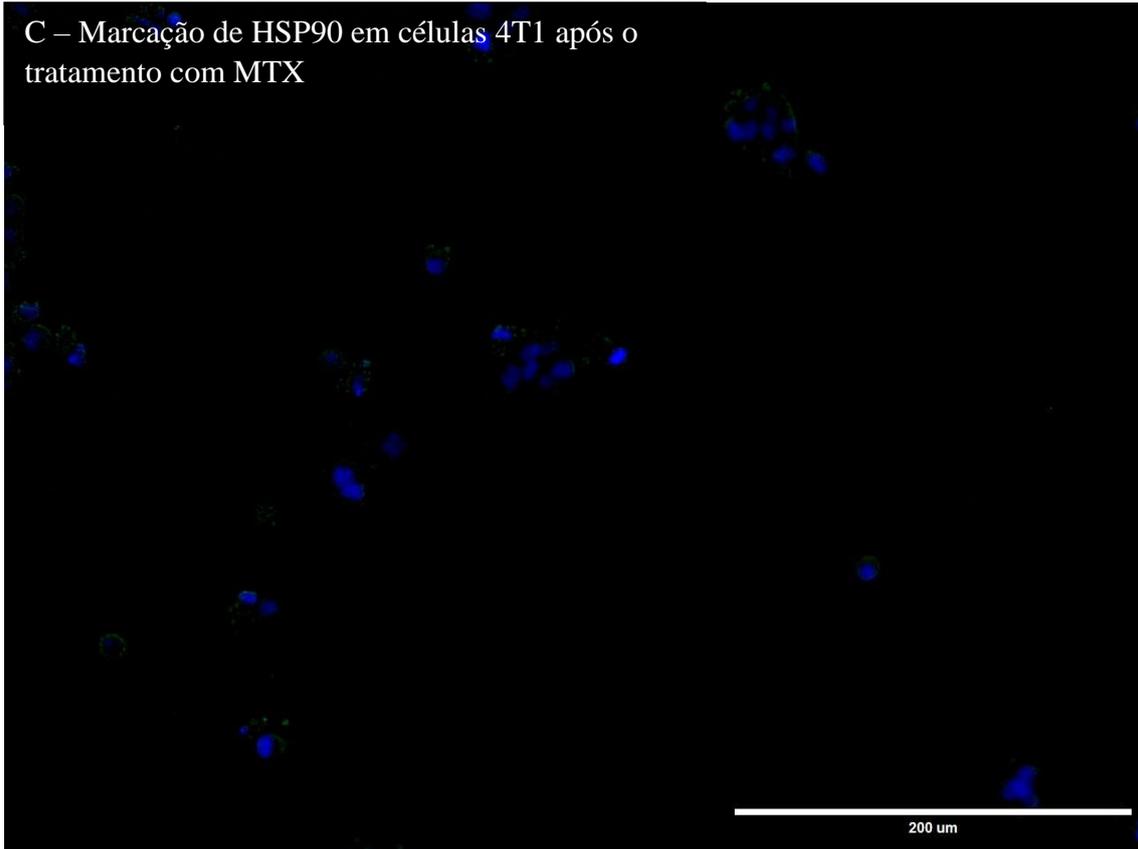
HSP90
DAPI



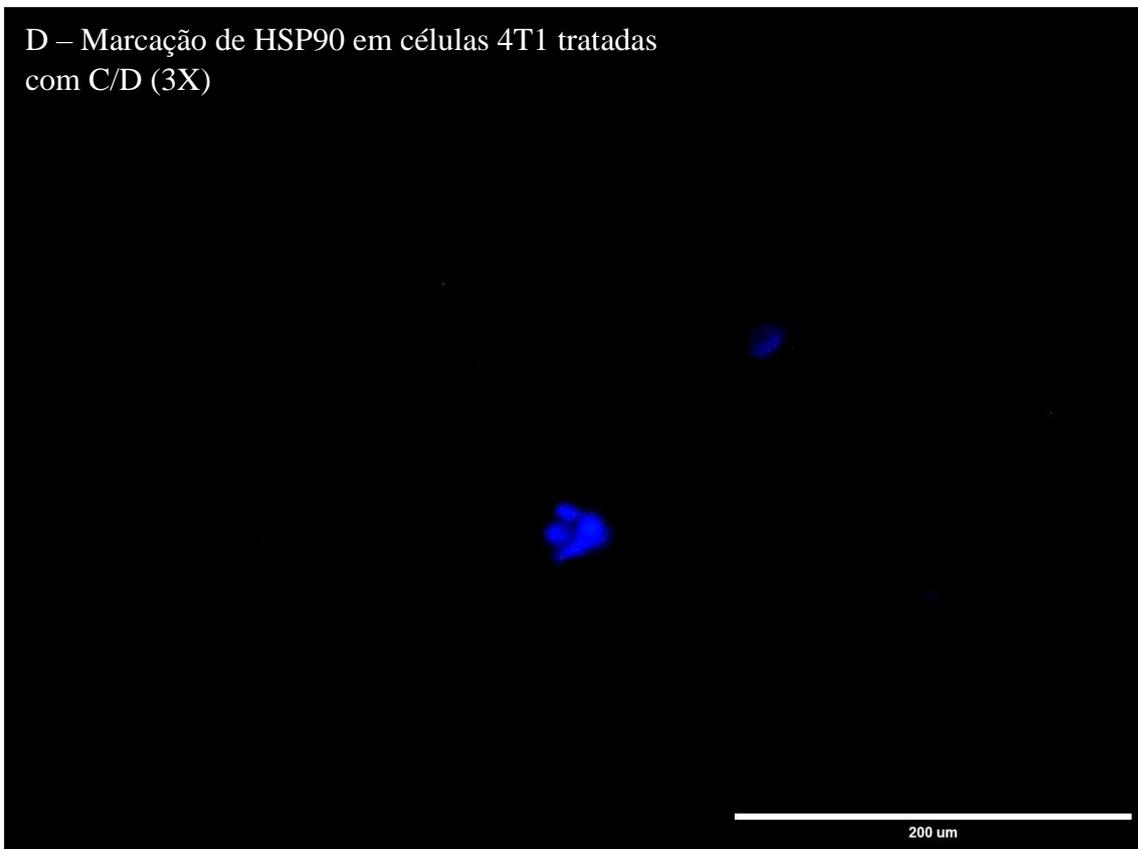
B – Marcação de HSP90 em células 4T1 não permeabilizadas



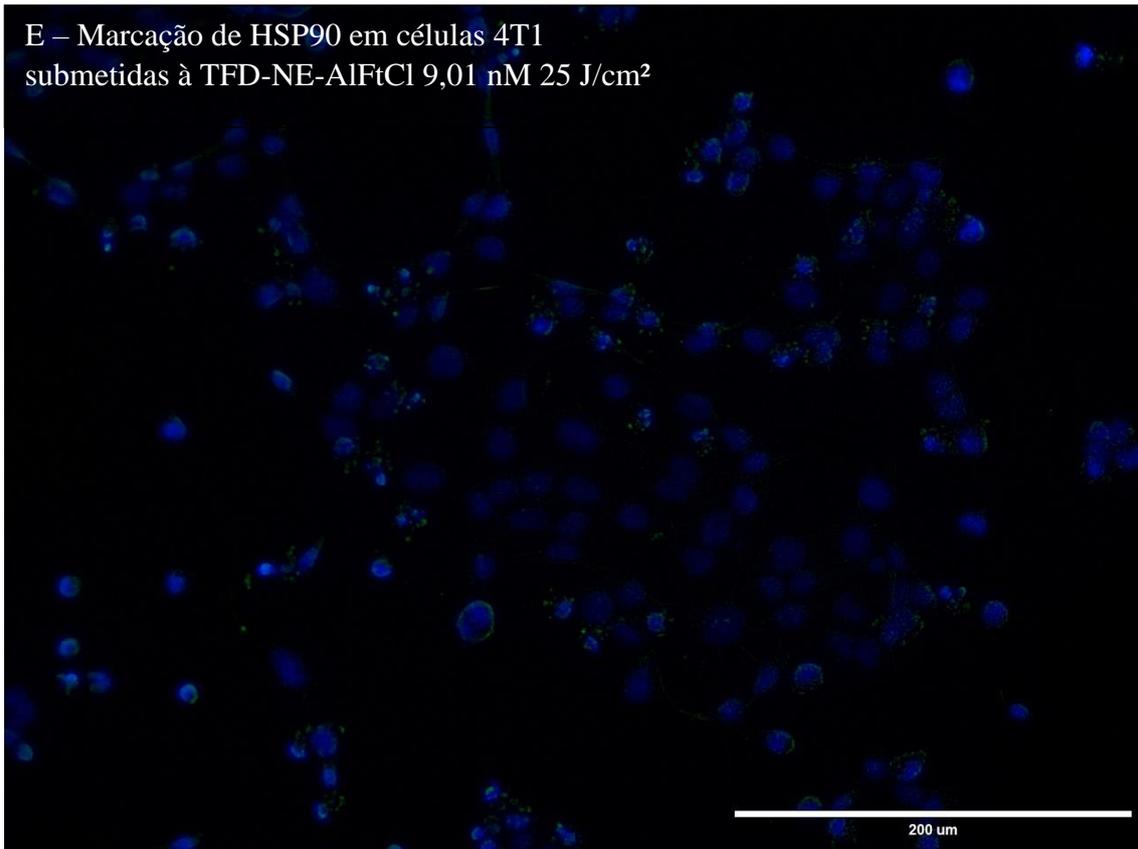
C – Marcação de HSP90 em células 4T1 após o tratamento com MTX



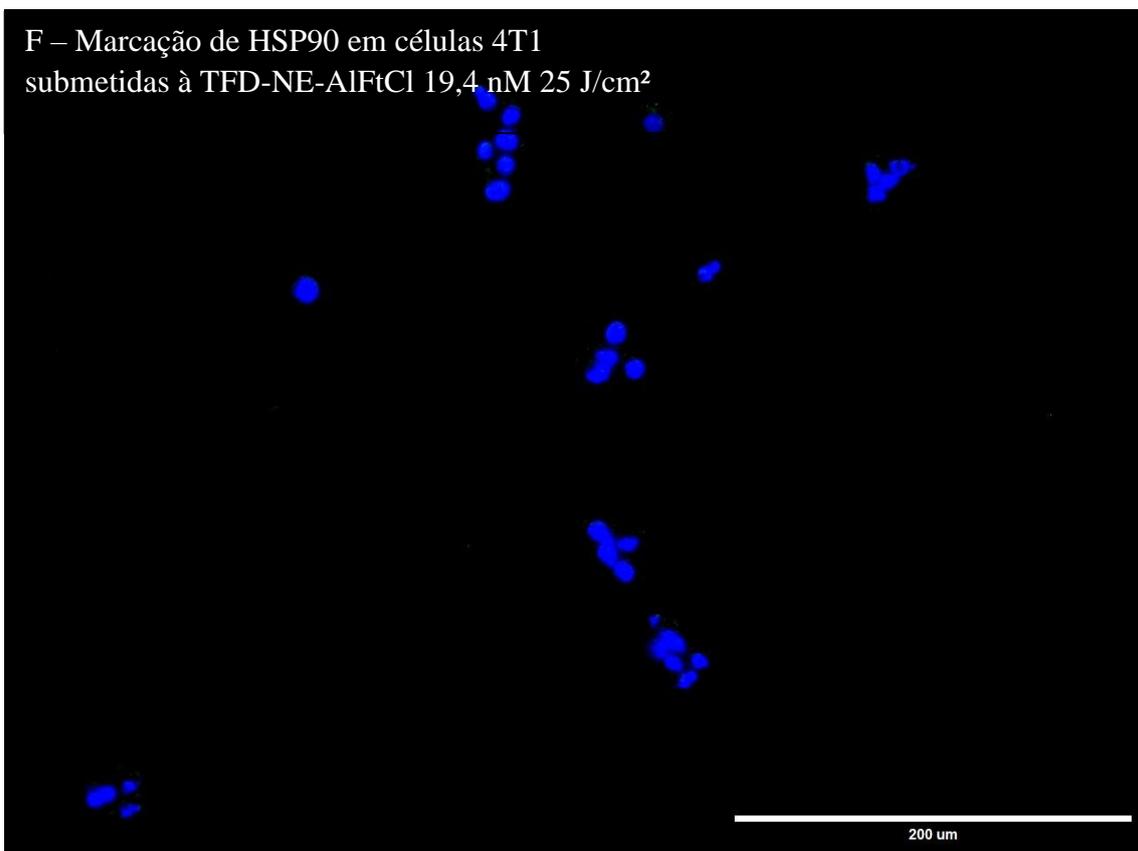
D – Marcação de HSP90 em células 4T1 tratadas com C/D (3X)



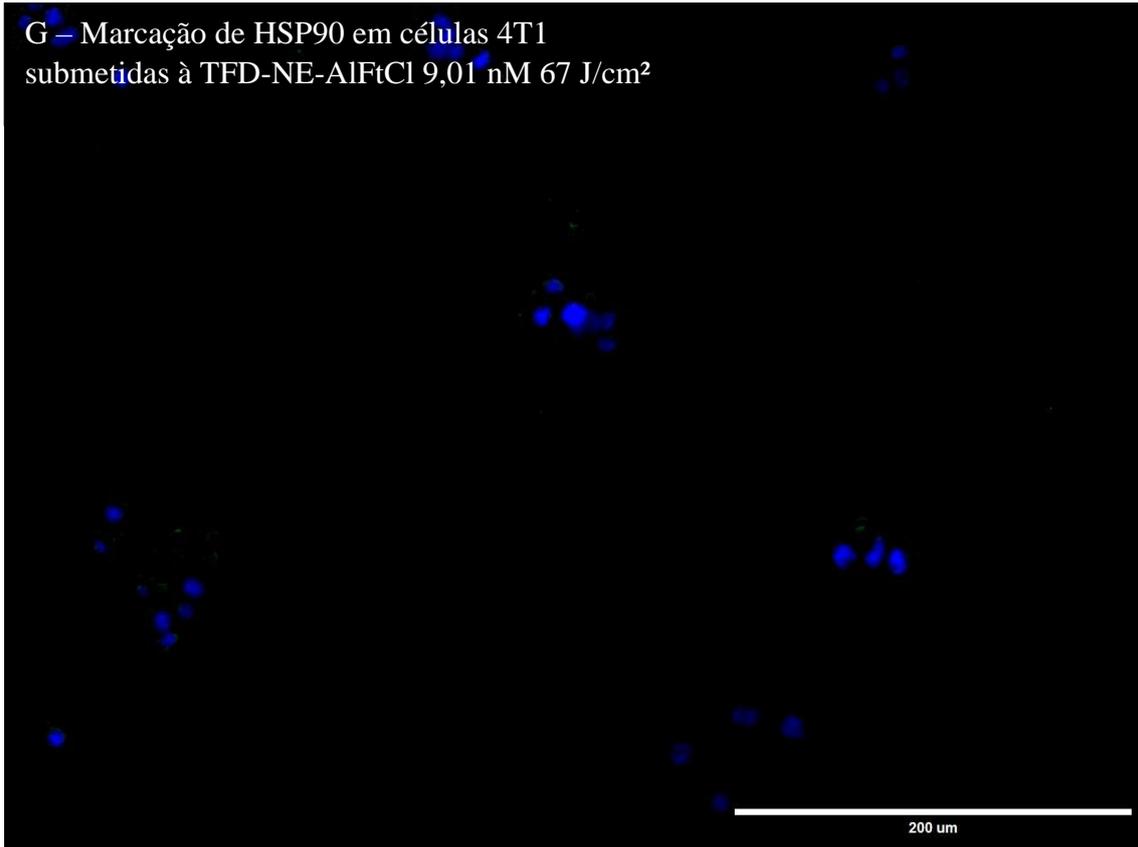
E – Marcação de HSP90 em células 4T1 submetidas à TFD-NE-AIFtCl 9,01 nM 25 J/cm²



F – Marcação de HSP90 em células 4T1 submetidas à TFD-NE-AIFtCl 19,4 nM 25 J/cm²



G – Marcação de HSP90 em células 4T1 submetidas à TFD-NE-AlFtCl 9,01 nM 67 J/cm²



H – Marcação de HSP90 em células 4T1 submetidas à TFD-NE-AlFtCl 19,4 nM 67 J/cm²

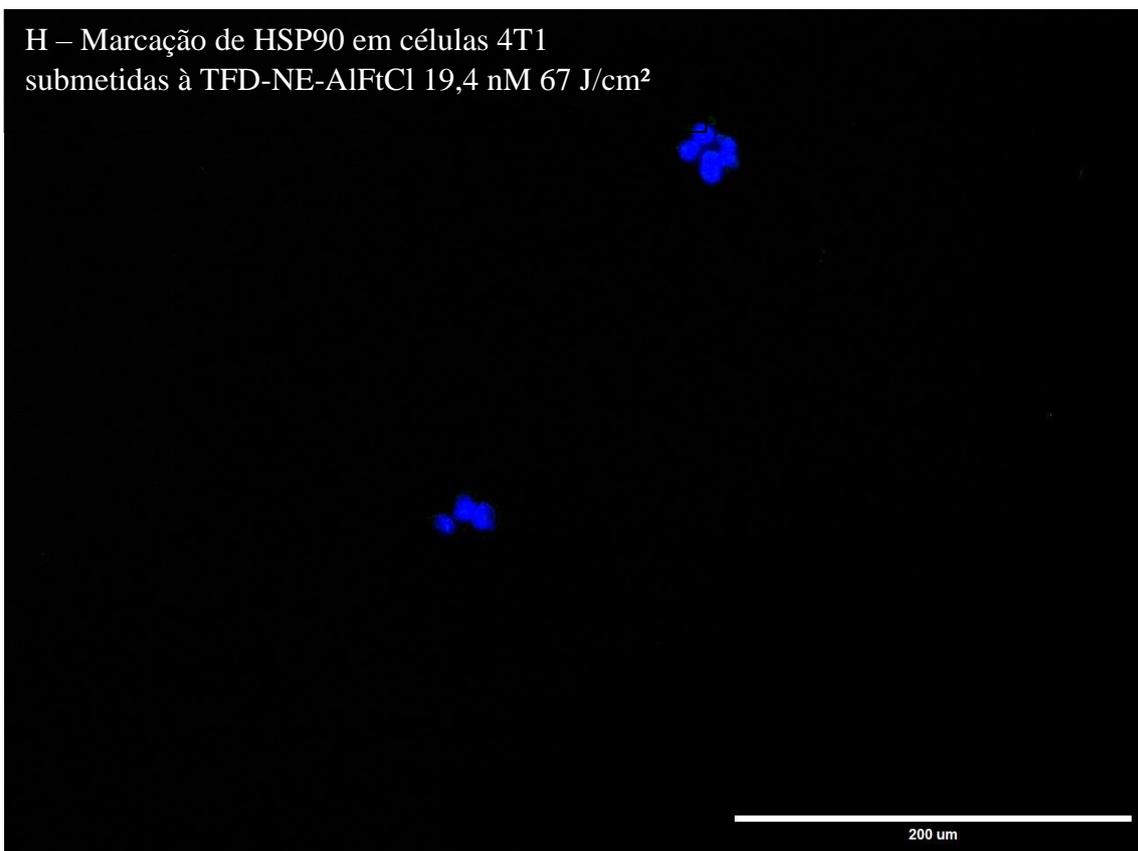
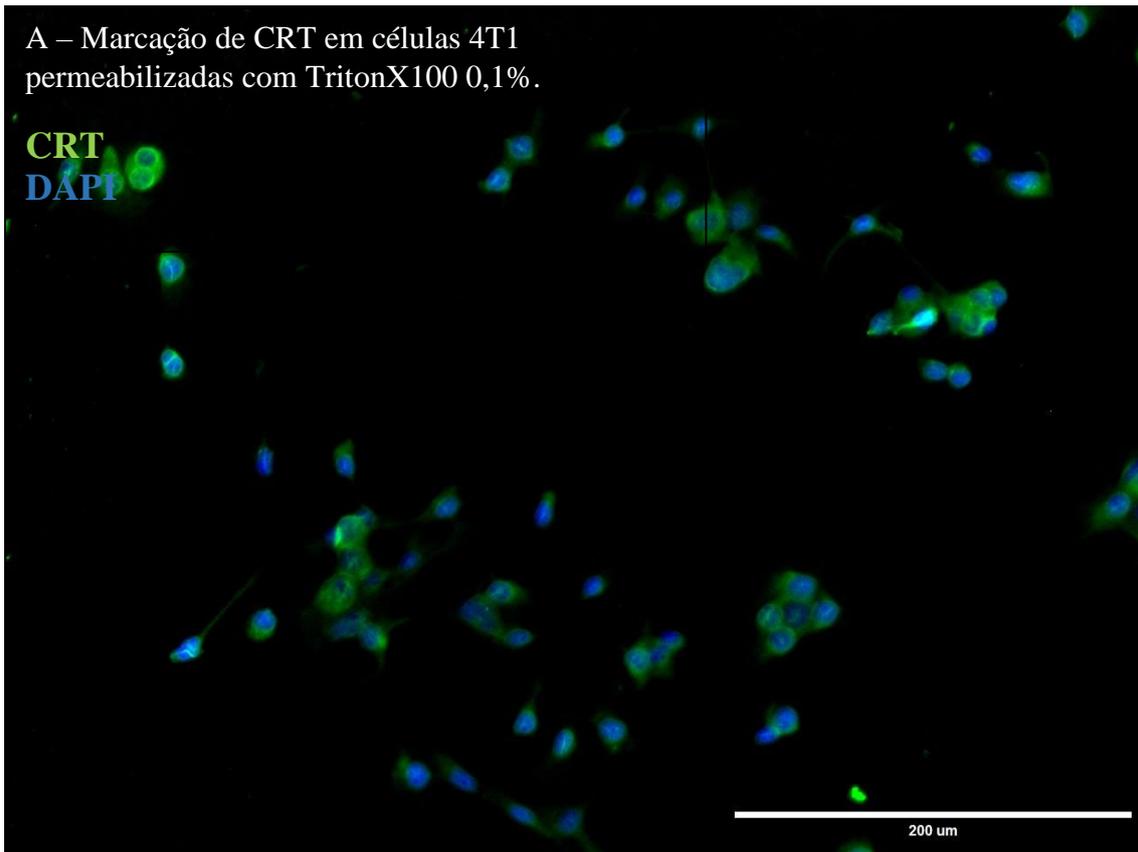


Figura 62: Emissão na membrana plasmática da proteína HSP90 em células 4T1 submetidas a diferentes protocolos da TFD-NE-AlFtCl. **A)** células 4T1 permeabilizadas com Triton X100 (0,01%); **B)** células 4T1 não permeabilizadas; **C)** células tratadas com MTX (1,5 μ M); **D)** células submetidas a C/D; **E-H)** aplicação dos diferentes protocolos da TFD alterando concentração e dose de energia.

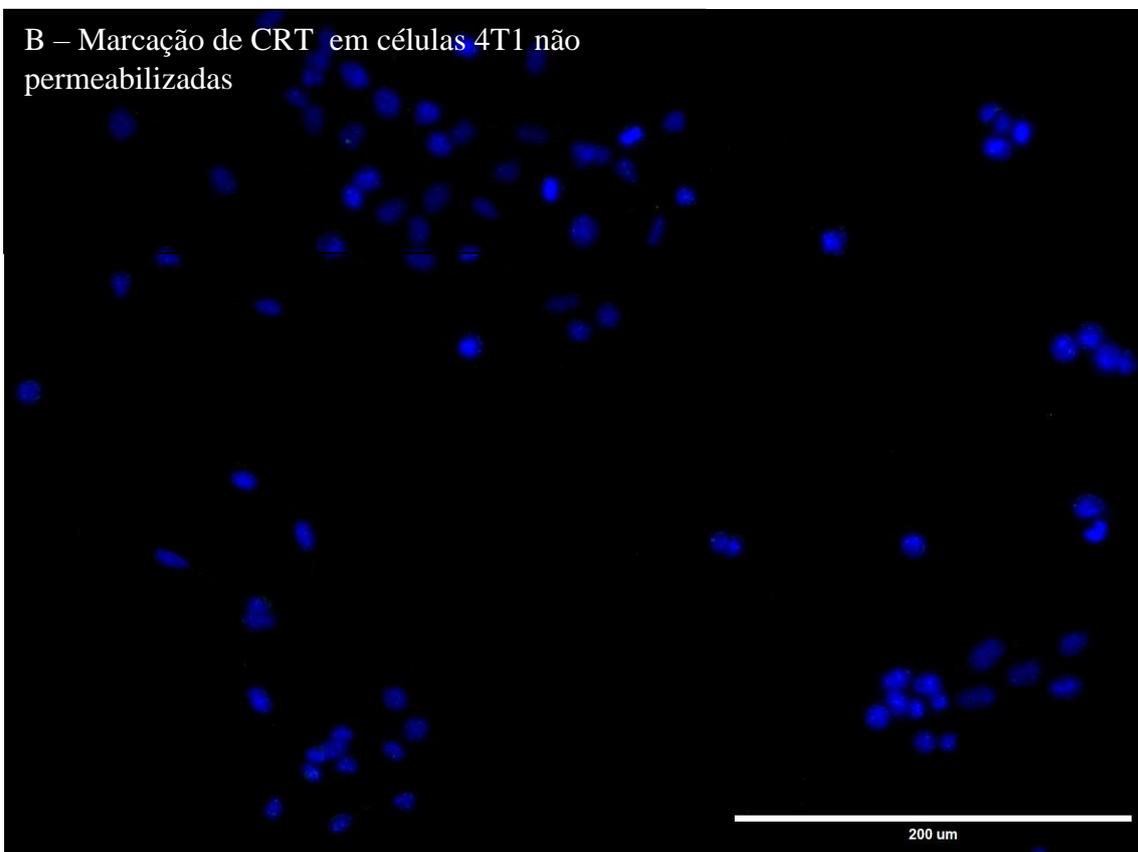
Anexo VI: Imagnes com a marcação de CRT (**Figura 62**) Ed.

A – Marcação de CRT em células 4T1 permeabilizadas com TritonX100 0,1%.

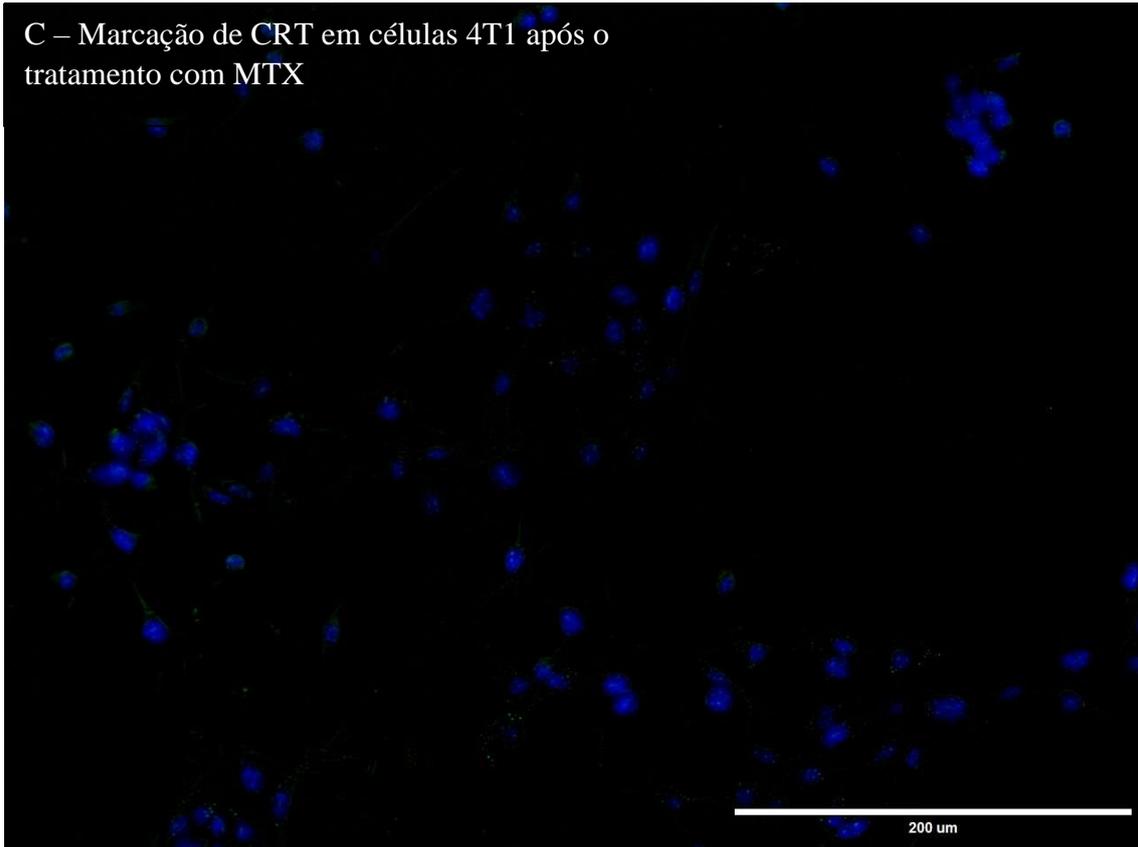
CRT
DAPI



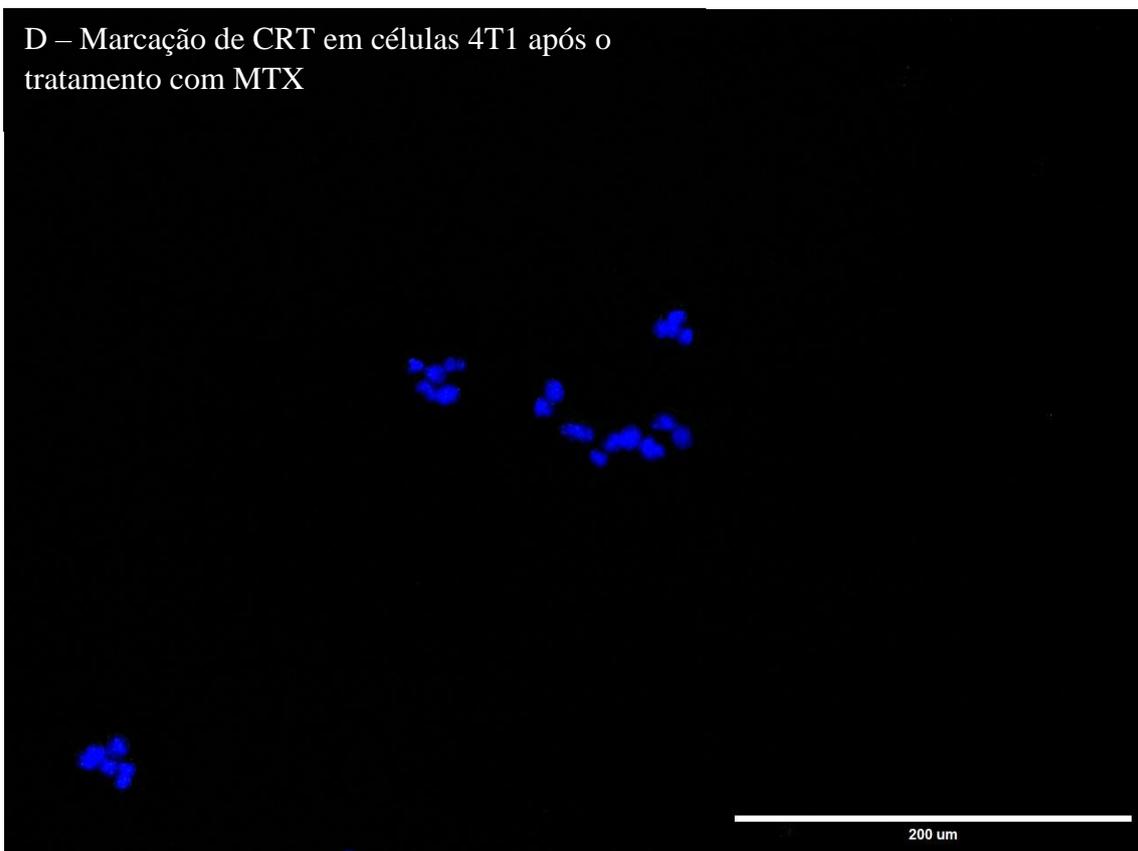
B – Marcação de CRT em células 4T1 não permeabilizadas



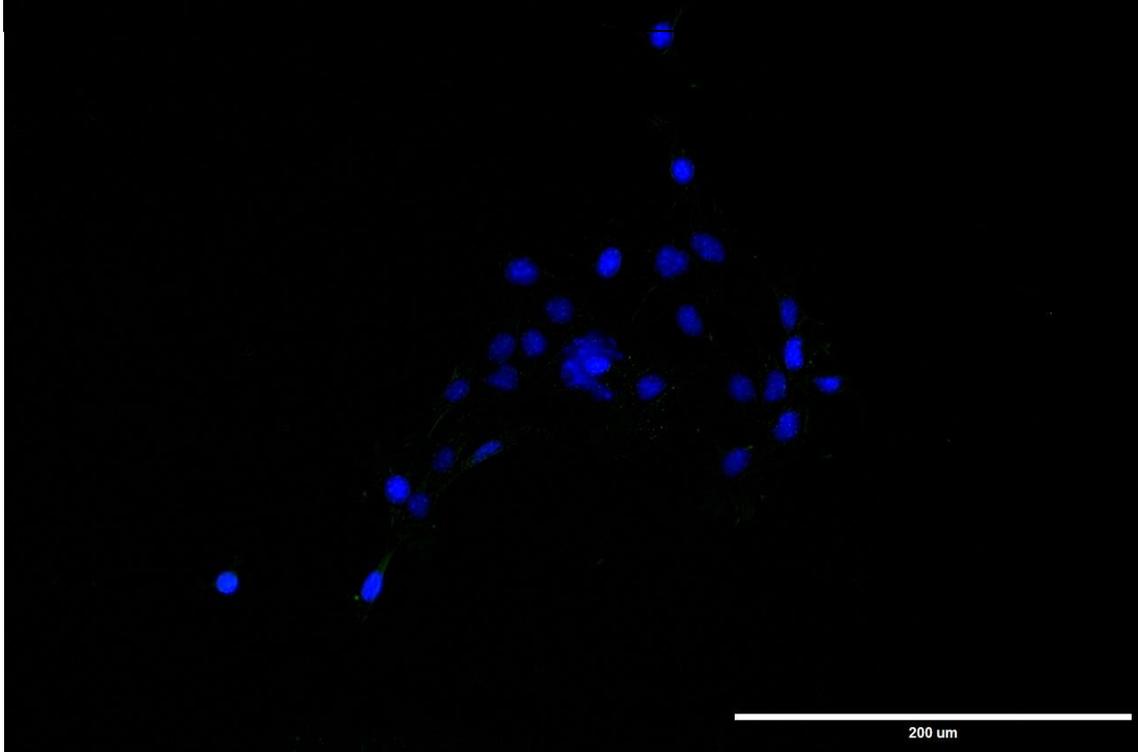
C – Marcação de CRT em células 4T1 após o tratamento com MTX



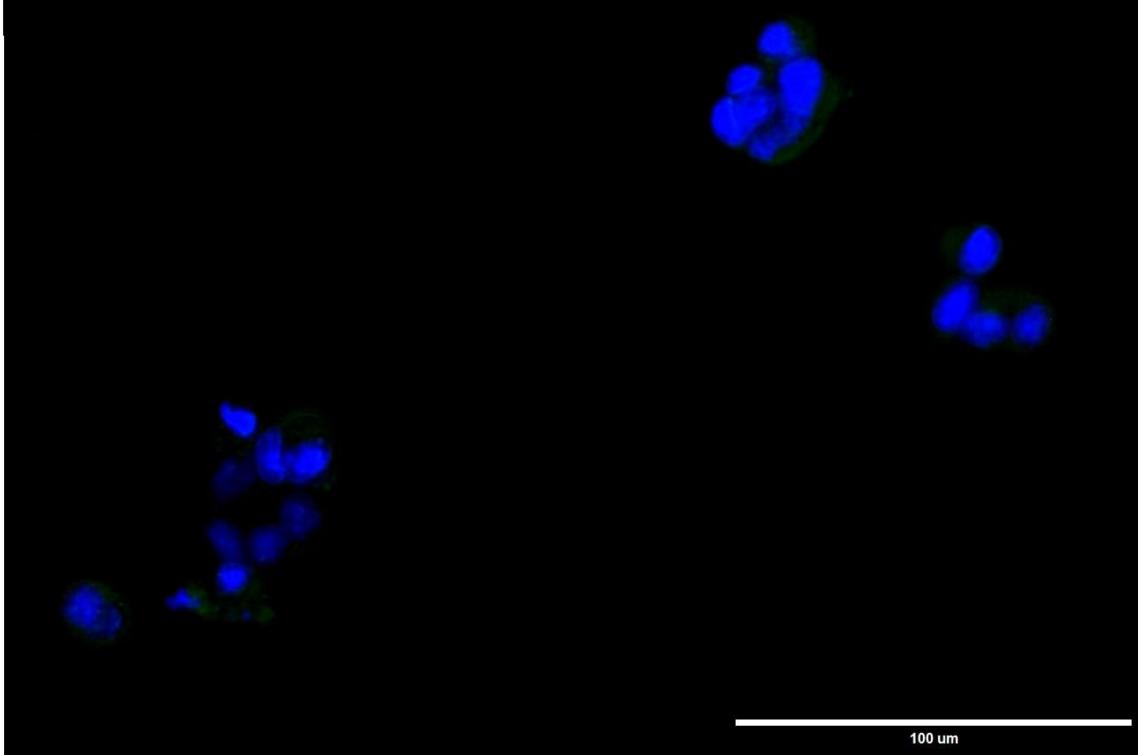
D – Marcação de CRT em células 4T1 após o tratamento com MTX



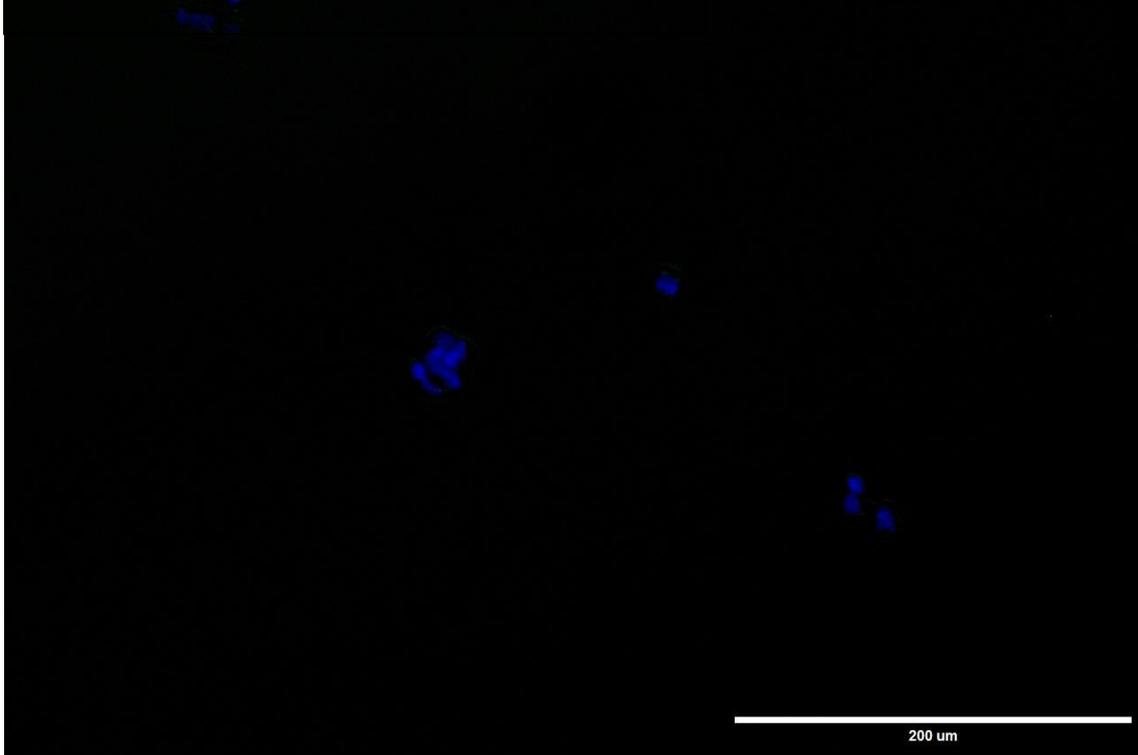
E – Marcação de CRT em células 4T1 submetidas
à TFD-NE-AIFtCl 9,01 nM 25 J/cm²



F – Marcação de CRT em células 4T1 submetidas
à TFD-NE-AIFtCl 19,4 nM 25 J/cm²



G – Marcação de CRT em células 4T1 submetidas à TFD-NE-AIFtCl 9,01 nM 67 J/cm²



H – Marcação de CRT em células 4T1 submetidas à TFD-NE-AIFtCl 19,4 nM 67 J/cm²

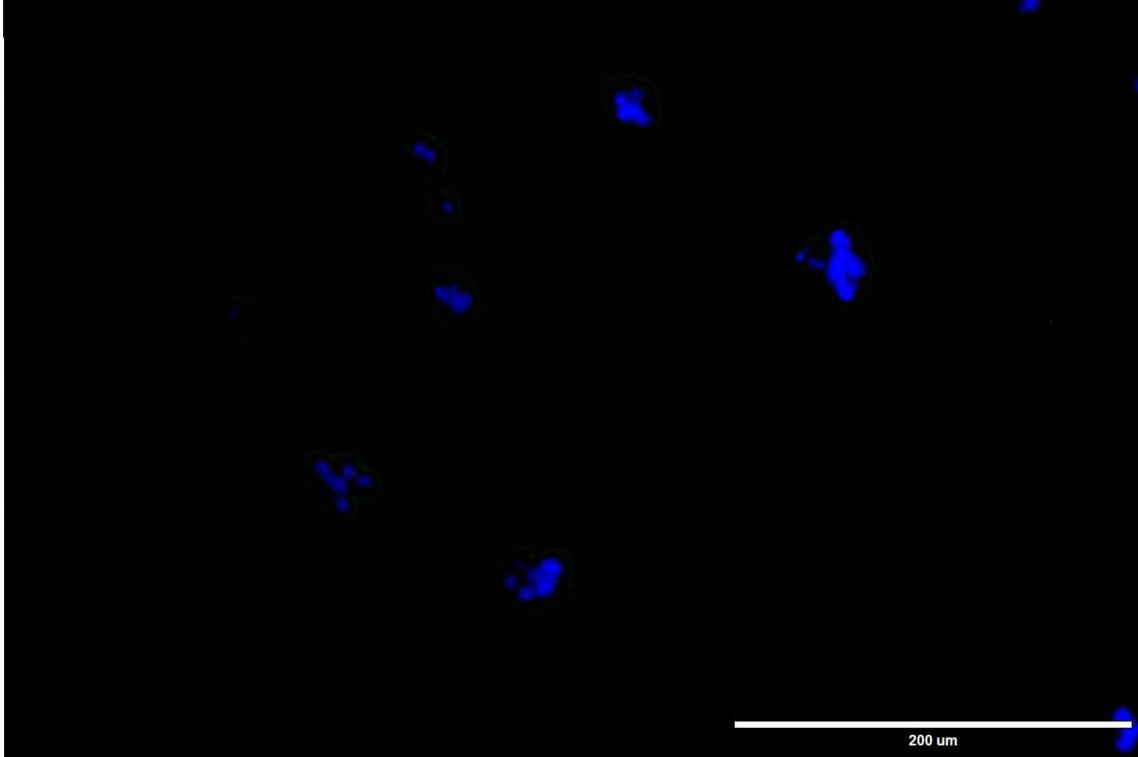


Figura 62: Emissão na membrana plasmática da proteína HSP90 em células 4T1 submetidas a diferentes protocolos da TFD-NE-AIFtCl. **A)** células 4T1 permeabilizadas com Triton X100 (0,01%); **B)** células 4T1 não permeabilizadas; **C)** células tratadas com MTX (1,5 μ M); **D)** células submetidas a C/D; **E-H)** aplicação dos diferentes protocolos da TFD alterando concentração e dose de energia.


Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Comitê de Ética no Uso Animal

Brasília, 09 de março de 2015.



DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado "INVESTIGAÇÃO DE MECANISMOS DE AÇÃO, EFICÁCIA E SEGURANÇA DA TERAPIA FOTODINÂMICA MEDIADA POR CLORETO DE ALUMÍNIO-PTALOCIANINA EM NANOEMULSÕES NO TRATAMENTO DE CÂNCER DE MAMA IN VIVO.", UNBDOC n.º 5529/2015, sob responsabilidade do Professor Luis Alexandre Muehlmann foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília. Este projeto foi aprovado para utilização de *Mus musculus*: 45. A presente aprovação é válida pelo período de 01/12/2014 a 01/12/2018.


Prof. Dr. Rafael Plakoudi Souto Maior
Coordenador da CEUA



*Este documento se restringe à avaliação ética do projeto supracitado e não substitui outros exames e permissões que porventura se façam necessários.