



Universidade de Brasília

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular

Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas

**ANÁLISE FUNCIONAL E PROTEÔMICA DOS
POLIMORFONUCLEARES
APÓS TERAPIA FOTODINÂMICA (TFD)**

KATYELLE LÍGIA RODRIGUES BOTELHO

Brasília - DF, 2024.

KATYELLE LÍGIA RODRIGUES BOTELHO

**ANÁLISE FUNCIONAL E PROTEÔMICA DOS
POLIMORFONUCLEARES
APÓS TERAPIA FOTODINÂMICA (TFD)**

KATYELLE LIGIA RODRIGUES BOTELHO

Dissertação de Mestrado submetida ao
Programa de Pós-Graduação em Patologia
Molecular da Universidade de Brasília –
Faculdade de Medicina como requisito
parcial para a obtenção do grau de Mestre
em Patologia Molecular.

Orientador: **Prof. Dr. Wagner Fontes**

Coorientador: **Prof. Dr. Luis Muehlmann**

Brasília - DF, 2024.

Este estudo foi desenvolvido no Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas (LBQP) do Departamento de Biologia Celular da Universidade de Brasília.

Apoio financeiro: Fundação de Amparo à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF, Processos 193.001.053/2015 e 193.001.802/2017).

Projeto de Mestrado realizado com bolsa da CAPES e CNPq

KATYELLE LÍGIA RODRIGUES BOTELHO

**ANÁLISE FUNCIONAL E PROTEÔMICA DOS POLIMORFONUCLEARES
APÓS TERAPIA FOTODINÂMICA (TFD)**

Dissertação de Mestrado submetida ao
Programa de Pós-Graduação em Patologia
Molecular da Universidade de Brasília –
Faculdade de Medicina como requisito
parcial para a obtenção do grau de Mestre
em Patologia Molecular.

BANCA EXAMINADORA:

**Dr. Wagner Fontes
Universidade de Brasília
Presidente**

**Universidade de Brasília
Carlos André**

**Universidade de Brasília
Hylane Damascena**

“Seu trabalho vai preencher uma grande parte da sua vida, e a única maneira de ficar realmente satisfeito é fazer o que você acredita ser um ótimo trabalho. E a única maneira de fazer um excelente trabalho é amar o que você faz.”

(Steve Jobs)

*Dedico este trabalho aos meus pais,
meu marido minhas irmãs, minha
família e amigos.*

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Júlia Rodrigues Botelho e ao meu pai Orozimbo Botelho, pelo amor, apoio, suporte, paciência e não me deixarem desistir nos momentos difíceis. Por me incentivarem a continuar os estudos e a conquistar meus sonhos;

Ao meu marido Romário Albuquerque pelo amor, incentivo, suporte, pela compreensão, pelos conselhos, por enxugar minhas lágrimas e não me deixar desistir;

As minhas irmãs, Cássia Lilian e Catiane Livia, pela cumplicidade, amor, ajuda e apoio;

Aos meus sobrinhos, Victor Lucca e Heitor Vinicius, que mesmo sendo pequenos, me trouxeram alegria nos dias difíceis;

Ao meu orientador, Wagner Fontes por me ensinar, por acreditar em mim, por me apoiar, por me orientar e por ser um pai na ciência, minha eterna gratidão a esse ser humano e profissional incrível.

Ao meu coorientador Luis Muehlmann que pegou um projeto desafiador, acreditou em mim.

Aos meus parceiros de laboratório, Hylane Damascena Phillippe Braga, Adriano Rios, Wendy Dawson, sem vocês eu não conseguiria terminar e nem obter resultados tão bons, esse trabalho é tão meu quanto de vocês;

Em especial minha amiga, parceira tão amada Isabelle Luz sem você nada disso seria possível obrigada por me apoiar, pelas noites mal dormidas, pelos projetos juntas e por todo ensinamento.

Ao grupo de Pesquisa Proteômica de Neutrófilos, foram anos incríveis, muitas amizades, tenho muito carinho pelo GPPN.

Aos meus amigos do laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas, Reynaldo Magalhães, Lucas Oliveira, Giovanna Dutra, pelas conversas, descontração, e momentos do café. Reynaldo obrigada pelas caronas e pela amizade.

Ao laboratório de genética, em especial o grupo Imuno Nano e meus amigos, Victor Mello e José Athayde, sem vocês também não seria possível terminar esse trabalho, gratidão. Victor, você foi indispensável nesse trabalho, uma amizade que quero levar para a vida, obrigada por tudo.

Aos meus amigos/colegas que fizeram parte da minha trajetória, seja de passagem ou que ficaram presentes na minha vida e que ajudaram nas

doações e reagentes, obrigada pelo carinho, pela parceria, histórias compartilhadas e experiências trocadas, Karla Sousa, Gabriel Henrique, Henrique Loback, Alexandre Felipe e Karen Letycia.

À professora Consuelo pelo carinho e por todo apoio e amizade;

Aos meus amigos que estão sempre presentes na minha vida, me apoiando, confiando em mim e me fazendo feliz, Marden Augusto, Jéssica Carvalho, Ana Beatriz Paurá, Andressa Eloísa, Tiago Galvão, Grazielli Brandão, Bianca Roberto, Marcus Vinícios.

À banca examinadora, por ter aceitado o convite e participarem da defesa da dissertação;

À CAPES e CNPq pela concessão da bolsa de estudo;

À FAPDF, FINEP, CAPES e CNPq pelo financiamento da pesquisa.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	7
LISTA DE ABREVIATURAS	9
LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE TABELAS.....	11
RESUMO.....	12
ABSTRACT	13
1 INTRODUÇÃO.....	14
2 JUSTIFICATIVA.....	32
3 OBJETIVOS.....	33
4 METODOLOGIA	34
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1 Rendimento, viabilidade pureza e ativação	43
5.2 Proteômica exploratória de neutrófilos após exposição a terapia fotodinâmica	43
5.3 Ativação de Neutrófilos após Terapia Fotodinâmica	50
5.4 Avaliação da morte celular após exposição da TFD	56
5.5.. O efeito da terapia fotodinâmica na liberação de armadilha extracelulares dos PMNs (NETs).....	58
5.6 Migração	60
5.7 Os efeitos da Terapia fotodinâmica nos processos de fagocitose e exocitose.....	60
6 CONCLUSÃO	64
7 PERSPECTIVAS.....	65
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
ANEXO 1	73
ANEXO 2.....	73

LISTA DE ABREVIATURAS

AlFtCl – Ftalocianina de alumínio

AO – *Acridine Orange*

ATP – Adenosina trifosfato

DAPI – 4'6 – diamidino-2-fenilindole

DC – Dendritic cell (Célula Dendrítica)

DTT – Ditioneitol

EROs – Espécies reativas de oxigênio

FDR – False Discovery rate (Taxa de descoberta falsa)

FS – Fotossensibilizantes

MPO – Mieloperoxidase

NBT – *Nitro-blue tetrazolium test*

NE - Nanoemulsão

NET – *Neutrophil Extracellular traps*

NK – Célula exterminadora Natural Killer

PI – *Propidium iodide*

PMNs - Polimorfonucleares

RTCA - do inglês *Real Time Cell Analyzer*

SDC – *Detergent sodium deoxycholate*

SDS – Dodecilssulfato de sódio

TFA – Ácido trifluoroacético

TFD – Terapia Fotodinâmica

TNF – Tumor necrosis fator (Fator de Necrose Tumoral)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Esquematisação da resposta imune inata	18
Figura 2 Dados de epidemiologia.	23
Figura 3 Esquema de mecanismo de ação da TFD	27
Figura 4 estrutura química da ftalocianina	28
Figura 5 Representação esquemática da metodologia utilizada.....	34
Figura 6 Método de preparo de nanopartículas:	36
Figura 7 Esquema do experimento de migração pela placa RTCA.	42
Figura 8 Número de proteínas identificadas.	44
Figura 9 Análise de clusterização e de ontologia de gene	45
Figura 10 Análise das proteínas reguladas após terapia fotodinâmica	46
Figura 11 Termos GO de processo biológico do cluster 1	48
Figura 12 Funções enriquecidas do cluster 2.	49
Figura 13 - Processos biológicos enriquecidos do cluster 3.	51
Figura 14 - Ativação de neutrófilo por NBT.	52
Figura 15 - Análise de enriquecimento de termos GO	53
Figura 16 - Análise do Gráfico VIP score	55
Figura 17 - Avaliação da morte celular	58
Figura 18 - Microscopia de Fluorescência de NETs	59
Figura 19 - Avaliação de migração.	60
Figura 20 - Capacidade fagocítica do neutrófilo:.....	62
Figura 21 - Fagocitose: Fungos por neutrófilo :	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	14
Tabela 2: Lista de proteínas reguladas obtidas pelo Progenesis.	75

RESUMO

O câncer é uma das doenças que mais causam mortes no mundo. Em nível global, são cerca de 9,6 milhões de óbitos por ano. O tratamento para essa doença varia entre intervenções individuais ou combinadas, como cirurgias, radioterapia e quimioterapia. Apesar de serem eficazes para alguns tipos de cânceres, esses tratamentos apresentam muitos efeitos colaterais, como náuseas, tonturas e vômitos, além de afetarem o sistema imunitário ao diminuir leucócitos essenciais, como os neutrófilos, que protegem contra infecções. Devido a essas limitações, a busca por tratamentos mais adequados é constante, e um dos alvos de pesquisa é a Terapia Fotodinâmica (TFD), uma técnica segura, eficaz, minimamente invasiva e menos agressiva que as terapias convencionais. A TFD é composta por três componentes: oxigênio molecular O_2 , nanopartículas fotossensibilizantes (FS) e luz de comprimento de onda específico. Neste contexto, o presente estudo enfatiza os neutrófilos, células predominantes na resposta imune inata e que participam da fisiopatologia de diversas doenças, incluindo o câncer. Neste estudo, utilizamos a proteômica label-free como ferramenta exploratória para identificar danos deletérios nos neutrófilos, comparando entre os grupos controle, neutrófilos incubados com nanoemulsão de ftalocianina, neutrófilos expostos à luz e o grupo TFD com tratamento completo. Além disso, aprofundamos os testes funcionais. Na análise proteômica, foram identificadas 4.678 proteínas, considerando $FDR < 1\%$ e pelo menos dois peptídeos. Em seguida, uma análise de variância simples (one-way ANOVA), realizada pelo programa Progenesis, foi utilizada para a identificação de íons, peptídeos e proteínas com abundância diferencial significativa, resultando na detecção de 107 proteínas reguladas com pelo menos dois peptídeos únicos. A análise proteômica seguida dos testes funcionais possibilitou a observação da ativação dos neutrófilos após o tratamento, além da avaliação de suas capacidades funcionais em processos como fagocitose e migração. Também foi possível observar os tipos de morte celular dos neutrófilos, incluindo apoptose, necrose e netose. O estudo apresentou aspectos fundamentais para a avaliação das funcionalidades dos neutrófilos após a exposição à TFD.

Palavras-chave: neutrófilos; proteômica; terapia fotodinâmica; câncer, armadilhas extracelulares de neutrófilos.

ABSTRACT

Cancer is one of the leading causes of death worldwide, accounting for approximately 9.6 million deaths annually. Treatment for this disease varies, with options ranging from individual to combined approaches, including surgical interventions, radiotherapy, and chemotherapy. Although current treatments are effective for certain types of cancer, they often have many side effects, such as nausea, dizziness, and vomiting, and can weaken the immune system by reducing essential leukocytes that protect against infections, such as neutrophils. As a result, cancer treatment has become a focus of extensive scientific research, leading to the search for more suitable therapies, including Photodynamic Therapy (PDT)—a safe and effective technique that is minimally invasive and less aggressive than existing therapies. PDT consists of three components: molecular oxygen, photosensitizing nanoparticles (PS), and light of a specific wavelength. This study emphasizes neutrophils, predominant cells in the innate immune response that play a role in the pathophysiology of various diseases, including cancer. We used label-free proteomics as an exploratory tool to identify deleterious effects on neutrophils, comparing control groups, neutrophils incubated with a phthalocyanine nanoemulsion, neutrophils exposed to light, and the complete PDT treatment group. We also performed more in-depth functional tests. Proteomics analysis identified a total of 4,678 proteins, considering an FDR < 1% and at least two peptides. Subsequently, a one-way ANOVA analysis was performed using the Progenesis software to identify ions, peptides, and proteins with significant differential abundance, resulting in the detection of 107 regulated proteins with at least two unique peptides. Proteomics analysis followed by functional tests revealed neutrophil activation after treatment, assessing neutrophil functionality in phagocytosis and migration, as well as the type of cell death—whether apoptosis, necrosis, or netosis. Thus, this study presents fundamental insights into neutrophil functionality following exposure to photodynamic therapy.

Keywords: neutrophil, proteomics, photodynamic therapy, cancer, neutrophil extracellular traps.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Sistema Imunitário e Inflamação

O sistema imunitário apresenta como principal função manter a homeostase do organismo, combatendo patógenos e degradando tecidos lesados. O sistema imunitário divide-se em inato e adaptativo.

Tabela 1	
Imunidade Inata	Imunidade Adaptativa
Presente desde o nascimento;	Presente a partir dos primeiros meses de vida
Resposta imediata a moléculas liberadas pelo patógeno	Requer algum tempo para reagir a um patógeno;
Reage da mesma forma para uma variedade de insultos;	Específico para um antígeno
Sem memória imunológica.	Memória imunológica

Enquanto a imunidade inata é caracterizada por ter uma resposta mais rápida e ser a primeira linha de defesa do organismo, a imunidade adaptativa ou adquirida classifica-se pela linha de defesa específica, obtida após contato com os patógenos ou seus componentes, como vacinas, por exemplo. A imunidade inata é composta por barreiras físicas, químicas e biológicas. A barreira física é constituída pela pele, mucosa, saliva, lágrimas e pelos, impedindo que microrganismos consigam alcançar outras regiões e prevenindo o desenvolvimento de doenças (USLAN et al., 2000). Caso o patógeno consiga entrar no organismo, ele enfrenta as barreiras biológica e química, iniciando um processo de inflamatório. O sistema imunitário adaptativo possui memória e armazena características dos patógenos, o que evita futuros ataques. (ETER; ELVES; OITT, 2000; USLAN et al., 2000)

A inflamação compreende uma resposta de defesa do organismo após dano ao tecido, geralmente causada por lesão física, lesão isquêmica (suprimento insuficiente de sangue a um órgão), infecção, exposição a toxinas ou outros tipos de trauma. A resposta inflamatória causa mudanças celulares e humorais que geralmente resultam na reparação do tecido danificado e proliferação celular no local lesionado, dando início à cicatrização. O processo inflamatório engloba uma série de eventos, como dilatação de vênulas e arteríolas, aumento da

permeabilidade dos vasos sanguíneos e migração de leucócitos para os tecidos(KOLACZKOWSKA; KUBES, 2013a).

Em algumas circunstâncias a resposta inflamatória pode ser excessiva, tornando-se prejudicial ao organismo, fato que ressalta a importância dos mecanismos anti-inflamatórios, capazes de balancear a resposta pró-inflamatória e prevenir lesões.(LAWRENCE; WILLOUGHBY; GILROY, 2002)

Essa resposta inflamatória pode ser classificada como aguda ou crônica, a inflamação se torna crônica quando a inflamação persiste ou quando os mecanismos de controle falham e não conseguem interromper a inflamação o que pode ser prejudicial e levar a doenças inflamatórias como diabetes, doenças autoimunes, artrite, doenças cardiovasculares, Alzheimer, doenças pulmonares e câncer (ZHONG; SHI, 2019).

As citocinas são moléculas envolvidas no processo inflamatório. Trata-se de polipeptídeos ou glicoproteínas produzidas por diversos tipos de células no local da lesão e lançadas no meio extracelular. As citocinas influenciam a atividade, a proliferação e a diferenciação das células imunes, assim como regulam a produção e a atividade de outras citocinas. Algumas citocinas podem apresentar atividade pró-inflamatória ou anti-inflamatória, sendo que os tipos e quantidades de citocinas liberadas dependem do microambiente e algumas têm sido associadas à inflamação crônica.

1.1 Polimorfonucleares

Os neutrófilos, um tipo de leucócitos polimorfonucleares (PMNs), são as células de defesa mais abundantes do sistema imunitário humano, eles realizam um papel primordial na imunidade inata, por serem o primeiro grupo de leucócitos a migrar da circulação para o local da inflamação atraídas por citocinas (LAUTERBACH et al., 2008). Os PMNs são produzidos na medula óssea onde demoram em média, duas semanas para maturação, possuem grânulos citoplasmáticos que participam da fagocitose e eliminação de patógenos. Os neutrófilos são considerados células antimicrobianas eficazes porém, essa atividade pode resultar em danos ao hospedeiro e doenças autoimunes, quando não controlados (CASTANHEIRA; KUBES, 2019). Alguns estudos inclusive demonstraram que os neutrófilos tem capacidade notável de sintetizar lipídeos

para regular sua atividade e para resolver a inflamação (BURN et al., 2021). Sua abundância é clinicamente relevante pois, defeitos congênitos ou condições adquiridas que reduzem os neutrófilos na corrente sanguínea precedem infecções. (NEWBURGER, 2016). Evidências também demonstram que os neutrófilos são responsáveis por manifestações patológicas em tecidos saudáveis distantes de lesões e/ou infecções. (AMULIC et al., 2012)

O processo de formação do neutrófilo se inicia na medula óssea adulta, onde sob a instrução de fatores de crescimento e através de citocinas, as células hematopoiéticas pluripotentes se diferenciam em mieloblastos, uma célula sanguínea imatura que dará origem aos granulócitos. À medida que essas células precursoras amadurecem para neutrófilos elas sintetizam proteínas que são classificadas em diferentes grânulos. (BORREGAARD, 2010; BURN et al., 2021)

Os neutrófilos extravasam em massa para o tecido comprometido e sua abundância é clinicamente relevante (NEWBURGER, 2016). Estudos demonstraram que neutrófilos ativados na corrente sanguínea podem inclusive ser letais (ELLETT et al., 2018; SKOKOWA et al., 2017), incluindo a capacidade do neutrófilo de danificar o hospedeiro pode contribuir para diversas doenças inflamatórias e auto imunes (DINAUER, 2016) inclusive no câncer os neutrófilos se diferenciam em pró e anti tumorais e influenciam na metastase. (SHAUL; FRIDLENDER, 2019).

1.2 Inflamação e Polimorfonucleares

O processo de ativação dos neutrófilos durante a inflamação consiste em várias etapas, entre elas a liberação de radicais superóxido, desencadeada por meio de citocinas pró-inflamatórias.

Uma dessas citocinas é o TNF-alfa (fator de necrose tumoral), produzido principalmente por macrófagos e células NK (TCHORZEWSKI et al., 1993), que desencadeia, em neutrófilos, a ativação de moléculas de adesão ao endotélio, as quais proporcionam o rolamento, adesão e participam da migração dos neutrófilos para fora da circulação e nos sítios de inflamação. O TNF-alfa também estimula neutrófilos a produzir outras citocinas e espécies reativas de oxigênio (TAKAHASHI, 2001).

Quando ativados, os neutrófilos passam a realizar diversas funções como migrar, fagocitar e liberar espécies reativas de oxigênio através da montagem e ativação do complexo NADPH oxidase. A hiperatividade de neutrófilos, decorrente da inflamação aguda prolongada e sistêmica, implica em injúria severa, onde se verifica uma liberação extracelular inapropriada de ânion superóxido e enzimas proteolíticas, podendo promover dano a tecidos saudáveis e desencadear doenças autoimunes, SARA (Síndrome da Angústia Respiratória Aguda, ou *ARDS, Acute Respiratory Distress Syndrome*), sepse ou até FMO (Falência Múltipla de Órgãos, ou *MOF, Multiple Organ Failure*).

1.3 Ativação dos neutrófilos

A liberação de neutrófilos da medula óssea é regulada por quimiocinas. Frequentemente, os neutrófilos circulam por aproximadamente 6-8 horas e o número de neutrófilos aumenta drasticamente durante infecções e em algumas patologias. (BORREGAARD, 2010) A ativação do neutrófilo se dá a partir do momento em que a integridade do hospedeiro for comprometida por invasores, geralmente bactérias, fungos e vírus ou por dano tecidual.

Neutrófilos maduros emergem da medula óssea e após uma lesão, os neutrófilos saem da corrente sanguínea e circulam pelo tecido circundante onde se alojam no local coordenando o movimento celular usando receptores de adesão e geração de força pelo citoesqueleto (SVITKINA, 2018).

O sistema imune controla uma série de células que tem a finalidade de defender o organismo. Os neutrófilos migram rapidamente para o local injuriado após detecção de sinais quimioatratantes se afastam do vaso sanguíneo e se aproximam das células endoteliais, essa migração é orientada em direção ao agente quimiotático que atrai a célula para o rolamento, adesão e diapedese. Proteínas degradadoras da matriz celular expressadas pelo neutrófilo são utilizadas para entrar no local da injúria (WOLF; FRIEDL, 2011). Essas células, expressam moléculas de adesão como integrinas e selectinas que se ligam ao seu contra-ligante expressados por outras células ou na matriz extracelular formando adesões transitórias ou estáveis. Simultaneamente, essas moléculas de adesão transmembrana são envolvidas por elementos citoesqueleticos como actina ou outras proteínas formadoras de filamentos por proteínas adaptadoras(MICHAEL;

PARSONS, 2020).

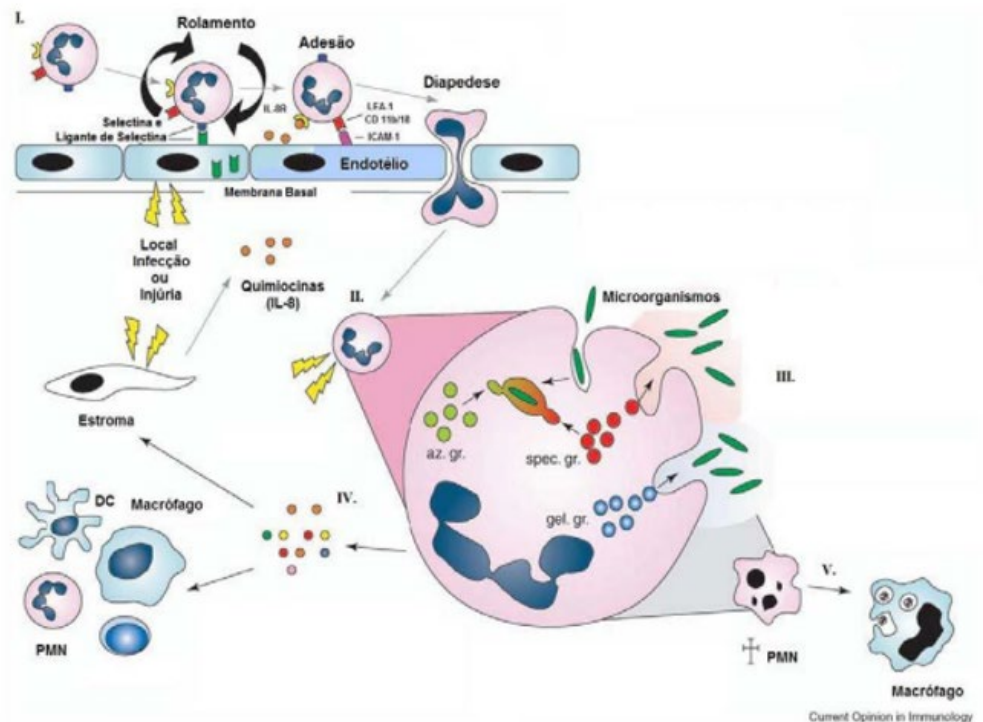


Figura 1 - Esquematização da resposta imune inata por neutrófilos em resposta a injúrias no tecido. I: Saída do neutrófilo da corrente sanguínea (rolamento, adesão e diapedese); II: Ativação do neutrófilo; III: Processo de fagocitose, destruição, degradação e liberação de espécies reativas de oxigênio; IV: Liberação de citocinas consequentemente ativação de outras células do sistema imunitário; V: Apoptose dos neutrófilos e fagocitose dos macrófagos .

Os neutrófilos participam da captura e da destruição de microorganismos invasores por meio de quimiotaxia, fagocitose, desgranulação, produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e liberação de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs) (Figura 1) (HIDALGO et al., 2019). Nesse contexto, a ativação de neutrófilos e a estimulação subsequente de receptores específicos de superfície celular de um grande repertório de receptores controlam as funções dos neutrófilos.

E a medida que persegue o microorganismo, essas células executam diversos mecanismos celulares como mobilizar grânulos, vesículas e secretoras, reorganizar o citoesqueleto de actina, penetrar na barreira endotelial, iniciar a transcrição de citocinas para recrutamento de novas células do sistema imunitário. (Amulic et al., 2012). Defeitos no desenvolvimento das funcionalidades do neutrófilo aumentam a

suscetibilidade à infecções, inflamação e disfunção orgânica em vários organismos (ADROVER et al., 2020).

Durante a ativação, em locais inflamatórios, sinais derivados de bactérias e produzidos pelo hospedeiro são abundantes, esses sinais estimulam as células endoteliais próximas ao sítio inflamatório. Esses estimulantes como lipossacarídeos (LPS) e fMLP, bem como os quimiotrantes e citocinas fator de necrose tumoral TNF- α , interleucina (IL) -1 β e IL-17, estimulam essas células endoteliais a produzir moléculas de adesão as P-selectinas, E-selectinas e integrinas ICAMs.

Embora os neutrófilos tenha seu papel na defesa contra patógenos microbianos, os neutrófilos também são reconhecidos em envolvimento do câncer onde são recrutados para MAT e suas funções podem variar em ser protetoras podendo fagocitar células tumorais e contribuir para eliminação de células malignas ou também como maléficios como envolvidos em promover crescimento e disseminação de muitos cânceres (COFFELT; WELLENSTEIN; DE VISSER, 2016). A célula cancerosa são frequentemente acompanhados por recrutamento de neutrófilos (MANTOVANI et al., 2011). Estudos de neutrófilos em modelos de camundongos com câncer estabeleceram que neutrófilos podem promover crescimento tumoral, angiogênese e metastase.

1.3.1 Migração

Uma das funções importantes do neutrófilo, a migração permite que a célula saia do vaso, frequentemente em vênulas, e atinja um alvo por meio de quimiotaxia.

A migração é um processo crucial na resposta imune ao câncer, os neutrófilos são recrutados para o local do tumor por meio da quimiotaxia, isso ocorre quando células do sistema imunitário ou células tumorais do microambiente tumoral liberam substâncias químicas (quimiocinas e citocinas) que atraem os neutrófilos. Essas substâncias sinalizadoras orientam os neutrófilos em direção ao tumor (HUANG et al., 2024).

Na terapia fotodinâmica, a produção de EROs e a necrose induzida ao tecido tumoral resultam na liberação de citocinas e moléculas de sinalização inflamatória atraindo neutrófilos para o local. A presença de neutrófilos contribui para a resposta imune pois, eles podem fagocitar restos celulares e liberar mais EROs ajudando a

destruir células tumorais remanescentes. O papel dos neutrófilos na TFD é ajudar a intensificar a resposta imunológica e estimular o sistema imunitário a reconhecer e eliminar as células tumorais. Portanto, a migração dos neutrófilos está ligada ao controle ou suporte na progressão do tumor. Entretanto, migração de neutrófilos em resposta a TFD pode desempenhar um papel importante na eficácia do tratamento. (CASTANO; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2004; GALDIERO; MARONE; MANTOVANI, 2018).

Qualquer modulador que afete a migração dos neutrófilos também pode interferir na atividade anti-infecciosa ou com potencial inflamatório. Durante a migração, os PMNs se aderem ao endotélio passando a expressar glicoproteínas de membrana como a CD44, L-selectina e ligantes de P-selectina (PSGL-1), e ligantes de E-selectina (ESL1). Essas glicoproteínas se ligam as moléculas de adesão. (Norman et al. 2000; Kolaczowska e Kubes 2013). Depois de ativados, os PMNs se aderem no endotélio realizando a transmigração através da barreira vascular.

No tecido, os neutrófilos migram em direção a inflamação por um processo de quimiotaxia de gradientes. A via de sinalização é dependente do quimioatratante. Próximo ao sítio da lesão, os neutrófilos liberam granulos de gelatinase e ocorre a montagem do complexo NADPH oxidase produzindo espécies reativas de oxigênio. (Gambardella e Vermeren 2013). O conjunto desses fatores contribuem para eliminação dos patógenos. (Klebanoff et al. 2013).

Já no câncer, uma vez no MAT, os neutrófilos reconhecem as células tumorais por meio de padrões moleculares (DAMPs) e antígenos tumorais. Através desse reconhecimento que começa a ativação dos neutrófilos (KUMAR; DIKSHIT, 2019; WU et al., 2020).

1.3.2 Fagocitose

A fagocitose é um mecanismo celular especializado envolvido na morte de microorganismos pelo sistema imunitário inato executada por três células especificamente macrófagos, neutrófilos e células dendríticas. O mecanismo se caracteriza pelo englobamento e digestão de partículas e microorganismos com menos 0,5 microns de tamanho. (FRANK R. DELEO.; 2020)

Ao englobar o patógeno, o leucócito fornece um meio altamente citotóxico dentro do fagolisossoma, o que evita a disseminação de microorganismos dentro do hospedeiro e proteção contra infecções clínicas. (HELLEBREKERS et al., 2017)

Sabe-se que, a capacidade de fagocitar dos neutrófilos é influenciada por determinadas condições como idade e doença (NAGEL et al., 1986). Esse dado foi demonstrado pelo aumento de atividade fagocitária em algumas doenças como artrite reumatóide, por exemplo (DE SIQUEIRA et al., 2015). Como citado no tópico anterior, os neutrófilos podem fagocitar as células tumorais contribuindo para eliminação de células malignas porém, de forma pró-tumoral, os neutrófilos podem ajudar a criar um microambiente tumoral imunossupressor onde a fagocitose é ineficaz e a resposta imune é inibida.

Durante o tratamento de câncer, alguns tratamentos são muitos maléficos aos pacientes, principalmente a quimioterapia que afeta os neutrófilos causando redução de neutrófilos no sangue (neutropenia) (CRAWFORD; DALE; LYMAN, 2004) e isso pode comprometer a capacidade do organismo de se defender contra infecções já que tem menos neutrófilos circulantes para realizar a fagocitose. As funcionalidades dos neutrófilos também podem ser afetadas, as células podem ter uma resposta fagocitária reduzida tornando-se menos eficazes na eliminação do patógeno ou na célula tumoral (XIONG; DONG; CHENG, 2021) .

Devido a isso, o presente estudo analisou a atividade fagocitária dos neutrófilos após a terapia fotodinâmica afim de verificar se a TFD afeta a capacidade dos neutrófilos a fagocitar microorganismos.

1.3.3 Armadilhas extracelulares de Neutrófilos (NETs)

As NETs são estruturas semelhantes a teias compostas a partir de fibras de DNA nuclear ou mitocondrial, com enzimas antimicrobianas e histonas que são liberadas para capturar e eliminar patógenos. (Pruchniak & Demkow, 2019). Além da função antimicrobiana as NETs criam uma barreira física para patógenos e células imunes. O processo de formação de NETs é descrito de NETose e foi defenido como um tipo de morte celular regulada distinta de apoptose e necrose. (Hanahan & Coussens, 2012)

Estudos demonstraram uma via alternativa de formação de NETs sem morte celular, denominada de NET vital. (DEMKOW, 2021a) A liberação de armadilhas extracelulares é iniciada a partir de uma explosão oxidativa da ativação raf-MEK-ERK da NADPH oxidase. Logo em seguida, a elastase neutrofílica (NE) transloca-

se dos grânulos para o núcleo, onde estimula a quebra da cromatina por meio da hidrólise da histona. Outras descrições sugerem que a mieloperoxidase (MPO) também está envolvida na descondensação da cromatina e na ruptura do envelope nuclear além da MPO, outra enzima que está envolvida da descondensação da cromatina é a peptil arginina deiminase (PAD4), uma enzima citrulinadora de proteínas que entra no núcleo para disseminar resíduos de arginina transformados pela desmontagem da estrutura do nucleossomo. (DEMKOW, 2021b; PRUCHNIAK; DEMKOW, 2019)

A formação de NETs então se dá pelo inchaço nuclear, desintegração do envelope nuclear, mistura de ácidos nucleicos, e proteínas granulares no vácuolo intracelular, derramamento do conteúdo nuclear no citoplasma e quebra da membrana celular (COOLS-LARTIGUE et al., 2013).

1.4 Câncer e Terapia Fotodinâmica (TFD)

O câncer é a segunda principal causa de morte no mundo todo, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), 9,6 milhões de mortes foram registradas no ano de 2018, sendo os tipos mais comuns e mais letais: câncer de pulmão, fígado, próstata e mama.

Câncer é definido pelas desordens celulares que podem ocorrer em vários tipos celulares e levam à desregulação do ciclo celular. Essas alterações podem ser desencadeadas por fatores genéticos como hereditariedade, epigenéticos e/ou ambientais. Segundo o INCA (Instituto Nacional de Câncer), os principais fatores de risco (80-90%) para o aparecimento de células cancerosas estão relacionados ao ambiente, como exposição aos principais fatores carcinogênicos e hábitos de vida representados na figura 2.

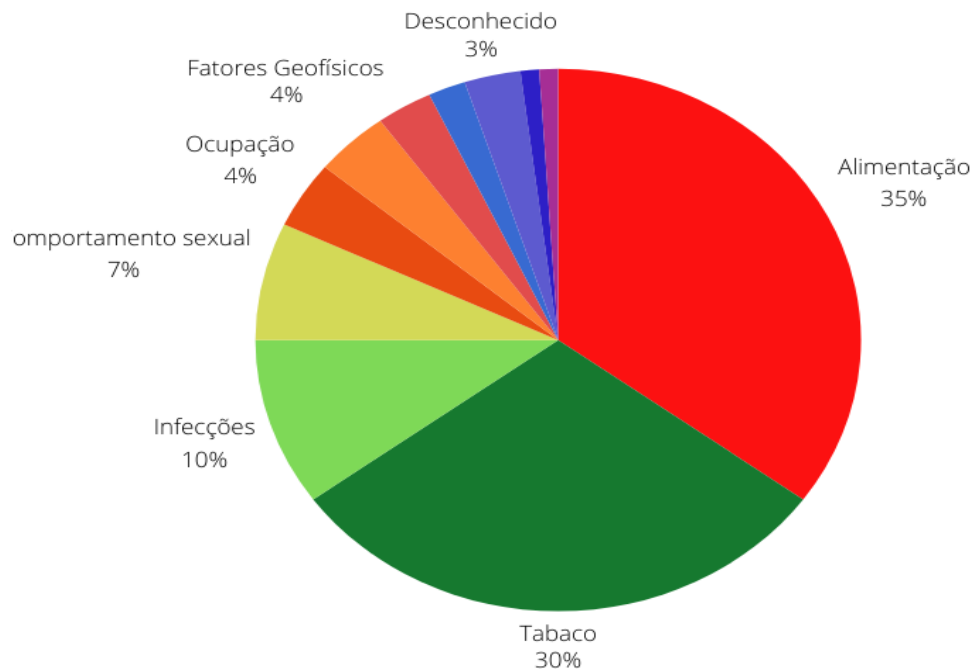


Figura 2 - Dados de epidemiologia **que** mostram que a maior evidência para surgimento de câncer está no estilo de vida. O gráfico mostra características que constituem fatores de risco no desenvolvimento do câncer, por exemplo: uma dieta rica em gordura, e pobre em frutas e verduras é um fator de risco em 35% dos casos. O uso de cigarro leva a 30% do risco para câncer, os agentes biológicos causadores de infecções e vírus por exemplo o Papiloma Vírus (HPV) – 10%. O comportamento sexual irresponsável como não uso de preservativos expõe o indivíduo a ISTs (7%), exposição a agentes físicos como sol, está relacionado ao desenvolvimento de câncer de pele 4%.

A mortalidade por câncer pode ser reduzida se o diagnóstico e o tratamento forem realizados de forma precoce, o que costuma levar a um tratamento eficaz e uma maior probabilidade de sobrevivência (GØTZSCHE, 2004; MARMOT et al., 2013). O melhor tratamento vai depender do tipo de câncer a fase em que ele está. Hoje em dia, os principais tratamentos são cirurgia, quimioterapia, radioterapia, imunoterapia e transplante de medula óssea (American Cancer Society, 2024).

A cirurgia oncológica é um dos principais tratamentos utilizados para vários tipos de câncer e pode ser curativo se for diagnosticado no estágio inicial. Esse procedimento também pode ser utilizado com objetivo de diagnóstico para obter biópsia, para alívio de sintomas como a dor e para remoção de metástase. (LIU;

CHEN; CHEN, 2015). O uso de quimioterapia reduz o risco de recorrência em 30% dos pacientes, é utilizada através de uso de medicamentos anticancerígenos para destruir células tumorais. Porém, por ser um tratamento sistêmico, umas das desvantagens dessa terapia é que não atinge somente células cancerosas, como também as sadias presentes no organismo. A quimioterapia pode ser administrada via venosa e via oral podendo ser aplicada com um ou mais quimioterápicos. (LIU; CHEN, 2015; LOIBL et al., 2021)

Dentre os principais tratamentos do câncer, a radioterapia consiste na aplicação de radiações de ionizantes para destruir ou inibir o crescimento de células tumorais. A radioterapia é planejada para preservar o tecido saudável e mesmo que as células normais sejam atingidas e danificadas pela radiação, geralmente elas podem se reparar e, quando não reparados, o tecido saudável afetado pode provocar possíveis efeitos colaterais.

Apesar dos tratamentos existentes serem eficazes na maioria dos tipos de cânceres e reduzirem a chance de reincidência em 24-30%, essas terapias provocam muitos efeitos colaterais como náuseas, tonturas, vômitos. A radioterapia e a quimioterapia tendem a ter efeitos colaterais a longo prazo como problemas cardíacos, pulmonares, problemas no sistema endócrino, ósseo, articulações e tecidos moles;

No século XIX, Rudolf Virchow observou pela primeira vez a presença de leucócitos no interior dos tumores indicando uma possível ligação entre a inflamação e o câncer. Entretanto, somente na última década foram obtidas evidências de que a inflamação desempenha um papel primordial na tumorigênese e que o microambiente inflamatório é um componente essencial. Muitas causas ambientais e 90% dos fatores de risco estão associados a alguma inflamação crônica. Desses 90%, 20% estão ligados a infecções crônicas; 30% são atribuídos ao tabagismo e poluentes inalados e 35% a fatores dietéticos (AGGARWAL; VIJAYALEKSHMI; SUNG, 2009).

Por muitos anos, cientistas estudam sobre a cura e tratamento câncer, uma dos tratamentos além das convencionais é a imunoterapia. A imunoterapia é um tratamento que consiste estimular o sistema imunitário do paciente para combater doenças como câncer, doenças autoimunes e alergias (Riley et al., 2019).

As células tumorais desenvolvem várias maneiras de escapar do sistema imunitário, especialmente da imunidade inata. Tumores podem regular

negativamente a expressão de antígenos tumorais em suas superfícies tornando-se menos reconhecíveis para células imunes. Neutrófilos associados ao tumor (TANs) podem atuar de forma pró-tumoral, ajudando na angiogênese, liberando enzimas pró-migratórias e quando ativados podem secretar fatores que promovem a inflamação mas também produzem citocinas que ajudam a criar um ambiente que favorece a progressão do tumor.

A imunidade inata embora não seja específica, desempenha um papel importante no reconhecimento inicial das células tumorais e na ativação da resposta imune. A modulação da imunidade inata no câncer é alvo pois visa fortalecer as respostas anti-tumorais enquanto suprime mecanismos que favorecem a progressão e disseminação do tumor. Por exemplo, neutrófilos pró-tumoral (N2) liberam enzimas e citocinas que favorecem a angiogênese e a metastáse, reduzir a ativação desses neutrófilos pró-tumorais pode inibir o crescimento do tumor. A neutralização de citocinas pró-tumorais que recrutam os neutrófilos como a IL-8 pode reverter o MAT tornando-o menos favorável ao crescimento do tumor.

Com isso, a modulação da imunidade inata é uma área promissora e desde a descoberta, o uso de tratamentos que ativam o sistema imunitário de forma eficaz em pacientes oncológicos é um objetivo comum de pesquisadores que buscam novas técnicas de tratamento do câncer.

Enfatiza-se as terapias associadas à nanobiotecnologia que vêm se mostrando promissoras no tratamento do câncer. (Chaturvedi et al., 2018)(MOSLEH-SHIRAZI et al., 2022)

Nesse sentido, o presente estudo avalia a utilização da terapia fotodinâmica (TFD) como uma aplicação da nanotecnologia. A TFD é uma técnica segura e eficaz, pouco invasiva e menos agressiva que as terapias existentes e que é aprovada pelo *Food and Drug Administration (FDA, 2024)* para tratamento de doenças oncológicas e não oncológicas. No Brasil, o Ministério da Saúde incorporou a terapia fotodinâmica ao SUS em Setembro de 2023, e descreveu como tratamento alternativo para pacientes com câncer de pele aprovado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2024).

1.5 Terapia fotodinâmica

A TFD é baseada na combinação de três componentes: oxigênio molecular (O_2), nanopartículas fotossensibilizantes (FS) e luz de comprimento de onda específico. Esses três elementos induzem efeitos tóxicos aos tecidos e células-alvo baseados na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs)(TREVISAN et al., 2019) **Figura 3**

O mecanismo de ação dos fotossensibilizantes na TFD é caracterizado pela transformação de energia luminosa em energia química, necessária para geração das EROs que são altamente reativas causando peroxidação de lipídios, danos as proteínas e ao DNA. Sendo assim, após a ativação por um comprimento de onda específico e luz, os fotossensibilizadores geram as espécies reativas de oxigênio que induzem diretamente a apoptose e a necrose celular. Além disso, a TFD desencadeia também a morte celular imunogênica, que promove a liberação de DAMPs (padrões moleculares associados a danos), incluindo calreticulina, HGMB1 (*high mobility group box*) e ATP (adenosina trifosfato) provocando efetivamente uma reposta antitumoral; desse modo, o FS é indispensável para a eficácia da TFD. (NARDIN et al., 2021).

A TFD, além de produzir espécies reativas de oxigênio através da luz e dos fotossensibilizantes utilizados na terapia, tem sido reconhecida com imunomoduladora, influenciando as respostas e o comportamento de células imunes. TFD danifica vasos sanguíneos que suprem o tumor e através da produção de EROs causam lesões nas células endoteliais dos vasos levando á sua obstrução e interrompendo o fornecimento de oxigenio e nutrientes paa o tumor.

Segundo Zhu et al., 2024, a eficácia da terapia fotodinâmica é dependente da produção intracelular de EROs, no entanto, alcançar um tratamento de TFD eficaz tem sido um grande desafio.

Entretanto, a geração fotodinâmica de $O_2^{\cdot -}$ depende de um FS capaz de absorver luz em um comprimento de onda entre 400-800nm pois, é essa faixa que oferece uma boa penetração nos tecidos e é eficaz para a ativação da maioria dos FS. Uma luz infravermelha (700-800nm) oferece penetração ainda mais profunda sendo útil para alcançar tecidos mais profundos. Alguns fotossensibilizadores de nova geração como ftalocianinas e clorinas são ativados nessa faixa. Ou seja, o comprimento de onda vai depender do FS **Figura 3**.

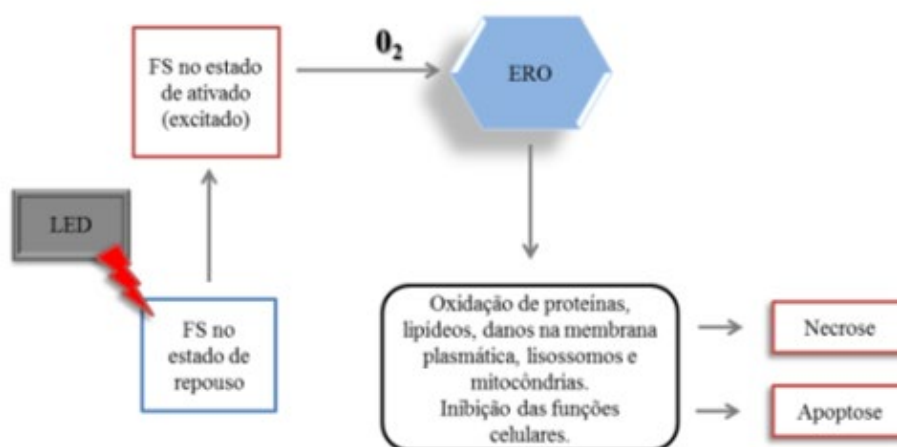


Figura 3 - Esquema de mecanismo de ação da TFD

Esquema de mecanismo de ação da TFD. O FS (fotossensibilizante) é excitado com a luz em um determinado comprimento de onda, ocorrendo a partir do O_2 tecidual, formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) que são tóxicas as células tumorais. Fonte: Rodrigues, 2014.

1.6.1 Nanoemulsão de ftalocianina

Desde a descoberta da Nanotecnologia, existem diversas aplicações como na medicina, cosméticos, alimentos e veterinária. As vantagens da nanotecnologia são melhor eficiência, redução de gastos, redução de doses, menor toxicidade além de maior segurança. As nanoemulsões que são sistemas de entrega de substâncias ativas como fármacos, nutrientes ou cosméticos, em forma de gotículas extremamente pequenas com diâmetro médio entre 10 e 100nm. As nanoemulsões podem ser de óleo e água, de água e óleo e podem ser múltiplas. A composição pode ser substância ativa (fármaco, nutriente ou cosmético), óleo (vegetal ou sintético), água, surfactante (agente tensoativo) e co-surfactante (auxilia o surfactante). As nanoemulsões são indispensáveis na TFD pois, permite liberar substâncias ativas de forma controlada. A escolha de uma nanoemulsão vai de acordo com as características do FS e sua aplicabilidade.

Fotossensibilizantes (FS) são substâncias que absorvem luz em determinado comprimento de ondas e convertem essa energia em reações. Os FS utilizados para TFD devem especificamente, utilizar essa energia para produzir agentes citotóxicos. Um bom FS deve possuir algumas características como capacidade de se acumular no sítio tumoral, ausência de toxicidade no escuro, pureza química,

propriedades fotoquímicas e físicas.

O mecanismo de ação dos FS na TFD é atribuída à transformação de energia luminosa em energia química, essencial para produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). Desta forma, é indispensável o uso de FS na terapia fotodinâmica. Dentre os FS existentes os FS de ftalocianinas são bastante utilizados como mediadores da TFD como tratamento de diversas doenças bucais, doenças virais e bacterianas devido às suas propriedades fotoquímicas e fotofísicas (geração de oxigênio singlete, especificidade e direcionamento) . As nanoemulsões aumentam a solubilidade da ftalocianina em meios aquosos facilitando sua administração no corpo. As ftalocianinas apresentam alto coeficiente de absorção de luz em uma faixa de comprimento de onda de 650-850nm. Esse comprimento de onda corresponde ao intervalo da região vermelho visível que tem maior penetração. Devido a essa característica de alta absorção de luz, a aplicabilidade desse FS de ftalocianina para tratamento de câncer tem se demonstrado bastante promissora. (MUEHLMANN et al., 2015b, 2011)

Os fotossensibilizantes de ftalocianina são descritos como aromáticos e de natureza hidrofóbica (Figura 4). o que leva à formação de agregados em solução aquosa, reduzindo seu rendimento quântico de maneira significativa na produção de ROS.

Sendo assim, a associação de de fototerápicos a sistemas de nanoemulsões melhora a atividade do FS em meios fisiológicos..

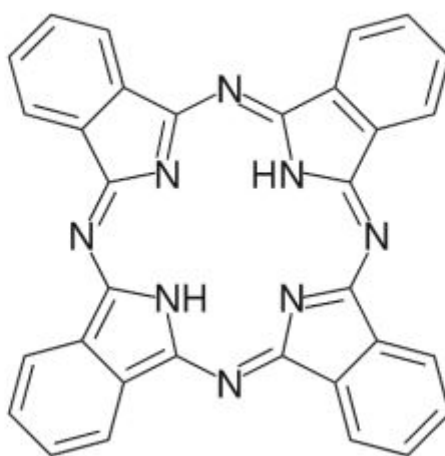


Figura 4 - estrutura química da ftalocianina

Diversos estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram uma maior eficácia do FS quando associado em nanopartículas. As nanoemulsões de ftalocianina especificamente as de alumínio ftalcianinas possuem propriedades que tornam excelentes agentes para TFD. A encapsulação em nanoemulsões modifica algumas dessas propriedades e oferece vantagens em relação ao FS em seu estado livre. Segundo Muehlmann et al., 2011 o FS de nanoemulsão de cloreto de alumínio-ftalocianina como mediador da TFD apresentou a maior eficiência contra células do câncer de mama MCF7 quando comparado com o FS de forma livre. Devido a isso, diversas pesquisas têm mostrado que a TFD é capaz de destruir o tumor devido à sua toxicidade direta às células cancerosas e também causa infarto do tecido do tumor destruindo a microvasculatura tumoral. A TFD também é capaz de ativar o sistema imunitário contra antígenos tumorais. Apesar de diversos estudos sobre TFD, a ativação do sistema imunitário tem sido alvo de investigação nos últimos anos.

1.6 Microambiente tumoral e Neutrófilos

O Microambiente tumoral (MAT) foi indiretamente proposto em 1889 por Stephen Page e refere-se ao ambiente biológico do tumor sólido, e consiste de células tumorais, células não tumorais, inclusive as do sistema imunitário, fibroblastos e células dos vasos vizinhos ao tumor e matriz extracelular. As interações entre as células malignas e não malignas afetam a progressão do câncer (HANAHAN; COUSSENS, 2012b). Alguns estudos demonstram que, as células não malignas do microambiente tumoral geralmente desempenham um papel pró tumorigênica estimulando a proliferação celular descontrolada (RODRÍGUEZ-UBREVA; GARCIA-GOMEZ; BALLESTAR, 2017; SPILL et al., 2016)

O MAT cada vez mais tem se tornado alvo de pesquisas e atraente para terapias. (Hodis et al., 2022). Hoje já é sabido que o MAT desempenha funções múltiplas que não apenas na metástase e crescimento como também no metabolismo e na progressão (Wei et al., 2020). O meio tumoral consiste em diversas células tumorais que acumulam rapidamente mutações genéticas. Na fase inicial do câncer, a resposta produzida pelas células do sistema imunitário no microambiente tumoral possui características antitumorais. (Lee et al., 2001). Evidências mostram que o MAT consiste em diversas células pró-tumorais como neutrófilos, macrófagos

associados a tumores (TAMs), células T que são essenciais e que possibilitam moldar o microambiente permitindo sobrevivência e metástase das células tumorais além de promover destruição imunológica.(Shitara et al., 2022).

1.7 Neutrófilos e NETs no câncer

Durante décadas, acreditava-se que os neutrófilos morriam principalmente por apoptose ou necrose e, mais recentemente, por necroptose. Takei et al. em 1996 tiveram uma interessante descoberta em que observaram uma nova morte de neutrófilos através do estímulo com forbol 12-miristato 13-acetato (PMA). Observaram que quando ativados com PMA, as células morriam por descondensação da cromatina, dissolvendo suas membranas nucleares e liberando cromatina revestida de proteínas granulares. Mas, somente em 2004 esse achado foi comprovado e NETs foram consideradas estruturas antibacterianas extracelulares e foram detectadas como liberadas em resposta também a outros agonistas como IL-8, PAF e LPS.

No contexto do câncer, as NETs desempenham papéis ainda não muito elucidados pois, elas podem tanto promover tanto o desenvolvimento e metástase do tumor, quanto inibir (YANG; LIU, 2021). Na metástase as NETs podem facilitar a disseminação criando um ambiente favorável para adesão e sobrevivência das células tumorais, pois, elas promovem a captação de células cancerosas por meio de interações moleculares como Integrina $\beta 1$ e podem facilitar a ancoragem de células tumorais circulantes (YANG; LIU, 2021). A liberação de NETs também pode ativar vias de sinalização em células tumorais por meio de moléculas como a IL-8 que contribui para a proliferação celular (ZHAO; JIN, 2022).

Diversos estudos mostraram que células cancerosas podem induzir a liberação de NETs por neutrófilos. Em um modelo de camundongos com leucemia mieloide crônica, câncer de mama e carcinoma pulmonar, os neutrófilos circulantes eram mais propensos a liberar NETs do que em animais saudáveis. A alta tendência dos neutrófilos de formar NETs correlaciona com os efeitos do câncer no hospedeiro (DEMERS et al., 2012; DEMERS; WAGNER, 2013). As células cancerosas podem adquirir a capacidade de metastizar expressando genes de metástase como fatores de transcrição (Karu et al., 1989). Entretanto, células cancerosas podem recrutar e ativar leucócitos como macrofágos e neutrófilos para promover

metastáse (HANAHAHAN; COUSSENS, 2012a; SPIEGEL et al., 2016). As NETs se formam em tecido e foram descritas em câncer pancreático, hepático e gástrico. As NETs também podem se formar intravascularmente e podem danificar células celulares quando formadas (KOLACZKOWSKA et al., 2015).

Segundo (PARK et al., 2016), NETs produzidas por infecção podem estimular a invasão e migração de células cancerígenas, promovendo a metástase do câncer. A formação de NETs é um mecanismo pelo qual os sinais das células cancerígenas ativam células hospedeiras para aumentar a metástase. Durante a ativação, o neutrófilo tem algumas funções, dentre elas, a formação de NETs que recentemente descrito envolvendo na progressão e metástase do tumor. As armadilhas de DNA que eram destinadas a capturar o patógeno durante a infecção acabam promovendo o crescimento e a disseminação do tumor (TOHME et al., 2016) por mecanismos identificados incluindo proteção para tumores

2 JUSTIFICATIVA

Os tratamentos existentes para o câncer variam de tratamentos individuais ou combinados como intervenções cirúrgicas. Quimioterapia e radioterapia e apesar de eficazes traz muitos malefícios para os pacientes, além de diversos efeitos colaterais e baixa da imunidade por não afetar somente as células doentes mas também as saudáveis e muitas vezes prejudicar o paciente com uma infecção por exemplo.

Sabe-se que a terapia fotodinâmica é eficaz no tratamento de algumas enfermidades, como câncer e infecções bacterianas. Estudos demonstraram que esse método é capaz de induzir a resposta inflamatória, que por sua vez é mediada por neutrófilos, os quais têm um grande potencial destrutivo sendo de importância no combate de tumores, mas que também podem afetar células saudáveis (CECIC et al., 2001; SCHUITMAKER; DE KOSTER; ELFERINK, 1998). Sabe-se também que a TFD induz o recrutamento de neutrófilos e produção de EROs. Porém, mesmo que a presença de neutrófilos no estroma tumoral já tenha sido apontada como frequente e importante, não há estudos que investiguem os eventos moleculares dos neutrófilos após a aplicação da TFD, nem de outras características funcionais de neutrófilos.

Devido a isso, o presente estudo tem como objetivo analisar alterações funcionais e no proteoma dos neutrófilos induzidas pela TFD, para gerar progressos na elucidação dos mecanismos moleculares associados às alterações funcionais induzidas pela TFD em células envolvidas na resposta ao tumor. Os dados gerados pelo desenvolvimento deste projeto ajudarão a elucidar a importância de neutrófilos durante a aplicação de TFD anticâncer, bem como poderão ser utilizados para melhorar o desempenho da TFD como modalidade de tratamento anticâncer

3 OBJETIVOS

3.1. Geral

Determinar alterações na resposta funcional e da abundância de proteínas de neutrófilos induzidas pela terapia fotodinâmica, comparados a neutrófilos quiescentes, assim como propor possíveis mecanismos moleculares de influência da TFD sobre neutrófilos.

3.2. Específicos

- Verificar possíveis alterações do padrão de produção de EROs, fagocitose, migração e viabilidade de neutrófilos após a exposição à TFD;
- Identificar as proteínas de neutrófilos com abundância diferencial significativa entre neutrófilos quiescentes e neutrófilos expostos à TFD;
- Avaliar a correlação entre alterações funcionais e eventos moleculares dos neutrófilos após TFD.

4 METODOLOGIA

Para alcançar o objetivo proposto, foi delineado o desenho experimental de acordo com a Figura 5 abaixo:

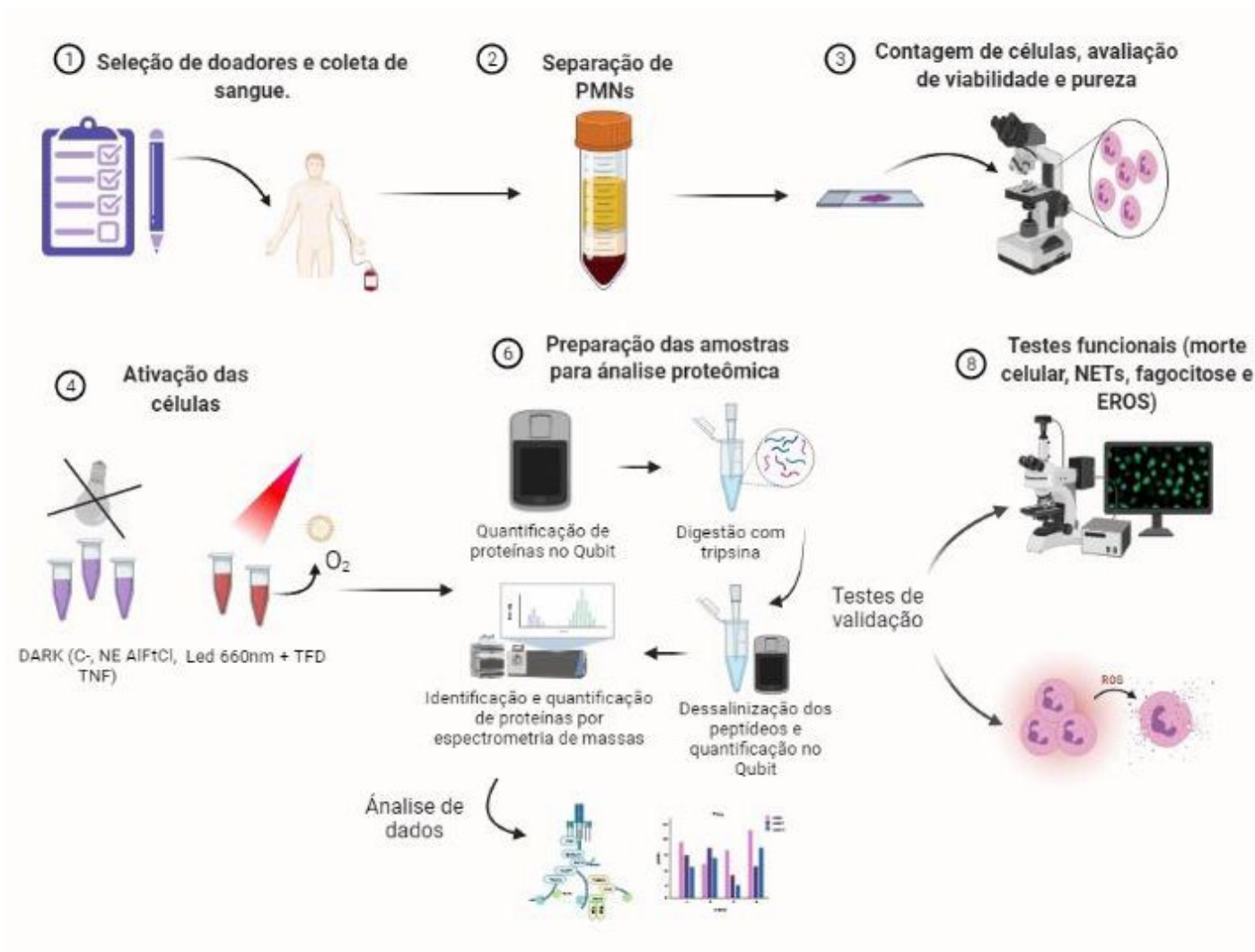


Figura 5 - Representação esquemática da metodologia utilizada. O desenho experimental desse estudo foi realizado através da seleção dos doadores do sexo masculino de 18 a 30 anos saudáveis sem histórico de doenças atuais ou recentes. Após a coleta, o sangue foi centrifugado em um gradiente de percoll, após separadas, as células foram avaliadas quanto à viabilidade e pureza por contagem em lâminas. A seguir foi realizada a ativação das células sendo incubadas com ativador (TNF), ftalocianina, exposição à luz e TFD. Após ativadas, as células foram preparadas para ensaios funcionais ou para análise proteômica por espectrometria de massas.

4.1 Seleção de doadores e coleta de amostra

Para o presente estudo, foi coletado sangue de 8 doadores do sexo masculino, saudáveis com faixa etária de 18 a 30 anos. O número de replicatas biológicas foi estabelecido com base em estudos anteriores de proteômica de neutrófilos humanos, tendo sido realizada análise de potência estatística e determinado que $n=8$ é suficiente para uma potência de 0,8 em 80% das amostras. Para a coleta, todos os voluntários preencheram e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), aprovado previamente pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), processo 13364819.0.0000.5558.

4.2 Separação de neutrófilos

20 mL sangue foi coletado por punção venosa periférica com seringa heparinizada (5 UI/mL) e o isolamento de PMN foi conduzido conforme protocolo descrito por Russo-Carbonolante et al., (2002) e (SOUZA LUZ et al., 2024). Resumidamente, os neutrófilos foram separados por diferença de densidade em gradientes Percoll. Após serem separadas e retirado o Percoll da amostra, foi realizado o processo de contagem das células em câmara de Neubauer e também verificada a viabilidade, rendimento por coloração com azul de tripan, e de pureza a partir da coloração com corante panóptico. Amostras apresentando mais de 98% de células vivas e mais de 96% de neutrófilos foram utilizadas nas etapas subsequentes (Aquino et al., 2016).

4.3 Preparo da Nanoemulsão

As nanoemulsões com cloreto de alumínio-ftalocianina (NE-AlFtCl) utilizadas nesse estudo foram preparadas pelo método de nanoemulsão espontânea descrita por Muehlmann et al. (2015). No preparo da nanoformulação contendo FS AlFtCl, foi utilizado Kolliphor® EPL (surfactante) como tensoativo e óleo de rícino como solubilizante do FS, na proporção 3:1.

O preparo da nanoformulação foi dividido em três etapas: a) disposição em um béquer (9g) e óleo de rícino (3g). Em seguida o béquer contendo os excipientes foi colocado sob agitação 300rpm com temperatura de 50°C por 10 minutos até formar

uma mistura homogênea. b) após homogeneização dos excipientes foi adicionado o FS AlFtCl (0,0023g) solubilizado em 4mL de etanol sendo mantidos os parâmetros de agitação por 30 minutos até a evaporação do solvente. c) após a evaporação do solvente, foram adicionados 10mL de água destilada, depois de adicionada a água destilada ocorrerá a nanoemulsificação.

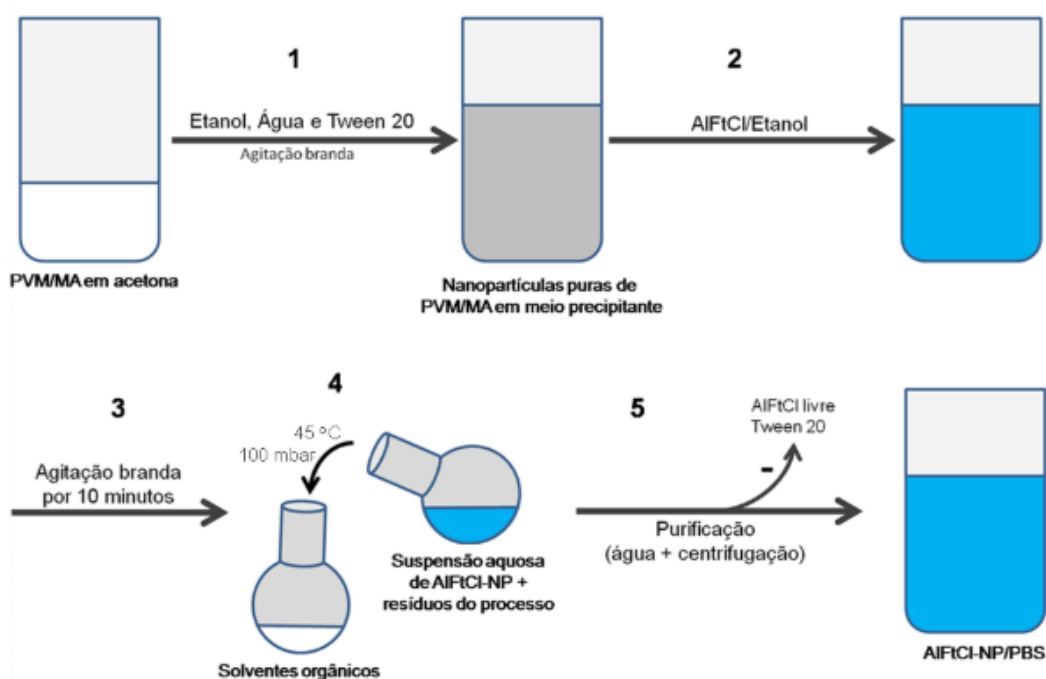


Figura 6 - Método de preparo de nanopartículas: associadas ao cloreto de alumínio-ftalocianina.

4.4 Ativação de neutrófilos

Após a separação dos neutrófilos, as amostras que apresentaram um rendimento superior a 10^6 células e viabilidade maior que 98% e 96% de pureza foram submetidas à ativação celular. As amostras foram divididas em 5 grupos: Grupo **C-**: Controle negativo (sem estímulo); Grupo **C+**: Controle positivo, células expostas a TNF- α ; Grupo **Nano**: células expostas à nanoemulsão FS AlFtCl 31 nM, Grupo **Luz**: células expostas à luz de led 660nm; Grupo **TFD**: células expostas à TFD completa (FS AlFtCl + luz).

A ativação foi realizada segundo descrito anteriormente (SOUZA LUZ et al., 2024). As células foram incubadas segundo cada condição. No grupo C-, as células foram incubadas com tampão HBSS com Ca²⁺ Mg²⁺, no grupo C+, as células foram

incubadas com TNF- α 0,01 $\mu\text{g/mL}$, por 60 min, condição capaz de induzir alterações funcionais em neutrófilos como produção de EROs, fagocitose e migração (LAUTERBACH et al., 2008). Como forma de controle de ativação. No grupo Luz, as células foram incubadas com tampão HBSS $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$ e, após 30 minutos, foram expostas à luz de led no comprimento de onda de 660nm por 10 minutos, como um controle para avaliar o efeito isolado da luz vermelha sob os polimorfonucleares. Os grupos Nano e TFD foram incubados por 30 minutos com nanoemulsão FD AIFtCl 7,5nM e, após esse tempo, as células do grupo TFD foram expostas à luz de led por 10 minutos. Todas as amostras foram ativadas por um período total de 1 hora.

4.5 Preparo das amostras para proteômica

4.5.1 Lise das células

Após a separação das células e incubação com as condições, as aliquotas passaram por centrifugação a 1600 rpm por 5 minutos a 4 °C. Logo após a centrifugação, foi retirado o sobrenadante e foram realizadas três lavagens com HBSS seguidas pela centrifugação. Após as lavagens foram adicionados 200 μL de Tampão de lise (SDS 2%, DTT 0,1 mol/L, TEAB 20 mmol/L, inibidor de protease 2%) ao pellet e as aliquotas foram incubadas em *thermomixer* por 10 minutos a 80 °C a 1000 rpm. Passados os 10 minutos, as amostras foram sonicadas em ponteira por 5 ciclos de 15 segundos, com potência 50% com intervalos de 15 segundos. As amostras foram congeladas em -80°C e analisadas posteriormente.

4.5.2 Digestão das proteínas

Para digestão, as amostras foram centrifugadas a 21°C em 1600g por 15 minutos. Ao sobrenadante foi adicionado DTT 0,1 mol/L e realizada a quantificação das proteínas por fluorímetro Quibit (Invitrogen) seguindo as instruções do fabricante, e 100 μg de proteínas foram transferidas para um filtro molecular de 30kDa para serem conforme o método FASP (*Filtered aided sample preparation*), descrito por (Wiśniewski et al. 2009). Foram realizadas três lavagens com 200 μL de uréia 8M em pH 8,00 e logo após foram centrifugadas a 1000g por 15 minutos em uma temperatura de 21°, depois, foram adicionados 150 μL de DTT 0,1 mol/L e as aliquotas ficaram no escuro em repouso de 30 minutos. Após o repouso, foram realizadas duas lavagens em uma solução de uréia 8M repetindo o processo de lavagem realizada anteriormente. As proteínas foram incubadas com 150 μL de iodocetamida 50 nM com

amberlite 0,5% e mantidas em repouso por 20 minutos, logo em seguida foi realizada uma lavagem com 100 μ L de uréia 8M. Após a lavagem, foi descartado o sobrenadante e foram adicionados 100 μ L de TEAB 20 nM e centrifugados a 1000 g em uma temperatura de 21 °C por 15 minutos. As amostras foram incubadas com tripsina 1 μ g a 37 °C por aproximadamente 16 horas.

Após as 16 horas de incubação com tripsina, as amostras foram centrifugadas a 1400 g por 10 minutos a 21°, adicionou-se 50 μ L de TEAB 20 nM em cada condição e foram centrifugadas. Em seguida, foram adicionados 45 μ L de TEAB 20nM e realizada outra centrifugação. A reação foi interrompida pela adição de TFA 0,5%, os peptídeos foram secados em SpeedVac, ressuspensos em 50 μ L ácido fórmico 0,1%.

4.5.2 Processo de Dessalinização

Os extratos de peptídeos foram aplicados em colunas anteriormente preparadas com ponteiros C8, C18 e resina Poros R2 (RAPPSILBER; MANN; ISHIHAMA, 2007). As amostras foram centrifugadas a 900g por 4 minutos a 21°C seguidas por três lavagens com 200 μ L de TFA 0,1% e realizada outra centrifugação. Logo após, foram realizadas dois ciclos de eluição com 80 μ L de acetonitrila 20% + TFA 0,1% ; mais dois ciclos de acetonitrila 50% + TFA 0,1% e mais 2 ciclos com acetonitrila 90% + TFA 0,1%, cada ciclo teve centrifugações de 600g por 2 minutos com temperatura 21°C. As amostras foram secas novamente em SpeedVac e ressuspensas em 50 μ L de ácido fórmico 0,1% e quantificadas em Quibit. Cada amostra teve concentração final de peptídios ajustadas para 0,5 μ g/ μ L em uma solução de ácido fórmico 0,1%.

4.6 Proteômica

As amostras em solução de ácido fórmico contendo peptídios foram analisadas segundo (Viana et al. 2018). Foram aplicadas no cromatografo de fase reversa (Dionex UPLC 3000) acoplado a um espectrômetro de massas do tipo LTQ-Orbitrap Elite (Thermo Scientific, Alemanha). A coluna trap utilizada apresentava 3 cm de comprimento, 100 μ m de diâmetro e foi preenchida por partículas de C18 de 3 μ m.

A coluna analítica consistiu em um capilar preenchido por partículas de C18 de 3 μ m, com 23 cm de comprimento e 75 μ m de diâmetro. Para separação cromatográfica, foi utilizado o seguinte gradiente para eluição por 185 min: 10 min a 1% B, 5 min de 1 a 12.8%B, 155 min, de 12.8 a 42.3% B, 15 min de 42.3 a 99% B, mantido por 5 min a 99% B, 1 min de 99 a 1% B, seguido por equilíbrio da coluna em 1%B por 20 min. Para espectrometria de massas, a resolução foi de 120000 FWHM e 15000 FWHM para MS1 e MS2, respectivamente. A aquisição de MS2 foi do tipo data-dependent (DDA), fragmentando os 15 íons mais intensos por higher collisional dissociation (HCD) com uma janela de isolamento de 2 m/z. Para evitar fragmentação dos mesmos íons precursores, foi determinada uma exclusão dinâmica com duração de 90s.

4.7 Análise estatística e bioinformática

Os dados de LC-MS/MS gerados como arquivos .raw foram exportados para o software Peaks para identificação e para o software Progenesis para quantificação (ZHANG et al., 2012). Os parâmetros para identificação foram FDR < 1 % e a presença de pelo menos 2 peptídeos únicos. Para quantificação, a diferença significativa de abundância de proteínas entre os grupos foi considerada quando o valor de $p \leq 0.05$ (ANOVA). A visualização e agrupamento dos dados foram feitos com auxílio dos programas MetaboAnalyst para heatmap e PCA (PANG et al., 2021), String para visualização de interações proteína-proteína (SZKLARCZYK et al., 2017), shinyGO para enriquecimento de termos de ontologia de genes (XIJIN GE; JUNG; YAO, 2019) e do software Vsclust para clusterização (MARCUS; EISENACHER; SITEK, 2021). Adicionalmente, o teste de Tukey foi realizado em script R para comparação entre os grupos.

4.8 Morte celular

O efeito das condições experimentais sobre a morte celular de PMN foi avaliado por microscopia de fluorescência. O uso de marcadores fluorescentes teve dois objetivos: determinar a viabilidade das células e quantificar as células apoptóticas e necróticas após o tratamento com a terapia fotodinâmica.

Foram utilizados dois marcadores fluorescentes: laranja de acridinina (LA) e o iodeto de propídio (IP). O LA permeia as membranas das células viáveis. Quando

reage com a cromatina, forma um composto verde. Já o IP atravessa apenas as membranas de células necróticas e reage tanto com o DNA nuclear quanto com o RNA presente no citoplasma, tornando a coloração da célula vermelha. Dessa forma, espera-se encontrar células viáveis com fluorescência verde, células necróticas com fluorescência vermelha e células apoptóticas com a coloração amarela.

Uma vez finalizado o processo de ativação das células, as mesmas foram transferidas para uma placa de 96 poços, na quantidade de $2,5 \times 10^4$ células em cada poço, e inseridos marcadores para avaliação de viabilidade e morte celular. Em cada poço foram adicionados 2uL de laranja de acridina (5 mg/mL) e, após 5 minutos, adicionou-se 2uL de iodeto de propídeo na concentração de 20 ug/mL. Após 1 minuto foi avaliada a viabilidade celular e morte celular por necrose no microscópio de fluorescência EVOS.

4.9 Espécies Reativas de oxigênio (EROs)

A ativação de neutrófilos pode ser medida segundo a liberação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e uma das formas de avaliar a liberação de EROs pelo neutrófilo é por meio do teste do *Nitroblue tetrazolium* (NBT) (GÖRG, 2004). Quando o NBT (amarelo) é reduzido pelas EROs, um cristal azul denominado formazan é formado. Essa alteração resulta em uma mudança de coloração, passando do tom amarelado para um tom azul arroxeado, o que se torna perceptível à espectrofotometria e à microscopia óptica permitindo análise qualitativa da distribuição dos grânulos de NBT corados (NEVES, 2007). Concomitantemente, após os 40 minutos de ativação, foram retirados 36 µL de células de cada alíquota e adicionados em uma placa de 96 poços com uma solução de NBT, de modo que a concentração final fosse 1,79 µg/µL. A partir dessa solução foram retirados 6 µL de cada alíquota e repassadas para uma lâmina sendo divididas em 3 poços com 2 µL da mesma alíquota. Os tubos, as placas e as lâminas foram incubadas durante mais 20 min a 37° C sob agitação suave, totalizando 60 minutos de ativação.

Logo após o período de incubação, as lâminas foram fixadas com metanol durante 1 minuto e coradas com safranina durante 5 minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas e colocadas para secar em temperatura ambiente, sendo posteriormente analisadas por microscopia óptica. As alíquotas com NBT presentes na placa de 96 poços, foram analisadas

no espectrofotômetro Spectramax (Soft Pro 6.3), em uma faixa de absorbância de 350 a 790 nm com intervalos de 10 nanômetros. (NEVES, 2010; FONSECA, 2017).

4.10 Migração

Para a avaliação da capacidade de migração, foi realizada pelo RTCA (do inglês *Real Time Cell Analyzer*). como descrito por (CANO; VARGAS; LAVOIE, 2016) A placa CIM (CIM-Plate 16; ACEA Biosciences Inc., San Diego, CA) possui duas câmaras, inferior e superior. As câmaras são separadas por um conjunto de eletrodos que impede neutrófilos quiescentes de passarem passivamente para os poços inferiores. Quando quimicamente atraídos para o poço inferior, os neutrófilos transmigram pelos eletrodos, gerando uma resistência elétrica que é detectada pelo RTCA. Como mostrado na figura 6, a placa de RTCA foi montada na seguinte ordem: 160uL de fMLP 100nM foram adicionados aos poços inferiores dos grupos Controle positivo, Luz e TFD (como descrito na figura 7 e em um poço foi adicionado nanoemulsão de ftlocianina-alumínio 7.5nM para avaliação da migração e 160uL de HBSS foi adicionado em um poço inferior para o controle negativo. A câmara superior foi encaixada sobre a câmara inferior e 25uL de HBSS foram adicionados a todos os poços superiores e a placa foi incubada a temperatura ambiente 37°C por pelo menos 60 minutos para formação do gradiente quimiotático entre as câmaras. Logo após, o processo de ativação celular descrita no tópico 4.9, uma alíquota de 60uL de células controle e células do processo de ativação com TFD foram adicionados aos poços superiores para os respectivos testes, como explicado na figura 6 e a análise foi programada para medição do índice celular a cada 60 segundos por um período de 2 horas.

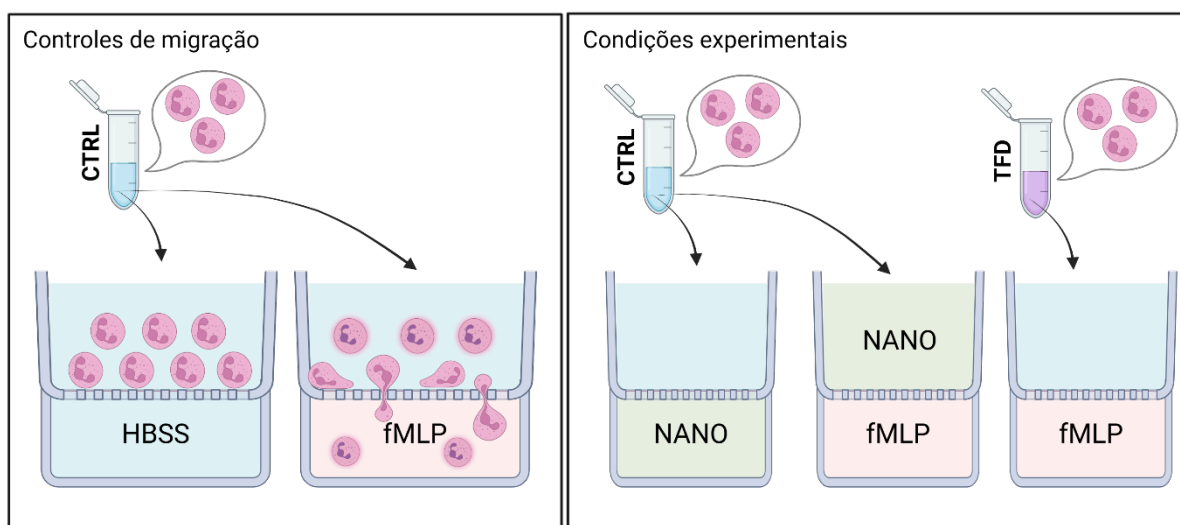


Figura 7 - Esquema detalhando o experimento de migração pela placa RTCA. Nas condições “Controles de migração” foi adicionado na parte inferior em um poço HBSS e em outro poço fMLP. Já nas condições experimentais; na placa inferior um poço foi adicionado nanoemulsão de Al-ftalocianina e nos demais grupos foi adicionado fMLP. Figura feita com Biorender.com.

4.11 Armadilhas Extracelulares dos Neutrófilos (NETs)

Afim de analisar se TFD promovia NETs, realizamos o seguinte teste. As células (2×10^5 células por condição) foram colocadas em placas de 24 poços imediatamente após a separação e foram aderidas em lâminulas com polilisina 0,001% por 30 minutos, seguidas por ativação de 1h, foi utilizado o mesmo método de ativação descrito no tópico 4.4. Após a ativação, as células foram fixadas com formaldeído 1% por 30 minutos, seguidas de 2 lavagens. Após a ativação, foi adicionado anticorpo monoclonal anti-elastase de neutrófilos humanos, recombinante 1:1000 (MA5-32548; Invitrogen) por 3 horas em temperatura ambiente, seguidos de uma lavagem com HBSS e incubadas com anticorpo secundário Alexa Fluor 405 1:1000 (A48258; Invitrogen) por 1 hora em temperatura ambiente. Após, foi adicionado Sytox Green (10 $\mu\text{mol/L}$) durante 5 minutos, seguido de duas lavagens com HBSS. As lamínulas foram colocadas em lâminas com 0,5 μL de glicerol 50%. As lâminas foram visualizadas no microscópio confocal Leica TCS SP5. O confocal foi adquirido usando o plano 100x lente com óleo de imersão com zoom 2,0x. O sinal de imunofluorescência do Alexa Fluor 405 e do Sytox Green foram excitados a 450 nm e 485nm, com multilaser argon, respectivamente (Rada 2019 com modificações).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Rendimento, viabilidade pureza e ativação

Corroborando o método de separação de PMNs (SOUZA LUZ et al., 2024), foram obtidas $1,7 \times 10^6$ células por replicata, a análise de pureza resultou em média 96,8% de neutrófilos e viabilidade média de 98,9% mostrando a eficácia do método de separação de polimorfonucleares.

5.2 Proteômica exploratória de neutrófilos após exposição a terapia fotodinâmica

Os neutrófilos são os leucócitos mais abundantes na circulação sanguínea humana e estão diretamente envolvidos na primeira linha de defesa do sistema imunitário adaptativo, eles respondem como moduladores e participam de diversas patologias incluindo sepse e câncer. Os polimorfonucleares também são considerados sensíveis e se ativam pelo contato com corpos estranhos e após exposição a agentes químicos ou terapias invasivas (KOLACZKOWSKA; KUBES, 2013). Quando estimulados ou ativados, os neutrófilos realizam funções como adesão ao endotélio, migração, liberação de citocinas, produção de EROs, desgranulação, liberação de NETs, dentre outras. Já se sabe que algumas terapias para tratamento de câncer, como a quimioterapia, são extremamente invasivas e acabam causando a morte de algumas células de defesa saudáveis como por exemplo os neutrófilos (KOBAYASHI, 2008). Esse tipo de tratamento tem diversos efeitos no sistema hematopoiético levando até mesmo à neutropenia seguida de febre e infecção (VAINSTEIN et al., 2005).

Apesar dos estudos que mostram que a quimioterapia é prejudicial à resposta funcional dos neutrófilos e os efeitos deletérios em células normais e saudáveis, seus benefícios no tratamento do câncer superam os danos. Como consequência, buscaram-se outras opções de tratamento, como a TFD, porém ainda não se tem estudos que verifiquem os efeitos da terapia fotodinâmica sobre a imunidade inata, conhecimento relevante uma vez que, a TFD é, em alguns casos, mais eficaz que outras já existentes. Embora a TFD tenha sido usada nas últimas décadas, ela ainda é um tratamento alternativo, não se sabe ao certo quais efeitos ela traria para células do sistema imunitário e se faz necessário e de extrema importância entender a imunologia para desenvolver terapias combinadas de TFD e imunoterapia (PEGAZ et

al., 2006). Assim, este trabalho utilizou a técnica de proteômica *bottom-up label free* como ferramenta exploratória para identificar características que possam evidenciar possíveis alterações em neutrófilos após terapia fotodinâmica. O estudo também utilizou testes funcionais de validação ou seguimento, buscando correlacionar as alterações detectadas em nível molecular às alterações funcionais das células. Para análise estatística foi utilizada uma análise qualitativa utilizando o programa de bioinformática Peaks, que permitiu identificar o total de 4678 proteínas considerando $FDR < 1\%$. Em seguida, uma análise de variância simples (one-way ANOVA) realizada pelo programa Progenesis para identificação de peptídeos e proteínas com abundância diferencial significativa, que resultou na detecção de 107 proteínas reguladas (ANOVA, $p \leq 0,05$) (Figura 8).

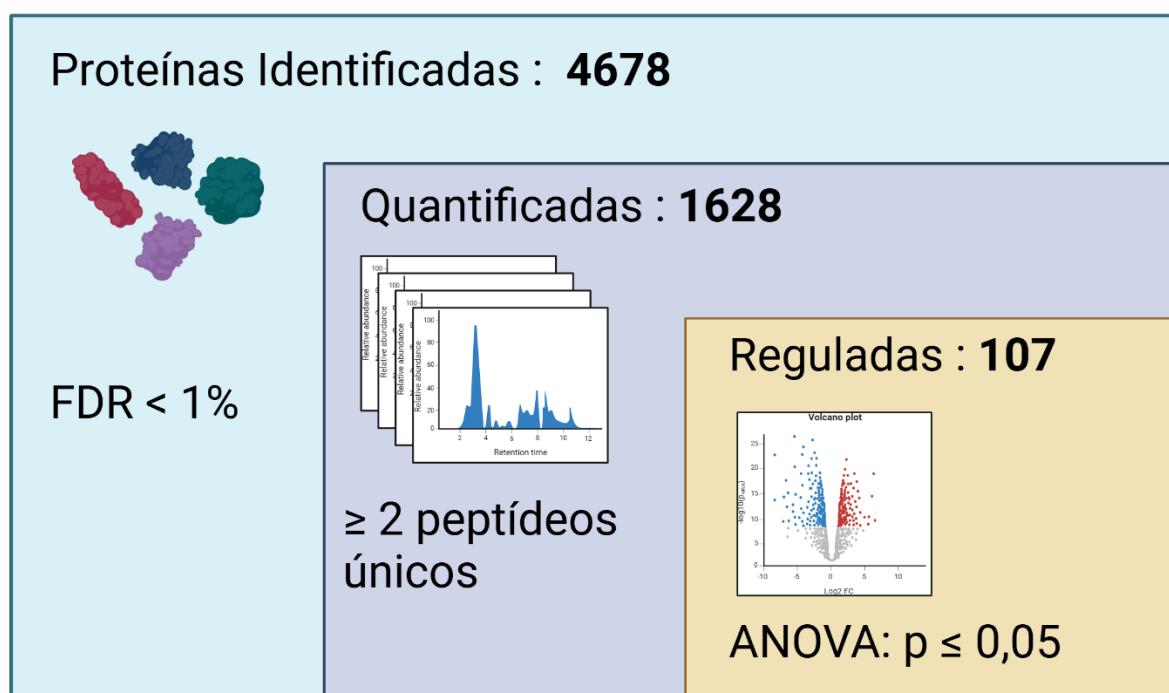


Figura 8 - Número de proteínas identificadas. Do total de 4678, 1628 tinham pelo menos 2 peptídeos únicos e apresentaram dados suficientes para quantificação, dessas, 107 estavam reguladas entre os grupos (ANOVA, $p \leq 0,05$). Figura feita com o Biorender.com.

Após a identificação, o grupo de proteínas quantificadas foi agrupado em clusteres, utilizando-se o vsclust (SCHWÄMMLE; JENSEN, 2018), onde foi possível observar três cenários predominantes, denominados clusters 1,2 e 3 (Figura 9). No cluster 1 observa-se proteínas com abundância aumentada no grupo Controle em

relação a todos os outros grupos (luz, nanopartículas e terapia fotodinâmica). Para uma melhor análise desses grupos de proteínas, as proteínas identificadas no Cluster 1 foram submetidas a análise de ontologia de gene pelo programa ShinyGO (XIJINGE; JUNG; YAO, [s.d.]) Considerando as 379 proteínas do cluster 1, os principais processos biológicos enriquecidos são transporte e localização celular.

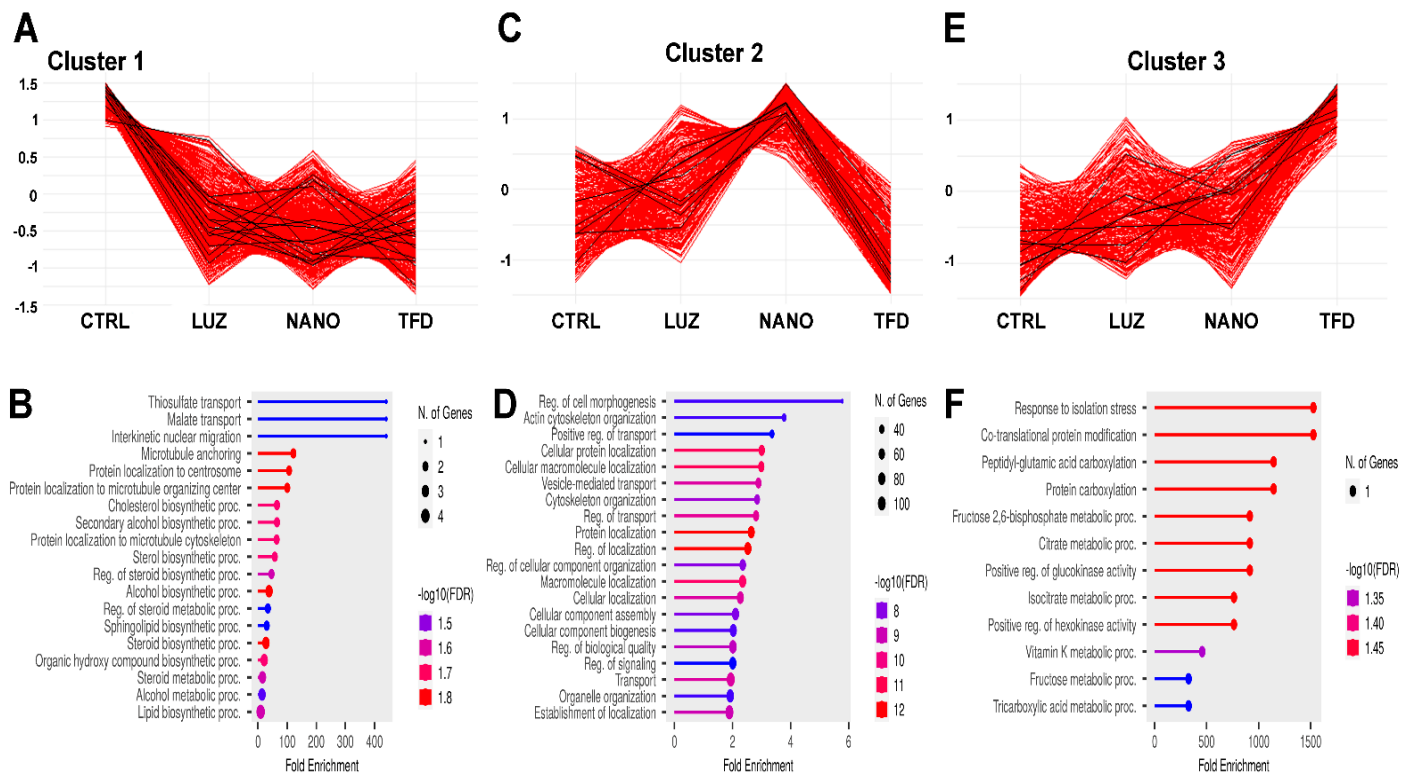


Figura 9 - Análise de clusterização e de ontologia de gene. A figura avalia os processos biológicos e o agrupamento das proteínas em três clusters diferentes de acordo com os perfis de abundância. As proteínas reguladas foram destacadas em preto (ANOVA $p \leq 0,05$). A: Cluster 1 perfil que destaca diferenças entre o controle e os demais grupos; B mostra que os principais processos biológicos enriquecidos para as proteínas reguladas do cluster 1 estão envolvidos com microtúbulos que envolvem a organização celular. C: Cluster 2 mostra o efeito de nanopartículas, na ausência de luz. D: Processos biológicos enriquecidos associados ao conjunto completo de proteínas do cluster 2. E: Cluster 3, que destaca proteínas com abundância aumentada no grupo TFD. F: Mostra que os processos biológicos envolvidos na resposta ao estresse estão enriquecidos nas proteínas reguladas do cluster 3.

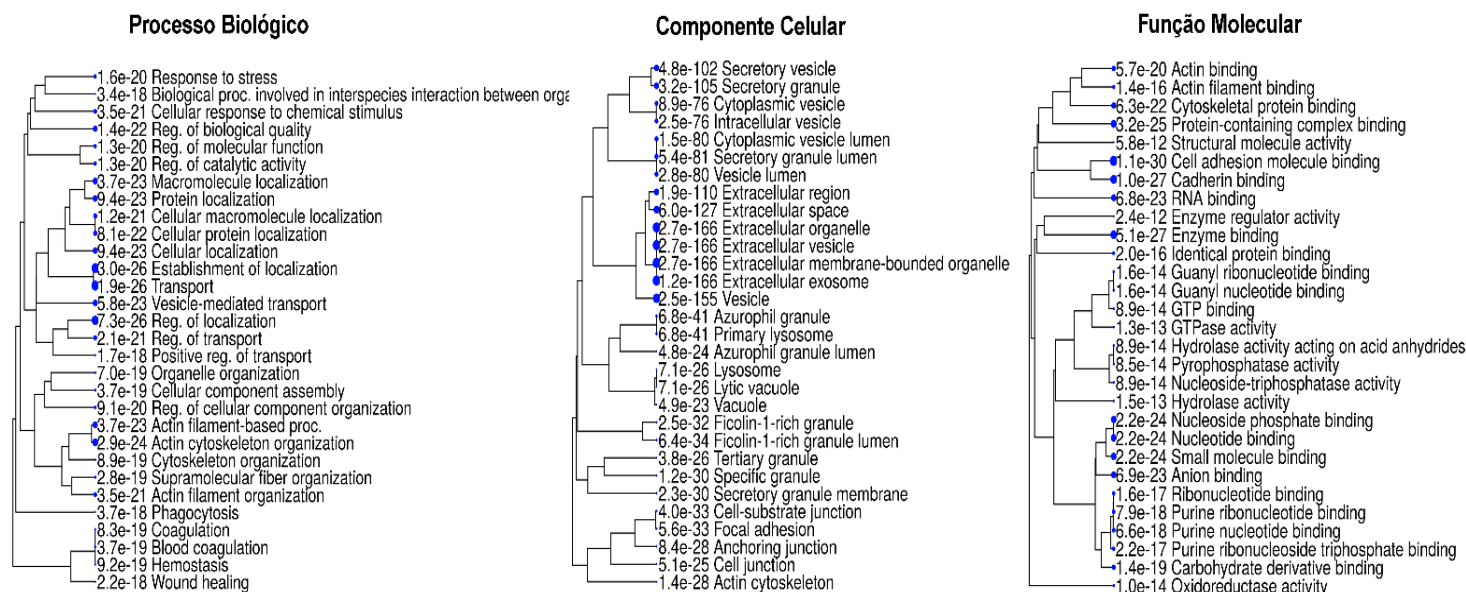


Figura 10 - Análise das proteínas reguladas após terapia fotodinâmica. Os dados foram avaliados pelo programa ShinyGo que revelou enriquecimento de transporte, fagocitose e ativação com menor p valor.

Diversos estudos demonstram a presença de neutrófilos no microambiente tumoral (ARNETH, 2020) e com isso surgiu a ideia de que a terapia fotodinâmica poderia ser utilizada para preparar tecidos tumorais e ativar a infiltração de neutrófilos em tumores. Porém, segundo (Dong et al., 2017, 2018), a TFD pode ser usada para preparar tecidos tumorais para ativar a infiltração de neutrófilos em tumores, sendo assim, nanoterapêuticos podem atrair os neutrófilos para aumentar a administração de medicamentos tumorais, o que seria viável pois, no cluster 1 um dos processos biológicos com abundância diminuída na TFD é o que estão envolvidos com microtúbulo que sugere facilitar o transporte de vesículas e organelas dentro da célula o que pode corroborar com o Dong. Para investigar melhor os processos biológicos envolvidos, das 379 proteínas pertencentes ao cluster 1, onze tiveram o ANOVA p valor $\leq 0,05$, e dessas proteínas, os processos envolvidos com melhor enriquecimento foram de ancoragem de microtubulos.

Os microtúbulos são elementos importantes do citoesqueleto que medeiam uma ampla gama de funções no ciclo nas células mitóticas. A polaridade dos

microtubulos é reconhecida por proteínas motoras para permitir transporte direcionado (ALUSHIN et al., 2014). (Yadav et al., 2019). Uma função dos microtúbulos no citoesqueleto é fornecer uma armação nas lamelas das células durante a migração celular, que ajudam a estabilizar e a organizar os componentes de sinalização necessários para migração. Essa função foi demonstrada em células mesenquimais, já em células hematopoiéticas embora os microtúbulos tenham uma variedade de funções efetoras como transporte de citocina e carga citotóxica, os elementos citoesqueléticos essenciais na adesão, migração e cruzamento de barreiras fisiológicas de leucócitos (GARCIN; STRAUBE, 2019).

Em células hematopoiéticas como os leucócitos, os microtubulos desempenham funções distintas, eles suportam o transporte intracelular de citocinas e outros componentes tóxicos e também facilitam adesão, migração e cruzamento de barreiras fisiológicas como as paredes dos vasos sanguíneos durante a resposta imunológica.

Diversos estudos demonstraram a presença de neutrófilos no microambiente tumoral (ARNETH, 2020) e com isso surgiu a ideia de que a terapia fotodinâmica poderia ser utilizada para preparar tecidos tumorais e ativar a infiltração de neutrófilos em tumores. Porém, segundo (Dong et al., 2017, 2018), nanoterapêuticos podem atrair os neutrófilos para aumentar a administração de medicamentos tumorais. Para investigar melhor os processos biológicos envolvidos, das 379 proteínas pertencentes ao cluster 1, 11 tiveram o ANOVA p valor $\leq 0,05$, e dessas proteínas, os processos envolvidos com melhor enriquecimento foram de ancoragem de microtubulos.

Os microtúbulos são elementos importantes do citoesqueleto que medeiam uma ampla gama de funções no ciclo nas células mitóticas. A polaridade dos microtubulos é reconhecida por proteínas motoras para permitir transporte direcionado (ALUSHIN et al., 2014). Em neutrófilos os níveis de microtúbulos são extremamente menores quando comparados com uma célula T efetora.

Diante disso, nossos resultados demonstraram que uma das proteínas encontradas no cluster 1 (Figura 8) com diminuição em TFD foi a Tubulin beta-4B chain (TUBB4B), essa proteína é principal constituinte dos microtúbulos. Esses microtubulos crescem pela adição de dímeros de GTP-tubulina à extremidade, onde se forma um tipo de capa estabilizadora; abaixo dessa capa, os dímeros de tubulina estão ligados a GDP, devido à atividade GTPase da alfa-tubulina. O que nos levou à hipótese que a condição de TFD poderia estar envolvida no transporte da

nanoemulsão, pois, segundo publicado anteriormente (Dumontet & Jordan, 2010), muitas drogas anti proliferativas bem-sucedidas se ligam a tubulina e interferem na dinâmica dos microtubulos e nossos resultados mostram que dois processos biológicos estão relacionados com organização e ancoragem dos microtubulos (Figura 10). (YADAV et al., 2019) descreveu que a migração transendotelial dos neutrófilos é dependente de quimiocina e embora que seja um processo migratório, é distinto da quimiotaxia de neutrófilos por quimiotráticos solúveis.

Nos neutrófilos, os microtubulos ajudam a manter a forma e a estrutura da célula, organização do citoesqueleto, movimentação celular e transporte intracelular, os microtubulos facilitam o transporte de vesículas e organelas dentro da célula. Além que, os microtúbulos regula a adesão e migração.

Apesar que, colaboração dos microtúbulos para a motilidade dos neutrófilos ainda está sendo estudada e ainda permanecem indefinidos, o que se sabe é que a diminuição de tubulina podem afetar funções que dependem do microtúbulo como por exemplo processos de ativação e resposta imune (LOGAN; MENKO, 2019). A diminuição de tubulina pode enfraquecer a rede de microtúbulos e reduzir a capacidade dos neutrófilos de se reorganizarem e moverem em resposta aos sinais quimiotáticos (WANG, 2018; XU et al., 2005). Ou seja, a diminuição dessa proteína, o neutrófilo pode apresentar dificuldade para realizar fagocitose de forma eficaz, limitando sua capacidade de eliminar diretamente os agentes patológicos.

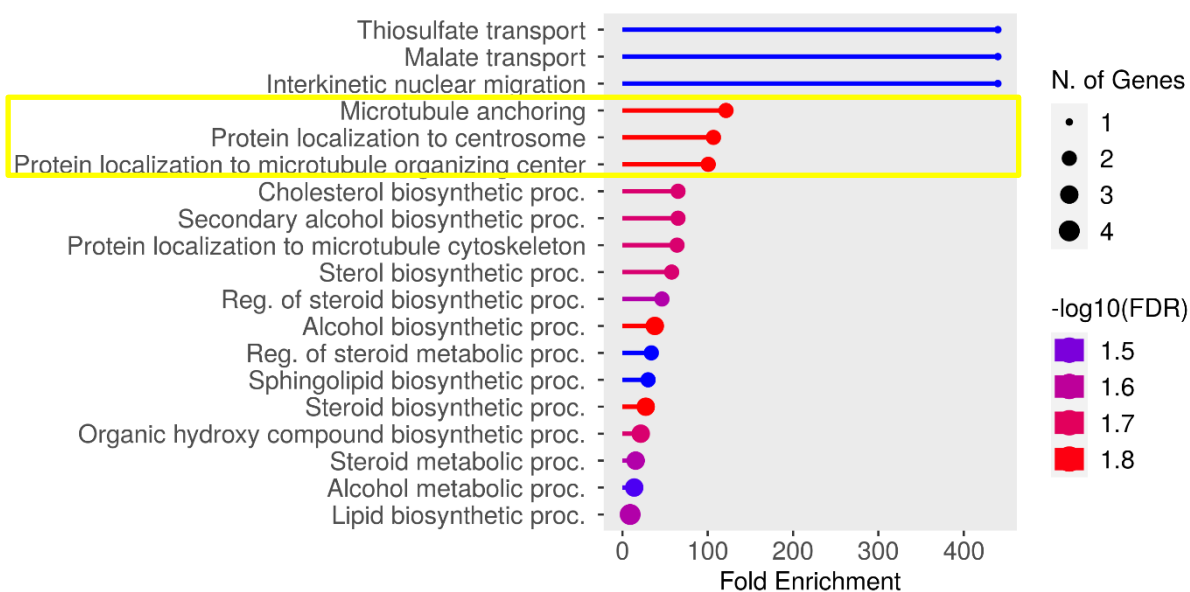


Figura 11 - Termos GO de processo biológico do cluster 1. Os processos foram enriquecidos no conjunto de proteínas com p valor $\leq 0,05$ no Cluster 1. Destaque em amarelo para proteínas associadas a microtúbulos.

Quando analisamos o cluster 2, pelo perfil de abundância (Figura 2) podemos observar que o grupo Nano teve maior abundância comparado com os outros grupos, destacando uma resposta característica às nanopartículas na ausência de luz, já que o efeito não se mostra em TFD completa. A análise de termos GO para o conjunto de proteínas com diferença significativa (ANOVA p-valor <0.05) mostrou enriquecimento para função molecular e componente celular relacionadas com ativação de neutrófilos. Expandindo-se a análise para o conjunto completo de proteínas pertencentes ao cluster, observa-se processos biológicos enriquecidos, tais como atividade da adenosina monofosfato, atividade aminoacilase. (FIGURA 12)

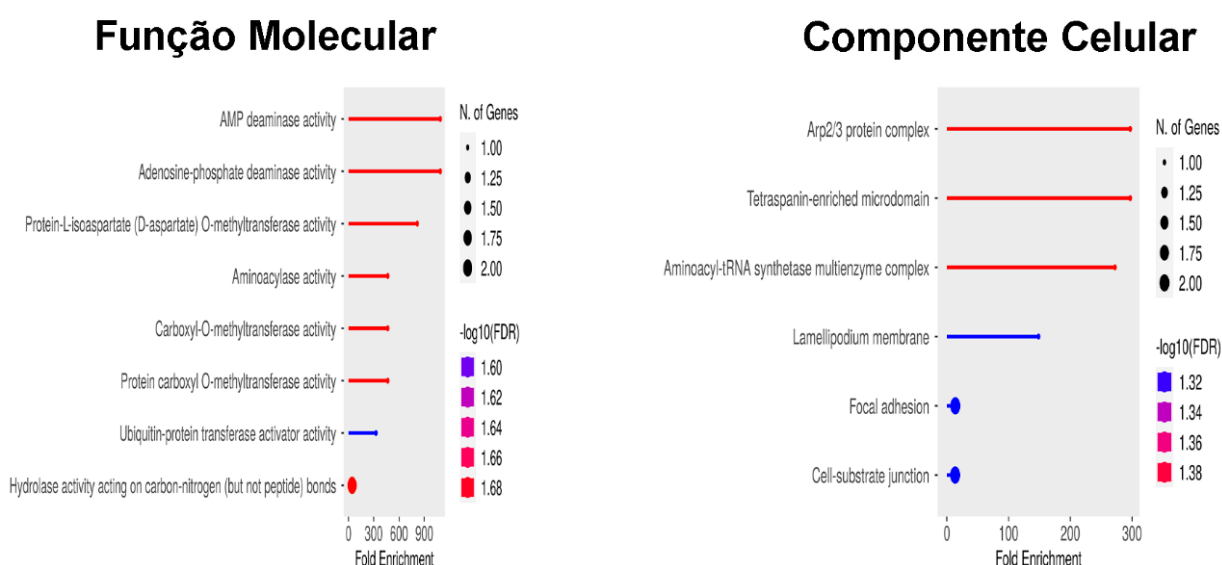


Figura 12 - : Função molecular e componente celular enriquecidas do cluster 2. Funções do cluster 2 onde no grupo nano está mais abundante e podemos observar que as proteínas significativas do cluster estão envolvidas em atividade da adenosina monofosfato, atividade aminoacilase.

Na Figura 12 observa-se que, dentre as proteínas significativamente reguladas do cluster 2, os termos de função molecular enriquecidos com maior número de genes e com menor FDR incluem a atividade de adenosina monofosfato desanimase (AMPD), essa enzima é responsável pelo ciclo de degradação das purinas. A AMPD catalisa a transformação de adenosina monofosfato (AMP) em iosina monofosfato (IMP) o que desempenha um papel primordial no metabolismo de purinas que são

importantes para o sistema de energia celular por fornecer energia química para atividades. (Zhan et al., 2020). A adenosina monofosfato desempenha um importante papel na regulação das funções dos neutrófilos, a adenosina controla a produção de espécies reativas de oxigênio pelos neutrófilos bem como sua capacidade de fagocitar (BARLETTA; LEY; MEHRAD, 2012). A ativação do receptor de adenosina inibe a liberação de mediadores pró-inflamatórios de neutrófilos ativos enquanto aumenta a liberação de mediadores anti-inflamatórios ajudando assim, a controlar a resposta inflamatória. Além disso, a AMP modula a quimiotaxia influenciando a migração dos neutrófilos para o sítio lesionado (ZHANG; YU-JING; MA, 2022). Sendo assim, como observado no cluster 2, não teve diferença entre controle e TFD, porém quando observamos o grupo Nano as proteínas envolvidas em abundância. O que sugere que, a TFD não tem danos aos neutrófilos quando comparado com o grupo que não recebeu luz.

5.3 Ativação de Neutrófilos após Terapia Fotodinâmica

O perfil de abundância de proteínas mostrado no cluster 3 (Figura 8) mostra que diversas proteínas apresentam aumento de abundância apenas na condição TFD (cluster 3, 284 proteínas, sendo 8 com diferença significativa entre condições) enquanto outras proteínas sugerem que o efeito da TFD completa, isto é, a aplicação de luz após a exposição às nanopartículas, seja diferente do efeito de seus componentes aplicados isoladamente (cluster 2, 290 proteínas, sendo 8 proteínas com diferença significativa entre condições).

(TREVISAN et al., 2019) avaliou *in vitro* os efeitos da terapia fotodinâmica em neutrófilos em diferentes concentrações de azul de metileno e mostrou que a viabilidade celular continuou preservada embora a análise estrutural revelou presença de modificações morfológicas resultando em rearranjo do citoesqueleto que no presente estudo também podemos observar através do cluster 1. Trevisan também descreveu que a produção de espécies reativas de oxigênio foi acentuadamente aumentada pela iluminação de azul de metileno.

Em concordância com os resultados de (TREVISAN et al., 2019), a exposição à terapia fotodinâmica mostrou perfil proteômico no cluster 3 (Figura) com alterações na 4 de proteínas mais intensas em TFD, comparado com os outros grupos, consequência de possível ativação. Ao avaliar o enriquecimento de termos GO das

proteínas significativamente reguladas em cada cluster, destacaram-se os termos associados à resposta ao estresse e processo catabólico, isso sugere que, os neutrófilos do grupo nano, luz e TFD tiveram ativação ao estímulo. Dentre os processos biológicos envolvidos, para uma melhor avaliação, selecionamos as proteínas do cluster 3 e filtramos para $p \leq 0,05$ resultando em 8 proteínas com resultado significativo. Foram encontrados 8 genes que estão relacionados a ativação (Figura 13).

Uma das proteínas envolvidas que encontramos é a PFKFB2 (6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 2) que está envolvida a regulação de respostas inflamatórias. A PFKFB2 é uma enzima chave na glicólise, é ela que regula o nível de frutose-2,6-bisfosfato. (Chen et al., 2024). PFKFB2 tem como função fosforilar frutose 6-fosfato em frutose 2,6 bisfosfato que é um ativador de PFKFB1, uma enzima limitante na taxa de degradação da açúcar. Ou seja, a PFKFB2 afeta a atividade glicolítica (YANG et al., 2022).

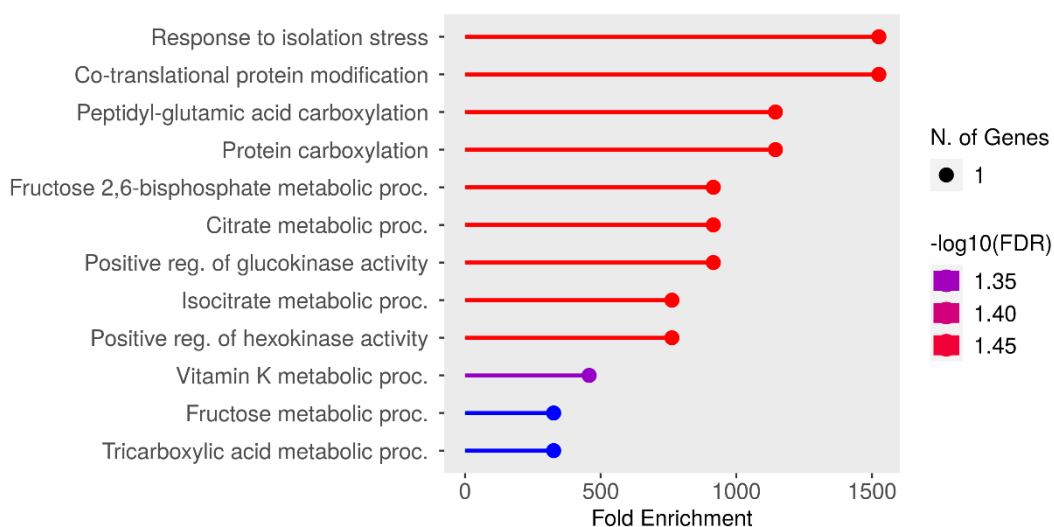


Figura 13 - Processos biológicos enriquecidos do cluster 3. Esses processos estão envolvidos na resposta ao estresse, metabolismo de carboidratos e modificação de proteína.

Como a proteômica mostrou resultados envolvidos na resposta ao estresse e metabolismo de carboidrato, e esses dois processos estão relacionados na produção de espécies reativas de oxigênio e para corroborar com (TREVISAN et al., 2019) verificarmos se a TFD afetava as funcionalidades da célula. Para isso, foi realizada

uma avaliação por microscopia óptica para verificar diferenças na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em que foi observado aumento de produção de EROs em 32,2% das células do grupo TFD, indicando que foram ativadas (conforme a figura 12). O teste de NBT possibilitou observar por microscopia os cristais de formazan na lâmina. Onde foi observado 32,2 % de células ativadas na condição de TFD e na condição controle não houve ativação significativa (Figura 14).

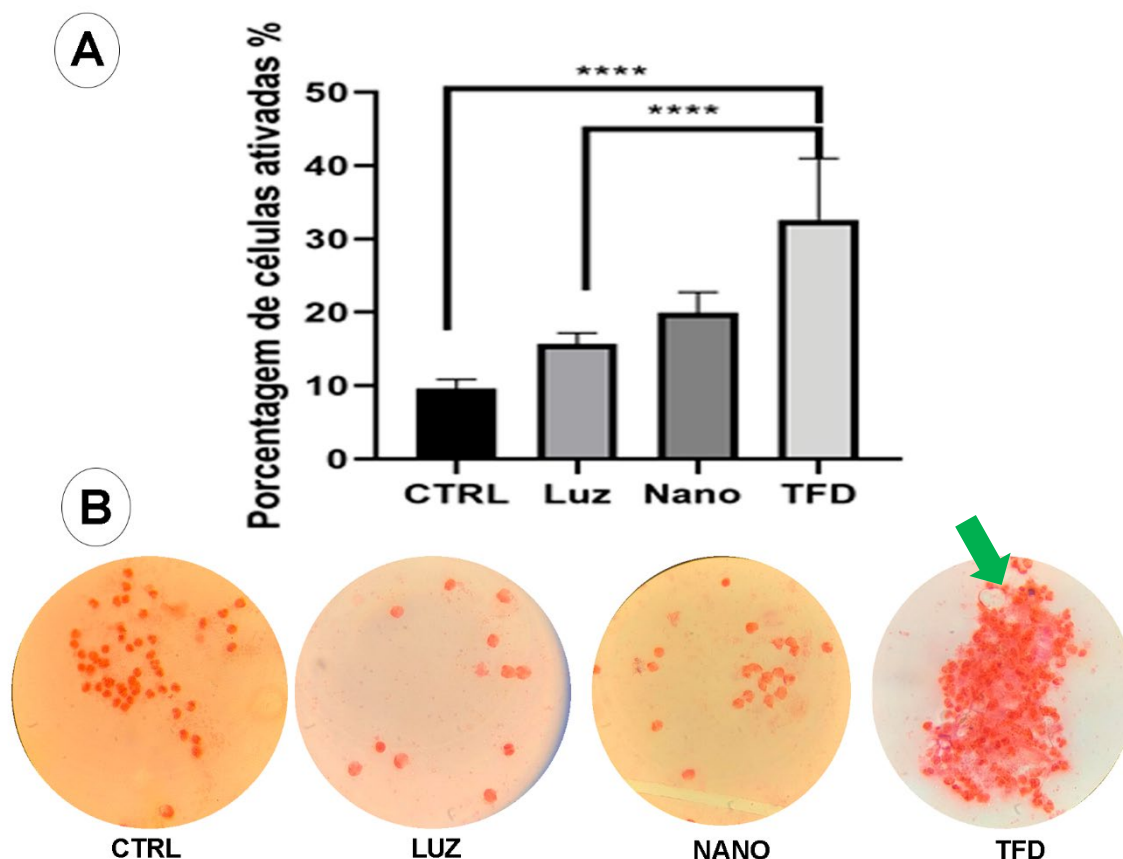


Figura 14 - Ativação de neutrófilo por NBT. **A:** Gráfico da contagem de lâminas a partir dos cristais de formazan. Onde mostrou diferença significativa com p valor <0.05 e no teste Turkey demonstrou diferença significativa entre controle e TFD. Além de Luz e TFD. No grupo controle quando observado com Luz não teve diferença significativa. **B:** Imagens de microscopia eletrônica dos grupos após ativação com NBT, onde podemos observar uma pequena ativação no grupo TFD (seta verde) e uma grande aglomeração entre as células.

A exposição a nanopartículas de ftalocianina também desencadeou ativação, porém, quando observamos a condição somente com exposição à luz, não foi detectada diferença estatística significativa em relação ao controle.

Segundo (AL-WATBAN; ANDRES, 2001,) a ativação dos neutrófilos pode se dar através da reação da luz com a nanoemulsão, os neutrófilos podem ser induzidos pela irradiação no espectro visível. Karu et al. em 1989 mencionou que a irradiação vermelha pode causar a ativação da NADPH oxidase e isso se dá porque a forma de semiquinonas podem absorver luz no comprimento de onda 632,8nm. Ou seja, a irradiação do laser pode acelerar o transporte de elétrons.

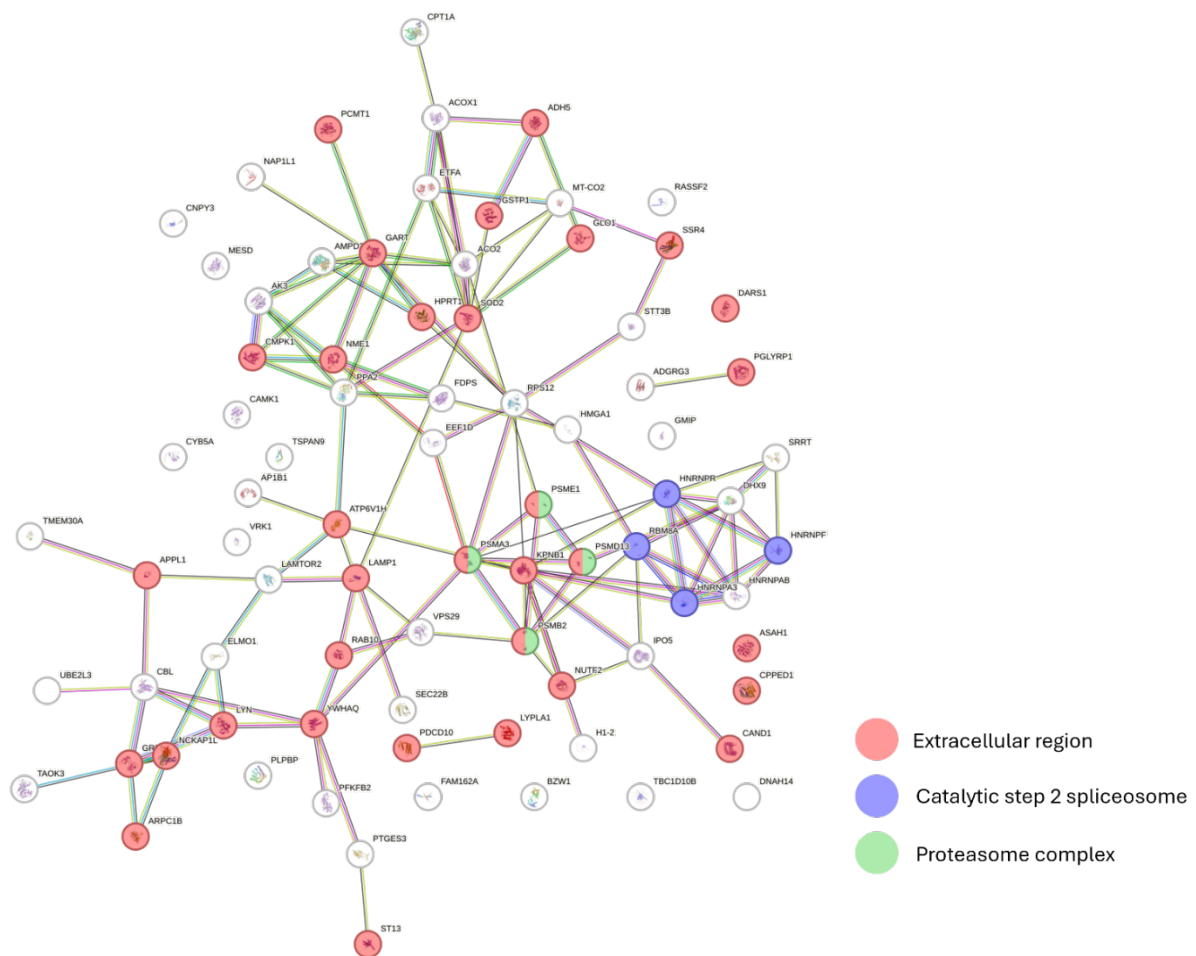


Figura 15 - Análise de enriquecimento de termos GO com base em rede de interações, feita no programa String. Os resultados revelaram o enriquecimento de três componentes celulares entre as 107 proteínas reguladas (ANOVA, $p \leq 0.05$). A maior parte das proteínas está associada à região extracelular e dois pequenos clusters revelam a presença de atividade relacionada ao spliceossomo e ao proteassoma.

Conforme ilustrado na (Figura 15), a análise de interações pelo String revelou que grande parte das proteínas está relacionada à região extracelular. Dentro desse conjunto de proteínas estão as proteínas **Glutamate receptor ionotropic (NMDA)** e

Tyrosine-protein kinase Lyn (LYN) que podem ser encontradas nos grânulos citoplasmáticos de neutrófilos, como reportado anteriormente (DEL ARROYO et al., 2019; PEREIRA; LOWELL, 2003). Esse enriquecimento sugere que funções como degranulação e exocitose foram reguladas. Tais funções são essenciais para a atividade efetora de neutrófilos e também fazem parte da ativação.

Adicionalmente, foram encontradas proteínas que são associadas com o spliceossomo e ao proteassoma, esses complexos são conhecidos por gerar o mRNA maduro e degradar proteínas, respectivamente. O proteassoma possui papel central na sobrevivência da célula, de modo que a sua inibição causa a morte celular de diversos tipos tumorais e por isso, tem sido alvo de diferentes estudos para desenvolvimento de tratamentos de câncer (ADAMS, 2003). Em neutrófilos, a inibição do proteassoma já foi descrito como responsável pela diminuição significativa da formação de NETs, que por sua vez preveniu a necrose de cardiomiócitos (PASHEVIN et al., 2015).

A presença de proteínas do spliceossomo pode indicar atividade transcricional nessas células. Neutrófilos e spliceossomos estão relacionados ao estudo de doenças autoimunes e também, há algumas evidências que mutações em genes de spliceossomo podem afetar neutrófilos (GURULE et al., 2023) de várias formas incluindo: neoplasia mielodisplásica (SMD), leucemia neutrofilica crônica e desregulação imunológica. Mutações em genes do spliceossomo podem causar desregulação imunológica e outros fenótipos devido ao splicing incorreto dos genes relacionados ao sistema imunitário (Gurule et al., 2023; H. Yang et al., 2022).

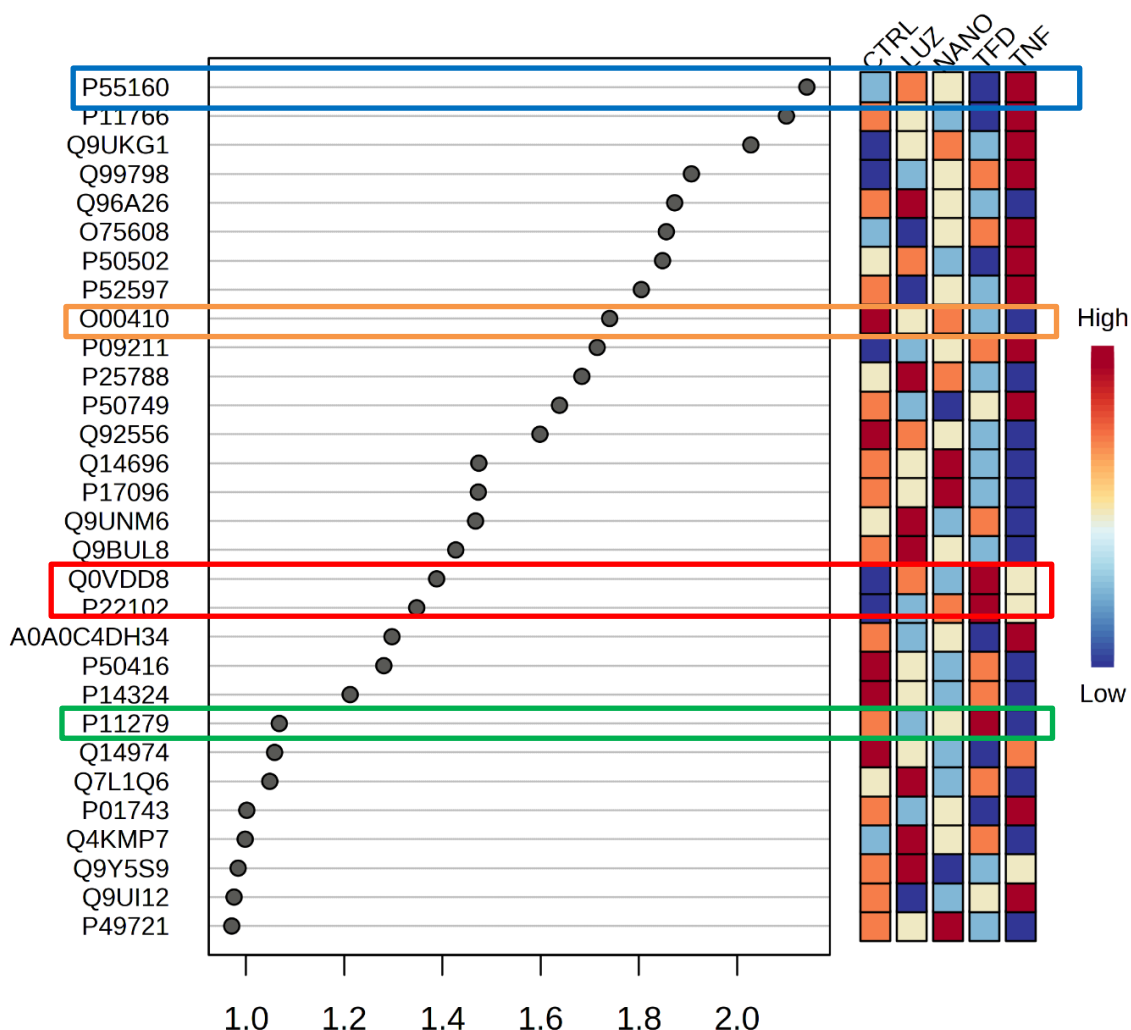


Figura 16 - Análise do Gráfico VIP score: Análise das proteínas que melhor discriminam as condições, com base na análise de PLS-DA que mostra as condições que tiveram mais abundância e que impactaram comparando as condições com o grupo controle, em destaque para as condições controle e TFD que tiveram maior impacto.

A partir da análise de VIP score (FIGURA 14) temos 4 proteínas em destaque, uma delas a Dynein axonemal heavy chain 14 (DNAH14) que está no quadro vermelho. Essa proteína está com maior abundância em TFD quando comparado ao controle. A DNAH14 é caracterizada por uma proteína que produz força nas extremidades negativas do microtúbulo, essa proteína está com diferença significativa de $p \leq 0,05$, como dito anteriormente,

Outra proteína de extrema importância nesse estudo foi Importin-5 (IPO5) – é uma proteína codificada pelo gene IPO5, essa proteína teve diferença significativa de abundância quando observado com TFD e controle. A

Importin 5 é uma proteína que tem como função na importação de proteína nuclear como receptor de transpote nuclear. Ela serve como receptor para sinais de localização nuclear em substrato de carga. está ligada ao processo imune, função e regulação molecular e na atividade catalítica.

Uma proteína que esta em destaque que chamou a atenção foi a LAMP1 (glicoproteína da membrana lisossomal) (marcado em verde), essa proteína apresenta abundancia significativamente diferente entre os grupos TFD e controle. A LAMP1 desempenha um papel primordial na biogênese do lisossomo, regulação do pH lisossomal autofagia e homeostase do colesterol (ZHANG et al., 2023). Também foi descrita com um papel importante na citotoxicidade das células natural killer (NK) e mecanicamente participa do movimento de grânulos citotóxicos para superfície celular e do tráfego de perforina, além disso protege as células NK de danos associados a desgranulação induzidos pelos grânulos citotóxicos (KRZEWSKI et al., 2013). No câncer, ela foi implicada no desenvolvimento e na progressão do tumor o que levanta a hipótese que TFD pode expressar essa proteína em neutrófilos (WANG et al., 2017).

Corroborando com o achado do STRING (Figura 14) uma proteína classificada como região extraceular, teve uma característica importante nesse estudo. A Nck-associated protein 1-like (NCKAP1L) em destaque na Figura 14 (linha azul), essa proteína é essencial para o citoesqueleto de actina (WEINER et al., 2007), ela que controla a ativação, proliferação e homeostase de linfócitos, estabilidade da membrana eritrocitária, fagocitose e migração de neutrófilos (COOK et al., 2020). Apesar que a diferença não seja tão significativa entre controle e TFD, a hipótese que a TFD ative os neutrófilos ainda prevalece mostrando que, não afeta tanto as células como outras terapias existentes e invasivas.

5.4 Avaliação da morte celular após exposição da TFD

Os neutrófilos são sensíveis a muitos regimes da quimioterapia, causando diminuição do número de neutrófilos (neutropenia). Como a neutropenia traz um risco perigosamente de infecções fatais (PARK et al., 2016), a terapia fotodinâmica, tem como objetivo ser menos invasiva do que as terapias já existentes para tratamento de câncer, o que nos levou a fazer avaliação dos mecanismos de morte celular, apoptose ou necrose, desencadeados por TFD ou seus componentes. No presente trabalho, os resultados de proteômica discutidos a seguir instigaram a investigação sobre o efeito

da TFD na viabilidade de neutrófilos por diferentes vias de morte celular. Uma das proteínas diferencialmente abundantes foi a Mitochondrial 2-oxoglutarate/malate carrier protein, essa proteína está envolvida em diversos processos metabólicos, incluindo regulação da apoptose, ela reduz a apoptose induzida por citotóxicos modulando o nível de glutatona nas mitocôndrias (GALLO et al., 2011)

Para investigar tais efeitos, a viabilidade celular foi avaliada por microscopia óptica com azul de tripan, e a diferenciação entre apoptose e necrose foi avaliada por microscopia de fluorescência na plataforma EVOS ao longo do tempo.

Foi observado à incubação das células com nanoemulsão de alumínio ftlocianina na presença de luz, de TFD completa e controle. Ao se avaliar os mecanismos de morte celular, observou-se que após a exposição da terapia fotodinâmica, as células apresentaram viabilidade de 62,3% e começaram a sofrer processo necrose e apoptose Figura 17, corroborando com achados anteriores que descrevem que, após o tratamento com TFD, células imunológicas sofrem apoptose e necrose (A. L. Muehlmann et al., 2015).

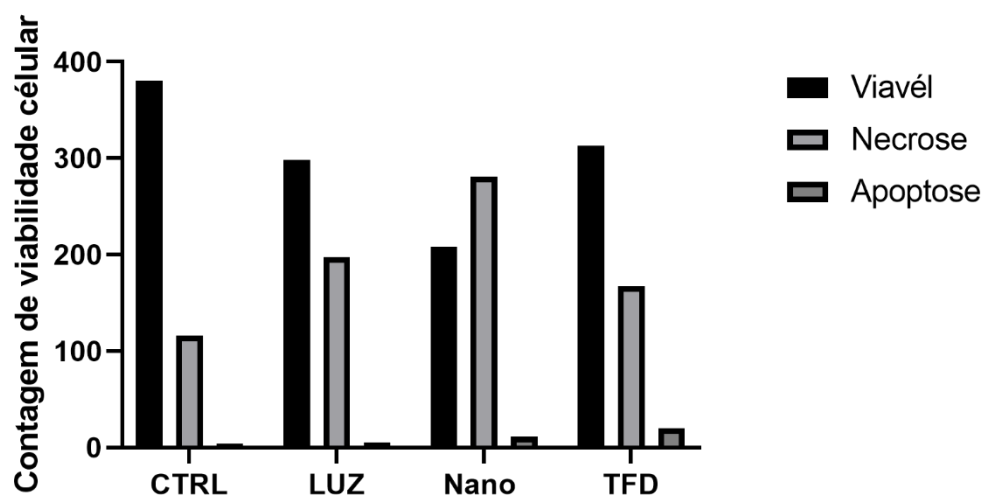


Figura 17 - Avaliação da morte celular.

A TFD pode desencadear predominantemente duas vias de morte celular em diversos tipos celulares como macrófagos, por exemplo: necrose e apoptose (KWIATKOWSKI et al., 2018). Em um estudo foi associada à morte por autofagia em células cancerígenas ou patogênicas. A TFD pode causar danos ao DNA celular levando a ativação de sinalizações que induzem a autofagia (SONG et al., 2020). Ainda assim, em neutrófilos não foi observada influência da TFD ou de seus componentes isolados na morte celular. Apenas uma proteína regulada foi detectada, sem consequências

funcionais aparentes. Assim, o presente estudo revelou que a TFD desencadeou a morte celular de necrose porém é necessário mais estudos para elucidar tal achado.

5.5 O efeito da terapia fotodinâmica na liberação de armadilha extracelulares dos PMNs (NETs)

A ativação dos neutrófilos também pode resultar na liberação de armadilhas extracelular compostas por moléculas de DNA e proteínas citoplasmáticas conhecidas como NETs (do inglês, *Neutrophil Extracellular Traps*). As NETs são agentes importantes para imunidade, contribuindo para fagocitose, contenção de patógenos e ativação da coagulação (CHEN et al., 2024), mas que também contituem para o neutrófilo, um tipo de morte celular, a NETose.

Para avaliar se a TFD seria capaz de desencadear outro tipo de morte celular, realizamos um teste funcional para liberação de NETs como descrito no tópico 4.9. Segundo Souto, 2011, após ativação os PMNs podem liberar redes formadas por ácidos nucleicos e enzimas que podem capturar microorganismos e também influenciam o microambiente tumoral (Souto et al., 2011). Recentemente, as NETs foram descritas como tendo um papel importante na inciação e proressão do câncer pois, são essenciais no desenvolvimento de nichos pré-metastáticos, despertar de metástase dormentes e podem promover diretamente o crescimento do tumor por proteases associadas (Brinkmann et al., 2004.; Fang et al., 2022).

As células cancerosas supostamente desencadeiam a formação de NETs e alteram o microambiente tumoral promovendo a proliferação de células tumorais e migração. Ainda não se sabe ao certo sobre como ocorre, em certos tumores, um MAT associado a células TCD4 induz NETs e exerce funções imunossupressoras via morte programada, ambos associados a um prognóstico mais desfavorável. Já em outros casos, as NETs induzem a proliferação de células Th1 associadas a um prognóstico melhorado do câncer. NETs também podem induzir a proliferação de macrófagos para promover a invasão e a metastáse das células cancerosas.

O ensaio realizado permite a visualização por fluorescência da localização de elastase e DNA em redes extracelulares. Tais redes foram observados tanto no grupo TFD quanto no grupo Nano sendo que no grupo Nano pode-se se observar somente o início da formação de NETs na Figura 15. Segundo (DEMKOW, 2021a) , as NETs

estão envolvidas em alguns tipos de tumor, o que sugere a perspectiva de se avaliar se essas armadilhas seriam cruciais para um possível tratamento de tumores. Na figura 18 podemos observar em verde as células marcadas com sytox mostrando a integridade das células tanto no grupo A (controle), B (luz), C (Nano). No grupo D podemos observar as células em verde diminuídas e a coloração azul mostrado por anti-elastase, o DNA das células ou seja, a célula estava em processo de NETs.

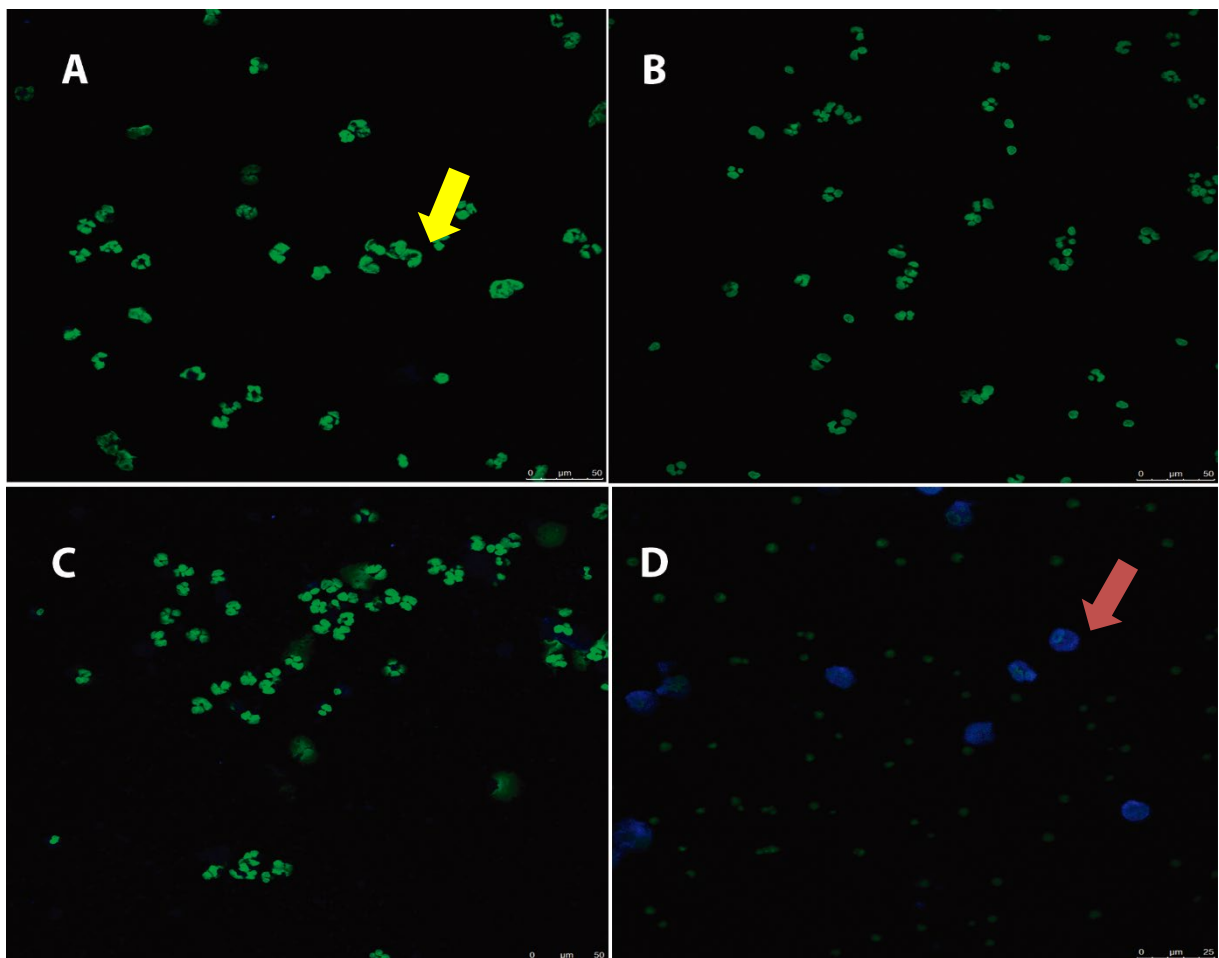


Figura 18 - Microscopia de Fluorescência de NETs: Neutrófilos dos quatro grupos experimentais incubados com Sytox (verde) e um marcador específico anti-elastase neutrofílica (azul) e observados em microscópio de fluorescência para avaliação da formação de NETs. A: grupo controle após 3h de incubação; B grupo Luz onde pode se observar a integridade das células, sem diferenças relevantes em relação ao controle; C: grupo de nanoemulsão de ftalocianina, observa-se discreta marcação com NE (coloração azul) marcando o DNA fora da célula (seta vermelha); D: no grupo TFD, podemos observar células maiores e com a presença de DNA extracelular.

5.6 Migração

No presente estudo, como o objetivo era avaliar os efeitos da nanoemulsão e da terapia fotodinâmica sobre a capacidade migratória dos PMNs. Para isso foi realizado um teste com o auxílio do RTCA (*Real Time Cell Analyzer*) que analisa a capacidade de migração dos neutrófilos entre dois compartimentos. Apesar do N triplicata não ter sido suficiente devido à elevada variabilidade biológica entre doadores, esse resultado preliminar sugere que a nanopartícula de ftalocianina não é quimiotático. A exposição de neutrófilos à TFD completa e aos seus componentes (nano e luz) parece interferir na sua quimiotaxia em direção ao fMLP, reduzindo a quimiotaxia.

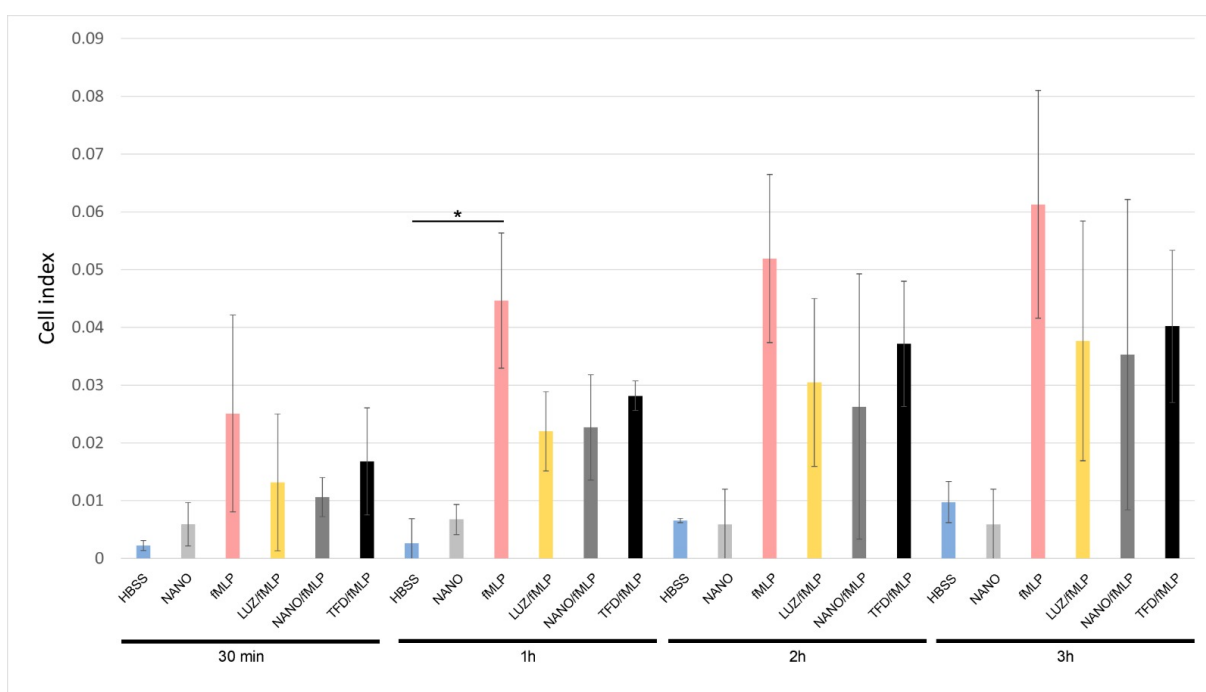


Figura 19 - Avaliação de migração comparando entre os grupos e se nanoemulsão de ftlocianina é quimiotático.

5.7 Os efeitos da Terapia fotodinâmica nos processos de fagocitose e exocitose

Uma análise na Figura 13 observando o String e pelo gráfico VIPscore (Figura 14) mostraram uma proteína extracelular sugere que a **Proteína de membrana associada ao lisosomo 1 (LAMP1)** apresenta alto poder discriminante para diferenciar os grupos controle e TFD. A proteína LAMP1 está envovida em diversos

processos celulares como degradação de proteínas por autofagia, modulação de resposta imune, migração e adesão celular. Porém, originalmente ela é conhecida por seu papel de transporte e estabilidade dos lisossomos. Como já mencionado, é sabido que os neutrófilos são de grande importância na eliminação de microorganismos invasores e no reconhecimento de corpos estranhos e a morte desses patógenos é dependente da secreção de grânulos e da formação de fagolisossomos. Durante a fagocitose a LAMP1 participa da maturação do fagossomo. Os grânulos citoplasmáticos de neutrófilos armazenam componentes bactericidas e receptores de superfície. A função antibacteriana dos neutrófilos depende de diferentes organelas para a formação do fagolisossomo pela fusão das vesículas fagocíticas.

Como queríamos avaliar se a função dos PMNs eram afetadas após a exposição a TFD, foi necessário avaliar a função fagocítica dos mesmos (Figura 17). Lâminas contendo neutrófilos provenientes de todas as condições experimentais foram incubadas com leveduras, o que permitiu avaliar que comparados com o grupo controle, os neutrófilos que receberam luz, ftalocianina ou TFD tiveram uma redução mínima aparente, porém não significativa, na função de fagocitar as leveduras.

Segundo (Muehlmann, A.L. 2011) as células neoplásicas captam maior quantidade de AIFtCI-NP comparando com células não neoplásicas. Células neoplásicas incorporam de 45 % em relação as não neoplásicas, ou seja, uma das hipóteses que a NP não afetou os neutrófilos, levando a hipótese que,

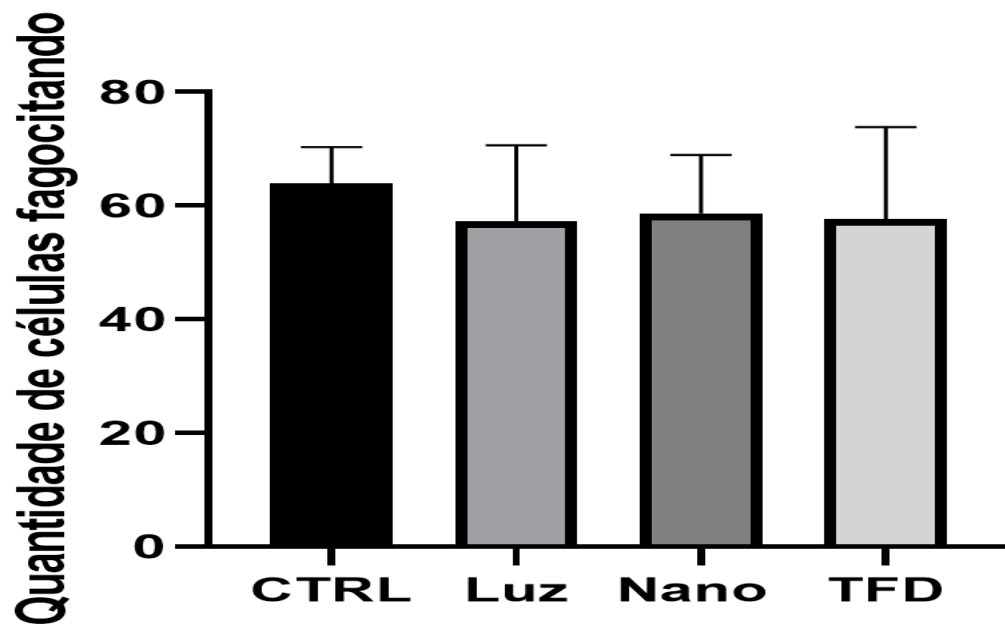


Figura 20 - Capacidade fagocítica do neutrófilo: Número de neutrófilos fagocitando *Saccharomyces cerevisiae*. Neutrófilos na concentração de 6600 células/uL incubados 5uL de suspensão com *S. Cerevisiae* na concentração de 3300 leveduras/uL. Após a incubação por 40 min, as lâminas foram coradas com panóptico e contadas 100 células aleatoriamente, observando-se se continham leveduras em seu interior, e quantas leveduras.

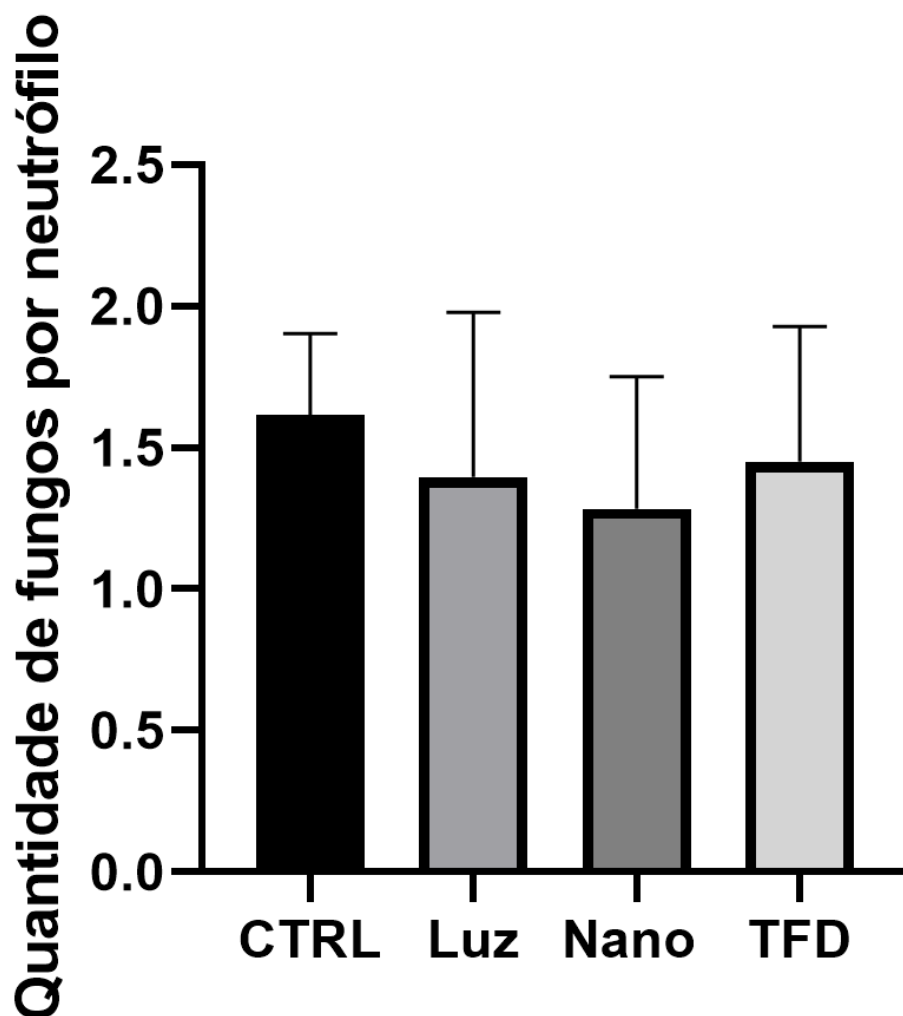


Figura 21 - Fagocitose: Fungos por neutrófilo : Gráfico que demonstra a quantidade de fungos encontrados dentro dos neutrófilos após os tratamentos indicados. Nesse gráfico podemos observar que não teve diferença entre os grupos. Classificando assim que a terapia fotodinâmica não altera a capacidade de fagocitar os fungos.

Após a análise de contagem das lâminas, podemos observar que apesar que teve alguma alteração na atividade fagocítica dos neutrófilos após TFD, o teste ANOVA demonstrou que não teve diferença significativa entre os grupos.

6 CONCLUSÃO

A Terapia fotodinâmica é considerada uma terapia promissora e menos invasiva para tratamento do câncer, sendo atualmente aplicada no tratamento de câncer de pele como carcinomas. Apresenta potencial para aplicação em outros tipos de câncer, como de mama, de útero, ainda necessitando mais estudos. Sua aplicação pode influenciar a imunidade inata, possivelmente favorecendo o combate aos tecidos tumorais.

Apesar de constatações anteriores de que a TFD afeta mais intensamente as células cancerosas, o presente estudo mostrou que a TFD afeta significativamente o perfil proteico de PMNs, sugerindo influência em migração, fagocitose e em ativação. Dentre as funções dos polimorfonucleares, o aumento da produção de EROs foi confirmado, sendo a nanoemulsão de alumínio ftalocianina a provável responsável por esta resposta das células. A liberação de NETs também foi induzida por TFD XXX. A fagocitose e a morte celular não foram afetadas pela TFD nem seus componentes (ftalocianina e luz) e a migração sendo necessário ainda mais estudos para esclarecimentos.

A TFD oferece vantagens no tratamento de câncer sendo menos invasivas, focalizadas e precisa e ser imunogênica porém ainda é necessário mais conhecimento e mais estudos pois tem algumas limitações como por exemplo tipos de tumores, profundidade de penetração da luz, qual nanoemulsão é ideal além do acesso para os pacientes.

Dado que o papel dos neutrófilos no sistema imunitário e em diversas patologias, inclusive no câncer, adquirir informações sobre a influência da TFD nessas células é indispensável. Assim, há necessidade de aumentar a especificidade das NP.

O estudo apresentou limitações em relação as outras funcionalidades dos PMNs, e se

7 PERSPECTIVAS

Como encontramos alguns achados que sugerissem que o neutrófilo pode estar fagocitando a nanoemulsão e que os neutrófilos podem ser ativados pela TFD. Para desenvolvimento de trabalhos futuros, o presente estudo propõe:

1. Realizar ensaios de microscopia com incubação de neutrófilos com células tumorais, avaliando o efeito tanto no neutrófilo quanto na célula tumoral;
2. Avaliar o efeito da TFD nas subpopulações de neutrófilos pró e anti tumoral;
3. Realizar ensaio de NETs com mais tempo de incubação;
4. Verificar se os neutrófilos fagocitam a nanoemulsão de Alumínio ftalocianina
5. Realizar ensaios funcionais para avaliar vias de migração e fagocitose que foi demonstrada na proteômica
6. Comparar a cinética de fagocitose por videomicroscopia
7. Teste de migração mais detalhado
8. Confirmar os resultados de NBT por citometria para verificar a cinética da ativação dos neutrófilos

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, J. **The proteasome: Structure, function, and role in the cell.** *Cancer Treatment Reviews* W.B. Saunders Ltd, , 2003.
- ADROVER, J. M. et al. Programmed 'disarming' of the neutrophil proteome reduces the magnitude of inflammation. *Nature Immunology*, v. 21, n. 2, p. 135–144, 1 fev. 2020.
- AGGARWAL, B. B.; VIJAYALEKSHMI, R. V.; SUNG, B. **Targeting inflammatory pathways for prevention and therapy of cancer: Short-term friend, long-term foe.** *Clinical Cancer Research*, 15 jan. 2009.
- ALUSHIN, G. M. et al. High-Resolution microtubule structures reveal the structural transitions in $\alpha\beta$ -tubulin upon GTP hydrolysis. *Cell*, v. 157, n. 5, p. 1117–1129, 22 maio 2014.
- AL-WATBAN, F. A. H.; ANDRES, B. L. **The Effect of He-Ne Laser (632.8 nm) and Solcoseryl Y In vitro** *Lasers Med Sci.* [s.l: s.n.].
- AMULIC, B. et al. **Neutrophil function: From mechanisms to disease.** *Annual Review of Immunology*, abr. 2012.
- ARNETH, B. **Tumor microenvironment.** *Medicina (Lithuania)* MDPI AG, , 1 jan. 2020.
- BARLETTA, K. E.; LEY, K.; MEHRAD, B. Regulation of neutrophil function by adenosine. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, v. 32, n. 4, p. 856–864, abr. 2012.
- BORREGAARD, N. **Neutrophils, from Marrow to Microbes.** *Immunity*, 24 nov. 2010.
- BRINKMANN, V. et al. **Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria.** [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.sciencemag.org>.
- BURN, G. L. et al. **The Neutrophil.** *Immunity* Cell Press, , 13 jul. 2021.
- CANO, P. M.; VARGAS, A.; LAVOIE, J. P. A real-time assay for neutrophil Chemotaxis. *BioTechniques*, v. 60, n. 5, p. 245–251, 1 maio 2016.
- CASTANHEIRA, F. V. S.; KUBES, P. **Neutrophils and NETs in modulating acute and chronic inflammation.** *Blood* American Society of Hematology, , 16 maio 2019.
- CASTANO, A. P.; DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. **Mechanisms in photodynamic therapy: Part one - Photosensitizers, photochemistry and cellular localization.** *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* Elsevier, , 2004.
- CECIC, I. et al. Induction of Systemic Neutrophil Response in Mice by Photodynamic Therapy of Solid Tumors. *Photochemistry and Photobiology*, v. 74, n. 5, p. 712–720, 2001.
- CHATURVEDI, V. K. et al. Cancer Nanotechnology: A New Revolution for Cancer Diagnosis and Therapy. *Current Drug Metabolism*, v. 20, n. 6, p. 416–429, 26 set. 2018.
- CHEN, S. et al. HP promotes neutrophil inflammatory activation by regulating PFKFB2 in the glycolytic metabolism of sepsis. *PLoS ONE*, v. 19, n. 1 January, 1 jan. 2024.
- COFFELT, S. B.; WELLENSTEIN, M. D.; DE VISSER, K. E. **Neutrophils in cancer: Neutral no more.** *Nature Reviews Cancer* Nature Publishing Group, , 24 jun. 2016.
- COOK, S. A. et al. HEM1 deficiency disrupts mTORC2 and F-actin control in inherited immunodysregulatory disease. *Science*, v. 369, n. 6500, p. 202–207, 10 jul. 2020.

COOLS-LARTIGUE, J. et al. Neutrophil extracellular traps sequester circulating tumor cells and promote metastasis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 123, n. 8, p. 3446–3458, 1 ago. 2013.

CRAWFORD, J.; DALE, D. C.; LYMAN, G. H. **Chemotherapy-Induced Neutropenia: Risks, Consequences, and New Directions for Its Management**. **Cancer**, 15 jan. 2004.

DE CIÊNCIAS, F.; SAÚDE, D. A. **UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**. [s.l: s.n.].

DEL ARROYO, A. G. et al. NMDA receptor modulation of glutamate release in activated neutrophils. **EBioMedicine**, v. 47, p. 457–469, 1 set. 2019.

DEMERS, M. et al. Cancers predispose neutrophils to release extracellular DNA traps that contribute to cancer-associated thrombosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 32, p. 13076–13081, 7 ago. 2012.

DEMERS, M.; WAGNER, D. D. **Neutrophil extracellular traps: A new link to cancer-associated thrombosis and potential implications for tumor progression**. **Oncolmunology**, fev. 2013.

DEMKOW, U. **Neutrophil extracellular traps (NETs) in cancer invasion, evasion and metastasis**. **CancersMDPI**, , 1 set. 2021a.

DEMKOW, U. **Neutrophil extracellular traps (NETs) in cancer invasion, evasion and metastasis**. **CancersMDPI**, , 1 set. 2021b.

DE SIQUEIRA, M. B. P. et al. Enhanced neutrophil phagocytic capacity in rheumatoid arthritis related to the autoantibodies rheumatoid factor and anti-cyclic citrullinated peptides. **BMC Musculoskeletal Disorders**, v. 16, n. 1, 30 jun. 2015.

DINAUER, M. C. **Primary immune deficiencies with defects in neutrophil function**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://ashpublications.org/hematology/article-pdf/2016/1/43/1252169/hem088412.pdf>>.

DONG, X.; CHU, D.; WANG, Z. **Leukocyte-mediated delivery of nanotherapeutics in inflammatory and tumor sites**. **Theranostics**Ivyspring International Publisher, , 2017.

DONG, X.; CHU, D.; WANG, Z. Neutrophil-mediated delivery of nanotherapeutics across blood vessel barrier. **Therapeutic Delivery**, v. 9, n. 1, p. 29–35, 1 jan. 2018.

DUMONTET, C.; JORDAN, M. A. **Microtubule-binding agents: A dynamic field of cancer therapeutics**. **Nature Reviews Drug Discovery**Nature Publishing Group, , 2010.

ELLETT, F. et al. Diagnosis of sepsis from a drop of blood by measurement of spontaneous neutrophil motility in a microfluidic assay. **Nature Biomedical Engineering**, v. 2, n. 4, p. 207–214, 1 abr. 2018.

ETER, P.; ELVES, J. D.; OITT, V. M. R. **T H E I M M U N E S Y S T E M First of Two Parts**. [s.l: s.n.].

fagocitose2. [s.d.].

FANG, Q. et al. **No NETs no TIME: Crosstalk between neutrophil extracellular traps and the tumor immune microenvironment**. **Frontiers in Immunology**Frontiers Media S.A., , 23 dez. 2022.

GALDIERO, M. R.; MARONE, G.; MANTOVANI, A. Cancer inflammation and cytokines. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 10, n. 8, 1 ago. 2018.

GALLO, M. et al. MISC-1/OGC links mitochondrial metabolism, apoptosis and insulin secretion. **PLoS ONE**, v. 6, n. 3, 2011.

GARCIN, C.; STRAUBE, A. **Microtubules in cell migration**. **Essays in Biochemistry**Portland Press Ltd, , 2019.

GÖRG, A. 2-D electrophoresis: Principles and Methods. **GE Healthcare Handbook**. p. 27–32, 2004.

GØTZSCHE, P. C. **On the benefits and harms of screening for breast cancer**. **International Journal of**

Epidemiology, fev. 2004.

GURULE, N. J. et al. Myelodysplastic neoplasm-associated U2AF1 mutations induce host defense defects by compromising neutrophil chemotaxis. **Leukemia**, v. 37, n. 10, p. 2115–2124, 1 out. 2023.

HANAHAN, D.; COUSSENS, L. M. **Accessories to the Crime: Functions of Cells Recruited to the Tumor Microenvironment. Cancer Cell**Cell Press, , 20 mar. 2012a.

HANAHAN, D.; COUSSENS, L. M. **Accessories to the Crime: Functions of Cells Recruited to the Tumor Microenvironment. Cancer Cell**Cell Press, , 20 mar. 2012b.

HELLEBREKERS, P. et al. Neutrophil functional heterogeneity: Identification of competitive phagocytosis. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. NOV, 9 nov. 2017.

HIDALGO, A. et al. **The Neutrophil Life Cycle. Trends in Immunology**Elsevier Ltd, , 1 jul. 2019.

HODIS, E. et al. Stepwise-edited, human melanoma models reveal mutations' effect on tumor and microenvironment. **Science**, v. 376, n. 6592, 29 abr. 2022.

HUANG, X. et al. **Neutrophils in Cancer immunotherapy: friends or foes? Molecular Cancer**BioMed Central Ltd, , 1 dez. 2024.

KARU, T. I. et al. **Helium-Neon Laser-Induced Respiratory Burst of Phagocytic Cells**Lasers in Surgery and Medicine. [s.l: s.n.].

KARU, T. I. et al. **Helium-Neon Laser-Induced Respiratory Burst of Phagocytic Cells**Lasers in Surgery and Medicine. [s.l: s.n.].

KOBAYASHI, Y. **The role of chemokines in neutrophil biology**Frontiers in Bioscience. [s.l: s.n.].

KOLACZKOWSKA, E. et al. Molecular mechanisms of NET formation and degradation revealed by intravital imaging in the liver vasculature. **Nature Communications**, v. 6, 2015.

KOLACZKOWSKA, E.; KUBES, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. **Nature reviews. Immunology**, v. 13, n. 3, p. 159–75, 2013a.

KOLACZKOWSKA, E.; KUBES, P. **Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. Nature Reviews Immunology**, mar. 2013b.

KRZEWSKI, K. et al. LAMP1/CD107a is required for efficient perforin delivery to lytic granules and NK-cell cytotoxicity. [s.d.].

KUMAR, S.; DIKSHIT, M. **Metabolic Insight of Neutrophils in Health and Disease. Frontiers in Immunology**Frontiers Media S.A., , 20 set. 2019.

KWIATKOWSKI, S. et al. **Photodynamic therapy – mechanisms, photosensitizers and combinations. Biomedicine and Pharmacotherapy**Elsevier Masson SAS, , 1 out. 2018.

LAUTERBACH, M. et al. Role of TNF priming and adhesion molecules in neutrophil recruitment to intravascular immune complexes. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 83, n. 6, p. 1423–1430, 19 mar. 2008.

LAWRENCE, T.; WILLOUGHBY, D. A.; GILROY, D. W. **Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. Nature Reviews Immunology**, out. 2002.

LEE, J. et al. Dual role of inflammatory stimuli in activation-induced cell death of mouse microglial cells: Initiation of two separate apoptotic pathways via induction of interferon regulatory factor-1 and caspase-11. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 35, p. 32956–32965, 31 ago. 2001.

LIU, C. Y.; CHEN, K. F.; CHEN, P. J. Treatment of liver cancer. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 5, n. 9, 1 set. 2015.

LOGAN, C. M.; MENKO, A. S. **Microtubules: Evolving roles and critical cellular interactions**. **Experimental Biology and Medicine** SAGE Publications Inc., , 1 nov. 2019.

LOIBL, S. et al. **Breast cancer**. **The Lancet** Elsevier B.V., , 8 maio 2021.

MANTOVANI, A. et al. **Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity**. **Nature Reviews Immunology**, ago. 2011.

MARCUS, K.; EISENACHER, M.; SITEK, B. **Quantitative Methods in Proteomics Second Edition Methods in Molecular Biology 2228**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.springer.com/series/7651>>.

MARMOT, M. G. et al. The benefits and harms of breast cancer screening: An independent review. **British Journal of Cancer**, v. 108, n. 11, p. 2205–2240, 11 jun. 2013.

MICHAEL, M.; PARSONS, M. **New perspectives on integrin-dependent adhesions**. **Current Opinion in Cell Biology** Elsevier Ltd, , 1 abr. 2020.

MOSLEH-SHIRAZI, S. et al. **Nanotechnology Advances in the Detection and Treatment of Cancer: An Overview**. **Nanotheranostics** Ivyspring International Publisher, , 2022.

MUEHLMANN, A. L. et al. 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**, 2015a.

MUEHLMANN, A. L. et al. 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, n. 1, 13 maio 2015b.

MUEHLMANN, L. A. et al. **Liposomal photosensitizers: Potential platforms for anticancer photodynamic therapy**. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** Associacao Brasileira de Divulgacao Cientifica, , 2011.

NAGEL, J. E. et al. Age differences in phagocytosis by polymorphonuclear leukocytes measure by flow cytometry. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 39, n. 4, p. 399–407, 1986.

NARDIN, C. et al. Connexin hemichannel activation by s-nitrosoglutathione synergizes strongly with photodynamic therapy potentiating anti-tumor bystander killing. **Cancers**, v. 13, n. 20, 1 out. 2021.

NEVES, A. C. D. **Análise proteômica comparativa entre neutrófilos quiescentes e neutrófilos ativo por n-formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP)**. [s.l: s.n.].

NEWBURGER, P. E. **Autoimmune and other acquired neutropenias This educational review addresses the diagnostic evaluation of patients for autoimmune and other forms of**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://ashpublications.org/hematology/article-pdf/2016/1/38/1251347/hem088411.pdf>>.

PANG, Z. et al. MetaboAnalyst 5.0: Narrowing the gap between raw spectra and functional insights. **Nucleic Acids Research**, v. 49, n. W1, p. W388–W396, 2 jul. 2021.

PARK, J. et al. Cancer cells induce metastasis-supporting neutrophil extracellular DNA traps. **Science Translational Medicine**, v. 8, n. 361, 19 out. 2016.

PASHEVIN, D. O. et al. Proteasome inhibition diminishes the formation of neutrophil extracellular traps and prevents the death of cardiomyocytes in coculture with activated neutrophils during anoxia-reoxygenation. **Pathobiology**, v. 82, n. 6, p. 290–298, 1 nov. 2015.

PEGAZ, B. et al. Effect of nanoparticle size on the extravasation and the photothrombic activity of meso(p-tetracarboxyphenyl)porphyrin. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 85, n. 3, p. 216–222, 1 dez. 2006.

PEREIRA, S.; LOWELL, C. The Lyn Tyrosine Kinase Negatively Regulates Neutrophil Integrin Signaling. **The Journal of Immunology**, v. 171, n. 3, p. 1319–1327, 1 ago. 2003.

PRUCHNIAK, M. P.; DEMKOW, U. Potent NETosis inducers do not show synergistic effects in vitro. **Central European Journal of Immunology**, v. 44, n. 1, p. 51–58, 2019.

RAPPSILBER, J.; MANN, M.; ISHIHAMA, Y. Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips. **Nature Protocols**, v. 2, n. 8, p. 1896–1906, ago. 2007.

RILEY, R. S. et al. **Delivery technologies for cancer immunotherapy**. **Nature Reviews Drug Discovery** Nature Publishing Group, , 1 mar. 2019.

RODRÍGUEZ-UBREVA, J.; GARCIA-GOMEZ, A.; BALLESTAR, E. **Epigenetic mechanisms of myeloid differentiation in the tumor microenvironment**. **Current Opinion in Pharmacology** Elsevier Ltd, , 1 ago. 2017.

SCHUITMAKER, J. J.; DE KOSTER, B. M.; ELFERINK, J. G. R. The Effects of Photodynamic Therapy on Human Neutrophil Migration Using Bacteriochlorin a. **Photochemistry and Photobiology**, v. 68, n. 6, p. 841–845, 1998.

SCHWÄMMLE, V.; JENSEN, O. N. VSClust: Feature-based variance-sensitive clustering of omics data. **Bioinformatics**, v. 34, n. 17, p. 2965–2972, 1 set. 2018.

SHAUL, M. E.; FRIDLENDER, Z. G. **Tumour-associated neutrophils in patients with cancer**. **Nature Reviews Clinical Oncology** Nature Publishing Group, , 1 out. 2019.

SHITARA, K. et al. Nivolumab plus chemotherapy or ipilimumab in gastro-oesophageal cancer. **Nature**, v. 603, n. 7903, p. 942–948, 31 mar. 2022.

SKOKOWA, J. et al. Severe congenital neutropenias. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, 8 jun. 2017.

SONG, C. et al. Photodynamic therapy induces autophagy-mediated cell death in human colorectal cancer cells via activation of the ROS/JNK signaling pathway. **Cell Death and Disease**, v. 11, n. 10, 1 out. 2020.

SOUTO, F. O. et al. Essential role of CCR2 in neutrophil tissue infiltration and multiple organ dysfunction in sepsis. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 183, n. 2, p. 234–242, 15 jan. 2011.

SOUZA LUZ, I. et al. A Set of Screening Techniques for a Quick Overview of the Neutrophil Function. **Journal of Visualized Experiments**, v. 2024, n. 204, 1 fev. 2024.

SPIEGEL, A. et al. Neutrophils suppress intraluminal NK cell-mediated tumor cell clearance and enhance extravasation of disseminated carcinoma cells. **Cancer Discovery**, v. 6, n. 6, p. 630–649, 1 dez. 2016.

SPILL, F. et al. **Impact of the physical microenvironment on tumor progression and metastasis**. **Current Opinion in Biotechnology** Elsevier Ltd, , 1 ago. 2016.

SVITKINA, T. The actin cytoskeleton and actin-based motility. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 10, n. 1, 1 jan. 2018.

SZKLARCZYK, D. et al. The STRING database in 2017: Quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. D1, p. D362–D368, 2017.

TAKAHASHI, T. ET AL. Activation of Human Neutrophil by Cytokine-Activated Endothelial Cells. **Circulation Research**. p. 88:422-429, 2001.

TCHORZEWSKI, H. et al. The effect of tumour necrosis factor-alpha (TNF- alpha) muteins on human neutrophils in vitro. **Mediators of Inflammation**, v. 2, p. 41–48, 1993.

TOHME, S. et al. Neutrophil extracellular traps promote the development and progression of liver metastases after surgical stress. **Cancer Research**, v. 76, n. 6, p. 1367–1380, 15 mar. 2016.

TREVISAN, E. et al. Effect of methylene blue photodynamic therapy on human neutrophil functional responses. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 199, 1 out. 2019.

USLAN, R. et al. **Review Articles Advances in Immunology I NNATE I MMUNITY**. [s.l.: s.n.].

VAINSTEIN, V. et al. The complex effect of granulocyte colony-stimulating factor on human granulopoiesis analyzed by a new physiologically-based mathematical model. **Journal of Theoretical Biology**, v. 234, n. 3, p. 311–327, 7 jun. 2005.

WANG, J. **Neutrophils in tissue injury and repair**. **Cell and Tissue Research** Springer Verlag, , 1 mar. 2018.

WANG, Q. et al. LAMP1 expression is associated with poor prognosis in breast cancer. **Oncology Letters**, v. 14, n. 4, p. 4729–4735, 2017.

WEINER, O. D. et al. An actin-based wave generator organizes cell motility. **PLoS Biology**, v. 5, n. 9, p. 2053–2063, set. 2007.

WEI, R. et al. **Cellular and Extracellular Components in Tumor Microenvironment and Their Application in Early Diagnosis of Cancers**. **Analytical Cellular Pathology** Hindawi Limited, , 2020.

WOLF, K.; FRIEDL, P. **Extracellular matrix determinants of proteolytic and non-proteolytic cell migration**. **Trends in Cell Biology**, dez. 2011.

WU, M. et al. **Neutrophil: A New Player in Metastatic Cancers**. **Frontiers in Immunology** Frontiers Media S.A., , 24 set. 2020.

XIJIN GE, S.; JUNG, D.; YAO, R. ShinyGO: a graphical gene-set enrichment tool for animals and plants. [s.d.].

XIJIN GE, S.; JUNG, D.; YAO, R. ShinyGO: a graphical gene-set enrichment tool for animals and plants. [s.d.].

XIONG, S.; DONG, L.; CHENG, L. **Neutrophils in cancer carcinogenesis and metastasis**. **Journal of Hematology and Oncology** BioMed Central Ltd, , 1 dez. 2021.

XU, J. et al. **Neutrophil microtubules suppress polarity and enhance directional migration**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0502106102>.

YADAV, S. K. et al. Chemokine-triggered microtubule polymerization promotes neutrophil chemotaxis and invasion but not transendothelial migration. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 105, n. 4, p. 755–766, 1 abr. 2019.

YANG, D.; LIU, J. **Neutrophil Extracellular Traps: A New Player in Cancer Metastasis and Therapeutic Target**. **Journal of Experimental and Clinical Cancer Research** BioMed Central Ltd, , 1 dez. 2021.

YANG, H.; BEUTLER, B.; ZHANG, D. **Emerging roles of spliceosome in cancer and immunity**. **Protein and Cell** Higher Education Press Limited Company, , 1 ago. 2022.

YANG, X. et al. Identification of PFKFB2 as a key gene for the transition from acute to old myocardial infarction in peripheral blood. **Frontiers in Cardiovascular Medicine**, v. 9, 6 dez. 2022.

ZHANG, J. et al. PEAKS DB: De novo sequencing assisted database search for sensitive and accurate peptide identification. **Molecular and Cellular Proteomics**, v. 11, n. 4, abr. 2012.

ZHANG, J. et al. Lysosomal LAMP proteins regulate lysosomal pH by direct inhibition of the TMEM175 channel. **Molecular Cell**, v. 83, n. 14, p. 2524–2539.e7, 20 jul. 2023.

ZHANG, T.; YU-JING, L.; MA, T. **The immunomodulatory function of adenosine in sepsis**. **Frontiers in Immunology** Frontiers Media S.A., , 25 jul. 2022.

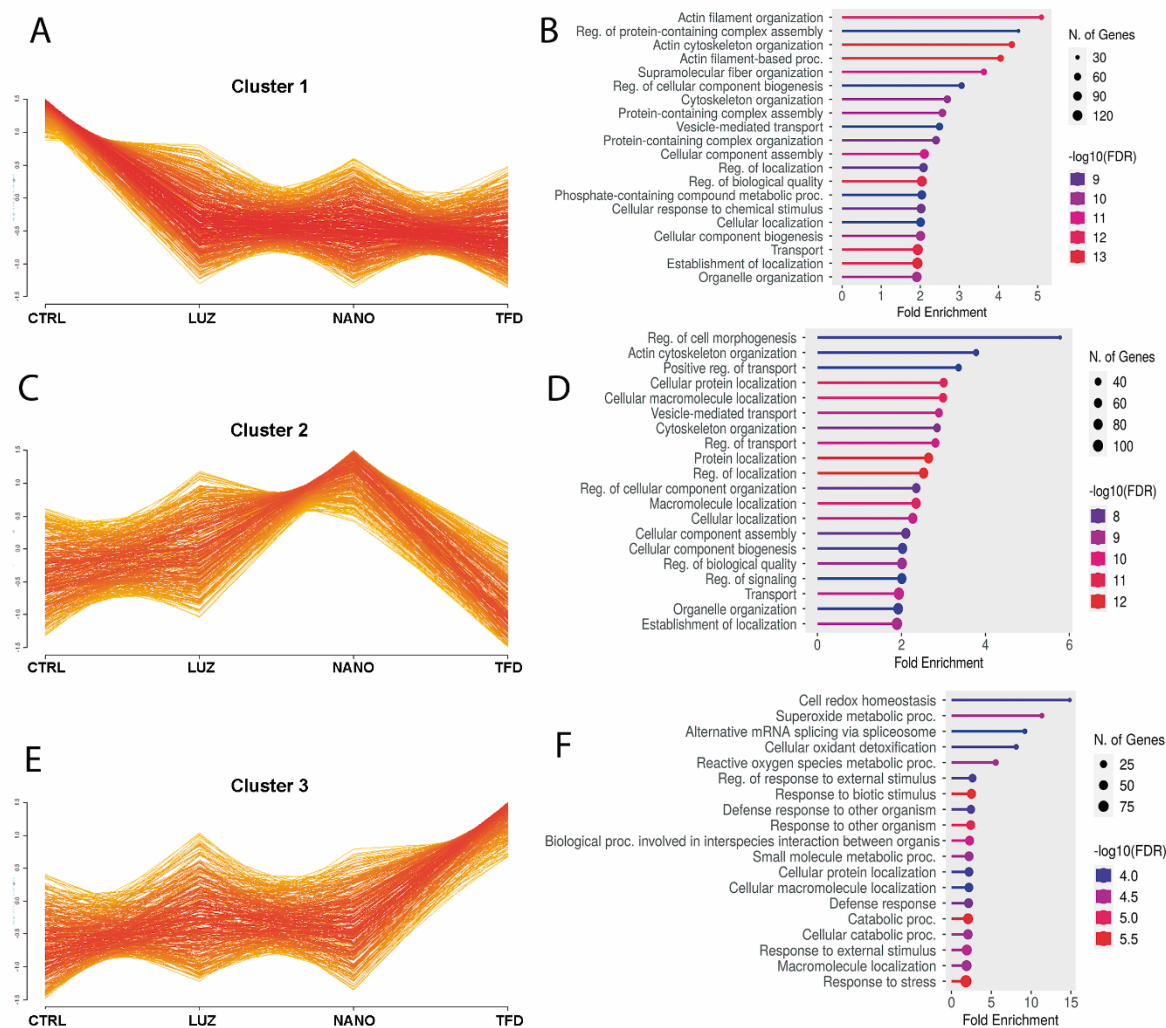
ZHAN, X. et al. Adenosine monophosphate deaminase 3 null mutation causes reduction of naive T cells in mouse peripheral blood. **Blood Advances**, v. 4, n. 15, p. 3594–3605, 11 ago. 2020.

ZHAO, J.; JIN, J. **Neutrophil extracellular traps: New players in cancer research**. **Frontiers in Immunology** Frontiers Media S.A., , 19 ago. 2022.

ZHONG, J.; SHI, G. **Editorial: Regulation of inflammation in chronic disease**. **Frontiers in Immunology** Frontiers Media S.A., , 2019.

ZHU, X. et al. Enhanced Photodynamic Therapy Synergizing with Inhibition of Tumor Neutrophil Ferroptosis Boosts Anti-PD-1 Therapy of Gastric Cancer. **Advanced Science**, v. 11, n. 12, 27 mar. 2024.

ANEXO 1



Anexo 1: Nessa imagem Cluster 1 onde se pode observar proteínas com perfil de abundância tendendo a uma menor abundância em qualquer das condições testadas em relação ao controle. Sugere proteínas cuja abundância seja reduzida por qualquer um dos tratamentos; C: cluster 2 o que aumento progressivo de abundância pelos tratamentos de luz e nanopartículas, porém não com TFD completa. Pode indicar a diferença do efeito de TFD em relação a seus componentes isolados; E: cluster 3 mostra conjunto de proteínas com possível aumento de abundância na condição TFD, comparadas a quaisquer outras condições; B, D, F: Processos biológicos enriquecidos referentes às proteínas significativamente reguladas e que sejam membros dos clusters 1, 2 e 3, respectivamente;.

ANEXO 2

Código Uniprot	Anova (p-valor)	Descrição
P5052	0.000135	Hsc70-interacting protein
Q01433	0.000303	AMP deaminase 2
Q8TCJ2	0.000307	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit STT3B
Q9H2K8	0.000479	Serine/threonine-protein kinase TAO3
Q9Y2Q5	0.001391	Ragulator complex protein LAMTOR2
Q9UNM6	0.002388	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 13
Q7Z5P9	0.00275	Mucin-19
P22102	0.002792	Trifunctional purine biosynthetic protein adenosine-3
P50749	0.002975	Ras association domain-containing protein 2
P55160	0.003029	Nck-associated protein 1-like
P25788	0.003327	Proteasome subunit alpha type-3
Q99613	0.003445	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit C
O00410	0.003465	Importin-5
P04179	0.004386	Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial
Q9NVJ2	0.004991	ADP-ribosylation factor-like protein 8B
P22681	0.005441	E3 ubiquitin-protein ligase CBL
Q10567	0.00582	AP-1 complex subunit beta-1
Q9UKG1	0.00636	DCC-interacting protein 13-alpha
Q14696	0.00636	LRP chaperone MESD
P50416	0.006371	Carnitine O-palmitoyltransferase 1, liver isoform
P49721	0.006492	Proteasome subunit beta type-2
Q15067	0.006736	Peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase 1
Q9UIJ7	0.006758	GTP:AMP phosphotransferase AK3, mitochondrial
Q9NV96	0.006812	Cell cycle control protein 50A
P13804	0.006823	Electron transfer flavoprotein subunit alpha, mitochondrial
P11279	0.007285	Lysosome-associated membrane glycoprotein 1
O75608	0.00733	Acyl-protein thioesterase 1
O43390	0.007633	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R
P51991	0.007711	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3
O75015	0.007765	Low affinity immunoglobulin gamma Fc region receptor III-B
Q13217	0.007924	DnaJ homolog subfamily C member 3
P08574	0.007992	Cytochrome c1, heme protein, mitochondrial
P07948	0.008676	Tyrosine-protein kinase Lyn
P00167	0.008696	Cytochrome b5
Q04760	0.008885	Lactoylglutathione lyase
Q9Y4E8	0.00906	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 15
P68036	0.009089	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 L3
O94905	0.009311	Erlin-2
Q9H2U2	0.010033	Inorganic pyrophosphatase 2, mitochondrial
P62888	0.010166	60S ribosomal protein L30
Q7L1Q6	0.01017	Basic leucine zipper and W2 domain-containing protein 1
P51571	0.010213	Translocon-associated protein subunit delta
Q9BUL8	0.010797	Programmed cell death protein 10
P27348	0.010953	14-3-3 protein theta
Q9BT09	0.012129	Protein canopy homolog 3
O75594	0.01252	Peptidoglycan recognition protein 1
A0A0C4DH34	0.01275	Immunoglobulin heavy variable 4-28
P14324	0.012849	Farnesyl pyrophosphate synthase
Q86Y34	0.012971	Adhesion G protein-coupled receptor G3
Q9NX63	0.013155	MICOS complex subunit MIC19
Q96A26	0.013586	Protein FAM162A
P52597	0.014871	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F
P22061	0.015207	Protein-L-isoaspartate(D-aspartate) O-methyltransferase
P08134	0.015385	Rho-related GTP-binding protein RhoC
Q9Y2G3	0.015536	Phospholipid-transporting ATPase IF
P29692	0.015819	Elongation factor 1-delta
P01743	0.015948	Immunoglobulin heavy variable 1-46
Q9UBM7	0.01645	7-dehydrocholesterol reductase
Q86VS8	0.017758	Protein Hook homolog 3
O75396	0.018117	Vesicle-trafficking protein SEC22b
Q08211	0.019	ATP-dependent RNA helicase A
Q92556	0.019356	Engulfment and cell motility protein 1

Q9P107	0.021518	GEM-interacting protein
Q99986	0.021913	Serine/threonine-protein kinase VRK1
Q9BRF8	0.022097	Serine/threonine-protein phosphatase CPPED1
Q9Y5S9	0.022126	RNA-binding protein 8A
O15143	0.023179	Actin-related protein 2/3 complex subunit 1B
Q99729	0.02378	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B
Q14974	0.023946	Importin subunit beta-1
P61026	0.024333	Ras-related protein Rab-10
P13501	0.024839	C-C motif chemokine 5
P14868	0.024933	Aspartate--tRNA ligase, cytoplasmic
O75954	0.02778	Tetraspanin-9
P11766	0.028715	Alcohol dehydrogenase class-3
Q8TAT6	0.029866	Nuclear protein localization protein 4 homolog
Q9BYZ2	0.029895	L-lactate dehydrogenase A-like 6B
Q06323	0.030337	Proteasome activator complex subunit 1
Q99798	0.030523	Aconitate hydratase, mitochondrial
P69892	0.030837	Hemoglobin subunit gamma-2
P00403	0.033294	Cytochrome c oxidase subunit 2
Q0VDD8	0.033385	Dynein axonemal heavy chain 14
O94903	0.033724	Pyridoxal phosphate homeostasis protein
Q9UBQ0	0.03383	Vacuolar protein sorting-associated protein 29
Q9Y2Z0	0.035112	Protein SGT1 homolog
P09211	0.035322	Glutathione S-transferase P
P17096	0.036103	High mobility group protein HMG-I/HMG-Y
P25398	0.036486	40S ribosomal protein S12
A0A0C4DH35	0.037513	Probable non-functional immunoglobulin heavy variable 3-35
P15531	0.037527	Nucleoside diphosphate kinase A
P16403	0.03774	Histone H1.2
Q13510	0.038321	Acid ceramidase
P55209	0.04098	Nucleosome assembly protein 1-like 1
O60825	0.041295	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 2
P30085	0.042127	UMP-CMP kinase
Q9Y336	0.042821	Sialic acid-binding Ig-like lectin 9
Q14012	0.043327	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type 1
Q86VP6	0.045223	Cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1
P12236	0.045551	ADP/ATP translocase 3
Q9BXP5	0.045738	Serrate RNA effector molecule homolog
P00492	0.04724	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase
Q4KMP7	0.047311	TBC1 domain family member 10B
P62993	0.047733	Growth factor receptor-bound protein 2
O00501	0.048131	Claudin-5
Q9UI12	0.048313	V-type proton ATPase subunit H
P62330	0.049075	ADP-ribosylation factor 6
P61970	0.049614	Nuclear transport factor 2
Q15185	0.049753	Prostaglandin E synthase 3

Tabela 2: Lista de proteínas reguladas obtidas pelo Progenesis.