

Universidade Estadual Paulista - UNESP
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Ciências e Letras - Campus de Assis
Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais -
POSMAT

Mirella Boaro Kobal

**NANOPARTÍCULAS DE OURO RECOBERTAS COM SÍLICA (AuSHINs)
COMO AGENTES FOTOTÉRMICOS NA TERAPIA DE CÉLULAS
DERIVADAS DE CARCINOMA MAMÁRIO**



Assis
2022

Mirella Boaro Kobal

Nanopartículas de ouro recobertas com sílica (AuSHINs) como agentes fototérmicos na terapia de células derivadas de carcinoma mamário

Dissertação apresentada como requisito à obtenção do título de Mestre à Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais, área de concentração “Materiais poliméricos, cerâmicos, híbridos e nano estruturais”.

Orientador: Dr. Pedro Henrique Benites Aoki

Coorientadora: Dra. Sabrina Aléssio Camacho

Assis

2022

K75n

Kobal, Mirella Boaro

Nanopartículas de ouro recobertas com sílica (AuSHINs) como agentes fototérmicos na terapia de células derivadas de carcinoma mamário / Mirella Boaro Kobal. -- Presidente Prudente, 2022

76 p. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências e Tecnologia, Presidente Prudente

Orientador: Pedro Henrique Benites Aoki

Coorientadora: Sabrina Aléssio Camacho

1. Terapia Fototérmica. 2. AuSHINs. 3. Carcinoma mamário. I.
Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências e Tecnologia, Presidente Prudente. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE MIRELLA BOARO KOBAL, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS, DA FACULDADE DE CIÊNCIAS - CÂMPUS DE BAURU.

Aos 03 dias do mês de fevereiro do ano de 2022, às 14:00 horas, por meio de Videoconferência, realizou-se a defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de MIRELLA BOARO KOBAL, intitulada **Nanopartículas de ouro recobertas com sílica (AuSHINs) como agentes fototérmicos na terapia de células derivadas do carcinoma mamário**. A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Prof. Dr. PEDRO HENRIQUE BENITES AOKI (Orientador(a) - Participação Virtual) do(a) Departamento de Biotecnologia / Faculdade de Ciências e Letras UNESP, Profa. Dra. CAMILA FABIANO DE FREITAS MARIN (Participação Virtual) do(a) Departamento de Química / Universidade Estadual de Maringá, Profa. Dra. PRISCILA ALESSIO CONSTANTINO (Participação Virtual) do(a) Departamento de Física / Faculdade de Ciências e Tecnologia de Presidente Prudente. Após a exposição pela mestrande e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, a discente recebeu o conceito final: Aprovada

_____. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.

Prof. Dr. PEDRO HENRIQUE BENITES AOKI



AGRADECIMENTOS

A Deus, pela força restaurada a cada dia.

Às minhas grandes fortalezas e inspirações, mãe e avó, por todo o apoio, amor e colo sempre disponíveis.

Ao meu eterno, carinhoso e primeiro professor, pai, que em vida me mostrou o significado de ser forte.

Aos meus orientadores, Pedro e Bina, por toda dedicação, empenho e ensinamentos a mim destinados, com certeza são os pilares dessa minha evolução acadêmica. Obrigada não só pela orientação, mas também pela amizade.

À professora Karina, que além da parceria e colaboração não mede esforços em compartilhar o conhecimento.

Ao grupo “Nanotec”, por cada café e experiência vivenciados, cada tristeza e alegria que pude compartilhar nessa amizade estabelecida. Aos também agregados, obrigada pelo carinho e amizade no dia a dia.

Aos amigos, por todos os momentos de descontração e apoio, por me mostrarem como a vida pode ser mais leve.

Aos profissionais da saúde e amigos que me permitiram ter saúde física e mental para enfrentar cada momento difícil em meio a pandemia.

Aos professores e funcionários do POSMAT, pelo apoio e formação.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (2018/16713-0; 2018/14692-5; 2018/22214-6) pelo suporte financeiro.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

KOBAL, M. B. **Nanopartículas de ouro recobertas com sílica (AuSHINs) como agentes fototérmicos na terapia de células derivadas de carcinoma mamário**. 2022. 76f. Dissertação (Mestre em Ciência e Tecnologia dos Materiais) - UNESP, Faculdade de Ciências e Tecnologia - Presidente Prudente.

RESUMO

A nova geração de agentes fototérmicos nanoestruturados tem relançado a terapia fototérmica (TFT) como tratamento clínico menos invasivo no combate ao câncer. Em particular, nanopartículas metálicas demonstram elevada eficiência na conversão de luz em calor, desencadeando o aumento de temperatura local nos tecidos, e consequente morte celular. Apesar dos efeitos de agregação em meios com elevada força iônica, nanopartículas esféricas de ouro (AuNPs) são pioneiras em aplicações *in vitro* e *in vivo* da TFT. Neste trabalho, AuNPs foram recobertas com uma camada ultrafina (2 – 5 nm) de sílica, obtendo nanopartículas de ouro isoladas (AuSHINs, do inglês *gold shell-isolated nanoparticles*). As AuSHINs foram aplicadas como agentes fototérmicos no cultivo *in vitro* de células derivadas de carcinoma mamário comparativamente a células não tumorais. O objetivo do recobrimento foi reduzir os efeitos de agregação, aumentando assim a eficiência fototérmica na redução da viabilidade celular. Para tanto, células derivadas de carcinoma mamário glandular (MCF7) e ductal (BT-474), e células mono e polimorfonucleares extraídas do sangue periférico, foram avaliadas considerando diferentes concentrações de AuSHINs ($2,2 \times 10^{12}$, $5,5 \times 10^{12}$ e $2,2 \times 10^{13}$ AuSHINs/mL) e períodos de incubação (30 min, 2 e 6 h), irradiadas (em 525 nm com $32,8 \text{ mW/cm}^2$ de irradiância) e não-irradiadas. O aquecimento fotoinduzido das AuSHINs reduziu a viabilidade celular das células MCF7 e BT-474 para aproximadamente 11% com $5,5 \times 10^{12}$ AuSHINs/mL e 2 h de incubação, o qual é significativamente maior que resultados prévios encontrados na literatura para AuNPs, enquanto nas células não tumorais essa condição não apresentou redução na viabilidade celular abaixo de 50%. Experimentos subsidiários revelaram a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) durante a fotoativação das AuSHINs. Além

disso, imagens de microscopia de fluorescência confocal revelaram fragmentação da membrana e diminuição nuclear para ambas as linhagens celulares tumorais, enquanto nas células não tumorais as alterações morfológicas foram mínimas, mesmo após fotoativação. Este resultado corrobora com os dados de extravasamento de LDH, indicando deturpações significativas na integridade da membrana celular das linhagens tumorais (MCF7 e BT-474) à medida em que a concentração de AuSHINs fotoativadas aumenta, enquanto efeitos mínimos foram observados para as não tumorais, confirmando a resistência das células saudáveis ao aumento de temperatura local. Tais dados sugerem o comprometimento da membrana das células tumorais por desnaturação de proteínas e abertura de poros, que são provavelmente a origem da fototoxicidade observada, desencadeando maior porcentagem de morte celular via necrose, quando comparada às células não tumorais.

Palavras-chave: terapia fototérmica, AuSHINs, carcinoma mamário

ABSTRACT

The new generation of nanostructured photothermal agents has relaunched the photothermal therapy (PTT) as a less invasive clinical treatment to fight cancer. Particularly, metallic nanoparticles demonstrate high efficiency in converting light into heat, triggering an increase in the local temperature and consequent cell death. Despite the effects of aggregation in media with high ionic strength, spherical gold nanoparticles (AuNPs) are pioneers in *in vitro* and *in vivo* PTT applications. Herein, AuNPs were coated with an ultrathin silica shell (2 - 5 nm), obtaining gold shell-isolated nanoparticles (AuSHINs). AuSHINs were applied as photothermal agents in the *in vitro* culture of cells derived from mammary carcinoma compared to non-tumor cells. The goal of the silica shell was to reduce the aggregation effects, increasing the photothermal efficiency in reducing cell viability. Cells derived from glandular (MCF7) and ductal (BT-474) mammary carcinoma, and mono- and polymorphic nuclear cells extracted from peripheral blood, were evaluated in different concentrations of AuSHINs (2.2×10^{12} , 5.5×10^{12} and 2.2×10^{13} AuSHINs / mL) and incubation periods (30 min, 2 and 6 h), irradiated (at 525 nm with $32,8 \text{ mW/cm}^2$ of irradiance) and non-irradiated. The photoinduced heating of AuSHINs reduced cell viability of MCF7 and BT-474 cells to approximately 11% with 5.5×10^{12} AuSHINs/mL and 2 h of incubation, which is significantly higher than previous results found in literature for AuNPs, while in non-tumor cells, the viability was not reduced below 50%. Subsidiary experiments revealed the generation of reactive oxygen species (ROS) during the AuSHINs photoactivation. Additionally, confocal fluorescence microscopies revealed membrane fragmentation and nuclear decrease for both tumor cell lines, but in non-tumor cells the morphological changes were minimal, even after photoactivation. This result corroborates with the LDH data, indicating significant disruptions in the cell membrane integrity of the tumor cell lines (MCF7 and BT-474) as the concentration of photoactivated AuSHINs increases, while minimal effects were observed for the non-tumor cells, confirming the resistance of healthy

cells to the local temperature increase. Such data suggest that the membrane of tumor cells is compromised by protein denaturation and pore opening, which are probably the origin of the observed phototoxicity, triggering a higher percentage of cell death via necrosis, when compared to non-tumor cells.

Keywords: photothermal therapy, AuSHINs, mammary carcinoma

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Diagrama de Jablonski para uma molécula fotossensibilizadora em solução após excitação luminosa. Os elétrons saem do estado fundamental (S_0) para os estados excitados singleto (S_1 e S_2) e tripleto (T_1) através da absorção de energia luminosa, no retorno emitem radiação na forma de luz, que podem ser diferenciadas em fluorescência e fosforescência. O FS, quando no estado excitado tripleto (T_1), pode interagir com o oxigênio presente no meio transferindo elétrons (mecanismo tipo 1 da TFD) e/ou energia (mecanismo tipo 2 da TFD), originando espécies reativas de oxigênio (EROs). Processos não radiativos como conversão interna, cruzamento intersistemas e relaxação vibracional também podem ocorrer. Adaptado de (Blanco et al. 2020). 18
- Figura 2.** Janela terapêutica de absorção biológica junto ao espectro de absorção visível-infravermelho próximo da água (H_2O), hemoglobina (Hb) e hemoglobina na presença de oxigênio (HbO_2). Adaptado de (Weissleder 2001). 19
- Figura 3.** Ilustração da ressonância de plasmon de superfície localizado (LSPR) gerada através da oscilação coerente dos elétrons da nuvem eletrônica em nanopartículas metálicas. Adaptado de (Willets and Duyn 2007). 22
- Figura 4.** Componentes real (lado esquerdo) e imaginária (lado direito) da função dielétrica de vários metais (ϵ_{metal}) em função do comprimento de onda. Adaptado de (Le Ru and Etchegoin 2009). 24
- Figura 5.** (a) Variação dos plasmons de absorção e imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos nanodiscos, nanotriângulos e nanobastões de ouro. (b) Dependência do espalhamento de luz com o diâmetro dos nanodiscos, caracterizados por MEV. Adaptado de (Hu et al. 2012). 25
- Figura 6.** Espectro de extinção no UV-Vis para duas suspensões coloidais de AuNPs, antes (vermelho) e após (azul) o efeito de agregação. Fonte: do autor. 26
- Figura 7.** (a) Amplificação do campo elétrico local em AuSHINs com excitação em 515 nm. Adaptado de (Aroca et al. 2011). E (b) aumento de temperatura em função do tempo de irradiação para AuNPs e AuSHINs em água ultrapura. A irradiação foi realizada com LED em 525 nm e $32,8 \text{ mW/cm}^2$ de irradiância. Fonte: do autor. 27
- Figura 8.** Representação da utilização da TFT em células tumorais. Células cancerosas, incubadas na presença de AuSHINs e expostas à radiação em comprimentos de onda específicos, sofrem aumento de temperatura e consequente morte por hipertermia, devido a

capacidade de conversão de luz em calor das nanopartículas. Adaptado de (Camacho et al. 2020).....	28
Figura 9. Estrutura molecular do (a) MTT e do (b) formazan, produto de cor púrpura formado após metabolização mitocondrial do MTT. Fonte: do autor.	34
Figura 10. Mecanismo de avaliação da citotoxicidade causada à membrana celular via ensaio de LDH. Fonte: do autor.....	34
Figura 11. Espectros de extinção no UV-Vis das AuNPs e AuSHINs diluídas (1:1 v/v) em água ultrapura e em meio de cultivo DMEM F12.....	37
Figura 12. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão (MET) para as (a) AuNPs e (b) AuSHINs.	38
Figura 13. Histogramas construídos a partir das imagens de MET e utilizados para determinar a (a) distribuição do diâmetro médio das AuNPs e a (b) espessura do recobrimento de sílica das AuSHINs. Foram contabilizadas 200 AuNPs e 200 AuSHINs utilizando o programa Image J®.	39
Figura 14. (a) Esquema de formação da superposição de proteínas presentes no SFB ao redor de uma nanopartícula, formando um arranjo corona. No primeiro momento (i) as nanopartículas são adicionadas no plasma ou fluído biológico, em seguida (ii) as proteínas de tamanho pequeno e intermediário são adsorvidas e por fim (iii) proteínas maiores podem substituir as menores, sofrendo desnaturação para atingir a adsorção irreversível. Adaptado de (Zhdanov 2019). (b) Espectros de extinção no UV-Vis e (c) aumento da temperatura em função do tempo de irradiação para as AuSHINs em água ultrapura, PBS, meio de cultivo DMEM F12 e PBS +10% FBS. A irradiação foi realizada usando um LED a 525 nm com irradiância de 32,26 mW/cm ² . Adaptado de (Camacho et al. 2022).	43
Figura 15. Aumento da temperatura local ao longo do tempo irradiando (a) AuNPs e (b) AuSHINs com comprimento de onda em 525 nm (LED verde). As setas on e off indicam os momentos em que o LED foi ligado e desligado, respectivamente.....	44
Figura 16. Controle com (a) MCF7 e (b) BT-474 para avaliar a citotoxicidade da sílica (SiO ₂) e do ácido clorídrico (HCl), utilizados no recobrimento das nanopartículas. *p <0,05 (testes t múltiplos, Bonferroni), em relação à população incubada por 2 h.....	45
Figura 17. Efeitos tóxicos (escuros) e fototóxicos (irradiados) via ensaios MTT para as concentrações de 2,2x10 ¹² , 5,5x10 ¹² e 2,2x10 ¹³ AuSHINs/mL após 30 min, 2h e 6h de incubação em células MCF7 (a, b e c, respectivamente) e BT-474 (d, e, e f, respectivamente).	

Ensaio com $6,5 \times 10^{12}$ AuNPs/mL foram utilizados como controle. * $p < 0,05$ (testes t múltiplos, Bonferroni), em relação à população não irradiada.....	46
Figura 18. Efeitos tóxicos (escuro) e fototóxicos (irradiadas) via ensaios MTT para as concentrações de $2,2 \times 10^{12}$, $5,5 \times 10^{12}$, e $2,2 \times 10^{13}$ AuSHINs/mL sobre as células MCF7 após (a) 2h e (b) 6h de incubação com e sem 5×10^{-3} mol/L do antioxidante NAC. Ensaio com $6,5 \times 10^{12}$ AuNPs/mL foram usados como controle. * $p < 0,05$ (teste t múltiplos, Bonferroni), em relação a população irradiada na ausência de NAC.....	48
Figura 19. Efeitos tóxicos (escuro) e fototóxicos (irradiada) via ensaios MTT para as concentrações de $2,2 \times 10^{12}$, $5,5 \times 10^{12}$, e $2,2 \times 10^{13}$ AuSHINs/mL sobre as células BT-474 após (a) 2h e (b) 6h de incubação com e sem 5×10^{-3} mol/L do antioxidante NAC. Ensaio com $6,5 \times 10^{12}$ AuNPs/mL foram usados como controle. * $p < 0,05$ (teste t múltiplos, Bonferroni), em relação a população irradiada na ausência de NAC.....	48
Figura 20. Ensaio com células não tumorais para (a) avaliação da citotoxicidade da sílica (SiO_2) e do ácido clorídrico (HCl), utilizados no recobrimento das nanopartículas e efeitos tóxicos (escuros) e fototóxicos (irradiados) via ensaios MTT para as concentrações de $2,2 \times 10^{12}$, $5,5 \times 10^{12}$ e $2,2 \times 10^{13}$ AuSHINs/mL após (b) 30 min, (c) 2h e (d) 6h de incubação. Ensaio com $6,5 \times 10^{12}$ AuNPs/mL foram utilizados como controle. * $p < 0,05$ (testes t múltiplos, Bonferroni), em relação à população não irradiada.....	51
Figura 21. Efeitos tóxicos (escuro) e fototóxicos (irradiada) via ensaios MTT para as concentrações de $2,2 \times 10^{12}$, $5,5 \times 10^{12}$, e $2,2 \times 10^{13}$ AuSHINs/mL sobre as células não tumorais após (a) 2h e (b) 6h de incubação com e sem 5×10^{-3} mol/L do antioxidante NAC. Ensaio com $6,5 \times 10^{12}$ AuNPs/mL foram usados como controle. * $p < 0,05$ (teste t múltiplos, Bonferroni), em relação a população irradiada na ausência de NAC.	53
Figura 22. Microscopia de fluorescência confocal da linhagem celular MCF7. (a) Controle celular e incubações de 6h com (b) $2,2 \times 10^{12}$, (c) $5,5 \times 10^{12}$ e (d) $2,2 \times 10^{13}$ AuSHINs/mL anterior a irradiação e após a irradiação com (e) controle de luz e (f) $2,2 \times 10^{12}$, (g) $5,5 \times 10^{12}$ e (h) $2,2 \times 10^{13}$ AuSHINs/mL. DAPI, em azul, delimitando o núcleo e WGA, em verde, demarcando a membrana celular.	55
Figura 23. Microscopia de fluorescência confocal da linhagem celular BT-474. (a) Controle celular e incubações de 6h com (b) $2,2 \times 10^{12}$, (c) $5,5 \times 10^{12}$ e (d) $2,2 \times 10^{13}$ AuSHINs/mL anterior a irradiação e após a irradiação com (e) controle de luz e (f) $2,2 \times 10^{12}$, (g) $5,5 \times 10^{12}$ e (h) $2,2 \times 10^{13}$ AuSHINs/mL. DAPI, em azul, delimitando o núcleo e WGA, em verde, demarcando a membrana celular.	57

Figura 24. Microscopia de fluorescência confocal para as células não tumorais. (a) Controle celular e incubações de 6h com (b) $2,2 \times 10^{12}$, (c) $5,5 \times 10^{12}$ e (d) $2,2 \times 10^{13}$ AuSHINs/mL anterior a irradiação e após a irradiação com (e) controle de luz e (f) $2,2 \times 10^{12}$, (g) $5,5 \times 10^{12}$ e (h) $2,2 \times 10^{13}$ AuSHINs/mL. DAPI, em azul, delimitando o núcleo e WGA, em verde, demarcando a membrana celular.59

Figura 25. Valores médios de diâmetro dos núcleos celulares antes e após irradiação das linhagens (a) MCF7, (b) BT-474 e (c) não tumorais. Foram contabilizadas aproximadamente 20 células para cada grupo utilizando o software Image J[®]. * $p < 0,05$ (teste t múltiplos, Bonferroni), em relação a população irradiada, * $p < 0,05$ (teste t múltiplos, Bonferroni), em relação ao controle celular (CC) e * $p < 0,05$ (teste t múltiplos, Bonferroni), em relação ao controle de luz (CL)..... 61

Figura 26. Ensaio LDH para células (a) não tumorais, (b) MCF7 e (c) BT-474 incubadas por 2h com diferentes concentrações de AuSHINs, antes e após fotoativação. * $p < 0,05$ (teste t múltiplos, Bonferroni), em relação a população não irradiada. (d) Relação entre os valores médios dos ensaios de MTT versus LDH, para as diferentes linhagens celulares, onde (1) representa o controle celular e (2), (3) e (4) incubações com $2,2 \times 10^{12}$, $5,5 \times 10^{12}$ e $2,2 \times 10^{13}$ AuSHINs/mL, respectivamente, por 2h seguida de irradiação.63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores médios de potencial zeta (ζ) das AuNPs e AuSHINs diluídas em água ultrapura e em meio de cultivo DMEM F12.....	40
Tabela 2. Caracterização do diâmetro das AuSHINs em água ultrapura, tampão fosfato-salino (PBS), meio de cultura DMEM F12, e PBS + 10% de soro fetal bovino (SFB) via análise por espalhamento de luz dinâmico (DLS).	41
Tabela 3. Viabilidade celular após fotoativação das AuSHINs para as células tumorais MCF7 e BT-474 e não tumorais via ensaios MTT. * $p < 0,05$ (testes t múltiplos, Bonferroni), das não tumorais em relação à MCF7 e * $p < 0,05$ (testes t múltiplos, Bonferroni), das não tumorais em relação à BT-474.	52

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACOES

AuNPs	Nanopartículas de ouro
AuSHINs	Nanopartículas de ouro recobertas com sílica
DMSO	Dimetilsulfóxido
EROs	Espécies reativas de oxigênio
LDH	Lactato Desidrogenase
LSPR	<i>Localized surface plasmon resonances</i>
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio
NAC	Antioxidante N-acetil-L-cisteína
TFD	Terapia fotodinâmica
TFT	Terapia fototérmica
UV-Vis	Ultravioleta visível

ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO

Essa dissertação está estruturada em cinco capítulos, sendo o capítulo 1 composto pela introdução e o capítulo 2 pelos objetivos. No capítulo 3 estão os procedimentos experimentais. Os resultados e discussões estão apresentados no capítulo 4, dividido entre a caracterização espectroscópica, morfológica e estrutural das AuNPs e AuSHINs e a aplicação dessas nanopartículas como agentes fototérmicos em experimentos *in vitro* com células derivadas de carcinomas mamário (MCF7 e BT-474) e não tumorais. A aplicação *in vitro*, conta por sua vez, com ensaios de MTT a fim de avaliar a viabilidade celular das células incubadas com diferentes concentrações de AuSHINs por diferentes períodos, antes e após fotoativação. Adicionalmente, ensaios de MTT com o antioxidante NAC foram realizados para a detecção de espécies reativas de oxigênio (EROs). Imagens de microscopia de fluorescência confocal permitiram a análise morfológica das linhagens e avaliação das alterações desencadeadas pelo tratamento fototérmico, enquanto através dos ensaios de LDH, foram mensuradas deturpações na membrana celular. Por fim, no capítulo 5, tem-se as conclusões desta dissertação.

SUMÁRIO

1. Introdução	16
1.1. Terapia fotodinâmica (TFD)	16
1.2. Terapia fototérmica (TFT)	19
1.3. Nanopartículas de ouro.....	21
1.4. Nanopartículas de ouro recobertas com sílica.....	26
2. Objetivos	29
3. Materiais e métodos	30
3.1. Síntese e recobrimento das nanopartículas de ouro	30
3.2. Caracterização das nanopartículas	30
3.3. Cultivo <i>in vitro</i> de células humanas	31
3.3.1. Incubação das células com AuSHINs: avaliação da citotoxicidade e fototoxicidade.....	32
3.4. Ensaio de MTT	33
3.5. Ensaio de LDH	34
3.6. Microscopia de fluorescência confocal	35
4. Resultados e Discussões	37
4.1. Caracterização das AuNPs e AuSHINs.....	37
4.2. Citotoxicidade e fototoxicidade das AuSHINs em células de carcinoma mamário via ensaio MTT	44
4.3. Citotoxicidade e fototoxicidade das AuSHINs em células não tumorais via ensaio MTT	49
4.4. Microscopia de fluorescência confocal	54
4.5. Ensaio LDH	63
5. Conclusões	66
REFERÊNCIAS	67

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

Como uma das principais causas de doenças do mundo, desafiando a vida de milhares de pessoas numa ampla faixa etária, o câncer é o crescimento descontrolado das células, que pode ocorrer em qualquer tipo de tecido no corpo humano (Bray et al. 2018). Dentre os órgãos acometidos, o câncer de mama é o de maior incidência entre as mulheres, representando 25% dos novos casos em nível mundial e 29,7% no Brasil (INCA - Instituto Nacional de Câncer 2021). O carcinoma originário dos ductos mamários (ductal) representa mais de 80% dos casos diagnosticados. Outros 10% são oriundos das glândulas responsáveis pela produção de leite materno (lobulares) (INCA 2022). Atualmente, as tradicionais cirurgias, radioterapias e quimioterapias ainda são as estratégias mais adaptadas para o tratamento (INCA - Instituto Nacional de Câncer 2021; INCA 2022), embora apresentem severos danos colaterais, eficácia terapêutica limitada, resistência a múltiplos fármacos (de Melo-Diogo et al. 2017; Mocna 2007) e efeito curativo bastante limitado para tumores metastáticos (Aoki et al. 2016). Para prevalecer na guerra contra o câncer, novos avanços em materiais terapêuticos, bem como o desenvolvimento de modalidades terapêuticas mais eficientes, são urgentemente necessários (Maria et al. 2016). Neste quesito, terapias empregando luz para interagir com tecidos biológicos merecem destaque, (INCA - Instituto Nacional de Câncer 2021; INCA 2022) como as terapias fotodinâmica (TFD) (Aoki et al. 2016; de Melo-Diogo et al. 2017; Mocna 2007) e fototérmica (TFT) (Abadeer and Murphy 2016; Maria et al. 2016; Reshetnickov et al. 2000) no tratamento clínico menos invasivo (Penon et al. 2017; Silva and Setlik 2015).

1.1. Terapia fotodinâmica (TFD)

A TFD baseia-se na administração controlada de uma molécula fotossensibilizadora, que induz espécies reativas de oxigênio (EROs) ao ser ativada por uma fonte luminosa. As EROs, como oxigênios singlete ($^1\text{O}_2$), radicais hidroxila ($\text{OH} \bullet$) e o ânion superóxido ($\text{O}_2\text{-}\bullet$), são agentes oxidantes que destroem células cancerígenas (Ermilov et al. 2004; Kochevar et al. 1996; Valenzano 1987). A TFD atua nas células cancerosas dos tecidos, podendo também afetar os vasos sanguíneos, evitando que tais células recebam nutrientes. O diagrama de Jablonski (Figura 1) mostra os diferentes estados eletrônicos de uma molécula fotossensibilizadora e os processos de transição entre eles. Um fotossensibilizador (FS), ao

absorver energia na forma luminosa, sai do estado fundamental (S_0) para os estados excitados singleto (S_1 e S_2) e tripleto (T_1). Ao retornar desses níveis energéticos, emitem radiação na forma de luz, que podem ser diferenciadas em fluorescência e fosforescência. A fluorescência é a transição do estado excitado singleto S_1 para o estado fundamental S_0 . Em S_1 o elétron está pareado com spins opostos ao de S_0 , sendo permitida a relaxação para o estado fundamental de forma rápida (taxa $\sim 10^8$ a 10^3 s^{-1}), existente somente durante a exposição à radiação. Enquanto isso, no processo de fosforescência ocorre lentamente (taxa $\sim 10^{-1}$ a 10^0 s^{-1}) a conversão da energia em luz após o fim da exposição, pois o elétron sofre um cruzamento intersistemas caracterizado como transição não radiativa, de S_1 para o estado tripleto T_1 , invertendo a multiplicidade do spin do elétron em T_1 . A relaxação para o estado fundamental é uma transição eletrônica de spin não permitida, visto que o spin do elétron em T_1 precisa sofrer inversão para retornar a S_0 , caracterizando um processo radiativo mais lento do que a fluorescência (Blanco et al. 2020; Feng, Zhang, and Ding 2020; Gryczynski et al. 2020). Além disso, processos não radiativos de conversão interna e relaxação vibracional também podem ocorrer. Na conversão interna a molécula passa para um estado eletrônico mais baixo de energia sem emissão. Esse tipo de transição ocorre entre dois estados de mesma multiplicidade ($S \rightarrow S$, $T \rightarrow T$). Já a relaxação vibracional caracteriza-se pela perda de energia entre os níveis vibracionais.

Outra alternativa para liberação de energia quando no estado excitado tripleto T_1 seria a reação com o oxigênio presente no meio (O_2) por meio de duas vias: transferência de elétrons (tipo 1) ou transferência de energia (tipo 2) (Blanco et al. 2020). No mecanismo tipo 1, ocorre a transferência de elétrons do FS com biomoléculas presentes no meio, gerando radicais livres que interagem com o oxigênio molecular no estado fundamental tripleto presente no meio (3O_2), formando então as EROs. Já no mecanismo tipo 2 ocorre a transferência de energia diretamente para o oxigênio (3O_2) livre, gerando o oxigênio singleto (1O_2), uma das espécies reativas de oxigênio. Ambos os mecanismos ocorrem paralelamente e são a base para a TFD. Entretanto, o tipo 2 é considerado o principal mecanismo para a oxidação de sistemas biológicos (Aoki et al. 2015; Dai et al. 2012; Maria et al. 2016).

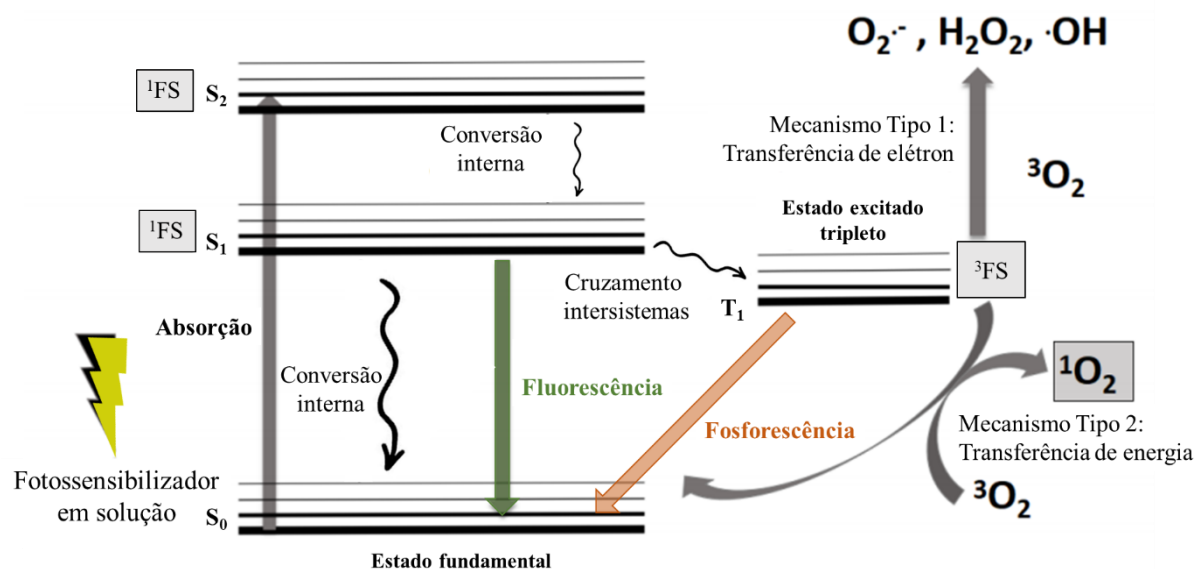


Figura 1. Diagrama de Jablonski para uma molécula fotossensibilizadora em solução após excitação luminosa. Os elétrons saem do estado fundamental (S_0) para os estados excitados singlete (S_1 e S_2) e tripleto (T_1) através da absorção de energia luminosa, no retorno emitem radiação na forma de luz, que podem ser diferenciadas em fluorescência e fosforescência. O FS, quando no estado excitado tripleto (T_1), pode interagir com o oxigênio presente no meio transferindo elétrons (mecanismo tipo 1 da TFD) e/ou energia (mecanismo tipo 2 da TFD), originando espécies reativas de oxigênio (EROs). Processos não radiativos como conversão interna, cruzamento intersistemas e relaxação vibracional também podem ocorrer. Adaptado de (Blanco et al. 2020).

Para todos os casos citados, a luz de excitação deve apresentar comprimentos de onda específicos. O retorno ao estado fundamental libera fótons com energia mais baixa e maior comprimento de onda (Feng et al. 2020). Isso faz com que seja possível selecionar alguns FSs que estejam dentro da janela ótica de absorção, no infravermelho próximo (>700 nm), visando a aplicação da TFD em ensaios *in vivo*, como ilustrado na Figura 2. A luz no infravermelho próximo (NIR, do inglês *near infrared*) oferece penetração corporal profunda pois alcança o coeficiente de absorção mínimo de moléculas de água, melanina e hemoglobina (Yang et al. 2019).

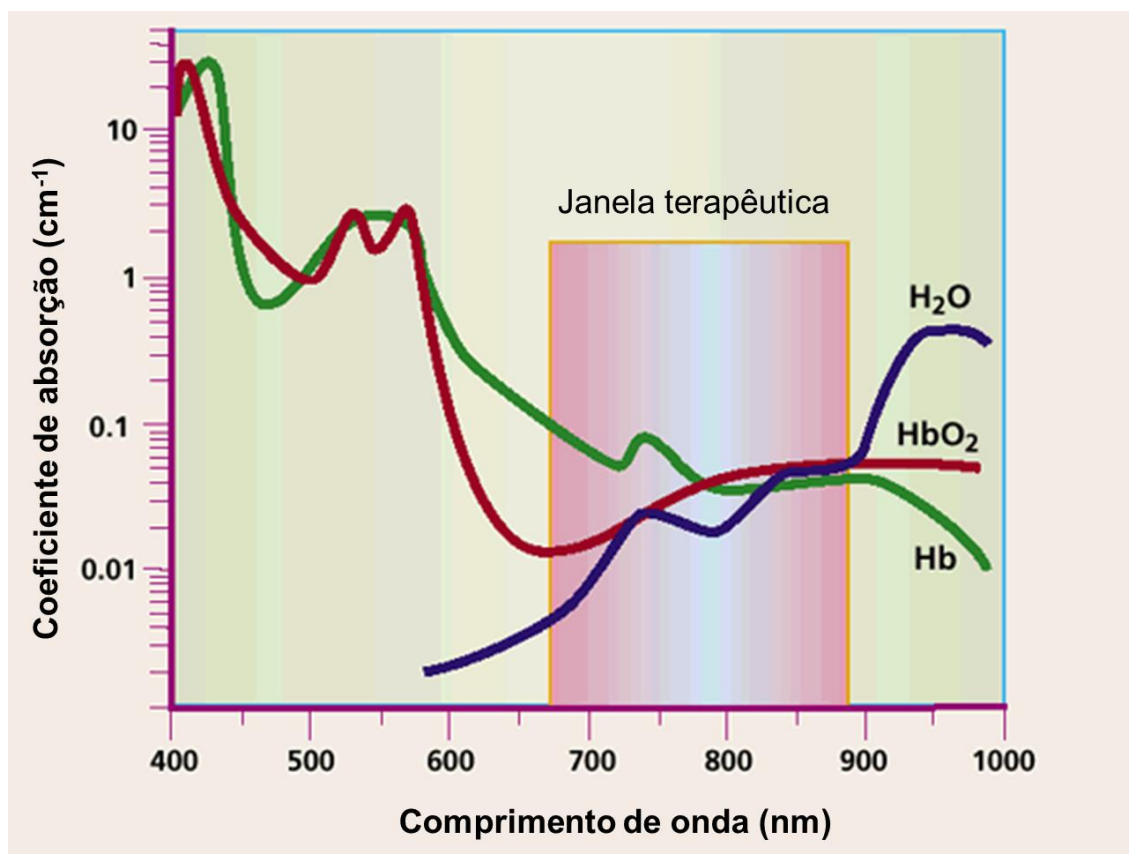


Figura 2. Janela terapêutica de absorção biológica junto ao espectro de absorção visível-infravermelho próximo da água (H₂O), hemoglobina (Hb) e hemoglobina na presença de oxigênio (HbO₂). Adaptado de (Weissleder 2001).

Sabe-se que para a eficácia terapêutica é necessário que a luz alcance o tecido de interesse nas doses apropriadas. No entanto, a profundidade de penetração da luz é altamente dependente do comprimento de onda e da cor da pele de cada indivíduo. Para um comprimento de onda na região do verde (ca. 530 nm), a penetração é de cerca de 0,32 mm, já para 700 nm aumenta-se a penetração para aproximadamente 0,55 mm de profundidade (Mustafa and Jaafar 2013).

1.2. Terapia fototérmica (TFT)

A TFT não depende do oxigênio local e pode ser utilizada no tratamento de cânceres hipóxicos, normalmente não-responsivos ao tratamento com TFD. Agentes fototérmicos convertem luz irradiada em calor, aumentando a temperatura local de tecidos específicos em aproximadamente 10 °C (Norouzi, Khoshgard, and Akbarzadeh 2018a). Danos ao DNA assim como desnaturação de proteínas e deturpação das membranas celulares ocorrem em temperaturas acima de 40 - 46 °C em células tumorais (Norouzi et al. 2018a), resultando na

ablação dos tecidos. Células cancerosas apresentam maior sensibilidade ao aumento da temperatura e são destruídas de forma seletiva, poupando as células saudáveis da vizinhança (Huang et al. 2006; Norouzi et al. 2018a; Panikkanvalappil, Hooshmand, and El-sayed 2017; Riley and Day 2017). Os tecidos tumorais têm estruturas vasculares caóticas e esparsas, o que torna a dissipação do calor lenta, resultando em um maior aquecimento local (Song 1984). Além disso, o ambiente tumoral é mais ácido e deficiente em nutrientes, o que se acredita ser a razão pela sensibilidade das células cancerosas ao calor (Reshetnickov et al. 2000). A TFT tem se mostrado eficiente e com isso surgem algumas demandas, como a escolha adequada da potência do laser, a fim de minimizar os danos no tecido normal adjacente ao tumor. A potência do laser é adequada quando menor que o limite de tolerância da pele, o que para comprimentos de onda na faixa de 808–980 nm, é cerca de 330–350 mW/cm² com um tempo de radiação de 10 a 100 s (Norouzi, Khoshgard, and Akbarzadeh 2018b). A hipertermia gerada pela TFT é capaz de desencadear a destruição das células através da morte celular via dois principais mecanismos, a apoptose e a necrose. A apoptose pode ocorrer quando há geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), ou ainda quando as temperaturas de aquecimento variam de 41 a 47 ° C, enquanto a necrose acontece por choque térmico em temperaturas geralmente superiores a 50 ° C (Gao et al. 2014; Spyratou et al. 2017). A necrose é uma via de morte celular mais rápida e baseada na desnaturação de proteínas e alterações fisiopatológicas graves, incluindo inchaço mitocondrial, ruptura da membrana plasmática e, consecutivamente, vazamento de conteúdo intracelular. A apoptose não envolve liberação do conteúdo intracelular, mas é baseada no encolhimento celular e organelar, condensação de cromatina nuclear, clivagem de DNA e externalização das fosfatidilserinas presentes no lado interno da membrana plasmática (Criddle et al. 2007).

Tecidos e células têm seus agentes fototérmicos naturais, como a hemoglobina e citocromos. Porém, sua eficiência de absorção é muito baixa, exigindo altas quantidades de energia absorvida (Panikkanvalappil et al. 2017). Para aumentar o efeito fototérmico, são utilizados corantes orgânicos sintéticos, que podem ser liberados seletivamente às células cancerosas, potencializando a destruição de células malignas. No entanto, esses corantes são propensos à fotodegradação, o que resulta em perda de atividade anticancerígena. A geração de agentes fototérmicos à base de materiais nanoestruturados, como nanopartículas de ouro (AuNPs), com maior eficiência de absorção e livres da fotodegradação, relança a TFT como terapia anticâncer (Reshetnickov et al. 2000).

1.3. Nanopartículas de ouro

De maneira geral, nanomateriais têm sido incorporados em produtos para cuidados pessoais, como cosméticos, protetores solares, e até em tintas. Dentre os nanomateriais metálicos, as nanopartículas de prata têm sido utilizadas em aplicações como sprays desinfetantes, lenços umedecidos, shampoos e cremes dentais (Jeevanandam et al. 2018). Apesar da cautela das agências reguladoras responsáveis pelo controle desses nanomateriais, como a Agência Europeia de Medicamentos (EMA) e a *Food and Drug Administration (FDA)* dos EUA, o uso de algumas nanoestruturas a base de lipossomos e metais em aplicações médicas e biomédicas já foi aprovado. O “Diafer”, uma nanopartícula férrica, atua na reposição de ferro em indivíduos com anemia e o “Hensify”, nanopartícula metálica atuante na intensificação da radiação em sarcomas, são exemplos das nanopartículas aprovadas (Foulkes et al. 2020).

No Brasil, apesar de alguns nanomateriais já serem utilizados na indústria têxtil, como as nanopartículas de prata, utilizadas em roupas esportivas, devido à capacidade antibacteriana e antiodorífera, a legislação para o uso interno de nanopartículas de ouro, em específico, ainda não está bem elucidada (Lazzaretti and Hupffer 2019). Embora exista diversas nanopartículas metálicas (como de ouro, prata, platina, chumbo) já relatadas para uso em TFT, as nanopartículas de ouro (AuNPs) tem ganhado destaque por sua alta biocompatibilidade, facilidade de síntese, modificação de superfície e ajuste de propriedades ópticas e físicas (Ali, Wu, and El-sayed 2019). Quando uma AuNP menor que o comprimento de onda da radiação incidente é irradiada por uma onda monocromática plana, o campo elétrico oscilante conduz a uma oscilação coerente dos elétrons na banda de condução (Mie 1908). Esta oscilação coletiva da nuvem eletrônica do metal excitado pela radiação é chamada de ressonância de plasmon de superfície localizado (Figura 3, LSPR, do inglês localized surface plasmon resonances), resultando em fortes campos eletromagnéticos (Aroca 2006). Tanto o espalhamento quanto a absorção de luz pelas nanopartículas são amplificados, o que é relevante em aplicações biomédicas (Sharma et al. 2015).

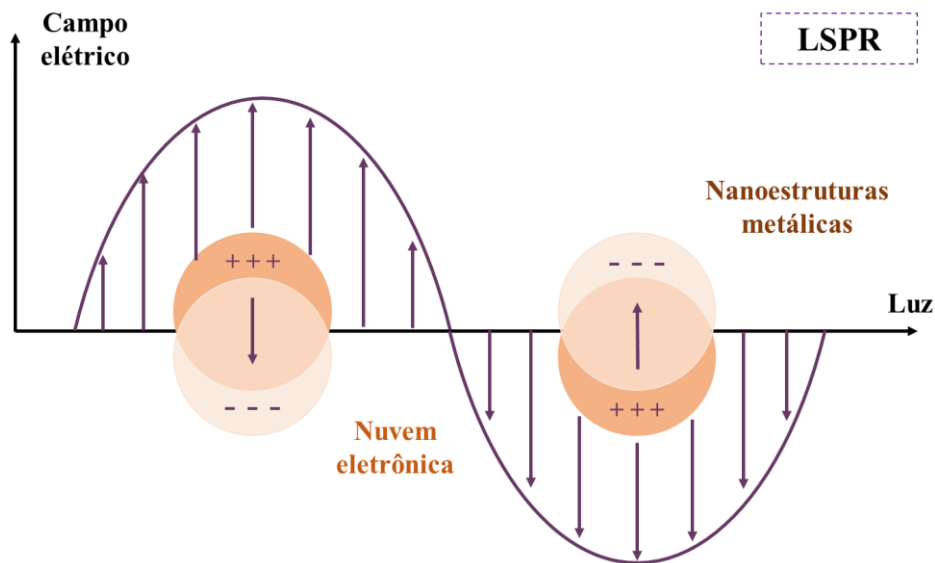


Figura 3. Ilustração da ressonância de plasmon de superfície localizado (LSPR) gerada através da oscilação coerente dos elétrons da nuvem eletrônica em nanopartículas metálicas. Adaptado de (Willets and Duyne 2007).

Devido às propriedades plasmônicas, nanopartículas metálicas espalham luz, em potencial quando irradiadas com comprimentos de onda próximos ao *plasmon* (Elnoby et al. 2018). Além do espalhamento, cada nanopartícula metálica mostra propriedades de absorção variadas, sendo a LSPR afetada pelo seu tamanho, forma e propriedades dielétricas (Samsuri et al. 2017). Em 1908, Gustav Mie resolveu as equações de Maxwell para definir a absorção de luz por nanopartículas metálicas, baseado na LSPR (Samsuri et al. 2017). Ele considerou que uma onda eletromagnética monocromática plana atinge uma partícula esférica homogênea e lisa imersa em um meio líquido com um índice de refração real. Para as soluções de campos eletromagnéticos, Mie considerou as eficiências de extinção, absorção e espalhamento, Q_{ext} , Q_{abs} e Q_{esp} . Essas eficiências são a seção de choque da extinção, absorção e espalhamento, normalizadas por unidade de área, sendo que:

$$Q_{ext} = Q_{abs} + Q_{esp}$$

Quando focados em um determinado comprimento de onda pode-se obter a situação onde Q_{abs} e Q_{esp} atinjam seus valores máximos. Nesse momento, ocorre oscilação da nuvem eletrônica do metal com o máximo de amplitude, caracterizando a LSPR (Duque, Blandón, and Riascos 2017; Mie 1908). Baseado na teoria de Mie, a seção de choque da extinção (Q_{ext}) para

nanopartículas esféricas separadas por um raio R (que é menor que o comprimento de onda da luz λ ($R / \lambda < 0,1$)), pode ser indicada como:

$$Q_{ext} = \frac{24\pi^2 R^3 N \varepsilon_m^{2/3}}{\lambda} \frac{\varepsilon_i}{(\varepsilon_r + 2\varepsilon_m)^2 + \varepsilon_i^2}$$

Sendo N o número de partículas por volume e considerando que os *plasmons* são radiativos, ou seja, espalham a luz incidente para a vizinhança. A quantidade de luz espalhada é uma propriedade do comprimento de onda da luz incidente e da natureza do material, dada pela função dielétrica do metal (ε_{metal}) (Maier 2007; Mie 1908):

$$\varepsilon_{metal} = \varepsilon_r + \varepsilon_i$$

Sendo ε_r a parte real e ε_i a parte imaginária da função dielétrica das nanopartículas metálicas (Mie 1908; Samsuri et al. 2017).

O campo elétrico incidente (E_{Laser}) induzirá um campo elétrico local (E_{Local}), que depende do formato e tamanho da nanopartícula, da função dielétrica do metal (ε_{metal}) e do meio (ε_{meio}) ao redor das nanopartículas, sendo ambos dependentes do comprimento de onda da luz incidente (Maier 2007; Mie 1908):

$$E_{local} \propto \frac{\varepsilon_{metal} - \varepsilon_{meio}}{\varepsilon_{metal} - 2\varepsilon_{meio}}$$

Dessa forma, o campo elétrico é máximo quando a seguinte condição de ressonância é atendida, para as partes real (Re) e imaginária (Im) (Maier 2007):

$$Re[\varepsilon_{metal}] \approx -2\varepsilon_{meio} \quad e \quad Im[\varepsilon_{metal}] < 1$$

Nanopartículas de ouro (AuNPs) e seus agregados atendem essa condição de ressonância e, portanto, podem conter *plasmons* de superfície localizados em regiões menores que o comprimento de onda da luz incidente. Isto permite uma alta concentração de energia eletromagnética, gerando um intenso campo eletromagnético na região do visível, conhecido como *hot spots* (Camden et al. 2008; Nie and Emory 1997). A Figura 4 apresenta uma

comparação das partes real e imaginária das funções dielétricas de vários metais, dentre eles ouro (Au), prata (Ag) e cobre (Cu), cuja condição de ressonância é atendida.

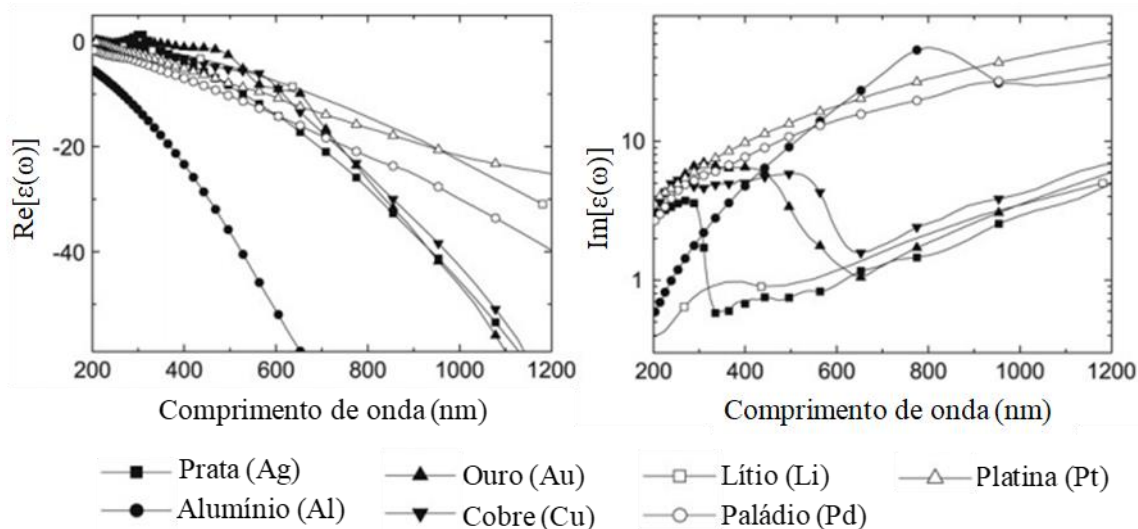


Figura 4. Componentes real (lado esquerdo) e imaginária (lado direito) da função dielétrica de vários metais (ϵ_{metal}) em função do comprimento de onda. Adaptado de (Le Ru and Etchegoin 2009).

A suspensão obtida após a síntese de nanopartículas é denominada coloide, sistema aparente homogêneo, mas que contém uma fase dispersante e outra dispersa, formada por partículas em nanoescala. Os *plasmons* de absorção dos coloides podem ser detectados a partir do espectro de extinção no UV-Vis. Baseados na Teoria de Mie, Hu *et al.*, 2012, confirmaram e demonstraram que as bandas de absorção variam de acordo com a forma, tamanho e tipo de metal do qual são formadas as nanopartículas (Hu et al. 2012). Nanodiscos, nanotriângulos e nanobastões de ouro são caracterizados na Figura 5a, com a banda do *plasmon* de absorção em 596 nm, 634 nm e 661 nm, respectivamente. Adicionalmente, na Figura 5b, podemos notar a variação do espalhamento de luz em função do diâmetro dos nanodiscos, intensificando e deslocando para o vermelho a ressonância do *plasmon* conforme o aumento do diâmetro (Hu et al. 2012). Essa possibilidade de ajuste do *plasmon* de absorção e espalhamento auxilia na utilização das nanopartícula metálicas, no geral, de acordo com a aplicação desejada, como manter a absorção na região do infravermelho próximo (NIR = 650 - 1350 nm) (Riley and Day 2017).

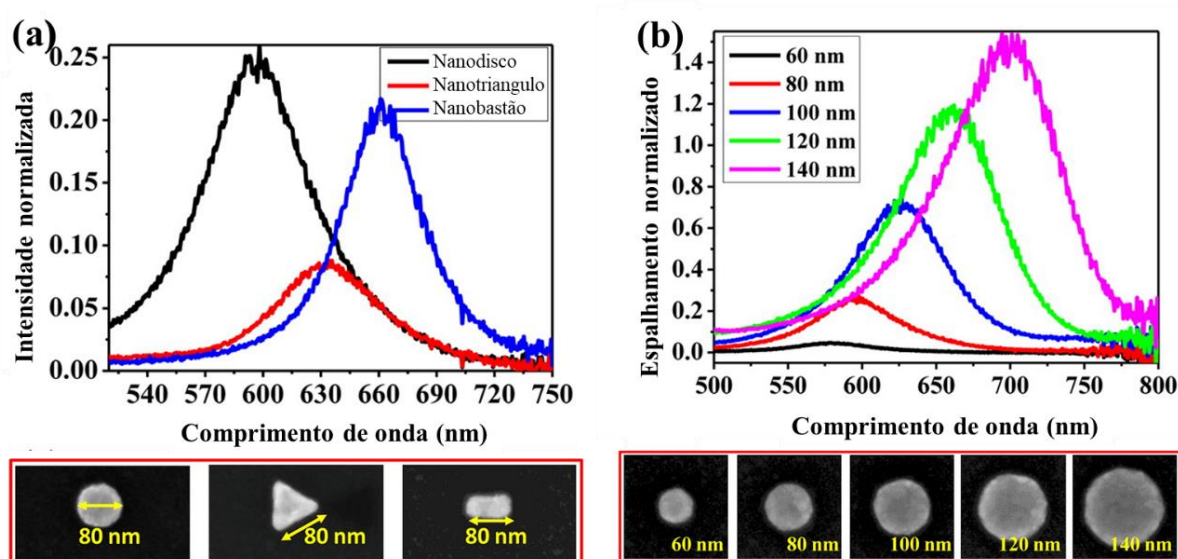


Figura 5. (a) Variação dos *plasmons* de absorção e imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos nanodiscos, nanotriângulos e nanobastões de ouro. (b) Dependência do espalhamento de luz com o diâmetro dos nanodiscos, caracterizados por MEV. Adaptado de (Hu et al. 2012).

Com relação a estabilidade das nanopartículas metálicas, a formação de agregados podem afetar suas propriedades plasmônicas e, conseqüentemente, a eficiência fototérmica, especialmente quando adicionadas a meios com elevada força iônica (Balasubramanian et al. 2002). Soluções salinas possuem íons que neutralizam as cargas ao redor das nanopartículas, anulando as forças de repulsão eletrostática presentes entre elas e responsáveis pela estabilidade coloidal (Oh et al. 2013; Pamies et al. 2014). Quando agregadas, notamos que, além do deslocamento da banda do *plasmon* para a região do vermelho (~ 630 nm), o coloide passa também a apresentar uma mudança de coloração por conta do acoplamento de *plasmons* interpartículas (Samsuri et al. 2017). Na Figura 6 tem-se uma ilustração dos efeitos de agregação, mudança de coloração de vermelho-púrpura para azul acinzentado e deslocamento do *plasmon*, observada para AuNPs com diâmetros entre 15-20 nm, preparadas via redução com citrato de sódio.

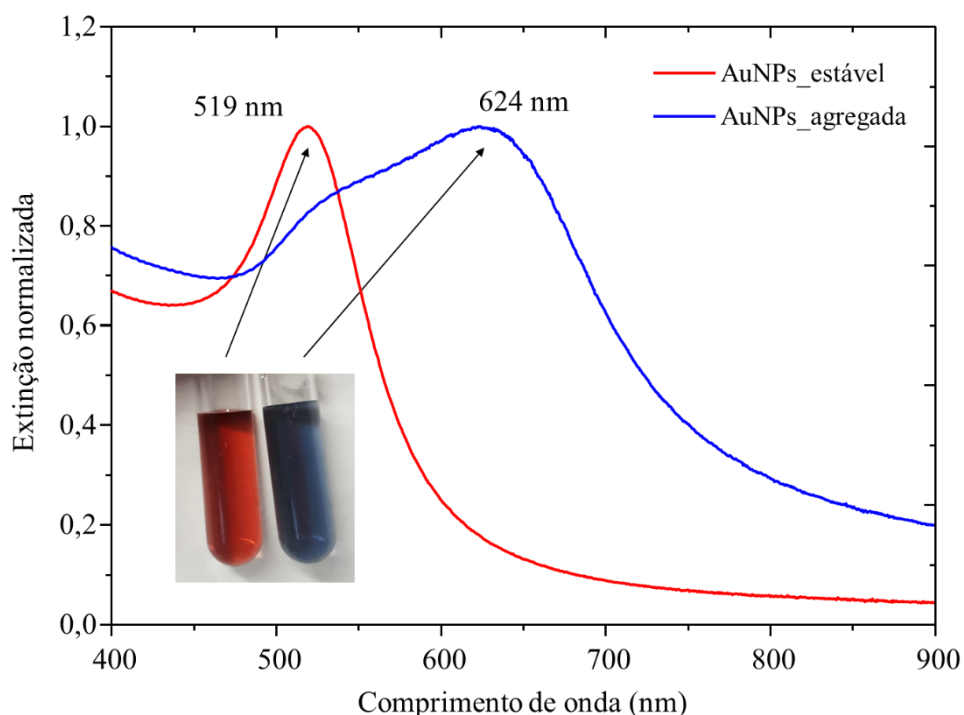


Figura 6. Espectro de extinção no UV-Vis para duas suspensões coloidais de AuNPs, antes (vermelho) e após (azul) o efeito de agregação. Fonte: do autor.

1.4. Nanopartículas de ouro recobertas com sílica

No que diz respeito à aplicação das AuNPs como agentes fototérmicos na TFT, algumas moléculas têm sido utilizadas na modificação de suas superfícies a fim de evitar efeitos de agregação durante os ensaios *in vitro* e *in vivo*. Por exemplo, o polietilenoglicol (PEG), cuja deposição superficial não apenas aumenta a hidrofiliicidade (Zhang et al. 2016) mas também melhora a biocompatibilidade (Ma et al. 2016; Zhan et al. 2012b), é amplamente utilizado. No entanto, o alto grau de polidispersividade das nanoestruturas recobertas com PEG e a geração de anticorpos anti-PEG, que resultam em uma rápida eliminação das nanoestruturas contendo PEG (Wang et al. 2017), são limitações que precisam ser superadas. Neste contexto, o recobrimento de AuNPs com sílica (AuSHINs, do inglês *gold shell-isolated nanoparticles*) tem se apresentado uma alternativa promissora na modificação química da superfície das nanopartículas (Li et al. 2010). O recobrimento ultrafino com 2 a 5 nm (Li et al. 2013) previne a agregação das nanopartículas e possibilita aplicá-las não apenas nos ensaios celulares *in vitro*, mas também em diagnósticos biomédicos, quimiossensores e biossensores (Li and Aroca 2017). Complementarmente, Aroca *et al* (2011) determinaram (Figura 7a) que a camada de sílica ao redor das AuNPs não inviabiliza a amplificação do campo elétrico local, onde duas regiões de espalhamento de luz podem ser observadas, uma rente ao núcleo (AuNP) e outra refratada para além da camada de sílica (Aroca et al. 2011). Além disso, a camada ultrafina de sílica ao redor

das AuNPs também tem demonstrado não afetar o aumento de temperatura em função do tempo de irradiação (Figura 7b), confirmando a eficiência do recobrimento com sílica em prevenir a agregação e manter a conversão fototérmica.

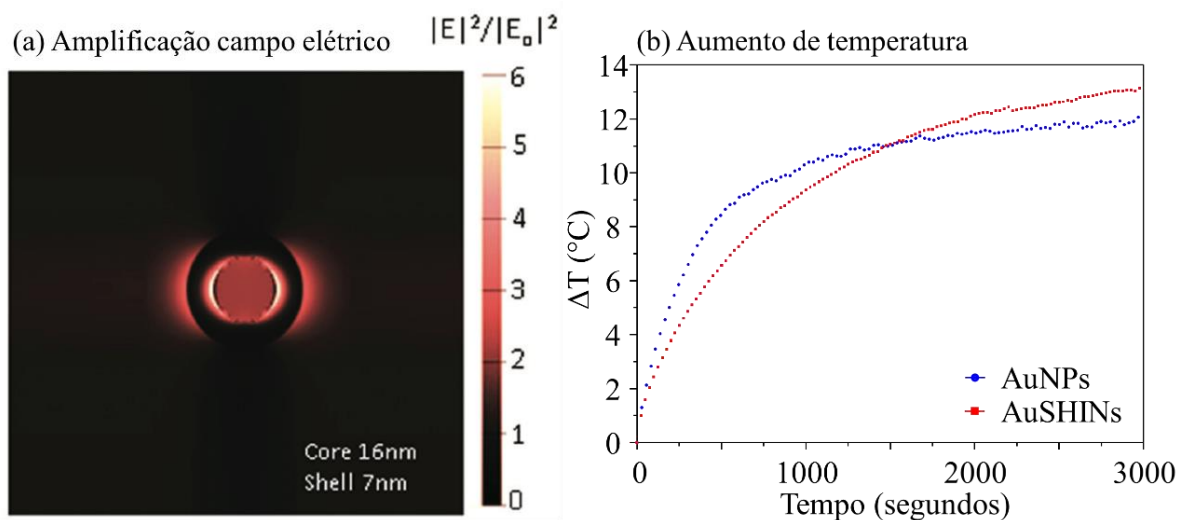


Figura 7. (a) Amplificação do campo elétrico local em AuSHINs com excitação em 515 nm. Adaptado de (Aroca et al. 2011). E (b) aumento de temperatura em função do tempo de irradiação para AuNPs e AuSHINs em água ultrapura. A irradiação foi realizada com LED em 525 nm e 32,8 mW/cm² de irradiância. Fonte: do autor.

A TFT tem sido aplicada com sucesso no tratamento de linhagens celulares derivadas de carcinomas mamários, como a MCF7 (Jannathul Firdhouse and Lalitha 2015; Mendes et al. 2017), MDA-MB-231 (Yang et al. 2017) e T47D (Heidari, Salouti, and Sariri n.d.). Dentre os tipos de carcinoma até então explorados, o carcinoma glandular MCF7 destaca-se por ser o tipo de câncer com a segunda maior incidência e, apesar de grandes as chances de cura, é de difícil detecção, podendo se apresentar em estado invasivo e metastático quando do seu diagnóstico (Society 2019). Por outro lado, os efeitos da TFT em células derivadas do carcinoma ductal mamário (BT-474) ainda são desconhecidos. Embora o potencial das AuSHINs como biossensores e em diagnósticos biológicos sejam conhecidos (Camacho et al. 2017, 2018; Li and Aroca 2017), ainda há poucos relatos de sua aplicação em ensaios celulares *in vitro*. Dessa maneira, AuSHINs foram utilizadas nesta dissertação como agentes fototérmicos e incubadas com células derivadas de carcinomas mamário (MCF7 e BT-474). Quando irradiadas, as AuSHINs geram um aumento da temperatura local, ocasionando a morte celular por hipertermia, como ilustrado no esquema da Figura 8.

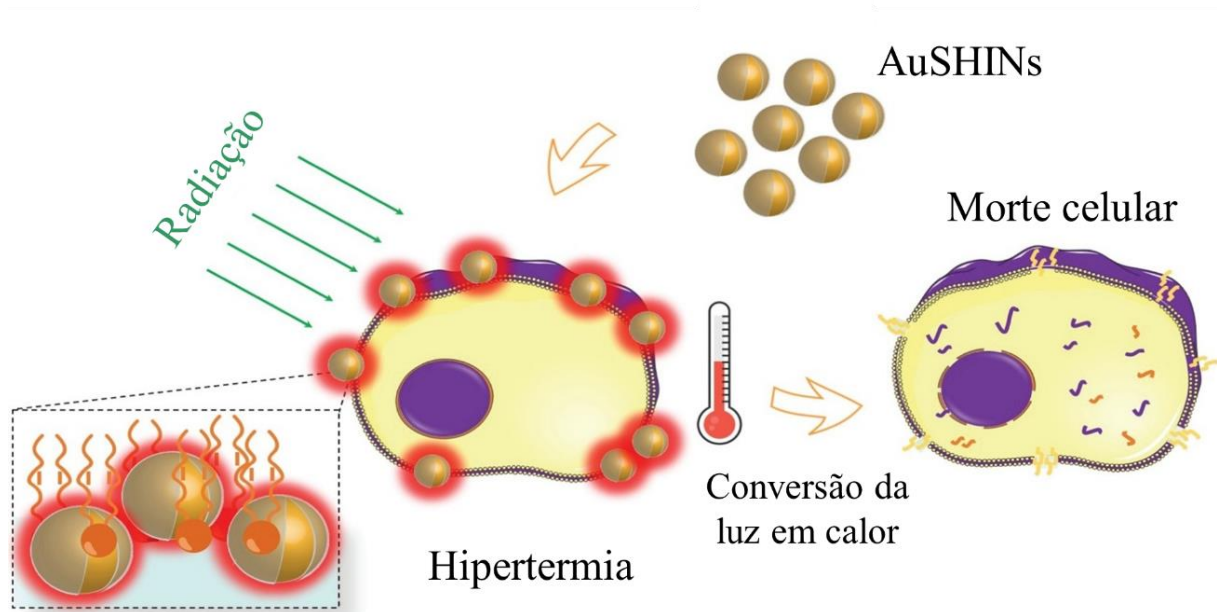


Figura 8. Representação da utilização da TFT em células tumorais. Células cancerosas, incubadas na presença de AuSHINs e expostas à radiação em comprimentos de onda específicos, sofrem aumento de temperatura e consequente morte por hipertermia, devido a capacidade de conversão de luz em calor das nanopartículas. Adaptado de (Camacho et al. 2020).

CAPÍTULO 2

2. OBJETIVOS

Este projeto teve como objetivo geral contribuir para a área de nanobiotecnologia e para o aperfeiçoamento das tecnologias empregadas em fototerapias. O objetivo principal se baseia no efeito fototérmico das AuSHINs sobre a viabilidade de células derivadas do carcinoma mamário glandular (MCF7) e ductal (BT-474). Os objetivos específicos do projeto contemplavam as seguintes atividades:

- i) Síntese de nanopartículas de ouro e recobrimento com sílica para obtenção das AuSHINs.
- ii) Determinação da eficiência fototérmica das AuSHINs frente ao cultivo *in vitro* de células derivadas do carcinoma mamário glandular (MCF7) e ductal (BT-474), estabelecendo comparativo com células não tumorais, extraídas do sangue periférico de doadores declarados sadios.
- iii) Determinação dos mecanismos de morte celular (necrose *vs.* apoptose) desencadeado pela presença e fotoativação das AuSHINs.

CAPÍTULO 3

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Síntese e recobrimento das nanopartículas de ouro

As AuNPs foram sintetizadas (Aroca et al. 2011; Grabar et al. 1995) via redução do ácido tetracloroáurico (HAuCl_4) com citrato de sódio ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$), onde tamanhos variados de nanopartículas podem ser obtidos ajustando a proporção molar de HAuCl_4 :citrato. AuNPs com aproximadamente 16 nm foram preparadas adicionando, em um balão de fundo redondo, 150 mL de HAuCl_4 a 5×10^{-4} mol/L mantendo-se em aquecimento e agitação vigorosa até atingir ebulição. Rapidamente, 7,5 mL de citrato de sódio a $38,8 \times 10^{-3}$ mol/L foram então adicionados e a solução resultante foi mantida sob aquecimento e agitação por 10 minutos após a mudança de coloração para vermelho-púrpura, indicando a formação da suspensão coloidal. Na sequência, removeu-se do aquecimento e manteve-se apenas a agitação por mais 15 minutos. O coloide é então resfriado a temperatura ambiente para a caracterização por espectroscopia de absorção no UV-Vis.

Visando futuras aplicações no cultivo *in vitro* de células, as AuNPs obtidas foram recobertas com sílica, a fim de evitar agregação em meio de cultura celular. Nanopartículas de ouro recobertas com sílica são denominadas pela sigla AuSHINs (do inglês, *gold shell-isolated nanoparticles*). Em um balão de fundo redondo, equipado com sistema de refluxo, 100 mL de coloide AuNPs 16 nm foram colocados sob vigorosa agitação com 6 mL de uma solução recém-preparada de APTMS [(3-Aminopropyl) trimethoxysilane; Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA, ref. 281778; 1×10^{-3} mol/L]. Após 10 minutos, 12 mL de solução de silicato de sódio (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA, ref.338443; 0,54%; pH= 10~11, ajustado com solução de HCl 0,01 mol/L) foram adicionados e ligou-se o aquecimento, mantendo a solução entre 90-95 °C e em agitação suave por cerca de 3 horas, ou até obter um recobrimento significativo acompanhado via espectroscopia de absorção no UV-Vis. Durante esse período, foram recolhidas alíquotas de AuSHINs em intervalos de 1 hora avaliando o deslocamento no *plasmon* de extinção.

3.2. Caracterização das nanopartículas

A caracterização espectroscópica das nanopartículas sem (AuNPs) e com recobrimento de sílica (AuSHINs) foi realizada via espectroscopia de absorção no UV-Vis em

um espectrofotômetro Varian, modelo Cary 60, de 190 a 1100 nm, disponível no Laboratório de Nanotecnologia do Departamento de Biotecnologia, FCL – UNESP, Assis – SP. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão (MET) foram realizadas para caracterização estrutural e morfológica das AuNPs e AuSHINs em um microscópio eletrônico de transmissão JEM-2100-JEOL (com voltagem variando entre 80, 100, 120, 160 e 200 kV), disponível no Laboratório de Microscopias Eletrônica de Transmissão no Instituto de Química de São Carlos. Análises de diâmetro hidrodinâmico via espalhamento de luz dinâmico (DLS) e potencial zeta foram realizadas em um equipamento disponível no Laboratório de Materiais Nanoestruturados para Análises Ambientais e Biológicos do Departamento de Física, FCT – UNESP, Presidente Prudente – SP.

Experimentos subsidiários foram realizados a fim de caracterizar o aumento de temperatura local induzido pela fotoativação das AuSHINs. 300 μ L de suspensão coloidal foram adicionados em um poço de placa de cultura, previamente acoplado a um sensor de temperatura, e irradiados com um LED verde (525 nm/ Irradiância 32,8 mW/cm²). O aumento da temperatura foi acompanhado com o tempo através de medidas *on* e *off* referindo-se aos tempos em que as AuNPs são expostas e não expostas, respectivamente, a fonte de luz.

3.3. Cultivo *in vitro* de células humanas

Células do carcinoma mamário glandular (MCF7) e ductal (BT-474), obtidas a partir do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ ref. 0162 e 0353, respectivamente), foram cultivadas em garrafas de cultura de 25 cm² (Corning ref. 3290), incubadas em estufa umedecida a 37 °C e 5% de CO₂ e meio de cultura DMEM F12 (Sigma ref. D8900-10X1L) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, Cultilab ref. 0521-500) e acrescido de antibióticos e antimicóticos (ThermoFisher, ref. 15240-062). O crescimento celular foi acompanhado diariamente utilizando-se um microscópio óptico invertido (ECLIPSE TS100, Nikon, Spectron, disponível no Laboratório de Imunologia Celular e Molecular do Departamento de Ciências Biológicas, FCL – UNESP, Assis – SP) e uma capela de fluxo laminar foi utilizada para todas as manipulações envolvendo a cultura de células. De acordo com o metabolismo de cada linhagem celular, com a confluência em cerca de 80% nas garrafas de cultivo, as células passaram pelo processo de lavagem com NaCl (0,15 mol/L) e/ou PBS e posterior suspensão através da adição de tripsina (0,5 mL) por 3 minutos ou até que as células se soltem por completo. Foram então adicionados 5 mL de meio DMEM F12 a fim de neutralizar a ação da tripsina e possibilitar a contagem celular. Cerca de metade desse volume resultante foi usado

para plaqueamento. Análises preliminares para a quantificação da viabilidade celular foram realizadas via método de exclusão do azul de tripano, corante para o qual as células vivas são impermeáveis. O número de células não viáveis é determinado em uma câmara de Neubauer onde 10 µL do corante são adicionados a 90 µL da suspensão de células. O refinamento dos ensaios de citotoxicidade foi realizado para culturas celulares com viabilidade inicial superior a 95%.

Células não tumorais, classificadas como mononucleares e polimorfonucleares foram isoladas de amostras de sangue periférico humano de voluntários declarados saudáveis e maiores de idade, após consentimento por escrito. Foram coletados 20 mL de sangue humano em tubos contendo citrato de sódio (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, EUA). Cada amostra de sangue foi colocada cuidadosamente em 6 mL de meio de separação Histopaque (Sigma-Aldrich, densidades 1119 e 1077), com 3 mL de cada densidade, e a seguir centrifugadas a 700 g por 30 minutos a 25°C. Os anéis contendo mononucleares e polimorfonucleares isolados foram coletados e lavados com NaCl 0,15 mol/L a 800 g por 5 minutos. O procedimento experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Universidade Estadual Paulista (UNESP) da Faculdade de Ciências Humanas e Letras (número de aprovação: 46730721.9.0000.5401) e a coleta realizada por pessoal treinado e autorizado.

3.3.1. Incubação das células com AuSHINs: avaliação da citotoxicidade e fototoxicidade

As células tumorais (MCF7 e BT-474) e não tumorais (5×10^4 /poço), diluídas em meio de cultivo DMEM F12, foram semeadas em placas de 96 poços e incubadas por 24 horas a 37 °C para que atingissem confluência $\geq 80\%$. Em seguida, o cultivo recebeu diferentes concentrações de AuSHINs diluídas em meio de cultura DMEM F12 ($2,2 \times 10^{12}$, $5,5 \times 10^{12}$ e $2,2 \times 10^{13}$ AuSHINs/mL) e foram incubadas em períodos distintos (30 min, 2 e 6 horas) de forma a atingir um volume final de 100 µL/poço. Os grupos controle positivos foram cultivados nas seguintes condições: i) apenas em meio de cultura; e ii) em AuNPs sem recobrimento ($6,5 \times 10^{12}$ AuNPs/mL). Células cultivadas apenas em meio de cultura foram consideradas 100% viáveis e usadas como controle celular (CC). O controle de luz (CL) foi obtido irradiando as células cultivadas na ausência das AuNPs e AuSHINs e o controle de morte (CM) foi feito pela adição de peróxido de hidrogênio (50×10^{-6} mol/L). O metabolismo celular perante as diferentes concentrações de AuSHINs e tempos de incubação foi avaliado por ensaios de MTT. Posteriormente, a cultura celular foi exposta a 1 hora de irradiação utilizando um LED

BioLambda com comprimento de onda em 525 nm (32,8 mW/cm² de irradiância). Após 30 minutos do fim da exposição à luz, a viabilidade celular foi mensurada através de ensaio colorimétrico de MTT e LDH. Experimentos subsidiários envolvendo o antioxidante N-acetil-L-cisteína (NAC, Sigma ref. A7250) foram realizados a fim de avaliar a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) durante a fotoativação das AuSHINs. Para tanto, as condições de cultivo sob irradiação foram duplicadas com adição de 5 mmol/L de NAC para as análises via MTT. Os dados experimentais de citotoxicidade e fototoxicidade foram analisados com os softwares Microsoft Excel[®], Origin[®] e GraphPad Prism[®] 8 e avaliados com análise de variância (*one-unpaired multiple t test*), seguido de teste Bonferroni, utilizando nível de significância $p \leq 0,05$. Todos os testes foram realizados em triplicata.

3.4. Ensaio de MTT

O ensaio com MTT é um teste colorimétrico de viabilidade celular, onde o sal específico (brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio, Sigma ref. M5655, Figura 9a) é metabolizado, via desidrogenases mitocondriais, apenas por células viáveis, transformando o composto que possui coloração amarelada em tons púrpura. O sal de MTT foi diluído em meio de cultura DMEM F12 seguindo a concentração recomendada pelo fabricante (0,5 mg/mL) em um volume final de 100µL/poço. Após o respectivo tratamento, o meio de cultivo foi substituído pela solução de MTT e incubado por 40-60 minutos. Em seguida, a solução de MTT é substituída por 50 µL de dimetilsulfóxido puro (DMSO, Sigma ref. D4540-1L) para solubilização dos cristais de formazan (Figura 9b). A absorbância da solução foi mensurada em aparelho de espectrofotometria (Multiskan[™] FC Microplate Photometer, ref. 51119000, disponível no Laboratório de Imunologia Celular e Molecular do Departamento de Ciências Biológicas, FCL – UNESP, Assis – SP), com leitura em comprimento de onda de 560 nm (específico para coloração resultante da metabolização do sal). A metabolização do sal é diretamente proporcional à taxa metabólica celular, possibilitando inferir a mortalidade/viabilidade celular a partir da absorbância mensurada. A fim de evitar interferentes na leitura, foram realizadas lavagens com NaCl 0,15 mol/L para retirada de possíveis vestígios do composto antes da adição do MTT.

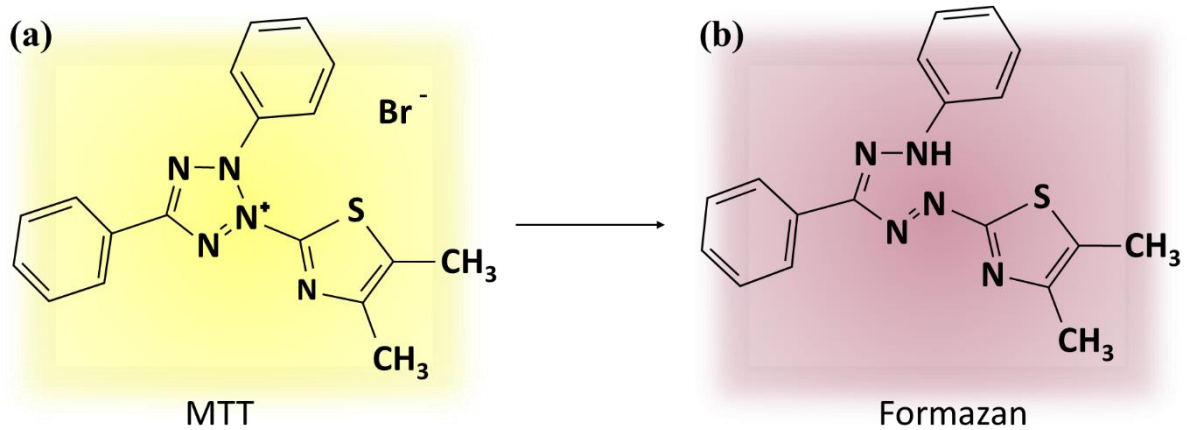


Figura 9. Estrutura molecular do (a) MTT e do (b) formazan, produto de cor púrpura formado após metabolização mitocondrial do MTT. Fonte: do autor.

3.5. Ensaio de LDH

O ensaio avalia a liberação da enzima lactato desidrogenase (LDH) em células que tenham perdido a integridade da membrana. A enzima LDH é normalmente encontrada no citoplasma das células e sua liberação indica que houve danos à membrana plasmática, desencadeando sua liberação no meio de cultura celular. A LDH extracelular pode ser quantificada por uma reação enzimática acoplada em que a LDH catalisa a conversão de lactato em piruvato via redução de NAD⁺ em NADH. A oxidação de NADH pela diaforase leva à redução de um sal de tetrazólio (iodonitrotetrazólio (INT)) a um produto formazan (Figura 10) que pode ser medido espectrofotometricamente em 490 nm. O nível de formação de formazan é diretamente proporcional à quantidade de LDH liberada no meio, o que é indicativo de citotoxicidade causada à integridade da membrana celular (Aslantürk 2018).

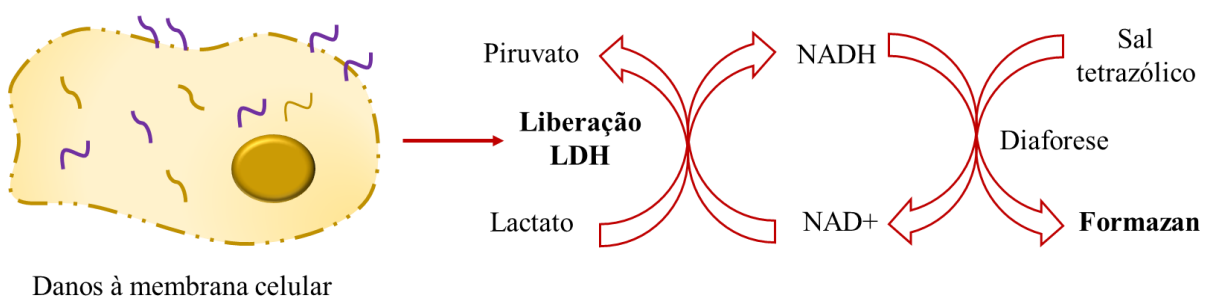


Figura 10. Mecanismo de avaliação da citotoxicidade causada à membrana celular via ensaio de LDH. Fonte: do autor.

A liberação de LDH foi avaliada para as células tumorais (MCF7 e BT-474) e não tumorais (3×10^4 /poço) tratadas com diferentes concentrações de AuSHINs diluídas em meio de

cultura DMEM F12 ($2,2 \times 10^{12}$, $5,5 \times 10^{12}$ e $2,2 \times 10^{13}$ AuSHINs/mL) juntamente com os seguintes grupos controle: i) apenas em meio de cultura; ii) adição de 10 µL de água ultrapura filtrada aos 100 µL de meio DMEM F12 para liberação espontânea de LDH; e iii) adição de 10 µL do tampão de lise 10X, para a máxima liberação de LDH. O ensaio foi realizado utilizando o kit CyQUANT™ LDH Cytotoxicity Assay (ref C20301, Invitrogen, ThermoFisher). Ao final do tempo de exposição celular e fotoativação, 50 µL do meio sobrenadante de cada poço foram transferidos para outra placa e receberam 50 µL da mistura de reação (54×10^{-3} mol/L L(+) lactato, $0,66 \times 10^{-3}$ mol/L cloreto de 2-p-iodofenil-3-p-nitrofenil tetrazólio, $0,28 \times 10^{-3}$ mol/L metossulfato de fenazina, e $1,3 \times 10^{-3}$ mol/L NAD 0,2 mol/L tampão Tris, pH 8.2). Após 30 minutos de incubação, foram adicionados, em cada poço, 50 µL da solução de parada. A absorbância foi medida a 450 nm através do leitor de placa Multiskan™ FC e a porcentagem de LDH liberado foi obtida através da fórmula:

$$\% \text{ LDH liberada} = \frac{[(\text{Tratamento AuSHINs}) - (\text{Liberação espontânea})]}{[(\text{Liberação máxima}) - (\text{Liberação espontânea})]} * 100$$

3.6. Microscopia de fluorescência confocal

Os mecanismos de adsorção e internalização das nanopartículas, bem como os efeitos da TFT, foram avaliados via microscopia de fluorescência confocal. O princípio de funcionamento da iluminação e observação por fluorescência baseia-se na marcação do material de interesse com uma molécula fluorescente. A marcação celular foi mediada por dois fluoróforos, WGA AlexaFluor® 488 conjugate (Wheat Germ Agglutinin Conjugates with AlexaFluor®488; Invitrogen, Gaithersburg, MD, USA, ref. W11261) e DAPI (4,6- diamidino-2- phenylindole; Invitrogen, Gaithersburg, MD, USA, ref. R37606). O WGA AlexaFluor®488 possui afinidade à membrana celular e, quando excitado em 495 nm emite fluorescência na região do verde (519 nm), caracterizando então a membrana das células. Já o DAPI se liga ao DNA, emitindo fluorescência na região do azul (455 nm) ao ser excitado no comprimento de onda de 358 nm, demarcando assim o núcleo celular.

As análises microscópicas foram realizadas para as células tumorais (MCF7 e BT-474) e não tumorais. As células (1×10^5 / poço) foram diluídas em meio de cultivo DMEM F12, semeadas em placas de 24 poços previamente preparadas, com a presença de lamínulas, e incubadas por 24 horas a 37 °C para que atingissem confluência $\geq 80\%$. As AuSHINs foram então adicionadas e posteriormente incubadas. Após o período de incubação, o sobrenadante

foi retirado e adicionado o corante de membrana WGA AlexaFluor[®] 488 conjugate (5×10^{-6} g/mL). O excesso de WGA AlexaFluor[®] 488 conjugate foi retirado após 10 minutos e os poços foram lavados, no mínimo 5 vezes, com PBS. Na sequência, as lamínulas foram retiradas do poço e finalizadas com uma gota ($\sim 10 \mu\text{L}$) de ProLong[™] Gold (ref. P36931; Molecular Probes, Eugene, OR, USA) acrescido do corante DAPI, deixando-as secarem por aproximadamente 24 horas fora da geladeira. Posteriormente ao período de secagem, as lamínulas foram seladas/coladas com base incolor de unha (Risque) e mantidas na geladeira até realização dos experimentos. As imagens foram obtidas através do Microscópio Confocal Nikon, C2/C2si Eclipse Ti-E, no Laboratório Multiusuário de Microscopia Confocal do Departamento de Física, FCT – UNESP, Presidente Prudente – SP e tratadas utilizando o software Image J[®].

CAPÍTULO 4

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Caracterização das AuNPs e AuSHINs

Após a síntese das nanopartículas de ouro (AuNPs) e recobrimento com sílica (AuSHINs), os espectros de extinção no UV-Vis foram obtidos para cada amostra diluída em água ultrapura e em meio de cultivo DMEM F12, como mostrado na Figura 11.

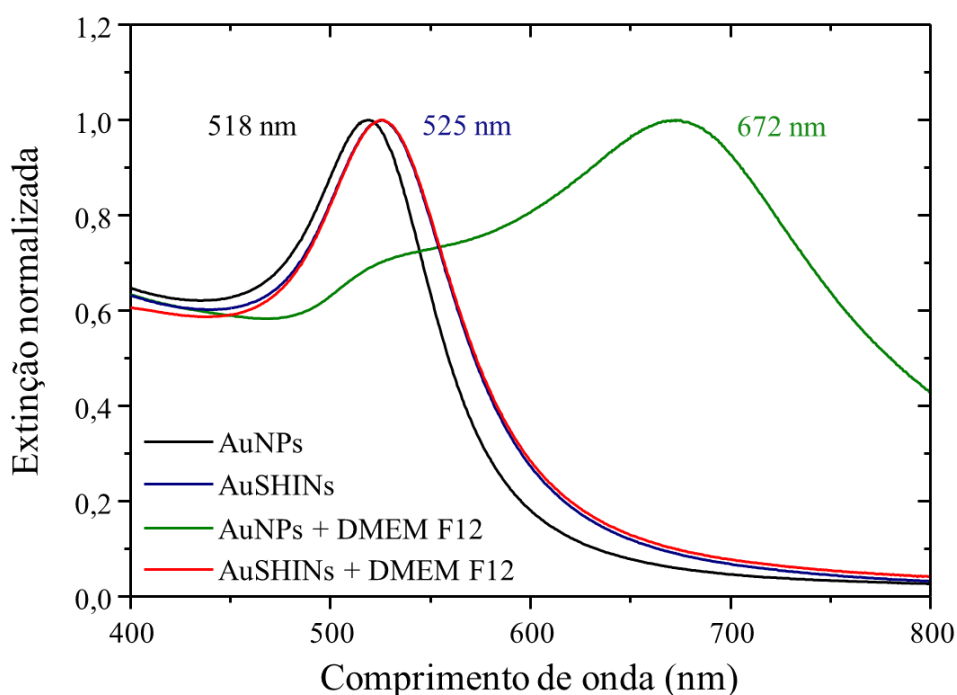


Figura 11. Espectros de extinção no UV-Vis das AuNPs e AuSHINs diluídas (1:1 v/v) em água ultrapura e em meio de cultivo DMEM F12.

A banda do *plasmon* de extinção das AuNPs está localizada em 518 nm, enquanto a das AuSHINs está em 525 nm. Esse deslocamento de aproximadamente 7 nm caracteriza a mudança no índice de refração do meio devido a presença da camada de sílica depositada ao redor das AuNPs (Camacho et al. 2017; Guerrero, Albella, and Aroca 2014). Visando a aplicação *in vitro*, ainda na Figura 11, tem-se os espectros das AuNPs e AuSHINs em meio de cultivo celular DMEM F12. Quando as AuNPs, carregadas negativamente, são expostas ao meio de cultivo, contendo uma alta concentração de sais, os cátions presentes na solução salina neutralizam os grupos negativos ao redor das nanopartículas, quebrando as forças de repulsão eletrostáticas entre elas, responsável por manter a estabilidade coloidal junto com as interações

de van der Waals (Oh et al. 2013; Pamies et al. 2014). Esse efeito leva a agregação das AuNPs, o qual é confirmado pelo alargamento e deslocamento da banda de extinção para 672 nm (Grabar et al. 1995), interferindo não apenas no tamanho das nanoestruturas como também na eficiência da TFT. Ao recobrir essas nanopartículas (AuSHINs), o perfil espectral se mantém o mesmo na ausência ou presença de meio de cultivo (espectros sobrepostos na Figura 11, azul e vermelho), confirmando que o recobrimento com sílica evita o efeito de agregação e torna viável a aplicação das AuSHINs no cultivo *in vitro* de células.

Complementando as informações espectroscópicas, imagens de microscopia eletrônica de transmissão (MET) das AuNPs e AuSHINs foram realizadas para caracterização morfológica e estrutural, e estão apresentadas na Figura 12a e 12b, respectivamente.

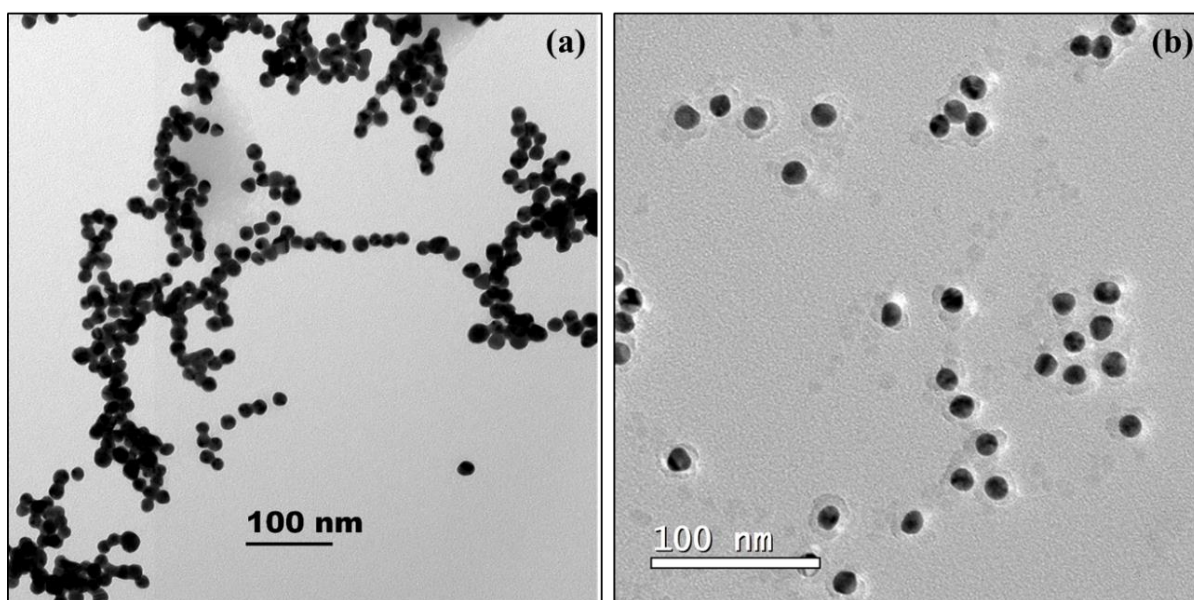


Figura 12. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão (MET) para as (a) AuNPs e (b) AuSHINs.

Através das imagens de MET podemos confirmar o formato predominantemente esférico das AuNPs e a presença da camada de sílica ao redor das AuSHINs. Além disso, foi possível determinar o diâmetro médio e a espessura de recobrimento das nanopartículas a partir da construção de histogramas, mostrados na Figura 13a e 13b.

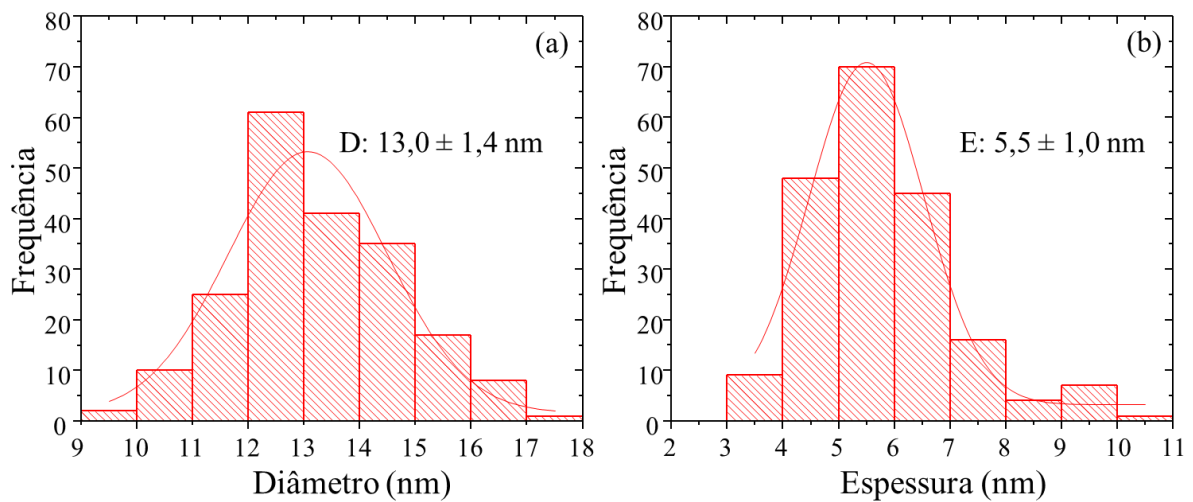


Figura 13. Histogramas construídos a partir das imagens de MET e utilizados para determinar a (a) distribuição do diâmetro médio das AuNPs e a (b) espessura do recobrimento de sílica das AuSHINs. Foram contabilizadas 200 AuNPs e 200 AuSHINs utilizando o programa Image J[®].

Analisando os histogramas construídos a partir das imagens de MET obteve-se um diâmetro médio de $13,0 \pm 1,4$ nm para as AuNPs (Figura 13a), o que está de acordo com os valores relatados na literatura por Grabar et al. e Aroca et al. os quais através da mesma metodologia de síntese obtiveram AuNPs com diâmetros entre 13 a 16 nm (Aroca et al. 2011; Grabar et al. 1995). Em termos de recobrimento, a espessura da camada de sílica obtida foi de $5,5 \pm 1,0$ nm (Figura 13b), similar as AuSHINs de 16 nm recobertas com uma camada de sílica de $7,5 \pm 0,5$ nm por Aroca et al (Aroca et al. 2011).

O diâmetro das AuNPs (d_{AuNPs}), obtido via histograma de MET (Figura 13a), foi utilizado para determinar a concentração aproximada das AuNPs e AuSHINs. Sabendo que as AuNPs possuem forma predominantemente esférica, obteve-se os valores de raio (R_{AuNPs}) e volume (V_{AuNPs}):

$$d_{AuNPs} = 13,0 \text{ nm}$$

$$d_{AuNPs} = 2 \times R_{AuNPs} \rightarrow R_{AuNPs} = 6,5 \text{ nm} = 6,5 \times 10^{-7} \text{ cm}$$

$$V_{AuNPs} = \frac{4}{3} \pi R^3 = \frac{4}{3} \pi (6,5 \times 10^{-7} \text{ cm})^3 = 1,15 \times 10^{-18} \text{ cm}^3$$

Considerando a densidade do ouro ($\rho_{ouro} = m/V = 19,32 \text{ g/cm}^3$), a massa de uma AuNP (m_{AuNPs}) é dada por:

$$m_{AuNP} = \rho_{ouro} \times V_{AuNP} = 19,32 \text{ g/cm}^3 \times 1,15 \times 10^{-18} \text{ cm}^3 = 2,22 \times 10^{-17} \text{ g}$$

Um volume conhecido de suspensão coloidal de AuNPs ($V = 3 \text{ mL}$) foi levado à estufa para secagem e a massa resultante foi medida ($m = 8,658 \times 10^{-4} \text{ g}$). Então, considerando a relação matemática descrita abaixo, foi determinada a concentração (C_{AuNPs}) da suspensão coloidal de AuNPs:

$$\frac{1 \text{ AuNP}}{x} \rightarrow \frac{2,22 \times 10^{-17} \text{ g}}{8,658 \times 10^{-4} \text{ g}}$$

$$x = 3,9 \times 10^{13} \text{ AuNP (em 3 mL)}$$

$$\therefore C_{\text{AuNPs}} = 1,3 \times 10^{13} \text{ AuNPs/mL}$$

Durante o recobrimento das AuNPs, considerando que 100 mL do coloide são acrescidos de 6 mL de APTMS e 12 mL de silicato de sódio, ao final do processo obtemos uma suspensão de AuSHINs (118 mL) com a seguinte concentração:

$$C_i x V_i = C_f x V_f$$

$$1,3 \times 10^{13} \frac{\text{AuNPs}}{\text{mL}} x 100 \text{ mL} = C_{\text{AuSHINs}} x 118 \text{ mL}$$

$$C_{\text{AuSHINs}} = 1,1 \times 10^{13} \text{ AuSHINs/mL}$$

A estabilidade das AuNPs e AuSHINs em água ultrapura e em meio de cultivo também foi avaliada via medidas de potencial zeta, cujos resultados estão na Tabela 1.

Tabela 1. Valores médios de potencial zeta (ζ) das AuNPs e AuSHINs diluídas em água ultrapura e em meio de cultivo DMEM F12.

Potencial Zeta (mV)			
AuNPs	- 38,5 ± 3,5	AuSHINs	- 28,2 ± 3,3
AuNPs + DMEM F12	- 11,6 ± 0,5	AuSHINs + DMEM F12	- 23,7 ± 1,1

Os valores de potencial zeta obtidos para as AuNPs e AuSHINs foram de -38,5 e -28,2 mV, respectivamente, indicando a formação de coloides estáveis, mesmo na presença da camada de sílica. A carga negativa na superfície das nanopartículas gera repulsão eletrostática entre nanopartículas vizinhas, favorecendo a estabilidade do coloide (Chow and Zukoski 1994;

Zhao, Li, and Astruc 2013). Quando dispersas em meio salino (meio de cultivo DMEM F12), o valor obtido para as AuNPs aumenta para -11,6 mV, indicando a interação com os íons presentes no meio salino e, conseqüentemente, afetando a estabilidade coloidal. Segundo Pamies et al., AuNPs de 10 a 13 nm em meio salino (NaNO₃ 0,025 mol/L) sofreram alterações nos valores de potencial zeta de -40 para -15 mV (Pamies et al. 2014), corroborando com os dados obtidos. No entanto, as nanopartículas recobertas com sílica (AuSHINs) em meio de cultivo (salino) possuem um valor de potencial zeta (-23,7 mV) semelhante ao encontrado para as AuSHINs em água ultrapura (-28,2 mV), sugerindo que a presença dos íons do meio salino não afetou a estabilidade coloidal da AuSHINs, tornando-as viáveis para aplicação em sistemas *in vitro*.

Complementarmente às análises de potencial zeta, a caracterização do diâmetro hidrodinâmico das AuSHINs foi realizada via espalhamento de luz dinâmico (DLS) em diferentes condições biologicamente relevantes, como apresentado na Tabela 2.

Tabela 2. Caracterização do diâmetro das AuSHINs em água ultrapura, tampão fosfato-salino (PBS), meio de cultura DMEM F12, e PBS + 10% de soro fetal bovino (SFB) via análise por espalhamento de luz dinâmico (DLS).

	Diâmetro hidrodinâmico (nm)	Índice de polidispersividade
AuSHINs + H ₂ O ultrapura (1:1)	29,3 ± 0,1	0,4 ± 0,01
AuSHINs + PBS (1:1)	28,9 ± 0,2	0,4 ± 0,01
AuSHINs + DMEM F12 (1:1)	29,9 ± 0,5	0,4 ± 0,01
AuSHINs + (PBS + 10% SFB) (1:1)	111,0 ± 5,0	0,2 ± 0,01
PBS + 10% SFB	25,0 ± 1,0	0,5 ± 0,02

Além do potencial zeta, a estabilidade coloidal das AuSHINs também foi mensurada via medidas de DLS em meios biologicamente relevantes. Os resultados da análise via DLS na Tabela 2 não mostraram variações significativas no diâmetro hidrodinâmico das AuSHINs em água ultrapura, PBS ou meio de cultura DMEM F12, onde a distribuição dos diâmetros hidrodinâmicos foi de aproximadamente 29 nm, confirmando a estabilidade coloidal dessas nanopartículas. No entanto, os valores se diferem aos dos diâmetros obtidos via histogramas calculados a partir das imagens de MET, pois o DLS analisa as flutuações de intensidade de luz espalhadas em um determinado ângulo para partículas dispersas em meio líquido, podendo

moléculas presentes ou mesmo cargas ao entorno das nanopartículas causar interferência nos valores de diâmetro (Bruce J. Berne 2000).

Experimentos subsidiários em PBS contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) também foram realizados para simular as condições de fluido biológico que as AuSHINs experimentarão em aplicações *in vivo*. Neste caso, o tamanho hidrodinâmico aumenta para 111 nm. Choi et al. também notou um aumento no diâmetro hidrodinâmico de AuNPs-citrato expostas ao meio de cultura RPMI acrescido de 10% de SFB. Segundo os autores, as proteínas séricas adsorvem na superfície das AuNPs, revestindo as nanopartículas (Choi et al. 2012). É importante notar que apenas a solução de PBS + 10% de SFB já apresenta um diâmetro hidrodinâmico de 25 nm, o que pode ser devido à presença de proteínas séricas (Majorek et al. 2012; Wright and Thompson 1975). De fato, a albumina sérica bovina (BSA), principal componente do SFB, demonstrou interagir com a sílica coloidal em pH = 7,0 (Valle-Delgado et al. 2004). Portanto, a hipótese é de que as proteínas presentes no SFB estão adsorvendo na superfície das AuSHINs, formando uma sobreposição de camadas, provavelmente como um arranjo corona (Faunce, White, and Matthaai 2008; Valle-Delgado et al. 2004), conforme ilustrado na Figura 14a. Embora tenha havido um aumento significativo no diâmetro hidrodinâmico devido ao arranjo corona das proteínas sobre a superfície das AuSHINs, o índice de polidispersividade (~0,2) diminuiu (Prathna et al. 2011; Srinath and Ravishankar Rai 2015), sugerindo a ausência de aglomerados ou agregados de AuSHINs, o que é confirmado pelos espectros de extinção no UV-Vis e gráficos de aumento de temperatura *versus* tempo de irradiação mostrados nas Figuras 14b e 14c, respectivamente.

(a) Formação do arranjo corona em nanopartículas

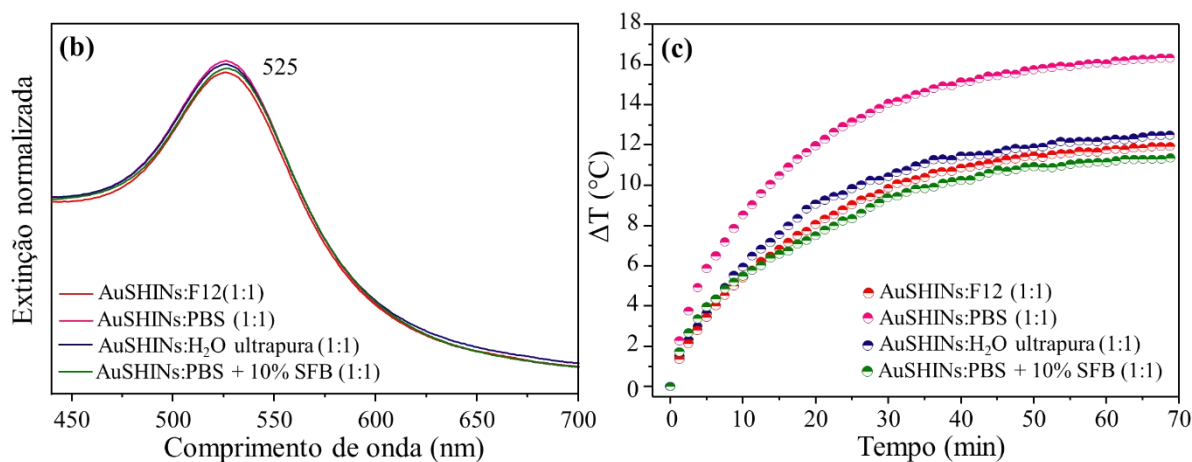
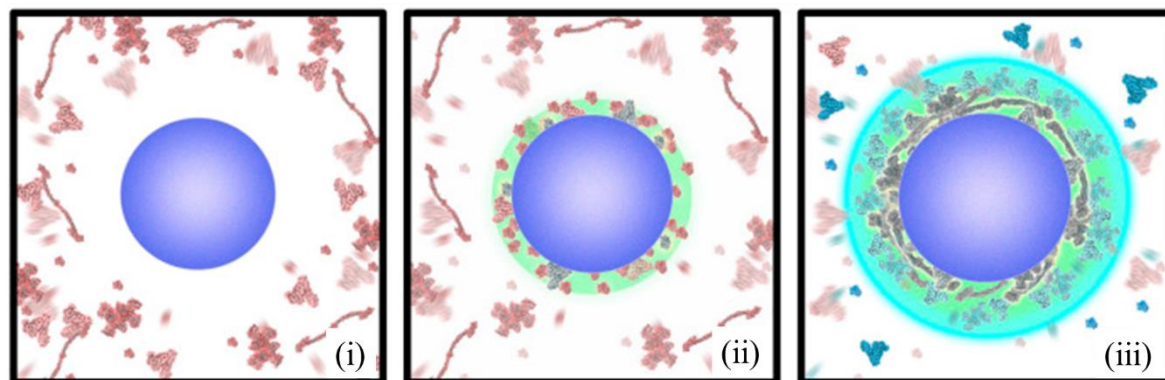


Figura 14. (a) Esquema de formação da superposição de proteínas presentes no SFB ao redor de uma nanopartícula, formando um arranjo corona. No primeiro momento (i) as nanopartículas são adicionadas no plasma ou fluido biológico, em seguida (ii) as proteínas de tamanho pequeno e intermediário são adsorvidas e por fim (iii) proteínas maiores podem substituir as menores, sofrendo desnaturação para atingir a adsorção irreversível. Adaptado de (Zhdanov 2019). (b) Espectros de extinção no UV-Vis e (c) aumento da temperatura em função do tempo de irradiação para as AuSHINs em água ultrapura, PBS, meio de cultivo DMEM F12 e PBS +10% FBS. A irradiação foi realizada usando um LED a 525 nm com irradiância de 32,26 mW/cm². Adaptado de (Camacho et al. 2022).

Experimentos de aumento de temperatura local induzido pela fotoativação das AuNPs e AuSHINs foram realizados com LED verde (525 nm/ Irradiância de 32,8 mW/cm²) em ressonância com seu *plasmon* de superfície localizado (LSPR). Os resultados na Figura 15 mostram o aumento de temperatura quando as suspensões coloidais são expostas à irradiação (LED ligado), que cessa quando o LED é desligado.

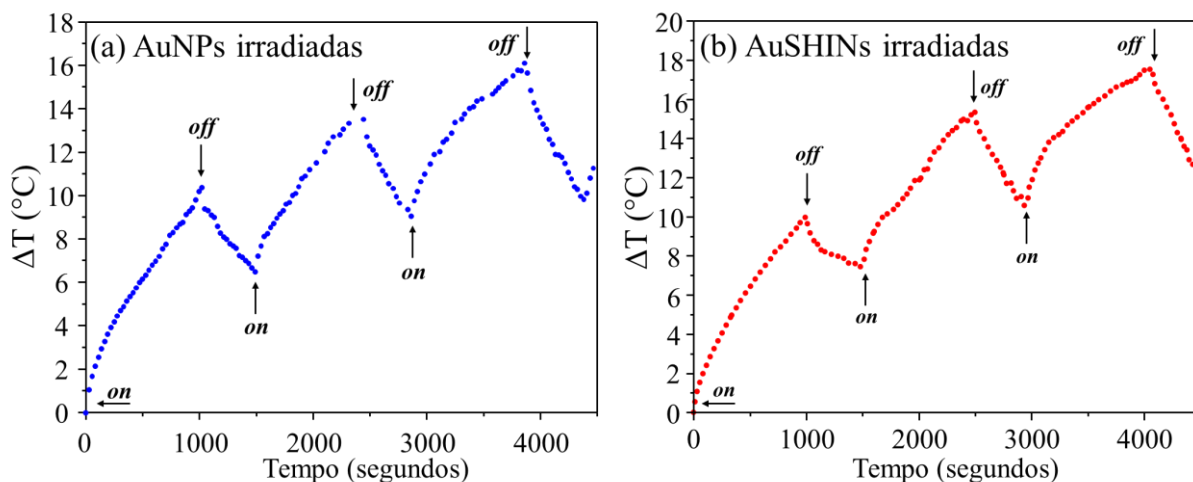


Figura 15. Aumento da temperatura local ao longo do tempo irradiando (a) AuNPs e (b) AuSHINs com comprimento de onda em 525 nm (LED verde). As setas *on* e *off* indicam os momentos em que o LED foi ligado e desligado, respectivamente.

Essa dependência da temperatura observada com a exposição à fonte de luz, aumentando quando as suspensões coloidais são expostas a irradiação (*on*) e diminuindo instantaneamente ao desligarmos o LED (*off*) se dá ao fato das AuNPs e AuSHINs (Figura 15a e 15b, respectivamente) apresentarem uma banda de LSPR em torno de 520 nm, na região verde do espectro visível. Tal banda está em ressonância com o comprimento de onda do LED (525 nm), resultando em uma eficiente conversão de luz em calor (Cabral and Baptista 2013, 2014; Jain, Hirst, and O'Sullivan 2012; Qin et al. 2016). Um aumento de temperatura total de 10 $^{\circ}\text{C}$ é observado, para ambas, em aproximadamente 1000 s (~ 17 min) e 16 e 18 $^{\circ}\text{C}$ próximo a 4000 s (~ 67 min) para as AuNPs e AuSHINs, respectivamente. Portanto, a eficiência das AuSHINs não é afetada pela camada de sílica e a conversão de luz em calor está relacionada com as dimensões das nanoestruturas (diâmetros entre 10 e 30 nm), favorecendo os processos de absorção no espectro de extinção (Cabral and Baptista 2013, 2014; Qin et al. 2016). Dessa maneira, as AuSHINs são fortes agentes de absorção da luz visível, capazes de gerar calor em um local preciso, o que implica em um grande potencial para hipertermia (Amendoeira et al. 2019; Cabral and Baptista 2014; Qin et al. 2016; Raji et al. 2011).

4.2. Citotoxicidade e fototoxicidade das AuSHINs em células de carcinoma mamário via ensaio MTT

AuSHINs foram aplicadas como agentes fototérmicos em experimentos *in vitro* com linhagens celulares derivadas de carcinoma mamário glandular (MCF7) e ductal (BT-474).

Experimentos controle foram realizados previamente aos testes de citotoxicidade a fim de avaliar os efeitos dos reagentes de recobrimento das nanopartículas sobre a viabilidade celular. A Figura 16 mostra a viabilidade das células (a) MCF7 e (b) BT-474 em presença dos reagentes SiO₂ e HCl em duas diferentes porcentagens, as quais referem-se às quantidades aproximadas desses reagentes quando as AuSHINs são sintetizadas nas concentrações de $5,5 \times 10^{12}$ e $2,2 \times 10^{13}$ AuSHINs/mL.

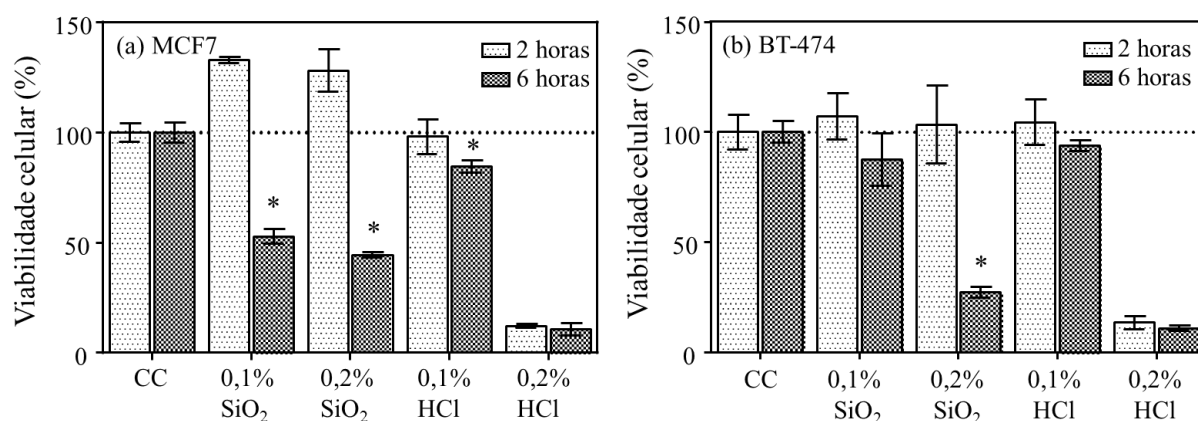


Figura 16. Controle com (a) MCF7 e (b) BT-474 para avaliar a citotoxicidade da sílica (SiO₂) e do ácido clorídrico (HCl), utilizados no recobrimento das nanopartículas. * $p < 0,05$ (testes t múltiplos, Bonferroni), em relação à população incubada por 2 h.

Nota-se que os dados de viabilidade celular são pouco alterados na presença de sílica (SiO₂) nas distintas porcentagens [$5,5 \times 10^{12}$ (0,1%) e $2,2 \times 10^{13}$ (0,2%) AuSHINs/mL] para MCF7 e BT-474 em 2 h de incubação. Somente após 6 h de incubação observa-se uma redução na viabilidade celular abaixo da concentração citotóxica capaz de reduzir a viabilidade em 50% (CC₅₀) para porcentagem de 0,2% em ambas as linhagens. Para o HCl, não observamos citotoxicidade elevada na menor porcentagem (0,1%) em ambos os períodos de incubação (2 e 6 h). No entanto a redução na viabilidade celular em aproximadamente 75-80%, observada na maior porcentagem (0,2%), demonstra a citotoxicidade desse reagente.

Esses dados representam a concentração inicial de cada reagente utilizado no recobrimento das AuNPs, não sendo possível contabilizar com exatidão a porcentagem de material disponível na suspensão coloidal, uma vez que estes reagentes são consumidos pelas reações químicas durante a etapa de recobrimento. No entanto, pode-se assumir que as concentrações de SiO₂ e HCl não consumidos pela reação, e que estariam disponíveis para interagirem com as células, são significativamente menores do que as iniciais.

Os efeitos citotóxicos (escuro) e fotocitotóxicos (irradiadas) das AuSHINs em células derivadas dos carcinomas mamários glandular (MCF7) e ductal (BT-474) são mostrados nos ensaios de MTT da Figura 17.

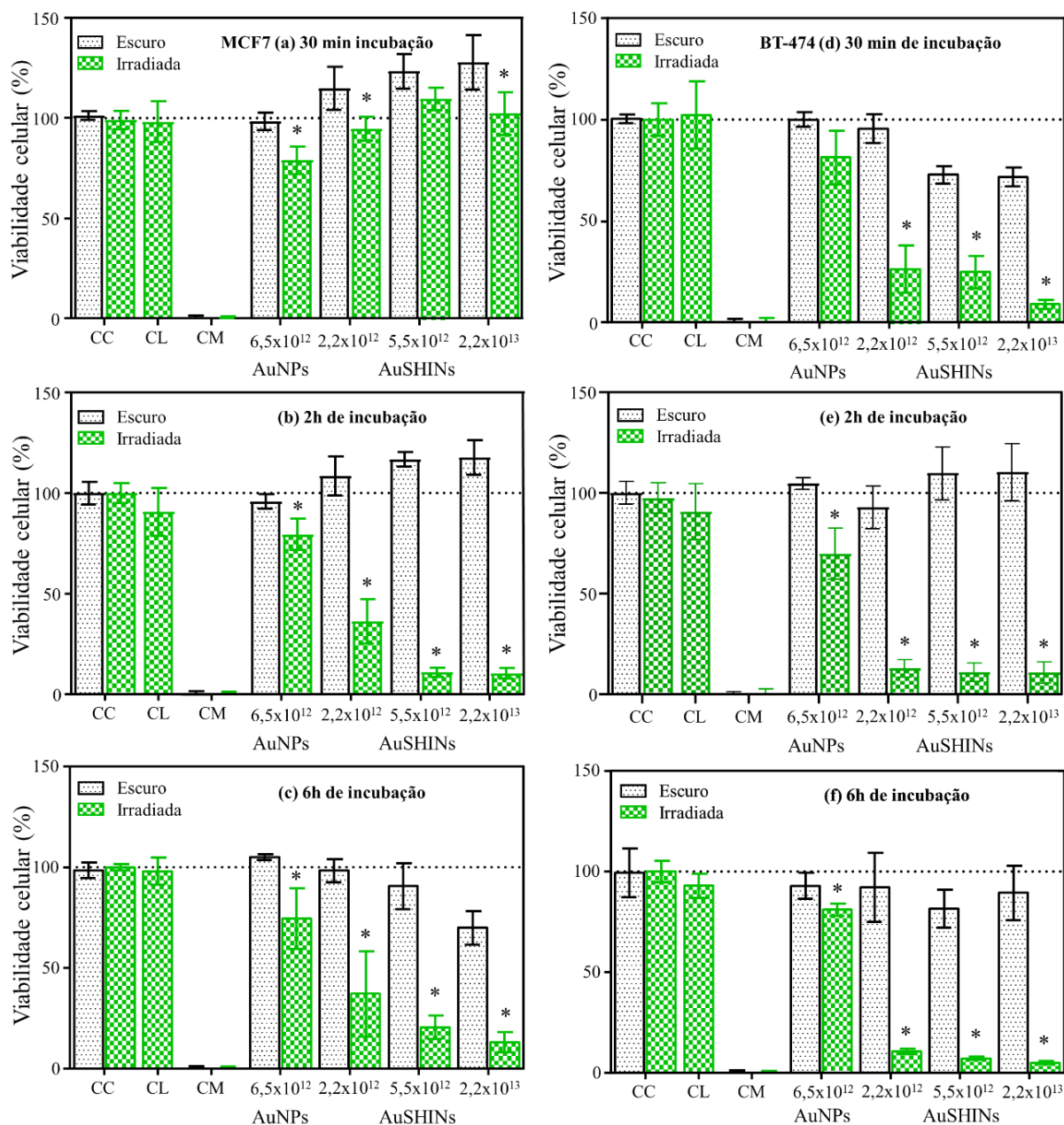


Figura 17. Efeitos tóxicos (escuros) e fotocitotóxicos (irradiados) via ensaios MTT para as concentrações de 2,2x10¹², 5,5x10¹² e 2,2x10¹³ AuSHINs/mL após 30 min, 2h e 6h de incubação em células MCF7 (a, b e c, respectivamente) e BT-474 (d, e, e f, respectivamente). Ensaios com 6,5x10¹² AuNPs/mL foram utilizados como controle. * p < 0,05 (testes t múltiplos, Bonferroni), em relação à população não irradiada.

Suspensões coloidais a 2,2x10¹², 5,5x10¹² e 2,2x10¹³ AuSHINs/mL foram incubadas por 30 min, 2 e 6 h no escuro e irradiadas (525 nm) por 1 h para ambas as culturas.

A viabilidade celular não foi afetada durante 30 min e 2 h de incubação no escuro (Figuras 17a e 17b), exceto por um ligeiro aumento (mas sem significância estatística) no metabolismo da MCF7 para concentrações acima de $5,5 \times 10^{12}$ AuSHINs/mL, o que pode ser indicativo de apoptose precoce (Cancino-bernardi et al. 2018). As AuSHINs apresentaram apenas uma toxicidade leve para a MCF7 acima de $2,2 \times 10^{13}$ AuSHINs/mL incubadas por 6h no escuro, como mostra a Figura 17c. No entanto, quando comparado aos valores obtidos na análise demonstrada da Figura 16, a citotoxicidade é menor quando adicionamos as AuSHINs, sugerindo que não há atuação de solventes residuais, mas sim que a origem da citotoxicidade está relacionada à interação das AuSHINs nas células.

Por outro lado, a cultura celular é significativamente afetada pela irradiação e a viabilidade é reduzida abaixo de 50% (CC_{50}) em $2,2 \times 10^{12}$ AuSHINs/mL para as células MCF7 e BT-474 após 2h de incubação. Considerando 6 h de tempo de incubação, a viabilidade é reduzida abaixo de 50%, para todas as concentrações de AuSHINs/mL. A diminuição da população viável com o aumento do tempo de incubação sugere um aumento de AuSHINs incorporadas pelas células, o que permite maior eficiência na redução da viabilidade celular, semelhante ao observado para os fotossensibilizadores (Bistaffa et al. 2020). Os experimentos controle com as AuNPs foram menos eficazes na redução da viabilidade celular sob irradiação devido à agregação das nanoestruturas, desencadeadas pela força iônica do meio (Guerrero et al. 2014). Comparado com os dados relatados na literatura, o CC_{50} atingido aqui para a MCF7 com 2 h de incubação foi obtido com cerca de metade da dose de luz necessária em trabalhos semelhantes usando AuNPs revestidas com polietilenoglicol (PEG) (Mendes et al. 2017), destacando a alta eficiência fototérmica das AuSHINs. O aumento da temperatura próximo em 18 °C (Figura 15b) é capaz de desnaturar proteínas e abrir poros na membrana plasmática (Lalonde et al. 2013; Mendes et al. 2017), caracterizando as possíveis causas da fototoxicidade observada na Figura 17.

Comparando as linhagens celulares via teste t múltiplos (Bonferroni) para $p < 0,05$, nota-se uma diferença significativa no tempo de incubação de 30 min, no escuro, onde as concentrações de $5,5 \times 10^{12}$ e $2,2 \times 10^{13}$ AuSHINs/mL apresentam maior toxicidade para as células BT-474. Após irradiação, todas as concentrações de AuSHINs apresentaram maior efeito fototóxico sobre a linhagem BT-474, sugerindo, em um primeiro momento, uma maior sensibilidade ao aquecimento local. Xiang et al, ao comparar as linhagens MCF7 e BT-474, detectou algumas proteínas exclusivas a linhagem BT-474, dentre elas a proteína relacionada ao choque térmico (HSP, do inglês *heat-shock proteins*). As HSPs são induzidas por proteínas

desnaturadas produzidas durante o choque térmico e, dentre os estudos, sabe-se que auxiliam na restauração da estrutura e função das proteínas desnaturadas (Xiang et al. 2004). Estudos sugerem que a ativação de HSPs protegem as células cerebrais *in vitro* contra lesões que produzem necrose e alguns tipos de apoptose (Sharp, Massa, and Swanson 1999).

Experimentos utilizando o antioxidante N-acetil-L-cisteína (NAC) foram realizados a fim de analisar a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) durante o aquecimento fotoinduzido das AuSHINs. Os ensaios de MTT com NAC são apresentados para as células MCF7 (Figura 18) e BT-474 (Figura 19) incubadas por 2 e 6h com as diferentes concentrações de AuSHINs.

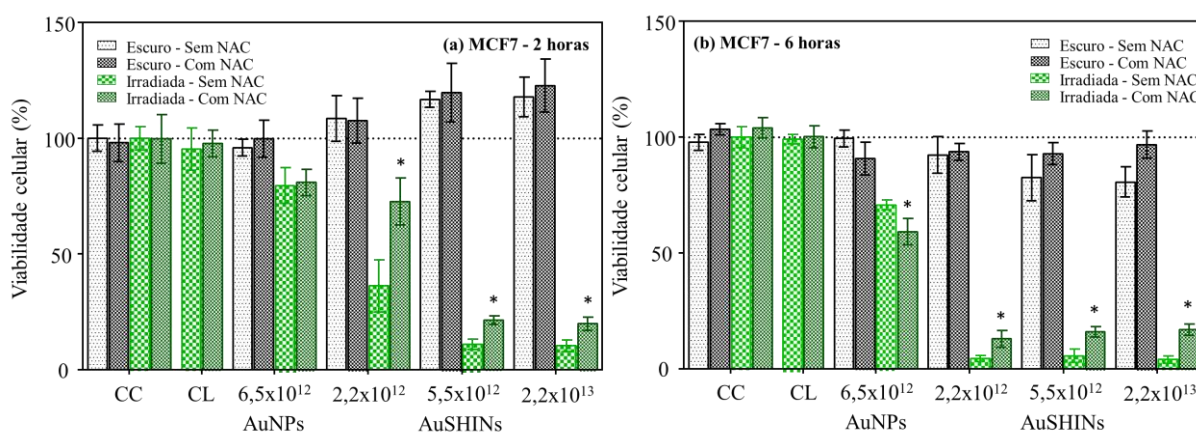


Figura 18. Efeitos tóxicos (escuro) e fototóxicos (irradiadas) via ensaios MTT para as concentrações de $2,2 \times 10^{12}$, $5,5 \times 10^{12}$, e $2,2 \times 10^{13}$ AuSHINs/mL sobre as células MCF7 após (a) 2h e (b) 6h de incubação com e sem 5×10^{-3} mol/L do antioxidante NAC. Ensaios com $6,5 \times 10^{12}$ AuNPs/mL foram usados como controle. * $p < 0.05$ (teste t múltiplos, Bonferroni), em relação a população irradiada na ausência de NAC.

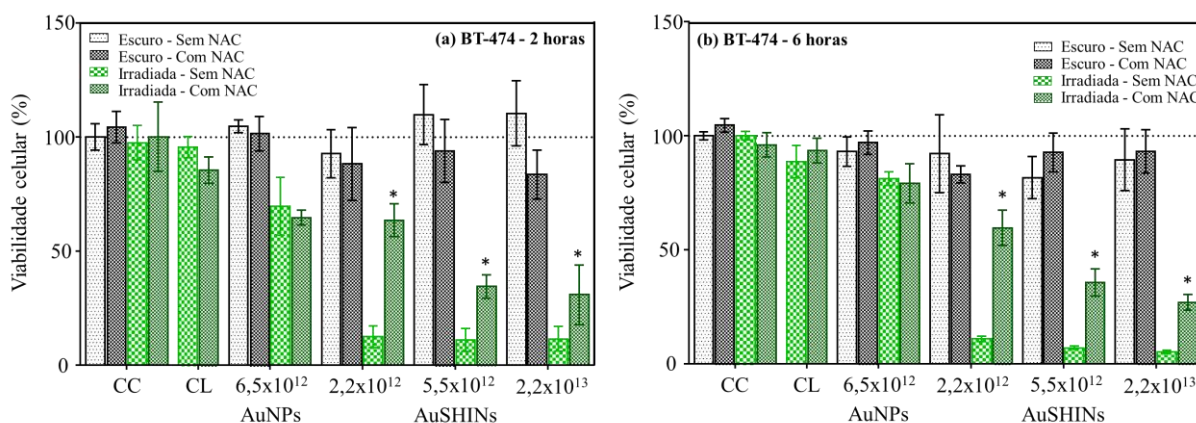


Figura 19. Efeitos tóxicos (escuro) e fototóxicos (irradiada) via ensaios MTT para as concentrações de $2,2 \times 10^{12}$, $5,5 \times 10^{12}$, e $2,2 \times 10^{13}$ AuSHINs/mL sobre as células BT-474 após (a) 2h e (b) 6h de incubação com e sem 5×10^{-3} mol/L do antioxidante NAC. Ensaios com $6,5 \times 10^{12}$ AuNPs/mL foram usados como controle. * $p < 0.05$ (teste t múltiplos, Bonferroni), em relação a população irradiada na ausência de NAC.

Os experimentos em presença de NAC revelaram uma recuperação da viabilidade de células incubadas com AuSHINs e irradiadas por 1h, em comparação àquelas sem o antioxidante, para as duas linhagens e ambos os períodos de incubação. Tal comportamento se deve à supressão de ERO disponível no meio, confirmando não apenas a geração de ERO durante o aquecimento local, mas também sugerindo que as reações oxidativas desempenham um papel importante na fototoxicidade celular (Hildebrandt et al. 2002; Hou et al. 2018; Lepock 2003).

Considerando a atuação do NAC para a recuperação da viabilidade celular após a fotoativação, observamos para a MCF7 um aumento médio de aproximadamente 10% (36, 10 e 9% e 8, 10 e 12%, para as concentrações de $2,2 \times 10^{12}$, $5,5 \times 10^{12}$, e $2,2 \times 10^{13}$ AuSHINs/mL, 2 e 6 h, respectivamente) e para a BT-474 de aproximadamente 30% (48, 25 e 23% e 50, 23 e 20%, para as concentrações de $2,2 \times 10^{12}$, $5,5 \times 10^{12}$, e $2,2 \times 10^{13}$ AuSHINs/mL, 2 e 6 h, respectivamente). Sendo assim, presume-se que as EROs têm uma menor atuação no processo de morte celular para a MCF7. No entanto, para a BT-474 observamos uma maior parcela de morte celular por EROs. Com isso, podemos concluir que o estresse oxidativo é maior para a BT-474, repercutindo nos maiores efeitos fototóxicos mostrados na Figura 17. Gupta e Srivastava, observaram uma maior geração de ERO em células de câncer de mama que expressam níveis mais elevados de HER2 em comparação com suas linhagens celulares originais (Gupta and Srivastava 2012). De fato, quando comparamos as linhagens tumorais, a BT-474 tem superexpressão de HER2, enquanto a MCF7 é HER2 negativa (Chen et al. 2021). HER2 é um receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) e sua superexpressão contribui para o crescimento e diferenciação celular (Zhu et al. 2021). Células tumorais também expressam Caderina-E, uma glicoproteína encontrada como um fator de sobrevivência em vários cânceres de mama. HER2 está diretamente correlacionada à Caderina-E e em contato com ERO ocorre a diminuição da expressão de HER2 celular e, consecutivamente, da Caderina-E, desencadeando os processos de morte celular (Zhu et al. 2021).

4.3. Citotoxicidade e fototoxicidade das AuSHINs em células não tumorais via ensaio MTT

AuSHINs também foram aplicadas como agentes fototérmicos em experimentos *in vitro* com células não tumorais. Experimentos controle foram realizados previamente aos testes de citotoxicidade a fim de avaliar os efeitos dos reagentes de recobrimento das nanopartículas sobre a viabilidade celular. A Figura 20a mostra a viabilidade das células mono e

polimorfonucleares em presença dos reagentes SiO₂ e HCl em duas diferentes porcentagens, as quais referem-se às quantidades aproximadas desses reagentes quando as AuSHINs são sintetizadas nas concentrações de $5,5 \times 10^{12}$ e $2,2 \times 10^{13}$ AuSHINs/mL.

Nota-se que os dados de viabilidade celular permanecem igual ou superior a 50% na presença de sílica (SiO₂) em ambas as porcentagens ($5,5 \times 10^{12}$ (0,1%) e $2,2 \times 10^{13}$ (0,2%) AuSHINs/mL) com 2 e 6 h de incubação. Para o HCl, não observamos citotoxicidade elevada na menor porcentagem (0,1%) em ambos os períodos de incubação (2 e 6 h). No entanto, a redução na viabilidade celular de 90%, observada na maior porcentagem (0,2%) demonstra a citotoxicidade desse reagente. Esses dados seguem o mesmo perfil das células tumorais para o HCl em 2 e 6 h de incubação e SiO₂ com 6h de incubação. Quando comparada a 2 h na presença de SiO₂, tem-se uma redução na viabilidade das células não tumorais em aproximadamente 20-30%. Vale ressaltar novamente que essas condições representam a concentração inicial de cada reagente utilizado no recobrimento das AuNPs, não sendo possível contabilizar com exatidão a porcentagem de material disponível na suspensão coloidal, uma vez que estes reagentes são consumidos pelas reações químicas durante a etapa de recobrimento. No entanto, pode-se assumir que as concentrações de SiO₂ e HCl não consumidos pela reação, e que estariam disponíveis para interagirem com as células, são significativamente menores do que as iniciais. Os efeitos citotóxicos (escuro) e fotocitotóxicos (irradiadas) das AuSHINs em células não tumorais, mono e polimorfonucleares, estão mostrados nos ensaios de MTT da Figura 20(b-d).

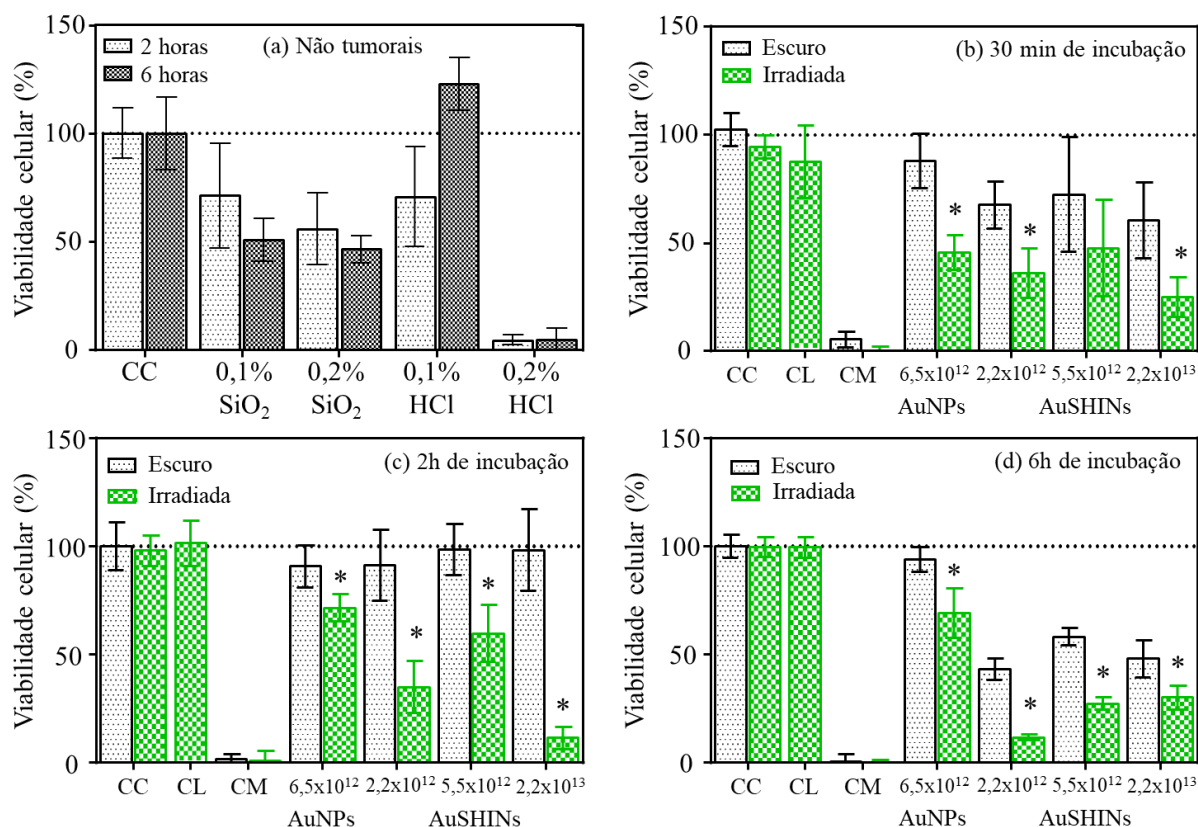


Figura 20. Ensaios com células não tumorais para (a) avaliação da citotoxicidade da sílica (SiO₂) e do ácido clorídrico (HCl), utilizados no recobrimento das nanopartículas e efeitos tóxicos (escuros) e fototóxicos (irradiados) via ensaios MTT para as concentrações de $2,2 \times 10^{12}$, $5,5 \times 10^{12}$ e $2,2 \times 10^{13}$ AuSHINs/mL após (b) 30 min, (c) 2h e (d) 6h de incubação. Ensaios com $6,5 \times 10^{12}$ AuNPs/mL foram utilizados como controle. * $p < 0,05$ (testes t múltiplos, Bonferroni), em relação à população não irradiada.

Suspensões coloidais a $2,2 \times 10^{12}$, $5,5 \times 10^{12}$ e $2,2 \times 10^{13}$ AuSHINs/mL foram incubadas por 30 min, 2 e 6 h no escuro e irradiadas (525 nm) por 1 h com células não tumorais, a fins comparativos com as tumorais MCF7 e BT474. A viabilidade celular se manteve acima de 75% para 30 min e 2 h de incubação no escuro, independente da concentração de nanopartículas (Figuras 20b e 20c). As AuSHINs apresentaram citotoxicidade apenas para as células incubadas por 6h no escuro, como mostra a Figura 20d. Quando comparado aos valores obtidos na análise da Figura 20a, a citotoxicidade das AuSHINs é menor do que dos reagentes de síntese, sugerindo que não há atuação de solventes residuais, mas sim que a origem da citotoxicidade está relacionada ao tempo de incubação das AuSHINs nas células. Quando o sistema é irradiado, a cultura celular é significativamente afetada e a viabilidade é reduzida. Com exceção da concentração de $5,5 \times 10^{12}$ AuSHINs/mL, incubadas por 30 min e 2 h, as demais condições com AuSHINs afetaram a viabilidade celular, reduzindo-a abaixo de 50%. Os

experimentos controle com as AuNPs foram menos eficazes na redução da viabilidade celular sob irradiação devido à agregação das nanoestruturas, desencadeadas pela força iônica do meio (Guerrero et al. 2014).

As análises comparativas dos dados de fototoxicidade obtidos via ensaios MTT entre as linhagens tumorais e não tumorais estão dispostas na Tabela 3.

Tabela 3. Viabilidade celular após fotoativação das AuSHINs para as células tumorais MCF7 e BT-474 e não tumorais via ensaios MTT. * p <0,05 (testes t múltiplos, Bonferroni), das não tumorais em relação à MCF7 e * p <0,05 (testes t múltiplos, Bonferroni), das não tumorais em relação à BT-474.

(AuSHINs/mL) irradiada		2,2x10 ¹²	5,5x10 ¹²	2,2x10 ¹³
MCF7	30 min	94,7 ± 5,8 %	109,5 ± 5,7 %	102,3 ± 10,5 %
	2 horas	36,2 ± 11,2 %	10,9 ± 2,3 %	10,4 ± 2,5 %
	6 horas	37,1 ± 21,3 %	20,6 ± 5,8 %	13,1 ± 5,1 %
BT474	30 min	26,3 ± 11,7 %	24,7 ± 8,1 %	8,9 ± 2,3 %
	2 horas	12,7 ± 4,3 %	10,9 ± 4,5 %	10,6 ± 5,3 %
	6 horas	10,7 ± 1,2 %	7,2 ± 0,8 %	5,0 ± 0,8 %
Não tumoral	30 min	36,1 ± 10,4 % *	47,7 ± 19,9 % **	25,1 ± 7,8 *
	2 horas	34,9 ± 12,1 % *	59,7 ± 13,1 % **	11,3 ± 5,2 %
	6 horas	11,7 ± 1,4 % *	27,3 ± 2,9 % *	30,2 ± 5,5 % **

Comparando as linhagens celulares via teste t múltiplos (Bonferroni) para p<0,05, com 30 min de incubação notamos uma redução significativa das células não tumorais comparada à MCF7, independente da concentração de AuSHINs. No entanto, quando compradas à BT474, a viabilidade celular é igual ou maior para as não tumorais. Em 2 h de incubação e posterior fotoativação, é possível observar maior viabilidade celular para as não tumorais em comparação com a BT-474 quando incubadas com 5,5x10¹² e 2,2x10¹³ AuSHINs/mL e maior ou igual em comparação à MCF7. Já em 6 h de incubação, a fotoativação gerou um decaimento de aproximadamente 90% na viabilidade celular das linhagens tumorais na concentração de 2,2x10¹³ AuSHINs/mL, enquanto nas não tumorais, essa redução foi de aproximadamente 70%, demonstrando que, apesar das variações entre as concentrações e períodos de incubação, as não tumorais se mostram mais resistentes às tumorais. Zhan et al,

também obteve diferença significativa entre linhagens de câncer *versus* células saudáveis após hipertermia induzida por nanobastões de ouro, confirmando que as células tumorais são mais suscetíveis ao aumento de temperatura (Zhan et al. 2012a). Uma análise pontual da Tabela 3, visando ressaltar a aplicação das AuSHINs na TFT, nos indica que um período de 2 h de incubação com a concentração de $5,5 \times 10^{12}$ AuSHINs/mL seria uma condição ideal, uma vez que é possível obter a maior viabilidade celular para as células não tumorais (~ 60%) e uma alta redução na viabilidade celular das células tumorais (~ 11% tanto para a MCF7 quanto para a BT474). Apesar das comparações na Tabela 3 serem feitas para as células tumorais *versus* não tumorais após irradiação, é importante considerarmos que quando aplicadas em sistemas *in vivo* a TFT se delimita à região tumoral, atingindo apenas uma pequena população de célula saudável ao redor do tecido tumoral. Neste caso, ressaltamos que a toxicidade das AuSHINs no escuro foi ainda menor para as células não tumorais (Figura 20), atingindo viabilidades celulares de aproximadamente 100% para períodos de incubação de 2 h, independente da concentração de AuSHINs (Figura 20c), demonstrando a baixa citotoxicidade das AuSHINs às células não-alvo.

Experimentos utilizando o antioxidante N-acetil-L-cisteína (NAC) foram realizados a fim de analisar a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) durante o aquecimento fotoinduzido das AuSHINs. Os ensaios de MTT com NAC são apresentados para as células não tumorais (Figura 21) incubadas por 2 e 6h com as diferentes concentrações de AuSHINs.

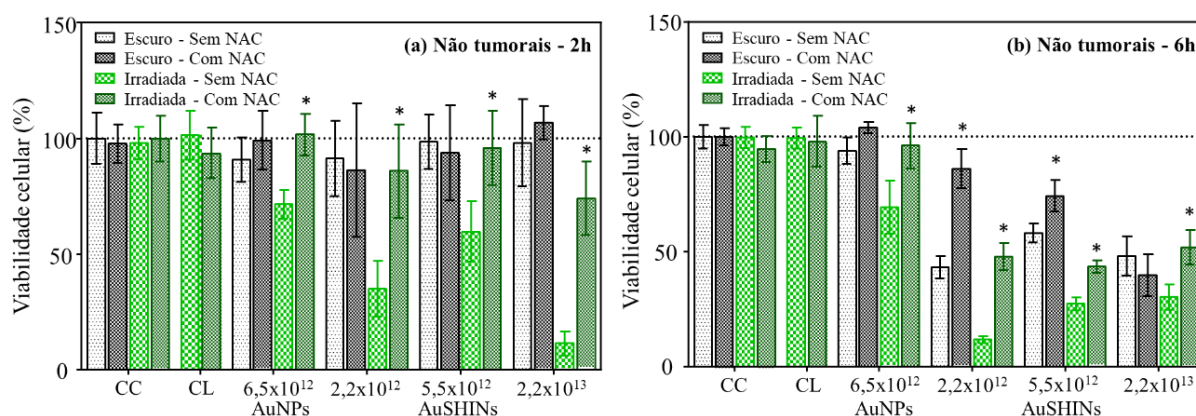


Figura 21. Efeitos tóxicos (escuro) e fototóxicos (irradiada) via ensaios MTT para as concentrações de $2,2 \times 10^{12}$, $5,5 \times 10^{12}$, e $2,2 \times 10^{13}$ AuSHINs/mL sobre as células não tumorais após (a) 2h e (b) 6h de incubação com e sem 5×10^{-3} mol/L do antioxidante NAC. Ensaios com $6,5 \times 10^{12}$ AuNPs/mL foram usados como controle. * $p < 0.05$ (teste t múltiplos, Bonferroni), em relação a população irradiada na ausência de NAC.

Os experimentos em presença de NAC revelaram uma recuperação da viabilidade das células incubadas com AuSHINs e irradiadas por 1h, em comparação àquelas sem o antioxidante, para ambos os períodos de incubação, e as diferentes concentrações de AuSHINs. Tal comportamento se deve à supressão de ERO disponível no meio, confirmando não apenas a geração de ERO durante o aquecimento local, mas também sugerindo que as reações oxidativas desempenham um papel importante na fototoxicidade das células não tumorais (Hildebrandt et al. 2002; Hou et al. 2018; Lepock 2003). Considerando a atuação do NAC na recuperação da viabilidade celular após fotoativação, observamos um aumento médio de aproximadamente 10% e 30% para as células MCF7 e BT-474, respectivamente, enquanto as não tumorais apresentaram uma recuperação de aproximadamente 35% (51, 36 e 62% e 36, 16 e 21%, para as concentrações de $2,2 \times 10^{12}$, $5,5 \times 10^{12}$, e $2,2 \times 10^{13}$ AuSHINs/mL, 2 e 6 h, respectivamente). Sendo assim, presume-se que as EROs têm maior atuação no processo de morte desencadeado nas células não tumorais. Ainda assim tal efeito não é tão pronunciado nas células não tumorais, devido à capacidade de recuperação, resistência e balanceamento do sistema redox presente na mitocôndria de células saudáveis e que são prejudicados nas células tumorais (Wu et al. 2011).

4.4. Microscopia de fluorescência confocal

A Figura 22 apresenta imagens de microscopia de fluorescência confocal para a linhagem celular MCF7 incubadas por 6 h com as concentrações de $2,2 \times 10^{12}$, $5,5 \times 10^{12}$ e $2,2 \times 10^{13}$ AuSHINs/mL, antes e após 1h de irradiação. Os núcleos foram marcados com DAPI (em azul), enquanto as membranas celulares foram marcadas com WGA (em verde). A escolha do período de 6h de incubação para a aquisição das microscopias está relacionada a maior eficiência da TFT observada nos ensaios prévios com MTT, apresentados na Figura 17.

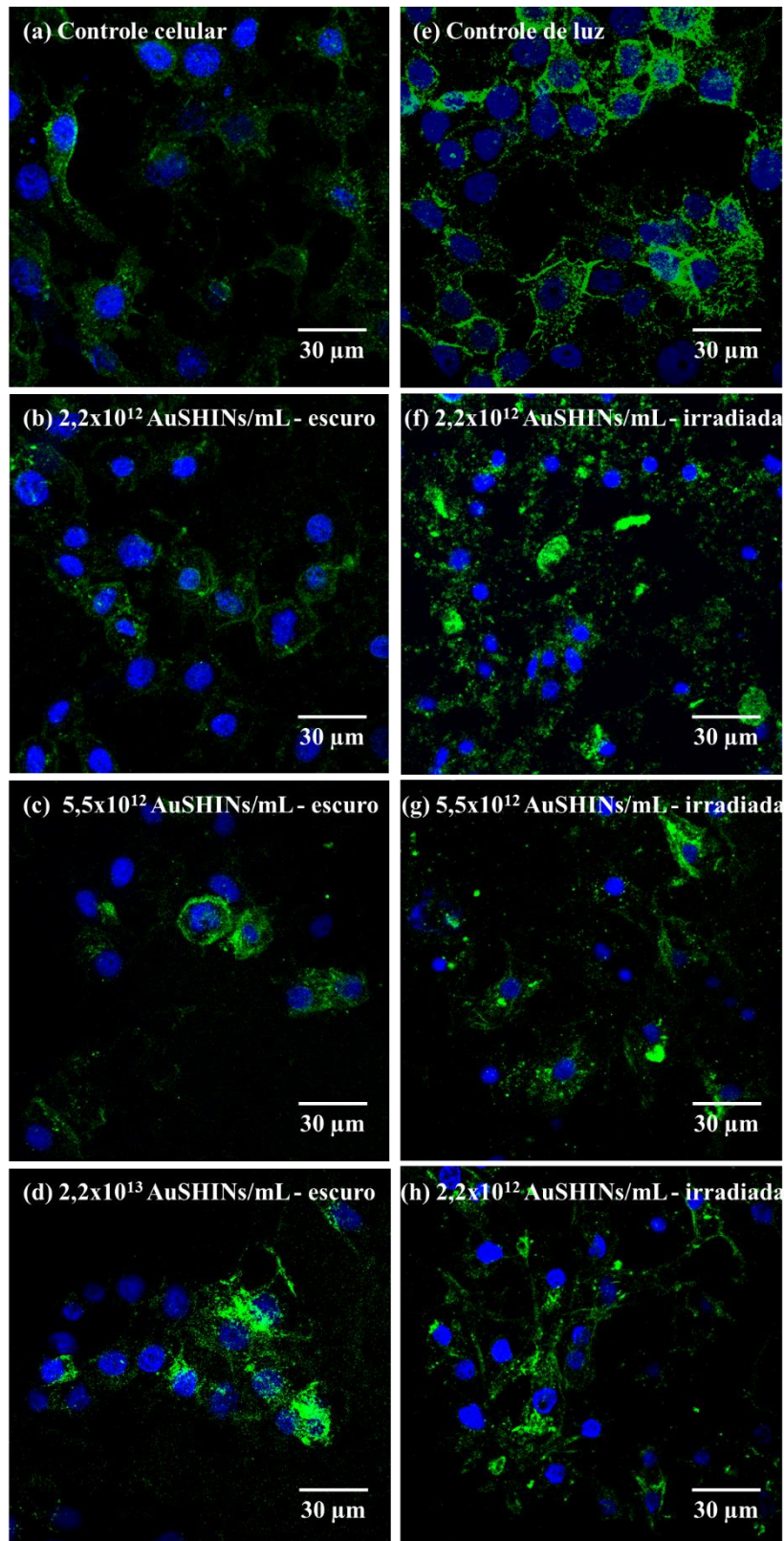


Figura 22. Microscopia de fluorescência confocal da linhagem celular MCF7. (a) Controle celular e incubações de 6h com (b) $2,2 \times 10^{12}$, (c) $5,5 \times 10^{12}$ e (d) $2,2 \times 10^{13}$ AuSHINs/mL anterior a irradiação e após a irradiação com (e) controle de luz e (f) $2,2 \times 10^{12}$, (g) $5,5 \times 10^{12}$ e (h) $2,2 \times 10^{13}$ AuSHINs/mL. DAPI, em azul, delimitando o núcleo e WGA, em verde, demarcando a membrana celular.

No grupo controle, apresentado na Figura 22a (sem irradiação e sem AuSHINs), e na menor concentração de AuSHINs ($2,2 \times 10^{12}$ - Figura 22b), podemos notar que as células possuem os núcleos e membranas bem definidos, indicando que a incubação com essa concentração de AuSHINs não afeta a integridade morfológica das células MCF7. No entanto, para concentrações acima de $5,5 \times 10^{12}$ AuSHINs/mL ocorre uma perda de marcação da membrana, corroborando com os dados de viabilidade celular apresentados nos ensaios de MTT (Figura 17c), onde uma leve toxicidade foi observada para concentrações de $2,2 \times 10^{13}$ AuSHINs/mL. Selim et al. também constataram um efeito citotoxicidade para células MCF7 incubadas por 24 h com 200 $\mu\text{g/mL}$ de AuNPs ($\sim 2,2 \times 10^{13}$ AuNPs/mL) via imagens de microscopia de fluorescência. O maior tempo de incubação, quando comparado ao nosso (6 h), levou a condensação nuclear das células, indiciando a ocorrência do processo de apoptose celular (Selim and Hendi 2012).

Tanto no controle celular (Figura 22a) quanto no controle de luz (Figura 22e), a integridade do núcleo e da membrana é mantida, sugerindo que somente a irradiação não é capaz de afetar a morfologia das células. Por outro lado, a irradiação afeta significativamente a morfologia das células incubadas com AuSHINs (Figuras 22f, 22g e 22h). A membrana celular adota um aspecto pontilhado, indicando sua desintegração, enquanto o núcleo sofre diminuição no diâmetro. Após irradiação de células MCF7 incubadas previamente com nanopartículas de ouro funcionalizadas com polímero PEG, Mendes et al. notaram a permeabilidade da membrana via ensaios com azul de tripano (Mendes et al. 2017). Ao combinar nanopartículas de ouro também com células MCF7, Lazzarini et al. observaram a inibição da proliferação celular via imagens de microscopia de fluorescência confocal (Lazzarini et al. 2015). Já Uzma et al. verificaram a diminuição do tamanho dos núcleos na mesma linhagem celular incubada com nanopartículas de ouro através de imagens de microscopia de fluorescência, o que foi induzida por apoptose (Uzma et al. 2020). Portanto, os efeitos gerados pelo aquecimento fotoinduzido das AuSHINs nas células MCF7, observados via imagens de microscopia de fluorescência confocal, corroboram com resultados prévios reportados na literatura.

Na Figura 23 estão as imagens de microscopia de fluorescência confocal para a linhagem BT-474 incubada por 6h com concentrações de $2,2 \times 10^{12}$, $5,5 \times 10^{12}$ e $2,2 \times 10^{13}$ AuSHINs/mL, além do controle celular e do controle de luz. Os núcleos celulares foram marcados com DAPI (em azul), e as membranas celulares, marcadas com WGA (em verde).

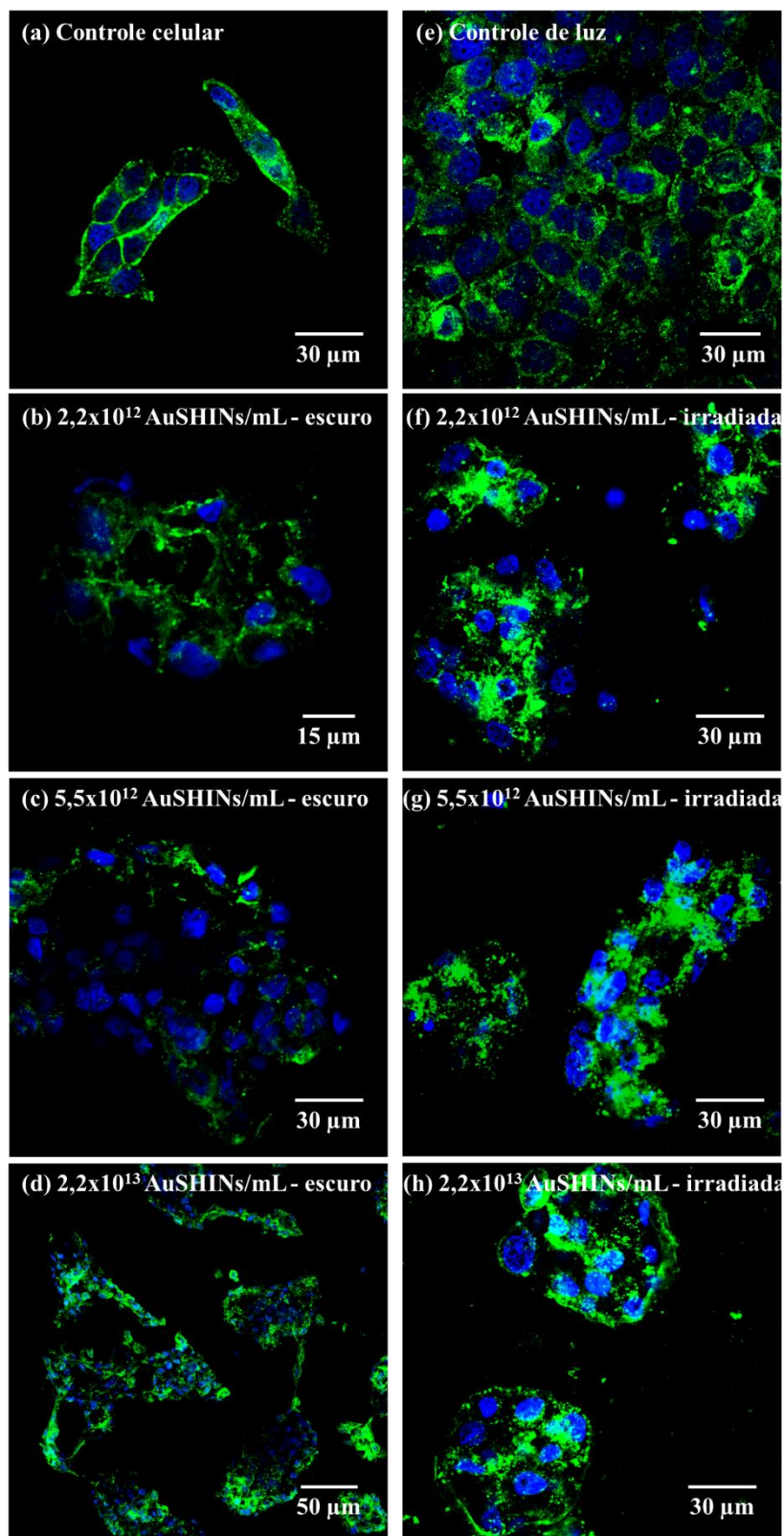


Figura 23. Microscopia de fluorescência confocal da linhagem celular BT-474. (a) Controle celular e incubações de 6h com (b) $2,2 \times 10^{12}$, (c) $5,5 \times 10^{12}$ e (d) $2,2 \times 10^{13}$ AuSHINs/mL anterior a irradiação e após a irradiação com (e) controle de luz e (f) $2,2 \times 10^{12}$, (g) $5,5 \times 10^{12}$ e (h) $2,2 \times 10^{13}$ AuSHINs/mL. DAPI, em azul, delimitando o núcleo e WGA, em verde, demarcando a membrana celular.

No escuro, as células referentes ao grupo controle, apresentadas na Figura 23a (sem AuSHINs e sem irradiação), e as células incubadas com a menor concentração de AuSHINs ($2,2 \times 10^{12}$ - Figura 23b), exibem núcleos e membranas bem definidos, indicando que a integridade morfológica das células não foi afetada, similar ao observado para as células MCF7. Para concentrações acima de $5,5 \times 10^{12}$ AuSHINs/mL ocorre uma alteração na marcação da membrana, corroborando com a leve toxicidade notada nos ensaios de MTT para concentrações de $5,5 \times 10^{12}$ e $2,2 \times 10^{13}$ AuSHINs/mL (Figura 17f). Cai et al, em experimentos com a linhagem BT-474, notaram que nanopartículas sem qualquer tipo de funcionalização possuem baixa internalização (Cai et al. 2017), o que pode estar relacionado a baixa toxicidade observada.

A Figura 23e mostra a integridade da membrana e do núcleo no controle de luz, garantindo que a irradiação não tem efeitos sobre a morfologia desta linhagem. No entanto, após a irradiação das células incubadas por 6h com AuSHINs (Figuras 23f, 23g e 23h), algumas mudanças são observadas devido aos efeitos do aquecimento fotoinduzido. A membrana celular é fragmentada e perde sua conformação (ou formato) e o núcleo tem seu diâmetro reduzido. Ao expor a linhagem celular de carcinoma ductal mamário (Hs 578T) à nanopartículas de ouro recobertas com PEG por 24 h, Li et al também observaram desintegração de membrana, via ensaios com azul de tripano, já nas menores intensidades de irradiação aplicada (14 W/cm^2). (Li et al. 2009)

Comparativamente, tem-se na Figura 24 as imagens de microscopia de fluorescência confocal para as células não tumorais incubada por 6h com concentrações de $2,2 \times 10^{12}$, $5,5 \times 10^{12}$ e $2,2 \times 10^{13}$ AuSHINs/mL, além do controle celular e do controle de luz. Os núcleos foram marcados com DAPI (em azul) e as membranas com WGA (em verde).

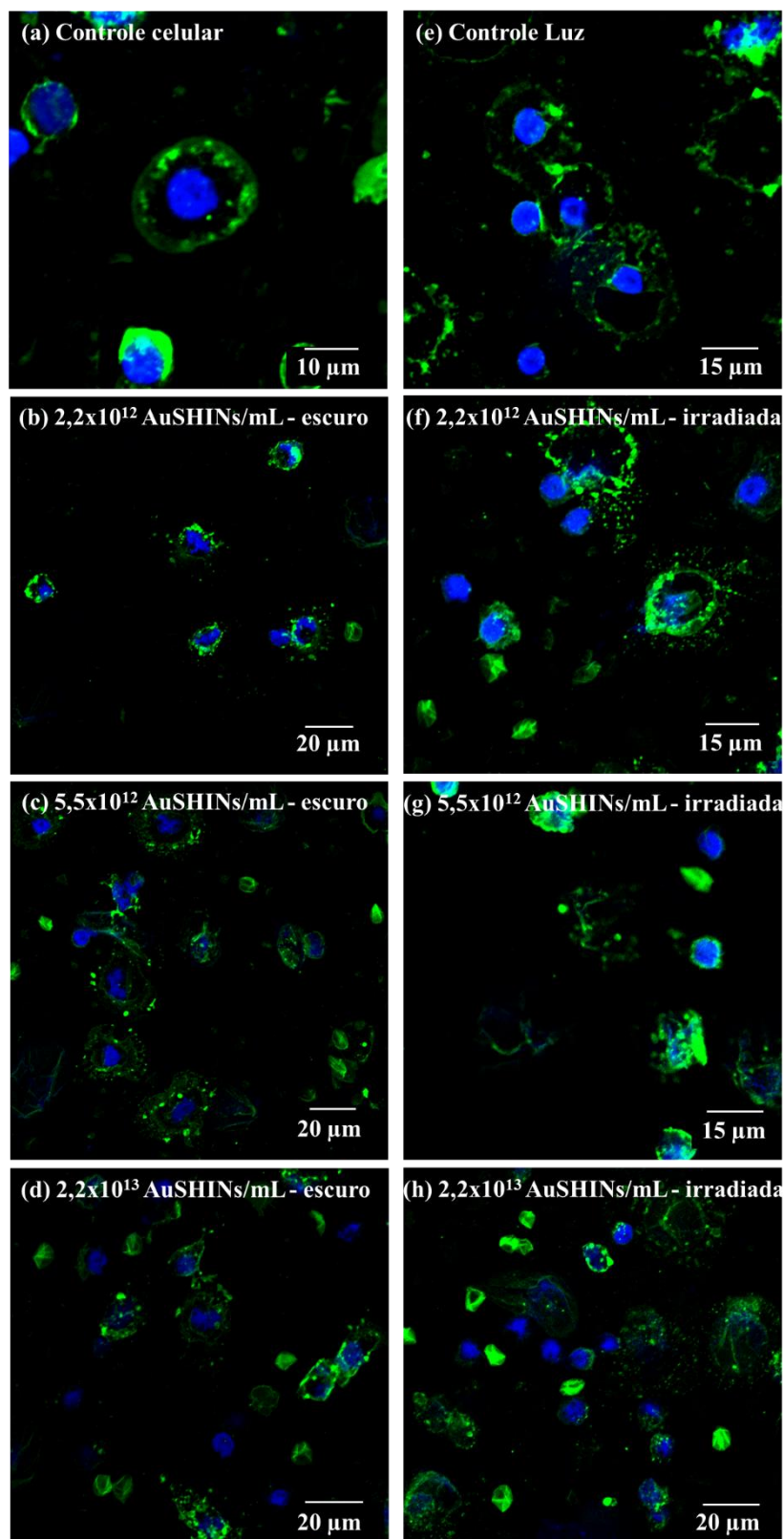


Figura 24. Microscopia de fluorescência confocal para as células não tumorais. (a) Controle celular e incubações de 6h com (b) $2,2 \times 10^{12}$, (c) $5,5 \times 10^{12}$ e (d) $2,2 \times 10^{13}$ AuSHINs/mL anterior a irradiação e após a irradiação com (e) controle de luz e (f) $2,2 \times 10^{12}$, (g) $5,5 \times 10^{12}$ e (h) $2,2 \times 10^{13}$ AuSHINs/mL. DAPI, em azul, delimitando o núcleo e WGA, em verde, demarcando a membrana celular.

Na Figura 24 tem-se as modificações morfológicas induzidas pelas AuSHINs irradiadas e não irradiadas após 6 h de incubação com células não tumorais. No escuro, as células referentes ao grupo controle, apresentadas na Figura 24a (sem AuSHINs e sem irradiação), e as células incubadas com a menor concentração de AuSHINs ($2,2 \times 10^{12}$ - Figura 24b), exibem núcleos e membranas bem definidos, indicando que a integridade morfológica das células não foi afetada, similar ao observado para as células MCF7 e BT-474. Para concentrações acima de $5,5 \times 10^{12}$ AuSHINs/mL no escuro as membranas plasmáticas das células não tumorais perdem sua forma aderida (Figura 24c e 24d) porém sem alterações nas dimensões do núcleo. Wu et al. relataram uma diminuição transitória na membrana de células saudáveis incubadas com nanopartículas de ferro recobertas com ouro (Fe@Au), exibindo uma baixa citotoxicidade (Wu et al. 2011). Portanto, a incorporação das AuSHINs pode ter dificultado a adesão das células. A Figura 23e mostra a integridade da membrana e do núcleo mantidos no controle de luz, garantindo que apenas a irradiação não tem efeitos sobre a morfologia desta linhagem. Após irradiação, as células não tumorais incubadas por 6h com as diferentes concentrações de AuSHINs (Figuras 24f, 24g e 24h) apresentam também alterações na membrana plasmática, mas que não são intensificadas pelo aquecimento fotoinduzido, indicando que o efeito observado relacionado com a incorporação das AuSHINs nas células antes da irradiação se mantém após a fotoativação.

Com base nas imagens de microscopia de fluorescência confocal obtidas para as linhagens tumorais MCF7 e BT-474 e não tumorais, tratadas com o software Image J[®], o valor médio e desvio padrão dos diâmetros celulares foram determinados para às células incubadas por 6h com as diferentes concentrações de AuSHINs, antes e após a irradiação. Os dados estão dispostos na Figura 25, juntamente com os valores obtidos para as células dos grupos controle celular (CC) e controle de luz (CL).

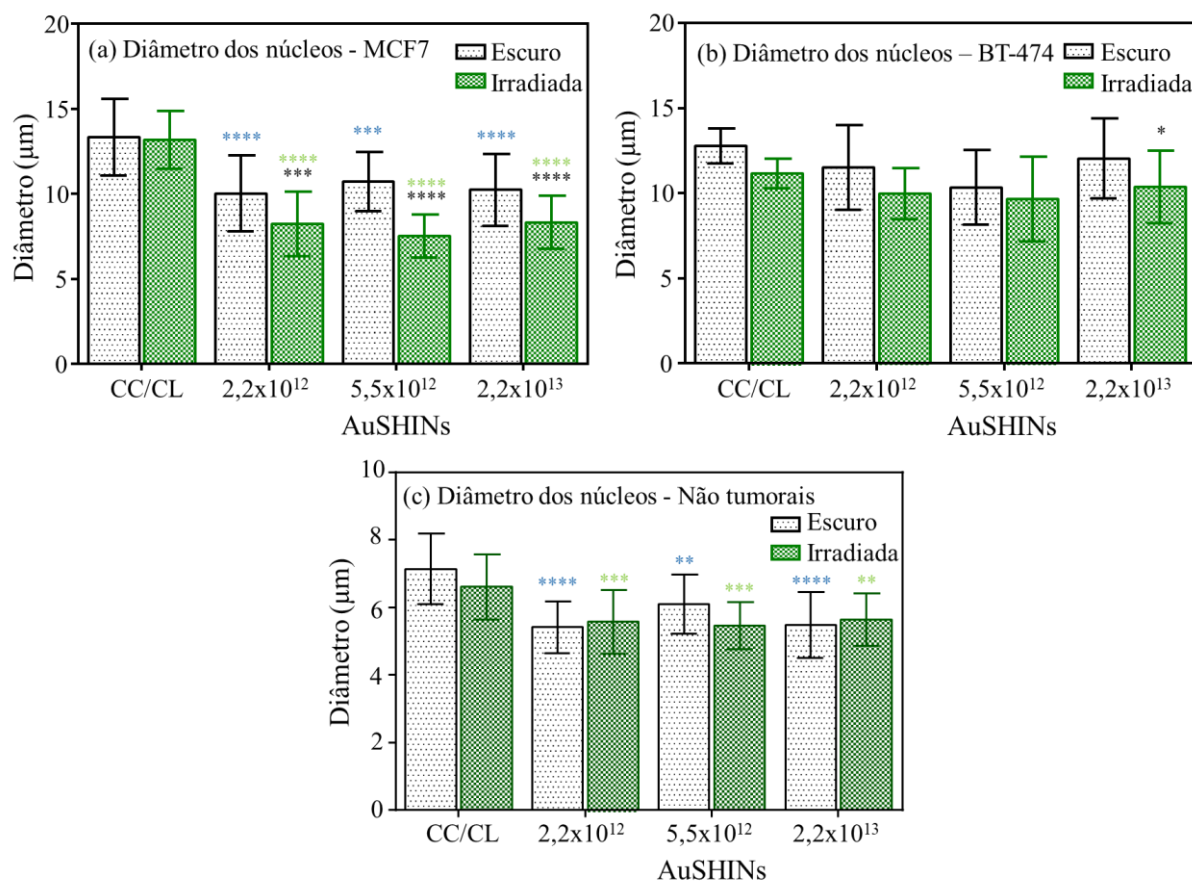


Figura 25. Valores médios de diâmetro dos núcleos celulares antes e após irradiação das linhagens (a) MCF7, (b) BT-474 e (c) não tumorais. Foram contabilizadas aproximadamente 20 células para cada grupo utilizando o software Image J[®]. * $p < 0,05$ (teste t múltiplos, Bonferroni), em relação a população irradiada, * $p < 0,05$ (teste t múltiplos, Bonferroni), em relação ao controle celular (CC) e * $p < 0,05$ (teste t múltiplos, Bonferroni), em relação ao controle de luz (CL).

Analisando os valores médios de diâmetro dos núcleos celulares obtidos para MCF7, podemos observar uma diminuição significativa ($p < 0,05$) nas células incubadas com as AuSHINs no escuro com relação as células do grupo controle (CC) para todas as condições, enquanto a BT-474 não apresenta diferença estatística para nenhuma concentração de AuSHINs quando comparada ao CC. Essa diminuição nuclear, mais característica para a MCF7, pode estar relacionada à um estresse celular que pode desencadear processos apoptóticos, ainda precoces para detecção na análise de viabilidade via MTT (Figura 17). De fato, os processos apoptóticos são caracterizados por manter a integridade da membrana, mas também pelo encolhimento celular e nuclear, condensação da cromatina, fragmentação nuclear e formação de bolhas na membrana plasmática. Dentre os estimuladores de apoptose podemos destacar o aumento de EROs intracelular e dano ao DNA, que levam, inclusive, ao aumento da

permeabilidade mitocondrial, possibilitando a liberação de proteínas pró-apoptóticas (Hotchkiss et al. 2009).

Quando irradiadas, as células referentes ao controle de luz (CL) se mantêm no padrão das do CC, no entanto, quando incubadas com as AuSHINs, os valores dos diâmetros dos núcleos celulares diminuem significativamente para todas as condições da MCF7 e para $2,2 \times 10^{13}$ AuSHINs/mL para a BT-474. Tais modificações, combinadas a fragmentação nas membranas celulares, podem ser características dos processos de morte celular via necrose. Além de ser um mecanismo recorrentemente ativado em células expostas ao calor (Krysko et al. 2008), a via necrótica caracteriza-se pelo inchaço celular, pela deturpação e perda precoce da integridade da membrana plasmática, permitindo um influxo de íons extracelulares e fluido, com edema resultante da célula e de suas organelas e alterações nucleares (picnose) ou até ausência nuclear (Hotchkiss et al. 2009; Hou et al. 2016). No entanto, algumas características similares de alterações nucleares também podem ocorrer na apoptose, não sendo possível distinguir a via de morte celular utilizando apenas as imagens de microscopia.

Comparativamente, nas células não tumorais, observamos uma diminuição significativa ($p < 0,05$) nos valores médios de diâmetro dos núcleos das células incubadas com AuSHINs no escuro com relação as células do grupo controle (CC), para todas as condições, assim como a população irradiada se diferem do controle de luz (CL). No entanto, não são encontradas diferenças significativas entre as populações irradiadas e não irradiadas, indicando que as alterações nucleares são, assim como observado para a membrana celular (Figura 24), efeitos da incorporação das AuSHINs, sendo as células não tumorais menos afetadas pela fotoativação.

Como já relatado, a TFT aumenta a permeabilidade dos vasos tumorais e membrana celular, assim como danos intracelulares no DNA e desnaturação de proteínas. Recentemente, Riley e Day descobriram que a TFT pode desencadear as duas principais via de morte celular, apoptose versus necrose, a depender da intensidade da radiação utilizada (Riley and Day 2017). Altas energias desencadeiam necrose, enquanto baixas iniciam o processo apoptótico. Além disso, as propriedades fototérmicas, a concentração das nanopartículas, e as condições de irradiação, também podem ter efeito sobre os processos de morte celular (Riley and Day 2017).

4.5. Ensaio LDH

Experimentos para detectar a permeabilização das membranas celulares e externalização de enzimas citosólicas (LDH) foram realizados a fim de auxiliar no entendimento das vias de morte celular. Em 6 h de incubação e posterior fotoativação, os níveis de extravasamento de LDH saturaram o sistema de detecção, visto a elevada citotoxicidade representada nos dados de MTT (Figura 17). Portanto, visando observar as variações entre as concentrações de AuSHINs utilizadas, a integridade da membrana celular foi avaliada após 2h de incubação com as AuSHINs, irradiadas e não irradiadas, por meio da quantificação da enzima lactato desidrogenase (LDH) externalizada no meio de cultura celular circundante. Os resultados estão mostrados na Figura 26, onde maior porcentagem de liberação da enzima LDH indica um maior nível de deturpação da membrana plasmática e, consecutivamente, maior morte celular.

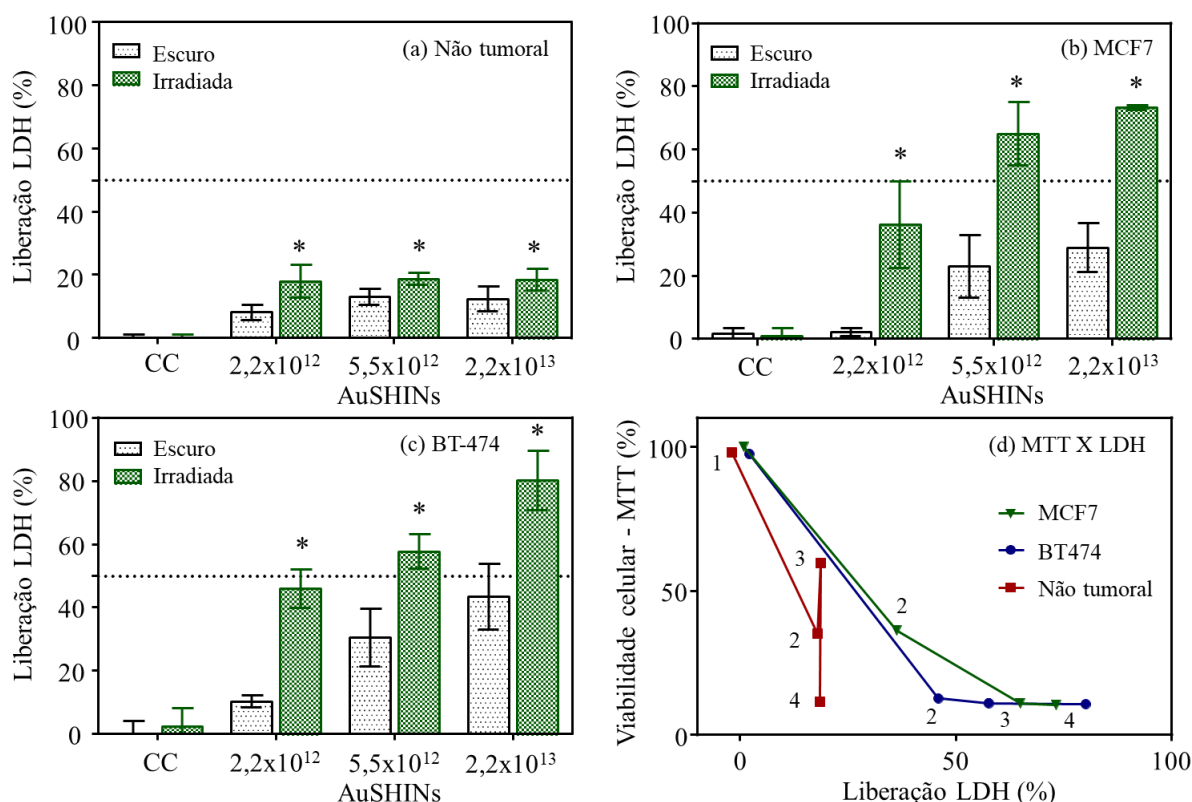


Figura 26. Ensaio LDH para células (a) não tumorais, (b) MCF7 e (c) BT-474 incubadas por 2h com diferentes concentrações de AuSHINs, antes e após fotoativação. * $p < 0,05$ (teste t múltiplos, Bonferroni), em relação a população não irradiada. (d) Relação entre os valores médios dos ensaios de MTT versus LDH, para as diferentes linhagens celulares, onde (1) representa o controle celular e (2), (3) e (4) incubações com $2,2 \times 10^{12}$, $5,5 \times 10^{12}$ e $2,2 \times 10^{13}$ AuSHINs/mL, respectivamente, por 2h seguida de irradiação.

O efeito da incorporação das AuSHINs sobre a integridade da membrana plasmática pode ser sugerido como causa dos pequenos níveis de LDH detectados em todas as populações celulares não irradiadas. Quando irradiadas, além dos efeitos danosos gerados pela hipertermia no interior das células, danos à membrana celular também são observados devido às reações oxidativas desencadeadas pela presença de EROs geradas na vizinhança das membranas lipídicas (Camacho et al. 2020, 2022), levando a aumentos significativos nos valores de LDH liberado para todas as populações celulares. As células não tumorais na presença das diferentes concentrações de AuSHINs fotoativadas (Figura 26a), apesar de serem afetadas significativamente em relação a população não irradiada, manteve-se com valores pouco expressivos. Nas células não tumorais, tanto a população no escuro quanto irradiada, permanecem com liberação de LDH entre 15-25%, confirmando que os danos são resultados da incorporação das AuSHINs e que tais células possuem resistência ao tratamento fototérmico, como observado nos dados de MTT e microscopia de fluorescência confocal. Já nas células tumorais, o LDH detectado aumenta conforme a concentração de AuSHINs, antes e após fotoativação. A MCF7 parte de 2%, para $2,2 \times 10^{12}$ AuSHINs/mL, e atinge 28% quando na máxima concentração no escuro, $2,2 \times 10^{13}$ AuSHINs/mL, e de 37 para 73%, nas mesmas condições fotoativadas. A BT474 parte de 10%, com $2,2 \times 10^{12}$ AuSHINs/mL, para 43% em $2,2 \times 10^{13}$ AuSHINs/mL no escuro e de 45 para 80%, nas mesmas condições fotoativadas, indicando que a incorporação das AuSHINs resulta em alterações na membrana plasmática, o que após fotoativação é intensificado, revelando danos graves às membranas celulares. A mortalidade de células tumorais com AuSHINs fotoativadas tem se mostrado maior do que relatado na literatura para sistemas semelhantes (Kuo et al. 2012; Shi et al. 2012; Wu et al. 2012), destacando a eficiência fototérmica das AuSHINs aqui empregadas. Por exemplo, nanopartículas bimetálicas de ouro-prata funcionalizadas com aptâmeros não desencadearam morte celular na linhagem MCF7 ao serem incubadas por 30 min e irradiadas por 1h com $0,06 \text{ W/cm}^2$, enquanto um aumento para 25% de morte celular foi observado com irradiância de $0,13 \text{ W/cm}^2$ e 46% com $0,19 \text{ W/cm}^2$ (Wu et al. 2012), demonstrando uma mortalidade menos efetiva mesmo aplicando maior irradiância.

Quando comparamos os ensaios de MTT versus LDH (Figura 26d), em geral nos deparamos com porcentagens inversamente proporcionais, ou seja, quanto menor a viabilidade celular via MTT, maior a citotoxicidade via porcentagem de liberação de LDH. Com base nos valores médios obtidos nos ensaios (MTT e LDH) após irradiação (células irradiadas), traçamos a relação observada na Figura 26d. No ponto 1 (Controle celular) temos viabilidade

celular próxima de 100% versus citotoxicidade de 0%, para todas as linhagens celulares. Os pontos 2, 3 e 4 se referem às concentrações de $2,2 \times 10^{12}$, $5,5 \times 10^{12}$ e $2,2 \times 10^{13}$ AuSHINs/mL, respectivamente. Comparando as linhagens tumorais, notamos uma sensibilidade maior à terapia das células BT-474 com $2,2 \times 10^{12}$ AuSHINs/mL (ponto 2), resultando em 46% de citotoxicidade contra 36% para as células MCF7, corroborando com os dados de MTT, onde a viabilidade reduziu para 12% e 36%, nas células BT-474 e MCF7, respectivamente. A partir do ponto 3 ($5,5 \times 10^{12}$ AuSHINs/mL), apesar dos valores médios via MTT estarem em torno de 10%, os valores médios de LDH continuam se deslocando, inferindo um aumento do efeito citotóxico nas membranas celulares conforme aumentou-se a concentração de AuSHINs. Por fim, destaca-se a curva das células não tumorais, com maiores valores de viabilidade (MTT) e menores de deturpação da membrana (LDH), confirmando a resistência das células saudáveis ao aumento de temperatura local e corroborando com os dados de microscopia de fluorescência confocal.

Portanto, a viabilidade celular, combinada com as mudanças morfológicas e com os níveis aumentados de LDH sugerem que a TFT induz o processo de necrose celular nas linhagens mamárias tumorais, MCF7 e BT-474. De fato, considerando o aumento da temperatura de 18°C (Figura 15b) em um sistema inicialmente a 36°C e que a partir de 50°C as células passam a sofrer necrose, a via pode ser um mecanismo recorrente induzido pela hipertermia (Camacho et al. 2022; Spyratou et al. 2017). Dessa forma, a hipertermia fotoinduzida combinada com o estresse oxidativo pode ter causado comprometimento da membrana por desnaturação de proteínas e abertura de poros (Camacho et al. 2022; Spyratou et al. 2017), que são provavelmente a origem da fototoxicidade aqui observada.

CAPÍTULO 5

5. CONCLUSÕES

Apesar das AuNPs serem consideradas eficientes agentes fototérmicos, a agregação em meio iônicos, como em meio de cultivo celular, representa uma limitação para aplicações *in vitro*. O recobrimento com sílica demonstrou ser uma alternativa promissora, evitando o processo de agregação em meio de cultivo sem interferir na eficiência fototérmica. Experimentos subsidiários revelaram a eficiência de conversão de luz em calor das AuSHINs, capazes de elevar a temperatura do meio em 18 °C. Através de análises *in vitro* com células derivadas do carcinoma mamário glandular (MCF7) e ductal (BT-474), incubadas com diferentes concentrações de AuSHINs ($2,2 \times 10^{12}$, $5,5 \times 10^{12}$, $2,2 \times 10^{13}$ AuSHINs/mL) e períodos de incubação (30 min, 2 e 6 h), foi possível observar uma redução da viabilidade celular abaixo de 50% para $2,2 \times 10^{12}$ AuSHINs/mL e 6h de incubação. A citotoxicidade avaliada junto à presença do antioxidante NAC demonstrou a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) durante o aquecimento fotoinduzido das AuSHINs, indicando que os processos oxidativos desempenham um papel na redução da viabilidade celular. As imagens de microscopia evidenciaram alterações na integridade da membrana plasmática para ambas as linhagens celulares e uma redução significativa do núcleo para a MCF7. Comparativamente, células não tumorais também submetidas ao mesmo tratamento fototérmico com AuSHINs, demonstraram uma sobrevivência superior via resultados de viabilidade celular, além de mínimas alterações morfológicas no núcleo e na membrana via imagens de microscopia, mesmo em condições de incubação com AuSHINs fotoativadas. Além disso, ensaios de liberação de LDH indicaram deturpações significativas na integridade da membrana celular das linhagens tumorais (MCF7 e BT-474) à medida em que a concentração de AuSHINs fotoativadas aumenta. Em contraste, células não tumorais não apresentaram diferenças significativas nos dados de LDH, independente da concentração de AuSHINs, irradiadas ou não-irradiadas, confirmando a resistência das células saudáveis ao aumento de temperatura local e corroborando com os dados de MTT e microscopia de fluorescência confocal. Portanto, a hipertermia fotoinduzida combinada com o estresse oxidativo ocasionou comprometimento da membrana por desnaturação de proteínas e abertura de poros, induzindo o processo de necrose celular, que são provavelmente a origem da fototoxicidade mais acentuada observada nas linhagens tumorais.

REFERÊNCIAS

- Abadeer, Nardine S., and Catherine J. Murphy. 2016. "Recent Progress in Cancer Thermal Therapy Using Gold Nanoparticles." doi: 10.1021/acs.jpcc.5b11232.
- Ali, Moustafa R. K., Yue Wu, and Mostafa A. El-sayed. 2019. "Gold-Nanoparticle-Assisted Plasmonic Photothermal Therapy Advances Toward Clinical Application." *J. Phys. Chem* 123:15375–15393 Feature. doi: 10.1021/acs.jpcc.9b01961.
- Amendoeira, Ana, Lorenzo Rivas García, Alexandra R. Fernandes, and Pedro V. Baptista. 2019. "Light Irradiation of Gold Nanoparticles Toward Advanced Cancer Therapeutics." *Advanced Therapeutics* 3(1). doi: 10.1002/adtp.201900153.
- Aoki, Pedro Henrique Benites, Luis F. C. Morato, Felipe J. Pavinatto, Thatyane M. Nobre, Carlos J. L. Constantino, and Osvaldo N. Oliveira. 2016. "Molecular-Level Modifications Induced by Photo-Oxidation of Lipid Monolayers Interacting with Erythrosin." doi: 10.1021/acs.langmuir.6b00693.
- Aoki, Pedro Henrique Benites, A. P. Schroder, C. J. L. Constantino, and C. M. Marques. 2015. "Bioadhesive Giant Vesicles for Monitoring Hydroperoxidation in Lipid Membranes." *Soft Matter* 11(30):5995–98. doi: 10.1039/C5SM01019E.
- Aroca, Ricardo. 2006. *Surface-Enhanced Vibrational Spectroscopy*. Toronto, Canada: John Wiley & Sons.
- Aroca, Ricardo F., Geok Yi Teo, Haider Mohan, Ariel R. Guerrero, Pablo Albella, and Fernando Moreno. 2011. "Plasmon-Enhanced Fluorescence and Spectral Modification in SHINEF." 20419–24.
- Aslantürk, Özlem Sultan. 2018. "In Vitro Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages." in *Genotoxicity - A Predictable Risk to Our Actual World*.
- Balasubramanian, R., Beomseok Kim, Steven L. Tripp, Xuejun Wang, Marya Lieberman, and Alexander Wei. 2002. "Dispersion and Stability Studies of Resorcinarene-Encapsulated Gold Nanoparticles." 18:3676–81. doi: 10.1021/la0156107.
- Bistaffa, Maria J., Mirella B. Kobal, Priscila S. S. Souza, Karina A. Toledo, Sabrina A. Camacho, and Pedro H. B. Aoki. 2020. "Photo-Induced Necrosis on Oropharyngeal Carcinoma (HEp-2) Cells Mediated by the Xanthene Erythrosine." *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 20(10):6180–90. doi: 10.1166/jnn.2020.18123.
- Blanco, Kate C., Lucas D. Dias, Amanda C. Zangirolami, and Vanderlei S. Bagnato. 2020. "Antimicrobial Photodynamic Action in Medical Materials: A Novel Thriving Area for Hospital Pneumonia Prevention." *Journal of Infectious Diseases & Preventive Medicine* 9(1):1–4.
- Bray, Freddie, Jacques Ferlay, Isabelle Soerjomataram, R. Siegel, Lindsey Torre, and Ahmedin Jemal. 2018. "Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries." *CA: A Journal for Clinicians* 00(00):1–31. doi: 10.3322/caac.21492.
- Bruce J. Berne, Columbia. 2000. *Dynamic Light Scattering: With Applications to Chemistry, Biology, and Physics*. Courier Corporation.
- Cabral, Rita M., and Pedro V Baptista. 2013. "The Chemistry and Biology of Gold Nanoparticle-Mediated Photothermal Therapy: Promises and Challenges." *Nano Life* 3(3):1–18. doi: 10.1142/S179398441330001X.
- Cabral, Rita M., and Pedro V Baptista. 2014. "Anti-Cancer Precision Theranostics: A Focus on Multifunctional Gold Nanoparticles." *Expert Review of Molecular Diagnostics* 14(8):1041–52. doi: 10.1586/14737159.2014.965683.
- Cai, Zhongli, Simmyung Yook, Yijie Lu, Dane Bergstrom, Mitchell A. Winnik, Jean-philippe Pignol, and Raymond M. Reilly. 2017. "Local Radiation Treatment of HER2-Positive

- Breast Cancer Using Trastuzumab-Modified Gold Nanoparticles Labeled with ^{177}Lu .” *Pharmaceutical Research* 34:579–90. doi: 10.1007/s11095-016-2082-2.
- Camacho, S. A., P. H. B. Aoki, C. J. L. Constantino, and A. G. Brolo. 2017. “Immunoassay Quantification Using Surface-Enhanced Fluorescence (SEF) Tags.” 2717–24. doi: 10.1039/c7an00639j.
- Camacho, Sabrina A., Mirella B. Kobal, Alexandre M. Almeida, Karina A. Toledo, Osvaldo N. Oliveira, and Pedro H. B. Aoki. 2020. “Colloids and Surfaces B : Biointerfaces Molecular-Level Effects on Cell Membrane Models to Explain the Phototoxicity of Gold Shell-Isolated Nanoparticles to Cancer Cells.” *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 194(June). doi: 10.1016/j.colsurfb.2020.111189.
- Camacho, Sabrina A., Mirella B. Kobal, Lucas G. Moreira, Maria J. Bistaffa, Thamires C. Roque, Wallance M. Pazin, Karina A. Toledo, Osvaldo N. Oliveira Jr., and Pedro H. B. Aoki. 2022. “The Efficiency of Photothermal Action of Gold Shell-Isolated Nanoparticles against Tumor Cells Depends on Membrane Interactions.” *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 211. doi: 10.1016/j.colsurfb.2021.112301.
- Camacho, Sabrina A., Regivaldo Gomes Sobral-filho, Pedro Henrique B. Aoki, Carlos Jose L. Constantino, and Alexandre G. Brolo. 2018. “Zika Immunoassay Based on Surface-Enhanced Raman Scattering Nanoprobes.” doi: 10.1021/acssensors.7b00639.
- Camden, Jon P., Jon A. Dieringer, Yingmin Wang, David J. Masiello, Lawrence D. Marks, George C. Schatz, and Richard P. Van Duyne. 2008. “Probing the Structure of Single-Molecule Surface-Enhanced Raman Scattering Hot Spots.” *Journal of the American Chemical Society* 130:12616–17. doi: 10.1021/ja8051427.
- Cancino-bernardi, J., V. S. Marangoni, J. C. F. Besson, M. E. C. Cancino, M. R. M. Natali, and V. Zucolotto. 2018. “Gold-Based Nanospheres and Nanorods Particles Used as Theranostic Agents : An in Vitro and in Vivo Toxicology Studies.” *Chemosphere* 213:41–52. doi: 10.1016/j.chemosphere.2018.09.012.
- Chen, Cing Yu, Cheng Hsun Wu, King Chuen Wu, Lian Ru Shiao, Chin Min Chuang, Yuk Man Leung, and Louis Chow. 2021. “A Basal Level of γ -Linolenic Acid Depletes Ca^{2+} stores and Induces Endoplasmic Reticulum and Oxidative Stresses to Cause Death of Breast Cancer BT-474 Cells.” *Chinese Journal of Physiology*. doi: 10.4103/cjp.cjp_30_21.
- Choi, Seon Young, Saeromi Jeong, Soo Hwa Jang, Jin Park, Jin Ho Park, Kwang Su Ock, So Yeong Lee, and Sang Woo Joo. 2012. “In Vitro Toxicity of Serum Protein-Adsorbed Citrate-Reduced Gold Nanoparticles in Human Lung Adenocarcinoma Cells.” *Toxicology in Vitro*. doi: 10.1016/j.tiv.2011.11.016.
- Chow, M. K., and C. F. Zukoski. 1994. “Gold Sol Formation Mechanisms: Role of Colloidal Stability.” *Journal of Colloid and Interface Science* 165(1):97–109. doi: 10.1006/jcis.1994.1210.
- Criddle, D. N., J. V. Gerasimenko, H. K. Baumgartner, M. Jaffar, S. Voronina, R. Sutton, O. H. Petersen, and O. V. Gerasimenko. 2007. “Calcium Signalling and Pancreatic Cell Death: Apoptosis or Necrosis?” *Cell Death and Differentiation*.
- Dai, Tianhong, Beth B. Fuchs, Jeffrey J. Coleman, Renato A. Prates, Christos Astrakas, Tyler G. St Denis, Martha S. Ribeiro, Eleftherios Mylonakis, Michael R. Hamblin, and George P. Tegos. 2012. “Concepts and Principles of Photodynamic Therapy as an Alternative Antifungal Discovery Platform.” 3(April):1–16. doi: 10.3389/fmicb.2012.00120.
- Duque, J. S., J. S. Blandón, and H. Riascos. 2017. “Localized Plasmon Resonance in Metal Nanoparticles Using Mie Theory.” *Journal of Physics: Conf. Series* 850. doi: 10.1088/1742-6596/850/1/012017.
- Elnoby, Rasha M., M. Hussein Mourad, Salah L. Hassab Elnaby, and Maram T. H. Abou Kana. 2018. “Monocrystalline Solar Cells Performance Coated by Silver Nanoparticles : Effect

- of NPs Sizes from Point of View Mie Theory.” *Optics and Laser Technology* 101:208–15. doi: 10.1016/j.optlastec.2017.11.019.
- Ermilov, E. A., M. Helmreich, N. Jux, and A. Hirsch. 2004. “Photophysical Properties of Fullerene-Dendron- Pyropheophorbide Supramolecules.” 301:27–31. doi: 10.1016/j.chemphys.2004.02.015.
- Faunce, Thomas Alured, John White, and Klaus I. Matthaiei. 2008. “Integrated Research into the Nanoparticle-Protein Corona: A New Focus for Safe, Sustainable and Equitable Development of Nanomedicines.” *Nanomedicine*. doi: 10.2217/17435889.3.6.859.
- Feng, Guangxue, Guo-Qiang Zhang, and Dan Ding. 2020. “Design of Superior Phototheranostic Agents Guided by Jablonski Diagrams.” *Chem. Soc. Rev.* 49(22):8179–8234. doi: 10.1039/D0CS00671H.
- Foulkes, Rachel, Ernest Man, Jasmine Thind, Suet Yeung, Abigail Joy, and Clare Hoskins. 2020. “The Regulation of Nanomaterials and Nanomedicines for Clinical Application: Current and Future Perspectives.” *Biomaterials Science* 8(17):4653–64. doi: 10.1039/D0BM00558D.
- Gao, Liang, Ru Liu, Fuping Gao, Yaling Wang, Xinglu Jiang, and Xueyun Gao. 2014. “Plasmon-Mediated Generation of Reactive Oxygen Species from Near-Infrared Light Excited Gold Nanocages for Photodynamic Therapy in Vitro.” *ACS Nano* 8(7):7260–71. doi: 10.1021/nn502325j.
- Grabar, Katherine C., R. Griffith Freeman, Michael B. Hommer, and Michael J. Natan. 1995. “Preparation and Characterization Monolayers of Au Colloid.” *Anal. Chem.* 67(4):735–43.
- Gryczynski, Z., J. Kimball, R. Fudala, J. Chavez, L. Ceresa, M. Szabelski, and J. Borejdo. 2020. “Photophysical Properties of 2-Phenylindole in Poly (Vinyl Alcohol) Film at Room Temperature . Enhanced Phosphorescence Anisotropy with Direct Triplet State Excitation Photophysical Properties of 2-Phenylindole in Poly (Vinyl Alcohol) Fi Lm at Room Tem.” *Methods Appl. Fluoresc* 8.
- Guerrero, Ariel R., Pablo Albella, and Ricardo F. Aroca. 2014. “Plasmon Enhanced Fluorescence with Aggregated Shell-Isolated Nanoparticles.” 1–6.
- Gupta, Parul, and Sanjay K. Srivastava. 2012. “Antitumor Activity of Phenethyl Isothiocyanate in HER2-Positive Breast Cancer Models.” *BMC Medicine*. doi: 10.1186/1741-7015-10-80.
- Heidari, Zahra, Mojtaba Salouti, and Reyhaneh Sariri. n.d. “Breast Cancer Photothermal Therapy Based on Gold Nanorods Targeted by Covalently- Coupled Bombesin Peptide.” *Nanotechnology* 26(19):195101. doi: 10.1088/0957-4484/26/19/195101.
- Hildebrandt, Bert, Peter Wust, Olaf Ahlers, Annette Dieing, Geetha Sreenivasa, Thoralf Kerner, Roland Felix, and Hanno Riess. 2002. “The Cellular and Molecular Basis of Hyperthermia.” *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 43(1):33–56. doi: 10.1016/S1040-8428(01)00179-2.
- Hotchkiss, Richard S., Andreas Strasser, Jonathan E. McDunn, and Paul E. Swanson. 2009. “Cell Death.” *N Engl J Med* 361:1570–83. doi: 10.1056/NEJMra0901217.
- Hou, Lin, Kai Liu, Yuhong Li, Shuang Ma, Xunming Ji, and Lei Liu. 2016. “Necrotic Pyknosis Is a Morphologically and Biochemically Distinct Event from Apoptotic Pyknosis.” *J Cell Sci.* 15(129):3084–90. doi: 10.1242/jcs.184374.
- Hou, Xiaoyang, Yingkai Tao, Yanyu Pang, Xinxin Li, Guan Jiang, and Yanqun Liu. 2018. “Nanoparticle-Based Photothermal and Photodynamic Immunotherapy for Tumor Treatment.” *International Journal of Cancer* 143(12):3050–60. doi: 10.1002/ijc.31717.
- Hu, Hailong, Huigao Duan, Joel K. W. Yang, and Ze Xiang Shen. 2012. “Plasmon-Modulated Photoluminescence of Individual Gold Nanostructures.” *ACS Nano* 6(11):10147–55. doi: 10.1021/nn3039066.

- Huang, Xiaohua, Prashant K. Jain, Ivan H. El-sayed, and Mostafa A. El-sayed. 2006. "Determination of the Minimum Temperature Required for Selective Photothermal Destruction of Cancer Cells with the Use of Immunotargeted Gold Nanoparticles." (25):412–17. doi: 10.1562/2005-12-14-RA-754.
- INCA - Instituto Nacional de Câncer. 2021. "Câncer de Mama." Retrieved March 14, 2022 (<https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-mama>).
- INCA, Instituto Nacional de Câncer. 2022. "A Mulher e o câncer de Mama No Brasil." Retrieved March 14, 2022 (<https://www.inca.gov.br/exposicoes/mulher-e-o-cancer-de-mama-no-brasil>).
- Jain, S., D. G. Hirst, and J. M. O'Sullivan. 2012. "Gold Nanoparticles as Novel Agents for Cancer Therapy." *The British Journal of Radiology* 85(1010):101–13. doi: 10.1259/bjr/59448833.
- Jannathul Firdhouse, M., and P. Lalitha. 2015. "Apoptotic Efficacy of Biogenic Silver Nanoparticles on Human Breast Cancer MCF-7 Cell Lines." *Progress in Biomaterials* 4(2):113–21. doi: 10.1007/s40204-015-0042-2.
- Jeevanandam, Jaison, Ahmed Barhoum, Yen S. Chan, Alain Dufresne, and Michael K. Danquah. 2018. "Review on Nanoparticles and Nanostructured Materials: History, Sources, Toxicity and Regulations." *Beilstein Journal of Nanotechnology* 9:1050–74. doi: 10.3762/bjnano.9.98.
- Kochevar, Irene E., Christopher R. Lambert, Mary C. Lynch, and Antonio C. Tedesco. 1996. "Comparison of Photosensitized Plasma Membrane Damage Caused by Singlet Oxygen and Free Radicals." 1280:223–30. doi: 10.1016/0005-2736(95)00297-9.
- Krysko, Dmitri V, Tom Vandem Bergh, Katharina D. Herde, and Peter Vandenberghe. 2008. "Apoptosis and Necrosis: Detection, Discrimination and Phagocytosis." *Methods* 44(3):205–21. doi: 10.1016/j.ymeth.2007.12.001.
- Kuo, Wen Shuo, Yi Ting Chang, Keng Chi Cho, Kuo Chih Chiu, Chi Hsiang Lien, Chen Sheng Yeh, and Shean Jen Chen. 2012. "Gold Nanomaterials Conjugated with Indocyanine Green for Dual-Modality Photodynamic and Photothermal Therapy." *Biomaterials*. doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.01.035.
- Lalonde, Bastien St-louis, Étienne Boulais, Jean-jacques Lebrun, and Michel Meunier. 2013. "Visible and near Infrared Resonance Plasmonic Enhanced Nanosecond Laser Optoporation of Cancer Cells." *Biomedical Optics Express* 4(4):490–99. doi: 10.1364/BOE.4.000490.
- Lazzaretti, Luísa Lauermann, and Haide Maria Hupffer. 2019. "Nanotecnologia e Sua Regulamentação No Brasil." *Gestão e Desenvolvimento* 16(3):153–77.
- Lazzarini, Roberto, Omar Alcántar-Ramírez, Ricardo Jaime-Cruz, Esbeydy García-Monterrubio, María Concepción Gutiérrez-Ruiz, and Luis Enrique Gómez-Quiroz. 2015. "Las Nanopartículas de Oro de 20 Nm Inhiben La Proliferación e Invasión de Células de Carcinoma Mamario Humano MCF7, in Vivo." *Revista Interdisciplinaria En Nanociencias y Nanotecnología*. doi: 10.22201/ceiich.24485691e.2015.15.53886.
- Lepock, James R. 2003. "Cellular Effects of Hyperthermia: Relevance to the Minimum Dose for Thermal Damage." *International Journal of Hyperthermia* 19(3):252–266. doi: 10.1080/0265673031000065042.
- Li, Jian-feng, and Ricardo F. Aroca. 2017. "Plasmon-Enhanced Fluorescence Spectroscopy." *Chemical Society Reviews* 46(13):3962–79. doi: 10.1039/c7cs00169j.
- Li, Jian Feng, Yi Fan Huang, Yong Ding, Zhi Lin Yang, Song Bo Li, Xiao Shun Zhou, Feng Ru Fan, Wei Zhang, Zhi You Zhou, De Yin Wu, Bin Ren, Zhong Lin Wang, and Zhong Qun Tian. 2010. "Shell-Isolated Nanoparticle-Enhanced Raman Spectroscopy." *Nature*. doi: 10.1038/nature08907.
- Li, Jian Feng, Xiang Dong Tian, Song Bo Li, Jason R. Anema, Zhi Lin Yang, Yong Ding, Yuan

- Fei Wu, Yong Ming Zeng, Qi Zhen Chen, Bin Ren, Zhong Lin Wang, and Zhong Qun Tian. 2013. "Surface Analysis Using Shell-Isolated Nanoparticle-Enhanced Raman Spectroscopy." *Nature Protocols*. doi: 10.1038/nprot.2012.141.
- Li, Jing-liang, Lei Wang, Xiang-yang Liu, Zhi-ping Zhang, Hong-chen Guo, Wei-min Liu, and Sing-hai Tang. 2009. "In Vitro Cancer Cell Imaging and Therapy Using Transferrin-Conjugated Gold Nanoparticles." *Cancer Letters* 274(2):319–26. doi: 10.1016/j.canlet.2008.09.024.
- Ma, Ningning, Yao-wen Jiang, Xiaodong Zhang, Hao Wu, John N. Myers, Peidang Liu, Haizhen Jin, Ning Gu, Nongyue He, Fu-gen Wu, and Zhan Chen. 2016. "Enhanced Radiosensitization of Gold Nanospikes via Hyperthermia in Combined Cancer Radiation and Photothermal Therapy." *ACS Appl. Mater. Interfaces* 8(42):28480–28494. doi: 10.1021/acsami.6b10132.
- Maier, Stefan Alexander. 2007. *Plasmonics: Fundamentals and Applications*. 1st ed. Springer, New York, NY.
- Majorek, Karolina A., Przemyslaw J. Porebski, Arjun Dayal, Matthew D. Zimmerman, Kamila Jablonska, Alan J. Stewart, Maksymilian Chruszcz, and Wladek Minor. 2012. "Structural and Immunologic Characterization of Bovine, Horse, and Rabbit Serum Albumins." *Molecular Immunology*. doi: 10.1016/j.molimm.2012.05.011.
- Maria, Giovana, Fioramonti Calixto, Jéssica Bernegossi, Laura Marise De Freitas, Carla Raquel Fontana, and Marlus Chorilli. 2016. "Nanotechnology-Based Drug Delivery Systems for Photodynamic Therapy of Cancer : A Review." 1–18. doi: 10.3390/molecules21030342.
- de Melo-Diogo, Duarte, Cleide Pais-Silva, Diana R. Dias, André F. Moreira, and Ilídio J. Correia. 2017. "Strategies to Improve Cancer Photothermal Therapy Mediated by Nanomaterials." *Advanced Healthcare Materials* 6(10).
- Mendes, Rita, Pedro Pedrosa, João C. Lima, Alexandra R. Fernandes, and Pedro V Baptista. 2017. "Photothermal Enhancement of Chemotherapy in Breast Cancer by Visible Irradiation of Gold Nanoparticles." (August):1–9. doi: 10.1038/s41598-017-11491-8.
- Mie, Gustav. 1908. "Beiträge Zur Optik Trüber Medien, Speziell Kolloidaler Metallösungen." *ANNALEN DER PHYSIK* 3:377–445. doi: 10.1002/andp.19083300302.
- Mocna, Marta. 2007. "Hyperthermia in Oncology." 256:1–3. doi: 10.1063/1.2825805.
- Mustafa, F. H., and M. S. Jaafar. 2013. "Comparison of Wavelength-Dependent Penetration Depths of Lasers in Different Types of Skin in Photodynamic Therapy." *Indian Journal of Physics* 87(3):203–9. doi: 10.1007/s12648-012-0213-0.
- Nie, Shuming, and Steven R. Emory. 1997. "Probing Single Molecules and Single Nanoparticles by Surface-Enhanced Raman Scattering." *Science* 275:1102–6. doi: 10.1126/science.275.5303.1102.
- Norouzi, Hasan, Karim Khoshgard, and Fatemeh Akbarzadeh. 2018a. "In Vitro Outlook of Gold Nanoparticles in Photo-Thermal Therapy : A Literature Review." 917–26.
- Norouzi, Hasan, Karim Khoshgard, and Fatemeh Akbarzadeh. 2018b. "In Vitro Outlook of Gold Nanoparticles in Photo-Thermal Therapy: A Literature Review." *Lasers in Medical Science*.
- Oh, Eunkeu, Kimihiro Susumu, Antti J. Mäkinen, Jeffrey R. Deschamps, Alan L. Huston, and Igor L. Medintz. 2013. "Colloidal Stability of Gold Nanoparticles Coated with Multithiol-Poly (Ethylene Glycol) Ligands : Importance of Structural Constraints of the Sulfur Anchoring Groups." *J. Phys. Chem. C* 117(37):18947–18956. doi: 10.1021/jp405265u.
- Pamies, Ramón, José Ginés Hernández Cifre Cifre, Vanesa Fernández Espín, Mar Collado-González, Francisco Guillermo Díaz Banõs, and José Garcia de la Torre Torre. 2014. "Aggregation Behaviour of Gold Nanoparticles in Saline Aqueous Media." *J Nanopart Res* (2014). doi: 10.1007/s11051-014-2376-4.
- Panikkanvalappil, Sajanalal R., Nasrin Hooshmand, and Mostafa A. El-sayed. 2017.

- “Intracellular Assembly of Nuclear-Targeted Gold Nanosphere Enables Selective Plasmonic Photothermal Therapy of Cancer by Shifting Their Absorption Wavelength toward Near-Infrared Region.” doi: 10.1021/acs.bioconjchem.7b00427.
- Penon, Oriol, María J. Marín, David A. Russell, and Lluïsa Pérez-García. 2017. “Water Soluble, Multifunctional Antibody-Porphyrin Gold Nanoparticles for Targeted Photodynamic Therapy.” *Journal of Colloid and Interface Science* 496:100–110. doi: 10.1016/j.jcis.2017.02.006.
- Prathna, T. C., N. Chandrasekaran, Ashok M. Raichur, and Amitava Mukherjee. 2011. “Biomimetic Synthesis of Silver Nanoparticles by Citrus Limon (Lemon) Aqueous Extract and Theoretical Prediction of Particle Size.” *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. doi: 10.1016/j.colsurfb.2010.08.036.
- Qin, Zhenpeng, Yiru Wang, Jaona Randrianalisoa, Vahid Raeesi, Warren C. W. Chan, Wojciech Lipi, and John C. Bischof. 2016. “Quantitative Comparison of Photothermal Heat Generation between Gold Nanospheres and Nanorods.” *Scientific Reports* 6(29836):1–13. doi: 10.1038/srep29836.
- Raji, V., Jatish Kumar, C. S. Rejiya, M. Vibin, Vinesh N. Sheno, and Annie Abraham. 2011. “Selective Photothermal Efficiency of Citrate Capped Gold Nanoparticles for Destruction of Cancer Cells.” *Experimental Cell Research* 317(14):2052–58. doi: 10.1016/j.yexcr.2011.04.010.
- Reshetnickov, Andrei V., Gelii V. Ponomarev, Olga Y. Abakumova, Tatyana A. Tsvetkova, Artashes V. Karmenyan, Aleksei G. Rebeko, and Rudolf P. Baum. 2000. “Novel Drug Form of Chlorin E6.” Pp. 124–30 in, edited by T. J. Dougherty.
- Riley, Rachel S., and Emily S. Day. 2017. “Gold Nanoparticle-Mediated Photothermal Therapy: Applications and Opportunities for Multimodal Cancer Treatment.” 9(August). doi: 10.1002/wnan.1449.
- Le Ru, Eric C., and Pablo G. Etchegoin. 2009. *Principles of Surface-Enhanced Raman Spectroscopy*.
- Samsuri, Nurul Diyanah, Wan Maisarah Mukhtar, Affa Rozana Abdul Rashid, Karsono Ahmad Dasuki, and Awangku Abdul Rahman Hj. Awangku Yussuf. 2017. “Synthesis Methods of Gold Nanoparticles for Localized Surface Plasmon Resonance (LSPR) Sensor Applications.” *EPJ Web of Conferences* 162:1–5. doi: 10.1051/epjconf/201716201002.
- Selim, Manar E., and Awatif A. Hendi. 2012. “Gold Nanoparticles Induce Apoptosis in MCF-7 Human Breast Cancer Cells.” *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 13(4):1617–20. doi: 10.7314/APJCP.2012.13.4.1617.
- Sharma, Harshita, Pawan K. Mishra, Sushama Talegaonkar, and Bhuvaneshwar Vaidya. 2015. “Metal Nanoparticles : A Theranostic Nanotool against Cancer.” *Drug Discovery Today* 20(9):1143–51. doi: 10.1016/j.drudis.2015.05.009.
- Sharp, Frank R., Stephen M. Massa, and Raymond A. Swanson. 1999. “Heat-Shock Protein Protection.” *Trends in Neurosciences* 22(3):97–99. doi: 10.1016/S0166-2236(98)01392-7.
- Shi, Peng, Konggang Qu, Jiasi Wang, Meng Li, Jinsong Ren, and Xiaogang Qu. 2012. “PH-Responsive NIR Enhanced Drug Release from Gold Nanocages Possesses High Potency against Cancer Cells.” *Chemical Communications*. doi: 10.1039/c2cc33543c.
- Silva, Rodrigo De Cássio, and Jussilene Setlik. 2015. “O Uso Da Terapia Fotodinâmica Como Tratamento Alternativo Para o câncer de Pele Do Tipo Não-Melanoma.” *Revista Saúde e Desenvolvimento* 7(4).
- Society, American Cancer. 2019. “Invasive Breast Cancer (IDC/ILC).” Retrieved January 5, 2019 (<https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/understanding-a-breast-cancer-diagnosis/types-of-breast-cancer/invasive-breast-cancer.html>).
- Song, C. W. 1984. “Effect of Local Hyperthermia on Blood Flow and Microenvironment: A

- Review.” *Cancer Research*.
- Spyratou, Ellas, Mersini Makropoulou, Efstathios P. Efstathopoulos, Alexandros G. Georgakilas, and Lembit Sihver. 2017. “Recent Advances in Cancer Therapy Based on Dual Mode Gold Nanoparticles.” *Cancers*.
- Srinath, B. S., and V. Ravishankar Rai. 2015. “Biosynthesis of Highly Monodispersed, Spherical Gold Nanoparticles of Size 4–10 Nm from Spent Cultures of *Klebsiella Pneumoniae*.” *3 Biotech*. doi: 10.1007/s13205-014-0265-2.
- Uzma, M., N. Sunayana, Vinay B. Raghavendra, C. S. Madhu, Rajasree Shanmuganathan, and Kathirvel Brindhadevi. 2020. “Biogenic Synthesis of Gold Nanoparticles Using *Commiphora Wightii* and Their Cytotoxic Effects on Breast Cancer Cell Line (MCF-7).” *Process Biochemistry* 92:269–76. doi: 10.1016/j.procbio.2020.01.019.
- Valenzeno, Dennis Paul. 1987. “Photomodification of Biological Membranes with Emphasis on Singlet Oxygen Mechanisms.” 46(1):147–60.
- Valle-Delgado, Juan J., José A. Molina-Bolévair, Francisco Galisteo-González, María J. Gálvez-Riuz, Adam Feiler, and Mark W. Rutland. 2004. “Interaction Forces between BSA Layers Adsorbed on Silica Surfaces Measured with an Atomic Force Microscope.” *Journal of Physical Chemistry B*. doi: 10.1021/jp0374197.
- Wang, Xuejun, Haichun Li, Xianping Liu, Ye Tian, Huishu Guo, Ting Jiang, Zimiao Luo, Kai Jin, Xiping Kuai, Yao Liu, Zhiqing Pang, Wuli Yang, and Shun Shen. 2017. “Enhanced Photothermal Therapy of Biomimetic Polypyrrole Nanoparticles through Improving Blood Flow Perfusion.” *Biomaterials*. doi: 10.1016/j.biomaterials.2017.08.004.
- Weissleder, Ralph. 2001. “A Clearer Vision for in Vivo Imaging.” *Nature Biotechnology* 19:316–17. doi: 10.1038/86684.
- Willets, Katherine A., and Richard P. Van Duyne. 2007. “Localized Surface Plasmon Resonance Spectroscopy and Sensing.” *Annu. Rev. Phys. Chem.* 58:267–97. doi: 10.1146/annurev.physchem.58.032806.104607.
- Wright, A. K., and M. R. Thompson. 1975. “Hydrodynamic Structure of Bovine Serum Albumin Determined by Transient Electric Birefringence.” *Biophysical Journal*. doi: 10.1016/S0006-3495(75)85797-3.
- Wu, Ping, Yang Gao, Hui Zhang, and Chenxin Cai. 2012. “Aptamer-Guided Silver-Gold Bimetallic Nanostructures with Highly Active Surface-Enhanced Raman Scattering for Specific Detection and near-Infrared Photothermal Therapy of Human Breast Cancer Cells.” *Analytical Chemistry*. doi: 10.1021/ac3015164.
- Wu, Ya Na, Li Xing Yang, Xuan Yu Shi, I. Chen Li, Joanna M. Biazik, Kyle R. Ratinac, Dong Hwang Chen, Pall Thordarson, Dar Bin Shieh, and Filip Braet. 2011. “The Selective Growth Inhibition of Oral Cancer by Iron Core-Gold Shell Nanoparticles through Mitochondria-Mediated Autophagy.” *Biomaterials*. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.03.006.
- Xiang, Rong, Yang Shi, Deborah A. Dillon, Brina Negin, Csaba Horva, and James A. Wilkins. 2004. “2D LC / MS Analysis of Membrane Proteins from Breast Cancer Cell Lines MCF7 and BT474 Research Articles.” *J. Proteome Res.* 3(6):1278–83. doi: 10.1021/pr049852e.
- Yang, Rui-Meng, Chao-Ping Fu, Jin-Zhi Fang, Xiang-Dong Xu, Xin-hua Wei, Wen-Jie Tang, Xin-Qing Jiang, and Li-Ming Zhang. 2017. “Hyaluronan-Modified Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles for Bimodal Breast Cancer Imaging and Photothermal Therapy.” *International Journal of Nanomedicine* 12:197–206. doi: 10.2147/IJN.S121249.
- Yang, Wenjie, Huazheng Liang, Songhua Ma, Devin Wang, and Jun Huang. 2019. “Gold Nanoparticle Based Photothermal Therapy : Development and Application for Effective Cancer Treatment.” *Sustainable Materials and Technologies* 22:e00109. doi: 10.1016/j.susmat.2019.e00109.
- Zhan, Tao, Pengfei Li, Shan Bi, Biao Dong, Hongwei Song, Hui Ren, and Liping Wang. 2012a.

- “12P-Conjugated PEG-Modified Gold Nanorods Combined with near-Infrared Laser for Tumor Targeting and Photothermal Therapy.” *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. doi: 10.1166/jnn.2012.6502.
- Zhan, Tao, Pengfei Li, Shan Bi, Biao Dong, Hongwei Song, Hui Ren, and Liping Wang. 2012b. “12P-Conjugated PEG-Modified Gold Nanorods Combined with Near-Infrared Laser for Tumor Targeting and Photothermal Therapy.” *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 12(9):7198–7205. doi: 10.1166/jnn.2012.6502.
- Zhang, Ai-wei, Wei-hua Guo, Ya-fei Qi, Jian-zhen Wang, Xiang-xing Ma, and De-xin Yu. 2016. “Synergistic Effects of Gold Nanocages in Hyperthermia and Radiotherapy Treatment.” *Nanoscale Research Letters*. doi: 10.1186/s11671-016-1501-y.
- Zhao, Pengxiang, Na Li, and Didier Astruc. 2013. “State of the Art in Gold Nanoparticle Synthesis.” *Coordination Chemistry Reviews* 257(3–4):638–65. doi: 10.1016/j.ccr.2012.09.002.
- Zhdanov, Vladimir P. 2019. “Formation of a Protein Corona around Nanoparticles.” *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 41:95–103. doi: 10.1016/j.cocis.2018.12.002.
- Zhu, Man, Xiaoyu Tang, Zhengyan Gong, Wenjuan Tang, and Yanmin Zhang. 2021. “TAD1822-7 Induces ROS-Mediated Apoptosis of HER2 Positive Breast Cancer by Decreasing E-Cadherin in an EphB4 Dependent Manner.” *Life Sciences*. doi: 10.1016/j.lfs.2021.119954.