



**Universidade de Brasília**  
**Pós-Graduação em Patologia Molecular**

**Avaliação do Potencial da Terapia Fotodinâmica associada ao  
nanocarreador AlPcNLS na modulação de morte celular  
imunogênica em melanoma murino *in vitro***

**Aluna:** Marina Mesquita Simões

**Brasília, DF**  
**2024**

Marina Mesquita Simões

**Avaliação do Potencial da Terapia Fotodinâmica associada ao nanocarreador ALPcNLS na modulação de morte celular imunogênica em melanoma murino *in vitro***

**Orientadora:** Sônia Nair Bão

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular, da Faculdade de Medicina, da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Patologia Molecular.

**Brasília  
2024**

## **Agradecimentos**

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus por sempre iluminar meu caminho e ser minha fortaleza. Obrigada Senhor por me dar forças nos momentos difíceis e por me conceder momentos maravilhosos nestes últimos anos.

À minha família, em especial aos meus pais, Marise e Carlos, que me dão todo o suporte e o incentivo para conquistar os meus sonhos. Sou extremamente grata pelos valores que me foram passados e por cada sacrifício feito em prol do meu bem-estar e educação. Vocês têm sido os pilares da minha vida, guiando-me com amor. A minha avó Cecília, que sempre se preocupou com meu bem estar e fez deliciosas marmitas para que almoçasse no laboratório. A minha avó Maria que me ensinou a ser forte e a não temer aos desafios da vida. E ao meu avô Manoel, que abria um grande sorriso quando me via e dizia feliz “Minha netinha faz mestrado”, que ele possa celebrar esta conquista nos céus.

Ao meu namorado Victor Valadares que sempre me apoiou e me ajudou nesta jornada, me iluminando com a tua luz e amor. Aos seus pais, Emersom e Valéria, que também sempre me incentivaram a ser uma boa pesquisadora.

À minha orientadora Sônia Bão, que se tornou uma inspiração para mim, não apenas no requisito profissional, como uma excelente cientista, mas também como uma mulher forte e determinada. Obrigada pela oportunidade de fazer parte do laboratório, pelos seus conselhos e por sempre me mostrar o caminho, quando me desviava dele. Meus sinceros agradecimentos.

À Karen Letycia, que foi a primeira pessoa a me treinar no laboratório e sempre esteve ao meu lado durante todo o mestrado. Obrigado por ter se tornado uma grande parceira na academia, uma amiga sensacional e minha gêmea.

Ao Victor Mello, que foi quem mais me incentivou para fazer o mestrado, me apoiou em ideias malucas e proporcionou momentos inesquecíveis. Obrigada por ser esse amigo maravilhoso e com um imenso coração.

À Isadora Florêncio, por ser uma grande amiga e sempre que eu precisava de ajuda estava pronta para me auxiliar. Sou grata por tê-la em minha vida.

A toda equipe do Laboratório de Microscopia e Microanálise da UnB. À Ingrid (anjo salvador), Karine, Melissa e Ana Luísa, que são as mães conselheiras. Á Giovanna (migles), Henry, Marina Radichi, Gabriel, Ariane, Dafne, Leonardo, Luane e Luís. Suas palavras de encorajamento e apoio foram minha fonte de força nos momentos difíceis, e suas risadas tornaram os momentos felizes ainda mais especiais.

Aos meus queridos amigos Sequelinhos, que também sempre estiveram ao meu lado. E as demais pessoas que fizeram parte desses dois anos de mestrado e deixaram esses anos mais especiais.

Ao CNPq, às agências de fomento – CAPES, FINEP, FAPDF, e ao Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular pelo financiamento deste trabalho. À Universidade de Brasília, que foi minha segunda casa por seis anos e me proporcionou momentos incríveis.

“Geralmente, esses momentos não duram muito; eles vão e vêm como a brisa do mar. Mas, às vezes, se prolongam para sempre.”

(Última Música)

## Resumo

A terapia fotodinâmica (TFD) é baseada na produção de espécies oxidativas por um fotossensibilizador, que é uma molécula capaz de converter energia luminosa específica em potencial químico. O estresse oxidativo gerado por esta terapia pode induzir a morte celular imunogênica (MCI) e desencadear uma resposta imunológica. Esse tipo de morte gera diferentes padrões moleculares associados a danos (DAMPs) para o sistema imunológico, que podem resultar na ativação das células dendríticas, especializadas na apresentação de antígenos. Portanto, a TFD surge como uma alternativa para o tratamento do câncer, uma vez que desempenha um papel importante na ativação do sistema imunológico e consiste em um tratamento local não invasivo. No entanto, o uso dessa terapia ainda enfrenta algumas limitações, como baixa fotossensibilidade de longo prazo e baixa biodisponibilidade dos fotossensibilizadores. Para promover maior eficácia terapêutica e ativação do sistema imunológico, o grupo de trabalho atual desenvolveu um novo sistema de fotossensibilizador de terceira geração composto por alumínio cloro ftalocianina associada a nanopartículas lipídicas sólidas baseadas em manteiga amazônica (AIPcNLS). Foram realizados experimentos para avaliar seu potencial terapêutico, com o objetivo de verificar se o protocolo estabelecido pode induzir a morte celular imunogênica e a ativação das células dendríticas (CDs). Nos ensaios *in vitro*, foi utilizado a linhagem celular de melanoma B16-F10 e células dendríticas precursoras da medula óssea de camundongos C57BL/6. Para o tratamento, as células de melanoma foram expostas ao nanocarregador por 15 minutos, mantidas no escuro ou irradiadas por 10 minutos com luz LED (660 nm a uma densidade de energia de 25,88 J/cm<sup>2</sup>). Mitoxantrona foi utilizado como controle positivo para a morte celular imunogênica. Os ensaios de viabilidade celular mostraram que o nanocarreador desempenhou bem sua função citotóxica quando foi excitado pela luz, o que desencadeou na produção de espécies reativas de oxigênio. A imunomarcagem para microscopia confocal e para microscopia eletrônica de transmissão mostraram que o tratamento induziu a produção de DAMPs. Após tratamento das células B16-F10, foi possível observar a produção de autofagossomos e de citocinas como IL-12, que desempenham um papel importante no processo de resposta imunológica. A avaliação de células dendríticas por microscopia mostraram alterações morfológicas, após o cocultivo com células tumorais tratadas. Além disso as CDs, apresentaram uma maior expressão de componentes de membrana como MHCII e CD86, bem como produção de citocinas como IL-12 e IFN- $\gamma$ , que são fatores importante para a ativação do sistema imunitário. Desta forma, os resultados indicam que o protocolo estabelecido com a nanoestrutura desenvolvida tem o potencial de melhorar a eficácia da TFD, promovendo a morte celular imunogênica e induzindo alterações fenotípicas nas células dendríticas, indicativas de sua ativação.

**Palavras Chaves:** Melanoma; B16-F10; Terapia Fotodinâmica; Nanocarreadores; Morte celular imunogênica e Células Dendríticas.

## **Abstract**

Photodynamic therapy (PDT) is based on the production of oxidative species by a photosensitizer, which is a molecule capable of converting specific light energy into chemical potential. The oxidative stress generated by this therapy can induce immunogenic cell death (ICD) and trigger an immune response. This type of death generates different molecular patterns associated with damage (DAMPs) for the immune system, which can result in the activation of dendritic cells, specialized in antigen presentation. Therefore, PDT emerges as an alternative for cancer treatment, as it plays an important role in activating the immune system and consists of a non-invasive local treatment. However, the use of this therapy still faces some limitations, such as low long-term photosensitivity and low bioavailability of photosensitizers. To promote greater therapeutic efficacy and immune system activation, the current working group has developed a new third-generation photosensitizer system composed of aluminum chloro phthalocyanine associated with solid lipid nanoparticles based on Amazonian butter (AlPcSLN). Experiments were conducted to evaluate its therapeutic potential, aiming to verify if the established protocol can induce immunogenic cell death and dendritic cell activation. For in vitro assays, the B16-F10 melanoma cell line and precursor bone marrow dendritic cells from C57BL/6 mice were used. For treatment, melanoma cells were exposed to the nanocarrier for 15 minutes, then kept in the dark or irradiated for 10 minutes with LED light (660 nm at 25.88 J/cm<sup>2</sup> energy density). Mitoxantrone was used as a positive control for immunogenic cell death. Cell viability assays showed that the nanocarrier performed well in its cytotoxic function when excited by light, leading to the production of reactive oxygen species. Immunostaining for confocal microscopy and transmission electron microscopy demonstrated that the treatment induced the production of DAMPs. After treatment of B16-F10 cells, the production of autophagosomes and cytokines such as IL-12 was observed, playing a significant role in the immunological response. Evaluation of dendritic cells by microscopy showed morphological changes after co-culture with treated tumor cells. Additionally, dendritic cells exhibited increased expression of membrane components such as MHCII and CD86, as well as production of cytokines such as IL-12 and IFN- $\gamma$ , which are important factors for immune system activation. In conclusion, the results indicate that the established protocol with the nanostructure has the potential to improve PDT efficacy by promoting immunogenic cell death and inducing phenotypic changes in dendritic cells, indicative of their activation.

**Keywords:** Melanoma; B16-F10; Photodynamic Therapy; Nanocarriers; Immunogenic Cell Death; Dendritic Cells.

## Índice de Figuras

|  |    |
|--|----|
| Figura 1. Incidência de câncer mundial 2020.....   | 13 |
| Figura 2. Características fundamentais para o desenvolvimento do câncer.....   | 14 |
| Figura 3. Incidência de melanoma cutâneo em 2020 no Brasil.....  | 15 |
| Figura 4. Linha do tempo de agentes de imuno-oncologia aprovados para terapias contra o melanoma. ....   | 17 |
| Figura 5. Ilustração esquemática do mecanismo da Terapia fotodinâmica (TFD), destacando as reações de fotodinâmica e as possíveis vias de morte celular..... | 19 |
| Figura 6. Tipos de nanocarregadores utilizados para a entrega de medicamentos na terapia do câncer. ....   | 20 |
| Figura 7. Interação de imunócitos nos linfonodos.....  | 23 |
| Figura 8. Detecção de morte celular imunogênica e ativação de células dendríticas.....   | 24 |
| Figura 9. Indução de Imunidade Antitumoral pela Terapia Fotodinâmica.....  | 25 |
| Figura 10. Diagrama do delineamento experimental desenvolvido no trabalho. ....  | 27 |
| Figura 11. Esquema do protocolo da Terapia Fotodinâmica com AIPcNLS para os ensaios de viabilidade celular. ....   | 29 |
| Figura 12. Esquema ilustrativo do protocolo utilizado para a terapia fotodinâmica nos experimentos. ....   | 30 |
| Figura 13. Análise da viabilidade celular da B16-F10 por MTT tratadas com NLS-BRANCA e AIPcNLS após 24h.....   | 36 |
| Figura 14. Análise da viabilidade celular da B16-F10 por MTT após Terapia fotodinâmica com NLS-BRANCA e AIPcNLS após 24h.....                                | 36 |
| Figura 15. Gráfico de viabilidade da linhagem B16-F10 após o tratamento com Mitoxantrona após 24 horas de tratamento.....                                    | 37 |
| Figura 16. Histograma de produção de EROs por B16-F10 após tratamentos. ....   | 38 |
| Figura 17. Análise de produção de EROs da B16-F10 após tratamentos.....  | 39 |
| Figura 18. Imunomarcção de HMGB1 em B16-F10 após 24 horas de tratamento.....   | 40 |
| Figura 19. Imunomarcção de calreticulina em B16-F10 após 24 horas de tratamento.....   | 41 |
| Figura 20. Análise de alterações morfológicas e imunomarcção por Microscopia Eletrônica de Transmissão de células B16-F10 após 24h de tratamento.....        | 42 |
| Figura 21. Análise da produção de citocinas por células B16-F10 após 24h de tratamento.....  | 43 |
| Figura 22. Análise de diferenciação de monócitos em células dendríticas por citometria de fluxo. ....  | 44 |
| Figura 23. Microscopia de Luz de células B16-F10 após tratamentos co-cultivadas com CDs.....   | 46 |
| Figura 24. Microscopia de Luz de células B16-F10 após 24 horas dos tratamentos co-cultivadas com CDs.....  | 47 |
| Figura 25. Microscopia Eletrônica de Varredura de células dendríticas co-cultivadas com células B16-F10 após tratamentos.....                                | 48 |
| Figura 26. Dotplot e histograma de fenotipagem de células dendríticas em 24h de co-cultivo celular após os tratamentos. ....                                 | 49 |
| Figura 27. Análise de fenotipagem de células dendríticas após 24h de co-cultivo celular.....   | 50 |
| Figura 28. Análise da produção de citocinas por células dendríticas e células B16-F10 após 24h de tratamento. ....   | 51 |



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|                               |  |
|-------------------------------|--|
| °C                            | Graus Celsius  |
| <sup>1</sup> O <sub>2</sub>   | Oxigênio Singlete  |
| <sup>3</sup> O <sub>2</sub>   | Oxigênio Triplete  |
| AlPc                          | Alumínio Cloro Ftalocianina  |
| AlPcNLS                       | Nanocarreador lipídico sólido contendo Alumínio Cloro Ftalocianina |
| AMDC                          | Morte Celular Mediada por Autofagia                                |
| ATP                           | Adenosina Trifosfato   |
| APCs                          | Células Apresentadoras de Antígenos                                |
| B16-F10                       | Linhagem de melanoma murino  |
| BCRJ                          | Banco de Células do Rio de Janeiro                                 |
| BRAF                          | Proto-oncogene que expressa B-Raf                                  |
| BSA                           | Albumina Sérica Bovina   |
| CDs                           | Células Dendríticas  |
| CEUA/IB                       | Comitê de Ética no Uso Animal do Instituto de Ciências Biológicas  |
| CRT                           | Proteína Calreticulina   |
| CTLA-4                        | Antígeno 4 associado a linfócitos T citotóxicos                    |
| DAMPs                         | Padrões Moleculares Associados a Danos                             |
| DAPI                          | <i>4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride</i>              |
| DMEM                          | <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>                            |
| DMSO                          | Dimetilsulfóxido   |
| DNA                           | Ácido desoxirribonucleico  |
| EDTA                          | Ácido etilenodiamino tetra-acético                                 |
| ELISA                         | Ensaio Imunoenzimático de Ligação                                  |
| RE                            | Retículo endoplasmático  |
| EROs                          | Espécies reativas de oxigênio                                      |
| FDA                           | <i>Food and Drug Administration</i>                                |
| FS                            | Fossensibilizante  |
| GLOBOCAN                      | <i>Global Cancer Observatory</i>                                   |
| GM-CSF                        | Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos         |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | Peróxido de hidrogênio   |

|                  |  |
|------------------|--|
| HMGB1            | Grupo de alta mobilidade <i>Box 1</i>                        |
| HSPs             | Proteínas de choque térmico                                  |
| IC <sub>50</sub> | Concentração Inibitória de 50%                               |
| ImCDs            | Células dendríticas imaturas                                 |
| INCA             | Instituto Nacional do Câncer                                 |
| IFN- $\gamma$    | Interferon gama  |
| IL-4             | Interleucina 4   |
| IL-10            | Interleucina 10  |
| IL-12            | Interleucina 12  |
| LED              | Diodo emissor de luz   |
| LPS              | Lipopolissacarídeo   |
| mCDs             | Células dendríticas maduras                                  |
| MCI              | Morte Celular Imunogênica                                    |
| MET              | Microscopia Eletrônica de Transmissão                        |
| MEV              | Microscopia Eletrônica de Varredura                          |
| MHC              | Complexo Principal de Histocompatibilidade                   |
| MHCII            | Complexo Principal de Histocompatibilidade II                |
| MTT              | Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5- difeniltetrazólio |
| MTX              | Mitoxantrona   |
| NAC              | N-acetil-L-cisteína  |
| NLS-BRANCA       | Nanopáticula Lipídica Sólida Branca                          |
| NLSs             | Nanopartículas Lipídicas Sólidas                             |
| OMS              | Organização Mundial da Saúde                                 |
| PBS              | Tampão Fosfato Salino  |
| PD-1             | Proteína 1 de morte celular programada                       |
| pH               | Potencial hidrogeniônico                                     |
| RPMI             | Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium                  |
| SFB              | Soro Fetal Bovino  |
| TFD              | Terapia Fotodinâmica   |
| TNF- $\alpha$    | Fator de necrose tumoral alfa                                |
| UV               | Raios ultravioleta   |

## **Sumário**

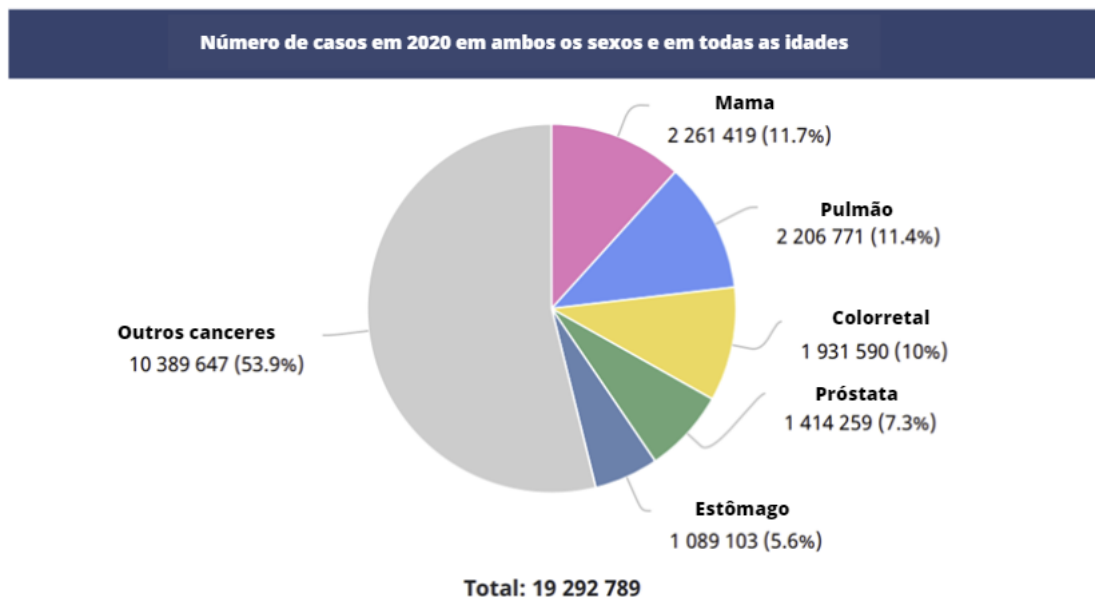
|  |    |
|--|----|
| <b>1. Introdução</b> .....   | 13 |
| 1.1 Câncer .....   | 13 |
| 1.2 Melanoma .....   | 15 |
| 1.3 Tratamentos .....  | 16 |
| 1.4 Terapia Fotodinâmica .....   | 18 |
| 1.5 Nanotecnologia e Terapias alternativas .....   | 20 |
| 1.6 Morte Celular Imunogênica .....  | 21 |
| 1.7 Sistema Imunológico e Células Dendríticas .....  | 22 |
| <b>2. Justificativa</b> .....  | 25 |
| <b>3. Objetivos</b> .....  | 26 |
| 3.1 Objetivos Gerais .....   | 26 |
| 3.2 Objetivos Específicos .....  | 26 |
| <b>4. Materiais e Métodos</b> .....  | 27 |
| 4.1 Delineamento Experimental .....  | 27 |
| 4.2 Nanopartícula Lipídica Solida .....  | 27 |
| 4.3 Manutenção das linhagens celulares.....  | 28 |
| 4.4 Ensaio de Viabilidade Celular .....  | 28 |
| 4.5 Protocolo da Terapia Fotodinâmica.....   | 29 |
| 4.6 Quantificação da produção de EROs por Citometria de fluxo .....                                  | 30 |
| 4.7 Alterações morfológicas por Microscopia Eletrônica de Transmissão .....                          | 30 |
| 4.8 Avaliação de mediadores de Morte Celular Imunogênica.....  | 31 |
| 4.8.1 Imunomarcção e Microscopia Confocal .....  | 31 |
| 4.8. 2 Imunomarcção e Microscopia Eletrônica de Transmissão.....                                     | 31 |
| 4.9 Análise da produção de citocinas por células B16-F10 tratadas com TFD .                          | 32 |
| 4.10 Obtenção de células precursoras e cultura de população enriquecida em células dendríticas ..... | 32 |
| 4.11 Análises morfológicas do co-cultivo .....   | 33 |
| 4.11.1 Microscopia de Luz.....   | 33 |

|   |           |
|---|-----------|
| 4.11.2 Microscopia Eletrônica de Varredura .....  | 33        |
| 4.12 Estudo da ativação da população enriquecida em células dendríticas.....  | 34        |
| 4.13 Análise da produção de citocinas por células dendríticas após a co-cultura<br>com células tumorais tratadas com TFD .....        | 34        |
| 4.14 Análises Estatísticas .....  | 35        |
| <b>5. Resultados .....</b>  | <b>35</b> |
| 5.1 Ensaio de Viabilidade Celular .....   | 35        |
| 5.2 Quantificação da produção de EROs por Citometria de fluxo.....  | 37        |
| 5.3 Avaliação de mediadores de morte celular imunogênica e alterações<br>morfológicas por Microscopia Eletrônica de Transmissão ..... | 39        |
| 5.4 Análise da produção de citocinas por células B16-F10 tratadas com TFD...42  |           |
| 5.5 Obtenção de células precursoras e cultura de população enriquecida em<br>células dendríticas.....                                 | 43        |
| 5.6 Análises morfológicas do co-cultivo .....   | 45        |
| 5.7 Estudo da ativação da população enriquecida em células dendríticas.....   | 48        |
| 5.8 Análise da produção de citocinas por células dendríticas após a co-cultura<br>com células tumorais tratadas com TFD .....         | 50        |
| <b>6. Discussão .....</b>   | <b>51</b> |
| <b>7. Conclusão .....</b>   | <b>60</b> |
| <b>8. Perspectivas .....</b>  | <b>60</b> |
| <b>9. Bibliografia .....</b>  | <b>61</b> |

## 1. Introdução

### 1.1. Câncer

O Câncer é considerado um dos principais problemas de saúde pública da atualidade, por ser uma das principais causas de morbidade e mortalidade global. Conforme os dados do *Global Cancer Observatory* (GLOBOCAN), o total de novos diagnósticos de câncer em 2020 atingiu 19,3 milhões, resultando em quase 10,0 milhões de óbitos atribuídos à doença como pode ser observado na Figura 1. As projeções do GLOBOCAN indicam um aumento significativo, prevendo que o número de casos de câncer alcançará 28,4 milhões em 2040. No Brasil, de acordo com o Instituto Nacional do Câncer, são esperados 704 mil casos novos de câncer para o triênio 2023-2025<sup>1-4</sup>.



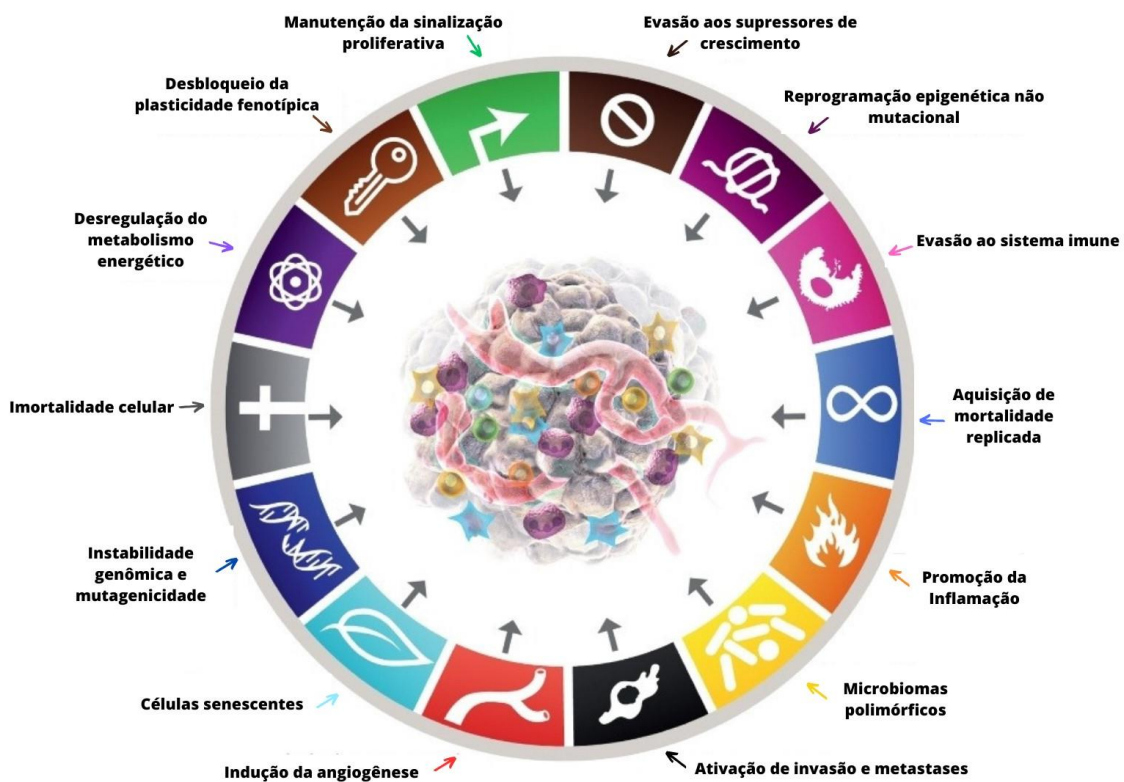
**Figura 1. Incidência de câncer mundial 2020.** A figura mostra o número de casos dos principais tipos de câncer em 2020, em ambos os sexos e em todas as idades. (Adaptado de OMS 2020)<sup>5</sup>.

O câncer é definido como um conjunto de doenças caracterizadas pelo crescimento desordenado de células anormais, devido a uma variedade de fatores, como aspectos genéticos, exposição a substâncias carcinogênicas, estilo de vida e fatores ambientais. Esses fatores podem levar a alterações no ácido desoxirribonucleico (DNA) das células, que ocasionam em mutações que podem afetar os genes que controlam o crescimento e a divisão celular, levando a um crescimento descontrolado das células e à formação de tumores<sup>6-8</sup>.

Durante o crescimento neoplásico, as células anteriormente consideradas normais adquirem capacidades funcionais que são cruciais para a formação de tumores malignos, uma vez que permitem o crescimento, sobrevivência, invasão e metástase do tumor<sup>9,10</sup>.

Dentre estas características podemos citar a proliferação descontrolada e a imortalidade de células somáticas, que são importantes para o processo de metástase, que consiste na saída das células cancerosas do seu local primário, circulação na corrente sanguínea e adaptação ao novo ambiente celular num local secundário <sup>11,12</sup>.

Outra característica presente no câncer é a evasão ao sistema imune, ocasionado por um desequilíbrio na distribuição e atividade celular do sistema imunológico dentro do microambiente tumoral. Esse fator envolve diversos mecanismos, como produção de moléculas inibitórias e o recrutamento de células imunossupressoras, o que contribui para que os tumores escapem da vigilância imunológica, cresçam e se espalham sem se tornarem alvos de eliminação imunológica<sup>13</sup>. A compreensão dos mecanismos de imunoeedição e imunossupressão possui um papel crucial para o desenvolvimento de estratégias para novos tratamentos e imunoterapias eficazes, a fim de superar essas evasões e fortalecer as respostas imunes contra o câncer <sup>13-15</sup>. As demais características fundamentais para o desenvolvimento do câncer estão presentes na Figura 2.

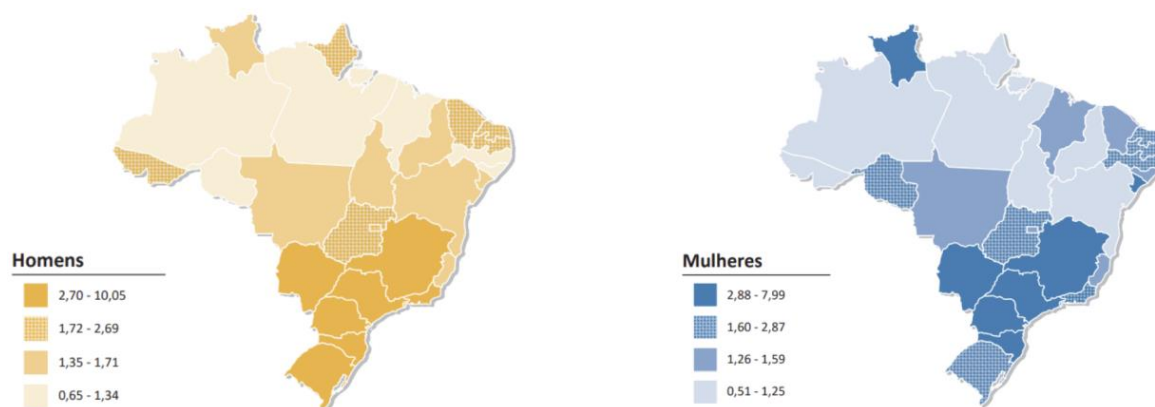


**Figura 2. Características fundamentais para o desenvolvimento do câncer.** A imagem descreve os principais parâmetros relacionados descritos na literatura, que são evasão aos supressores de crescimento, reprogramação epigenética não mutacional, evasão ao sistema imunológico, aquisição de mortalidade replicada, promoção da inflamação, microbiomas polimórficos, ativação de invasão e metástase, indução da angiogênese, células senescentes, instabilidade genômica e mutagenicidade, imortalidade celular, desregulação metabólica, desbloqueio da plasticidade fenotípica e manutenção da sinalização proliferativa. (Adaptado de Hanahan *et al.*, 2022) <sup>9</sup>.

## 1.2. Melanoma

O melanoma é um tipo de câncer maligno originário dos melanócitos, que são células responsáveis pela produção do pigmento melanina. Essas células estão predominantemente localizadas na pele, mas também podem ser encontradas nos olhos, ouvidos, leptomeninges, trato gastrointestinal, mucosas orais, genitais e nasossinusais. O melanoma cutâneo representa a maior parte dos casos de pacientes diagnosticados com melanoma (mais de 90%), enquanto melanomas de origem mucosa e do trato uveal do olho são diagnosticados mais raramente (menos de 1-5%, com variações específicas por país) <sup>16,17</sup>.

O Melanoma é o tipo de câncer de pele que causa mais mortalidade e sua ocorrência tem aumentado nas últimas décadas em países desenvolvidos, especialmente na população caucasiana. Atualmente, o melanoma ocupa a quinta posição entre os principais diagnósticos de câncer nos Estados Unidos. Já no Brasil corresponde a 4% das neoplasias malignas da pele com prevalência nas regiões Sudeste e Sul (Figura 3), embora não seja a mais frequente é o tipo mais grave, devido à sua alta possibilidade de provocar metástase. Conforme os dados do GLOBOCAN em 2020, foram registrados globalmente 324.635 casos de melanoma, equivalendo a 1,7% de todos os cânceres, resultando em 57.043 mortes por melanoma, representando 0,6% da mortalidade relacionada ao câncer <sup>18-20</sup>.



**Figura 3. Incidência de melanoma cutâneo em 2020 no Brasil.** Representação espacial das taxas ajustadas de incidência por 100 mil habitantes, estimadas para o ano de 2020, segundo Unidade da Federação para melanoma maligno da pele. O mapa amarelo representa a incidência para o sexo masculino e o mapa em azul representa a incidência para o sexo feminino. As regiões do Sudeste e Sul apresentam o maior número de casos em ambos os sexos. (Adaptado INCA 2020) <sup>21</sup>.

O surgimento do melanoma é influenciado por diversos fatores, resultantes da interação entre predisposição genética e exposição ambiental. Certos padrões de

ocorrência do melanoma estão associados aos padrões de exposição solar, antecedentes de queimaduras solares e sexo<sup>22</sup>. A relação entre a exposição solar e o aumento do risco de desenvolvimento de câncer de pele, incluindo o melanoma, é bem estabelecida, devido aos raios ultravioletas (UV). Diversos estudos indicaram que maior exposição à luz ultravioleta, especialmente ao longo de muitos anos em ambientes ocupacionais com alto índice solar (>20 anos), está associada a um aumento no desenvolvimento de melanoma<sup>23</sup>.

A identificação precoce de lesões é essencial, uma vez que os estágios iniciais apresentam uma elevada taxa de sobrevivência. Contudo, em alguns casos o câncer só é diagnosticado posteriormente, o que piora o prognóstico do paciente devido às características agressiva e metastática do melanoma<sup>24</sup>. Além disso, o diagnóstico de neoplasias melanocíticas continua sendo um desafio, pois estudos mostram uma alta divergência entre patologistas, principalmente em situações em que a histologia apresenta características ambíguas. Dessa maneira, estes fatos prejudicam o rastreamento e o estadiamento da doença, o que influencia de forma direta na elaboração de um regime de tratamento que ofereça ao paciente a melhor chance possível de recuperação ou sobrevivência prolongada<sup>25</sup>.

### **1.3. Tratamentos**

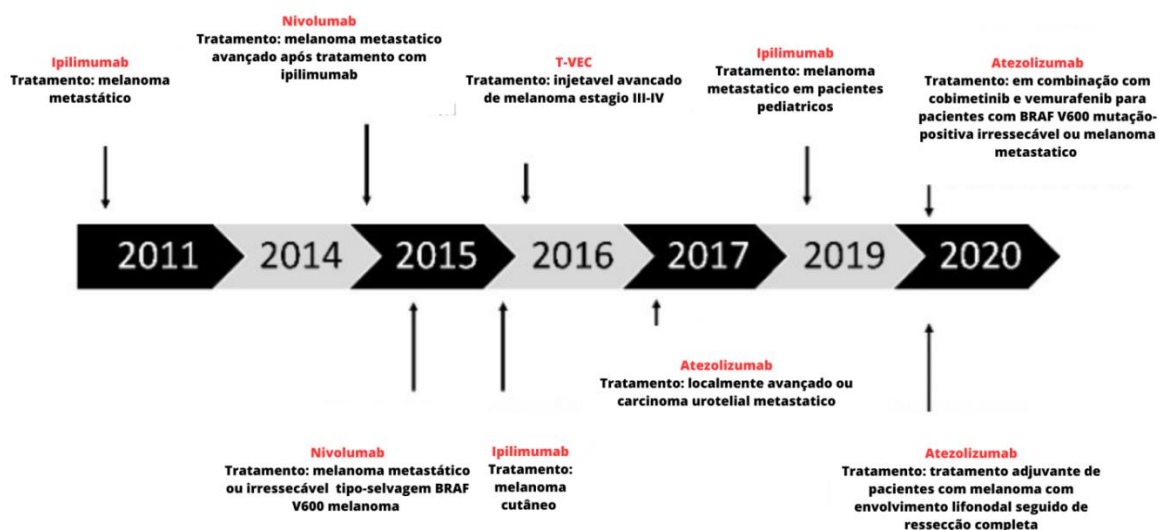
O avanço científico ao longo dos anos resultou em diversas opções terapêuticas para enfrentar o câncer, tais como cirurgia, radioterapia, quimioterapia e terapia alvo. A escolha entre essas abordagens é determinada pelo tipo específico de câncer, seu estágio e localização no organismo. A remoção cirúrgica do tumor, juntamente com o tecido saudável ao redor, representa a abordagem principal no tratamento do melanoma localizado, que corresponde ao estágio inicial da doença. A dissecação eletiva de linfonodos e de gânglios linfáticos, também poderá ocorrer caso forem identificadas células de melanoma. Em alguns casos, tumores metastáticos também podem ser submetidos à remoção cirúrgica. Contudo, é importante observar que o tratamento cirúrgico em contextos de doença metastática reconhecida não visa à cura e, portanto, exigirá outras modalidades de tratamento<sup>26,27</sup>.

A quimioterapia é uma das opções para melanoma metastático, dentre os quimioterápicos disponíveis, os mais utilizados são a Dacarbazina e Temozolomida<sup>28</sup>. Estes medicamentos possuem ação sistêmica e atuam como agente alquilante, causam danos no DNA e impedem que as células cancerosas se dividam, se multipliquem, o que



leva, em última instância, à sua destruição. Porém, esse tipo de tratamento não é altamente seletivo para as células tumorais em relação às células saudáveis, o que causa efeitos adversos nos pacientes. Além disso, estudos mostraram que esta modalidade de terapia apresentou eficácia antitumoral modesta e não demonstrou um prolongamento da sobrevida significativo<sup>28,29</sup>.

Até pouco tempo atrás, a única alternativa de tratamento para pacientes com melanoma metastático era a quimioterapia. Atualmente, com o avanço da ciência outras estratégias estão sendo utilizadas para combater o câncer, como terapias direcionadas e imunoterapias<sup>30</sup>. Dentre essas abordagens, tem bloqueio da sinalização das vias de transdução, como por exemplo o inibidor de BRAF, que é o oncogene com mutação mais frequente no melanoma<sup>31</sup>. Outra categoria terapêutica que tem sido aplicada para o melanoma é o uso de inibidores do checkpoint imunológico (Figura 4), cuja atuação é por meio da inibição de proteínas que estão presentes nas células tumorais e células do sistema imunitário. Entre essas proteínas, podemos citar a proteína 1 de morte celular programada (PD-1) e o antígeno 4 associado a linfócitos T citotóxicos (CTLA-4) são pontos de verificação que regulam negativamente a ativação de células T, produzidas por células cancerosas, a fim de escapar do sistema imunológico, logo a inibição destas proteínas podem evitar essa imunossupressão<sup>32,33</sup>.



**Figura 4. Linha do tempo de agentes de imun-oncologia aprovados para terapias contra o melanoma.** A linha do tempo mostra os principais imunoterápicos (inibidores do checkpoint imunológico) aprovados para o tratamento de melanoma desde 2011 a 2020 pela Food and Drug Administration (FDA), órgão federal regulador dos Estados Unidos da América. (Adaptado de Kuryk *et al.*, 2020)<sup>28</sup>.

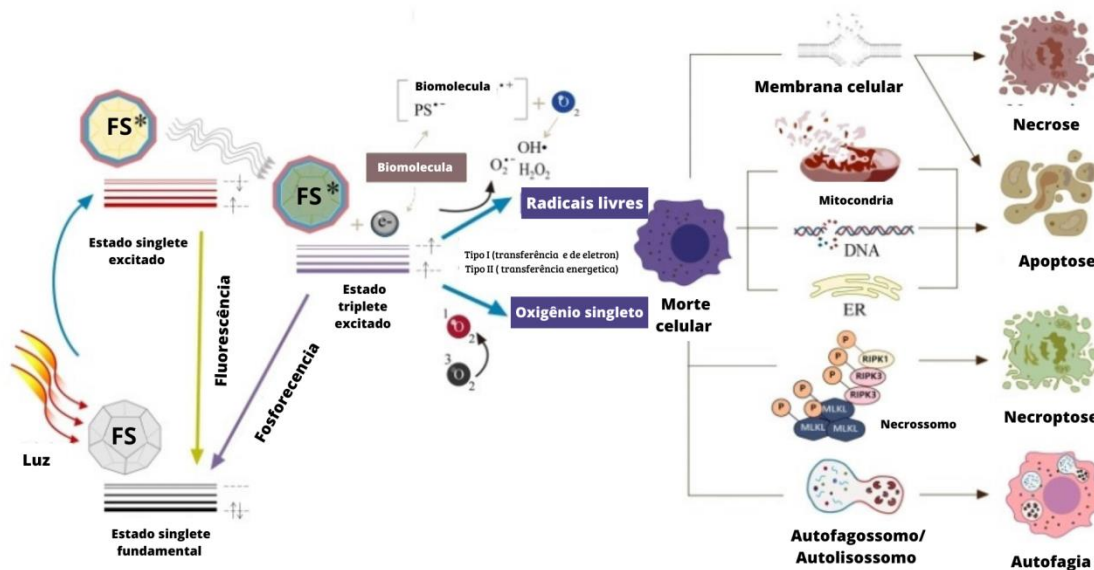
Apesar das descobertas recentes terem melhorado o prognóstico para pacientes com melanoma, ainda existem vários desafios na escolha para a abordagem terapêutica e para o combate à doença. As terapias tradicionais, como cirurgia e quimioterapia, podem apresentar uma recidiva do tumor, efeitos colaterais adversos, baixos índices terapêuticos e falta de especificidade<sup>34</sup>. Além disso, as abordagens mais atuais com terapias alvo e imunoterapias, também apresentam limitações, como a resistência secundária aos medicamentos e a indução de toxicidades que mimetizam doenças autoimunes, o que compromete a resposta do paciente ao tratamento. Por esse motivo, a busca por novas terapias no tratamento do melanoma permanece uma prioridade<sup>35</sup>.

#### **1.4. Terapia Fotodinâmica**

Em meio à necessidade de novas estratégias para melhorar a eficácia das terapias disponíveis ou a busca por novas abordagens terapêuticas contra o câncer, que ofereçam uma natureza não invasiva e uma baixa toxicidade sistêmica, uma que se destaca é a terapia fotodinâmica (TFD)<sup>35,36</sup>.

A terapia fotodinâmica foi identificada há mais de um século por Oscar Raab, um estudante de medicina que colaborava com o Prof. Hermann von Tappeiner. Raab notou que os paramécios incubados com um corante fluorescente e expostos à luz morriam, ao passo que aqueles mantidos no escuro não eram afetados<sup>37</sup>. Desde então a TFD evoluiu e a partir de 1970 começou a ser amplamente utilizada em diversas áreas, incluindo a medicina. Esta metodologia, não invasiva, é uma abordagem terapêutica promissora, devido ao seu potencial de alta seletividade para o câncer, o que leva ao aumento da eficácia no local do tumor com redução da toxicidade ao tecido normal<sup>38</sup>.

A TFD é baseada na ação combinada de três elementos principais: um fotossensibilizador, uma fonte de luz e oxigênio molecular. O fotossensibilizante é uma molécula capaz de converter energia luminosa específica em potencial químico. A ativação de fármacos fotossensibilizadores pela fonte de luz converte o oxigênio tripleto ( $^3\text{O}_2$ ) na espécie fortemente oxidativa de oxigênio singleto ( $^1\text{O}_2$ ) ou na liberação de radicais livres, o que ocasiona o estresse oxidativo. Os reativos citotóxicos, principalmente espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, induzem a morte celular de células cancerosas (Figura 5), o bloqueio vascular com subsequente isquemia tumoral, o que pode aumentar a resposta imunológica aos antígenos tumorais<sup>39,40</sup>.



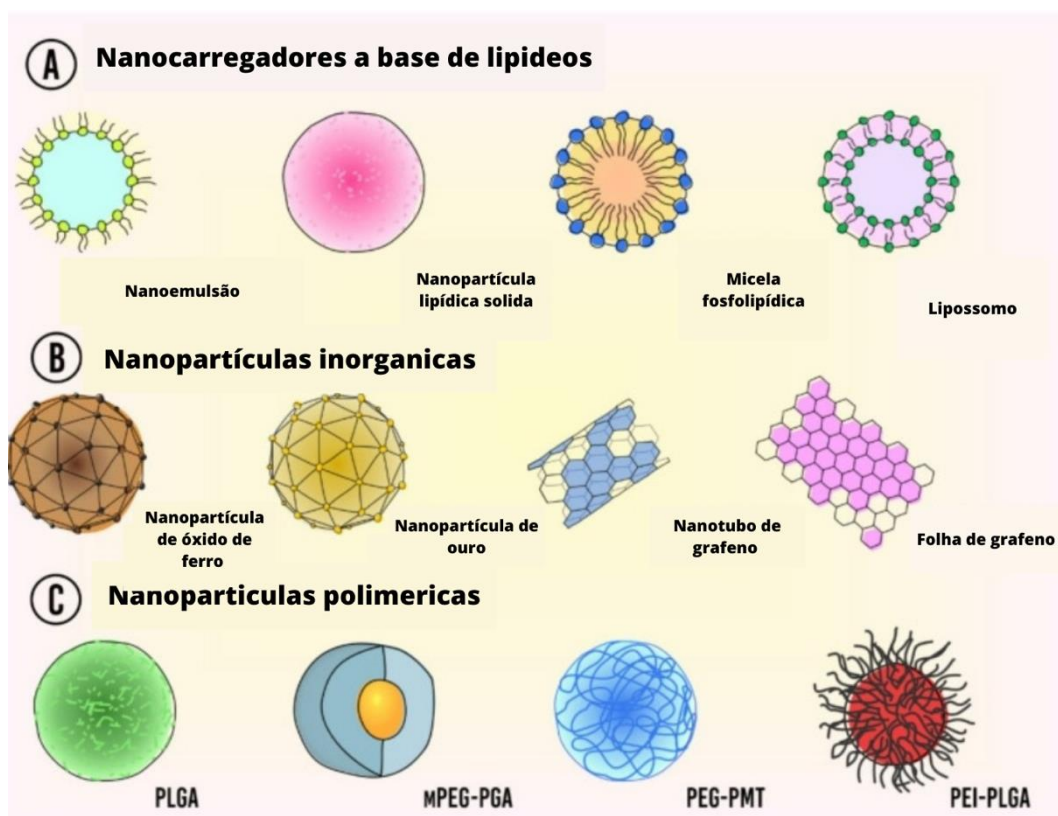
**Figura 5. Ilustração esquemática do mecanismo da Terapia fotodinâmica (TFD), destacando as reações de fotodinâmica e as possíveis vias de morte celular.** Um FS absorve energia da luz para eliminar as células tumorais através da geração de EROS. Os modos de morte celular induzidos pela TFD, incluem apoptose, necrose, necroptose e autofagia entre outros e dependem do tipo celular, tipo ou concentração da FS, localização intracelular, dose de luz e pressão parcial de oxigênio. TFD (terapia fotodinâmica), FS (fotosensibilizador), ER (retículo endoplasmático). (Adaptado de Sai *et al.*, 2021)<sup>41</sup>.

O tipo de morte celular e a ativação do sistema imunológico, devido à modulação do microambiente tumoral por meio da terapia fotodinâmica, estão relacionados com os parâmetros como dose de luz, concentração do fotossensibilizante selecionado e o seu intervalo entre a administração e a irradiação do tecido alvo. A escolha desses parâmetros é de extrema importância para estabelecer um protocolo de tratamento eficaz e superar as limitações desta terapia. Dentre os obstáculos que a TFD possui atualmente podemos citar: penetração da luz, hipóxia, baixa solubilidade e agregação em água dos fotossensibilizantes<sup>42-44</sup>.

Ao longo dos anos, vários estudos têm buscado estratégias para superar estas limitações. Em relação ao uso da luz, a melhor opção é selecionar equipamentos que tenham os comprimentos de onda entre 620 e 850 nm, pois apresentam uma melhor capacidade penetrante para atingir a permeabilidade máxima da pele, este intervalo é chamado de “janela fototerapêutica”<sup>45</sup>. Para superar as dificuldades devido a baixa disponibilidade de oxigênio no microambiente tumoral, tem-se optado por utilização de fotoativos que gerem TFD Tipo I, uma vez que é capaz de funcionar bem em ambiente hipóxico. Além disso, uma estratégia cada vez mais empregada, com resultados positivos, consiste na produção de nanopartículas para otimizar o potencial terapêutico dos agentes fotossensíveis<sup>46,47</sup>.

## 1.5. Nanobiotecnologia e Terapias Alternativas

O campo da nanotecnologia experimentou um avanço significativo na última década, e atualmente, muitos produtos contendo nanopartículas são empregados em várias aplicações, incluindo ciência de alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos. Nanoestruturas são caracterizadas por terem dimensões que variam entre 1 e 100 nm, exibindo propriedades distintas influenciadas por seu tamanho e funcionalidades de superfície. As nanopartículas são categorizadas em diversas classes, de acordo com sua composição e formato, como por exemplo: nanopartículas a base de lipídeos, nanopartículas inorgânicas e nanopartículas poliméricas (Figura 6)<sup>48,49</sup>.



**Figura 6. Tipos de nanocarregadores utilizados para a entrega de medicamentos na terapia do câncer.** (A) Nanocarregadores à base de lipídios; (B) Nanopartículas inorgânicas; (C) Nanopartículas poliméricas. (Adaptado de Lôbo et al., 2021)<sup>50</sup>.

O uso de nanotecnologia está em constante ascensão no campo da medicina, devido sua alta capacidade de inovação, o que permite que esta tecnologia seja amplamente explorada para diversas áreas, inclusive para o tratamento de câncer. A aplicação de nanopartículas pode aprimorar a eficácia da entrega de agentes terapêuticos nos tecidos afetados, por meio da preservação de sua carga durante a circulação prolongada e

entregá-la de maneira bem-sucedida aos locais desejados. A nanotecnologia proporciona oportunidades para superar as limitações dos tratamentos convencionais, facilitando uma resposta eficaz contra os tumores<sup>51-53</sup>.

Na terapia fotodinâmica a nanotecnologia está sendo utilizada como uma estratégia para o desenvolvimento de novos fotossensibilizantes, uma vez que diminui a toxicidade para o tecido normal tanto em ensaios *in vitro* quanto *in vivo*, aprimora sua solubilidade no ambiente biológico e potencializa os efeitos terapêuticos. Dessa maneira, o uso de nanocarreadores pode auxiliar a superar as limitações existentes nesta terapia<sup>54-56</sup>.

Um exemplo deste fato é que diversos pesquisadores então buscando formulações para associar com as ftalocianinas, uma vez que representam um grupo de fotossensibilizantes de segunda geração com uma alta capacidade terapêutica devido ao fato de responderem a comprimentos de ondas mais extensos. Dentro desse grupo, o alumínio cloro ftalocianina (AlPc) se destaca por possuir uma absorção de luz entre 660 e 770 nm, apresenta alta eficiência na fluorescência quântica para a geração de estresse oxidativo, além de manifestar rápida e duradouro acúmulo em células cancerosas, acompanhada por um tempo de meia-vida reduzido<sup>57</sup>. Contudo, apresenta uma baixa solubilidade em água, o que afeta a administração e a atividade do fármaco<sup>58</sup>.

A fim de solucionar esta problemática, surgiu o desenvolvimento de fotossensibilizantes de terceira geração, que são caracterizados pela associação de fotoativos de segunda geração com nanocarreadores que sejam biocompatíveis. Logo, é notório que o uso de nanoestruturas pode promover maior eficácia da terapia fotodinâmica e maior ativação do sistema imunitário<sup>59,60</sup>.

### **1.6. Morte Celular Imunogênica**

O efeito antitumoral da terapia fotodinâmica é desencadeado por uma ação citotóxica direta nas células cancerosas, pela destruição dos vasos sanguíneos do tumor e pelo estímulo da imunidade antitumoral. Esse último fator contribui para o controle da doença a longo prazo, o que é vantagem em relação às terapias convencionais, como cirurgia ou quimioterapia. Contudo, para reverter o cenário imunossupressor do microambiente pela TFD, é crucial ter um bom fotossensibilizante e estabelecer um protocolo adequado, uma vez que dependendo das escolhas para o tratamento pode-se obter diferentes tipos de morte celular<sup>61,62</sup>.

Anteriormente as principais vias de morte celular conhecidas eram a apoptose e a necrose. Após vários estudos, foi possível identificar a existência de várias outras modalidades de morte celular, incluindo a morte celular imunogênica (MCI). A MCI é uma forma de morte celular que promove respostas imunes inatas e adaptativas, o que leva à formação de memória imunológica a longo prazo. A imunogenicidade da morte das células cancerosas é influenciada pela presença de antígenos associados a tumores e pela liberação de padrões moleculares associados a danos (DAMPs) <sup>63,64</sup>.

Os DAMPs são moléculas imunoestimulantes que podem ser secretados de forma ativa, liberados de maneira passiva para o ambiente extracelular ou expostos na superfície de células que estão em processo de morte. Dentre essas substâncias, estão a adenosina trifosfato (ATP), a calreticulina (CRT), o grupo de alta mobilidade Box 1 (HMGB1), as proteínas de choque térmico (HSPs) 70 e 90, bem como as citocinas/quimiocinas que facilitam o recrutamento e maturação de células apresentadoras de antígenos (APCs) pelas células cancerosas em processo de morte. Dessa maneira, o reconhecimento destas moléculas pelas APCs é de extrema importância para ativação do sistema imunológico adaptativo, principalmente de células T CD8<sup>+</sup>, uma vez que é a força motriz para o controle e a destruição de células tumorais <sup>65,66</sup>.

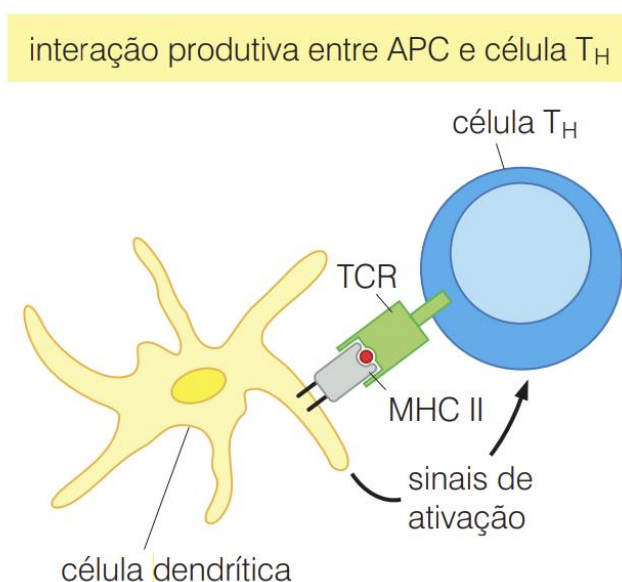
Portanto, é importante entender quais os processos imunitários relacionados à tumorigênese para elaborar protocolos mais eficientes para o tratamento do câncer. O uso da terapia fotodinâmica com enfoque na indução de MCI possui um papel promissor no combate ao câncer, uma vez que pode promover a imunidade antitumoral por meio da sinalização de diferentes padrões moleculares associados a danos para o sistema imunitário <sup>67,68</sup>.

### **1.7. Sistema Imunológico e Células Dendríticas**

O sistema imunológico é um mecanismo essencial para manter a saúde, combater infecções e doenças, a fim de promover o equilíbrio do organismo como um todo. O sistema imune possui a capacidade de discernir entre o próprio e o não próprio, eliminando assim patógenos e células danificadas. Por conseguinte, tem o potencial de erradicar células cancerosas que apresentam autoantígenos mutados ou expressos de forma anômala. Para evitar a eliminação por respostas imunitárias, os tumores não apenas desenvolvem a capacidade de evitar o reconhecimento imunológico, mas

também estabelecem um ambiente imunossupressor e ativamente modulam células imunológicas para favorecer a progressão tumoral <sup>69,70</sup>.

O microambiente tumoral interfere no reconhecimento das células cancerosas por meio da inibição da ação de células apresentadoras de antígenos e conseqüentemente a ativação do sistema adaptativo. As respostas imunes adaptativas exigem a ativação das vias de processamento e apresentação de antígenos. Essas vias possibilitam que as glicoproteínas codificadas pelo Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) sejam carregadas com seus ligantes apropriados. Somente as moléculas de MHC ligadas e expressas na superfície das APCs têm a capacidade de ativar as células T (Figura 7), as quais desempenham funções efetoras, como citotoxicidade, apoio às células B e produção de citocinas <sup>71,72</sup>.



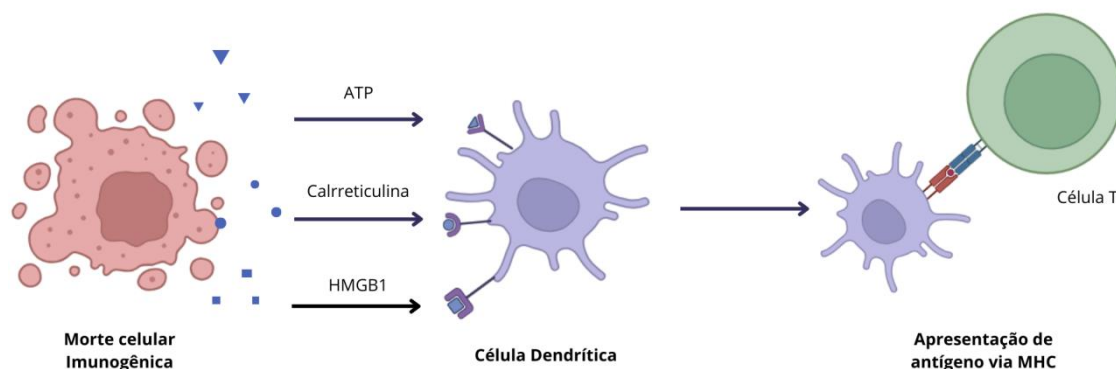
**Figura 7. Interação de imunócitos nos linfonodos.** As células dendríticas (CDs) interagem diretamente com as células T e apresentam os antígenos a elas nos linfonodos. As células dendríticas englobam, processam e apresentam fragmentos oligopeptídicos antigênicos expressos em sua superfície às células T auxiliares (T<sub>H</sub>) dos linfonodos, por meio de moléculas MHC de classe II (cinza) para essa função. As células T<sub>H</sub> expressam seu próprio receptor de célula T<sub>H</sub> distinto, T cell receptor (TCR, verde) sobre sua superfície. Ocorre o reconhecimento do antígeno apresentado pelas CDs com a ativação das células T<sub>H</sub>. (Adaptado de A Biologia do Câncer. Weinberg *et al.*, 2008) <sup>73</sup>.

Dentre as células apresentadoras de antígenos, as células dendríticas (CDs) desempenham um papel crucial no sistema imunitário. São reconhecidas como as APCs mais eficazes, pelo fato de serem especialistas em interligar respostas imunes inatas e adaptativas. As CDs representam um grupo de células, que surgem de progenitores da medula óssea conhecidos como progenitores mielóides comuns <sup>72</sup>. Ao longo do seu processo de maturação sofrem influência de vários sinais, como fatores de crescimento,



citocinas e DAMPs, que irão modular o perfil fenotípico para que estas células possam efetuar plenamente seu papel na resposta imune <sup>74</sup>.

No processo de morte celular imunogênica em células cancerosas, ocorre a liberação e exposição de DAMPs, moléculas importantes para o recrutamento e ativação de APCs <sup>75</sup>. A proteína calreticulina, por exemplo, normalmente encontrada no retículo endoplasmático, pode se deslocar para a membrana plasmática em resposta a danos causados pelo estresse oxidativo nessa organela. Quando exposta na membrana plasmática, a calreticulina atua como um sinal "coma-me" para as APCs, o que facilita a fagocitose da célula em processo de morte <sup>76</sup>. A ligação dos DAMPs aos receptores específicos de reconhecimento de padrões expressos nas células dendríticas, desencadeia uma cascata celular que ativa respostas imunes inatas e adaptativas. Isso inclui quimiotaxia, direcionamento, ativação e/ou maturação das CDs, culminando na apresentação cruzada de antígenos tumorais para os linfócitos T citotóxicos (CTLs) CD8<sup>+</sup> (Figura 8) <sup>77</sup>.

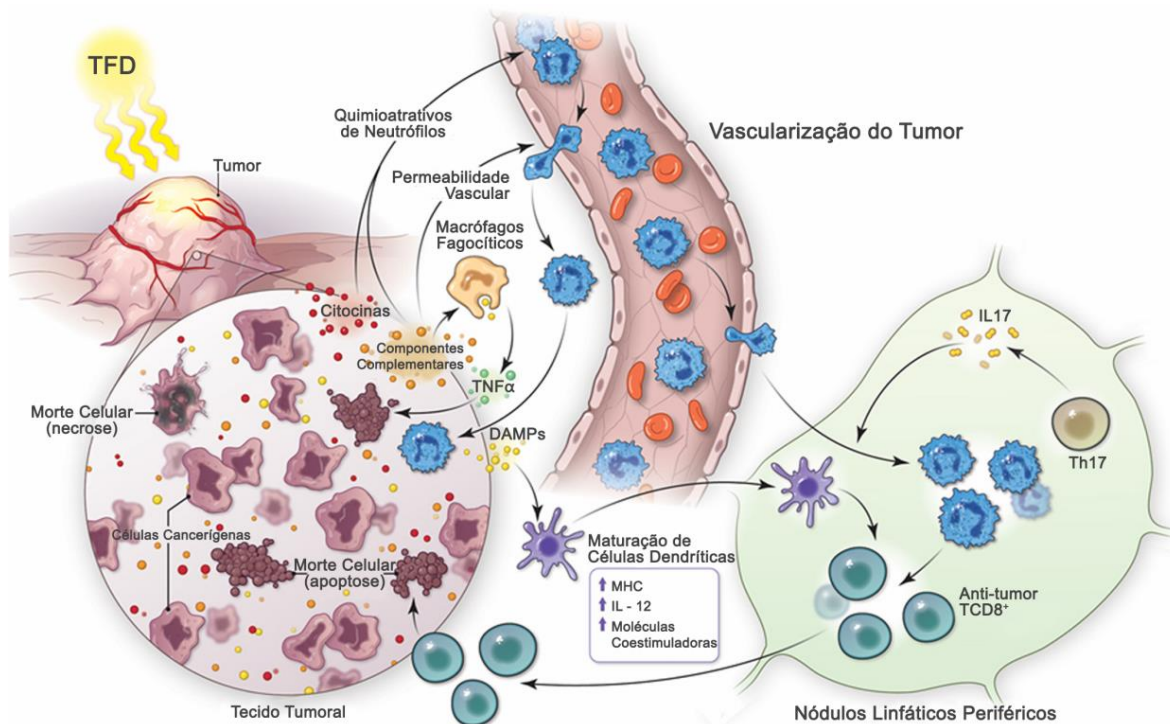


**Figura 8. Detecção de morte celular imunogênica e ativação de células dendríticas.** Ilustração esquemática da exposição e liberação de padrões moleculares associados a danos (DAMPs) por células cancerosas em processo de morte celular imunogênica. Os DAMPs são reconhecidos por receptores específicos de reconhecimento de padrões expressos nas células dendríticas (CDs), quando ocorre a ligação com essas moléculas ocorre uma cascata celular que pode ativar o sistema imunológico inato e adaptativo. As células dendríticas, após sua maturação podem ativar células T CD8<sup>+</sup> para um perfil citotóxico, apresentando os DAMPs via complexo de histocompatibilidade.

No contexto do microambiente tumoral, as CDs possuem a capacidade única de transportar antígeno tumoral para os nódulos linfáticos de drenagem para iniciar a ativação de células T. Além disso, as células dendríticas residentes no tumor também podem influenciar na regulação da resposta das células T nos tumores durante a terapia <sup>78</sup>. Assim, é evidente que as interações entre diferentes populações de células dentro dos tumores desempenham um papel importante no desenvolvimento da doença e avaliar como a morte celular imunogênica ocasionada pela terapia fotodinâmica pode



interferir nessas interações, como mostra a Figura 9, é essencial para melhorar a sua eficiência <sup>79</sup>.



**Figura 9. Indução de Imunidade Antitumoral pela Terapia Fotodinâmica.** Ilustração esquemática da indução de Imunidade Antitumoral pela TFD. A terapia fotodinâmica utilizada para o tratamento de tumores, pode causar morte celular imunogênica, caracterizada pela liberação de padrões moleculares associados a danos (DAMPs) que ativam o sistema imunológico e é acompanhada pela indução de uma inflamação aguda que leva à infiltração de neutrófilos, dependente de IL-17, no leito tumoral tratado e no nódulo linfático periférico do tumor. Os DAMPs estimulam a maturação das células dendríticas, que são células apresentadoras de antígenos, que migram para os linfonodos para ativar células do sistema imune adaptativo. As células dendríticas maduras trabalham em conjunto com os neutrófilos para potencializar a ativação de células T CD8<sup>+</sup> específicas contra o tumor e aumentar a morte celular tumoral. (Adaptado de Falk-Mahapatra e Gollnick, 2020) <sup>78</sup>.

## 2. Justificativa

Apesar dos avanços nos tratamentos, infelizmente não foi ainda possível atingir um patamar satisfatório no combate ao câncer, o que ocasiona na sua permanência como um grave problema de saúde pública em todo o mundo. Dentre os vários tipos de câncer, o melanoma, a cada ano que passa, aumenta a sua taxa de incidência, o que é um fator preocupante uma vez que é o tipo de câncer de pele mais agressivo, que causa mais mortalidade, possui uma alta taxa de metástase e os tratamentos convencionais utilizados provocam uma série de reações adversas. Dessa maneira, a aplicação de novas estratégias para melhorar a eficácia das terapias disponíveis ou a busca por novas abordagens terapêuticas são de extrema importância para alterar o cenário atual. A Terapia Fotodinâmica se torna uma forte candidata para ser um tratamento alternativo

para o melanoma, por ser um procedimento local não invasivo. Além disso, a capacidade da TFD de ocasionar morte celular imunogênica é um ponto chave para inibir o desenvolvimento da doença. Assim, a Terapia Fotodinâmica pode ter além da capacidade de destruir o tumor primário, acionar o sistema imunitário para reconhecer, rastrear e destruir quaisquer células tumorais remanescentes, sejam elas no local do tumor primário, próximo a ele ou micrometástases distantes.

Dessa maneira, para que a TFD alcance todo o seu potencial como uma imunoterapia é de extrema importância a utilização de um fotossensibilizante eficiente. Logo, o desenvolvimento de nanocarreadores podem aprimorar os efeitos dos fotossensibilizantes, como a nanopartícula AIPcNLS, que foi avaliada neste trabalho. Além disso, a compreensão de quais os mecanismos estão envolvidos na ativação das células imunes e na modulação do microambiente tumoral ocasionado por este tratamento, são essenciais para permitir sua aplicação na clínica.

### **3. Objetivos**

#### **3.1. Objetivos gerais**

Avaliar o potencial da Terapia Fotodinâmica em conjunto com o nanocarreador lipídico contendo o fotossensibilizante Alumínio Cloro Ftalocianina (AIPcNLS), na indução de morte celular imunogênica e na ativação de células dendríticas, em modelo de melanoma (B16-F10) *in vitro*.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Avaliar a viabilidade celular da célula B16-F10 após TFD com AIPcNLS.
- Avaliar a produção de espécies reativas de oxigênio após a terapia fotodinâmica com AIPcNLS em células B16-F10.
- Investigar o potencial de morte celular imunogênica e das citocinas produzidas pelas células tumorais (B16-F10) após tratamento com TFD e AIPcNLS.
- Estudar as alterações na morfologia celular após o tratamento com TFD e AIPcNLS em células B16-F10.
- Avaliar a ativação de células dendríticas co-cultivadas com células tumorais (B16-F10) pós-tratamento com TFD e AIPcNLS, por meio da expressão de moléculas de adesão e de receptores de quimiocinas (CD80, CD86 e MHCII).

- Estudar a produção de citocinas pró e anti-inflamatórias, derivados da co-cultura de células dendríticas com células de melanoma (B16-F10), após o tratamento com TFD e AIPcNLS.

#### 4. Material e Métodos

##### 4.1. Delineamento Experimental

Os experimentos realizados nesse trabalho estão esquematizados na figura 9 abaixo.

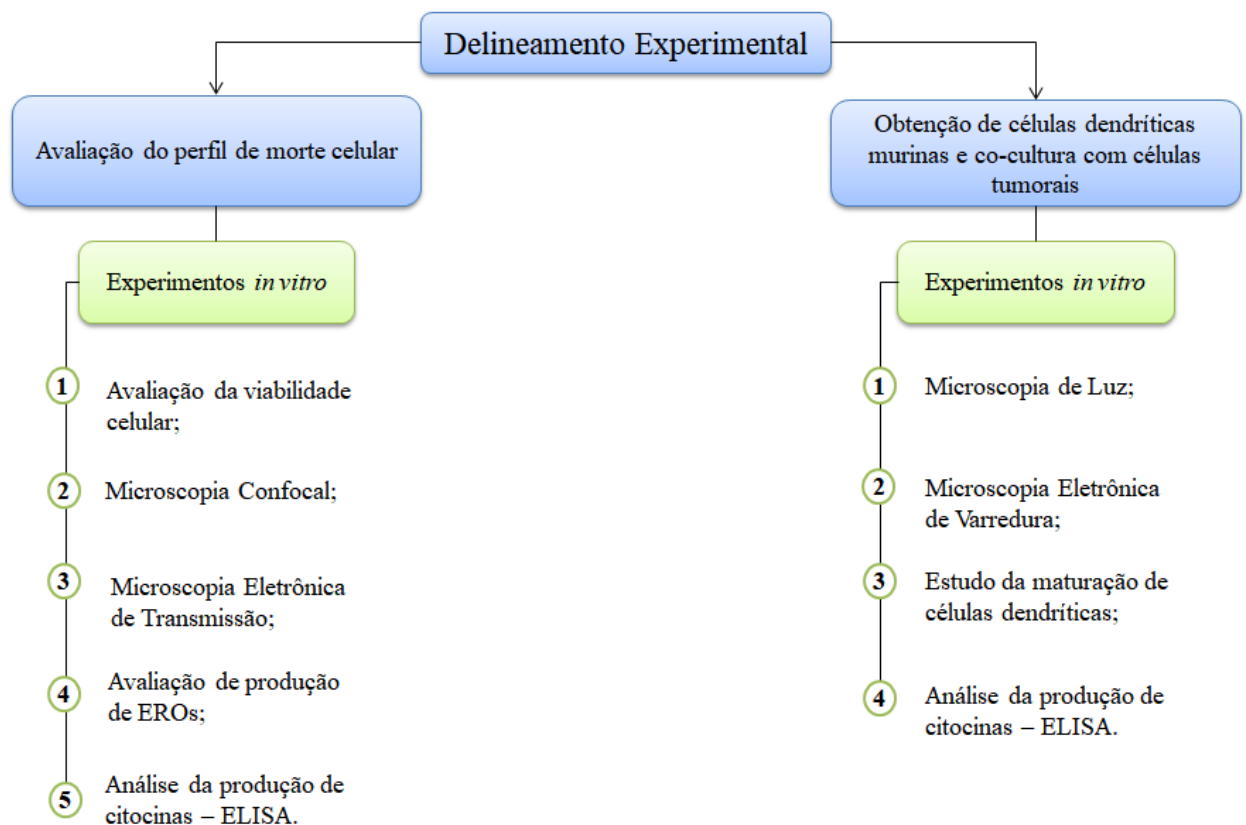


Figura 10. Diagrama do delineamento experimental desenvolvido no trabalho.

##### 4.2. Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS)

As nanopartículas utilizadas durante o projeto foram preparadas de acordo com o processo descrito por Mello *et al.*, (2022)<sup>80</sup>. Nanopartículas lipídicas sólidas foram preparadas pelo método de baixa energia. A manteiga de Murumuru foi selecionada como o lipídio sólido, e o surfactante selecionado foi o Brij™ O10, na proporção de 2:1, o que corresponde a 5% (p/v) da formulação, e a concentração final do fotossensibilizante Alumínio Cloro Ftalocianina (AIPc) foi de 20 µM. Foram analisadas em dois diferentes grupos, nanopartículas lipídicas sólidas com Alumínio Cloro

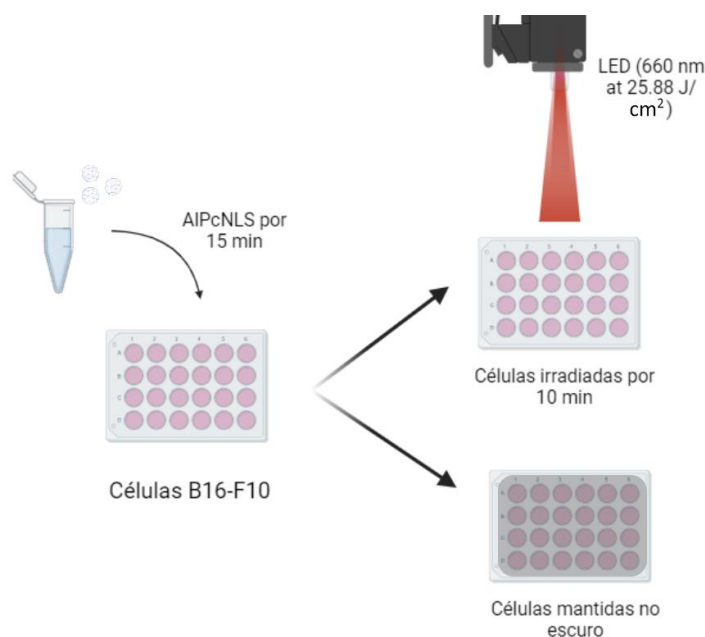
Ftalocianina (AlPcNLS) e nanopartículas lipídicas sólidas sem o fotossensibilizante (NLS-BRANCA).

#### **4.3. Manutenção das linhagens celulares**

A linhagem celular utilizada para o trabalho foi a B16-F10 (melanoma murino), e as células foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 1% de solução antibiótica (100 unidades/mL de penicilina e 100 mg/mL de estreptomicina) e 10% de soro fetal bovino (SFB). As células foram mantidas em incubadora úmida à 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. Os repiques foram realizados por meio da ação proteolítica de solução 0,25% de tripsina-EDTA (Gibco, USA). A contagem de células foi por contagem direta em câmara de Neubauer utilizando-se o método de exclusão por Azul de Tripán (Sigma) para distinção de células viáveis.

#### **4.4. Ensaio de Viabilidade Celular**

Para o ensaio de viabilidade, as células B16-F10 foram tratadas com duas nanopartículas AlPcNLS e NLS-BRANCA, desenvolvidas no Laboratório de Nanotecnologia da Universidade de Brasília e também foi utilizado o fármaco mitoxantrona (MTX), uma vez que, de acordo com a literatura, este fármaco gera morte celular imunogênica<sup>81</sup>. A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio padrão por brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difeniltetrazolium) (MTT) segundo as recomendações do fabricante. Um total de 3x10<sup>3</sup> células B16-F10, por poço, foram semeadas em placas de 96 poços e incubadas overnight a 37°C. Após sua adesão, as células foram tratadas com diferentes concentrações dos nanocarreadores (0,39; 0,78; 1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25 e 50 nM), de mitoxantrona (0,03; 0,07; 0,15; 0,31; 0,62; 1,25; 2,5; 5; 10 e 20 µM) ou foram mantidas apenas com meio de cultivo. Em seguida, as células tratadas com os nanocarreadores por 15 minutos e depois foram mantidas no escuro ou irradiadas por 10 min com luz LED (660 nm a 25,9 J/cm<sup>2</sup> de densidade de energia), como mostra o esquema na figura 11. Após o período de tratamento de 24h, os poços foram incubados por 4h, no escuro e a 37°C, com 150 µL da solução de MTT (0,5 mg/mL em meio de cultura) e em seguida esta solução foi retirada e 200 µL de DMSO foram adicionados em cada um dos poços para a dissolução dos cristais de formazan. As placas foram lidas no espectrofotômetro Spectramax M5 (Molecular Devices – USA).



**Figura 11. Esquema do protocolo da Terapia Fotodinâmica com AIPcNLS para os ensaios de viabilidade celular.**

O ensaio de MTT foi feito em triplicata para cada composto e concentração utilizada e três experimentos independentes foram realizados. A porcentagem de inibição foi determinada comparando a densidade celular das células tratadas com as células controle no mesmo período de incubação.

$$\% \text{ inibição} = \left( \frac{(1 - \text{densidade de células tratadas})}{\text{densidade de células controle}} \right) \times 100$$

#### 4.5. Protocolo da Terapia Fotodinâmica

A terapia fotodinâmica consiste no uso de um sistema de iluminação baseado em matriz de diodo emissor de luz (LED) para irradiar as células, juntamente com o nanocarreador AIPcNLS. Para o tratamento com o TFD as células foram expostas por 15 min ao nanocarreador ( $IC_{50} = 1,7 \text{ nM}$ ). Em seguida, as células foram lavadas duas vezes com PBS e mantidas no escuro ou irradiadas por 10 min com luz LED (660 nm a  $25,9 \text{ J/cm}^2$  de densidade de energia). Os controles positivo para MCI consistiu em células B16F10 tratadas com mitoxantrona ( $IC_{50} = 0,6 \text{ }\mu\text{M}$ ) por 24 horas, como ilustrado da figura 10.

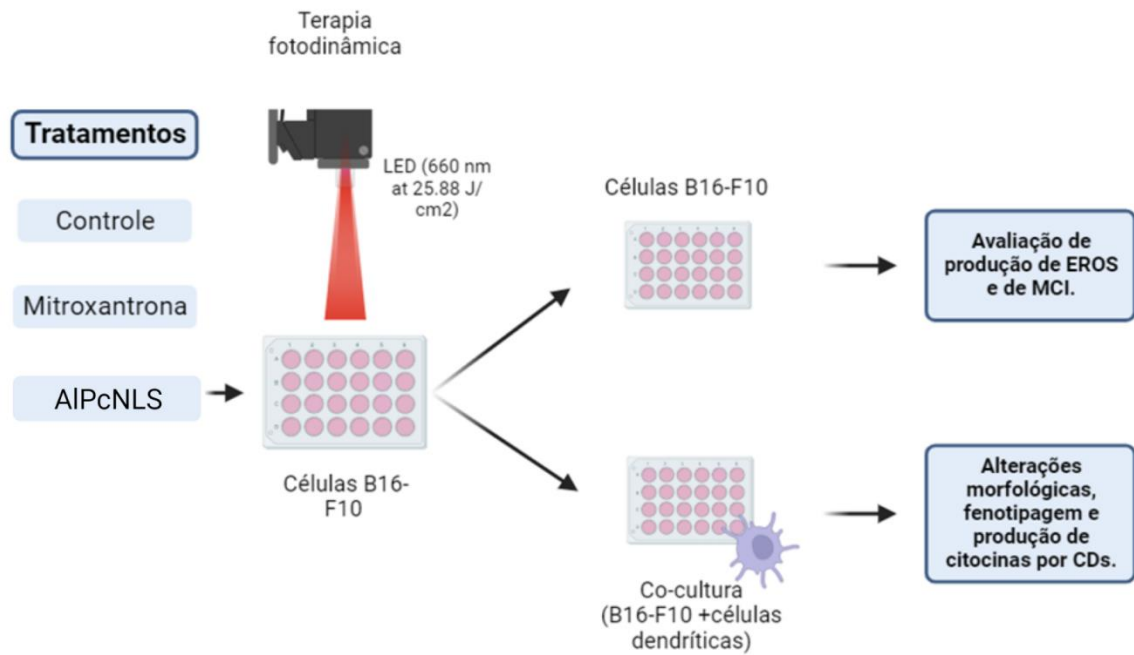


Figura 12. Esquema ilustrativo do protocolo utilizado para a terapia fotodinâmica nos experimentos.

#### 4.6. Quantificação da produção de EROs por Citometria de fluxo

Para a quantificação da produção de EROs após tratamento, foram realizados experimentos utilizando o Cellular ROS Assay Kit (Orange, Abcam) em citômetro de fluxo FACSCalibur (BD, EUA). Foram plaqueadas  $5 \times 10^5$  células em placas de 6 poços que, posteriormente, foram tratadas com TFD (AIPcNLS em 1,7 nM), MTX (0,6  $\mu$ M),  $H_2O_2$  (26mM) como controle positivo, N-acetil-L-cisteína (NAC) (10mM) como controle negativo. Após o tempo de tratamento de 1h, as células foram incubadas com ROS Orange (Ex/m = 540/570nm) por 1h a 37°C. Em seguida, as linhagens passaram pelos processos de desaderência, lavagem em PBS 1X e, somente após essas etapas, foram analisadas por citometria de fluxo.

#### 4.7. Alterações Morfológicas por Microscopia Eletrônica de Transmissão

As células foram plaqueadas em placas de 6 poços com  $1 \times 10^6$ . Após a adesão as células foram tratadas com MTX (0,6  $\mu$ M) ou irradiadas com a TFD (AIPcNLS na concentração de 1,7 nM). Em seguida, as células foram desaderidas dos poços com tripsina, lavadas com PBS e foram fixadas *overnight* em fixador Karnovisk (4% de paraformaldeído e 2% de glutaraldeído em tampão cacodilato de sódio 0.1 M, pH 7,2); lavadas no mesmo tampão; pós-fixadas por 30 minutos em tetróxido de ósmio 1% e

0,8% de ferrocianeto em tampão cacodilato de sódio 0.1 M, pH 7,2; desidratadas gradualmente em acetona (30%-100%) e incluídas com resina Spurr. Os cortes ultrafinos obtidos em ultramicrotomo (Leica Microsystems, Alemanha) foram contrastados em acetato de uranila e analisadas em Microscópio Eletrônico de Transmissão Jeol 1011 (Jeol, USA) a uma tensão de aceleração de 80 kV.

#### **4.8. Avaliação de mediadores de Morte Celular Imunogênica**

##### **4.8.1. Imunomarcção e Microscopia Confocal**

Imunomarcção de HMGB1 e de Calreticulina, para analisar a liberação ou o aumento de Padrões Moleculares Associados a Danos (DAMPs) devido ao tratamento com a Terapia Fotodinâmica. Foi feita a marcação das células com anticorpo anti-HMGB1 ou anti-calreticulina.  $1 \times 10^5$  células B16-F10 foram semeadas sobre lamínulas redondas em placas de 24 poços. Após a adesão, as células receberam ou não o tratamento da Terapia Fotodinâmica (AIPcNLS na concentração de 1,7 nM) ou Mitoxantrona na concentração de 0,6  $\mu\text{M}/\text{mL}$ . Após 24 horas, as células foram lavadas com PBS, fixadas com formaldeído 3,7% por 30 min. A solução de bloqueio (leite desnatado 1%, albumina sérica bovina (BSA) 2,5%, soro fetal bovino (SFB) 8% em PBS) foi adicionada e deixada por 20 min e logo após, as células foram incubadas com anticorpo primário de camundongo anti-HMGB1 ou anti-calreticulina, overnight a 4°C. Os poços foram lavados com PBS e o anticorpo secundário Alexa-488 ou Alexa-647 anti-camundongo (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), respectivamente, foram adicionados por 1h a 37°C protegido da luz. Os poços foram então lavados com PBS e incubados por 5 min com DAPI (300 nM) para marcação do DNA celular. Então os poços foram lavados com PBS e as lâminas foram montadas com ProLong Gold Antifade e analisadas em Microscópio Confocal de Varredura a Laser TCS SP5 (Leica Microsystems, Alemanha).

##### **4.8.2. Imunomarcção e Microscopia Eletrônica de Transmissão**

Para observar a organização da calreticulina após o tratamento com TFD,  $2 \times 10^6$  células foram semeadas em placas de 6 poços e tratadas com AIPcNLS na concentração de 1,7nM e com MTX na concentração de 0,6 $\mu\text{M}$  por 24h, enquanto o controle não recebeu nenhum tratamento. As células foram fixadas (4% de paraformaldeído, 0,5% de glutaraldeído e 0,2% de ácido pícrico em tampão cacodilato

de sódio 0.1 M, pH 7,2), a 4°C por 2h. O material foi lavado com tampão cacodilato de sódio e imerso em solução bloqueio (50mM de cloreto de amônia) duas vezes por 30 minutos. Logo após, foi adicionado acetato de uranila 2% em 15% de acetona nas amostras no escuro por 2 horas. Em seguida, as células foram desidratadas em acetona (30%-90%) a 4°C e embebidas em LR Gold em -20°C sob luz ultravioleta. Secções ultrafinas de 50 nm a 70 nm foram obtidas com facas de diamante em ultramicrotomo (Leica Microsystems, Wien, Áustria). As seções foram montadas em telas de níquel. Depois as amostras foram imersas em solução bloqueio (1% de BSA e 0,01% de Tween 20) por 1 hora em temperatura ambiente. A imunomarcção foi realizada com anticorpo primário anti-calreticulina e anticorpo secundário conjugado com ouro 10nm. As amostras foram examinadas em microscópio eletrônico de transmissão Jeol 1011 (Jeol, MA, EUA) a uma tensão de aceleração de 80 kV.

#### **4.9. Análise da produção de citocinas por células B16-F10 tratadas com TFD**

Células tumorais ( $5 \times 10^4$ ) foram plaqueadas em placas de 24 poços e após 24 horas foram tratadas com TFD (AIPcNLS em 1,7 nM), ou mantidas no escuro e tratadas com MTX (0,6  $\mu$ M) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (26mM). Após o tratamento, os sobrenadantes foram coletados a fim de fazer um mapeamento da produção de citocinas estimulada pela terapia, por meio Kit ELISA. As citocinas IL-12 e IL-10 foram analisadas com kits comerciais da BD Biosciences e conforme as especificações dos protocolos elaborados pelo fabricante. Os valores de absorbância foram gerados a partir da leitura no espectrofotômetro (Varioskan - ThermoFisher, EUA), em um comprimento de onda de 450nm. A determinação da concentração das citocinas foi realizada utilizando as curvas padrão específicas para cada uma delas, apresentadas em valores absolutos em picogramas por mililitro (pg/mL).

#### **4.10. Obtenção de células precursoras e cultura de população enriquecidas em células dendríticas**

As células dendríticas (CDs) foram obtidas da medula óssea de camundongos C57BL/6. A manipulação dos animais foi realizada de acordo com as diretrizes do Comitê de Ética no Uso Animal do Instituto de Ciências Biológicas – CEUA/IB (046/19). Para a realização do estudo *in vitro*, células de medula óssea isoladas de fêmures e tíbias foram cultivadas por 7 dias a uma densidade de  $2 \times 10^6$  por placa de 10



em (10 ml) em meio doravante denominado "meio de diferenciação completa". Este meio de cultivo consiste em RPMI suplementado com SFB a 10% (PAA Laboratories), antibiótico 1% v/v (penicilina 10.000 unidades/mL, estreptomicina 10.000 µg/mL Gibco), GM-CSF (20 ng/mL - Sigma-Aldrich), B-mercaptoetanol (50µM -Sigma-Aldrich) e IL-4 (20 ng/mL - Sigma-Aldrich). As células foram mantidas em placas de petri estéreis, em uma incubadora umidificada, com 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar e na temperatura de 37 °C. No dia 3, foi adicionado mais 10 mL de meio de diferenciação completo fresco. As células foram diferenciadas por mais 4 dias. Após esse período, as células flutuantes foram examinadas separadamente quanto às suas expressões de CD11c, marcador de superfície, por citometria de fluxo FACSCalibur (BD, EUA).

#### **4.11. Análises Morfológicas do co-cultivo**

##### **4.11.1. Microscopia de Luz**

Para avaliar as alterações morfológicas nas células dendríticas em co-cultivo com a linhagem B16-F10, 5x10<sup>4</sup> células de B16-F10 foram semeadas em placas de 24 poços. Após a adesão das células elas foram tratadas com TFD (AIPcNLS = 1,7nM), MTX (0,6 µM), LPS (1µg/mL) como controle positivo para a ativação das células dendríticas. Logo após o tratamento foram adicionadas as células dendríticas em uma proporção de 1:1, as células permaneceram em uma estufa úmida a 37°C acoplada ao Microscópio Evos (Thermo Fisher Scientific, USA), o qual foi utilizado para as análises, por meio de time lapse durante o período de 24h, com 10x de aumento.

##### **4.11.2. Microscopia Eletrônica de Varredura**

A fim de analisar as diferenças morfológicas presentes na superfície celular em decorrência da terapia fotodinâmica, as células tumorais e células dendríticas foram analisadas em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV). Inicialmente, 5x10<sup>4</sup> células tumorais foram plaqueadas em lamínulas 18x18 mm colocadas em placas de 6 poços. No dia seguinte, as células foram tratadas com TFD (AIPcNLS = 1,7nM) e em seguida foi realizado o co-cultivo com as células dendríticas. Após 15, 30, 45 minutos e 24 horas do co-cultivo, foi feito descarte do meio de cultivo e do tratamento e as células passaram pelo processo de lavagem. A seguir, foram fixadas em 2% de paraformaldeído, 2% de glutaraldeído em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2 overnights à 4°C. Posteriormente ao descarte do fixador, as linhagens foram lavadas

com tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pós-fixadas, por 30 min, com tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2. As células passaram por uma desidratação seriada com concentrações crescentes de acetona (30%-100%), pela secagem ao ponto crítico CPD 030 (BALZERS, EUA) e metalização SCD 500 (LEICA, Germany) e foram analisadas no Microscópio Eletrônico de Varredura JSM-7001F (JEOL, Japan).

#### **4.12. Estudo da ativação da população enriquecida em células dendríticas**

Para o estudo da maturação das células dendríticas, as células foram co-cultivadas com células B16-F10 tratadas com TFD (AlPcNLS = 1,7nM), MTX (0,6  $\mu$ M), LPS (1 $\mu$ g/mL) como controle positivo para perfil pro-inflamatório, por 24 horas em uma proporção de 1:1 a 37 °C (total de células =  $1 \times 10^6$ ). Após esse período de co-cultivo as células foram desaderidas por meio do espalhador de células (SCRAPER), lavadas com PBS 1X, foi adicionado a solução bloqueio (2,5% de BSA) por 15min. Em seguida, as células foram marcadas com os anticorpos anti-CD11c, CD86, CD80 e MHCII por 1 hora no gelo e analisadas por citometria de fluxo. O marcador anti-CD11c foi utilizado para fazer a seleção de gate da população enriquecida em células dendríticas e os demais marcadores foram analisados dentro desta subpopulação selecionada.

#### **4.13. Análise da produção de citocinas por células dendríticas após a co-cultura com células tumorais tratadas com TFD**

Células tumorais ( $5 \times 10^5$ ) foram plaqueadas em placas de 6 poços e após 24 horas foram tratadas com MTX (0,6  $\mu$ M), mantidas no escuro ou tratadas com TFD (AlPcNLS = 1,7nM). Após o tratamento células dendríticas foram adicionadas nos poços, em uma proporção de 1:1, pelos tempos de 24 horas. Como controle positivo para ativação de um perfil pró-inflamatório das células dendríticas, as células foram tratadas com LPS (1 $\mu$ g/mL) por 24h. Em seguida, ao término do tempo estipulado para a co-cultura, os sobrenadantes foram coletados a fim de fazer um mapeamento da produção de citocinas estimulada pelos tratamentos, utilizando o Kit ELISA. As citocinas IL-12, IL-10, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  foram analisadas com kits comerciais da BD Biosciences e conforme as especificações dos protocolos elaborados pelo fabricante. Os valores de absorbância foram gerados a partir da leitura no espectrofotômetro (Varioskan - ThermoFisher, EUA), em um comprimento de onda de 450nm. A

determinação da concentração das citocinas foi realizada utilizando as curvas padrão específicas para cada uma delas, apresentadas em valores absolutos em picogramas por mililitro (pg/mL).

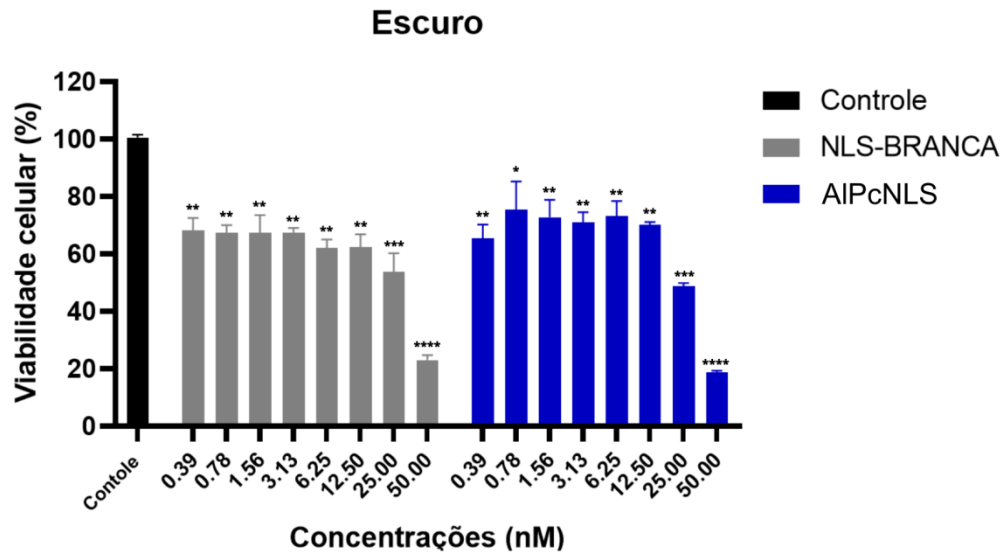
#### **4.14. Análises Estatísticas**

Os dados das análises foram submetidos à análise de variância (ANOVA). As análises estatísticas foram conduzidas utilizando o Software GraphPad Prism 9 e os resultados com a média +/- SEM. Os valores de  $P < 0.05$  foram considerados estatisticamente significativos.

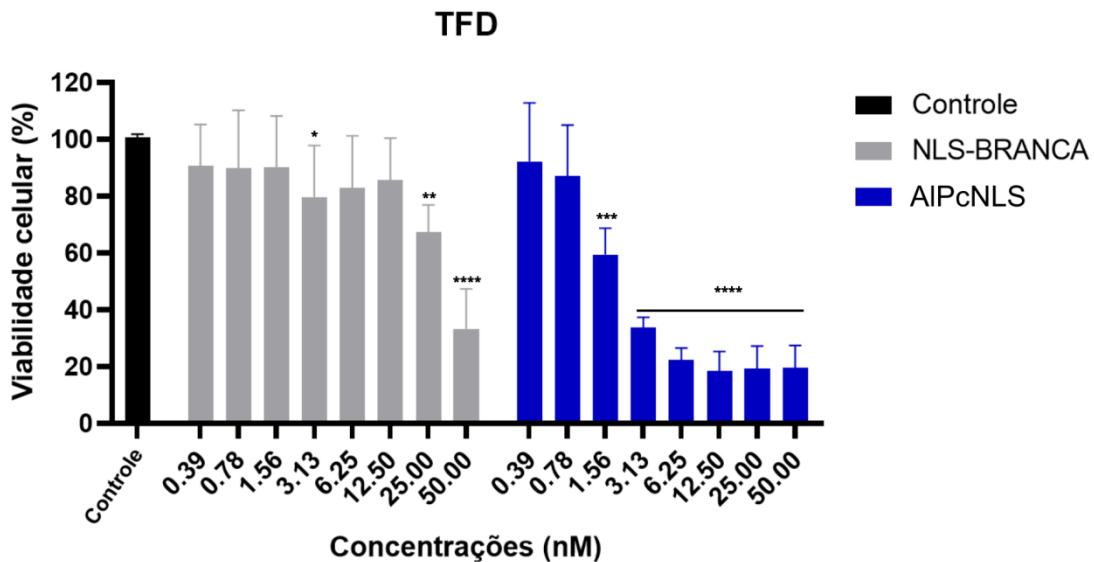
### **5. Resultados**

#### **5.1. Ensaio de Viabilidade Celular**

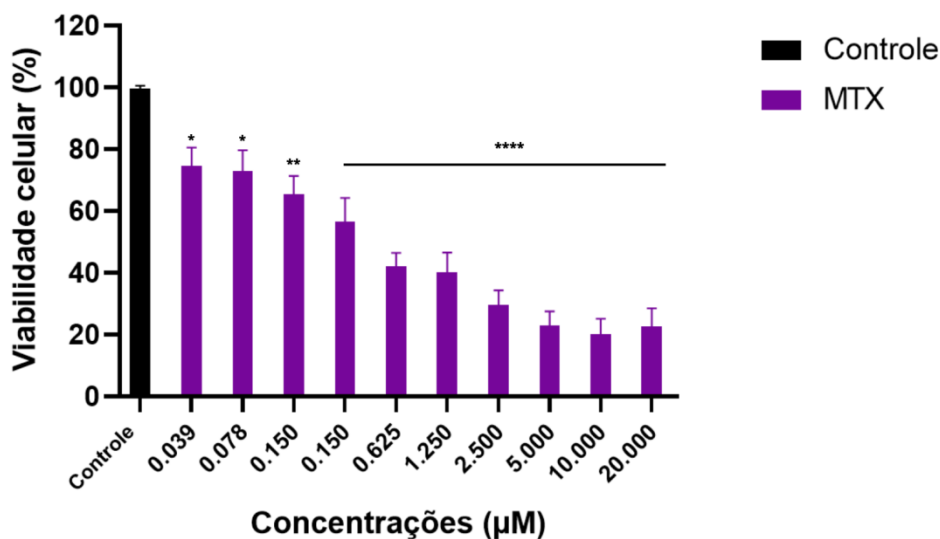
A fim de investigar o potencial da nanopartícula para o seu uso na Terapia Fotodinâmica, foi realizado o ensaio de MTT em células B16F10 para avaliar a citotoxicidade da AIPcNLS e do MTX. Os resultados foram comparados com o grupo controle e a NLS-BRANCA também foi avaliada. As células foram tratadas com as nanoestruturas nas concentrações 0,39; 0,78; 1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25 e 50 nM equivalentes de Alumínio Cloro Ftalocianina, após 15 minutos um grupo foi mantido no escuro (Figura 13) e o outro grupo foi irradiado por 10 min com luz LED (660 nm a  $25,9 \text{ J/cm}^2$  de densidade de energia) (Figura 14). Para as análises da NLS-BRANCA, foi feito diluições nos volumes equivalentes utilizados para o tratamento com a AIPcNLS. Também foi realizado o teste de MTT para o fármaco MTX, que foi utilizado como controle positivo para morte celular imunogênica. As concentrações testadas foram de 0,03; 0,07; 0,15; 0,31; 0,62; 1,25; 2,5; 5; 10 e 20  $\mu\text{M}$  (Figura 15). Todas as análises de viabilidade celular foram feitas 24h após os tratamentos.



**Figura 13. Análise da viabilidade celular da B16-F10 por MTT tratadas com NLS-BRANCA e AIPcNLS após 24h.** Gráfico de viabilidade da linhagem B16-F10 após os tratamentos NLS-BRANCA e AIPcNLS após 24 horas de tratamento. As barras representam a viabilidade celular em percentual após os tratamentos nas concentrações indicadas. Os dados representam a média  $\pm$  SEM de três experimentos independentes em triplicata \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$  e \*\*\*\* $P < 0,0001$  comparados ao controle não tratado.



**Figura 14. Análise da viabilidade celular da B16-F10 por MTT após Terapia fotodinâmica com NLS-BRANCA e AIPcNLS após 24h.** Gráfico de viabilidade da linhagem B16-F10 após o tratamento com a Terapia fotodinâmica, com o uso de NLS-BRANCA e AIPcNLS após 24 horas de tratamento. As barras representam a viabilidade celular em percentual após os tratamentos nas concentrações indicadas. Os dados representam a média  $\pm$  SEM de três experimentos independentes em triplicata \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$  e \*\*\*\* $P < 0,0001$  comparados ao controle não tratado.



**Figura 15. Gráfico de viabilidade da linhagem B16-F10 após o tratamento com Mitoxantrona após 24 horas de tratamento.** Gráfico de viabilidade da linhagem B16-F10 após o tratamento com Mitoxantrona após 24 horas de tratamento. As barras representam a viabilidade celular em percentual após os tratamentos nas concentrações indicadas. Os dados representam a média  $\pm$  SEM de três experimentos independentes em triplicata \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$  e \*\*\*\* $P < 0,0001$  comparados ao controle não tratado.

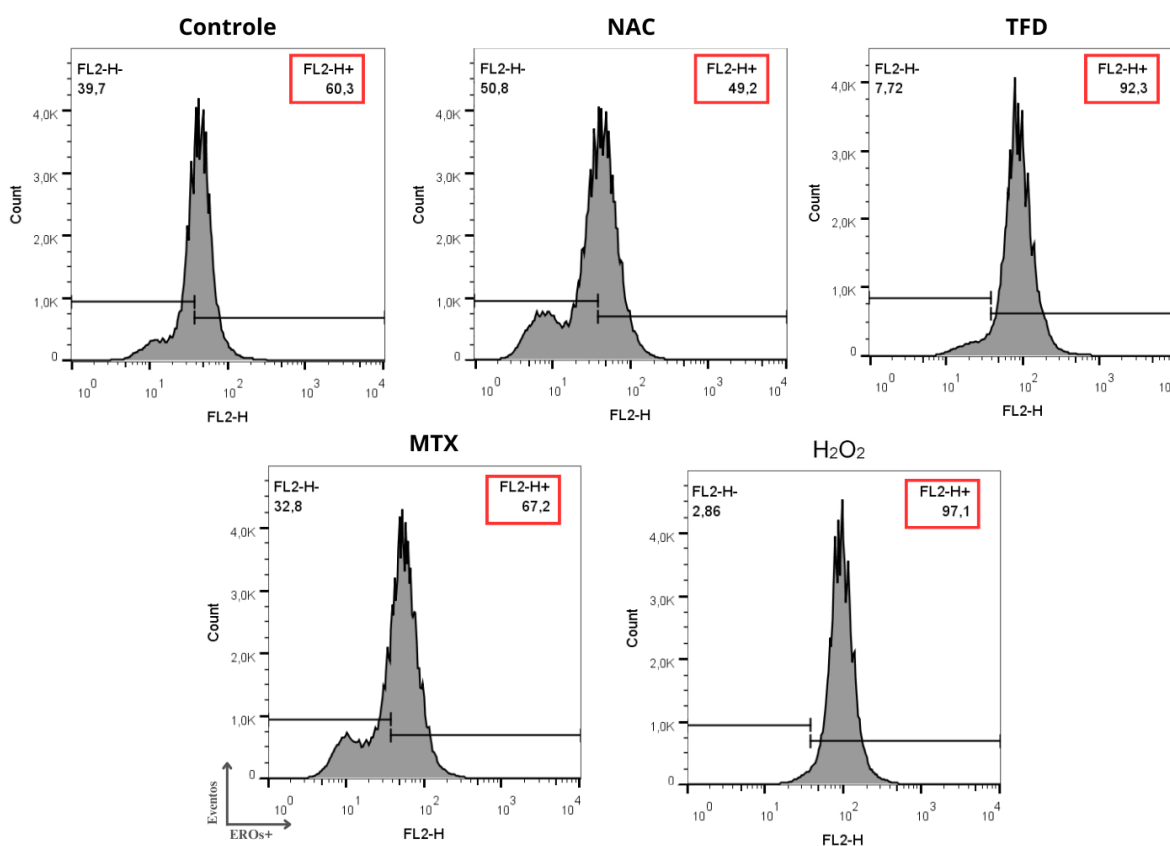
Os resultados mostraram que a NLS-BRANCA possui baixa citotoxicidade *in vitro* e a AIPcNLS, quando mantida no escuro, manteve o mesmo padrão que o nanocarreador sem o fotossensibilizante. Quando irradiada a NLS-BRANCA não reduziu significativamente a viabilidade celular ao comparar com a AIPcNLS. Logo, é possível evidenciar que a nanoestrutura contendo o fotossensibilizante resultou na diminuição da viabilidade celular de modo significativo apenas quando irradiado, o que reforça a hipótese de que o fotossensibilizante só se torna tóxico quando excitado pelo LED e que a NLS-BRANCA é um bom nanocarreador.

Após as análises, foi calculado o valor necessário para reduzir a população de células em 50% ( $IC_{50}$ ), os valores obtidos para AIPcNLS foi de 1,7 nM e de MTX foi 0,6  $\mu$ M, essas concentrações foram usadas nos tratamentos posteriores pois permitiria avaliar a diferença entre os diferentes tratamentos.

## 5.2. Quantificação da produção de EROs por Citometria de fluxo.

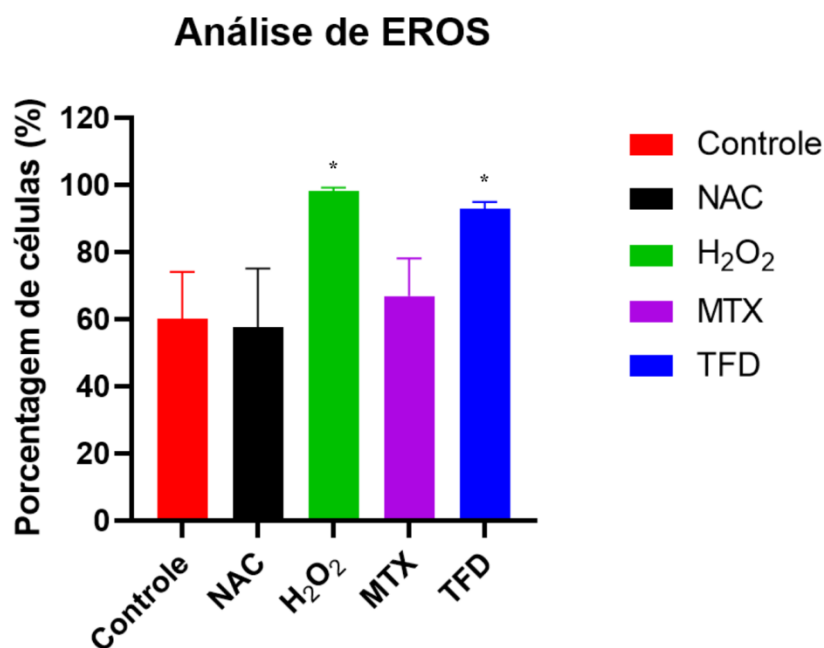
A Terapia Fotodinâmica está intrinsecamente ligada à geração de espécies reativas de oxigênio (EROs). Portanto, a quantificação da produção de EROs desempenha um papel fundamental na compreensão do mecanismo de ação do nanossistema

desenvolvido. A avaliação da produção de EROs foi conduzida utilizando citometria de fluxo, duas horas após a aplicação do tratamento. Foi utilizado peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) como controle positivo e N-acetil-L-cisteína (NAC) como controle negativo (Figura 16).



**Figura 16. Histograma de produção de EROs por B16-F10 após tratamentos.** Histograma representativo da produção de espécies reativas de oxigênio das B16-F10 pré e pós tratamentos. As células foram tratadas com NAC (controle negativo),  $H_2O_2$  (controle positivo), Terapia fotodinâmica (TFD) e Mitoxantrona (MTX).

Na Figura 17 observa-se que nas células B16F10, a produção de EROs apresenta maior pico no grupo tratado com  $H_2O_2$  e em seguida no grupo tratado com TFD. Desse modo, a Terapia Fotodinâmica se assemelhou com o resultado do grupo usado como controle positivo, em comparação com o controle, para um aumento de espécies reativas de oxigênio.



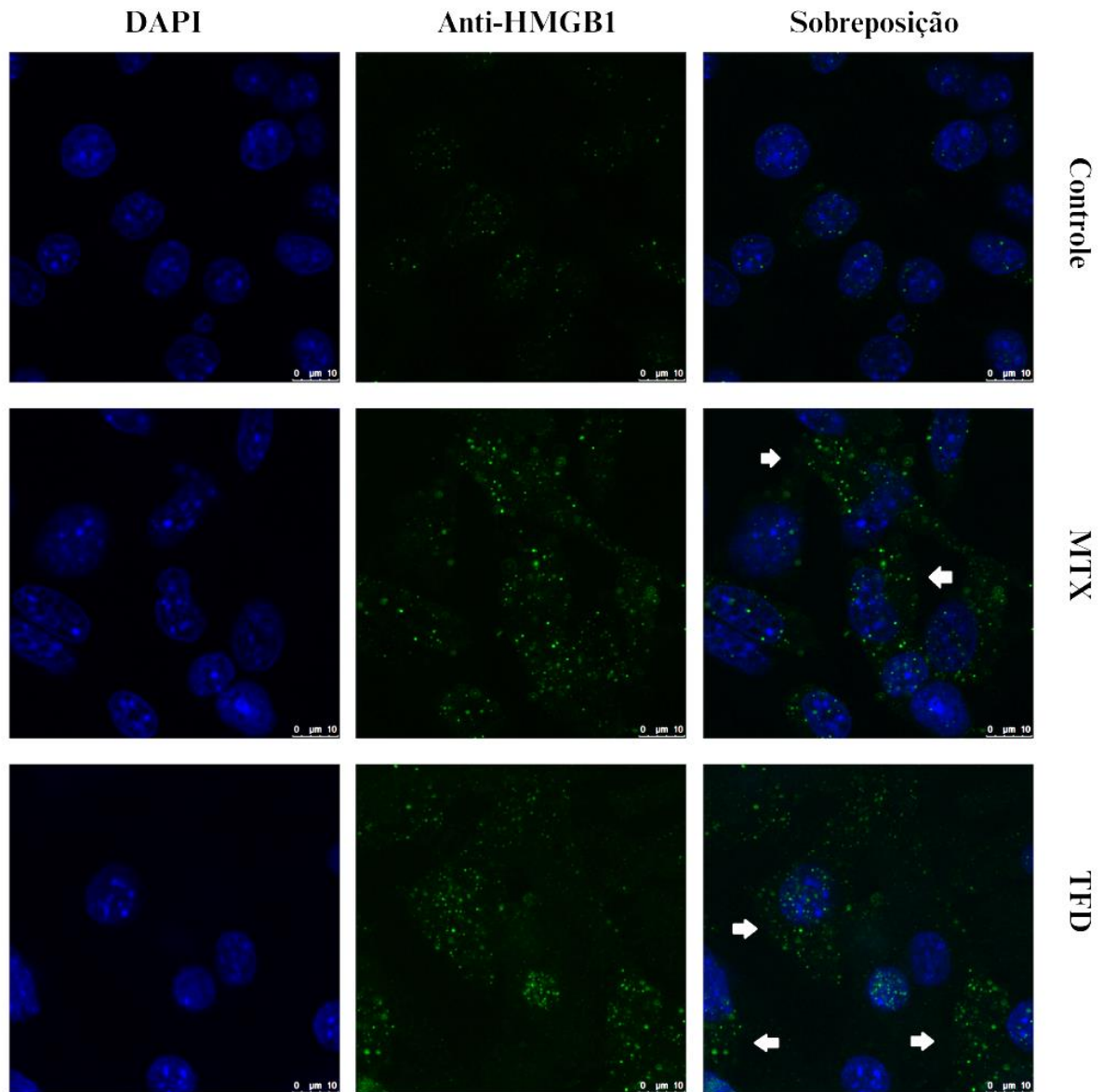
**Figura 17. Análise de produção de EROs da B16-F10 após tratamentos.** Quantificação do percentual de células em cada tratamento após 2 horas. As células foram tratadas com NAC (controle negativo), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (controle positivo), Terapia fotodinâmica (TFD) e Mitoxantrona (MTX). Os resultados apresentados são de três experimentos independentes, com a porcentagem média de células em cada tratamento  $\pm$  SEM. \* P < 0.05 quando comparado ao controle.

### 5.3. Avaliação de mediadores de morte celular imunogênica e alterações morfológicas por Microscopia Eletrônica de Transmissão

O tipo de morte celular influencia diretamente nas mudanças do microambiente tumoral e no sistema imunitário. Desse modo, foram realizados experimentos para analisar o potencial da terapia fotodinâmica com AIPcNLS na indução de morte celular imunogênica. Dentre os padrões moleculares associados a danos, foram escolhidas duas proteínas principais que estão correlacionadas com a ativação de células dendríticas, a calreticulina e a proteína de alta mobilidade box 1 (HMGB1).

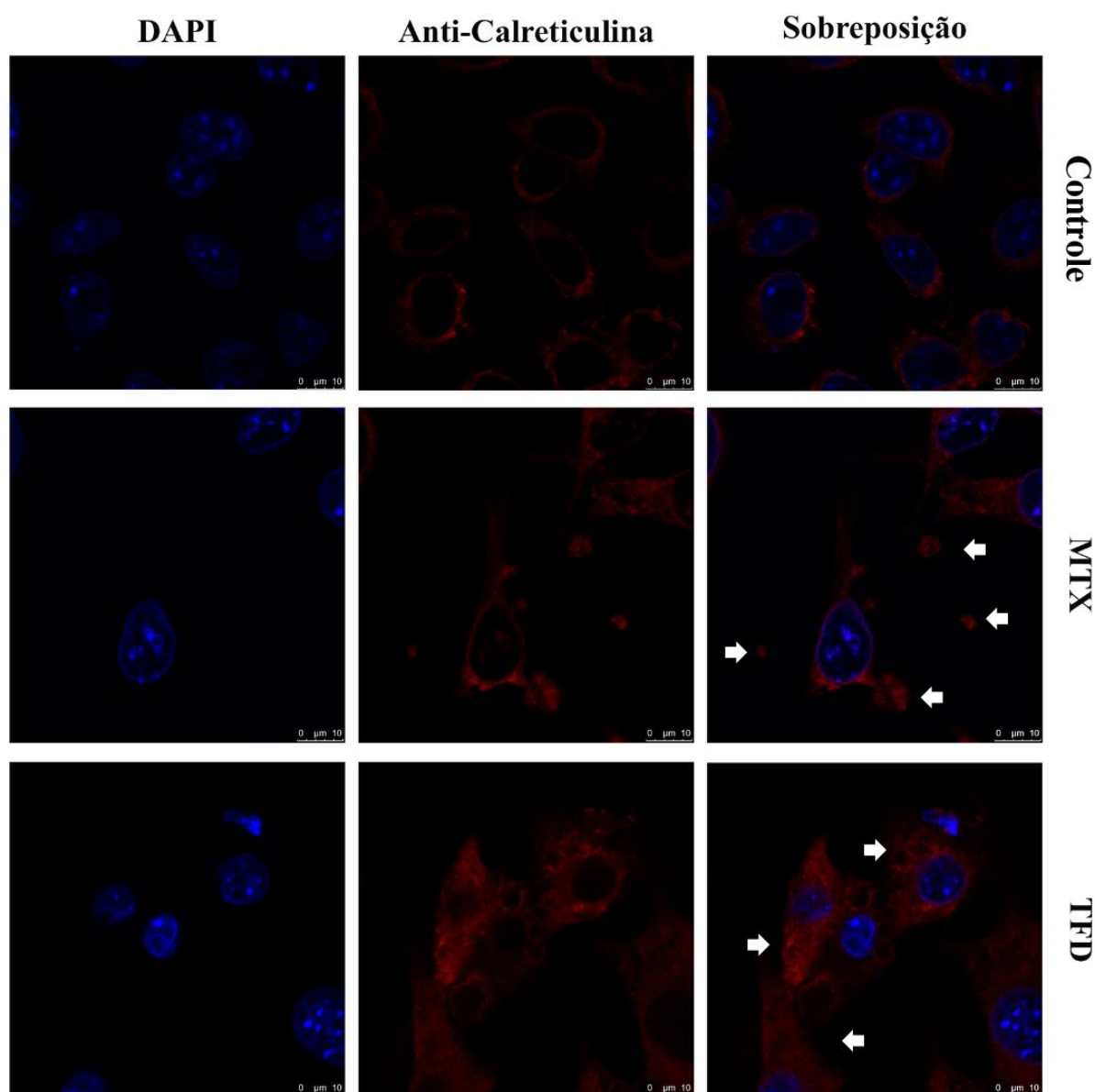
Os resultados de Microscopia Confocal após 24h de tratamento, mostraram que houve um extravasamento da proteína HMGB1, marcada em verde, do núcleo da célula para o citoplasma, nos grupos tratados com TFD e MTX (Figura 18). Já nas imagens obtidas das células marcadas com anti-calreticulina foi possível observar uma alteração no padrão de marcação de proteína. No grupo controle, a proteína marcada em vermelho se encontra mais peri-nuclear e nos grupos tratados é notória um aumento da intensidade e fluorescência mais perto da membrana celular. Além disso, o grupo tratado

com TFD apresenta alterações no arranjo estrutural da célula e o tratado com MTX apresentou formação de vesículas com calreticulina (Figura 19).



**Figura 18. Imunomarcagem de HMGB1 em B16-F10 após 24 horas de tratamento.** DAPI marcando o núcleo de azul, o verde marcando a proteína HMGB1 e a sobreposição das duas marcações. As setas indicam o extravasamento de HMGB1 para fora do núcleo e a sua presença no citoplasma celular.

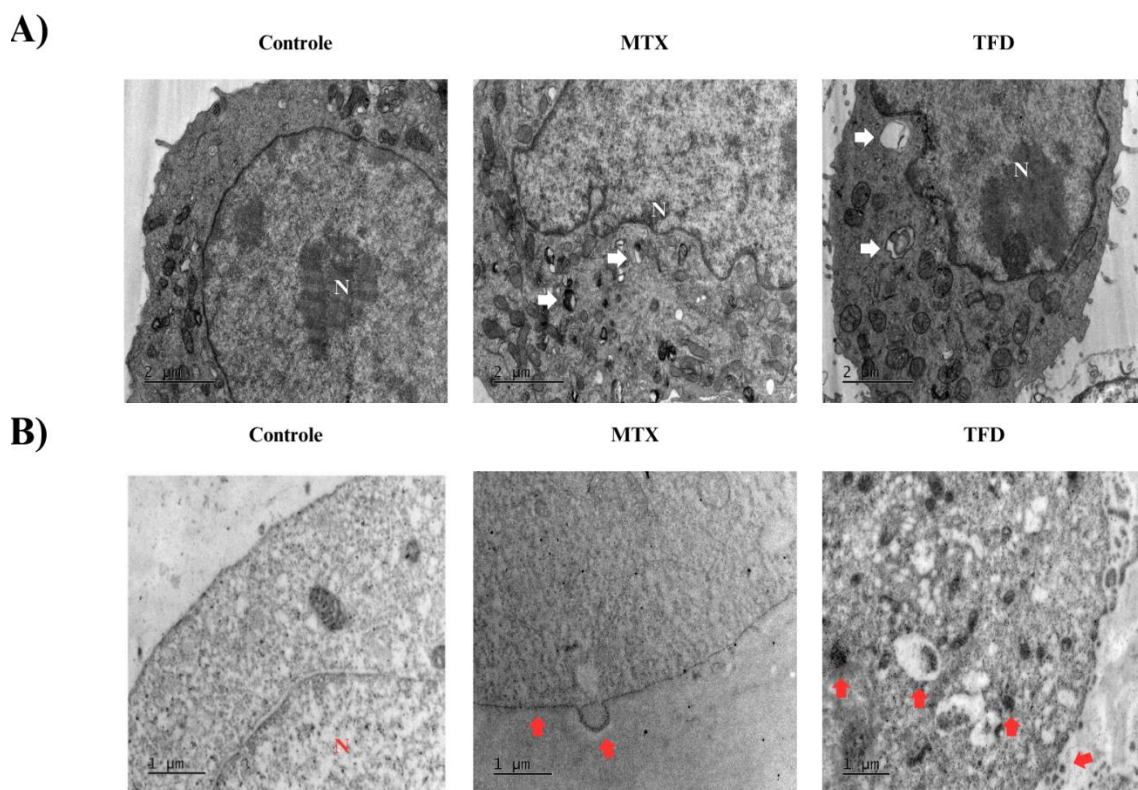




**Figura 19. Imunomarcção de calreticulina em B16-F10 após 24 horas de tratamento.** DAPI marcando o núcleo de azul, o vermelho marcando a proteína calreticulina e a sobreposição das duas marcações. As setas indicam o aumento da presença da calreticulina nas proximidades da membrana plasmática das células e a formação de vesículas contendo esta proteína.

Para investigar mais detalhadamente as alterações celulares provocadas pelos tratamentos e o padrão de localização de calreticulina foram realizados ensaios de Microscopia Eletrônica de Transmissão. Na Figura 20.A é visível a formação de autofagossomos em ambos os grupos tratados, tanto com TFD quanto com MTX. Nas micrografias com imunomarcção (Figura 20.B), foi possível observar que no grupo tratado com a Terapia Fotodinâmica há um acúmulo de calreticulina em regiões do citoplasma, que posteriormente se desloca para a exposição desta proteína na membrana celular. Nas células tratadas com MTX, também foi possível ver o acúmulo da

calreticulina na membrana celular, juntamente com a formação de vesículas contendo essa proteína. Essas vesículas podem desempenhar um papel sinalizador para as outras células presentes no microambiente tumoral.

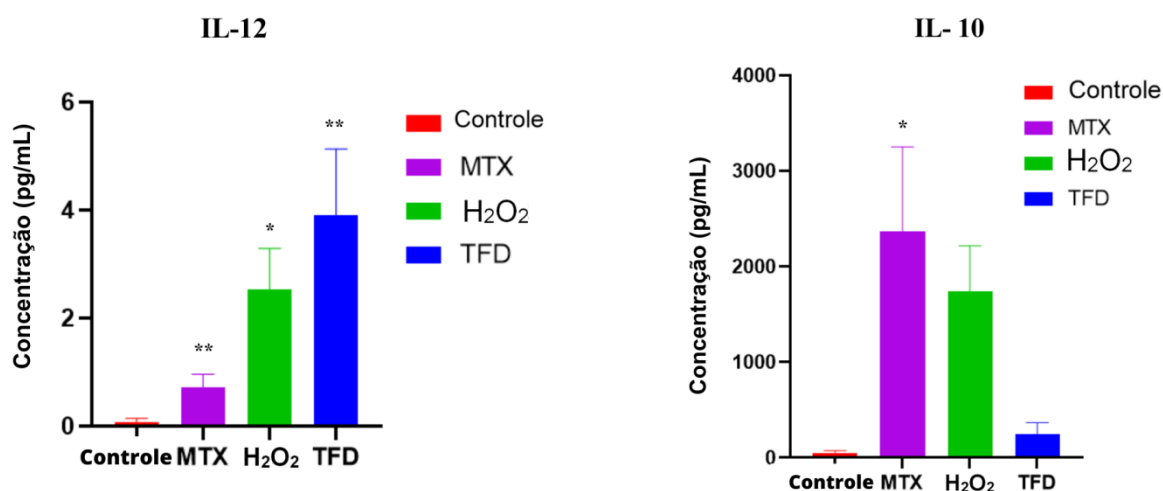


**Figura 20. Análise de alterações morfológicas e imunomarcção por Microscopia Eletrônica de Transmissão de células B16-F10 após 24h de tratamento.** Imagens obtidas por meio de Microscopia Eletrônica de Transmissão após 24 horas dos tratamentos com Terapia fotodinâmica (TFD) e Mitoxantrona (MTX) de células B16-F10. A) Observação de autofagossomos após os tratamentos, indicados nas setas brancas. B) Imunomarcção para a proteína calreticulina, as setas vermelhas indicam o deslocamento desta proteína para a membrana celular das células B16-F10 após os tratamentos. O N indica o núcleo celular.

#### 5.4. Análise da produção de citocinas por células B16-F10 tratadas com TFD

As citocinas presentes no microambiente tumoral são de extrema importância e podem estar correlacionadas com a progressão do tumor, a evasão da resposta imune e o potencial metastático. Logo, a fim de compreender melhor quais as alterações que a Terapia Fotodinâmica pode gerar no padrão de expressão de citocinas foram realizados Ensaio Imunoenzimático de Ligação (ELISA) das citocinas IL-12 e IL-10. A citocina IL-12 estimula a resposta imune, principalmente a ativação de células dendríticas e uma

resposta Th1. Já a citocina IL-10 inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias e reduz a ativação de células do sistema imune.



**Figura 21. Análise da produção de citocinas por células B16-F10 após 24h de tratamento.** Quantificação de citocinas após o tratamento de 24 horas com Terapia Fotodinâmica (TFD), Mitoxantrona (MTX) e com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ocorreu um aumento significativo da produção de IL-12 no grupo TFD e um pequeno aumento na produção de IL-10, contudo não foi significativo ao comparar com o controle. Os dados representam a média ± SEM de três experimentos independentes em triplicata \*P<0,05 e \*\*P<0,01 comparados ao controle não tratado.

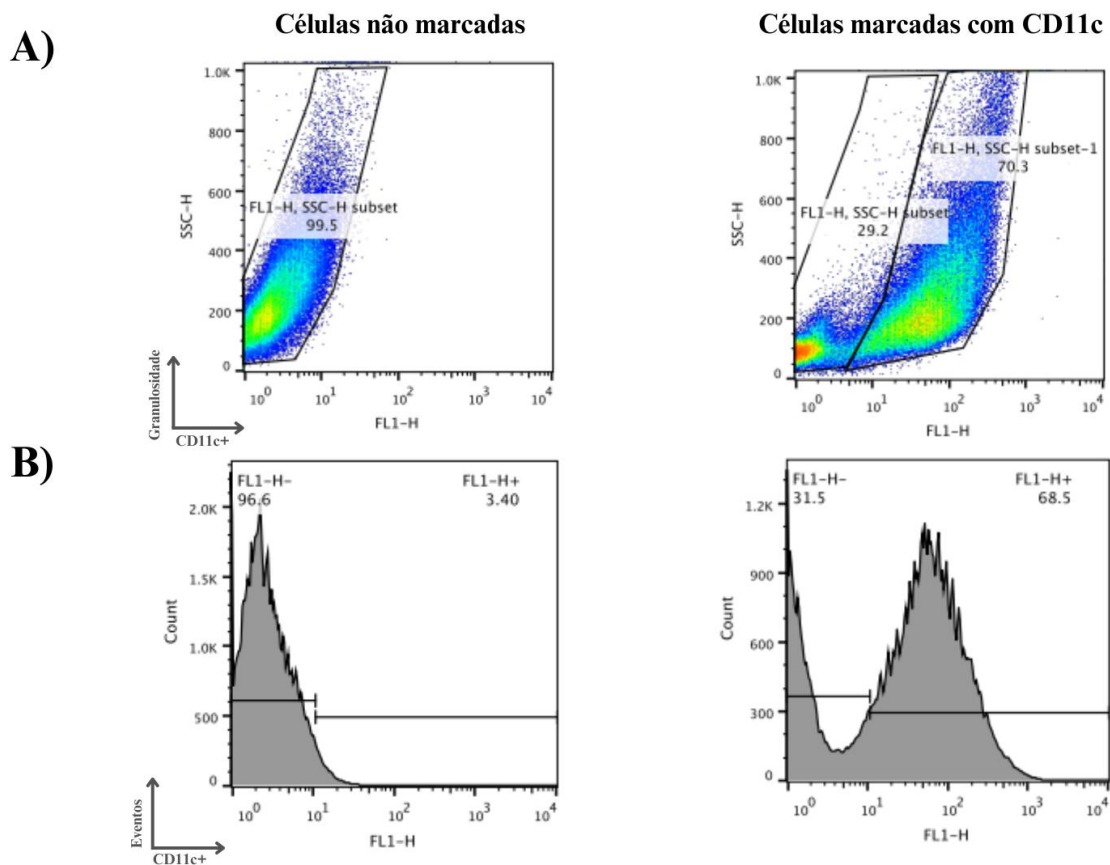
Nos resultados obtidos, foi evidente que houve um aumento da citocina IL-12 no tratamento com TFD (Figura 21). O nível de concentração desta citocina no grupo tratado com TFD foi maior que o nível de concentração do grupo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que foi utilizado como controle positivo. Contudo o valor da concentração de IL-12 ficou a baixo da curva de calibração do kit, o que pode demonstrar uma tendência, mas não são valores significativos. Já o grupo de células B16F10 tratadas com Terapia Fotodinâmica apresentou uma baixa concentração de IL-10, comparado com os grupos de MTX e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mas não apresentou diferença significativa comparado com o grupo não estimulado.

### 5.5. Obtenção de células precursoras e cultura de população enriquecida em células dendríticas

As células dendríticas (CDs) foram obtidas da medula óssea de camundongos C57BL/6. Para a realização do estudo *in vitro*, células de medula óssea isoladas de fêmures e tíbias foram cultivadas por 7 dias de acordo com a descrição presente na metodologia. Após esse período, as células flutuantes foram examinadas separadamente quanto às suas expressões de CD11c, marcador de superfície, por citometria de fluxo

FACSCalibur (BD, EUA). O CD11c é uma subunidade do integrina CR4, que é uma proteína envolvidas na aderência celular e na sinalização presente em células do sistema imunológico, principalmente em células dendríticas e macrófagos<sup>82</sup>. Logo, o marcador para CD11c é frequentemente usado para identificar e isolar subpopulações de células dendríticas<sup>83</sup>.

Foram realizados três ensaios independentes e na Figura 22 observa-se que em média 70% das células analisadas apresentaram um aumento na expressão de CD11c, o que indica o processo de diferenciação celular de células precursoras da medula óssea em células dendríticas imaturas. O resultado de diferenciação e de cultivo celular obtidos foram considerados satisfatórios e o mesmo protocolo foi utilizado para os demais testes realizados neste estudo.



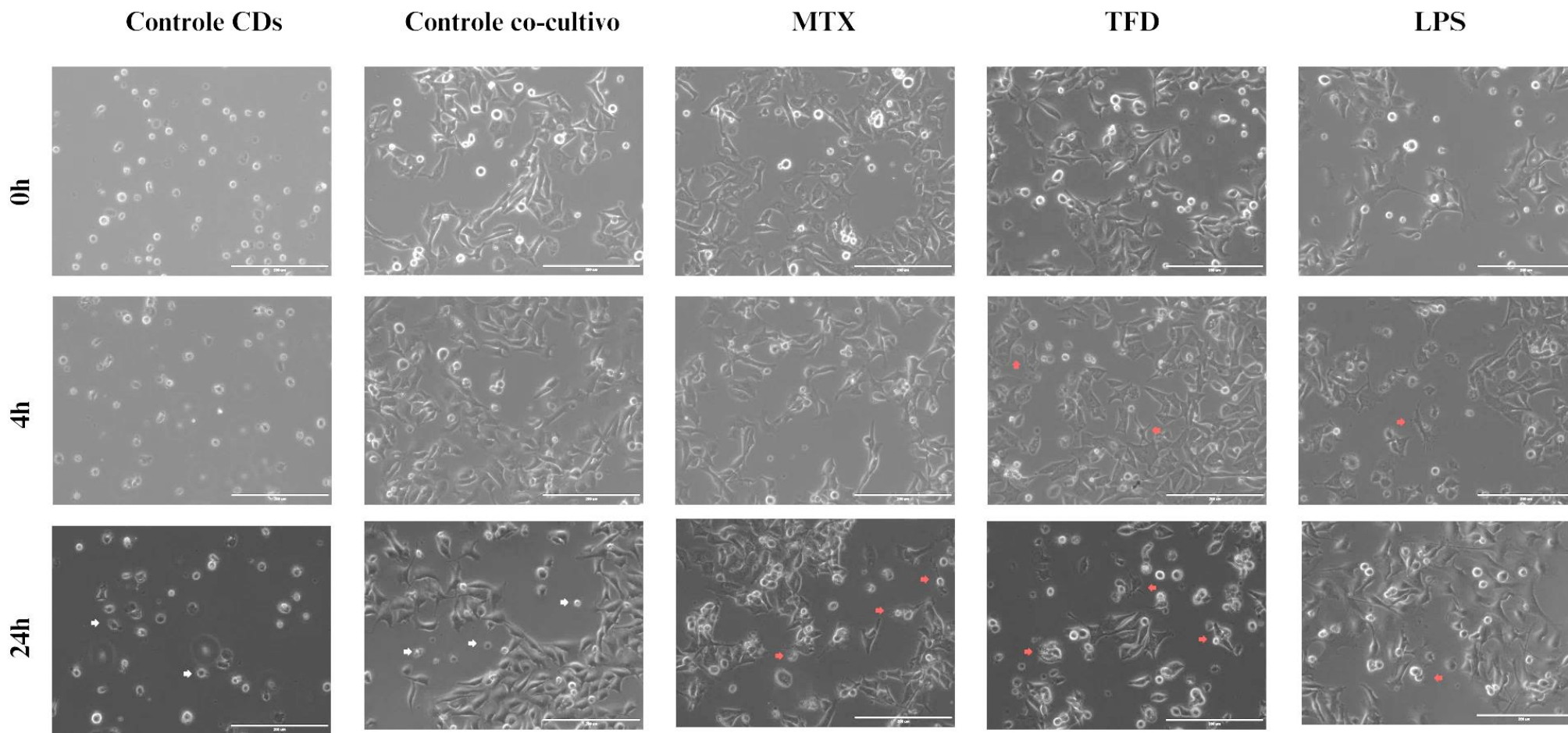
**Figura 22. Análise de diferenciação de monócitos em células dendríticas por citometria de fluxo.** As células obtidas da medula óssea de camundongos passaram por um processo de diferenciação celular para a obtenção de células dendríticas imaturas que foram utilizadas para a realização deste trabalho. A) Distribuição celular de acordo com o perfil de marcação, após o período de diferenciação e em B) Histogramas das células obtidas após o período de diferenciação. As células positivas para o marcador de CD11c foram consideradas células dendríticas imaturas.

## **5.6. Análises Morfológicas do co-cultivo**

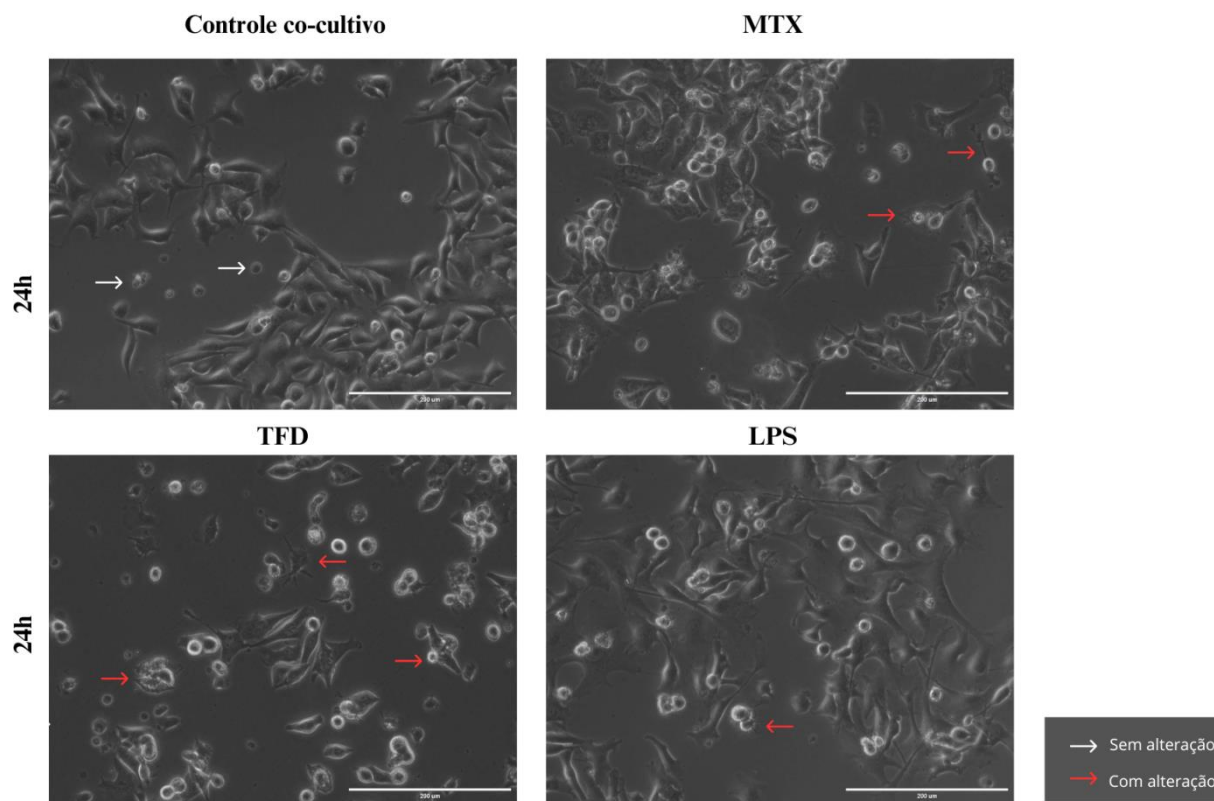
Após a obtenção das células dendríticas, iniciamos os estudos com essas células para compreender como a terapia fotodinâmica poderia estar influenciando na população enriquecida em CDs. Os primeiros testes realizados foram para analisar a morfologia destas células em co-cultivo com a linhagem celular B16F10 depois dos tratamentos.

A Figura 23, obtida por meio de microscopia de luz, mostrou os primeiros indícios de alterações morfológicas da população enriquecida em células dendríticas de acordo com cada grupo de tratamento. As células dendríticas foram adicionadas nas placas que continham as células B16-F10 logo após o tratamento. As imagens do co-cultivo foram realizadas no tempo 0h, 4h e 24h. Nas imagens no tempo de 24h (Figura 24) é possível observar um aumento dos dendritos celulares e uma diminuição do formato esferoide das células dendríticas nos grupos tratados com TFD e MTX. Além disso, nesses tratamentos as células dendríticas com morfologia alterada estavam próximas de células tumorais em processo de morte celular. Já em comparação com as células co-cultivadas com o controle e as células dendríticas mantidas em cultura sozinhas, o padrão morfológico observado foi uma maior presença de células esferoides e com dendritos reduzidos ou praticamente nulos.



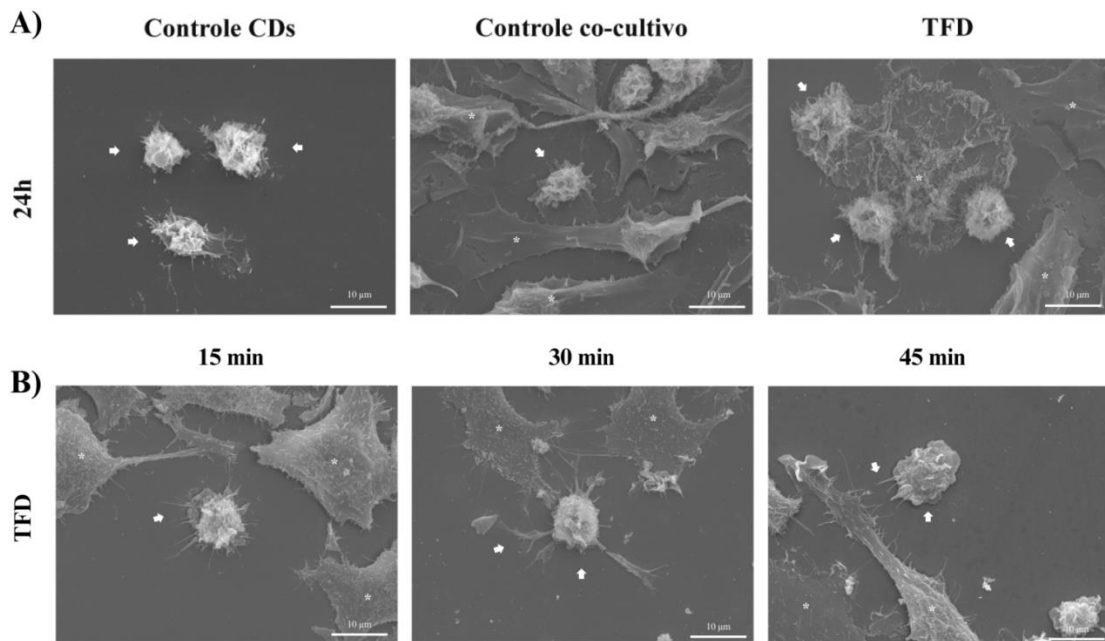


**Figura 23. Microscopia de Luz de células B16-F10 após tratamentos co-cultivadas com CDs.** Observação das alterações de células dendríticas (CDs) co-cultivadas com células B16-F10 tratadas com Terapia fotodinâmica (TFD), Mitoxantrona (MTX), lipopolissacarídeo (LPS) nos tempos de 0, 4 e 24 horas após o início do co-cultivo. Também foram analisadas a morfologias de CDs sozinhas e CDs co-cultivadas com B16-F10 não tratadas. As setas em branco mostram células dendríticas imaturas com seu formato esférico e setas em vermelho indicam células dendríticas com morfologia alterada, com presença de alongamento de dendritos e interação com células B16-F10.



**Figura 24. Microscopia de Luz de células B16-F10 após 24 horas dos tratamentos co-cultivadas com CDs.** Observação das alterações de células dendríticas (CDs) co-cultivadas com células B16-F10 tratadas com Terapia fotodinâmica (TFD), Mitoxantrona (MTX), lipopolissacarídeo (LPS), 24 horas após o início do co-cultivo. As setas em branco mostram células dendríticas sem alterações com seu formato esférico e setas em vermelho indicam células dendríticas com morfologia alterada, com presença de alongamento de dendritos e interação com células B16-F10.

Para obter mais detalhes sobre as características morfológicas das células, também foi realizado Microscopia Eletrônica de Varredura e as imagens correspondem ao período após 24h de tratamento. Na microscopia referente ao tratamento da terapia fotodinâmica é notório que ocorreu um aumento tanto no tamanho da célula dendrítica quanto nos seus prolongamentos e uma maior interação com células B16-F10 em processo de morte celular (Figura 25.A), o que corrobora com os resultados observados na microscopia de luz. Além disso, também foi feita uma análise dessas mudanças em três tempos iniciais, após o tratamento com TFD: 15 minutos, 30 minutos e 45 minutos. Nestes intervalos já foi possível perceber que o tratamento induziu mudanças morfológicas, como aumento do citoplasma celular, estruturas mais alongadas e aumento das projeções das células dendríticas (Figura 25.B).



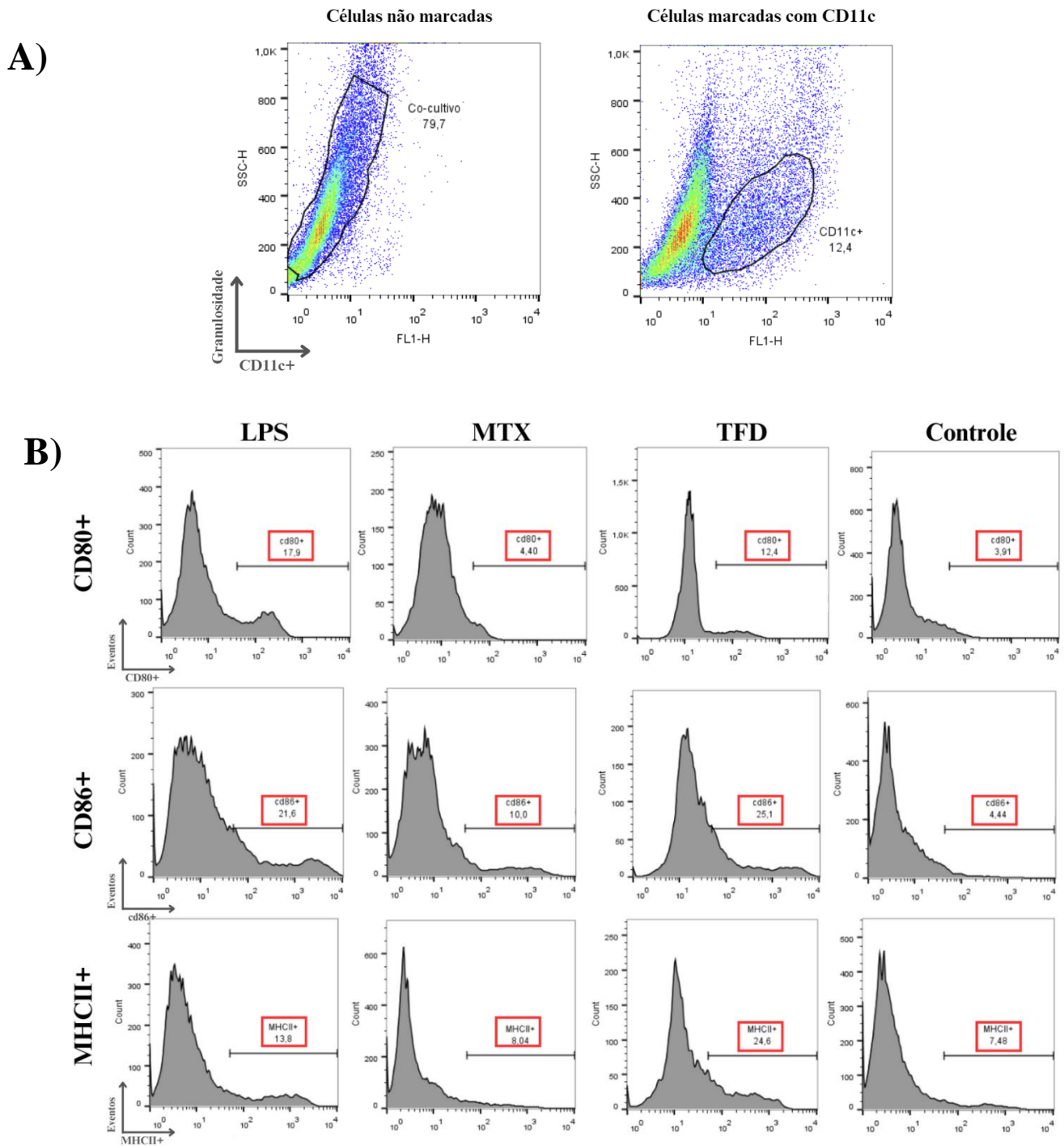
**Figura 25. Microscopia Eletrônica de Varredura de células dendríticas co-cultivadas com células B16-F10 após tratamentos.** Observação das alterações de células dendríticas (CDs) co-cultivadas com células B16-F10 tratadas com Terapia fotodinâmica (TFD). A) Imagens de CDs sozinhas ou de co-cultivo após 24 horas de tratamento com TFD. B) Imagens de co-cultivo celular após o tratamento de TFD nos tempos de 15, 30 e 45 minutos. As setas indicam células dendríticas.

### 5.7. Estudo da ativação da população enriquecida em células dendríticas

A maturação das células dendríticas é um estágio crucial em seu ciclo de vida e envolve várias mudanças morfológicas e funcionais. Após as análises morfológicas realizadas por microscopia, foi feito um experimento para investigar expressão e regulação de marcadores de membrana celular, que estão relacionados com a maturação e o perfil de ativação destas células do sistema imunitário. Dessa maneira, foram feitos três ensaios independentes de fenotipagem celular do co-cultivo por citometria de fluxo e as moléculas analisadas foram CD11c, MHCII, CD80 e CD86 (Figura 26).

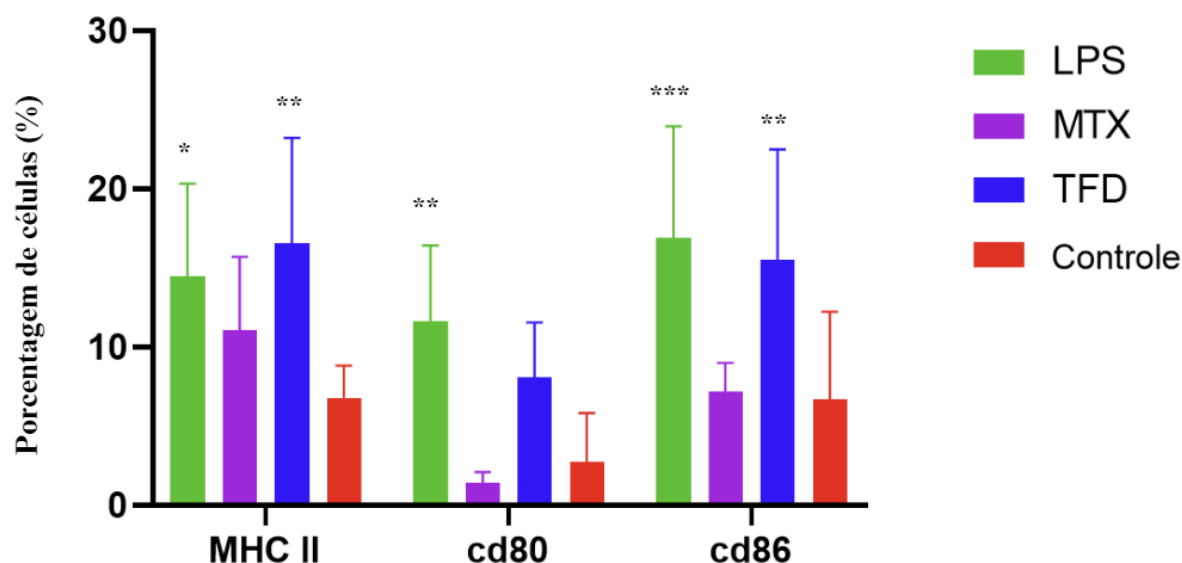
Os resultados mostram que o LPS, utilizado como controle positivo, aumentou a expressão dos marcadores. Os grupos da terapia fotodinâmica também aumentaram a expressão dessas moléculas em comparação com o grupo controle e com os grupos tratados com MTX. As células que foram tratadas com TFD apresentaram um aumento significativo de MHCII e de CD86, sendo que a expressão de MHCII ficou ainda maior que no grupo do controle positivo (Figura 27).





**Figura 26.** Dotplot e histograma de fenotipagem de células dendríticas em 24h de co-cultivo celular após os tratamentos. A) Dotplot da estratégia de seleção de gate, utilizando o marcador CD11c, a fim de avaliar a subpopulação enriquecida em CDs. B) Histograma do percentual de células dendríticas co-cultivadas com células B16-F10 em cada tratamento após 24 horas. As células foram tratadas com lipopolissacarídeo (LPS), Terapia fotodinâmica (TFD) e Mitoxantrona (MTX). Os marcadores utilizados foram MHCII, CD80 e CD86.

## Ensaio de Fenotipagem



**Figura 27. Análise de fenotipagem de células dendríticas após 24h de co-cultivo celular.** Quantificação e representação gráfica do percentual de células dendríticas co-cultivadas com células B16-F10 em cada tratamento após 24 horas. As células foram tratadas com lipopolissacarídeo (LPS), Terapia fotodinâmica (TFD) e Mitoxantrona (MTX). Os marcadores utilizados foram MHCII, CD80 e CD86. Os resultados apresentados são de três experimentos independentes, com a porcentagem média de células em cada tratamento  $\pm$  SEM. \*  $P < 0.05$ , \*\* $P < 0,01$  e \*\*\* $P < 0.001$  quando comparado ao controle.

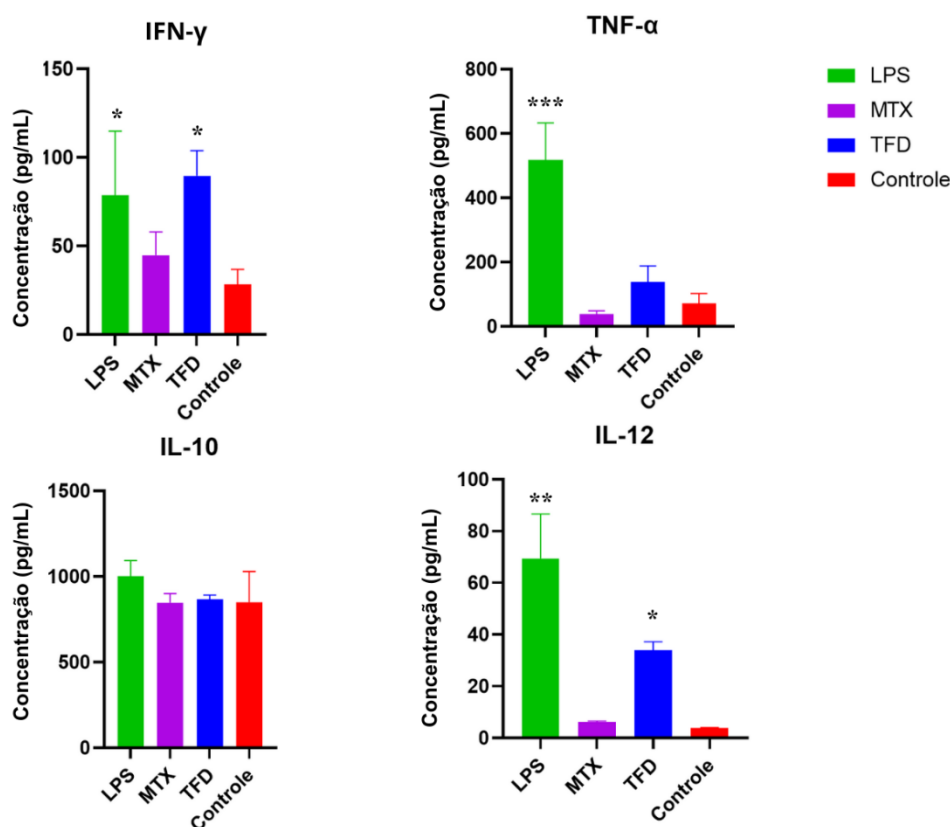
Já nas células tratadas com MTX é possível ver que ocorreu um aumento na expressão de MHCII e de CD86, semelhante ao observado no grupo TFD, contudo a expressão de CD80 ficou abaixo da porcentagem observadas nos demais grupos analisados, inclusive quando comparado com o controle.

### 5.8. Análise da produção de citocinas por células dendríticas após a co-cultura com células tumorais tratadas com TFD

As citocinas desempenham um papel fundamental na ativação do sistema imune, pois são mensageiros químicos que coordenam e regulam as respostas imunológicas. Dessa maneira, para compreender melhor qual o padrão de citocinas que foram estimuladas após a Terapia Fotodinâmica em co-cultivo de células de melanoma com células dendríticas, foi realizado um screening dessas moléculas por ELISA.

As citocinas mapeadas foram IL-12, TNF- $\alpha$ , IL-10 e IFN- $\gamma$ . Na figura 28 é possível observar que houve um aumento na produção de IL-12, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , que são consideradas citocinas pró-inflamatórias, nos grupos tratados com TFD em relação ao

grupo controle. O IL-12 e o IFN- $\gamma$  apresentaram um aumento significativo em relação ao controle e o IFN- $\gamma$  apresentou uma concentração muito próxima ao LPS, usado como controle positivo para ativação de células dendríticas. Em relação à produção de citocinas anti-inflamatórias como a IL-10, o padrão de concentração permaneceu similar entre os grupos, ou seja, não houve diferença significativas entre eles.



**Figura 28. Análise da produção de citocinas por células dendríticas e células B16-F10 após 24h de tratamento.** Quantificação de citocinas após o tratamento de 24 horas com Terapia Fotodinâmica (TFD), Mitoxantrona (MTX) e com lipopolissacarídeo (LPS). As citocinas avaliadas foram IL-12, TNF- $\alpha$ , IL-10 e IFN- $\gamma$ . Os dados representam a média  $\pm$  SEM de três experimentos independentes em triplicata \*P<0,05, \*\*P<0,01 e \*\*\*P<0,001 comparados ao controle não tratado.

## 6. Discussão

O Câncer é considerado um dos principais problemas de saúde pública da atualidade, por ser uma das principais causas de morbidade e mortalidade global. Entre os vários tipos de câncer, alguns, como o melanoma, apresentam um prognóstico desfavorável devido à sua agressividade e alta propensão à metástase<sup>22</sup>. Atualmente, os tratamentos clínicos para o melanoma incluem cirurgia, radioterapia, quimioterapia e, mais recentemente, a imunoterapia. Contudo, os tratamentos convencionais ainda apresentam algumas limitações e desvantagens, como o surgimento de efeitos colaterais

graves nos pacientes e a alta taxa de reincidência. Dessa maneira, é notória a necessidade de novas estratégias para melhorar a eficácia das terapias disponíveis ou a busca por novas abordagens terapêuticas contra o melanoma. Entre as metodologias alternativas, uma que se destaca é a terapia fotodinâmica<sup>50,84</sup>.

A terapia fotodinâmica (TFD) surge como um tratamento local não invasivo alternativo para o câncer. A TFD é baseada na produção de espécies oxidativas por um fotossensibilizante, que é uma molécula capaz de converter energia luminosa específica em potencial químico<sup>85</sup>. Os reativos citotóxicos, principalmente espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, induzem a morte celular de células cancerosas, o bloqueio vascular com subsequente isquemia tumoral e podem aumentar a resposta imunológica aos antígenos tumorais<sup>86,87</sup>.

A ativação do sistema imunológico, devido a modulação do microambiente tumoral por meio da terapia fotodinâmica, está relacionada com parâmetros como dose de luz, concentração do fotossensibilizante e o intervalo entre a administração do fotossensibilizante e a irradiação do tecido alvo. Dessa maneira, a fim de melhorar o potencial da TFD, o uso de nanopartículas se tornou uma estratégia para superar as limitações de baixa biodisponibilidade dos fotossensibilizantes e pouca fotossensibilidade de longo prazo. O uso de nanocarreadores pode promover maior eficácia da terapia e maior ativação do sistema imunitário<sup>88</sup>.

Diante das vantagens encontradas no desenvolvimento de nanossistemas, para o presente estudo foi selecionada uma nanopartícula desenvolvida pelo nosso grupo de pesquisa para ser avaliado o seu potencial de modular o sistema imunológico. O nanocarreador lipídico contendo o fotossensibilizante Alumínio Cloro Ftalocianina (AlPcNLS), em estudos anteriores<sup>80</sup>, demonstrou ser um bom transportador de fotossensibilizante, uma vez que foi capaz de carrear um composto hidrofóbico em meio aquoso, aumentar a estabilidade do composto e apresentar atividade fotodinâmica. Em comparação aos carreadores convencionais, as nanopartículas lipídicas sólidas (NLSs) apresentam várias vantagens, como alta estabilidade física, liberação sustentada do fármaco e a capacidade de serem produzidas em larga escala a partir de lipídios biodegradáveis fisiológicos. Devido à sua composição e tamanho nanométrico, as NLSs demonstram uma propensão a penetrar, se acumular e serem retidas nas células tumorais. Essas características fazem das NLSs uma escolha promissora e inteligente para aplicações em terapia direcionada contra o câncer<sup>89,90</sup>. Assim, com base nos resultados anteriores a AlPcNLS demonstrou ser um ótimo fotossensibilizante de

terceira geração feito com produtos naturais do bioma brasileiro e motivou esse trabalho a querer compreender melhor os seus possíveis potenciais.

Dessa maneira, após a síntese e caracterização das nanopartículas, foi realizada a avaliação da possível citotoxicidade da AIPcNLS em células tumorais de melanoma (B16-F10) tendo em vista que esse tipo de análise é um quesito indispensável para o desenvolvimento de novos materiais com aplicações biomédicas. O teste de viabilidade celular demonstrou que a linhagem tumoral foi sensível ao tratamento com a Terapia Fotodinâmica. Um fator importante a se destacar é que quando as células tumorais foram tratadas com o nanocarreador e mantidas no escuro, foi observado citotoxicidade baixa (~70% de células viáveis), o que demonstra que o efeito foto-oxidante do fotossensibilizante ocorre apenas quando é excitado pelo comprimento de onda de luz específico. De acordo com Rodrigues *et al.* (2020)<sup>87</sup>, tem se observado que nanopartículas contendo cloro alumínio-ftalocianina podem ser consideradas biocompatíveis e provocam queda da viabilidade celular com uma concentração de fotossensibilizante a partir de 80 nM, fato que corrobora com os resultados encontrados após os testes com AIPcNLS realizados neste trabalho. Além disso, o fato da AIPcNLS ter apresentado uma concentração citotóxica de 50% de 1,7 nM permitiu obter a morte das células tumorais com uma menor concentração da nanopartícula em comparação com outros estudos<sup>91</sup>.

A partir das análises de viabilidade celular também foi possível observar que houve um aumento na taxa de células viáveis no grupo NLS-BRANCA quando comparamos o grupo irradiado com o grupo de células que foram mantidas no escuro. O aumento de mais de 70% de células viáveis no grupo irradiado pode ter ocorrido devido aos efeitos do comprimento de onda de luz em excitar a proliferação celular e a ausência do fotossensibilizante na NLS-BRANCA. Vários estudos relatam a fototerapia como um método para cicatrização de tecidos, uma vez que a exposição de células a diferentes comprimentos de onda, como luz vermelha e infravermelha, podem modular a atividade celular e a síntese de colágeno<sup>92,93</sup>. O estudo realizado por Frigo *et al.* (2018)<sup>94</sup> demonstrou que células B16-F10, após a exposição a um laser com 21 J/cm<sup>2</sup> de fluência, teve um aumento na sua replicação celular e um aumento no volume tumoral. Logo, é evidente que a exposição à luz sem a presença do fotossensibilizante pode estimular positivamente a proliferação celular, o que contrasta com o efeito observado na presença do fotossensibilizante, no qual ocorre a morte celular devido a produção de espécies reativas de oxigênio.

Devido a Terapia Fotodinâmica levar a morte celular pela elevada produção de EROs, foram realizadas análises dessa produção, pois decorrente do estresse oxidativo pode ser induzido diferentes tipos de morte celular, como a apoptose, necrose e autofagia celular <sup>41</sup>. Por citometria de fluxo foi possível concluir que o tratamento utilizando a AIPcNLS apresentou uma maior produção de espécies reativas de oxigênio. No grupo TFD, mais de 90% das células foram marcadas positivamente para espécies reativas de oxigênio, o que demonstra o grande potencial do nanossistema desenvolvido para o combate ao melanoma.

A produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) apresentam uma contribuição direta na morte de células tumorais, uma vez que o nível moderado de EROs atua na regulação de alguns fenômenos fisiológicos, como a ativação de enzimas, expressão gênica e tráfego intracelular. O excesso desses componentes oxidativos danificam organelas, suprimem a proliferação celular, inibem o ciclo celular e ocasionam no desligamento da vasculatura tumoral<sup>95</sup>. Dessa maneira, diversos autores, como Zhang *et al.* (2020)<sup>96</sup> e Yu *et al.* (2022)<sup>97</sup> buscam por fotossensibilizantes que sejam capazes de gerar EROs de maneira eficiente, a fim de gerar distúrbios metabólicos e celulares para alcançar efeitos antitumorais. O resultado obtido com a AIPcNLS durante o estudo sugere que o estresse oxidativo foi a principal causa da morte celular observada ao longo dos experimentos de citotoxicidade das células tumorais, corroborando com os resultados encontrados na literatura que evidenciam como um dos fatores-chave, para aplicações eficazes de TFD, as espécies reativas de oxigênio que se originam de fotossensibilizadores após irradiação luminosa <sup>96-98</sup>.

A partir do estresse oxidativo, dependendo das escolhas de protocolo para o tratamento com TFD, pode-se obter diferentes tipos de morte celular. No estudo anterior realizado com a AIPcNLS, Mello *et al.* (2022)<sup>80</sup> demonstrou que o protocolo utilizado ocasionou na indução de morte celular por apoptose, com aumento da expressão de caspase 3 e uma diminuição na expressão de Bcl-2. Este tipo de morte, favorece a exposição e/ou liberação de moléculas pelas células tumorais, que podem induzir a morte celular imunogênica (MCI). Uma das consequências derivada da TFD pode ser a indução da MCI, que é caracterizada por ativar uma resposta imune adaptativa contra antígenos exógenos (patógenos) e endógenos (tumorais) apresentados nas células que estão morrendo. O uso da terapia fotodinâmica com enfoque na indução de MCI possui um papel promissor no combate ao câncer, uma vez que pode promover a imunidade

antitumoral por meio da sinalização de diferentes padrões moleculares associados a danos (DAMPs) para o sistema imunitário <sup>62</sup>.

Ao longo dos experimentos realizados para avaliar a produção de mediadores de MCI, foi possível observar por Microscopia de Florescência Confocal que a Terapia Fotodinâmica induziu um aumento na produção de DAMPs. Nas micrografias obtidas é visível que o tratamento com TFD ocasionou no deslocamento da proteína de histona HMGB1 para o citoplasma, resultado que corrobora com o obtido pelo fármaco Mitroxantrona que foi utilizado como controle positivo. A terapia também ocasionou em uma alteração na produção e localização da calreticulina (CRT), comparado com o controle foi possível visualizar que ocorreu um aumento na intensidade do marcador fluorescente em regiões mais distantes do núcleo celular e próximos a membrana celular. Outro fator interessante observado foi a formação de vesículas contendo a proteína nos grupos tratados com MTX. Estes resultados corroboram com a ideia de que o tratamento utilizado pode provocar respostas imunes adaptativas por meio do desencadeamento de DAMPs e MCI<sup>66</sup>. A presença de calreticulina na superfície da membrana celular é conhecida como um sinal de “coma-me” que acompanhada pela liberação de HMGB1, pode ativar células apresentadoras de antígenos como as células dendríticas (CDs). Estas células possuem receptores Toll-likes que podem interagir com esses DAMPs e promover fatores pró-inflamatórios, o que induz a maturação das CDs <sup>99</sup>.

Assim, como liberações dos DAMPs avaliados neste estudo são essenciais para a morte celular imunogênica, foram feitas análises de Microscopia Eletrônica de Transmissão, para investigar melhor o deslocamento da calreticulina para a membrana celular. A partir das micrografias feitas por meio de imunomarcção foi possível observar, no tratamento com TFD, um acúmulo de calreticulina em pontos específicos do citoplasma e o direcionamento destes aglomerados para a região da membrana plasmática. Esse movimento das proteínas está de acordo com o que diz a literatura, uma vez que a fototerapia está causalmente ligada à ocorrência de estresse do retículo endoplasmático, que induz a translocação de CRT do retículo endoplasmático para a superfície celular <sup>100</sup>. Também foi possível observar um acúmulo de calreticulina na membrana celular e formação de vesículas nas células tratadas com MTX. Dessa maneira, as imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão corroboraram com os resultados mostrados pela microscopia de fluorescência e evidenciaram o potencial da terapia em ocasionar na liberação de DAMPs.

Outro resultado obtido por meio da Microscopia Eletrônica de Transmissão, foi a presença de autofagossomos nos grupos tratados. A autofagia é um processo que faz parte da regulação da homeostase celular, as células quando se encontram em condições estressantes acionam o fluxo autofágico para capturar componentes degradados de organelas e posteriormente reciclá-los<sup>101</sup>. O papel da autofagia é controverso em relação a tratamentos para o combate ao câncer, pois ele pode tanto auxiliar no processo de morte de células tumorais como também pode facilitar a sobrevivência destas células. A terapia fotodinâmica gera um estresse por meio das espécies reativas de oxigênio que causam danos as organelas, principalmente o retículo endoplasmático e as mitocôndrias, a autofagia é um mecanismo natural da célula em tentar reverter a o estado no qual se encontra<sup>101,102</sup>.

Contudo, a alta produção de EROs e o alto nível de autofagia podem ser favoráveis para o processo pró-morte, uma vez que o estresse celular seria muito alto ao ponto da célula não conseguir mais alcançar a homeostase. Assim, o aparelho autofágico pode contribuir intrinsecamente para outros programas de morte celular, como apoptose ou necroptose, ocasionando em uma morte celular mediada por autofagia (AMDC). O processo autofágico pode estar correlacionado a uma produção maior de sinais da morte celular imunogênica, uma vez que vesículas podem ser liberadas com sinais para o sistema imunológico, como por exemplo, a calreticulina. De acordo com Pietro *et. al.* (2020)<sup>103</sup> a inibição precoce da autofagia pode atenuar a exposição da CRT. Dessa maneira, a alta presença de autofagossomos e a produção de ROS, geradas pelo estresse foto-oxidativo após a aplicação da TFD com AIPcNLS, podem regular o processo autofágico para um perfil de pró-morte, com a liberação de DAMPs e desempenhar um papel fundamental no aumento dos mediadores de morte, provavelmente levando à AMCD juntamente com a apoptose<sup>103,104</sup>.

Após o tratamento com a terapia fotodinâmica, foi investigado alguns padrões de citocinas liberados, uma vez que são moléculas sinalizadoras que modulam o sistema imunológico e o microambiente tumoral<sup>105</sup>. O tratamento com TFD apresentou uma maior concentração de IL-12 em comparação com os demais grupos, contudo o valor da concentração desta citocina em pg/mL é considerada sem significância uma vez que ficou abaixo da curva de calibração do kit. Porém, este resultado inicial permitiu o levantamento de hipóteses de que a TFD poderia modular a produção desta citocina e em resultados posteriores de análises de citocinas do co-cultivo, que será discutida ao longo do texto, foi possível ver uma diferença significativa. Outros trabalhos também



encontraram dificuldades em quantificar citocinas por teste ELISA e optaram por utilizar RT-qPCR como método de quantificação<sup>106,107</sup>.

Já as concentrações de IL-10 presentes no sobrenadante, apresentaram concentrações dentro da curva de calibração, o que permitiu uma melhor análise desta citocina. No grupo TFD, a concentração de IL-10 não mostrou diferenças significativas quando comparadas ao controle, mas mantiveram-se baixas. O tratamento TFD com AIPcNLS mostrou que pode estimular uma maior liberação de mediador pró-inflamatório e manteve reduzido o mediador anti-inflamatório, o que pode resultar em imunidade antitumoral sistêmica e morte secundária de células tumorais<sup>108,109</sup>.

Dentre as células presentes no microambiente tumoral, as células dendríticas desempenham um papel crucial no impulso à resposta imunológica de células T antitumorais, tornando-se assim um ponto chave para terapias contra o melanoma<sup>110</sup>. As populações enriquecida em células dendríticas utilizadas neste estudo foram obtidas por meio de diferenciação de células precursoras da medula óssea de camundongos C57BL/6. A partir da medula óssea é possível obter células precursoras que irão originar vários tipos celulares diferentes, logo a fim de obter uma população de células com um maior percentual de células dendríticas imaturas foi utilizados o GM-CSF e IL-4 como fatores de diferenciação. Estes dois componentes são utilizados na literatura para diminuir o número de outras células precursoras da medula, como macrófagos, e obter uma porcentagem maior de CDs<sup>111</sup>. A metodologia utilizada neste estudo foi a mesma empregada por Jin *et. al.* (2018)<sup>112</sup>, que gerou uma população de células altamente pura de CDs (90-96%).

Após a obtenção destas células foram realizados experimentos para avaliar se o tratamento proposto poderia influenciar na sua ativação celular. As imagens obtidas por microscopia de luz, após o co-cultivo celular, mostraram que o tratamento induziu uma mudança no comportamento e morfologia das células dendríticas. Comparado com o grupo controle, as CDs do grupo TFD apresentaram formatos mais alongados e com presença de prolongamentos. Estas imagens corroboram com os resultados encontrados pela microscopia eletrônica de varredura, que permitiram uma visualização mais detalhada das alterações morfológicas. Estes resultados estão de acordo com a literatura, uma vez que as células dendríticas imaturas (imCDs) apresentam características mais esféricas e com poucos prolongamentos, já as células dendríticas maduras (mCDs) apresentam morfologia estrelada com processos citoplasmáticos longos (> 10 µm) e finos, espinhosos ou em forma de folha (saliências ricas em actina)<sup>113</sup>. A reorganização

da estrutura celular das mCDs visualizada nas micrografias pode estar diretamente ligada a uma motilidade aprimorada e ao processo fagocítico, logo estas características, podem indicar o reconhecimento, a fagocitose e a apresentação de antígenos tumorais pelas células dendríticas, a fim de promover uma maior ativação e comunicação do sistema imune inato para o adaptativo <sup>114-117</sup>.

Além das alterações morfológicas, a expressão de moléculas co-estimulatórias são de extrema importância para avaliar a fenotipagem das células dendríticas. Os resultados obtidos por citometria de fluxo mostraram que a terapia fotodinâmica estimulou um aumento na expressão destas moléculas na superfície de membrana e do complexo de histocompatibilidade. No fenótipo maduro, as CDs apresentam o MHC II regulado positivamente e moléculas, como CD80 e CD86, presentes na membrana para a apresentação do antígeno tumoral e ativação de células T <sup>118-120</sup>. Os dados encontrados neste trabalho estão de acordo com descrição de outros autores, que também obtiveram esse padrão de expressão molecular em mCDs, assim a TFD mediada pela AIPcNLS foi capaz de induzir a maturação das células dendríticas <sup>121,122</sup>.

O perfil de citocinas do co-cultivo celular também é de extrema relevância para compreendermos melhor como que a terapia fotodinâmica pode estar influenciando nas células dendríticas e conseqüentemente no microambiente tumoral <sup>109</sup>. Os resultados obtidos por ELISA do sobrenadante do co-cultivo, mostraram um aumento de IL-12, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  nos grupos tratados com TFD em comparação com o grupo controle, já a concentração de IL-10 se manteve-se semelhante em todos os grupos.

Um fator observado neste estudo, foi que quando a citocina IL-12 foi avaliada apenas do sobrenadante de B16-F10, após o tratamento de TFD mediada pela AIPcNLS, os valores da concentração foram baixos em comparação com a curva de calibração. Contudo, ao analisar o sobrenadante do co-cultivo celular obteve-se valores maiores desta citocina no meio. A obtenção de resultados significativos de IL-12 a partir da avaliação do sobrenadante do co-cultivo pode estar relacionado com modulação de liberação de citocinas após a interação das células cancerosas e células dendríticas. De acordo com a literatura, o microambiente tumoral altera o perfil de secreção das células dendríticas, que em condições normais, sintetizam IL-12, para impulsionar a resposta imune antitumoral e reforçar a vigilância imunológica para combater as células tumorais <sup>123</sup>. Assim, o aumento de IL-12 observado nos resultados pode estar correlacionado com a ativação de CDs.

Os mediadores pró-inflamatórios como TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  também possuem um papel importante para a comunicação e ativação da imunidade adaptativa, em especial estimulando células Th1, que são importantes para a eliminação de células cancerosas. Além disso, a produção de IFN- $\gamma$  está associada à produção de IL-12 e regula células Natural killer para atuarem no controle de metástase tumoral<sup>110,124</sup>. O aumento destas citocinas após a terapia fotodinâmica, também foi descrita por Zhang *et. al.* (2022)<sup>108</sup>, o que permite inferir que a morte celular imunogênica gerada por TFD pode aumentar a resposta imune antitumoral<sup>125</sup>.

Já a citocina IL-10 pode antagonizar a função de citocinas Th1, logo, é considerada um fator supressor das funções das células dendríticas. Os resultados deste trabalho mostraram que a concentração de IL-10 não apresentou alterações entre os grupos e que a produção desta citocina não foi o suficiente para impedir a produção de IL-12 e de IFN- $\gamma$ , que são um dos critérios de avaliação para a geração de mCDs<sup>126</sup>. A presença de IL-10 após a TFD também foi descrita por Lobo *et. al.* (2020)<sup>127</sup>, que associou este fato a uma tentativa de resposta anti-inflamatória compensatória para limitar respostas imunes excessivamente reativas perigosas, reduzindo assim os danos colaterais aos tecidos causados pela foto-oxidação. Outro fator interessante, foi que nas análises desta citocina do sobrenadante apenas de B16-F10, o valor mais alto obtido da concentração de IL-10 foi de 2000 pg/mL, já na análise do sobrenadante do co-cultivo a maior concentração foi de 1000 pg/mL. A redução de IL-10 ao comparar os resultados obtidos destes experimentos pode indicar uma modulação do perfil de resposta imunológica e uma ativação de células dendríticas.

Em resumo, os resultados obtidos nesse estudo disponibilizam evidências sobre a utilização de nanopartículas lipídicas sólidas acopladas com alumínio cloro ftalocianina para o possível tratamento do câncer de melanoma. O nanocarreador desenvolvido foi capaz de elevar a produção de espécies reativas de oxigênio e ocasionar a morte celular imunogênica da célula tumoral estudada. A terapia fotodinâmica mediada pela AlPcNLS apresentou-se importante na modulação e ativação das células dendríticas, logo, pode se tornar um tratamento promissor, pois pode ocasionar na ativação do sistema imunológico para o reconhecimento e combate de células tumorais localizadas próximas ao tumor primário ou em micrometástases mais distantes

## 7. Conclusão

A partir dos resultados deste trabalho é possível concluir que a utilização de nanopartículas lipídicas sólidas, especificamente o nanocarreador contendo o fotossensibilizante Alumínio Cloro Ftalocianina (AlPcNLS), mostrou-se promissor para aprimorar a eficácia da terapia fotodinâmica. A nanopartícula demonstrou potencial citotóxico em células tumorais de melanoma, sendo capaz de induzir morte celular quando excitada por luz específica. A TFD mediada pela AlPcNLS promoveu a liberação de espécies reativas de oxigênio (EROs) em níveis que favorecem a morte celular. A observação de alterações na expressão de proteínas como calreticulina e histona HMGB1 sugere uma indução eficaz de morte celular imunogênica, fomentando a resposta imunológica. A avaliação das células dendríticas que foram co-cultivadas com células B16-F10, previamente expostas à terapia, revelou mudanças morfológicas e expressão aumentada de moléculas co-estimulatórias, indicando ativação celular. Além disso, a TFD estimulou a liberação de citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-12, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , o que fortalece a resposta imunológica antitumoral.

Portanto, os resultados obtidos fornecem suporte promissor para a utilização da AlPcNLS na terapia fotodinâmica contra o melanoma, destacando seu potencial na ativação do sistema imunológico e na indução de morte celular imunogênica. Essa abordagem representa uma perspectiva significativa para avançar no tratamento do câncer de pele tipo melanoma, oferecendo uma terapia mais eficaz e com menos efeitos adversos nos pacientes. No entanto, são necessárias pesquisas adicionais para validar e aprimorar ainda mais essa estratégia terapêutica.

## 8. Perspectivas

As perspectivas propostas para a continuidade deste trabalho são:

- Avaliar os mecanismos envolvidos na produção de EROs após a TFD;
- Investigar a atividade de AlPcNLS na ativação do sistema imunológico *in vivo*;
- Avaliar *in vivo* os efeitos da terapia mediada por AlPcNLS por meio de análises clínicas, bioquímicas, hematológicas assim como a regressão tumoral e sobrevida de camundongos;

## 9. Bibliografia

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(3):209-249. doi:10.3322/caac.21660
2. Siegel RL, Miller KD, Wagle NS, Jemal A. Cancer statistics, 2023. *CA Cancer J Clin.* 2023;73(1):17-48. doi:10.3322/caac.21763
3. Avgerinos KI, Spyrou N, Mantzoros CS, Dalamaga M. Obesity and cancer risk: Emerging biological mechanisms and perspectives. *Metabolism.* 2019;92:121-135. doi:10.1016/j.metabol.2018.11.001
4. Deo SVS, Sharma J, Kumar S. GLOBOCAN 2020 Report on Global Cancer Burden: Challenges and Opportunities for Surgical Oncologists. *Ann Surg Oncol.* 2022;29(11):6497-6500. doi:10.1245/s10434-022-12151-6
5. Organization WH. International Agency for Research on Cancer. *WHO Chron.* 2020;23(7):323-326.
6. Paiva KLR, Radicchi MA, Báo SN. In Vitro Evaluation of NLS-DTX Activity in Triple-Negative Breast Cancer. *Molecules.* 2022;27(15). doi:10.3390/molecules27154920
7. Khandelwal AR, Echanique KA, St. John M, Nathan CA. Cutaneous Cancer Biology. *Otolaryngol Clin North Am.* 2021;54(2):259-269. doi:10.1016/j.otc.2020.11.002
8. Wang D, Liu B, Zhang Z. Accelerating the understanding of cancer biology through the lens of genomics. *Cell.* 2023;186(8):1755-1771. doi:10.1016/j.cell.2023.02.015
9. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov.* 2022;12(1):31-46. doi:10.1158/2159-8290.CD-21-1059
10. Girotti MR, Salatino M, Dalotto-Moreno T, Rabinovich GA, Rabinovich GA. Sweetening the hallmarks of cancer: Galectins as multifunctional mediators of tumor progression. *J Exp Med.* 2020;217(2):1-14. doi:10.1084/jem\_20182041
11. Kontomanolis EN, Koutras A, Syllaios A, et al. Basic principles of molecular biology of cancer cell-Molecular cancer indicators. *J BUON.* 2021;26(5):1723-1734.
12. Fares J, Fares MY, Khachfe HH, Salhab HA, Fares Y. Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. *Signal Transduct Target Ther.*

- 2020;5(1). doi:10.1038/s41392-020-0134-x
13. Mortezaee K. Immune escape: A critical hallmark in solid tumors. *Life Sci.* 2020;258(June):118110. doi:10.1016/j.lfs.2020.118110
  14. Seferbekova Z, Lomakin A, Yates LR, Gerstung M. Spatial biology of cancer evolution. *Nat Rev Genet.* 2023;24(5):295-313. doi:10.1038/s41576-022-00553-x
  15. Nenclares P, Harrington KJ. The biology of cancer. *Med (United Kingdom).* 2020;48(2):67-72. doi:10.1016/j.mpmmed.2019.11.001
  16. Long G V., Swetter SM, Menzies AM, Gershenwald JE, Scolyer RA. Cutaneous melanoma. *Lancet.* 2023;402(10400):485-502. doi:10.1016/S0140-6736(23)00821-8
  17. Jenkins RW, Fisher DE. Treatment of Advanced Melanoma in 2020 and Beyond. *J Invest Dermatol.* 2021;141(1):23-31. doi:10.1016/j.jid.2020.03.943
  18. Saginala K, Barsouk A, Aluru JS, et al. medical sciences Epidemiology of Melanoma. Published online 2021:1-9. <https://doi.org/10.3390/medsci9040063>
  19. Luz RG da, Nobre LFM, Corrêa AS, Ferrandin RR, Matos SRS de, Moscal AP. Análise da variação no número dos casos de melanoma maligno e de outras neoplasias malignas da pele em todas as regiões do Brasil no período de 2015 até 2022. *Res Soc Dev.* 2023;12(6):e17712641967. doi:10.33448/rsd-v12i6.41967
  20. Switzer B, Puzanov I, Skitzki JJ, Hamad L, Ernstoff MS. Managing Metastatic Melanoma in 2022: A Clinical Review. *JCO Oncol Pract.* 2022;18(5):335-351. doi:10.1200/op.21.00686
  21. (INCA) IN de CJAG da S. *Estimativa 2020 de Incidência de Câncer No Brasil;* 2020.
  22. Carr S, Smith C, Wernberg J. Epidemiology and Risk Factors of Melanoma. *Surg Clin North Am.* 2020;100(1):1-12. doi:10.1016/j.suc.2019.09.005
  23. Dzwierzynski WW. Melanoma Risk Factors and Prevention. *Clin Plast Surg.* 2021;48(4):543-550. doi:10.1016/j.cps.2021.05.001
  24. Davis LE, Shalin SC, Tackett AJ. Current state of melanoma diagnosis and treatment. *Cancer Biol Ther.* 2019;20(11):1366-1379. doi:10.1080/15384047.2019.1640032
  25. O'Neill CH, Scoggins CR. Melanoma. *J Surg Oncol.* 2019;120(5):873-881. doi:10.1002/jso.25604
  26. Villani A, Scalvenzi M, Fabbrocini G, Ocampo-Candiani J, Ocampo-Garza SS. Looking into a Better Future: Novel Therapies for Metastatic Melanoma.

- Dermatol Ther (Heidelb)*. 2021;11(3):751-767. doi:10.1007/s13555-021-00525-9
27. M. CDB and FB. Recent advances in the treatment of melanoma. *N Engl J Med*. 2021;89:73-74. doi:10.1056/nejmra2034861
  28. Kuryk L, Bertinato L, Staniszewska M, et al. From conventional therapies to immunotherapy: Melanoma treatment in review. *Cancers (Basel)*. 2020;12(10):1-20. doi:10.3390/cancers12103057
  29. Luther C, Swami U, Zhang J, Milhem M, Zakharia Y. Advanced stage melanoma therapies: Detailing the present and exploring the future. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2019;133(April 2018):99-111. doi:10.1016/j.critrevonc.2018.11.002
  30. Nguyen K, Hignett E, Khachemoune A. Current and emerging treatment options for metastatic melanoma: A focused review. *Dermatol Online J*. 2020;26(7). doi:10.5070/d3267049551
  31. Chen Y, Xia R, Huang Y, et al. An immunostimulatory dual-functional nanocarrier that improves cancer immunochemotherapy. *Nat Commun*. 2016;7:13443. doi:10.1038/ncomms13443
  32. Seth R, Messersmith H, Kaur V, et al. Systemic therapy for melanoma: ASCO guideline. *J Clin Oncol*. 2020;38(33):3947-3970. doi:10.1200/JCO.20.00198
  33. Villani A, Potestio L, Fabbrocini G, Troncone G, Malapelle U, Scalvenzi M. The Treatment of Advanced Melanoma: Therapeutic Update. *Int J Mol Sci*. 2022;23(12):1-17. doi:10.3390/ijms23126388
  34. García-Hevia L, Casafont Í, Oliveira J, et al. Magnetic lipid nanovehicles synergize the controlled thermal release of chemotherapeutics with magnetic ablation while enabling non-invasive monitoring by MRI for melanoma theranostics. *Bioact Mater*. 2022;8(May 2021):153-164. doi:10.1016/j.bioactmat.2021.06.009
  35. Mkhobongo B, Chandran R, Abrahamse H. The role of melanoma cell-derived exosomes (Mtex) and photodynamic therapy (pdt) within a tumor microenvironment. *Int J Mol Sci*. 2021;22(18). doi:10.3390/ijms22189726
  36. Lee EH, Lim SJ, Lee MK. Chitosan-coated liposomes to stabilize and enhance transdermal delivery of indocyanine green for photodynamic therapy of melanoma. *Carbohydr Polym*. 2019;224(May):115143. doi:10.1016/j.carbpol.2019.115143
  37. Niculescu A gabriela, Grumezescu AM. Photodynamic Therapy — An Up-to-Date Review. *Appl Sci*. 2021;11:3626.

38. Algorri JF, Ochoa M, Roldán-Varona P, Rodríguez-Cobo L, López-Higuera JM. Photodynamic therapy: A compendium of latest reviews. *Cancers (Basel)*. 2021;13(17). doi:10.3390/cancers13174447
39. Tosa M, Ogawa R. Photodynamic therapy for keloids and hypertrophic scars: a review. *Scars, Burn Heal*. 2020;6:205951312093205. doi:10.1177/2059513120932059
40. Abramova OB, Kaplan MA, Grin MA, et al. Photodynamic Therapy of Melanoma B16 with Chlorin E6 Conjugated with a PSMA-Ligand. *Bull Exp Biol Med*. 2021;171(4):468-471. doi:10.1007/s10517-021-05252-x
41. Sai DL, Lee J, Nguyen DL, Kim YP. Tailoring photosensitive ROS for advanced photodynamic therapy. *Exp Mol Med*. 2021;53(4):495-504. doi:10.1038/s12276-021-00599-7
42. Gunaydin G, Gedik ME, Ayan S. Photodynamic Therapy—Current Limitations and Novel Approaches. *Front Chem*. 2021;9(June):1-25. doi:10.3389/fchem.2021.691697
43. Kim TE, Chang JE. Recent Studies in Photodynamic Therapy for Cancer Treatment: From Basic Research to Clinical Trials. *Pharmaceutics*. 2023;15(9). doi:10.3390/pharmaceutics15092257
44. Sun J, Zhao H, Fu L, Cui J, Yang Y. Global Trends and Research Progress of Photodynamic Therapy in Skin Cancer: A Bibliometric Analysis and Literature Review. *Clin Cosmet Investig Dermatol*. 2023;16:479-498. doi:10.2147/CCID.S401206
45. Park J, Lee YK, Park IK, Hwang SR. Current limitations and recent progress in nanomedicine for clinically available photodynamic therapy. *Biomedicines*. 2021;9(1):1-17. doi:10.3390/biomedicines9010085
46. An J, Tang S, Hong G, et al. An unexpected strategy to alleviate hypoxia limitation of photodynamic therapy by biotinylation of photosensitizers. *Nat Commun*. 2022;13(1):1-10. doi:10.1038/s41467-022-29862-9
47. Hou YJ, Yang XX, Liu RQ, et al. Pathological mechanism of photodynamic therapy and photothermal therapy based on nanoparticles. *Int J Nanomedicine*. 2020;15:6827-6838. doi:10.2147/IJN.S269321
48. Ijaz I, Gilani E, Nazir A, Bukhari A. Detail review on chemical, physical and green synthesis, classification, characterizations and applications of nanoparticles. *Green Chem Lett Rev*. 2020;13(3):59-81.



doi:10.1080/17518253.2020.1802517

49. Najahi-Missaoui W, Arnold RD, Cummings BS. Safe nanoparticles: Are we there yet? *Int J Mol Sci.* 2021;22(1):1-22. doi:10.3390/ijms22010385
50. Lôbo GCNB, Paiva KLR, Silva ALG, Simões MM, Bão SN, Radicchi MA. Nanocarriers used in drug delivery to enhance immune system in cancer therapy. *Pharmaceutics.* 2021;13(8). doi:10.3390/pharmaceutics13081167
51. Anselmo AC, Mitragotri S. Nanoparticles in the clinic: An update. *Bioeng Transl Med.* 2019;4(3):1-16. doi:10.1002/btm2.10143
52. Nasirmoghadas P, Mousakhani A, Behzad F, et al. Nanoparticles in cancer immunotherapies: An innovative strategy. *Biotechnol Prog.* 2021;37(2):1-12. doi:10.1002/btpr.3070
53. Gavvas S, Quazi S, Karpiński TM. Nanoparticles for Cancer Therapy: Current Progress and Challenges. *Nanoscale Res Lett.* 2021;16(1). doi:10.1186/s11671-021-03628-6
54. Tavakkoli Yaraki M, Liu B, Tan YN. *Emerging Strategies in Enhancing Singlet Oxygen Generation of Nano-Photosensitizers Toward Advanced Phototherapy.* Vol 14. Springer Nature Singapore; 2022. doi:10.1007/s40820-022-00856-y
55. Kadkhoda J, Tarighatnia A, Barar J, Aghanejad A, Davaran S. Recent advances and trends in nanoparticles based photothermal and photodynamic therapy. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2022;37(December 2021):102697. doi:10.1016/j.pdpdt.2021.102697
56. Lee D, Kwon S, Jang S young, Park E, Lee Y, Koo H. Overcoming the obstacles of current photodynamic therapy in tumors using nanoparticles. *Bioact Mater.* 2022;8(April 2021):20-34. doi:10.1016/j.bioactmat.2021.06.019
57. Calori IR, Tedesco AC. Aluminum chloride phthalocyanine in MCF-7: Rationally accounting for state of aggregation of photosensitizers inside cells. *Dye Pigment.* 2020;173(July 2019):107940. doi:10.1016/j.dyepig.2019.107940
58. De Oliveira ÉL, Ferreira SBS, De Castro-Hoshino L V., et al. Thermoresponsive Hydrogel-Loading Aluminum Chloride Phthalocyanine as a Drug Release Platform for Topical Administration in Photodynamic Therapy. *Langmuir.* 2021;37(10):3202-3213. doi:10.1021/acs.langmuir.1c00148
59. Reis TA, Jaculi AE, Ramos KLV, et al. Combination of cyclodextrin complexation and iontophoresis as a promising strategy for the cutaneous delivery of aluminum-chloride phthalocyanine in photodynamic therapy. *Eur J*

- Pharm Sci.* 2019;139(May):105056. doi:10.1016/j.ejps.2019.105056
60. Mkhobongo B, Chandran R, Abrahamse H. In Vitro Photodynamic Treatment Modality for A375 Melanoma Cell Line Using a Sulphonated Aluminum Phthalocyanine Chloride-Photosensitizer-Gold Nanoparticle Conjugate. *Pharmaceutics.* 2022;14(11). doi:10.3390/pharmaceutics14112474
  61. Mishchenko T, Balalaeva I, Gorokhova A, Vedunova M, Krysko D V. Which cell death modality wins the contest for photodynamic therapy of cancer? *Cell Death Dis.* 2022;13(5):1-16. doi:10.1038/s41419-022-04851-4
  62. Donohoe C, Senge MO, Arnaut LG, Gomes-da-Silva LC. Cell death in photodynamic therapy: From oxidative stress to anti-tumor immunity. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer.* 2019;1872(2):188308. doi:10.1016/j.bbcan.2019.07.003
  63. Alzeibak R, Mishchenko TA, Shilyagina NY, Balalaeva I V., Vedunova M V., Krysko D V. Targeting immunogenic cancer cell death by photodynamic therapy: Past, present and future. *J Immunother Cancer.* 2021;9(1):1-22. doi:10.1136/jitc-2020-001926
  64. Turubanova VD, Balalaeva I V., Mishchenko TA, et al. Immunogenic cell death induced by a new photodynamic therapy based on photosens and photodithazine. *J Immunother Cancer.* 2019;7(1):1-13. doi:10.1186/s40425-019-0826-3
  65. Chen X, Zheng R, Zhao L, et al. Photodynamic therapy initiated immunotherapy of self-delivery re-educator by inducing immunogenic cell death and macrophage polarization. *Chem Eng J.* 2022;435(P1):134783. doi:10.1016/j.cej.2022.134783
  66. Jin F, Liu D, Xu X, Ji J, Du Y. Nanomaterials-based photodynamic therapy with combined treatment improves antitumor efficacy through boosting immunogenic cell death. *Int J Nanomedicine.* 2021;16:4693-4712. doi:10.2147/IJN.S314506
  67. De Lima LI, Faria RS, Franco MS, et al. Combined paclitaxel-doxorubicin liposomal results in positive prognosis with infiltrating lymphocytes in lung metastasis. *Nanomedicine.* 2020;15(28):2753-2770. doi:10.2217/nnm-2020-0201
  68. Reichel D, Tripathi M, Perez JM. Biological effects of nanoparticles on macrophage polarization in the tumor microenvironment. *Nanotheranostics.* 2019;3(1):66-88. doi:10.7150/ntno.30052
  69. Huber A, Dammeijer F, Aerts JGJV, Vroman H. Current State of Dendritic Cell-Based Immunotherapy: Opportunities for in vitro Antigen Loading of Different DC Subsets? *Front Immunol.* 2018;9(December):2804.

doi:10.3389/fimmu.2018.02804

70. Gombart AF, Pierre A, Maggini S. A review of micronutrients and the immune system—working in harmony to reduce the risk of infection. *Nutrients*. 2020;12(1). doi:10.3390/nu12010236
71. Pishesha N, Harmand TJ, Ploegh HL. A guide to antigen processing and presentation. *Nat Rev Immunol*. 2022;22(12):751-764. doi:10.1038/s41577-022-00707-2
72. Gardner A, de Mingo Pulido Á, Ruffell B. Dendritic Cells and Their Role in Immunotherapy. *Front Immunol*. 2020;11(May):1-14. doi:10.3389/fimmu.2020.00924
73. Weinberg RA. *A Biologia Do Câncer.*; 2008.
74. Kotsias F, Cebrian I, Alloatti A. Antigen processing and presentation. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2019;348:69-121. doi:10.1016/bs.ircmb.2019.07.005
75. Gong T, Liu L, Jiang W, Zhou R. DAMP-sensing receptors in sterile inflammation and inflammatory diseases. *Nat Rev Immunol*. 2020;20(2):95-112. doi:10.1038/s41577-019-0215-7
76. Matsusaka K, Azuma Y, Kaga Y, et al. Distinct roles in phagocytosis of the early and late increases of cell surface calreticulin induced by oxaliplatin. *Biochem Biophys Reports*. 2022;29:101222. doi:10.1016/j.bbrep.2022.101222
77. Fucikova J, Kepp O, Kasikova L, et al. Detection of immunogenic cell death and its relevance for cancer therapy. *Cell Death Dis*. 2020;11(11). doi:10.1038/s41419-020-03221-2
78. Falk-Mahapatra R, Gollnick SO. Photodynamic Therapy and Immunity: An Update. *Photochem Photobiol*. 2020;96(3):550-559. doi:10.1111/php.13253
79. Tomasicchio M, Semple L, Esmail A, et al. An autologous dendritic cell vaccine polarizes a Th-1 response which is tumoricidal to patient-derived breast cancer cells. *Cancer Immunol Immunother*. 2019;68(1):71-83. doi:10.1007/s00262-018-2238-5
80. Mello VC, Araújo VHS, de Paiva KLR, et al. Development of New Natural Lipid-Based Nanoparticles Loaded with Aluminum-Phthalocyanine for Photodynamic Therapy against Melanoma. *Nanomaterials*. 2022;12(20). doi:10.3390/nano12203547
81. Morais JAV, Almeida LR, Rodrigues MC, Azevedo RB, Muehlmann LA. The induction of immunogenic cell death by photodynamic therapy in B16F10 cells

- in vitro is effected by the concentration of the photosensitizer. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2021;35(May). doi:10.1016/j.pdpdt.2021.102392
82. Lukácsi S, Gerecsei T, Balázs K, et al. The differential role of CR3 (CD11b/CD18) and CR4 (CD11c/CD18) in the adherence, migration and podosome formation of human macrophages and dendritic cells under inflammatory conditions. *PLoS One.* 2020;15(5):1-21. doi:10.1371/journal.pone.0232432
  83. Wu T, Qi Y, Zhang D, et al. Bone Marrow Dendritic Cells Derived Microvesicles for Combinational Immunotherapy against Tumor. *Adv Funct Mater.* 2017;27(42):1-15. doi:10.1002/adfm.201703191
  84. Beyk J, Tavakoli H. Selective radiofrequency ablation of tumor by magnetically targeting of multifunctional iron oxide–gold nanohybrid. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2019;145(9):2199-2209. doi:10.1007/s00432-019-02969-1
  85. Zhang J, Jiang C, Figueiró Longo JP, Azevedo RB, Zhang H, Muehlmann LA. An updated overview on the development of new photosensitizers for anticancer photodynamic therapy. *Acta Pharm Sin B.* 2018;8(2):137-146. doi:10.1016/j.apsb.2017.09.003
  86. Longo JPF, Muehlmann LA, Miranda-Vilela AL, et al. Prevention of distant lung metastasis after photodynamic therapy application in a breast cancer tumor model. *J Biomed Nanotechnol.* 2016;12(4):689-699. doi:10.1166/jbn.2016.2208
  87. Rodrigues MC, Vieira LG, Horst FH, et al. Photodynamic therapy mediated by aluminium-phthalocyanine nanoemulsion eliminates primary tumors and pulmonary metastases in a murine 4T1 breast adenocarcinoma model. *J Photochem Photobiol B Biol.* 2020;204(July 2019):111808. doi:10.1016/j.jphotobiol.2020.111808
  88. Morais JAV, Almeida LR, Rodrigues MC, Azevedo RB, Muehlmann LA. The induction of immunogenic cell death by photodynamic therapy in B16F10 cells in vitro is effected by the concentration of the photosensitizer. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2021;35(April). doi:10.1016/j.pdpdt.2021.102392
  89. Dabholkar N, Waghule T, Krishna Rapalli V, et al. Lipid shell lipid nanocapsules as smart generation lipid nanocarriers. *J Mol Liq.* 2021;339:117145. doi:10.1016/j.molliq.2021.117145
  90. Josefsen LB, Boyle RW. Photodynamic therapy: Novel third-generation photosensitizers one step closer? *Br J Pharmacol.* 2008;154(1):1-3.

doi:10.1038/bjp.2008.98

91. Barbosa HFG, Piva HL, Matsuo FS, et al. Hybrid lipid-biopolymer nanocarrier as a strategy for GBM photodynamic therapy (PDT). *Int J Biol Macromol.* 2023;242(P1):124647. doi:10.1016/j.ijbiomac.2023.124647
92. Ma H, Yang JP, Tan RK, Lee HW, Han SK. Effect of Low-Level Laser Therapy on Proliferation and Collagen Synthesis of Human Fibroblasts in Vitro. *J Wound Manag Res.* 2018;14(1):1-6. doi:10.22467/jwmr.2018.00283
93. Xu Y, Chen H, Fang Y, Wu J. Hydrogel Combined with Phototherapy in Wound Healing. *Adv Healthc Mater.* 2022;11(16):1-16. doi:10.1002/adhm.202200494
94. Feehan J, Burrows SP, Cornelius L, et al. Therapeutic applications of polarized light: Tissue healing and immunomodulatory effects. *Maturitas.* 2018;116(June):11-17. doi:10.1016/j.maturitas.2018.07.009
95. Yu Y, Wu S, Zhang L, et al. Cationization to boost both type I and type II ROS generation for photodynamic therapy. *Biomaterials.* 2022;280(August 2021):121255. doi:10.1016/j.biomaterials.2021.121255
96. Zhang ZJ, Wang KP, Mo JG, Xiong L, Wen Y. Photodynamic therapy regulates fate of cancer stem cells through reactive oxygen species. *World J Stem Cells.* 2020;12(7):562-584. doi:10.4252/wjsc.v12.i7.562
97. Yu H, Chen B, Huang H, et al. AIE-Active Photosensitizers: Manipulation of Reactive Oxygen Species Generation and Applications in Photodynamic Therapy. *Biosensors.* 2022;12(5). doi:10.3390/bios12050348
98. Shen J, Yu H, Shu Y, Ma M, Chen H. A Robust ROS Generation Strategy for Enhanced Chemodynamic/Photodynamic Therapy via H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> Self-Supply and Ca<sup>2+</sup> Overloading. *Adv Funct Mater.* 2021;31(50):1-12. doi:10.1002/adfm.202106106
99. Li Z, Chu Z, Yang J, et al. Immunogenic Cell Death Augmented by Manganese Zinc Sulfide Nanoparticles for Metastatic Melanoma Immunotherapy. *ACS Nano.* 2022;16(9):15471-15483. doi:10.1021/acsnano.2c08013
100. Chen K, Wang Y, Liang H, et al. Fullerenols boosting the therapeutic effect of anti-CD47 antibody to trigger robust anti-tumor immunity by inducing calreticulin exposure. *Nano Today.* 2021;37:101070. doi:10.1016/j.nantod.2020.101070
101. Xiao M, Benoit A, Hasmim M, et al. Targeting Cytoprotective Autophagy to Enhance Anticancer Therapies. *Front Oncol.* 2021;11(February):3-5.

doi:10.3389/fonc.2021.626309

102. Yun CW, Lee SH. The roles of autophagy in cancer. *Int J Mol Sci.* 2018;19(11):1-18. doi:10.3390/ijms19113466
103. Prieto K, Lozano MP, Urueña C, Alméciga-Díaz CJ, Fiorentino S, Barreto A. The delay in cell death caused by the induction of autophagy by P2Et extract is essential for the generation of immunogenic signals in melanoma cells. *Apoptosis.* 2020;25(11-12):875-888. doi:10.1007/s10495-020-01643-z
104. Martins WK, Belotto R, Silva MN, et al. Autophagy Regulation and Photodynamic Therapy: Insights to Improve Outcomes of Cancer Treatment. *Front Oncol.* 2021;10(January):1-22. doi:10.3389/fonc.2020.610472
105. Xia F, Hou W, Liu Y, et al. Cytokine induced killer cells-assisted delivery of chlorin e6 mediated self-assembled gold nanoclusters to tumors for imaging and immuno-photodynamic therapy. *Biomaterials.* 2018;170:1-11. doi:10.1016/j.biomaterials.2018.03.048
106. Liu C, Chu D, Kalantar-Zadeh K, George J, Young HA, Liu G. Cytokines: From Clinical Significance to Quantification. *Adv Sci.* 2021;8(15). doi:10.1002/advs.202004433
107. Richter KR, Nasr AN, Mexas AM. Cytokine Concentrations Measured by Multiplex Assays in Canine Peripheral Blood Samples. *Vet Pathol.* 2018;55(1):53-67. doi:10.1177/0300985817725388
108. Zhang M, Zhao Y, Ma H, Sun Y, Cao J. How to improve photodynamic therapy-induced antitumor immunity for cancer treatment? *Theranostics.* 2022;12(10):4629-4655. doi:10.7150/thno.72465
109. Li L, Yu R, Cai T, et al. Effects of immune cells and cytokines on inflammation and immunosuppression in the tumor microenvironment. *Int Immunopharmacol.* 2020;88(September):106939. doi:10.1016/j.intimp.2020.106939
110. Wylie B, Macri C, Mintern JD, Waithman J. Dendritic cells and cancer: From biology to therapeutic intervention. *Cancers (Basel).* 2019;11(4):1-21. doi:10.3390/cancers11040521
111. Sichen D, Lambrecht BN, Guillems M, Scott CL. Development of conventional dendritic cells: From common bone marrow progenitors to multiple subsets in peripheral tissues. *Mucosal Immunol.* 2017;10(4):831-844. doi:10.1038/mi.2017.8
112. Jin D, Sprent J. GM-CSF Culture Revisited: Preparation of Bulk Populations of

- Highly Pure Dendritic Cells from Mouse Bone Marrow. *J Immunol.* 2018;201(10):3129-3139. doi:10.4049/jimmunol.1800031
113. Kim MK, Kim J. Properties of immature and mature dendritic cells: phenotype, morphology, phagocytosis, and migration. *RSC Adv.* 2019;9(20):11230-11238. doi:10.1039/C9RA00818G
  114. Koller N, Höllthaler P, Barends M, et al. Nanoscale organization of the MHC I peptide-loading complex in human dendritic cells. *Cell Mol Life Sci.* 2022;79(9):1-13. doi:10.1007/s00018-022-04472-2
  115. Yu Y, Feng S, Wei S, et al. Extracellular ATP activates P2X7R-NF- $\kappa$ B (p65) pathway to promote the maturation of bone marrow-derived dendritic cells of mice. *Cytokine.* 2019;119(December 2018):175-181. doi:10.1016/j.cyto.2019.03.019
  116. Alotaibi N, Aldahlawi A, Zaher K, Basingab F, Alrahimi J. Optimizing the generation of mature bone marrow-derived dendritic cells in vitro: a factorial study design. *J Genet Eng Biotechnol.* 2023;21(1). doi:10.1186/s43141-023-00597-4
  117. Akkaya B, Oya Y, Akkaya M, et al. Regulatory T cells mediate specific suppression by depleting peptide–MHC class II from dendritic cells. *Nat Immunol.* 2019;20(2):218-231. doi:10.1038/s41590-018-0280-2
  118. Sun NY, Chen YL, Wu WY, et al. Blockade of PD-L1 enhances cancer immunotherapy by regulating dendritic cell maturation and macrophage polarization. *Cancers (Basel).* 2019;11(9):1-18. doi:10.3390/cancers11091400
  119. Blair TC, Bambina S, Alice AF, et al. Dendritic Cell Maturation Defines Immunological Responsiveness of Tumors to Radiation Therapy. *J Immunol.* 2020;204(12):3416-3424. doi:10.4049/jimmunol.2000194
  120. Lutz MB, Backer RA, Clausen BE. Revisiting Current Concepts on the Tolerogenicity of Steady-State Dendritic Cell Subsets and Their Maturation Stages. *J Immunol.* 2021;206(8):1681-1689. doi:10.4049/jimmunol.2001315
  121. Zhao X, Guo K, Zhang K, et al. Orchestrated Yolk–Shell Nanohybrids Regulate Macrophage Polarization and Dendritic Cell Maturation for Oncotherapy with Augmented Antitumor Immunity. *Adv Mater.* 2022;34(9):1-14. doi:10.1002/adma.202108263
  122. Luo JQ, Liu R, Chen FM, et al. Nanoparticle-Mediated CD47-SIRP $\alpha$  Blockade and Calreticulin Exposure for Improved Cancer Chemo-Immunotherapy. *ACS*

- Nano*. 2023;17(10):8966-8979. doi:10.1021/acsnano.2c08240
123. Jung HJ, Park SH, Cho KM, Jung K Il, Cho D, Kim TS. Threonyl-tRNA Synthetase Promotes T Helper Type 1 Cell Responses by Inducing Dendritic Cell Maturation and IL-12 Production via an NF- $\kappa$ B Pathway. *Front Immunol*. 2020;11(October):1-13. doi:10.3389/fimmu.2020.571959
  124. Marrache S, Tundup S, Harn DA, Dhar S. Ex vivo programming of dendritic cells by mitochondria-targeted nanoparticles to produce interferon-gamma for cancer immunotherapy. *ACS Nano*. 2013;7(8):7392-7402. doi:10.1021/nn403158n
  125. Zhang M, Shen W, Jiang Q, et al. Engineering a curcumin-loaded porphyrinic metal-organic framework for enhanced cancer photodynamic therapy. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2022;214(February):112456. doi:10.1016/j.colsurfb.2022.112456
  126. Zhu S, Yang N, Wu J, et al. Tumor microenvironment-related dendritic cell deficiency: a target to enhance tumor immunotherapy. *Pharmacol Res*. 2020;159(519):104980. doi:10.1016/j.phrs.2020.104980
  127. Lobo ACS, Gomes-Da-Silva LC, Rodrigues-Santos P, Cabrita A, Santos-Rosa M, Arnaut LG. Immune responses after vascular photodynamic therapy with redaporfin. *J Clin Med*. 2020;9(1):1-15. doi:10.3390/jcm9010104