



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Câmpus de São José do Rio Preto

Ágata Silva Cabral

**Avaliação da ação de nanoemulsões vinculadas à terapia fotodinâmica
em modelo de câncer de mama metastático murino 4T1**

São José do Rio Preto
2022

Ágata Silva Cabral

**Avaliação da ação de nanoemulsões vinculadas à terapia fotodinâmica
em modelo de câncer de mama metastático murino 4T1**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biociências, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marília de Freitas Calmon
Coorientador: Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga

São José do Rio Preto
2022

C117a	Cabral, Ágata Silva Avaliação da ação de nanoemulsões vinculadas à terapia fotodinâmica em modelo de câncer de mama metastático murino 4T1 / Ágata Silva Cabral. -- São José do Rio Preto, 2022 93 p. : il., tabs., fotos Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto Orientadora: Marília de Freitas Calmon Coorientador: Sebastião Roberto Taboga 1. Biologia Estrutural. 2. Fototerapia. 3. Nanotecnologia. 4. Genética. 5. Carcinogênese. I. Título.
-------	---

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Ágata Silva Cabral

**Avaliação da ação de nanoemulsões vinculadas à terapia fotodinâmica
em modelo de câncer de mama metastático murino 4T1**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biociências, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marília de Freitas Calmon

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof.^a Dra. Marília de Freitas Calmon

UNESP – São José do Rio Preto

Orientadora

Prof.^a Dra. Patricia Simone Leite Vilamaior

UNESP – São José do Rio Preto

Prof.^a Dra. Flavia Cristina Rodrigues Lisoni

UNESP – São José do Rio Preto

Prof.^a Dra. Daniele Lisboa Ribeiro

UFU – Uberlândia

Prof.^a Dra. Mariana Brait Rodrigues de Oliveira

JOHNS HOPKINS UNIVERSITY – Baltimore, EUA

São José do Rio Preto, 20 de Janeiro de 2022

DEDICATÓRIA

A Deus, pelo milagre da vida, pela beleza do existir e pela infinitude do amor.

À minha mãe, por ter me dado a luz e me transformado em guerreira, com o seu exemplo, dedicação, força e amor.

Aos meus queridos avós, in memoriam, que com sabedoria, cumplicidade e infinito amor me ensinaram a trilhar os caminhos da vida com persistência, fé e trabalho, me proporcionando uma infância maravilhosa e pelo incentivo de minha educação formal.

AGRADECIMENTOS

A Deus, em primeiro lugar, pela força e coragem não só nesta como em todas as demais conquistas durante a minha caminhada.

Aos meus pais, por me proverem de ensinamentos para a vida, e meu irmão, que são meus melhores e maiores presentes. Em especial a minha mãe, pelo companheirismo em todos os aspectos da minha vida, pelo apoio fosse aos maus ou bons momentos. Mãe, só você é tão acolhedora, contagiante e querida. Não sei o que faria sem sua presença confortante, você é meu abrigo!

Aos amigos e familiares que, embora saudosos, souberam entender a importância deste momento de trabalho que por vezes justificou minha ausência.

A todos os professores que me acompanharam durante a jornada da Pós-graduação, que, fosse com exigentes cobranças ou palavras de apoio, me serviram de profunda inspiração. Em especial à minha orientadora Dra. Marília de Freitas Calmon, que me acolheu de braços abertos, me conduzindo pelos caminhos da pesquisa com paciência e sabedoria, tornando possível a realização do trabalho. Orgulho-me de ter desenvolvido este estudo sob sua orientação, e, acima de tudo, obrigada por ter sido responsável pelo meu amadurecimento profissional e pessoal, e acima de tudo pela confiança depositada ao longo destes anos, você é uma profissional única e excepcional!

À profa. Dra. Paula Rahal, pela grande oportunidade a mim concedida, pelo acolhimento e apoio. Obrigada por contribuir com a minha evolução profissional, por compartilhar seus conhecimentos e experiências. Agradeço por todas as orientações concedidas e pelo carinho com seus alunos.

Ao meu coorientador Prof. Sebastião Roberto Taboga, pelo acolhimento em seu laboratório, por me proporcionar crescimento pessoal e profissional. Obrigada por toda a dedicação e preocupação ao longo do projeto.

Agradeço também aos membros da banca examinadora pela disponibilidade de

participação e pelas contribuições pessoais acerca desta Tese de Doutorado.

Aos amigos do Laboratório de Estudos Genômicos, agradeço pela disposição e prontidão a me ensinarem a rotina do laboratório, transferindo seus saberes com muito empenho. Obrigada pela amizade e companheirismo, vocês tornam os meus dias mais alegres!

Ao Prof. Dr. Antônio Cláudio Tedesco pela colaboração com o trabalho e fornecimento do aparato a laser.

À Ellen Leonel, pela amizade e pela ajuda preciosa dada ao desenvolvimento do trabalho e nos resultados práticos laboratoriais.

À Universidade Estadual Paulista – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (UNESP-IBILCE) pela oportunidade de adquirir conhecimentos. Pelo suporte durante todo o desenvolvimento do trabalho.

À CAPES pela concessão de bolsa de Doutorado (Processo nº 88882.434437/2019-01) e pelo auxílio financeiro fornecido para a realização do presente estudo. Muito obrigada nunca será suficiente para demonstrar a grandeza do que recebi de vocês!

Por fim, deixo minha gratidão a todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para realização deste trabalho.

RESUMO

O câncer de mama constitui um grave problema de saúde pública, não só pela elevada incidência e mortalidade, como pelo tratamento muitas vezes ineficaz. Diferentes sistemas nanoestruturados vêm sendo implementados a fim de resolver limitações das estratégias terapêuticas convencionais e demonstram vantagens sobre outros sistemas de veiculação devido à sua estrutura em escala nanométrica com propriedades singulares, e suas aplicações podem se estender desde a entrega de fármacos até procedimentos clínicos envolvendo fotoprocessos, tais como a terapia fotodinâmica (TFD). As nanopartículas (entre elas as nanoemulsões) apresentam a capacidade de superar a maioria das limitações dos fotossensibilizadores clássicos, como melhoria da solubilidade, biodistribuição, farmacocinética, absorção e habilidade de direcionamento nas células-alvo, além da alta razão superfície/volume possibilitando alta carga de drogas nestes sistemas. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi investigar a ação de nanoemulsões como sistemas de veiculação de um agente fotossensível (ftalocianina de cloro-alumínio – ClAlPc) e quimioterápico (doxorrubicina – DOX) em camundongos BALB/c (fêmeas de 6 a 8 semanas) inoculados com linhagem 4T1 (câncer de mama metastático) e tratados em associação à terapia fotodinâmica. Nossos resultados mostraram que o tratamento sinérgico na presença de irradiação a laser (NE-PcDoxo + TFD) ocasionou uma redução do câncer de mama induzido, diminuição da expressão de VEGF, aumento na expressão de Caspase-3, necrose tecidual e diminuição maciça de células proliferativas, conforme demonstrado pela imunocoloração de Ki67. Além disso, este tratamento associado induziu a superexpressão dos genes apoptóticos *ABL1*, *CD70*, *CRADD*, *FASL* e *NME5* e redução na expressão dos genes alvo de drogas anticâncer *CDK2*, *ERBB2*, *FIGF*, *IGF2*, *PARP4* e *PGR*. Tais resultados validam este tratamento como uma alternativa promissora para aprimorar as estratégias anticâncer aplicadas atualmente.

Palavras-chave: Agente Antitumoral. Câncer de Mama. Fotossensibilizador. Nanoemulsão. Nanotecnologia.

ABSTRACT

Breast cancer is a serious public health problem, not only because of the high incidence and mortality but also because of the often-ineffective treatment. Different nanostructured systems have been implemented to address limitations of conventional therapeutic strategies and demonstrate advantages over other delivery systems because of their nanometric scale structure with unique properties, and their applications can range from drug delivery to clinical procedures involving photoprocesses, such as photodynamic therapy (PDT). Nanoparticles (including nanoemulsions) have the ability to overcome most of classical photosensitizers limitations such as improved solubility, biodistribution, pharmacokinetics, absorption and targeting ability in target cells, as well as high surface/volume allowing high drug loading in these systems. Therefore, the objective of this present work will be to investigate the action of nanoemulsions as photosensitive agents (chloro aluminum phthalocyanine - ClAlPc) and chemotherapeutic agents (doxorubicin - DOX) in inoculated BALB/c mice (females 6 to 8 weeks) with 4T1 lineage and treated in association with photodynamic therapy. Our results showed that synergistic treatment in the presence of laser irradiation (NE-PcDoxo + PDT) led to a reduction of 4T1 induced breast cancer in mice, decrease of tumor VEGF expression, increase in Caspase-3 expression, tissue necrosis and massive decrease in proliferative cells, as shown by Ki67 immunostaining. Furthermore, this associated treatment induced overexpression of apoptotic genes *ABL1*, *CD70*, *CRADD*, *FASL*, and *NME5* and reduction in expression of anticancer drug target genes *CDK2*, *ERBB2*, *FIGF*, *IGF2*, *PARP4* and *PGR*. These results validate this treatment as a promising alternative to improve the currently applied anticancer strategies.

Keywords: Anti-tumor Agent. Breast Cancer. Photosensitizer. Nanoemulsion. Nanotechnology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Plasticidade celular no câncer.....	17
Figura 2. Modos de migração celular e regulação por proteínas da família Rho.....	19
Figura 3. Microambiente tumoral.....	21
Figura 4. Cascata metastática.....	22
Figura 5. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020 por sexo.....	23
Figura 6. Progressão do câncer de mama do tumor primário para o estágio metastático.....	24
Figura 7. Reações fotoquímicas resultantes da terapia fotodinâmica (diagrama de Jablonski).....	31
Figura 8. Estrutura de sistemas bifásicos w/o e o/w que formam as nanoemulsões.....	38
Figura 9. Estrutura química da ftalocianina de cloro alumínio ($C_{32}H_{16}AlClN_8$).....	40
Figura 10. Estrutura química da antraciclina doxorubicina.....	41
Figura 11. Gráfico do crescimento tumoral de mama murino experimento piloto 1.....	52
Figura 12. Gráfico do tamanho tumoral dos grupos inoculados com diferentes vias de administração de NE-PcDoxo associadas à terapia fotodinâmica.....	53
Figura 13. Curva de crescimento tumoral dos grupos estudados entre o dia do início do experimento (dia 0) e final do experimento piloto 3 (dia 30).....	54
Figura 14. Gráfico dos tamanhos tumorais <i>ex vivo</i> dos diferentes grupos de tratamento submetidos ao experimento piloto 3.....	54
Figura 15. Corte histológico de região total e periférica de tumor mamário desenvolvido a partir do experimento piloto 3.....	55
Figura 16. Histologia representativa dos tumores do experimento piloto 3.....	56

LISTA DE FIGURAS ARTIGO CIENTÍFICO

Figure 1. Tumor growth curves in the evaluated groups from the day experiment started (day 0) and the day of euthanasia (day 15).....	68
Figure 2. (A) Breast tumor volume of murine after euthanasia among different treatments applied. (B) Tumor weight after euthanasia. (C) Macroscopic aspect of a tumor treated with NE-PcDoxo + PDT showing a significant decrease in relation to the (D) 4T1 control mammary tumor (without treatment).....	69
Figure 3. Histological section of tumor tissue from animal treated with NE-PcDoxo + PDT.....	70
Figure 4. Stereological data of 4T1 strain mammary tumors subjected to different treatments.....	71
Figure 5. VEGF expression in tumors from animals of the control group and subjected to different treatments.....	72
Figure 6. Vascular microdensity (MDV) by staining index and the % of marked area shown by the expression of CD31 in tumor tissue of the animals from control group and subjected to different treatments.....	73
Figure 7. Caspase-3 expression in tumor tissue from animals of the control group and subjected to different treatments.....	74
Figure 8. Ki-67 expression in tumor tissue from animals of the control group and subjected to different treatments.....	75
Figure S1. Histological section of a tumor after treatment with NE-PcDoxo + PDT.....	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação dos subtipos moleculares do câncer de mama e terapias.....	26
---	----

Tabela 2. Nanomedicina aprovada pela FDA em uso clínico de rotina para tratamento de câncer de mama.....	37
---	----

LISTA DE TABELAS ARTIGO CIENTÍFICO

Table 1. Overview of the differentially expressed genes related to the response to antitumor drugs in the tumors after the NE-PcDoxo+PDT treatment.....	75
--	----

Table 2. Overview of the differentially expressed apoptosis genes in the tumors after the NE-PcDoxo+PDT treatment.....	76
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E UNIDADES FUNDAMENTAIS

4T1	Linhagem de carcinoma mamário murino
AICIPc	Ftalocianina de cloroalumínio
BSA	Albumina sérica bovina
CD31	molécula de adesão celular endotelial plaquetária (PECAM-1)
cm²	centímetros quadrados
CO₂	gás carbônico
DAB	diaminobenzidine trahydrochloride 3,3'
DMEM	“Dulbecco’s Modified Eagle Medium” (Meio essencial mínimo modificado por Dulbecco)
DMSO	Dimetilsulfóxido
Doxo	Doxorrubicina
H₂O₂	peróxido de hidrogênio
HE	Hematoxilina-eosina
HRP	Horseradish peroxidase (peroxidase de rábano)
Ki67	marcador de proliferação Ki67
J.cm⁻²	joule por centímetro quadrado
mL	mililitro
mm	Milímetro
mm³	Milímetros cúbicos
mRNA	RNA mensageiro
mV	Milivolt
NE	Nanoemulsão
NE-Doxo	Nanoemulsão contendo doxorrubicina
NE-Pc	Nanoemulsão contendo ftalocianina de cloro alumínio

NE-PcDoxo	Nanoemulsão contendo ftalocianina de cloro alumínio e doxorubicina
nm	Nanômetro
n°	Número
PBS	“Polyphosphate buffered saline” (Tampão fosfato-salino)
PIT	Pressão intersticial tumoral
RPMI	“Roswell Park Memorial Institute Medium” (Meio do Instituto Parque Memorial Roswell)
SFB	Soro fetal bovino
TFD	Terapia fotodinâmica
TBS	Tampão tris salino
µg	micrograma
U	unidade
USP	Universidade de São Paulo
v/v	volume/volume
VEGF	(Fator de crescimento endotelial vascular)
µL	Microlitro
µM	Micrômetro
°C	graus Celsius
%	porcentagem

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1 O câncer em seu contexto.....	16
1.2 Câncer de mama.....	23
1.2.1 <i>Classificação e caracterização.....</i>	<i>25</i>
1.2.2 <i>Diagnóstico e tratamento.....</i>	<i>27</i>
1.3 Terapia Fotodinâmica.....	29
1.3.1 <i>Mecanismos relacionados à Terapia Fotodinâmica.....</i>	<i>30</i>
1.3.2 <i>Fotossensibilizadores.....</i>	<i>33</i>
1.4 Nanotecnologia aplicada na terapia do câncer.....	34
1.4.1 <i>Nanoemulsões: Drug delivery systems para ftalocianinas e doxorubicina.....</i>	<i>38</i>
2. OBJETIVOS.....	43
2.1 Geral.....	43
2.2 Específicos.....	43
3. METODOLOGIA.....	44
3.1 Síntese dos sistemas nanoestruturados e aparato para TFD.....	44
3.2 Modelo experimental <i>in vivo</i>.....	44
3.3 Experimento Piloto 1 - Análise do melhor tempo pós-inoculação das células nos camundongos para início do tratamento com as nanoemulsões associadas a TFD.....	46
3.4 Experimento piloto 2 - Análise do melhor modo de administração das nanoemulsões nos tumores murinos.....	46
3.5 Experimento piloto 3 - Análise do período pós-tratamento até eutanásia dos animais após sessão única de TFD.....	47
3.6 Eficiência da TFD combinada com as nanoemulsões.....	48
3.7 Ensaios Imunohistoquímicos.....	48
3.8 Análises estereológicas.....	50
3.9 PCR Arrays.....	50
3.10 Análises Estatísticas.....	51

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO DOS EXPERIMENTOS PILOTOS.....	52
4.1 Análise do melhor tempo pós-inoculação das células nos camundongos para início do tratamento com as nanoemulsões associadas a TFD.....	52
4.2 Análise do melhor modo de administração das nanoemulsões nos tumores murinos.....	52
4.3 Análise do período pós-tratamento até eutanásia dos animais após sessão única de TFD.....	53

CAPÍTULO 2

5. ARTIGO CIENTÍFICO.....	60
Abstract.....	61
Introduction.....	62
Material and Methods.....	63
Results.....	68
Discussion.....	76
Conclusion.....	79
Acknowledgments.....	79
Conflict of interest.....	79
Supplementary Material.....	80
References.....	81

CAPÍTULO 3

6. CONCLUSÕES.....	84
7. REFERÊNCIAS.....	85

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

1.1 O câncer em seu contexto

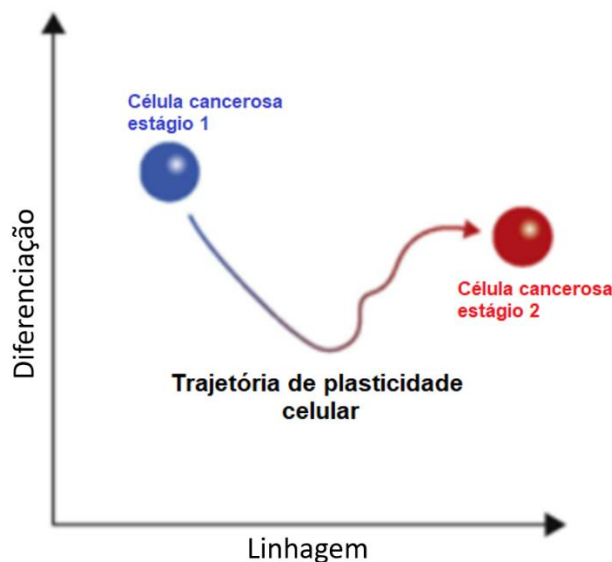
As células cancerosas possuem capacidade de violar as regras mais básicas de comportamento pelas quais os organismos multicelulares são constituídos e mantidos, explorando todas as oportunidades de fazê-lo, portanto, de uma forma simplista de entendimento, o câncer surge da violação do comportamento celular social. Se a ordem como os tecidos crescem e se renovam deve ser mantida, cada célula necessita ajustar seu comportamento de acordo com as necessidades do organismo como um todo, ou seja, devem dividir quando necessário e evitar a divisão quando não necessário; sobreviver por todo o período em que são requeridas e se suicidarem quando deixam de executar suas funções; e, ainda, manter suas características de especialização típicas e não invadir locais inadequados. Contudo, um colapso pode ocorrer quando uma única célula sofre alterações genéticas que permitem sua sobrevivência, produzindo células-filhas que se comportam da mesma forma “antissocial”, levando à expansão de um clone de células anormais e posteriormente à uma catástrofe ocasionada pela interrupção organizacional tecidual, surgindo então o câncer (ALBERTS et al., 2011).

Cânceres em geral se desenvolvem de uma população de células anormais, que evolui malignamente em ciclos sucessivos de mutação causados por instabilidade genética e pressões seletivas, conferindo vantagem competitiva em relação às células vizinhas (ALBERTS et al., 2017; SOMARELLI et al., 2020). As células cancerosas adquirem alterações genotípicas e fenotípicas ao longo do curso da doença, no qual essas mudanças melhoram a aptidão das células, permitindo que um tumor evolua e supere as restrições ambientais e o tratamento. Portanto, a evolução do câncer é impulsionada por complexos processos regidos por regras distintas, como variantes genéticas discretas e irreversíveis e reprogramação plástica contínua e reversível (HAHN et al., 2021).

A plasticidade celular é a capacidade de uma célula mudar sua identidade, alterando seu status de diferenciação e/ou compromisso de linhagem (SUVA et al., 2013). A reprogramação plástica no câncer é categorizada em desdiferenciação, ou seja, a aquisição por uma célula totalmente diferenciada de características observadas em células

progenitoras ou células-tronco, e trans-diferenciação, ou seja, a aquisição por uma célula de determinada linhagem de características de uma linhagem distinta (Figura 1) (CIRIELLO, MAGNANI, 2021).

Figura 1. Plasticidade celular no câncer. Empurradas por forças intrínsecas e extrínsecas, células cancerosas se movem em um espaço cujas dimensões são definidas pelo status de diferenciação e comprometimento da linhagem, cujas características variam entre os tipos de tumor e as pressões evolutivas, heterogeneidade fenotípica entre as células cancerosas, permitindo uma adaptação rápida, dinâmica e reversível durante a progressão da doença. Fonte: Adaptado de CIRIELLO, MAGNANI, 2021.



Fatores intrínsecos e extrínsecos podem afetar a plasticidade das células cancerosas e sua resistência durante a terapia de tratamento. Fatores intrínsecos do tumor incluem oncogenes mutados, alterações epigenéticas, desregulação transcricional e de transdução de sinal, atividade metabólica alterada e alterações nas respostas a danos no DNA (DDR). Juntos, os efeitos dos oncogenes, bem como a mudança do estado da célula, resultam na sobrevivência e proliferação tumoral. Já os fatores extrínsecos incluem alterações no microambiente tumoral (TME) e alterações no estado de diferenciação e composição das células estromais infiltrantes do tumor, como células imunes e fibroblastos (HAHN et al., 2021).

Para fins conceituais, mutações gênicas dominantes são aquelas que tornam o gene afetado hiperativado, e somente uma cópia precisa estar mutada para que o dano ocorra, sendo denominado oncogene, na qual, a forma normal do gene correspondente é dito como proto-oncogene. Para outros genes, o perigo reside em mutações que destroem sua função sendo normalmente recessivas, na qual duas cópias do gene devem ser perdidas ou inativadas para que seu efeito se manifeste, sendo denominados de supressores tumorais (ALBERTS, 2011). O câncer é considerado uma doença de alta complexidade

decorrente de falhas nos mecanismos que geralmente controlam o crescimento, proliferação celular e que regulam a apoptose (LODISH, 2000). O acúmulo progressivo de alterações genéticas e epigenéticas como a acetilação, metilação (hipermetilação das ilhas CpG), fosforilação, ubiquinação e a regulação por microRNAs favorece o surgimento de uma célula cancerosa (BENNETT, LICHT, 2018).

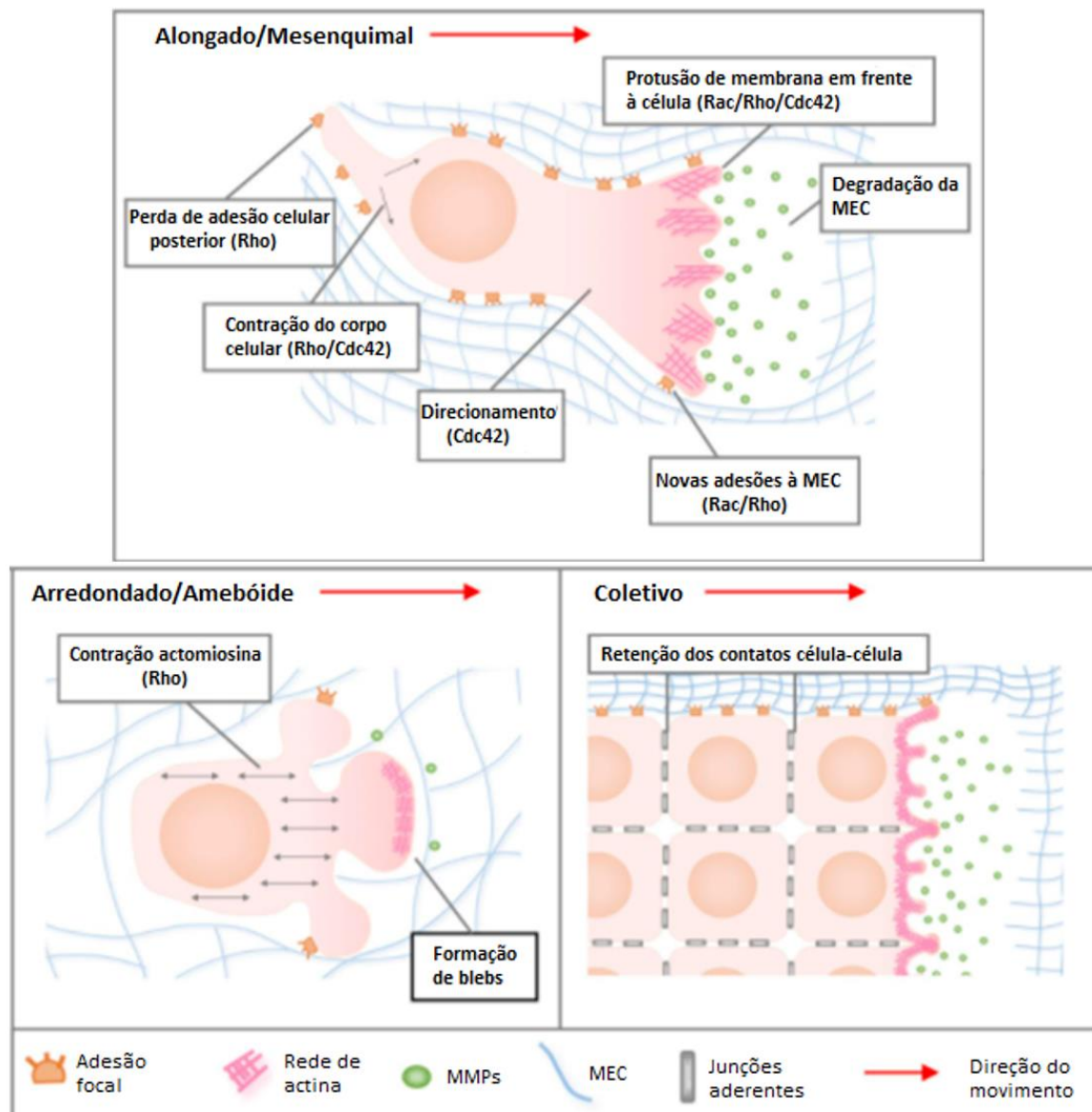
Como um exemplo de complexidade genética que conduz a sinalização oncogênica em tumores sólidos, a sinalização desregulada representa um importante mecanismo de conservação. Por exemplo, a via RAS se encontra mutada em aproximadamente 19% de todos os cânceres humanos (PRIOR et al., 2020). As mutações da tirosina quinase e da via RAS também resultam na ativação de outras vias de sinalização, como a fosfoinosítídeo-3 quinase (PI3K). PI3K também pode ser ativada por mutações diretas no gene *PIK3CA*, e inibidores de PI3K ou mediadores da via AKT/mTOR estão relacionados com melhoras no prognóstico de câncer (COX et al., 2014; GYSIN et al., 2011). Os fatores de transcrição MYC e MYCN, por exemplo, estão amplificados ou translocados em um subconjunto de cânceres, e a via MYC está desregulada em uma porcentagem significativa de cânceres humanos (DANG, 2012; SCHAUB et al., 2018).

A adoção de um fenótipo pró-migratório permite que células cancerosas invadam o estroma e se movam em direção a vasos sanguíneos ou linfáticos. Rho GTPases desempenham um papel fundamental na formação de protrusões de membrana ricas em actina, e na renovação das adesões celulares necessárias para a invasão eficiente de células cancerígenas (CLAYTON, RIDLEY, 2020). Elas se caracterizam como proteínas G monoméricas pequenas (~21 kDa) pertencentes à superfamília RAS, e constituem reguladores chave da estrutura e dinâmica do citoesqueleto, influenciando na adesão, morfologia e progressão celular ao longo do ciclo celular. As proteínas Rho agem como um interruptor molecular, alternando entre as formas ativas ligadas ao GTP e as formas inativas ligadas ao GDP, sendo, portanto, altamente reguladas (CARDAMA et al., 2017).

A mais bem caracterizada função dessas proteínas é a organização do citoesqueleto de actina em estruturas necessárias para a migração celular (Figura 2). As células em migração estendem saliências da membrana na borda de ataque, que são impulsionadas para a frente pela polimerização de actina. Três membros da família Rho já foram estudados em detalhe: Cdc42, Rac1 e RhoA (CARDAMA et al., 2017). Em geral, a formação de lamelipódios é regulada por Rac e Rho, enquanto a atividade do Cdc42 conduz a formação de filopódios e mantém a polarização celular necessária para a migração direcional. Rho regula a contratilidade da actomiosina, que pode levar à

formação de fibras de actina em resposta ao estresse e aderências focais em substratos rígidos, necessários para gerar as forças de tração para puxar o corpo celular na direção do movimento (CLAYTON, RIDLEY, 2020).

Figura 2. Modos de migração celular e regulação por proteínas da família Rho. A migração celular alongada envolve a extensão de protrusões ricas em actina e a liberação localizada de metaloproteinases de matriz (MMPs), que degradam as proteínas da matriz extracelular (MEC) e criam espaço no qual a célula pode se mover. A formação de novas adesões na frente da célula e a contração do corpo celular puxam a célula na direção do movimento, enquanto a perda de adesões da MEC na parte traseira permite que a célula migre para a frente. Durante a migração por movimentos arredondados, a alta contratilidade da actomiosina produz pressão hidrostática, que leva à formação de bolhas de membrana (*blebs*) dinâmicas que preenchem espaços pré-existent na matriz e formam apenas ligações fracas à MEC. Na migração celular coletiva, as células permanecem fisicamente ligadas por junções aderentes. As células de frente invasiva estendem saliências ricas em actina voltadas para a direção do movimento, formando novas adesões com a MEC permitindo forças de tração que puxam as células vizinhas. Fonte: Adaptado de CLAYTON, RIDLEY, 2017.

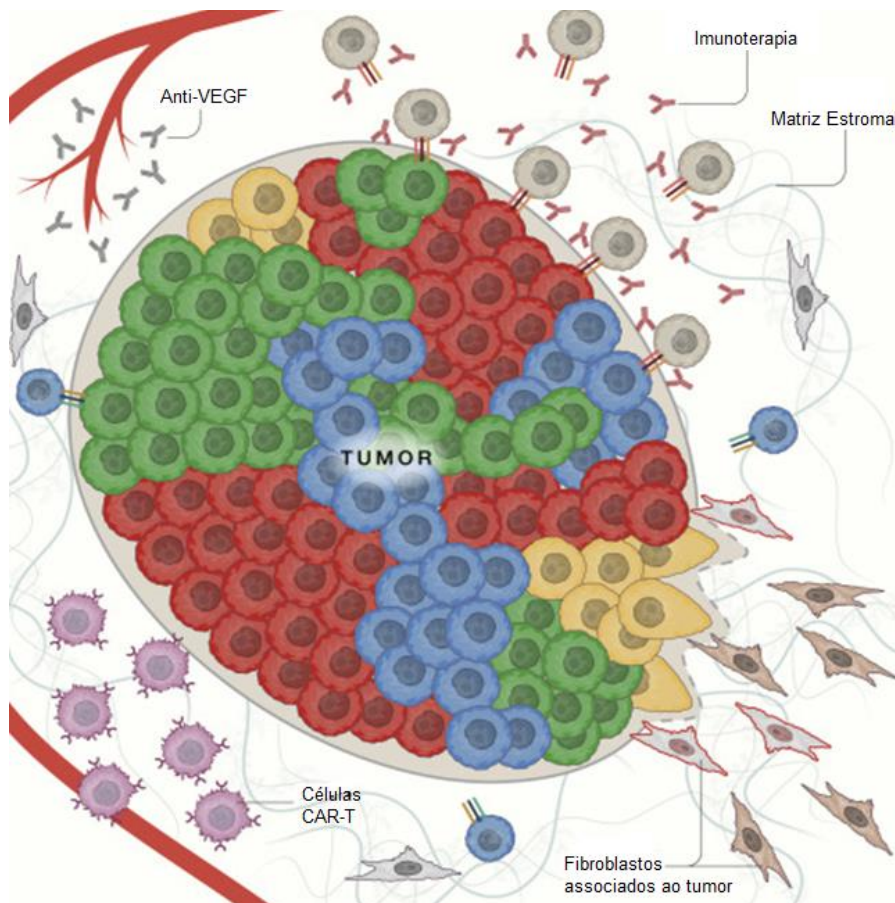


A primeira evidência de transformação maligna por Rho foi fornecida por experimentos onde a via Rac1 ativada constitutivamente, e em menor extensão RhoA, induziu transformação maligna em fibroblastos e tumorigenicidade em camundongos atímicos (KHOSRAVI-FAR et al., 1995; QIU et al., 1995). Em consonância com essa ideia, Rac1 está implicada na transição epitelial-mesenquimal e na transição mesenquimal-epitelial, ou seja, na plasticidade celular (SAHAI, MARSHALL, 2003; LV et al., 2013). Alterações nas vias Rho GTPases podem ser encontradas em muitos tipos de câncer, entre eles o de pâncreas, mama, próstata, cólon, fígado, pulmão, estômago, entre outros (CARDAMA et al., 2017).

A perda de função de genes supressores de tumor ocorre comumente no câncer. Por exemplo, mutações de perda de função na ubiquitina ligase *CBL* resultam no aumento da sinalização de tirosina quinases. Da mesma forma, as mutações no *PTEN*, que inativam a atividade da fosfatase, aumentam a sinalização da PI3K (HAHN et al., 2021). Além do mais, já foi extensivamente relatado na literatura mutação/desregulação associadas ao supressor p53 no câncer (MULLER, VOUSDEN, 2013; HUANG, 2021; XU et al., 2021, DUFFY et al., 2020).

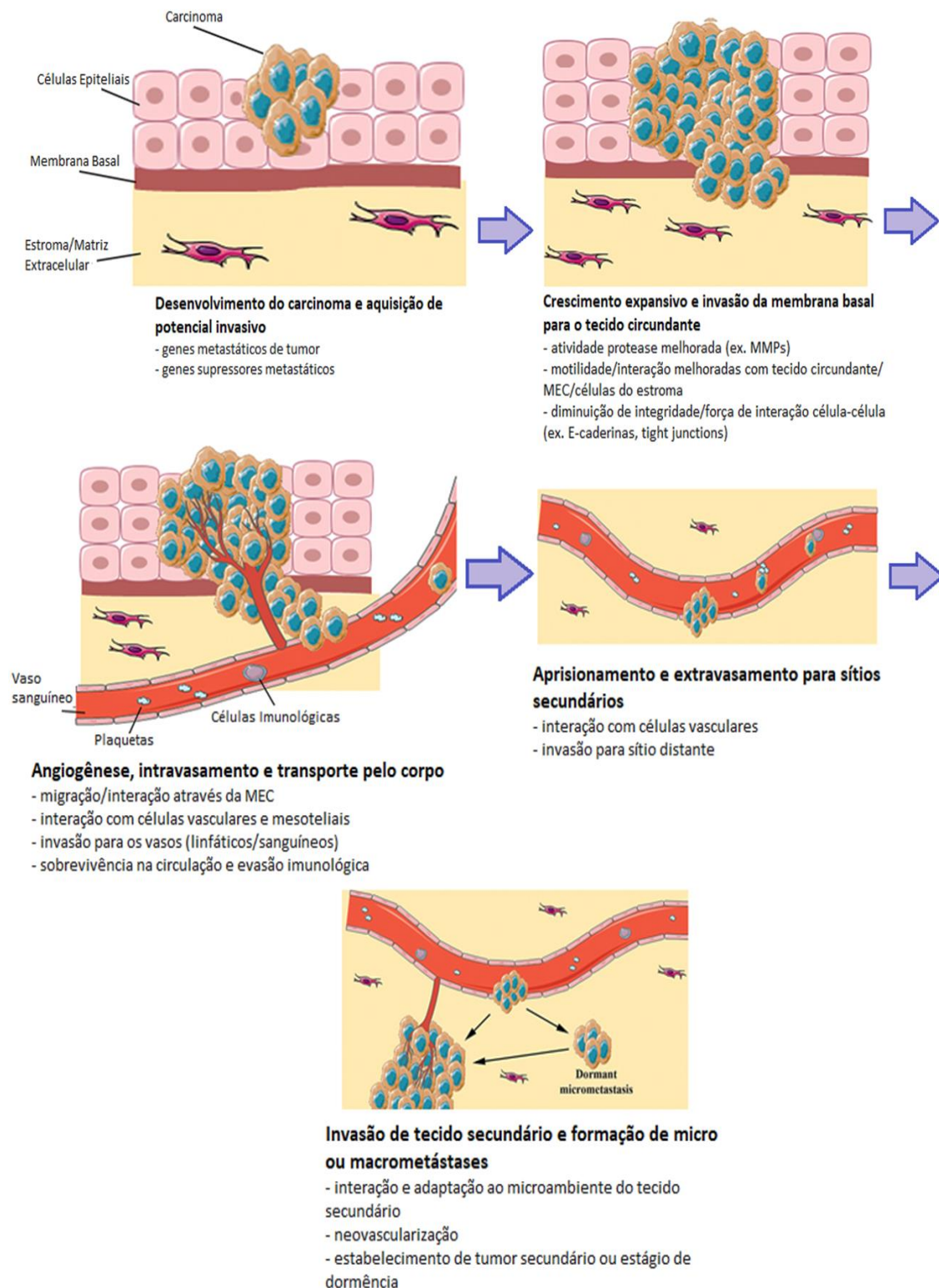
Além das alterações citadas acima, o microambiente tumoral (TME) é um meio rico no qual diversos tipos de células não neoplásicas (células imunes, fibroblastos) e proteínas da matriz extracelular interagem sendo essenciais na regulação das células cancerosas. Compreensões mecanísticas sobre essas trocas moleculares dinâmicas permitem estratégias terapêuticas direcionadas aos aspectos do TME (Figura 3) (HAHN et al., 2021). Estudos demonstraram a existência de múltiplas populações de células cancerosas (ou clones) compartilhando características moleculares comuns, prova de um ancestral comum, mas também abrigando alterações distintas adquiridas durante a progressão do tumor (CIRIELLO, MAGNANI, 2021).

Figura 3. Microambiente tumoral. Os tumores são compostos de uma mistura complexa de células cancerosas em estados celulares geneticamente e fenotipicamente distintos, rodeados por matriz extracelular, estroma fibroblástico e células imunes. As terapias atuais têm como alvo o VEGF para inibir a angiogênese, imunoterapia baseada em anticorpos, interromper as vias de sinalização de sobrevivência mediadas por fibroblastos associados ao câncer e fornecer células imunes projetadas (CAR-T) para eliminar as células cancerosas. Fonte: Adaptado de HAHN et al., 2021.



A invasividade é uma característica primordial das células cancerosas, onde ocorre o desprendimento da célula no tecido com posterior penetração na corrente sanguínea ou vasos linfáticos formando tumores secundários (metástases) em sítios mais distantes do organismo, como pode ser visto no esquema da Figura 4 (THOMPSON E THOMPSON, 2002; JIANG et al., 2015). A regulação negativa da molécula de junção aderente E-caderina, por exemplo, leva à perda de adesão celular e, juntamente com a expressão de marcadores mesenquimais (como vimentina e N-caderina) estão associados a um potencial migratório aumentado, mecanismo frequentemente adotado por células cancerosas para aumentar seu potencial invasivo e metastático (THIERY, 2002).

Figura 4. Cascata metastática. Mudanças nas propriedades celulares são necessárias para permitir o desenvolvimento de um fenótipo invasivo e a progressão tumoral. Fonte: Adaptado de JIANG et al., 2015.



Recente estimativa mundial (2020) aponta que ocorreram no mundo cerca de 19,3 milhões de novos casos de câncer (18,1 milhões excluindo câncer de pele não melanoma) e quase 10 milhões de óbitos. Em relação aos dados anteriores de 2018, pela primeira vez, o câncer de mama feminino ultrapassou o câncer de pulmão como o câncer mais

diagnosticado, com estimados 2,3 milhões de novos casos (11,7%), seguidos por câncer de pulmão (11,4%), colorretal (10,0%), próstata (7,3%) e estômago (5,6%). O câncer de pulmão permaneceu a principal causa de morte por câncer, com uma estimativa de 1,8 milhões de mortes (18%), seguido por câncer colorretal (9,4%), fígado (8,3%), estômago (7,7%) e câncer de mama feminino (6,9%) (SUNG et al., 2021). Enquanto nos países desenvolvidos há predominância de tipos de câncer associados à urbanização e ao desenvolvimento (pulmão, próstata, mama, cólon e reto), nos países subdesenvolvidos ainda é alta a ocorrência de câncer associado a infecções (colo de útero, estômago, esôfago e fígado) (FERLAY et al., 2015). No Brasil, segundo a projeção do Instituto Nacional do Câncer, serão diagnosticados 625 mil novos casos de câncer segundo a estimativa para o triênio de 2020-2022 (INCA, 2020).

1.2 Câncer de mama

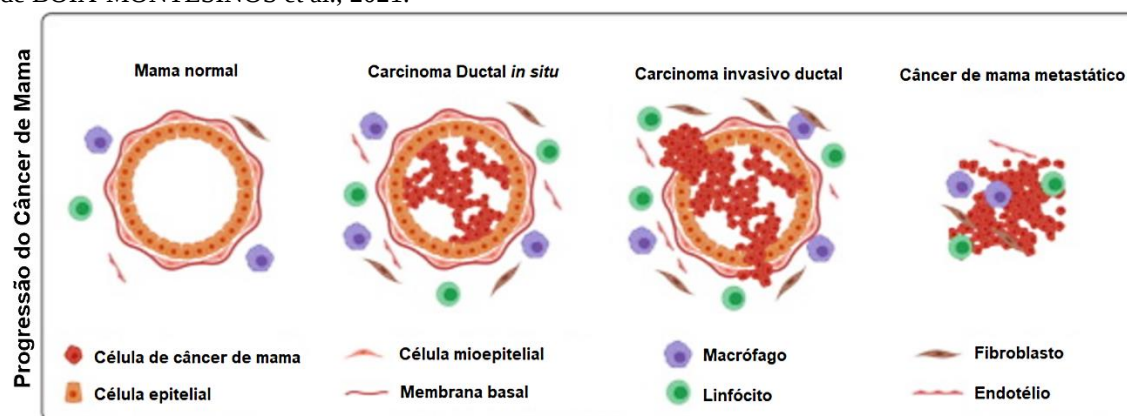
O câncer de mama é o tipo mais frequente e a principal causa de morte por câncer entre as mulheres no mundo e no Brasil, no qual há uma prevalência aproximada de 29,7% de novos casos anuais. Estima-se para cada ano do triênio 2020-2022 a ocorrência de 66.280 novos casos, com um risco estimado de 61,61 casos/100 mil mulheres (Figura 5) (INCA, 2020). Em 2017, ocorreram no país 16.724 óbitos por câncer de mama, sendo ainda um problema grave de saúde pública (INCA, 2020), e sua detecção precoce oferece um tratamento menos severo e mais efetivo (cirurgias menores, menos radiações ou quimioterapia), portanto, uma melhor sobrevida. Atualmente, a mamografia é considerada o padrão-ouro para a detecção de câncer de mama, no entanto, a sensibilidade deste teste está entre 54% e 77% dependendo do tipo de procedimento (PORTO-MASCARENHAS et al., 2017).

Figura 5. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020 por sexo.
Fonte: INCA, 2020.

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	65.840	29,2%		Homens	Mama feminina	66.280	29,7%
Cólon e reto	20.520	9,1%			Cólon e reto	20.470	9,2%
Traqueia, brônquio e pulmão	17.760	7,9%			Colo do útero	16.590	7,4%
Estômago	13.360	5,9%			Traqueia, brônquio e pulmão	12.440	5,6%
Cavidade oral	11.180	5,0%			Glândula tireoide	11.950	5,4%
Esôfago	8.690	3,9%			Estômago	7.870	3,5%
Bexiga	7.590	3,4%			Ovário	6.650	3,0%
Linfoma não Hodgkin	6.580	2,9%			Corpo do útero	6.540	2,9%
Laringe	6.470	2,9%			Linfoma não Hodgkin	5.450	2,4%
Leucemias	5.920	2,6%			Sistema nervoso central	5.220	2,3%

O câncer de mama ocorre quando um tumor maligno se desenvolve no tecido mamário, principalmente nos lóbulos e ductos, sendo o tipo histológico mais comum o carcinoma de células epiteliais, que se divide em lesões *in situ* e invasoras (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019; BRAY et al. 2018; FERLAY et al., 2015; STEWART, WILD, 2014). É caracterizado pela proliferação de células epiteliais inicialmente com uma camada de células mioepiteliais completas e membrana basal (carcinoma *in situ*), que progride após o rompimento da camada de células mioepiteliais, degradação da membrana basal e invasão para tecidos adjacentes, tornando-se metastático quando, após a passagem pelo sangue ou sistema linfático, atinge outros órgãos alvos como ossos, fígado, pulmões e cérebro (Figura 6) (BOIX-MONTESINOS et al., 2021) .

Figura 6. Progressão do câncer de mama do tumor primário para o estágio metastático. Fonte: Adaptado de BOIX-MONTESINOS et al., 2021.



As células normais da mama podem se tornar tumorigênicas devido a mutações de ganho de função em oncogenes como *PI3KCA* (fosfatidil inositol 3-quinase) e *HER2* (Receptor 2 de fator de crescimento epidermal humano), ou mutações de perda de função em genes supressores de tumor, como *BRCA1* (proteína de susceptibilidade ao câncer de mama tipo 1), *BRCA2* (proteína de suscetibilidade ao câncer de mama tipo 2), *ERS1* (gene receptor de estrogênio), *ATM* (mutação de ataxia-telangiectasia), *TP53* (proteína tumoral p53), *PALB2* (localizador de BRCA2), *CHEK2* (Checkpoint quinase 2), *PTEN* (fosfatase e homólogo de tensina), *STK11* (serina/ treonina quinase 11) ou *NF1* (neurofibromina 1) (HARBECK et al., 2019; SUN et al., 2017).

A causa exata desta doença ainda não está totalmente elucidada e como observada é multifatorial. Entretanto, os fatores de risco associados ao seu desenvolvimento incluem aumento da idade (mulheres acima de 50 anos), fatores hereditários (câncer de ovário na família), sedentarismo e obesidade, consumo de álcool, tabagismo, exposição ao

estrogênio, fatores genéticos como mutação em genes de susceptibilidade (*BRCA1* e *BRCA2*), menopausa tardia (após os 55 anos), nuliparidade, gravidez tardia, uso de contraceptivos orais, exposição à radiação ionizante, entre outros (INCA, 2020; KAST, RHIEM, 2015; FERLAY et al., 2015; GEETIKA et al., 2017). *BRCA1* e *BRCA2* são importantes genes supressores de tumores localizados nos cromossomos 17 e 13, respectivamente, herdados de forma autossômica dominante e altamente penetrantes, causando uma maior incidência de câncer nas famílias afetadas. Possuir a mutação *BRCA* traz risco estimado de 40% a 85% para desenvolver câncer de mama, bem como câncer de ovário e outros tipos de câncer primário (LEE et al., 2017).

Em mulheres de risco normal a moderado, intervenções protetoras incluem a manutenção de peso e índice de massa corporal, exercício regular e dieta com baixo teor de gordura. Em mulheres de alto risco, intervenções farmacológicas bloqueadoras de estrogênio podem reduzir o risco de desenvolvimento subsequente do câncer de mama. Já mulheres com risco extremamente elevado, tais como aquelas com mutações nos genes *BRCA1* ou *BRCA2*, mastectomia profilática pode ser considerada (GEETIKA et al., 2017). Por ser uma doença de etiologia multifatorial, quanto maior a exposição aos fatores de risco e mais tardio o diagnóstico, pior o prognóstico da paciente (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2017). Sendo assim, uma característica comum diretamente relacionada à mortalidade por câncer de mama é o desenvolvimento de metástases, no qual os sítios acometidos frequentemente são os pulmões, fígado, ossos, cérebro e linfonodos (INCA, 2020).

1.2.1 Classificação e Caracterização

O câncer de mama é considerado como altamente heterogêneo abrangendo perfis fenotípicos e morfológicos distintos e, portanto, com comportamentos clínicos diferentes (TANG et al., 2016). De forma simplificada, a doença pode ser dividida em quatro subtipos principais de acordo com suas características moleculares. O primeiro subtipo é Luminal A, o segundo é o Luminal B, o terceiro HER-2 Positivo (Enriquecido) e o quarto é o Triplo Negativo (TN ou TNBC) (NASCIMENTO, OTONI, 2020; BOIX-MONTESINOS et al., 2021). O modelo esquemático aborda algumas características destes subtipos e são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1. Classificação dos subtipos moleculares do câncer de mama e terapias. Fonte: Adaptado de NASCIMENTO, OTONI, 2020.

Subtipos Moleculares	Luminal A	Luminal B		HER2+	TN
Biomarcadores	ER+ PR+ HER2- Ki67 baixo	(HER2-)	(HER2+)	ER- PR- HER2+ Ki67 alto	ER- PR- HER2- Ki67 alto
		ER+ PR- HER2- Ki67 alto	ER+ PR-/++ HER2+ Ki67 baixo/alto		
Frequência de Casos (%)	40-50	20-30		15-20	10-20
Grau Histológico	Bem diferenciado (Grau I)	Diferenciação moderada (Grau II)		Pouco diferenciado (Grau III)	Pouco diferenciado (Grau IV)
Prognóstico	Bom	Intermediário		Ruim	Ruim
Resposta a Terapias	Endócrina	Endócrina Quimioterapia	Endócrina Quimioterapia Terapia Direcionada	Terapia Direcionada Quimioterapia	Quimioterapia Inibidores PARP

ER: receptor de estrogênio; PR: receptor de progesterona; HER2: receptor do fator de crescimento epidermal humano 2.

O subtipo **Luminal A** é o mais comum, definido por alta expressão de ER e PR e baixa expressão de HER2 e Ki67. São considerados de baixo grau devido ao seu crescimento lento e prognóstico favorável de resposta intensificada à terapia. O subtipo **Luminal B** é definido pela expressão ER e PR e pela expressão elevada de Ki67 e pode ser HER2+ ou HER2- e possuem um prognóstico menos favorável do que o primeiro subtipo devido ao crescimento mais acelerado do tumor. O subtipo **HER2+** é caracterizado principalmente por alta expressão de HER2 e ausência de expressão de ER e PR. Os cânceres de mama enriquecidos com HER2 exibem um crescimento tumoral mais rápido, desenvolvimento mais agressivo e sofrem de um pior prognóstico em comparação com os subtipos A e B Luminal. O subtipo **TN** ou **TNBC** representa cerca de 10–15% de todos os casos de câncer de mama e está frequentemente presente em mulheres jovens (<40 anos de idade) com mutações no gene *BRCA1*. São caracterizados pela ausência de expressão de ER, PR e HER2 e altos índices mitóticos Ki67, possuem comportamento proliferativo mais agressivo, com o pior prognóstico de todos os subtipos. Também exibem infiltração inflamatória linfoplasmocitária com metástases viscerais e, notavelmente, a falta de expressão do receptor hormonal, limita a eficácia dos regimes quimioterápicos convencionais, dificultando o desenvolvimento de terapêuticas anticâncer eficazes para esse tipo de câncer (BOIX-MONTESINOS et al., 2021).

1.2.2 Diagnóstico e Tratamento

A detecção precoce do CM pode ajudar a aumentar a taxa de sobrevida, pois no estágio inicial, o câncer pode responder efetivamente ao tratamento e fornecer informações úteis sobre o desenvolvimento da doença (ou seja, prognóstico). Nesse sentido, vários métodos podem ser usados para diagnosticar a doença, incluindo biópsia mamária, ultrassonografia, mamografia, tomografia e citologia aspirativa por agulha fina. Até agora, a mamografia foi considerada a técnica mais usada e confiável, no entanto, médicos podem precisar de uma biópsia adicional antes de tomada de decisão. Além disso, a taxa de detecção está em um nível considerado baixo (entre 60-70%) (HOSNI et al., 2019).

O sistema de estadiamento mais utilizado é o preconizado pela União Internacional para o Controle do Câncer (UICC), denominado Sistema de Classificação TNM, no qual o estágio da doença é determinado pelo tamanho do tumor (T), a extensão do envolvimento do linfonodo regional (N) e a presença ou ausência de metástases à distância (M). Estes parâmetros recebem graduações, geralmente de T0 a T4, de N0 a N3 e de M0 a M1, respectivamente. Quando as categorias T, N e M são agrupadas em combinações pré-estabelecidas, ficam distribuídas em estágios que, geralmente, variam de I a IV (INCA, 2019). O tamanho do tumor e o status do linfonodo permanecem os fatores de risco mais significativos para a recorrência do câncer de mama e sobrevida global (ROBISON, PERREARD, BERNARD, 2004).

Tratamentos convencionais incluem principalmente cirurgia, quimioterapia, radioterapia e imunoterapia. A ressecção cirúrgica de tumores em muitas ocasiões leva à alta taxa de recorrência, e a quimioterapia e radioterapia estão associadas a efeitos colaterais sistêmicos em tecidos normais, sendo esta última limitada pela dose cumulativa de radiação nas células cancerosas (RUI et al., 2016). A radioterapia, ademais, induz lesões ateroscleróticas e toxicidade coronariana devido às radiações de baixa dose, através da instabilidade genômica (KAMMERER et al., 2018). A terapia sistêmica de primeira linha para o câncer de mama metastático em indivíduos com tumores negativos para receptor de estrogênio é a quimioterapia com antraciclinas (doxorrubicina ou epirrubicina) associadas a taxanos, quando há metástase para sítios críticos ou quando o intervalo desde o tratamento prévio até a doença em estágio inicial é curto. Além desta, há ainda a terapia hormonal para os indivíduos com receptor de estrogênio positivo. No entanto, a quimioterapia tradicional, que interfere na divisão celular, é frequentemente

associada a efeitos adversos sistêmicos como mielossupressão, mucosite, alopecia, entre outros (GEETIKA et al., 2017). O tratamento para o câncer de mama metastático visa primordialmente o manejo dos sintomas e o aumento de sobrevida com qualidade de vida, sendo que a ressecção cirúrgica pode ser considerada paliativa quando possível, e, geralmente, a cura é pouco provável com os regimes terapêuticos disponíveis atualmente (GROBMYER et al., 2012).

O TNBC é o mais agressivo entre os CM, é facilmente metastático, tem uma taxa de recorrência de três anos e a mortalidade em cinco anos mais alta após o tratamento. Por falta de receptores ER, PR e HER-2, o tratamento usado para outros cânceres de mama não é eficaz no TNBC. A heterogeneidade do TNBC em nível molecular, patologia e características clínicas, também ocasiona níveis diferentes de sensibilidade às drogas quimioterápicas. Recentemente, os principais métodos de tratamento do TNBC são a ressecção tumoral e a quimioterapia. Devido à sua heterogeneidade molecular, má diferenciação celular, alta malignidade, falta de alvos moleculares, metástase rápida e sensibilidade à quimioterapia, não há terapia direcionada para prevenir a recorrência de TNBC, sendo, até o momento atual, muito difícil de tratar (CHANG-QING et al., 2020).

Atualmente, um dos testes de assinatura multigênica validados e amplamente usados é o *Oncotype DX*, aplicado para prever o resultado do câncer de mama. Este teste avalia a expressão de 21 genes em nível de mRNA, usando RT-PCR. Por fim, é calculado o escore de recorrência de acordo com a expressão relativa dos genes avaliados. De acordo com o resultado, os pacientes são divididos em 3 categorias, escores maiores que 30 são considerados de alto risco, escores entre 18 e 30 possuem risco intermediário e escores menores que 18 são considerados de baixo risco. O *Oncotype DX* tem dois objetivos principais em pacientes com câncer de mama, o primeiro é prever a possibilidade de recorrência da doença e o segundo objetivo é encontrar pacientes que provavelmente estão se beneficiando da quimioterapia (BARZAMAN et al., 2020). Outros testes multigênicos utilizados atualmente para categorizar os pacientes, avaliar grau de recorrência e prever benefícios da quimioterapia adjuvante são o *Mammaprint* e o *Prosigna PAM50*, este último atuando também como um classificador para subtipos de câncer de mama (NASCIMENTO, OTONI, 2020).

Trabalhos pioneiros dos anos 2000 (PEROU et al., 2000; SORLIE et al., 2001, SORLIE et al., 2003) permitiram a classificação molecular do CM em subtipos distintos, com base em semelhanças no perfil de expressão gênica usando a técnica de *microarrays* de cDNA. A subtipagem molecular mudou a visão sobre o câncer de mama, com a

possibilidade de estratificar esta neoplasia em distintas entidades que requerem tratamentos específicos e diferentes estratégias de monitoramento, além de um melhor entendimento do padrão fisiopatológico e prognóstico clínico (NASCIMENTO, OTONI, 2020).

Portanto, o desenvolvimento e o uso disseminado de tecnologias de genômica, epigenômica, transcriptômica e proteômica fornecem novos *insights* sobre a complexidade molecular desta doença. Embora seja importante refinar as modalidades convencionais de terapia do câncer, muito esforço tem sido colocado na investigação de modalidades terapêuticas alternativas seguras, eficazes, economicamente acessíveis e aceitáveis para as pacientes.

1.3 Terapia Fotodinâmica

A história da Terapia Fotodinâmica (TFD) remonta os anos de 1900 quando Oscar Raab demonstrou que o corante acridina na presença de luz visível gerava toxicidade e destruía microrganismos como o protozoário *Paramecium*, a esse evento denominou ‘Terapia Fotodinâmica’ (DANIELL, HILL, 1991; KATO, 1996; KESSEL, 2006). A partir disso, tem sido explorada e aplicada na área das ciências médicas para o tratamento de diversas patologias, inclusive o câncer (DOUGHERTY et al., 1978; DOUGHERTY, 1989).

Em 1978, Dougherty e cols. realizaram o primeiro estudo clínico envolvendo diversos tipos de carcinomas e aplicação da TFD em humanos, incluindo pacientes com câncer de mama, cólon, próstata, melanoma, condrossarcoma, angiossarcoma, células endometriais, basais e escamosas, que mostravam resistência a tratamentos convencionais da época. Foi utilizado um fotossensibilizador derivado da hematoporfirina por via endovenosa com posterior irradiação local do tumor, obtendo uma resposta satisfatória em 87% das lesões, mostrando pela primeira vez a possibilidade de tratamento com TFD em tumores resistentes a outras terapias (DOUGHERTY et al., 1978).

A TFD é uma modalidade de tratamento não invasiva empregada no manejo de condições benignas e malignas, e centra-se na interação fotoquímica de três componentes principais: oxigênio, fotossensibilizador e luz (BRODIN et al., 2015). Esta modalidade de tratamento usa luz em um comprimento de onda apropriado na presença de oxigênio para ativar uma droga fotossensibilizadora, que então causa morte celular tumoral

(CHUDY et al., 2018). A concentração, propriedade físico-química, localização intracelular do fotossensibilizador (PS), a concentração de oxigênio molecular, o comprimento de onda e intensidade apropriada de luz, o tipo celular e o microambiente dos tecidos podem influenciar o modo e a extensão da morte celular (ETCHEVERRY et al., 2018). Uma das propriedades únicas da TFD é a capacidade dos fotossensibilizadores de se acumularem seletivamente em células tumorais com o dano tecidual limitado apenas à área de tecido exposta à luz (MORAES et al., 2015). Este acúmulo aumentado em células/tecidos tumorais foi atribuído ao baixo pH, aumento da permeabilidade vascular, drenagem linfática pobre, arquitetura estromal distorcida e alta expressão de receptores LDL em células tumorais, entre outros (SHERIEN et al., 2017).

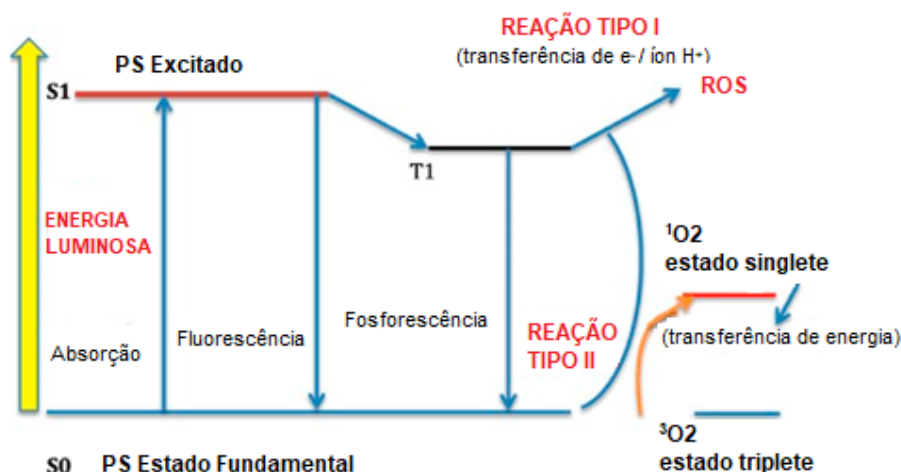
As glândulas mamárias são órgãos tubulares de ramificações relativamente simples com tipicamente uma a duas camadas de células epiteliais, perfazem um órgão dinâmico que está constantemente respondendo ao ambiente hormonal e alterações epigenéticas, sendo que o terminal de ramificação dos ductos da glândula mamária é suportado por tecido fibrovascular abundante misturado com tecido adiposo (RUSSO et al., 1990; CARDIFF et al., 2018). Portanto, por se tratar um tecido glandular vascularizado, acredita-se não haver limitações na aplicação da Terapia Fotodinâmica, técnica de caráter oxidativo.

1.3.1 Mecanismos relacionados à Terapia Fotodinâmica

Resumidamente, o fotossensibilizador (PS) no estado fundamental (S_0) absorve um fóton e é ativado para um estado singleto excitado (S_1) após irradiação com luz adequada. O estado singleto excitado pode converter-se no estado tripleto (T_1) através de cruzamento intersistema causado por uma mudança na rotação de elétrons. O fotossensibilizador no estado tripleto interage com moléculas circundantes e, portanto, produz espécies reativas de oxigênio (ROS) através de reações tipo I e tipo II (Figura 7). A primeira envolve a transferência de um átomo de hidrogênio ou um elétron entre o fotossensibilizador excitado e um substrato, levando à geração de radicais livres (íons superóxido e radicais hidroxila). A reação de tipo II envolve a transferência de energia entre o PS excitado e o oxigênio molecular no estado fundamental (3O_2), resultando na formação de um estado altamente reativo conhecido como oxigênio singleto (1O_2), podendo causar danos irreversíveis nos tecidos/células alvo (HONG et al., 2016; BANERJEE et al., 2017).

Vale ressaltar que ambas as reações podem ocorrer simultaneamente e a relação entre esses processos é afetada pela natureza do fotossensibilizador, bem como pelas concentrações de $^3\text{O}_2$ e outros substratos. No entanto, a maioria dos estudos experimentais indica que a produção fotoativada de $^1\text{O}_2$ (reação de tipo II) desempenha um papel dominante na TFD *in vivo* (ZHANG et al., 2017; BANERJEE et al., 2017).

Figura 7. Reações fotoquímicas resultantes da terapia fotodinâmica (diagrama de Jablonski). Fonte: Adaptado de BANERJEE et al., 2017.



Em um meio biológico, as espécies reativas geradas pelo processo fotodinâmico podem reagir com um grande número de biomoléculas e o dano a elas pode: (a) danificar irreversivelmente as células tumorais resultando em necrose, apoptose e/ou autofagia; (b) causar isquemia tumoral após lesão vascular induzida por TFD e (c) ativar a resposta imune contra antígenos tumorais (LONGO et al., 2016).

As espécies reativas de oxigênio, tais como $^1\text{O}_2$, radicais hidroxila e ânions superóxido, resultam em dano celular oxidativo e podem promover a apoptose ou a necrose, dependendo da intensidade da luz fornecida (BRODIN et al., 2015). A necrose é o modo mais frequente de morte celular quando utilizadas altas doses de TFD e é morfológicamente caracterizada por inchaço celular e perda rápida da integridade da membrana plasmática. Já a apoptose é desencadeada por doses leves ou baixas de luz e fotossensibilizador, sendo caracterizada pela redução do volume celular, condensação de cromatina, fragmentação nuclear e formação de corpos apoptóticos engolfados por fagócitos vizinhos. O papel da autofagia na morte celular por TFD é mais controverso, no entanto, considera-se que também pode ser promovida através da digestão de componentes celulares essenciais (AGOSTINIS et al., 2011; LÓPEZ-MARÍN et al., 2018).

O dano fotooxidativo ocorre em moléculas-chave associadas à função da membrana celular, incluindo resíduos de aminoácidos e colesterol, bem como estruturas intracelulares tais como ácidos nucleicos que controlam a atividade celular normal e o estado relativo da célula dentro do ciclo celular (BANERJEE et al., 2017). O tipo de morte celular depende em grande parte da localização do fotossensibilizador, no qual a apoptose (morte celular programada) é mediada no caso do fotossensibilizador localizado na mitocôndria, enquanto sua localização no lisossomo resulta em necrose ou apoptose (KUBIAK et al., 2016). De acordo com Wachowska et al. (2015) os radicais livres e o estresse oxidativo que aparecem durante a TFD levam à transdução de sinal intracelular responsável pela produção de proteínas induzidas pelo estresse, ativação de genes que regulam a apoptose e a expressão de genes de citocinas. Os danos fotooxidativos aparentes das membranas celulares levam a liberação de metabólitos de ácido araquidônico que são potentes mediadores inflamatórios.

A liberação extracelular de proteínas intracelulares, conhecidas como padrões moleculares associados ao dano (DAMPs), normalmente ocorre 1-4 h após a TFD, e alguns já foram identificados, como as proteínas de choque térmico (HSPs) e a calreticulina. Estes potencializam a ativação do sistema imunológico, a migração para o local do dano celular e a fagocitose de células danificadas que conduz uma resposta inflamatória aguda mediada por neutrófilos, macrófagos e outros componentes celulares, que migram para o local do tumor tratado (AGOSTINIS et al., 2011; BANERJEE et al., 2017). Além disso, a combinação de TFD com outros fármacos quimioterápicos pode ajudar a alcançar um controle do tumor em longo prazo, devido aos seus possíveis efeitos sinérgicos resultantes da combinação de respostas da TFD e os mecanismos das drogas quimioterápicas (ZHANG et al., 2016). Portanto, tal seletividade contribui para TFD gerar um impacto mínimo em tecidos normais, enquanto isso ainda é um grande desafio na quimioterapia e radioterapia (RUI et al., 2016).

Claramente em comparação com as terapias tradicionais contra o câncer, a TFD possui vantagens significativas, incluindo a natureza não invasiva, a repetibilidade sem toxicidade cumulativa, mínimos efeitos colaterais e a melhoria da qualidade de vida das pacientes, além da capacidade de limitar os efeitos tóxicos aos tecidos biológicos expostos ao PS e à luz, protegendo assim os tecidos normais (ZHANG et al. 2017). Ao longo das últimas décadas, a TFD foi aplicada de forma eficaz em uma variedade de cânceres, incluindo cabeça e pescoço, pulmão e pele, além do tratamento de doenças cardiovasculares, dermatológicas, oftálmicas e infecciosas (RUI et al., 2016). Novas

evidências ainda sugerem que a TFD tem potencial para induzir imunidade contra recorrência e destruição de metástases distantes dos locais tratados, proporcionando vantagens adicionais em relação aos tratamentos existentes (BANERJEE et al., 2017).

1.3.2 Fotossensibilizadores

Na ausência de luz foto-ativadora externa, as drogas fotossensibilizadoras (PS) são minimamente tóxicas. A TFD fornece uma maneira segura e eficaz de erradicar seletivamente células/tecidos alvo, como células cancerosas, evitando a toxicidade sistêmica e os efeitos colaterais em tecidos saudáveis (BRODIN et al., 2015). Apesar das muitas características positivas da TFD na terapia do câncer, a mesma ainda não está totalmente adaptada nas configurações clínicas devido a algumas propriedades inerentes aos fármacos PS, pois a maioria deles é hidrofóbica, portanto, se agregam facilmente em condições fisiológicas, diminuindo drasticamente a produção de ROS (HONG et al., 2016). Os nanomateriais podem melhorar significativamente a solubilidade de fármacos fotossensibilizadores em água através de propriedades hidrófilas e assim aumentar sua absorção celular. Quando formulados com nanopartículas, PS podem ter acesso ao tumor pelo efeito de permeabilidade e retenção, atribuído à vasculatura tumoral e drenagem linfática prejudicada nos tecidos tumorais (MAEDA et al., 2000; BRANNON-PEPPAS, BLANCHETTE, 2012; NÚÑEZ et al., 2016).

As características estruturais dos compostos têm um papel significativo na sua adequação para atuar como um fotossensibilizador, nas quais estruturas tetrapirrólicas aromáticas são particularmente adequadas. Um fármaco PS ideal possui alto coeficiente de absorção na região de 650-850 nm (próximo à janela terapêutica), alto rendimento de $^1\text{O}_2$, solubilidade em condições fisiológicas, dose eficaz baixa, baixa toxicidade escura, grande seletividade tumoral e menor efeito colateral (não mutagênico, carcinogênico e alergênico) (BANERJEE et al., 2017).

As principais classes de drogas fotossensibilizadoras são porfirinas e não-porfirinas. A hematoporfirina (Hp) isolada da hemoglobina está entre as de primeira geração e possui várias limitações, como acúmulo prolongado em tecidos e toxicidade. Devido a estas desvantagens, foram desenvolvidos outros PS de segunda geração com menor toxicidade e curto acúmulo em tecidos. No entanto, a hidrofobicidade e pouca seletividade das drogas PS de segunda geração são limitações na TFD (BRODIN et al., 2015). Medicamentos PS de segunda geração clinicamente aceitos para TFD são ácido

aminolevulínico, porfíricos e ftalocianinas, sendo a última muito promissora devido à sua forte absorção no infravermelho, permitindo melhor penetração no tecido. Nos fotossensibilizadores de terceira geração, que incluem PS conhecidos ligados quimicamente a conjugados biológicos ou incorporados fisicamente em nanotransportadores multifuncionais, a entrega é direcionada usando moléculas transportadoras (anticorpos, nanopartículas, lipossomos) e é útil para reduzir o acúmulo em tecidos saudáveis (CHENG et al., 2014; HONG et al., 2016).

As ftalocianinas são moléculas macrocíclicas semelhantes às porfirinas e sua vantagem é a alta produção de ROS, porém, uma desvantagem significativa destas substâncias é baixa solubilidade em vários solventes, mesmo em produtos orgânicos. De acordo com a literatura disponível, as ftalocianinas exibem tendência à alta agregação, formando espécies diméricas e oligoméricas em solução. Por este motivo, cada vez mais atenção é dada às metaloftalocianinas, como a ftalocianina de cloro-alumínio (ONISZCZUK et al., 2016). Muitos fatores influenciam a eficiência do tratamento de tumores, incluindo a química do PS usado, intensidade de luz e comprimento de onda, além da concentração de oxigênio. Portanto, é necessária muita atenção para resolver os problemas do fotossensibilizador ou modificá-lo para superar as dificuldades que podem ser o obstáculo potencial para a aplicação clínica da TFD (RUI et al., 2016).

1.4 Nanotecnologia aplicada na terapia do câncer

A nanotecnologia surgiu como uma ferramenta promissora para a entrega de vários fármacos para diagnóstico, imagem e tratamento do câncer, no qual nanoformulações variando entre 10 nm - 100 nm são consideradas sistemas de entrega potenciais para fins terapêuticos e diagnósticos (ZAFAR et al., 2021).

O alto potencial antitumoral da nanotecnologia foi evidenciado em 1995, quando o FDA aprovou o Doxil[®], uma das primeiras tentativas clínicas bem-sucedidas de equilibrar alta eficácia e menor toxicidade, fornecendo aos pacientes doses mais altas do medicamento doxorrubicina, ao mesmo tempo minimizando os efeitos cardiotóxicos dose-dependentes (KLOCHKOV et al., 2021). As principais vantagens das nanopreparações são a capacidade de direcionamento com precisão ao tumor, liberação prolongada, meia-vida aumentada e menor toxicidade sistêmica, melhoria na solubilidade de drogas hidrofóbicas, aumento da estabilidade em ambientes biológicos, aumento na biocompatibilidade e farmacocinética das drogas terapêuticas (KLOCHKOV et al., 2021;

CHEN et al., 2021). O efeito de permeabilidade e retenção aprimorado do tumor permite que grandes nanopartículas (100-200 nm), por exemplo, se acumulem nos tecidos tumorais, o que garante a entrega eficiente de medicamentos às células cancerosas em tumores sólidos. No entanto, pequenas nanopartículas de 2-6 nm de tamanho são mais eficazes na penetração na célula (KLOCHKOV et al., 2021).

As nanopartículas desenhadas como sistemas de veiculação de fármacos constituídas com agentes anticarcinogênicos e antimicrobianos tem recebido ultimamente grande atenção devido ao seu comportamento único de acúmulo no local do tumor e elevada sítio-especificidade (BRANNON-PEPPAS, BLANCHETTE, 2012; JIN; YE, 2013; HÖRMANN; ZIMMER, 2016; QIN et al. 2017). Em alguns casos, combinações sinérgicas de formulações nanoparticuladas antitumorais, através de mecanismos e toxicidade distintos, podem contornar a questão da resistência ao tratamento, sendo essenciais para uma terapia eficaz contra o câncer (MIAO et al., 2017). A co-entrega de dois medicamentos pode apresentar efeito sinérgico e, portanto, oferecer benefícios em termos de conveniência, sincronização farmacocinética e entrega de doses relativas definidas de ambos os fármacos para a mesma população de células (NÚÑEZ et al., 2016). Casos clínicos e estudos *in vivo* sugerem que a quimioterapia é mais eficaz quando drogas múltiplas são administradas em combinação para obter sinergia, potencializando os benefícios terapêuticos frente ao câncer (PARHI et al., 2012; HU et al., 2016; ZHANG et al., 2016). Ademais, a TFD associada à quimioterapia mostrou ser uma poderosa estratégia de combinação na destruição de células tumorais (BRODIN et al., 2015).

Embora a terapia do câncer bem-sucedida erradique a maior parte das células tumorais em proliferação, um subconjunto de células tronco cancerosas (CSCs) restantes pode sobreviver e causar recidiva devido à sua melhor capacidade de estabelecer invasividade e quimiorresistência (PHI et al., 2018). Potenciais agentes antitumorais como a curcumina e quinacrina causaram sinergicamente a apoptose em células tronco de câncer de mama (CSCs), e o primeiro composto aumentou a absorção do segundo neste mesmo estudo (NAYAK et al., 2020). Nanoencapsulação de curcumina e piperina em partículas de zeína-quitosana mostrou que a co-administração aumentou a biodisponibilidade de curcumina e causou redução de 50% na viabilidade de células de neuroblastoma (BASPINAR et al., 2018). Também foi relatado que a superexpressão de glicoproteína P (P-gp) em células tumorais contribui para a resistência aos medicamentos por meio de bombas de efluxo dependentes de ATP, e para contornar a situação, Shi *et al.* (2021) desenvolveram uma nanopartícula derivada de sulfato de condroitina capaz de

fornecer simultaneamente quercetina (quimiossensibilizador), clorina e6 (fotossensibilizador) e paclitaxel (quimioterápico) como terapia combinada e obtiveram resultados satisfatórios, como: superação da resistência a múltiplas drogas, aumento de apoptose e inibição de metástases pulmonares no câncer de mama (SHI et al., 2021).

As terapias combinatórias, visando diferentes vias de morte celular, são consideradas para superar os limites de eficácia e para reduzir a resistência aos medicamentos, além disso, precisam atingir efeitos aditivos/sinérgicos para melhorar o potencial de sobrevivência e a qualidade de vida do paciente. Mais exemplos dessas terapias associativas incluem um estudo onde o quimioterápico doxorrubicina e ácido 5-aminolevulínico (fotossensibilizador) conjugados em nanocomplexos de ácido hialurônico tiveram efeito potencializado frente às células MCF-7 de câncer de mama (WANG et al., 2019). Nanopartículas carregadas com Dox e fotossensibilizador clorina e6 foram utilizadas para testar a sinergia entre quimioterapia e TFD no tratamento de câncer de mama receptor $\alpha\beta3+$ e HER-2 negativo. Camundongos tratados com essa terapia combinada tiveram o volume do tumor significativamente diminuído e tempo de sobrevivência prolongado. Além disso, a nanoformulação foi capaz de aumentar produção de ROS, alcançando assim excelente eficácia antitumoral e induzindo apoptose e necrose (HE et al., 2020). Akram *et al.* (2019) sintetizaram uma nanopartícula Au-TiO₂@DOX (dióxido de titânio coberta com ouro e conjugada à doxorrubicina) e avaliaram a resposta sinérgica em linhagem MCF-7 e em modelo animal de câncer de mama. No modelo *in vivo* foi observado estresse oxidativo aumentado, necrose, dano vascular, e que o tratamento combinado foi mais conveniente e eficaz do que a eficácia individual dos nanocompostos (AKRAM et al., 2019).

Pesquisa sobre TFD usando ftalocianina de zinco e doxorrubicina se mostrou eficaz como combinação sinérgica para células de melanoma humanas SK-MEL-3. Neste estudo, verificaram que o pré-tratamento com ZnPc-TFD sensibilizou as células SK-MEL-3 para concentrações muito menores de doxorrubicina; além disso, houve diminuição da viabilidade celular sinergicamente pela quimio-TFD; diminuição da migração celular e aumento na taxa de apoptose, autofagia e parada do ciclo celular na fase subG1 e G2-M (DOUSTVANDI et al., 2019). Ali *et al.* (2018) fizeram um estudo com TFD mediada por ftalocianinas em associação a dois fármacos: doxorrubicina (Dox) ou metotrexato (Mtx) em câncer cervical (HeLa), adenocarcinoma de mama (MCF-7) e tumor cerebral de rato (RG2) *in vitro*. Observaram efeitos sinérgicos das terapias e que estes efeitos aumentaram conforme a concentração de ambas as drogas, visto que a

primeira (Dox) emprega dois mecanismos de morte: (i) interações diretas com DNA e (ii) danos à membrana celular através da produção de ROS; e a segunda droga (Mtx) interfere na replicação e síntese do DNA, inibindo a via de síntese de timina (ALI et al., 2018). Em vista do exposto, tais abordagens apontam diferentes tratamentos sinérgicos como alternativas eficazes para promover o controle da evolução não só do câncer de mama bem como outros tipos de cânceres, através de distintos mecanismos de atuação, como exemplificados acima.

Existem vários tipos de nanopartículas atualmente aprovadas para aplicação clínica como sistemas de entrega de drogas, sondas de imagem ou agentes de contraste de imagem, como Patisiran/ONPATRO® (o primeiro RNAi terapêutico aprovado pela FDA), VYXEOS™ (uma nanopartícula capaz de entregar proporções sinérgicas de duas drogas) e NBTXR3/Hensify (uma nanopartícula que sinergiza com o tratamento de radiação padrão de cuidados de oncologia) (AUGUSTINE et al., 2021).

Lipossomas, nanopartículas de proteínas, nanopartículas poliméricas e imunoconjugados representam nanomedicamentos contendo quimioterápicos que foram aprovados pela FDA para o tratamento do câncer de mama. Todos possuem capacidade clinicamente demonstrada para reduzir a toxicidade e melhorar a eficácia em comparação com o medicamento original (forma livre) (BOIX-MONTESINOS et al., 2021) (Tabela 2).

Tabela 2. Nanomedicina aprovada pela FDA em uso clínico de rotina para tratamento de câncer de mama. Fonte: Adaptado de BOIX-MONTESINOS et al., 2021.

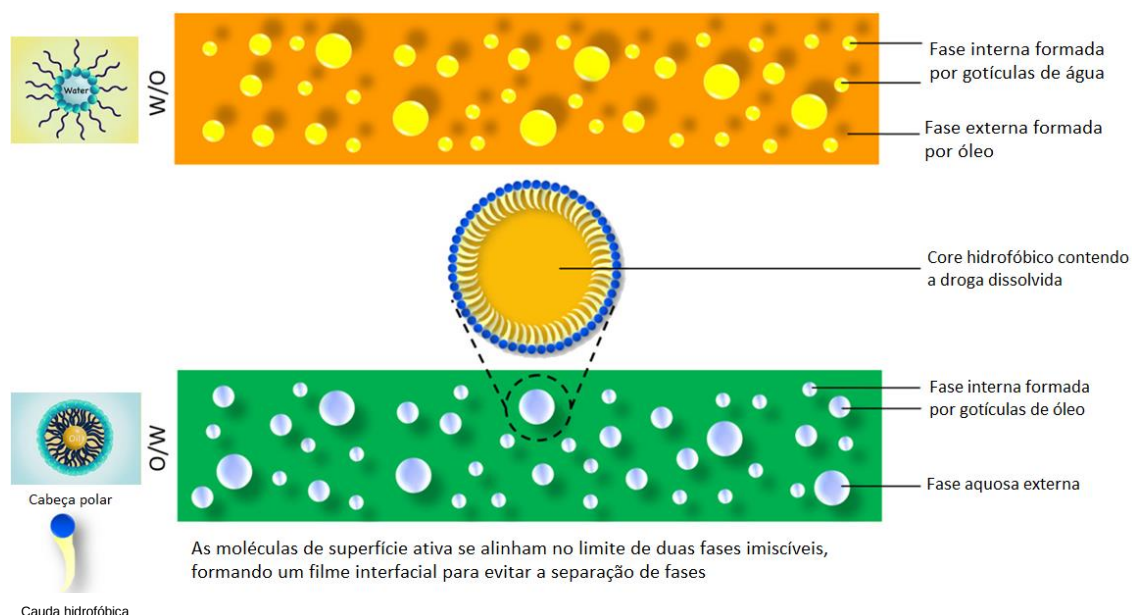
Nome/Fabricante	Nanocarreador	Droga/Composto	Data de aprovação	Indicação
Doxil® (Janssen Pharmaceutica)	Lipossoma PEGuilado	Doxorrubicina	1995	Metastático
Lipodox® (Sun Pharma Global FZE)	Lipossoma PEGuilado	Doxorrubicina	2013	Metastático
Myocet® (Sopherion Therapeutics)	Lipossoma não PEGuilado	Doxorrubicina	2000	Metastático
Lipusu® (Sike Pharmaceutical Co. Ltd)	Lipossoma	Paclitaxel	2006	Não Metastático
Abraxane® (Celgene)	Albumina	Paclitaxel	2005	Metastático
Genexol-PM® (Samyang Biopharm)	mPEG-PDLLA	Paclitaxel	2007	Não Metastático
Nanoxel® (Fresenius Kabi India Pvt Ltd)	NIPAM-VP	Paclitaxel	2006	Metastático
Kadcyla® (Hoffmann - La Roche)	Anticorpo	Trastuzumab/	2013	HER2+ e Metastático
		DM1	2019	HER2+ precoce e doença residual

1.4.1 Nanoemulsões: Drug delivery systems para ftalocianinas e doxorubicina

Até o momento, materiais versáteis foram aplicados para encapsular quimioterápicos e fotosensibilizadores: polímeros sintéticos, nanoemulsões, materiais inorgânicos, biomacromoléculas, entre outros (MIAO et al., 2017). Neste contexto, as nanoemulsões são uma das mais empregadas por sua natureza fluida, interação com as células teciduais devido sua superfície surfactante/emulsionante, tamanho reduzido das gotículas, capacidade de permeação eficiente, proteção para fornecer moléculas mesmo irritantes, voláteis e de alto peso molecular, além de proteger as drogas contra fatores severos como oxidação, pH e hidrólise (RAI et al., 2018).

A nanoemulsão é um sistema de dispersão bifásica de dois líquidos imiscíveis (gotículas de água em óleo (w/o) ou óleo em água (o/w) estabilizadas por um surfactante anfifílico (Figura 8). Elas consistem em uma boa entrega de drogas em *nanodroplets*, no qual a fase óleo (podendo variar de 2 a 20% p/p) desempenha um papel vital em sua formulação, pois solubiliza medicamentos lipofílicos destinados ao tratamento de doenças (BAZYLINSKA et al., 2012; SINGH et al., 2017).

Figura 8. Estrutura de sistemas bifásicos w/o e o/w que formam as nanoemulsões. Fonte: Adaptado de SINGH et al., 2017.



Tal sistema é estabilizado por surfactante que reduz a tensão superficial e evita a agregação de gotículas. São sistemas termodinamicamente e cineticamente estáveis (sem floculação ou coalescência aparente durante o armazenamento em longo prazo) com tamanho de gotícula pequeno e uniforme (<500nm), possuem propriedades viscoelásticas, não imunogênicas e são biocompatíveis (SINGH et al., 2017).

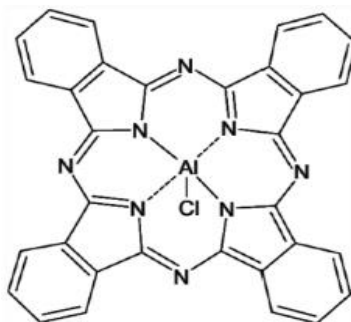
Nanoemulsões possuem maior capacidade de solubilização do que soluções micelares e sua estabilidade termodinâmica oferece vantagens em relação a dispersões instáveis (emulsões), pois podem ser fabricadas com pouca entrada de energia e têm uma longa vida útil (VIOR et al., 2011). O uso de nanossistemas como *drug delivery systems* mostra algumas vantagens: i) dispersão e estabilização dos fármacos lipofílicos em meio aquoso; ii) liberação prolongada evitando altas doses do fotossensibilizador no plasma; iii) modificação da superfície com agentes de direcionamento, melhorando a seletividade para o local de ação e iv) capacidade de carga de vários tipos de moléculas, como drogas quimioterápicas, agentes fotossensibilizadores e ligantes de direcionamento (SHAPIRA et al., 2011; BAZYLINSKA et al., 2012; RICCI-JUNIOR et al., 2018).

Os derivados da ftalocianina, compostos heterocíclicos relacionados a porfirinas, atraíram atenção considerável, por apresentarem algumas características ótimas para a TFD anticancerígena, como absorção de luz a 630-770 nm, região próxima ao infravermelho (janela terapêutica, proporcionando penetração máxima e menos prejudicial ao tecido), alta geração e elevada vida útil do estado tripleto fotossensibilizado, além do acúmulo rápido e prolongado dentro de células cancerosas (MIAO et al., 2017). No entanto, as ftalocianinas são insolúveis em água e apresentam alta hidrofobicidade, o que limita sua eficácia clínica. Neste sentido, a associação destas em nanocarreadores dispersáveis em água perfazem uma solução para o problema de autoagregação (MUEHLMANN et al., 2014; DLUGASZEWSKA et al., 2017).

As propriedades fotofísicas mais favoráveis das ftalocianinas dependem do íon metálico do núcleo que compreende a sua estrutura molecular, podendo ser queladas a metais como zinco ou alumínio, formando este último complexos de ftalocianina de cloro-alumínio (AlClPc) (PORTILHO et al., 2013). Recente estudo mostrou que a TFD mediada por nanoemulsão de ftalocianina de cloro-alumínio a 5µM foi capaz de erradicar tumores mamários 4T1 e metástases pulmonares em camundongos BALB/c (RODRIGUES et al., 2020). Autores demonstraram 90% de necrose tumoral após aplicação única da AlClPc em associação a irradiação luminosa em tumores de Erlich (LONGO et al., 2009), eficácia no tratamento de glioblastoma (CASTILHO-FERNANDES et al., 2017), citotoxicidade e apoptose em linhagens A549 e HeLa (adenocarcinoma de pulmão e cervical, respectivamente) (FRANCHI et al., 2016). Além disso, outra pesquisa mostrou boa estabilidade coloidal de nanopartículas poliméricas carregadas com AlClPc 10µM, bem como alta meia-vida do estado tripleto excitado, efeito fototóxico superior a 80% *in vitro*, características desejáveis para uso em TFD

(PAULA et al., 2013). Portanto, a AlClPc (Figura 9) é um fotossensibilizador de segunda geração quimicamente estável e tem sido usada com sucesso em modelos de câncer e proporciona uma margem de segurança relevante em ensaios clínicos (CASTILHO-FERNANDES et al., 2017; LEANDRO et al., 2017).

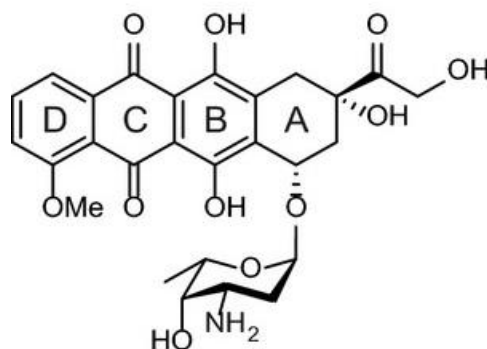
Figura 9. Estrutura química da ftalocianina de cloro alumínio ($C_{32}H_{16}AlClN_8$).
Fonte: LEANDRO et al., 2017.



As ftalocianinas complexadas com íons diamagnéticos, como Zn^{2+} , Al^{3+} e Ga^{3+} resultam em metaloftalocianinas nos quais os substituintes catiônicos são vantajosos em relação aos que contêm substituintes neutros e aniônicos porque proporcionam uma absorção celular melhorada. Além disso, estudos demonstraram que as metaloftalocianinas se localizam majoritariamente nas mitocôndrias celulares, o que induz a apoptose (LEANDRO et al., 2017). O desenvolvimento de novos fotossensibilizadores para TFD é complexo e são necessários testes experimentais pré-clínicos de vários passos, onde a experimentação animal é o segundo passo natural cronológico na investigação pré-clínica (LONGO et al., 2016). A AlClPc tem uma longa história e atividade anti-neoplásica sob ativação da luz visível, e é o único composto derivado de ftalocianina já aprovado pela FDA para uso em ensaios.

A doxorubicina, também conhecida como adriamicina, é um membro da família das antraciclina antitumorais (Figura 10). A primeira droga desta classe, a daunorrubicina, foi isolada de amostra de solo, consistindo de um antibiótico pigmentado produzido pela cepa *Streptomyces peucetius*. Logo se descobriu que a daunorrubicina exibia atividade anticâncer em camundongos, o que estimulou seu uso clínico para o tratamento de leucemia, linfoma e tumores sólidos no final dos anos 1960. Em 1969, seu homólogo, a doxorubicina, foi isolada de uma cultura de *S. peucetius* quimicamente mutada, mostrando atividade antineoplásica ainda mais ampla (SABINA, et al., 2021).

Figura 10. Estrutura química da antraciclina doxorrubicina.
 Fonte: Adaptado de SABINA et al., 2021.



A doxorubicina está entre os quimioterápicos mais usados até o presente, e seu mecanismo de ação se estende desde à intercalação de DNA em sua porção antraquinona, inibição da Topoisomerase II, estresse celular oxidativo, modulação imunológica e mais recentemente se reconhece que a droga também causa danos à cromatina (SABINA, et al., 2021). No entanto, a instabilidade química tanto hidrolítica quanto a fotodegradação perfazem desafios para o armazenamento, manuseio e eficácia do fármaco, além da resistência múltipla adquirida e à cardiotoxicidade dose-dependente (YONCHEVA et al., 2020).

A resistência das células tumorais à doxorubicina está associada a mecanismos adaptativos celulares e a mutações, levando a alterações nas vias de sinalização (CHRISTOWITZ, et al., 2019) e aumento do efluxo nas células tumorais (DARTIER, et al., 2017). Já os mecanismos de cardiotoxicidade estão relacionados a duas vias mecanísticas: estresse oxidativo por disfunção mitocondrial e dano direto ao DNA. Sabe-se que a doxorubicina se acumula na mitocôndria e causa sua disfunção devido à afinidade pelas cardiolipinas, componentes principais das membranas mitocondriais internas particularmente abundantes no miocárdio (WENNINGMANN et al., 2019).

Outros obstáculos relacionados às características dos quimioterápicos incluem pouca solubilidade em água, baixa especificidade para as células tumorais e baixa biodisponibilidade, levando à necessidade de altas doses e ciclos repetidos de administração. Nesse sentido, o encapsulamento de drogas quimioterápicas em nanoestruturas pode superar a baixa biodisponibilidade (ou seja, aumentar a meia-vida na corrente sanguínea), aumentar a solubilidade e melhorar a captação celular, reduzindo significativamente os efeitos colaterais (D'ANGELO et al., 2021).

Os lipossomas de doxorubicina, como o Doxil®, o primeiro sistema de entrega de nano drogas aprovado pela FDA com base na tecnologia de lipossomas PEGuilados,

demonstrou ser capaz de estender o tempo de circulação, desacelerar o metabolismo, aumentar a entrega no alvo e reduzir o efeito colateral da doxorubicina (JI et al., 2020). Outros estudos mostraram que o carregamento de doxorubicina em lipossomas diminuiu significativamente a fotodegradação em comparação com o fármaco livre após irradiação UV-A (BANDAK et al., 1999); superação de resistência mediada por transportador em células de neuroblastoma após administração de nanopartículas de albumina carregadas com doxorubicina (ONAFUYE et al., 2019); e menor toxicidade cardíaca da doxorubicina lipossomal em relação à droga pura (O'BRIEN et al., 2004).

A encapsulação de doxorubicina dentro de nanopartículas pode ser uma ferramenta viável, pois aumenta a concentração tumoral do fármaco e diminui o seu volume de distribuição e, assim, a cardiotoxicidade associada à terapia, além de melhorar a estabilidade química e contornar a resistência ao medicamento (ELBAYOUMI; TORCHILIN, 2009). Apesar de já se ter conseguido resultados clínicos satisfatórios com doxorubicina em lipossomos de longa circulação em tumores quando comparados com a droga livre, a otimização de suas propriedades é uma preocupação constante (ELBAYOUMI; TORCHILIN, 2009; LUO et al., 2016).

Em vista do exposto, investigamos a atividade fotodinâmica de AlClPc em associação à doxorubicina carregadas em nanoemulsão óleo/água e seu efeito sobre a morte celular da linhagem 4T1 em modelo animal. Essa combinação foi selecionada como material de carregamento porque antraciclinas perfazem o padrão ouro como quimioterápicos e são compatíveis ao sistema nanoparticulado fotossensível, a ftalocianina de cloro-alumínio é hidrofóbica, e a nanoemulsão óleo/água pode potencialmente entregar tais medicamentos direcionados ao local alvo, e posteriormente ativadas por luz visível.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

O presente trabalho teve como objetivo geral analisar o padrão de resposta *in vivo* das nanoemulsões contendo o agente fotossensível ftalocianina associado ao quimioterápico doxorrubicina em camundongos BALB/c a fim de investigar esta nova terapia dirigida contra o câncer de mama.

2.2 Específicos

a) Analisar o crescimento tumoral em grupos de camundongos BALB/c inoculados com 4T1, tratados e não tratados com os diferentes sistemas nanoestruturados, associados ou não à ativação luminosa visível.

b) Analisar a angiogênese, por meio da marcação imunohistoquímica de CD31 e VEGF, em cortes histológicos dos tumores extraídos dos animais submetidos aos diferentes tratamentos.

c) Analisar o perfil de proliferação celular, por meio do marcador Ki67, bem como a apoptose via Caspase-3 ativada, nos cortes histológicos dos animais tratados com as nanoemulsões propostas associadas ou não à TFD e dos animais não tratados.

d) Analisar a expressão do mRNA, por meio de *array*, de genes relacionados a apoptose e genes alvos de drogas antitumorais que também podem ser possíveis alvos dos agentes após incubação com NE-PcDoxo associada a TFD em modelo de camundongo inoculado com 4T1 e comparar com os animais controle (não tratados).

e) Analisar a porcentagem de áreas necróticas (Análise Estereológica) nos tumores dos animais tratados e não tratados com as diferentes nanoformulações associados ou não à terapia fotodinâmica.

3. METODOLOGIA

3.1 Síntese dos sistemas nanoestruturados e aparato para TFD

Foram utilizados sistemas nanoestruturados obtidos por emulsificação espontânea com base no método modificado descrito por Tabosa do Egito (1994): nanoemulsões contendo ftalocianina de cloroalumínio (NE-Pc), doxorubicina (NE-Doxo) e ambos os fármacos (NE-PcDoxo). Para NE-Pc, a fase orgânica (acetona) foi preparada usando triglicerídeos de cadeia média, fosfolipídeos naturais de soja (Liposoid S100, Lipid Co, Brasil) e ClAlPc (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) a 55°C. Posteriormente, esta solução orgânica foi adicionada à fase aquosa contendo um tensoativo aniônico e poloxamer 188 (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) sob agitação magnética. O solvente orgânico foi removido inteiramente por rota-evaporação sob pressão reduzida a 60°C. Para NE-Doxo, uma preparação semelhante ocorreu exceto pela adição do fotossensibilizador, e doxorubicina foi adicionada à fase aquosa. Além disso, para NE-PcDoxo, os dois fármacos foram adicionados à formulação final, de acordo com o protocolo adotado (CANDIDO et al., 2018). Todas as amostras foram preparadas em condições assépticas na ausência de contaminantes e interferência química. Três sessões de irradiação de luz visível a 630nm de 50J.cm⁻² foram aplicadas em grupos experimentais separados utilizando laser contínuo Eagle 2W a 60mW (Quantum Tech, São Carlos, Brasil) com intervalo de 24 horas entre cada sessão.

3.2 Modelo experimental *in vivo*

A linhagem celular de câncer mamário murino (4T1) foi adquirida da ATCC e cultivada em meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI1640) (GIBCO-BRL, Life Technologies, Nova York, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) (Cultilab, Ribeirão Preto, Brasil), 100 U/mL de penicilina (GIBCO-BRL, Life Technologies, Nova York, EUA) e 100 g/mL de estreptomicina (GIBCO-BRL, Life Technologies, Nova York, EUA). As células foram mantidas em incubadora umidificada com 5% de CO₂ e temperatura constante de 37°C.

Quarenta camundongos BALB/c fêmeas (6 a 8 semanas) foram mantidos em gaiolas ventiladas no Centro de Criação de Animais do Laboratório de Microscopia e Microanálises do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE/UNESP). A

temperatura ambiente ($24 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e a luminosidade (ciclo claro/escuro de 12h) foram controladas, e os animais receberam ração específica balanceada (Presence, Paulínia, Brasil) e água fresca filtrada *ad libitum*. O delineamento experimental foi realizado de acordo com o Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do IBILCE/UNESP sob protocolo nº 081/2013. Os animais foram divididos em 8 grupos ($n=5$), sendo que os animais mantidos como grupo controle, as células tumorais foram inoculadas e nenhum tratamento foi aplicado. No restante dos animais, 2×10^5 células 4T1 diluídas em 100µl de tampão fosfato-salino (PBS) foram inoculadas na quarta glândula mamária direita, visando o desenvolvimento de tumor no local da injeção e foram monitoradas diariamente até o final do experimento. No 12º dia após o enxerto de células tumorais, e com o tumor clinicamente aparente (palpável), os tratamentos foram realizados da seguinte forma: Injeção intratumoral de 100µl de nanoemulsões (1µM de ftalocianina de cloroalumínio associada/ou 0,5µM de doxorubicina diluída em NaCl a 0,9%) administrado em dose única associado ou não às sessões de TFD a cada 24 horas durante três dias nos animais, sob anestesia (Rompun, Bayer, Brasil; Dopalen, Ceva, Brasil). Resumidamente, os animais com tumor de mama 4T1 foram divididos em grupos: **1** - administração de NE-Doxo no primeiro dia de tratamento sem sessões de TFD (NE-Doxo); **2** - Administração de NE-PcDoxo no primeiro dia de tratamento associada a sessões de terapia fotodinâmica (NE-PcDoxo + TFD); **3** - Administração de NE-Pc no primeiro dia de tratamento associada a sessões de terapia fotodinâmica e administração de NE-Doxo 24 horas após a primeira sessão de TFD (tratamento adjuvante) (NE-Pc + TFD + NE-Doxo); **4** - animais sem nenhum tratamento (Controle); **5** - Administração de NE-PcDoxo sem sessões de TFD (NE-PcDoxo); **6** - Administração de NE-Pc no primeiro dia de tratamento associada a sessões de terapia fotodinâmica (NE-Pc + TFD); **7** - tratado com irradiação a laser; **8** - Administração de NE-Pc no primeiro dia de tratamento e administração de NE-Doxo após 24 horas (tratamento adjuvante) sem sessões de TFD (NE-Pc + NE-Doxo). As medidas dos diâmetros tumorais foram feitas no dia 12 (início dos tratamentos) e 15 com o auxílio de um paquímetro. Os animais foram sacrificados no 15º dia (atordoamento realizado por CO_2 seguido de decapitação) 24 horas após a última sessão de TFD, e os tumores foram coletados.

Após a eutanásia dos animais, amostras de tumor foram retiradas de todos os animais e processadas histologicamente. Para o processamento em parafina (Histosec, Merck), a fixação em paraformaldeído 4% foi realizada a 4°C . As amostras foram então desidratadas em uma série crescente de etanol, diafanizadas em xilol e incluídas em

parafina. Os blocos foram submetidos a cortes seriados de 5µM em micrótomo rotativo (Leica RM2155, Alemanha), procedendo-se à coloração de HE para adequada avaliação histopatológica dos tecidos.

3.3 Experimento Piloto 1 - Análise do melhor tempo pós-inoculação das células nos camundongos para início do tratamento com as nanoemulsões associadas à TFD

Foram utilizados 8 animais para análise do melhor tempo pós-inoculação das células 4T1 para o início dos tratamentos propostos. Para isto, 2×10^5 células 4T1 foram diluídas em 100µl de tampão fosfato-salino (PBS) e posteriormente inoculadas na quarta mama direita de cada camundongo fêmea para o desenvolvimento do tumor de mama, que consistiu em um tumor localizado no sítio de injeção.

Para a inoculação das células, os camundongos receberam anestesia, por meio da injeção subcutânea na região do pescoço, de 100 µl de solução contendo 100 µg de cloridrato de xilazina e 200 µg de cloridrato de ketamina diluídos em solução isotônica de 0,9% de cloreto de sódio. Após a anestesia, 2×10^5 células 4T1 diluídas em 100 µl de tampão fosfato-salino (PBS) foram inoculadas na quarta mama direita dos camundongos. Após a inoculação das células, os oito animais foram divididos em dois grupos (n=4), como se segue: - **Grupo 1:** o tamanho do tumor *ex vivo* foi analisado 12 dias após a inoculação das células nos camundongos; - **Grupo 2:** o tamanho do tumor *ex vivo* foi analisado 15 dias após a inoculação das células nos camundongos. O crescimento tumoral dos dois grupos de animais foi medido a cada 72 horas durante a realização dos experimentos.

3.4 Experimento piloto 2 - Análise do melhor modo de administração das nanoemulsões nos tumores murinos

Após a identificação do melhor intervalo de tempo entre a inoculação de células 4T1 nas mamas dos animais e o tratamento com nanoemulsões associadas à terapia fotodinâmica foi realizado um segundo teste piloto para identificar a administração ideal das nanoemulsões nos tumores de mama desenvolvidos nos referidos grupos analisados. Para a administração das nanoemulsões nos tumores murinos foram utilizados camundongos com tumores de, aproximadamente, 260mm³ (tumores formados após 12 dias de inoculação das células 4T1 na mama). Os animais foram divididos em três grupos

(n=4), como descrito: - **Grupo 1:** grupo que apresentava tumor de mama sem administração de nanoemulsões; - **Grupo 2:** tumor de mama com administração intratumoral das NE-PcDoxo associada a uma dose de irradiação (laser Eagle 2W-630nm (Quantum Tech, Brasil), operando a $50\text{J}/\text{cm}^2$); - **Grupo 3:** tumor de mama com administração peritumoral das NE-PcDoxo associada a uma dose de irradiação (laser Eagle 2W-630nm (Quantum Tech, Brasil), operando a $50\text{J}/\text{cm}^2$).

Os camundongos dos grupos 2 e 3 receberam anestesia, por meio de injeção subcutânea, de 100 μl de solução contendo 100 μg de cloridrato de xilazina e 200 μg de cloridrato de ketamina diluídos em solução isotônica de 0,9% de cloreto de sódio. Após a anestesia, 100 μl de nanoemulsões diluídas em solução de 0,9% de cloreto de sódio à concentração final de 1 μM de ftalocianina de cloroalumínio e 0,5 μM de doxorrubicina, sendo a solução com as nanoemulsões administrada de modo intratumoral ou peritumoral. Quinze minutos após administração das nanoemulsões, os tumores murinos foram irradiados usando o laser Eagle 2W-630nm (Quantum Tech, Brasil), operando a $50\text{J}/\text{cm}^2$. Após a irradiação, os camundongos dos grupos 2 e 3 foram colocados em suas respectivas gaiolas para se recuperarem da anestesia.

3.5 Experimento piloto 3 - Análise do período pós-tratamento até eutanásia dos animais após sessão única de TFD

Quarenta animais foram divididos igualmente em 8 grupos (n=5), sendo utilizados como controle positivo animais inoculados com células tumorais sem tratamento algum. Então, 2×10^5 células 4T1 diluídas em 100 μl de tampão fosfato-salino (PBS) foram inoculadas na quarta mama direita dos camundongos, para desenvolvimento do tumor *in loco*, e os animais receberam anestesia conforme já descrito anteriormente. Após o procedimento, 100 μl de nanoemulsões diluídas em solução de 0,9% de cloreto de sódio a concentração final de 1 μM de ftalocianina de cloroalumínio e/ou 0,5 μM de doxorrubicina, foram administradas de modo intratumoral. Após 15 minutos da administração das nanoemulsões, os tumores murinos foram irradiados usando o laser Eagle 2W-630nm (Quantum Tech, Brasil), operando a $50\text{J}/\text{cm}^2$. Os camundongos do grupo 3 e 8 foram submetidos ao tratamento adjuvante no qual 24 horas após a inoculação intratumoral de nanoemulsões conforme descrito em detalhe no parágrafo anterior, os camundongos receberam anestesia novamente. Após a anestesia, 100 μl de nanoemulsões diluídas em solução de 0,9% de cloreto de sódio a concentração final de 0,5 μM de

doxorrubicina foram administradas. Os animais foram divididos em oito grupos conforme descrito no tópico 3.2. A coleta dos tecidos comprometidos pelo tumor, incluindo pulmões, fígados e rins (órgãos retirados para possibilitar a verificação de metástases e reações adversas às nanoemulsões e ao tratamento) foram realizados nos grupos de animais no 30º dia após os tratamentos com nanoemulsões associadas/ não associadas à terapia fotodinâmica seguindo normas gerais e básicas para dissecação de mamíferos. Os animais foram anestesiados via inalação de CO₂ em câmara apropriada (modelo GCSCO2G, Beira-mar), decapitados e acomodados em decúbito dorsal sobre a placa de dissecação para início da retirada das amostras teciduais. O crescimento tumoral dos três grupos experimentais foi medido a cada 72 horas, com auxílio do paquímetro até o 30º dia após a realização da TFD. Os tumores de interesse principal foram fixados de acordo com a metodologia adequada, e corados com hematoxilina-eosina.

3.6 Eficiência da TFD combinada com as nanoemulsões

A eficiência antitumoral foi analisada comparando o crescimento do tumor entre os grupos antes e depois dos tratamentos. O método de Kaplan-Meier foi usado para estimar o tempo de expansão do tumor para cada grupo. O crescimento do tumor foi identificado visualmente a partir do 7º dia de inoculação das células 4T1. Os diferentes tratamentos foram iniciados no 12º dia, e os animais foram sacrificados no 15º dia. O peso do tumor foi avaliado após a eutanásia e o volume ao longo do experimento foi medido de acordo com a fórmula:

$$\text{mm}^3 = 0.52 \times C \text{ (Comprimento)} \times L^2 \text{ (Largura)}$$

3.7 Ensaios Imunohistoquímicos

Foi usado o kit de detecção Expose Rabbit Specific HRP/DAB (ab80437 Abcam, Reino Unido). As lâminas foram desparafinizadas em xilol e reidratadas em séries decrescentes de etanol. Em seguida, foram lavados com água destilada por 5 minutos e mantidos por 45 minutos em panela a vapor a 96°C com tampão citrato (pH 6,0) para recuperação antigênica. Após estabilização em temperatura ambiente, as lâminas foram lavadas com tampão TBS (3x5min) e incubadas com solução 0,1% H₂O₂ pronta para uso durante 10 minutos. Após nova lavagem com TBS (2x5min), uma solução de bloqueio de proteína pronta para uso foi adicionada por 10 minutos conforme descrito pelo fabricante,

e posteriormente as lâminas foram lavadas novamente em tampão TBS (2x5min). No final, as lâminas foram incubadas com anticorpos primários policlonais de coelho Ki67 (1:500, ab15580, Abcam, Reino Unido), Caspase-3 ativada (1:100, ab13847, Abcam, Reino Unido), VEGF (1:100, ab46154, Abcam, Reino Unido) ou CD31 (1:50, ab28364, Abcam, Reino Unido) diluído em albumina a 1% e mantido a 4°C *overnight*. As lâminas foram então lavadas em tampão TBS (3x5min) e incubadas com o conjugado secundário específico de coelho HRP por 30 minutos. A revelação foi realizada com um substrato cromogênico DAB (3,3'-diaminobenzidina tetrahidrocloreto) e contrastado com hematoxilina.

Para avaliação da expressão de VEGF e Caspase-3, o software ImageJ (versão 1.52, Bethesda MD, NIH, EUA) foi aplicado. As lâminas foram digitalizadas em microscópio óptico BX-60 (Olympus, Japão) acoplado a um computador com software DP-BSW V3.1 (Olympus, Japão), e 10 fotomicrografias aleatórias foram capturadas em objetiva de 40x. Em cada campo adquirido, foram pontuados 20 pontos aleatoriamente, totalizando 200 pontos, referentes à intensidade média de imunomarcacão de cada animal, segundo Jardim-Perassi et al. (2014). Os valores foram obtidos como unidades arbitrárias (a.u) e representados pela densitometria óptica média.

A análise de expressão de CD31 foi realizada usando o software ImageJ, e 10 campos visuais imunorreativos em ampliação de 40x foram capturados. A deconvolução de cor foi aplicada usando um macro que define os vetores de hematoxilina e DAB no software para isolar a coloração DAB do contraste da imagem, conforme descrito por Bouzin et al. (2016). Os resultados foram expressos como Índice de Coloração (SI) de acordo com a seguinte fórmula:

$$S.I = (Taxa \text{ de Anotação}) \times (\% \text{Área Corada}) \times (Intensidade \text{ de Coloração})$$

*Onde: a taxa de anotação é a porcentagem da área delineada de cada campo obtida do tumor, % da área corada é calculada como (área corada/área tecidual) *100, e a intensidade da coloração é calculada como (255-média de intensidade dos pixels corados).

A avaliação da expressão de Ki67 foi realizada pela média da proporção de células marcadas (%). Vinte campos tumorais visuais aleatórios de cada animal foram adquiridos com uma objetiva de 100x sob o microscópio de campo claro e analisados usando o software Image-Pro Plus 6.1 (Media Cybernetics Inc., Silver Spring, MD, EUA). O parâmetro utilizado para definir a expressão do Ki67 foi a presença de coloração nuclear, onde as células positivas e negativas para todos os campos visuais fotografados foram quantificadas manualmente.

3.8 Análises estereológicas

Cinco cortes transversais seriados (5µm) das regiões central e periférica dos tumores foram corados com HE. As lâminas foram digitalizadas em aumento de 10x utilizando uma câmera BX61VS (Olympus, Japão) acoplada a um Sistema de Escaneamento de Lâminas de Microscópio Virtual Olympus VS120 (VS120-S5) do mesmo fabricante e analisadas em sistema de imagem com o software Image-Pro Plus 6 utilizando o sistema multiponto M130 proposto por Weibel (1963). Esse método, utilizando a ferramenta *gridmask* do software, foi aplicado às secções dos tumores de cada animal, de forma que 25 imagens por grupo fossem analisadas por esse método. Observou-se o índice percentual de proliferação, necrose inicial, necrose avançada, padrão cribriforme, tecidos adjacentes e espaços vazios, sendo de interesse para este estudo os três primeiros critérios.

3.9 PCR Arrays

O RNA total dos tumores induzidos pela linhagem 4T1 não tratados (Controle) e tratados com nanoemulsão associada à ativação de luz visível (NE-PcDoxo + TFD) foram isolados usando o mini kit RNeasy de acordo com instruções do fabricante (Qiagen, Alemanha). O RNA total (2µg) de cada grupo foi transcrito reversamente usando o kit de síntese de cDNA da primeira fita para RT-PCR (Qiagen, Alemanha), seguindo as instruções do fabricante. Água nuclease-free foi usada para diluir o cDNA amplificado e foi adicionado ao RT²qPCR SYBR Green Master Mix (Qiagen, Alemanha). Após, 25µL do coquetel experimental foram adicionados a cada poço para analisar a expressão de 84 genes alvo para o desenvolvimento de drogas e outros 84 genes envolvidos em apoptose. Para isso, o Mouse Cancer Drug Targets RT² Profiler PCR Array (PAMM-507ZA) e o

Mouse Apoptose RT² Profiler PCR Array (PAMM-012ZA) foram usados de acordo com as instruções do fabricante (Qiagen, Alemanha). Para maiores informações acerca da tabela de genes avaliados visitar o site do fabricante através do modelo das placas utilizadas no presente estudo. A PCR em tempo real foi realizada no Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, EUA), e todas as amostras experimentais estavam em triplicata. Os dados da PCR foram coletados e a expressão diferencial dos genes foi analisada pelo Portal da Web da Qiagen (<https://www.qiagen.com/br/shop/genes-and-pathways/data-analysis-center-overview-page/>).

3.10 Análises Estatísticas

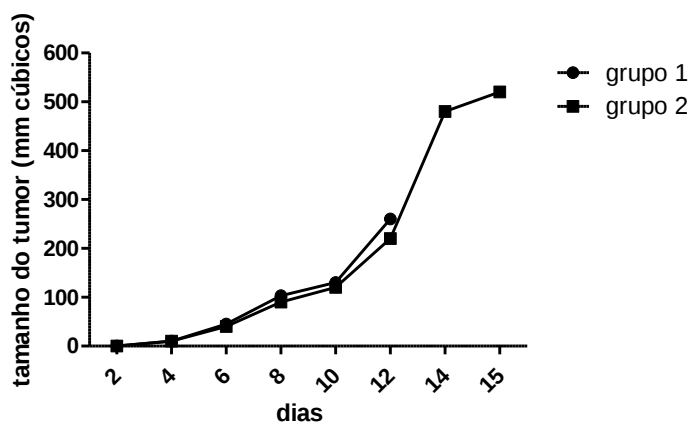
Os dados foram previamente submetidos à análise descritiva para determinação da normalidade. Para amostras com distribuição normal, os diferentes grupos de tratamento foram comparados por Análise de Variância (ANOVA) seguida pelo pós-teste de Bonferroni. Para aqueles com distribuição não normal, o pós-teste de Kruskal-Wallis foi usado para comparações múltiplas. Todos os valores obtidos foram expressos como média $\pm$ erro padrão usando GraphPad Prism 7 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). Qualquer valor de p de 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO DOS EXPERIMENTOS PILOTOS

4.1 Análise do melhor tempo pós-inoculação das células nos camundongos para início do tratamento com as nanoemulsões associadas a TFD

Os tumores cresceram com um padrão similar entre os dois grupos analisados até o 12º dia, quando os animais do grupo 1 foram eutanasiados. Neste dia os dois grupos apresentaram tumores com, aproximadamente, 260 mm³. No 15º dia, os tumores de mama do grupo 2 atingiram, aproximadamente, 520 mm³ (Figura 11), praticamente o dobro do volume tumoral do grupo 1. Portanto, o tempo escolhido entre a inoculação das células 4T1 e o início do tratamento com as nanoemulsões associadas/ não associadas à terapia fotodinâmica foi de 12 dias pois o tumor com, aproximadamente, 250 mm³ apresenta pouca pressão intersticial tumoral (PIT), evitando que a influência da PIT diminua a eficiência dos tratamentos com nanoemulsões associadas a terapia fotodinâmica estudados.

Figura 11. Gráfico do crescimento tumoral de mama murino experimento piloto 1.

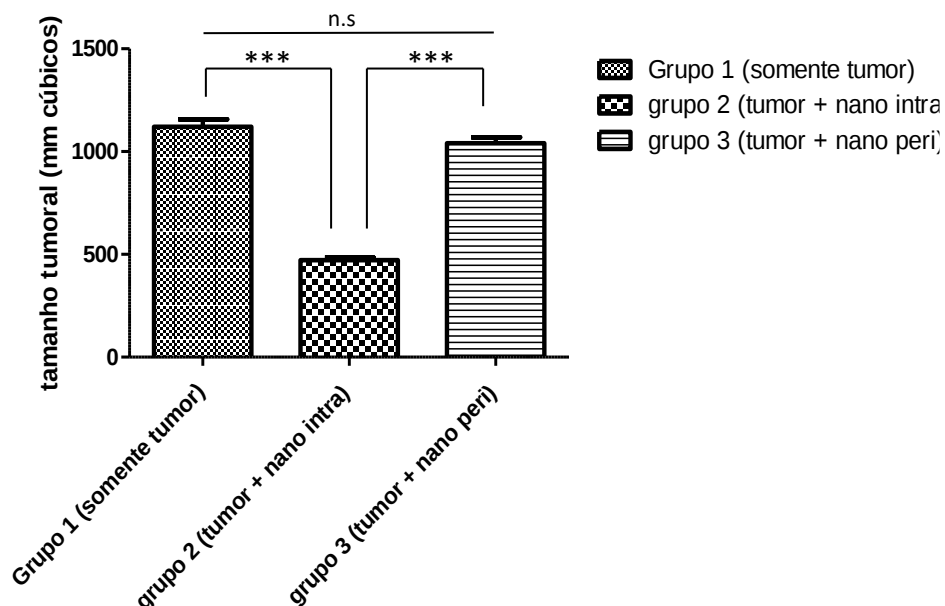


4.2 Análise do melhor modo de administração das nanoemulsões nos tumores murinos

Observou-se uma diminuição significativa no tamanho do tumor do grupo 2 (tumor tratado com nanoemulsões administradas intratumoralmente associada a terapia fotodinâmica) quando comparado ao grupo 1 (grupo controle apenas tumor) ($p < 0,0001$) e do grupo 2 comparado ao grupo 3 ($p < 0,0001$) (figura 12). Baseado nestes resultados concluiu-se que a administração intratumoral das nanoemulsões associadas à irradiação a

laser foi eficiente na diminuição do tamanho tumoral e que a administração peritumoral das nanoemulsões associadas à irradiação não teve efeito significativo na diminuição do tumor.

Figura 12 – Gráfico do tamanho tumoral dos grupos inoculados com diferentes vias de administração de NE-PcDoxo associadas à terapia fotodinâmica.



4.3 Análise do período pós-tratamento até eutanásia dos animais após sessão única de TFD

O experimento piloto 3 foi realizado com todos os grupos de tratamentos e no 30º dia foi realizado a eutanásia para retirada dos tumores e outros órgãos para estudos histológicos. Em relação à curva de crescimento, observou-se que a diferença nos tamanhos de tumores entre o grupo 2 (NE-PcDoxo + TFD, ou seja, terapia combinada) e os demais grupos ficou evidente a partir do dia 24, e, ao final do tratamento, foi observada uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0.001$) entre o grupo 2 e os outros grupos do estudo (Figura 13). A partir da medição *ex vivo* observou-se uma diminuição significativa nos tamanhos dos tumores nos animais do grupo 2 em relação a todos os outros grupos do estudo (Figura 14).

Figura 13. Curva de crescimento tumoral dos grupos estudados entre o dia do início do experimento (dia 0) e final do experimento piloto 3 (dia 30). ** $p < 0.001$.

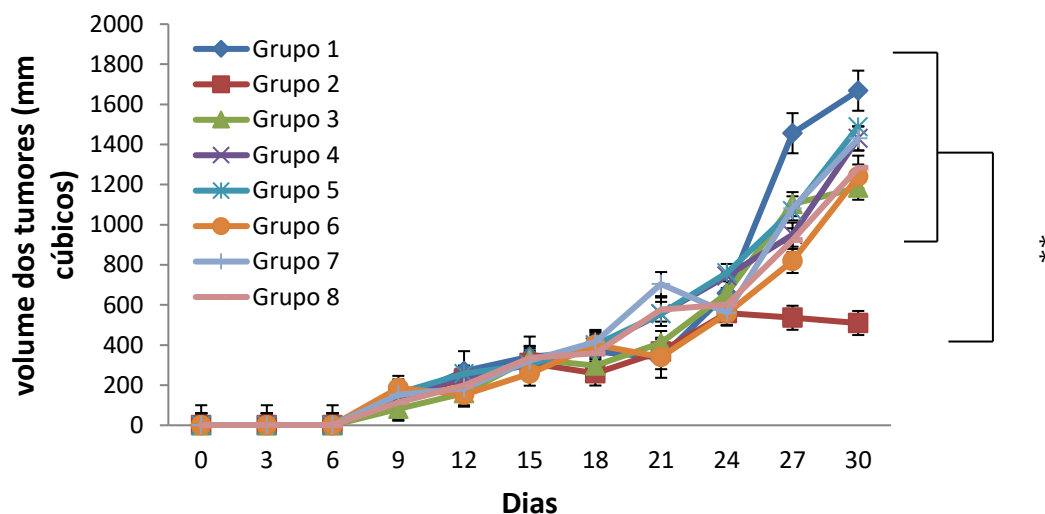
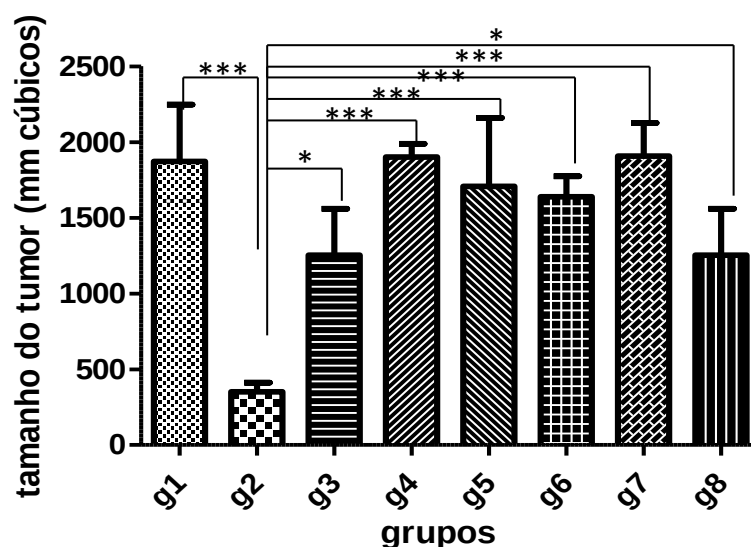


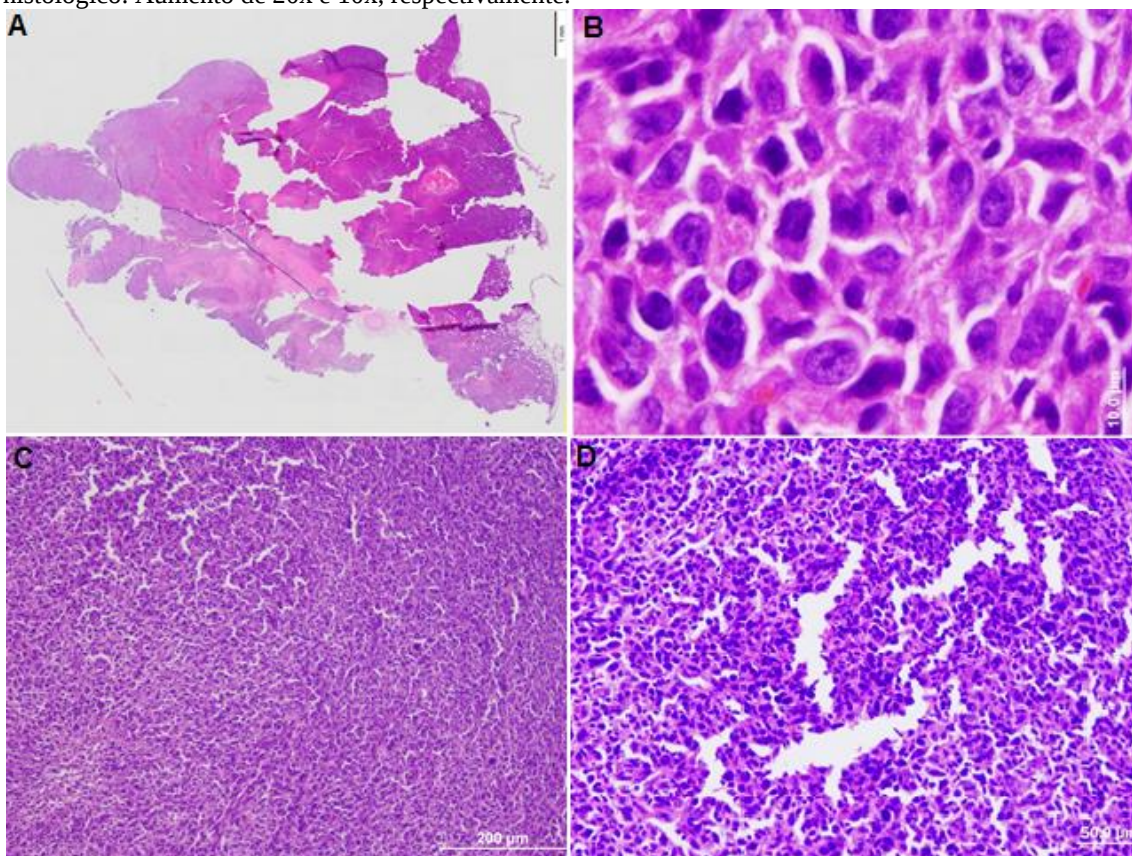
Figura 14. Gráfico dos tamanhos tumorais *ex vivo* dos diferentes grupos de tratamento submetidos ao experimento piloto 3. * $p < 0.05$; *** $p < 0.0001$



Foi realizada uma análise histológica inicial dos tumores pela coloração de hematoxilina-eosina (HE). O material histológico apresentou dificuldade em aderir às lâminas silanizadas para posteriores análises de coloração, uma vez que os tumores se encontravam em estágio avançado, apresentando perda de adesão intercelular ocasionada pela necrose tecidual, uma das características básicas deste estadiamento (Figura 15A). Em consequência desta perda de adesão presente na maioria dos tumores do estudo, não foi possível analisar a histologia da maioria dos tumores, pois os cortes não aderiram corretamente nas lâminas e foram perdidos durante as etapas de desparafinização e

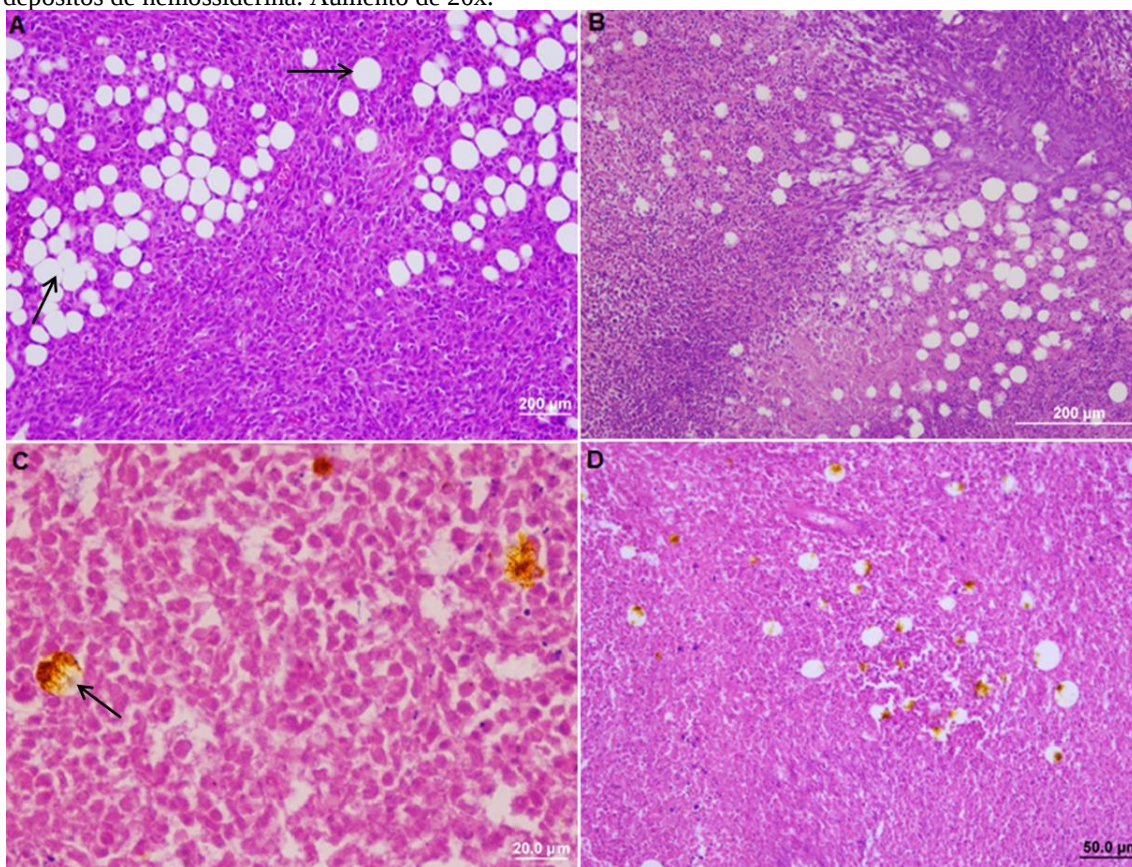
hidratação da metodologia de coloração dos cortes por HE. Nos poucos cortes que ficaram aderidos à lâmina, foi possível observar maciça perda de adesão célula-célula (Figura 15B - D).

Figura 15. Corte histológico de região total e periférica de tumor mamário desenvolvido a partir do experimento piloto 3. A) Corte histológico corado em HE parcialmente aderido a lâmina silanizada. B) Histologia do carcinoma mamário mostrando a perda de adesão célula-célula. Aumento de 100x. C e D) Histologia do carcinoma mamário mostrando a perda de adesão celular em grande parte do corte histológico. Aumento de 20x e 10x, respectivamente.



Outra característica marcante nestes cortes histológicos analisados foi a presença de padrão cribriforme nos tecidos, nos quais espaços bem definidos formados pelo rearranjo das células, característico de tumores de mama invasivos, ou seja, pontos que se assemelham à uma aparência fenestrada, lembrando um crivo ou peneira (Figuras 16A e B). Também se notou a presença de pigmentos de hemossiderina, que corresponde a degradação de hemoglobina em regiões teciduais onde há pouco oxigênio (hipóxia), observado nas zonas mais internas dos tumores, onde a vascularização torna-se mais restrita (Figuras 16C e D).

Figura 16. Histologia representativa dos tumores de animal controle do experimento piloto 3. A e B) Corte histológico de carcinoma mamário evidenciando aspecto cribriforme. Aumento de 5x. C) Histologia do carcinoma mamário mostrando a perda de adesão celular em grande parte do corte histológico, com presença de pigmentos de hemossiderina, evidenciando estágio tardio de necrose tecidual e cariólise avançada. Aumento de 100x. D) Histologia do carcinoma mamário evidenciando aspecto cribriforme e depósitos de hemossiderina. Aumento de 20x.



A análise do microambiente e das interações tumor-hospedeiro no comportamento das células tumorais é essencial durante a busca de um novo tratamento antitumoral e os modelos murinos singênicos, como o modelo 4T1 utilizado neste estudo, têm a vantagem importante de permitir o desempenho de análises em animais com função imune normal (TAO et al., 2008).

Além do microambiente tumoral a pressão intersticial do tumor (PIT) também é uma característica fundamental da biologia do câncer. A PIT provoca distribuição intratumoral heterogênea de drogas e macromoléculas além de provocar o desenvolvimento de hipóxia na massa tumoral, levando a uma eficácia reduzida de medicamentos terapêuticos (ARIFFIN et al., 2014). A pressão intersticial do tumor (PIT) foi identificada como um dos responsáveis que impede o tratamento eficaz do câncer, e pode ser atribuída a vários fatores fisiopatológicos, incluindo: anormalidades na vasculatura tumoral, nos vasos linfáticos e no microambiente, além de células tumorais em proliferação dentro de um espaço confinado (HELDIN et al., 2004).

Alguns métodos físicos mostraram-se eficazes na redução da PIT. Estes incluem irradiação, terapia hiper ou hipotérmica, ultrassom, terapia de oxigênio hiperbárico e terapia fotodinâmica. A TFD pode prejudicar a microcirculação em tumores, como demonstrado em um modelo de melanoma murino, onde TFD causou um aumento inicial na PIT antes de mostrar uma diminuição para 50% comparada ao controle após 24 horas (LEUNIG et al., 1994). Portanto, a partir da análise dos resultados do experimento piloto 1 para identificar qual o melhor período pós-inoculação das células 4T1 no tecido mamário dos camundongos para iniciar os tratamentos e, com o objetivo de evitar a possível influência negativa de uma alta pressão intratumoral nos experimentos *in vivo* deste estudo, optou-se por administrar as nanoemulsões para os tratamentos 12 dias após a inoculação das células de carcinoma mamário (4T1) na quarta mama dos animais.

Os resultados do experimento piloto 2 mostraram que a administração intratumoral das NE-PcDoxo foi eficiente no tratamento antitumoral, corroborando com um estudo que analisou o modo mais eficiente de administração de nanoemulsão em carcinoma de mama em pacientes. As nanoemulsões administradas intratumoralmente apresentaram valores de absorção intracelular das nanoemulsões lipídicas maiores no tumor em relação aos tecidos normais da mama ($p=0,002$), na ordem de cinquenta vezes maior. Já as nanoemulsões administradas peritumoralmente não apresentaram diferença de absorção intracelular das nanoemulsões entre o tecido tumoral e o normal (MENDES et al., 2009).

Embora os lipossomos sejam sistemas de entrega de drogas menos estáveis que as nanoemulsões, um estudo mostrou que lipossomos contendo fotossensibilizador (indocianina verde) e quimioterápico (docetaxel) injetados intratumoralmente em camundongos com carcinoma escamoso de boca resultou na ablação completa do tumor além de inibir sua recidiva, apresentando atividade antitumoral localizada, diminuindo com isso os efeitos colaterais em órgãos adjacentes ao tumor (NGUYEN et al., 2017). Outro estudo no qual injetaram intratumoralmente Foslip em tumores de mama associados à terapia fotodinâmica observou morte celular nos centros tumorais em grande parte dos tumores analisados (D'HALLEWIN et al., 2008). Com base nos resultados dos experimentos piloto envolvendo os oito grupos de camundongos submetidos a diferentes tratamentos sugere-se que o tratamento com NE-PcDoxo associada à terapia fotodinâmica mostrou-se eficiente na redução do tumor de mama. Estes resultados corroboram com outros estudos que utilizaram nanopartículas contendo ftalocianina associadas à terapia fotodinâmica que apresentaram ação eficiente no tratamento de tumores de mama em modelo *xenograft*, onde 40% dos camundongos apresentaram remissão completa do

tumor e 60% apresentou remissão parcial do tumor 30 dias após o tratamento (KOSTIV et al., 2017). Outros estudos com nanopartículas contendo diferentes ftalocianinas associadas à terapia fotodinâmica apresentaram redução do tamanho tumoral em modelo murino de melanoma (CAMERIN et al., 2016) e em modelo murino de sarcoma (PENG et al., 2013), além de massiva morte celular em modelo *xenograft* de carcinoma cervical (WANG et al., 2013).

Foi possível realizar a análise histológica de alguns tumores dos grupos de camundongos eutanasiados 15 dias (experimento piloto 3) após os tratamentos com nanoemulsões associadas à TFD. Os tumores apresentaram grande área necrótica, corroborando com o estudo de Tao *et al.* (2008) onde foi observado que a extensão da necrose é maior nos tumores 4T1 do que aqueles derivados de linhas de células menos metastáticas (67NR, 168FARN). Uma grande área necrótica central no tumor foi identificada após 30 dias de inoculação de células 4T1 modificadas contendo luciferase no tecido mamário dos camundongos. Portilho *et al.* (2013) observou uma área tumoral periférica de camadas viáveis que envolvem uma área central do tecido necrótico. Tecidos tumorais viáveis mostraram a presença de núcleos intactos, limites de citoplasma e figuras mitóticas isoladas, conforme identificado pela coloração com hematoxilina. Em contraste, os tecidos necróticos foram caracterizados por uma massa eosinofílica amorfa sem integridade da membrana citoplasmática e ausência de núcleo celular como observado também em nosso estudo. Kostiv *et al.* (2017) observou extensa necrose no sítio tumoral em todos os camundongos nudes atímicos com carcinoma de mama tratados com nanopartículas administradas intratumoralmente e associadas à terapia fotodinâmica entre 24 e 48 horas após a irradiação.

No presente estudo foi observado uma grande extensão de necrose na maioria dos tumores e esta necrose, juntamente com a perda de adesão célula-célula, característica do estadiamento avançado dos tumores, ocasionou a falta de aderência dos cortes histológicos dos tumores nas lâminas silanizadas. Este ocorrido impediu as montagens e processamento da maioria das lâminas para as análises de imunohistoquímica posteriores. Pelos motivos discutidos foi delineado um novo experimento *in vivo* para avaliar efeitos imediatos dos tratamentos, onde os animais foram eutanasiados 24 horas após o final do tratamento. Com base nos resultados pilotos apresentados, foi possível concluir que as formulações NE-PcDoxo associadas à terapia fotodinâmica, foram eficientes na redução do volume tumoral de mama independentemente do número de irradiações que os mesmos receberam e do tempo de tratamento. Com o novo delineamento experimental *in*

vivo foi possível avaliar que a necrose presente nos tumores foi em consequência dos tratamentos aplicados e não apenas do estadiamento avançado dos mesmos, bem como permitiu o prosseguimento da metodologia de imunohistoquímica e análises moleculares para avaliar o menor crescimento tumoral no grupo tratado com NE-PcDoxo combinada à TFD e os mecanismos celulares envolvidos neste microambiente tumoral. Tais resultados preliminares foram de suma importância para dar sustentação teórica e científica aos resultados definitivos que geraram o artigo do presente estudo, apresentado na seção seguinte.

CAPÍTULO 2

5. ARTIGO CIENTÍFICO

(PUBLICADO À *JOURNAL OF PHOTOCHEMISTRY AND PHOTOBIOLOGY B: BIOLOGY*)

Accepted 22 March 2021.

DOI <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2021.112181>

Combined Photodynamic Therapy with chloroaluminum phthalocyanine and doxorubicin nanoemulsions in breast cancer model

Ágata Silva Cabral^a, Ellen Cristina Rivas Leonel^b, Natália Maria Candido^a, Henrique Luis Piva^c, Maryanne Trafani de Melo^c, Sebastião Roberto Taboga^b, Paula Rahal^a, Antônio Cláudio Tedesco^c, Marília Freitas Calmon^a

^a Laboratory of Genomic Studies, São Paulo State University, São José do Rio Preto, São Paulo 15054-000, Brazil.

^b Laboratory of Microscopy and Microanalysis, São Paulo State University, São José do Rio Preto, São Paulo 15054-000, Brazil.

^c Chemistry Department, Center of Nanotechnology and Tissue Engineering - Photobiology and Photomedicine Research Group, University of São Paulo; Ribeirão Preto, São Paulo 14040-901, Brazil.

*Corresponding author: Marília de Freitas Calmon, PhD, Department of Biology, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – IBILCE/UNESP, Street: Cristóvão Colombo, 2265, Zip/Postal Code: 15054-000 – City: São José do Rio Preto, SP, Brazil. E-mail address: marilia.calmon@unesp.br Phone: +55 17 3221-2852, Fax: +55 17 3221-2390

Abstract

Breast cancer is the most common neoplasm among women but thanks to innovative therapies, patients' prognosis has considerably improved. In this aspect, nanotechnology has been applied for cancer therapy aiming to reduce its usual side effects. In this study we aimed to evaluate the effects of nanoemulsions containing photosensitizer and chemotherapeutic agents associated with photodynamic therapy in a breast cancer *in vivo* model. Our results showed that synergistic treatments in which chloroaluminum phthalocyanine (NE-Pc) administered together with Doxorubicin (Dox) in the presence of laser irradiation (NE-PcDoxo + PDT) led to a reduction of 4T1 induced breast cancer in mice, decline of tumor VEGF expression, increase in Caspase-3 expression, tissue necrosis and massive decrease in proliferative cells, as shown by Ki67 immunostaining. Furthermore, this associated treatment induced overexpression of apoptotic genes *ABL1*, *CD70*, *CRADD*, *FASL*, and *NME5* and a reduction in expression of anticancer drug target genes *CDK2*, *ERBB2*, *FIGF*, *IGF2*, *PARP4* and *PGR*. These results validate this treatment as a promising alternative to improve the currently applied anticancer strategies.

Keywords: Alternative Therapy. Anticancer Treatment. Breast Cancer. Nanotechnology. PDT. Photosensitizer.

1. Introduction

Female breast cancer (BC) has been diagnosed in 2.1 million women in 2018 causing more than 626,679 deaths in that year and representing 18.4% of total cancer deaths worldwide [1]. Depending on the subtype, stage, histopathology or gene expression, current treatment options consist of locoregional surgery or complete mastectomy, radiation therapy, systemic chemotherapy, hormonal therapy, or immunotherapy. Although chemotherapy successfully prolongs life span of patients, anticancer drugs have several limitations and side effects. In addition, unspecific drug pharmacokinetics may take place and patients may develop chemoresistance to treatment [2].

Nanotechnology is suggested to reduce the treatment dosage and frequency due to the nanocarrier's ability to deliver the drug within confined tissues and versatile materials have been applied to encapsulate chemotherapeutic agents [3]. In this context, nanoemulsions are used due to their fluid nature and well-established interaction with tissue cells, in which the oil phase plays a vital role solubilizing lipophilic drugs molecules ensuring sustained and controlled drug release for long periods [4].

Photodynamic Therapy (PDT) has proved to be a powerful strategy in tumor destruction and this treatment modality applies visible light to induce a cascade of events leading the PS to the excited triplet state, generating reactive oxygen species (ROS) which cause tumor cell death [5]. The most important benefit of PDT are the selective ability that limits the area to be exposed to the light and accumulation of the PS in the tumor region, attributed to low pH, increased vascular permeability, poor lymphatic drainage, and distorted stromal architecture of the tumor [6].

Chloroaluminum phthalocyanine (AlClPc) and derivatives have attracted attention due their optimal characteristics for anticancer PDT, such as light absorption inside the “therapeutic window” (600-770 nm) that allows maximum penetration and less damaging to the tissue. However, phthalocyanines have high hydrophobicity and self-aggregation under physiological conditions, so, different strategies are used to modify their chemical structure or encapsulate them in nanocarriers [7].

Doxorubicin (DOX) is frequently applied for BC but presents chemical instability being a challenge for storage, handling, and treatment efficacy. On the other hand, the application of free drug is related to multiple resistance associated with adaptive cellular mechanisms and mutations, changes in signaling pathways, increased efflux in tumor

cells, dose-dependent cardiotoxicity in addition to have slow and limited tissue absorption [8]. Clinical cases and animal studies suggests that chemotherapy is more effective when multiple drugs are administered in combination to obtain synergy, enhancing the therapeutic benefits against cancer [9, 10]. The use of nanoemulsions as carriers of photosensitizers associated with chemotherapy is an attractive alternative, especially when combined with PDT. So, this work aimed to evaluate nanoemulsion effects containing AlClPc and Doxorubicin associated with PDT in the breast cancer *in vivo* model.

2. Material and methods

2.1. *Synthesis of nanostructured systems and PDT apparatus*

Nanostructured systems obtained by spontaneous emulsification based on the modified method described by Tabosa do Egito [11] were used: nanoemulsions containing chloroaluminum phthalocyanine (NE-Pc), doxorubicin (NE-Doxo) and both drugs (NE-PcDoxo). For NE-Pc, the organic phase (acetone) was prepared using medium-chain triglycerides, natural soy phospholipids (Liposoid S100, Lipid Co, Brazil), and ClAlPc (Sigma-Aldrich, USA) at 55°C. Subsequently, this organic solution was added to the aqueous phase containing an anionic surfactant and poloxamer 188 (Sigma-Aldrich, USA) under magnetic stirring. Organic solvent was removed entirely by route-evaporation under reduced pressure at 60°C. For NE-Doxo, a similar preparation took place except for the addition of the photosensitizer, and doxorubicin was added to the aqueous phase. Additionally, for NE-PcDoxo, both drugs were added to the final formulation, according to the protocol adopted [12]. All samples were prepared under aseptic conditions in the absence of contaminants and chemical interference. Three sessions of visible light irradiation at 630nm of 50 J.cm⁻² were applied in separate experimental groups using continuous laser Eagle 2W at 60mW (Quantum Tech, São Carlos, Brazil) with an interval of 24 hours between each session.

2.2. *In vivo experimental model*

The murine BC cell line (4T1) acquired from ATCC was cultured in Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI1640) (GIBCO-BRL, Life Technologies, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Cultilab, Brazil), 100 U/mL penicillin

(GIBCO-BRL, Life Technologies, USA), and 100 g/mL streptomycin (GIBCO-BRL, Life Technologies, USA). The cells were maintained in a humidified 5% CO₂ incubator and a constant temperature of 37°C.

Forty female BALB/c mice (6 to 8 weeks) were kept under-ventilated cages and maintained in the Animal Breeding Center of the Institute of Biosciences, Humanities, and Exact Sciences (IBILCE) of São Paulo State University (UNESP). Environment temperature (24±2°C) and luminosity (12h light/dark cycle) were controlled, and animals received specific balanced feed (Presence, Paulínia, Brazil) and fresh filtered water *ad libitum*. The experimental design was conducted according to the Ethics Committee on the Use of Animals (CEUA) from IBILCE/UNESP under the protocol n° 081/2013. The animals were divided into 8 groups (n=5), with animals being kept as a control group, tumor cells were inoculated, and no treatment was applied. In the rest of the animals, 2x10⁵ 4T1 cells diluted in 100µl of phosphate-saline buffer (PBS) were inoculated in the fourth right mammary gland, aiming the development of a tumor at the injection site and were daily monitored until the end of the experiment. On the 12th day after tumor cells grafting, and with the tumor being clinically apparent (palpable), the treatments were performed as follows: Intratumoral injection of 100µl nanoemulsions (1µM of chloroaluminum phthalocyanine associated/or 0.5µM of doxorubicin diluted in 0.9% NaCl) was administered once associated or not with PDT sessions every 24 hours during three days in the animals under anesthesia (Rompun, Bayer, Brazil; Dopalen, Ceva, Brazil). Briefly, the animals with 4T1 breast tumor were divided into groups: **1** - NE-Doxo administration in the first day of the treatment without PDT sessions (NE-Doxo); **2** - NE-PcDoxo administration in the first day of the treatment associated with photodynamic therapy sessions (NE-PcDoxo + PDT); **3** - NE-Pc administration in the first day of the treatment associated with photodynamic therapy sessions and NE-Doxo administration 24 hours after the first PDT session (adjuvant treatment) (NE-Pc + PDT + NE-Doxo); **4** – animals without any treatment (Control); **5** - NE-PcDoxo administration without PDT sessions (NE-PcDoxo); **6** - NE-Pc administration in the first day of the treatment associated with photodynamic therapy sessions (NE-Pc + PDT); **7** - treated with laser irradiation; **8** - NE-Pc administration in the first day of the treatment and NE-Doxo administration after 24 hours (adjuvant treatment) without PDT sessions (NE-Pc + NE-Doxo). Measurements of the tumor diameters were made on the day 12 (beginning of treatments) and 15 with the aid of a caliper. The animals were euthanized on the 15th day (stunning performed by CO₂ followed by decapitation) 24 hours after the last PDT

session, and tumors were collected.

After euthanizing the animals, tumor samples were taken from all animals and histologically processed. For paraffin processing (Histosec, Merck), fixation in paraformaldehyde 4% was carried out at 4°C. Samples were then dehydrated in an increasing series of ethanol, diaphanized in xylol, and included in paraffin. The blocks were subjected to 5 µm slices on a rotating microtome (Leica RM2155, Germany), proceeding to HE staining for appropriate histopathological evaluation of the tissues.

2.3. PDT efficiency combined with nanoemulsions

The anti-tumor efficiency was analyzed by comparing tumor growth between groups before and after the treatments. The Kaplan-Meier method was used to estimate the time of tumor expansion for each group. Tumor growth was visually identified from the 7th day of 4T1 cells inoculation. Different treatments started on the 12th day, and the animals were euthanized on the 15th day. Tumor weight was assessed after euthanasia and volume along the experiment were measured according to the formula:

$$\text{mm}^3 = 0.52 \times L (\text{Length}) \times W^2 (\text{Width})$$

(1)

2.4. Immunohistochemical Assays

Expose Rabbit Specific HRP/DAB Detection Kit (ab80437 Abcam, UK) was used. The slides were deparaffinized in xylol and rehydrated in a decreasing series of ethanol. Soon after, they were washed with distilled water for 5 minutes and kept for 45 minutes in a steam pan at 96°C with citrate buffer (pH 6.0) for antigenic recovery. After stabilization at room temperature, the slides were washed with TBS buffer (3x5min) and incubated with 0.1% H₂O₂ solution ready for use (hydrogen peroxide block) for 10 minutes. After a new wash with TBS (2x5min), a ready-to-use protein blocking solution was added for 10 minutes as described by the manufacturer, and later the slides were rewashed in TBS buffer (2x5min). In the end, the slides were incubated with rabbit polyclonal primary antibodies Ki67 (1:500, ab15580, Abcam, UK), activated Caspase-3 (1:100, ab13847, Abcam, UK), VEGF (1:100, ab46154, Abcam, UK) or CD31 (1:50, ab28364, Abcam, UK) diluted in 1% albumin and kept at 4°C overnight. The slides were then washed in TBS buffer (3x5min) and incubated with the specific secondary conjugate

HRP rabbit for 30 minutes. Revelation was carried out with a chromogenic substrate DAB (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride) and counterstained with hematoxylin.

For evaluation of VEGF and Caspase-3 expression, ImageJ software (version 1.52, Bethesda MD, NIH, USA) was applied. The slides were digitized using a BX-60 optical microscope (Olympus, Japan) coupled to a computer with the DP-BSW V3.1 software (Olympus, Japan), and 10 random photomicrographs were captured using a 40x objective. In each acquired field, 20 points were randomly scored, totaling 200 points, referring to the average intensity of immunostaining for each animal, according to Jardim-Perassi et al. [13]. Values were obtained as arbitrary units (a.u) and represented by mean optical densitometry.

CD31 expression analysis was performed using ImageJ software, and 10 immunoreactive visual fields in 40x magnification were captured. Color deconvolution was applied using a macro that defines hematoxylin and DAB vectors in the software to isolate the DAB stain from the image contrast, as described by Bouzin et al.[14]. The same parameters were applied to all slides. The results were expressed as Staining Index (SI) according to the following formula:

$$S.I = (\text{Annotation ratio}) \times (\% \text{Stained area}) \times (\text{Staining intensity})$$

(2)

*Where: the annotation ratio is the percentage of the outlined area of each field obtained from the tumor, % of the stained area is calculated as (stained area/tissue area)*100, and the staining intensity is calculated as (255-average intensity of colored pixels).

Ki67 expression evaluation was performed by the average of marked cells proportion (%). Twenty random visual tumor fields from each animal were acquired with a 100x objective under the bright field microscope as mentioned above and analyzed using Image-Pro Plus 6.1 software (Media Cybernetics Inc., Silver Spring, MD, USA). The parameter used to define Ki67 expression was the presence of nuclear staining, where positive and negative cells for all photographed visual fields were manually quantified.

2.5. Stereological Analysis

Five cross-sections from the central and peripheral regions of the tumors were stained with H&E. The slides were digitized in 10x magnification using a BX61VS

camera (Olympus, Japan) coupled to an Olympus VS120 Virtual Microscope Slide Scanning System (VS120-S5) from the same company and analyzed in an imaging system with the Image-Pro Plus 6 software using the proposed M130 multipoint system by Weibel [15]. This method using the software's grid mask tool was applied to chosen slices from the tumors of each animal, so that 25 images per group were analyzed by this method. The percentage index of proliferation, initial necrosis, advanced necrosis, cribriform pattern, adjacent tissues, and space was noted, being of interest for this study, the first three criteria.

2.6. *PCR arrays*

Total RNA from tumors induced by the 4T1 cell line untreated (Control) and treated with nanoemulsion associated with visible light activation (NE-PcDoxo + PDT) were isolated using the RNeasy mini kit according to the manufacturer's instructions (Qiagen, Germany). Total RNA (2 µg) from each group was reverse transcribed using the first-strand cDNA synthesis kit for RT-PCR (Qiagen, Germany), following the manufacturer's instructions. Nuclease-free water was used to dilute the amplified cDNA and was added to the RT²qPCR SYBR Green Master Mix (Qiagen, Germany). After, 25 µl of the experimental cocktail was added to each well to analyze the expression of 84 target genes for drug development and other 84 genes involved in apoptosis. For this, the Mouse Cancer Drug Targets RT² Profiler PCR Array (PAMM-507ZA) and Mouse Apoptosis RT² Profiler PCR Array (PAMM-012ZA) were used according to the manufacturer's instructions (Qiagen, Germany). Real-time PCR was performed on the Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA), and all experimental samples were in triplicate. Data from the PCR Array was collected, and differential expression of genes was analyzed by Qiagen Web Portal (<https://www.qiagen.com/br/shop/genes-and-pathways/data-analysis-center-overview-page/>).

2.7. *Statistical analysis*

Data were previously subjected to descriptive analysis to determine normality. For samples with normal distribution, the different treatment groups were compared by Analysis of Variance (ANOVA) followed by the Bonferroni post-test. For those with non-normal distribution, the Kruskal-Wallis post-test was used for multiple comparisons. All

values obtained were expressed as mean $\pm$ standard error using GraphPad Prism 7 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Any p-value of 0.05 was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Efficiency of nanoemulsions combined with PDT

The analysis of the tumor growth curve showed that the treatment with NE-PcDoxo + PDT has a significant reduction of tumors in comparison to the other groups ($p < 0.01$) except for the NE-Pc + PDT + NE-Doxo group (Figure 1). After euthanasia and tumor removal, a new *ex vivo* analysis was performed, in which a statistically significant difference was observed between tumor volume from mice treated with NE-PcDoxo + PDT ($p < 0.001$) (Figure 2A, C). The same was observed for tumor weight ($p < 0.01$) (Figure 2B) about the other groups (Figure 2A, D). For this reason, only the combined treatment (NE-PcDoxo + PDT) was chosen for performing the PCR array experiments for differential gene expression evaluation.

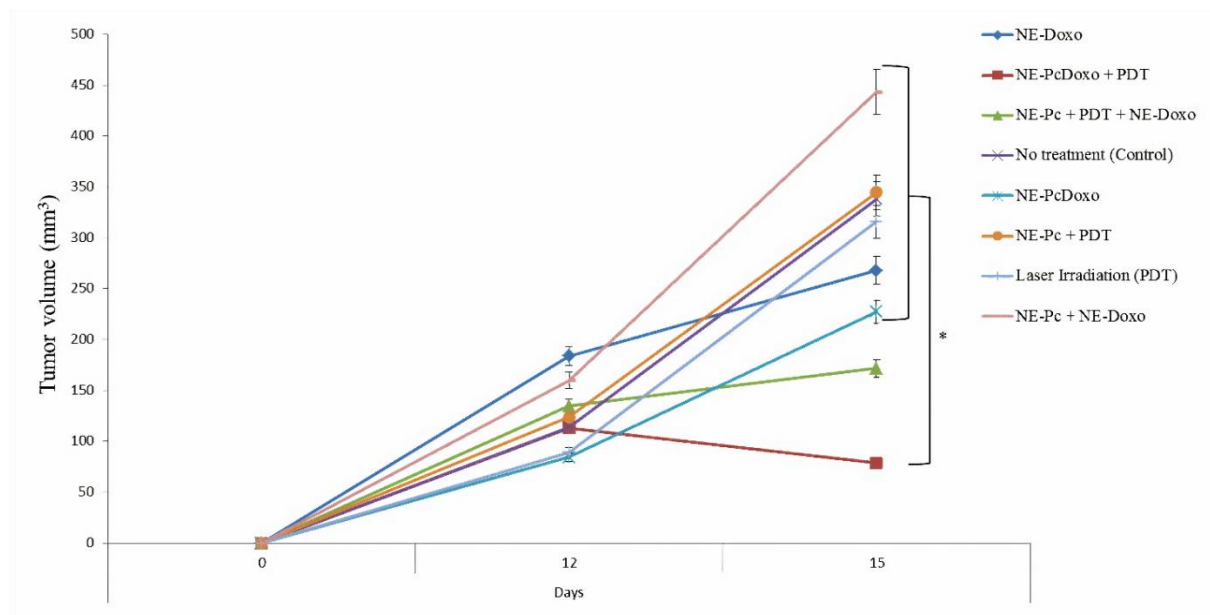


Figure 1: Tumor growth curves in the evaluated groups from the day experiment started (day 0) and the day of euthanasia (day 15). * $p < 0.01$.

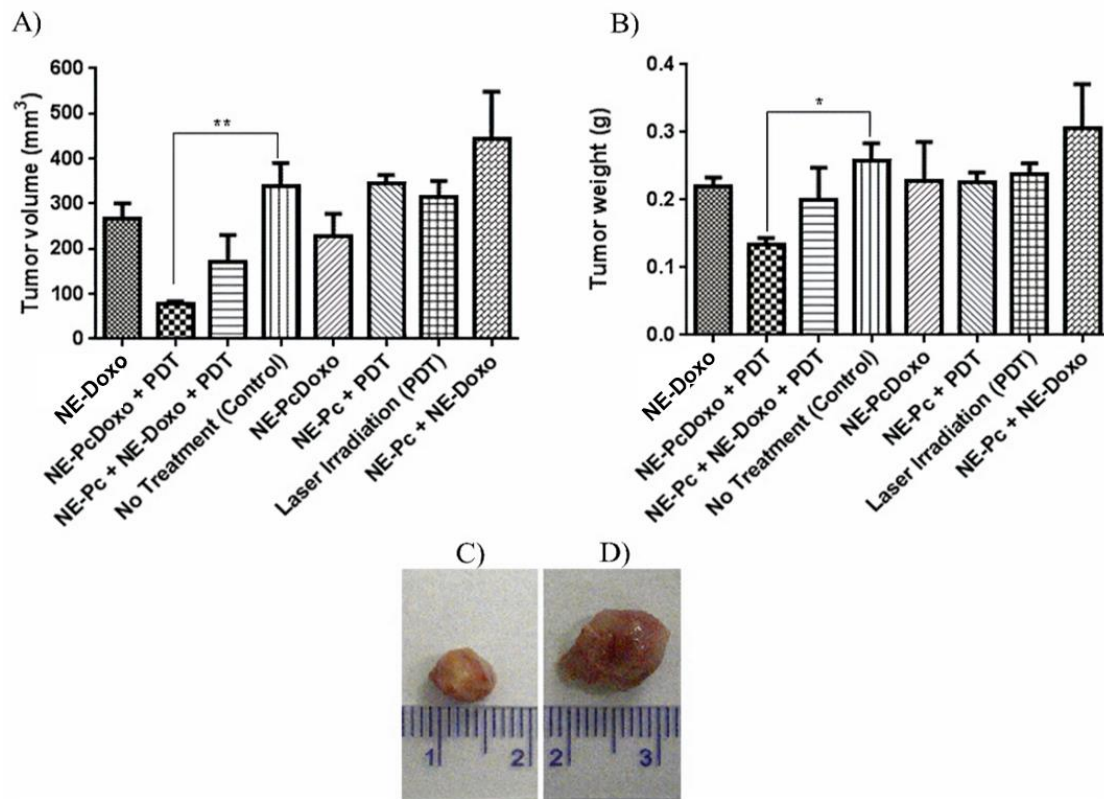


Figure 2: (A) Breast tumor volume of murine after euthanasia among different treatments applied. (B) Tumor weight after euthanasia. (C) Macroscopic aspect of a tumor treated with NE-PcDoxo + PDT showing a significant decrease in relation to the (D) 4T1 control mammary tumor (without treatment). Significant p-value in the ANOVA test followed by Kruskal-Wallis ($\pm$ S.E.M. * = $p < 0.01$ and ** = $p < 0.001$ in comparison to control group).

3.2. Tumor characterization

Tumor sections obtained were stained with HE (Figure S1A). It was possible to identify three distinct cell patterns: (i) peripheral tumor regions with a predominance of proliferative cells (Figure 3A; Figure S1C), with a high supply of blood vessels (Figure S1D); (ii) central regions of the tumor taken by initial necrosis, with evidence of pyknotic nuclei, chromatin condensation and cribriform patterns (Figure 3B); and (iii) central regions with an advanced stage of massive tissue necrosis, showing karyolysis with swollen nuclei and a gradual or total loss of chromatin which may degenerate totally, also with hemosiderin deposits due to hemoglobin degradation caused by tissue hypoxia (Figure 3C). These regions also showed extensive marking for caspase-3 (Figure S1B).

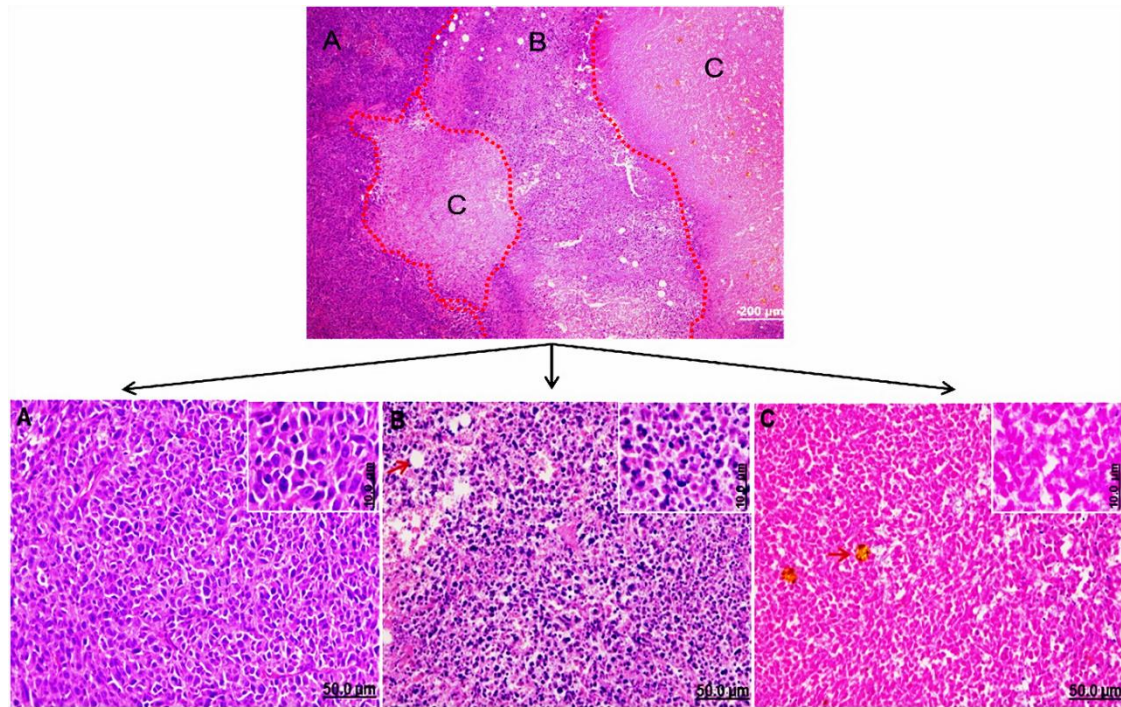


Figure 3: Histological section of tumor tissue from animal treated with NE-PcDoxo + PDT. **(A)** Peripheral tumor region with prevalence of proliferative cells. **(B)** Initial necrosis with evidence of pyknotic nuclei and formation of cribriform patterns (arrow). **(C)** Advanced stage of tissue necrosis showing karyolysis and hemosiderin deposits (arrow). Main figure: 4x magnification, scale bar 200μm. A, B and C: 20x (main figures, scale bars of 50μm) and 100x magnification (panels, scale bars of 10μm).

Stereological analyses showed that the group NE-PcDoxo + PDT and the group NE-Pc + PDT + NE-Doxo showed a reduced proliferation area in comparison to the control group (40.8%), with an average proliferative area of 24.8% and 26.2%, respectively ($p < 0.0001$) (Figure 4A). In contrast, these groups showed average rates of initial necrosis of 23.2% and 22.7% respectively ($p < 0.001$), similarly as the group that received laser irradiation (22.4%), showing an increase ($p < 0.01$) when compared to the control group (17.3%), as shown in Figure 4B. Cellular regions showing complete karyolysis and, consequently, advanced necrosis stage were increased after NE-PcDoxo + PDT treatment (8.7%) when compared to control (5.3%) ($p < 0.01$). The opposite was observed for the group treated with NE-Pc + NE-Doxo, which had a decreased percentage area of advanced necrosis (1.2%) ($p < 0.001$) (Figure 4C), confirming that in addition to chemical components, the laser was essential for an excellent anti-tumor effect. It is worth mentioning that treatments were only statistically different regarding the proportion of necrotic area since 4T1 grown tumors are very aggressive and naturally present necrosis due to tissue hypoxia, which was also observed by Jurczyszyn et al. [16].

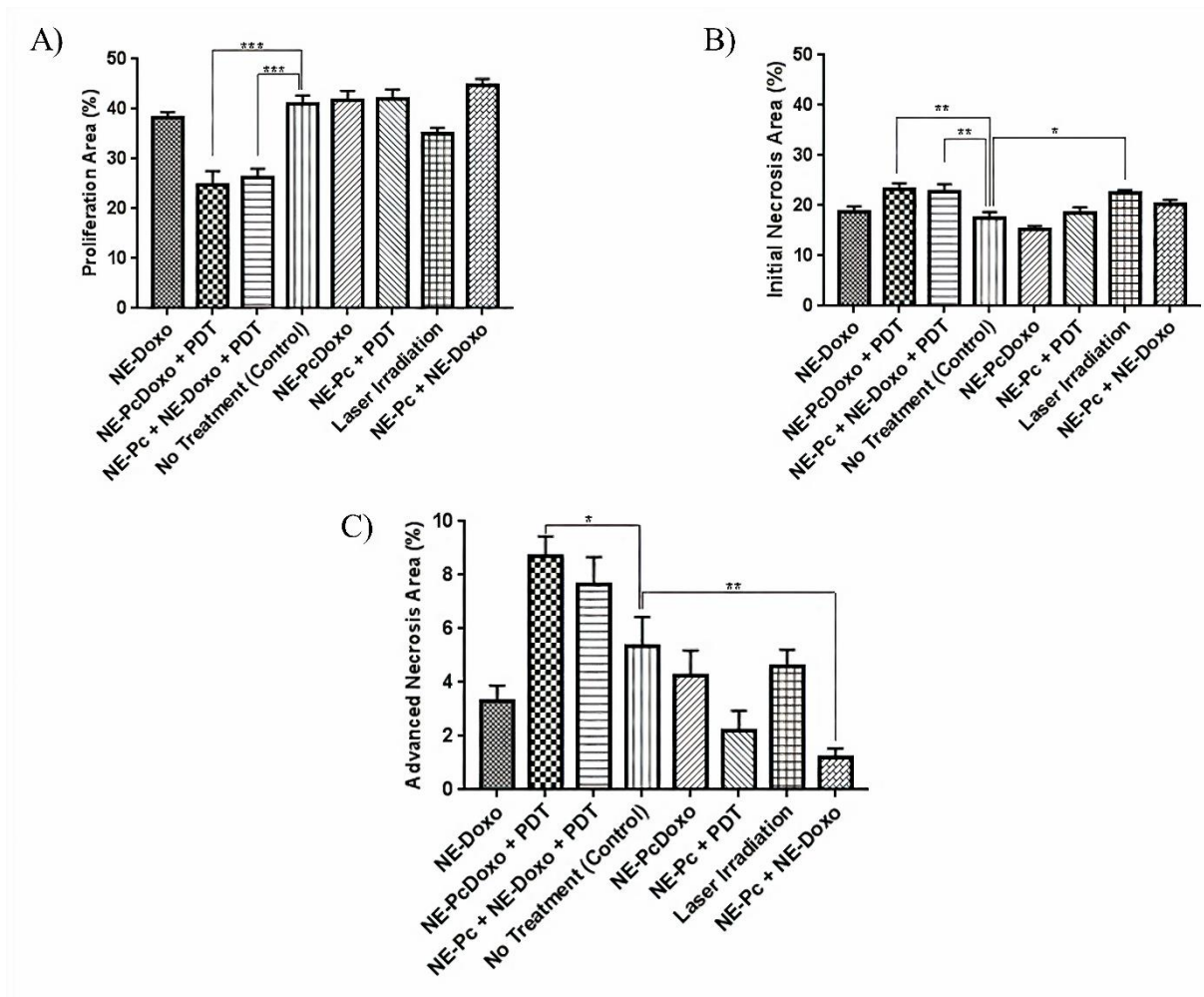


Figure 4: Stereological data of 4T1 strain mammary tumors subjected to different treatments. **A)** Proliferative areas; **B)** Initial necrotic areas; **C)** Advanced necrotic areas. Significant p-value in the ANOVA test followed by Bonferroni ($\pm$ S.E.M * = $p < 0.01$; ** = $p < 0.001$; *** = $p < 0.0001$ compared to control group).

3.3. VEGF, CD31, Caspase-3 and Ki67 protein expression

VEGF expression decreased in NE-Doxo, NE-PcDoxo + PDT, and NE-Pc + PDT + NE-Doxo treatments when compared to the control group ($p < 0.0001$) but showed a significant increase in NE-PcDoxo treatment ($p < 0.0001$) (Figure 5). CD31 expression showed no statistical difference between treated and control groups neither by staining index and vascular micro density by the percentage of the marked area (Figure 6). Although all groups had a significant increase of caspase-3 expression in comparison to control ($p < 0.0001$), the treatment with laser irradiation had less caspase-3 expression ($p < 0.001$) (Figure 7). Expression of Ki67 showed a significant decrease in the groups NE-PcDoxo + PDT and NE-Pc + PDT + NE-Doxo when compared to control ($p < 0.0001$) (Figure 8).

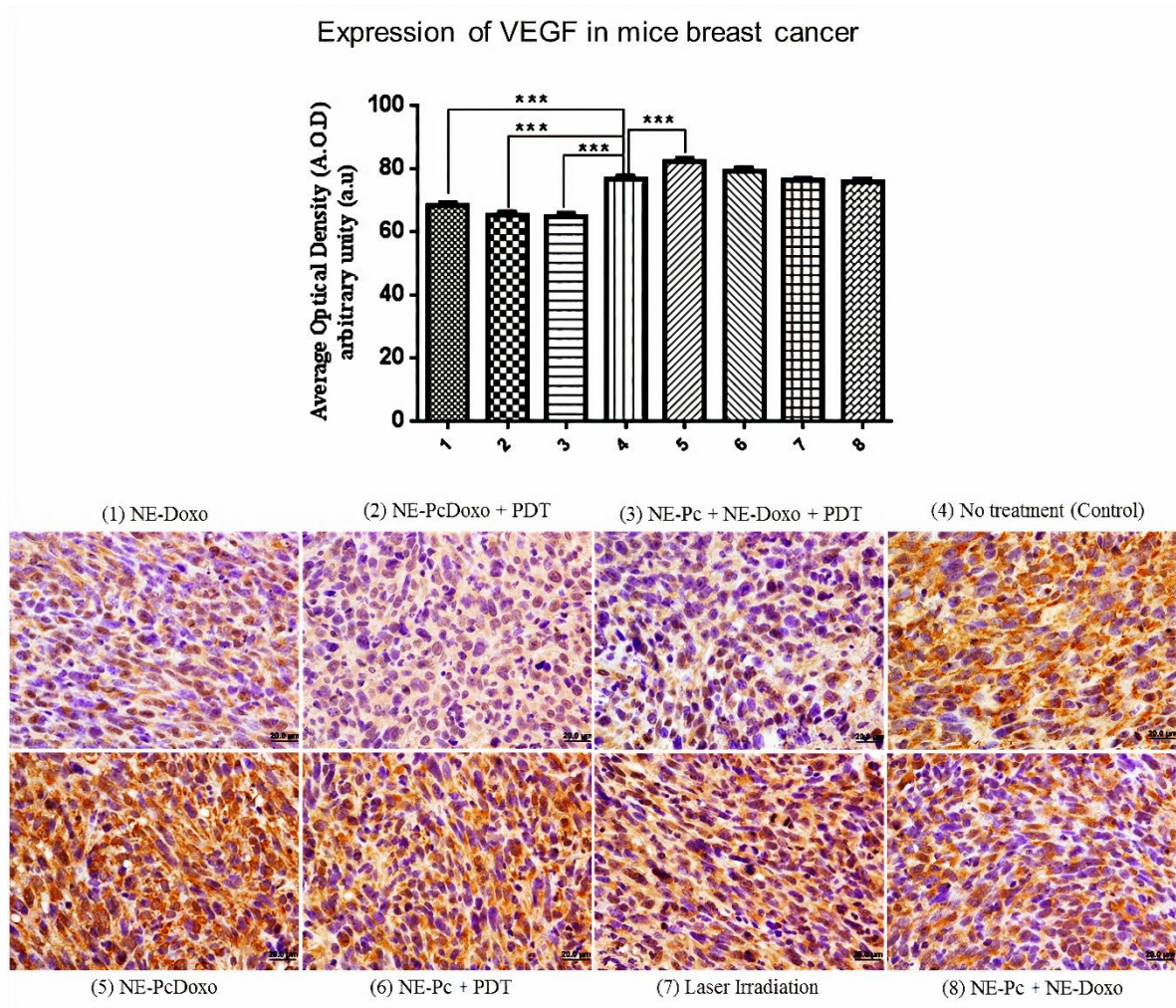


Figure 5: VEGF expression in tumors from animals of the control group and subjected to different treatments. Micrographs in 40x magnification (Bars in 20 μ m scale). Significant p-value in the ANOVA test followed by Bonferroni ($\pm$ S.E.M. *** = $p < 0.0001$ compared to the control group). Legends: (1) NE-Doxo: nanoemulsion with doxorubicin without PDT sessions; (2) NE-PcDoxo + PDT: nanoemulsion containing chloroaluminum phthalocyanine and doxorubicin associated with photodynamic therapy; (3) NE-Pc + PDT + NE-Doxo: nanoemulsion containing chloroaluminum phthalocyanine associated with photodynamic therapy and 24 hours later administration of nanoemulsion containing doxorubicin - after the first PDT session; (4) Control 41 breast cancer mice; (5) NE-PcDoxo: nanoemulsion containing chloroaluminum phthalocyanine and doxorubicin without PDT sessions; (6) NE-Pc + TFD: nanoemulsion containing chloroaluminum phthalocyanine associated with photodynamic therapy; (7) Laser Irradiation; (8) NE-Pc + NE-Doxo: nanoemulsion containing chloroaluminum phthalocyanine and 24 hours later administration of nanoemulsion containing doxorubicin without PDT sessions.

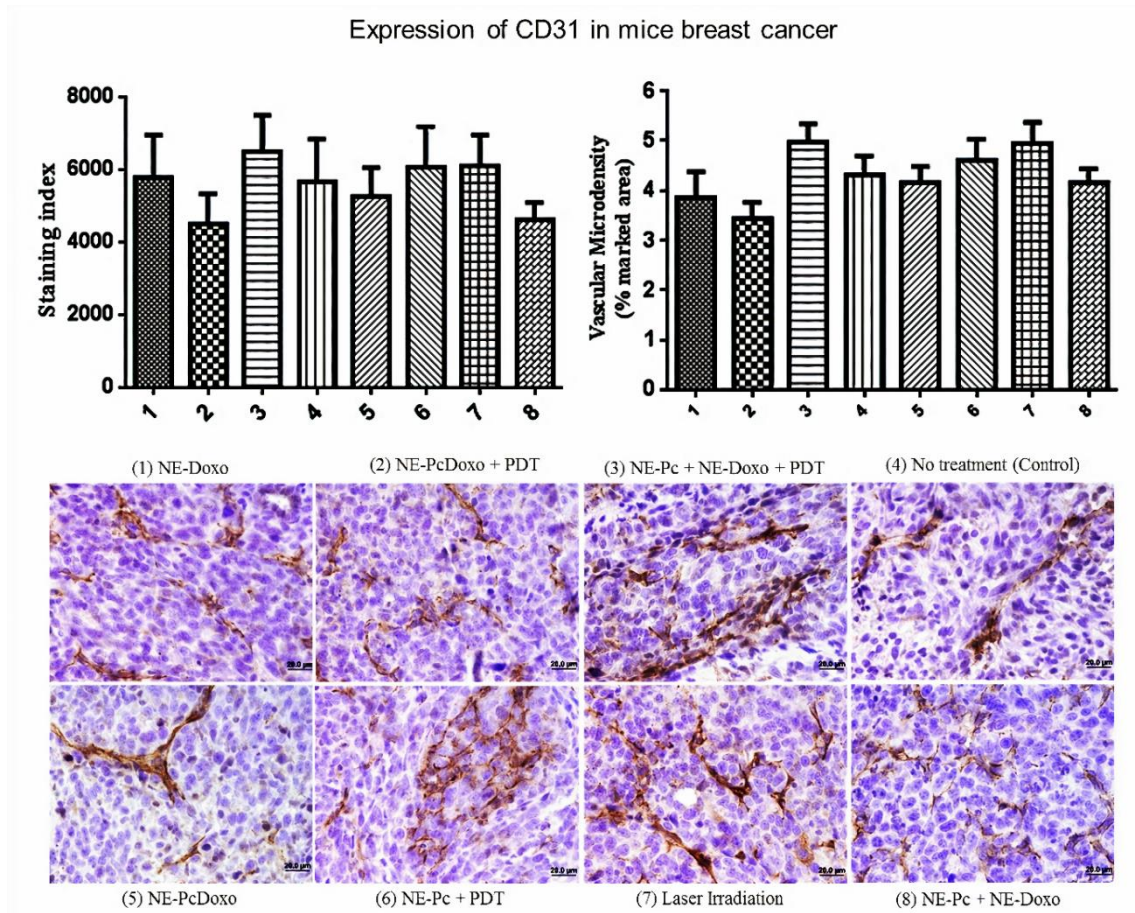


Figure 6: Vascular microdensity (MDV) by staining index and the % of marked area shown by the expression of CD31 in tumor tissue of the animals from control group and subjected to different treatments. Micrographs in 40x magnification (Bars in 20µm scale). Non-significant p-value in the ANOVA test followed by Bonferroni.

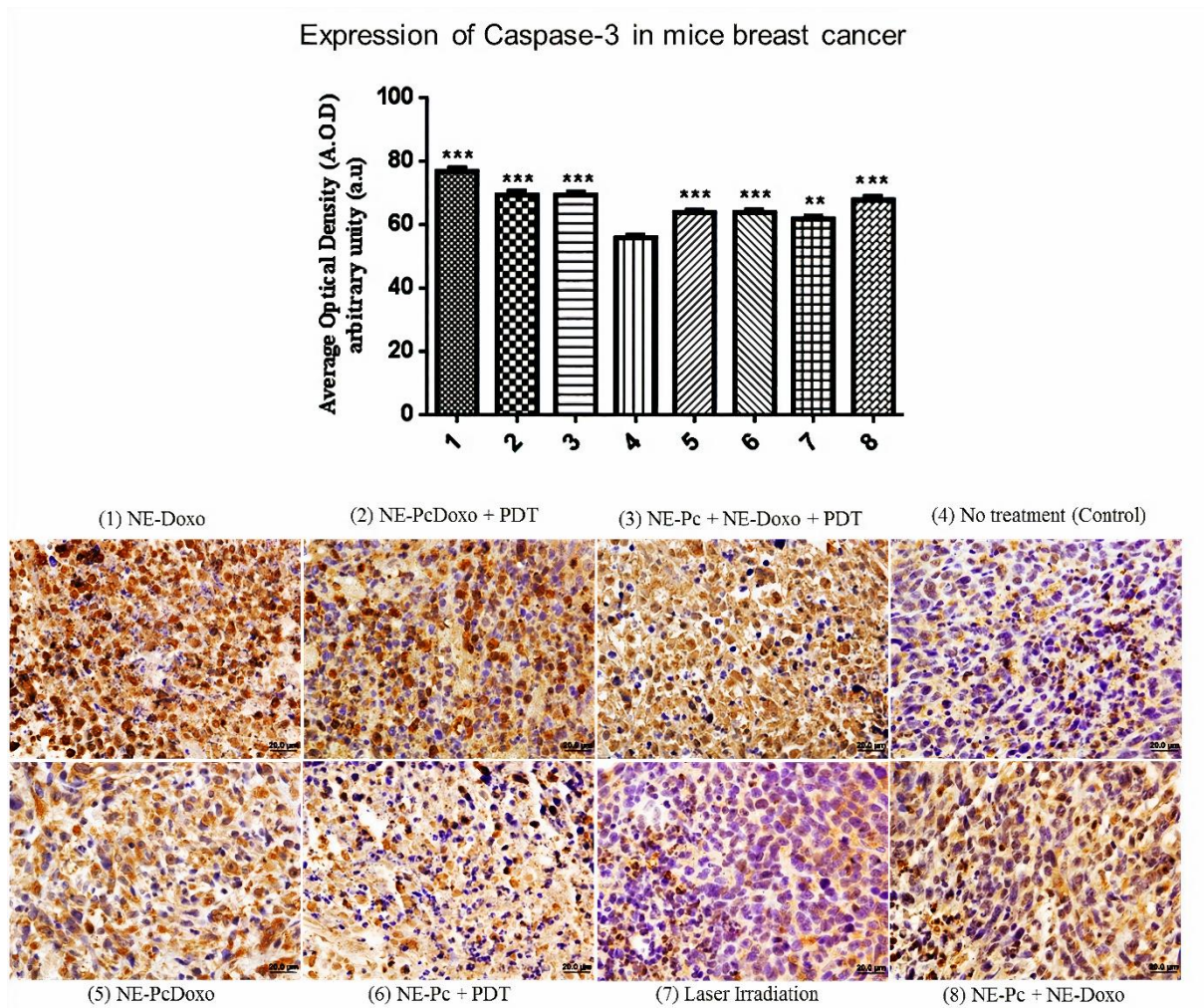


Figure 7: Caspase-3 expression in tumor tissue from animals of the control group and subjected to different treatments. Micrographs in 40x magnification (Bars in 20µm scale). Significant p-value in the ANOVA test followed by Bonferroni ($\pm$ S.E.M. *** = $p < 0.0001$ compared to the control group; ** = $p < 0.001$).

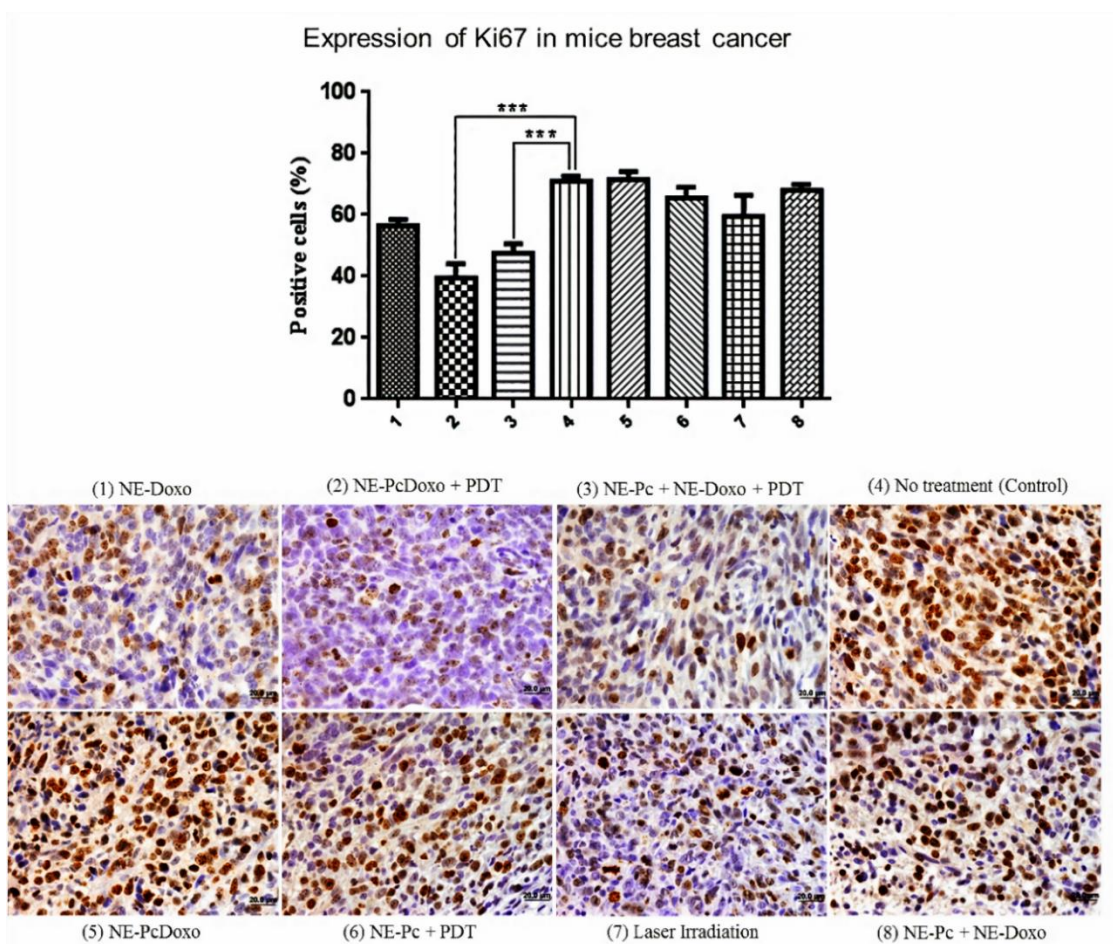


Figure 8: Ki-67 expression in tumor tissue from animals of the control group and subjected to different treatments. Micrographs in 40x magnification (Bars in 20 μ m scale). Significant p-value in the ANOVA test followed by Bonferroni ($\pm$ S.E.M. *** = $p < 0.0001$ compared to the control group).

3.4. Differential expression of anticancer and apoptosis target genes

The PCR array for drug targets evaluated 84 genes. From these, 6 genes showed decreased expression in the group that received intratumoral administration of conjugated nanoemulsion (NE-PcDoxo + PDT) compared to the control group (Table 1).

Table 1: Overview of the differentially expressed genes related to the response to antitumor drugs in the tumors after the NE-PcDoxo+PDT treatment.

Gene Symbol	Fold Regulation	p-value
<i>CDK2</i>	-2.33	0.028511
<i>ERBB2</i>	-2.07	0.035297
<i>FIGF</i>	-3.49	0.038872
<i>IGF2</i>	-3.50	0.008166
<i>PARP4</i>	-2.50	0.041034
<i>PGR</i>	-2.27	0.019876

Four essential pro-apoptotic genes showed significant overexpression with a fold change ≥ 2 : *ABL1*, *CD70*, *CRADD*, *FASL*, and *NME5*. In contrast, the anti-apoptotic genes *BCL2L10* and *NOL3* showed significantly decreased expression with fold change ≤ 2 (Table 2).

Table 2: Overview of the differentially expressed apoptosis genes in the tumors after the NE-PcDoxo+PDT treatment.

Gene Symbol	Fold Regulation	p-value
<i>ABL1</i>	6.13	0.005706
<i>BCL2L10</i>	-7.28	0.000273
<i>CD70</i>	2.90	0.002337
<i>CRADD</i>	2.19	0.002036
<i>FASL</i>	2.23	0.011397
<i>NME5</i>	2.44	0.029019
<i>NOL3</i>	-115.20	0.001693

4. Discussion

PDT has shown significantly effective against several types of cancer [6]. ROS generated by PDT can react with biomolecules, and the damage to them can (i) irreversibly damage the tumor cells resulting in necrosis, apoptosis or autophagy, (ii) cause tumor ischemia (vascular injury), (iii) and activate the immune response against tumor antigens. Apoptosis and necrosis share common activation pathways and this implies that inhibition of apoptosis redirects cells to necrosis so that cells are destroyed regardless of the mechanism involved [6].

Our results demonstrated that there was a tumor regression after NE-PcDoxo + PDT treatment at the same time that extensive necrosis was observed. Jurczyszyn et al. [16] showed that a porphyrin derivative (DTDB-PDT) was able to reduce the size and cause 83.3% of necrosis in 4T1 breast tumors. The tumor regression observed was more significant and may be explained by the long time from treatments until euthanasia and to the laser energy applied, which was higher. Photosensitizer porphyrin-derived + PDT led to histological changes correlated with acute necrosis with hyperchromic nuclei, karyolysis, pyknosis, and nuclear vacuoles in Walker tumors [17] and liposomal AlPc treatment for tongue tumors induced 90% of necrosis, characterized by an amorphous eosinophilic tissue without the integrity of the cytoplasmic membrane and absence of cell nucleus [18], both studies corroborating our findings.

The formation of blood vasculature is a mandatory step to sustain the influx of

essential nutrients to the tumor mass. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is a potent angiogenic factor, which receptors are expressed in endothelial and tumor cells, where it can protect cells from apoptosis and increase their resistance to conventional chemotherapy and radiation therapy [19]. Our treatment with NE-PcDoxo + PDT decreased VEGF expression, providing a good prognostic than conventional therapies currently used. Similar results was described after PDT regimen which reduced size of tumors and the spread of metastases [20].

Apoptosis is a complex programmed cell death that includes several cell pathways and is initiated through the activation of death receptors or mitochondrial release of cytochrome c [21]. Xenotransplanted mice with colorectal cancer showed an increase in caspase-3 after treatment with PDT using Pc4 photosensitizer [22], corroborating our results. There are *in vitro* studies describing this pattern after PDT for different photosensitizers in BC [23, 24]. Our study is unprecedented in the literature since it analyzes caspase-3 activity by immunohistochemistry *in vivo* using chemotherapeutic and photosensitizer association with PDT.

We found a significant decrease in Ki67 positive cells and these data corroborate previous *in vitro* results since it was observed that 4T1 cells stopped in the subG1 phase after treatment, and this protein is not expressed in this stage of cell cycle [12]. A study observed a significant decrease of Ki67 expression in mice with BC treated with doxorubicin and chlorine e6 nanoparticles + PDT [25] corroborating our findings. Another regimen of ALA-PDT can inhibit the proliferation of A431 and COLO-16 cells and promote apoptosis. These factors correlate with tumor size [26], as observed in our study after NE-PcDoxo + PDT application.

Essential drug target genes were downregulated after NE-PcDoxo + PDT: *CDK2*, *ERBB2*, and *IGF2*. Cyclin-dependent kinase 2 (Cdk2) is a critical enzyme in the transition of cells from G1 to S phase, and evidence indicates that *CDK2* promotes hyperproliferation and is associated with poor prognosis in multiple cancer cells [27]. Patel et al. [28] demonstrated that inhibition of *CDK2* induces a potent and durable response against breast cancer cells. The *ERBB2* gene (also known as *HER2* or *NEU*) is overexpressed in about 30% of breast cancers and disrupts standard cellular control mechanisms, generating aggressive tumor cells. High expression of *ERBB2* is correlated with concomitant overexpression of *FIGF* in breast cancer [29] and our treatment proposed led to negative regulation of this gene concomitantly with *FIGF*.

The insulin-like growth factor II (*IGF2*) is the most intrinsically regulated of all

characterized growth factors and it is well known for their mitogenic activities, so, IGFs can stimulate growth and differentiation in many tissues [30]. A study by Tominaga et al. [31] showed that *IGF2* overexpression increases the ability to initiate tumor in MCF7 cells. Therefore, a decrease in these genes expression after NE-PcDoxo + PDT confirm its efficiency.

Regarding the genes involved in the apoptosis pathway, *ABL1*, *CRADD*, *FASL*, *BCL2L10*, and *NOL3* are noteworthy in this study. The *ABL* oncogene encodes a tyrosine kinase distributed in the nucleus and cytoplasm of proliferating cells. In the nucleus, *c-ABL* activity is negatively regulated by the protein retinoblastoma and positively regulated by signs of DNA damage [32]. *CRADD* encodes an adapter protein containing a death domain (DD) motif similar to that of *FADD*. This protein recruits caspase 2 in cell death signal transduction complex, which includes tumor necrosis factor receptor 1 (TNFR1A) and RIPK1/RIP kinase; therefore, it acts by promoting apoptosis [33]. *FAS* (also known as Apo-1 or CD95), a potent member of the death receptor family, plays a crucial role in extrinsic apoptotic signaling in many cell types. Breast tumors exhibit negative *FAS* regulation or loss of function, conferring resistance to the death signals induced by the immune system [34]. The increased expression of these genes observed suggests cell death induction in breast tumors.

The B-cell lymphoma-2 protein family (BCL-2) is one of the primary regulators of apoptosis, and is located predominantly in mitochondria, the critical decision point of cytochrome c regulation and release [35]. *BCL2L10* is overexpressed in BC [36] and *NRH* homologous of *BCL2L10* was found to be overexpressed in >45% of a large cohort of invasive breast carcinomas, correlating with reduced metastasis-free survival and defined as a poor prognosis marker [37]. The *NOL3* gene encodes ARC protein (apoptosis repressor with CARD domain) and it has an anti-apoptotic function that regulates enzymatic activity of caspases -2,-8 and tumor suppressor protein p53, capable of specifically inhibiting both intrinsic and extrinsic cell death pathways [38]. Increased expression of *NOL3* was associated with glioblastoma progression due to decreased apoptosis [39] and the silencing of *NOL3* in BC mouse model led to a decrease in the primary tumor, limited the invasion and circulating cancer cells [40]. Therefore, NE-PcDoxo + PDT treatment was considerably able to decrease the expression of described genes, contributing to the activation of cell death pathways. These mechanisms are added to the promising results of the decrease in tumor volume and weight observed in the eligible treatment proposed.

5. Conclusion

Our results demonstrated tumor regression through apoptosis and extensive necrosis after NE-PcDoxo + PDT administration. Besides, we also observed a decrease in VEGF and Ki67 levels, decrease in some drug target genes expression, and an increase in the expression of genes involved in apoptosis pathway. Synergistic treatments involving photosensitizer and chemotherapy delivery plus PDT provided a good antitumor response. Thus, this combined therapy can considerably block tumor breast development, providing a better prognostic than conventional therapies currently used and is considered a promising solution among new targeted anti-tumor therapies.

Acknowledgments

The authors acknowledge the financial support of CAPES and FAPESP (M.F.C. FAPESP Process number 2015/16660-5 and A.C.T. and H.L.P. FAPESP Process number 2013/50181-1). M.T.M, thanks CAPES (Ph.D. project 88882.328486/2019-01) for their financial support. The author also thanks DMC – São Carlos, SP, Brazil, and Research and Education Center for Phototherapy in Health Science (NUPEN), São Carlos, SP, Brazil, for the adjustment and development of the light activation device used in this research.

Conflict of interest

The authors declare that they have no competing interests.

Supplementary Material

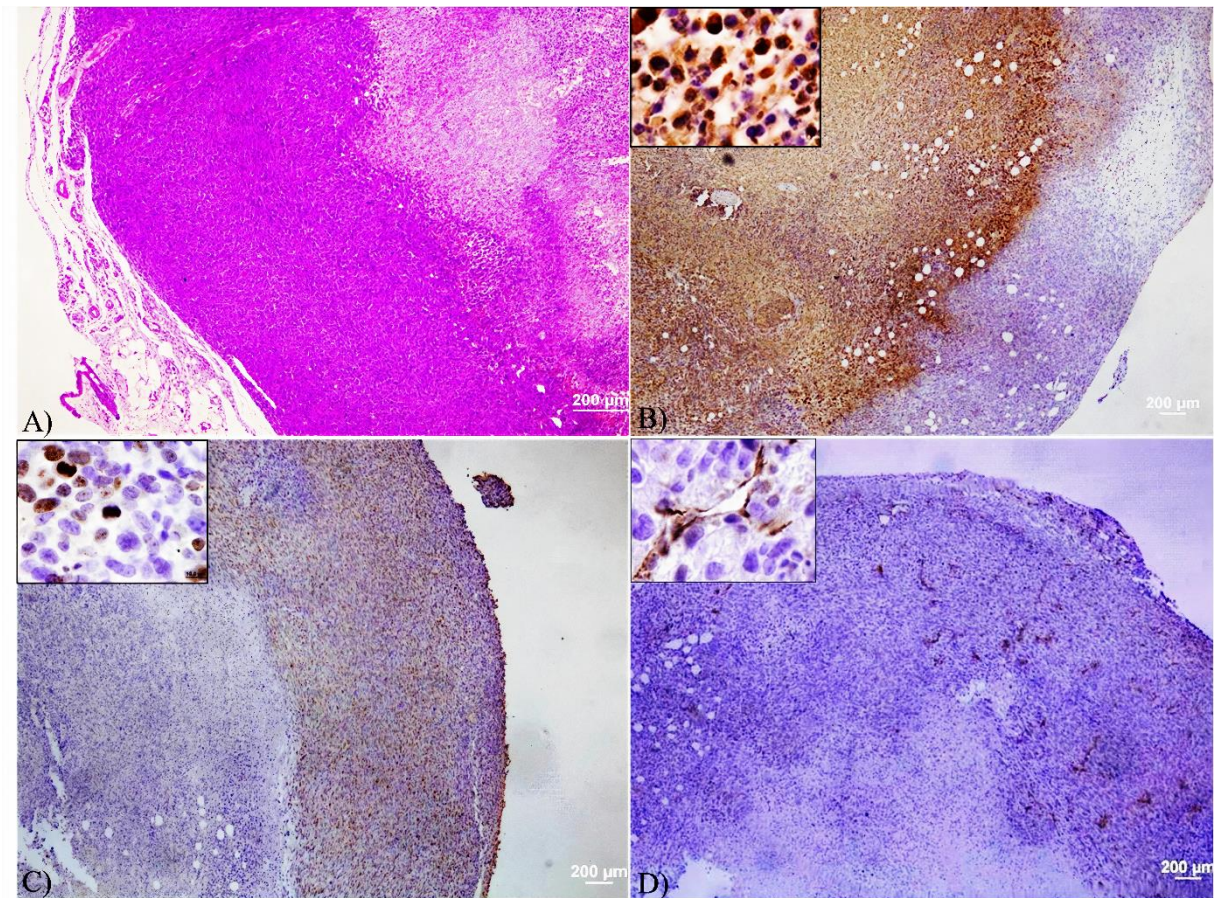


Figure S1: Histological section of a tumor after treatment with NE-PcDoxo + PDT. **A)** H&E staining in 4x magnification. **B)** Caspase-3 immunostaining showing cell death at the central region of the tumor, 4x and 100x magnification. **C)** Ki67 immunostaining showing proliferative cells in the periphery not overlapping Caspase-3 staining, being clearly separated, 4x and 100x magnification. **D)** CD31 immunostaining showing blood vessels only in the periphery of the tumor, 4x and 100x magnifications. Scale bars 200μm and 10μm, respectively.

References

1. Bray, F., et al., *Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries*. CA Cancer J Clin, 2018. **68**(6): p. 394-424.
2. McDonald, E.S., et al., *Clinical diagnosis and management of breast cancer*. Journal of Nuclear Medicine, 2016. **57**(Supplement 1): p. 9S-16S.
3. Tran, S., et al., *Cancer nanomedicine: a review of recent success in drug delivery*. Clinical and translational medicine, 2017. **6**(1): p. 1-21.
4. Lovelyn, C. and A.A. Attama, *Current state of nanoemulsions in drug delivery*. Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology, 2011. **2**(05): p. 626.
5. Oniszczyk, A., et al., *The potential of photodynamic therapy (PDT)—Experimental investigations and clinical use*. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2016. **83**: p. 912-929.
6. Robertson, C.A., D.H. Evans, and H. Abrahamse, *Photodynamic therapy (PDT): a short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT*. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 2009. **96**(1): p. 1-8.
7. Muehlmann, L.A., et al., *Aluminum-phthalocyanine chloride associated to poly (methyl vinyl ether-co-maleic anhydride) nanoparticles as a new third-generation photosensitizer for anticancer photodynamic therapy*. International journal of nanomedicine, 2014. **9**: p. 1199.
8. Christowitz, C., et al., *Mechanisms of doxorubicin-induced drug resistance and drug resistant tumour growth in a murine breast tumour model*. BMC cancer, 2019. **19**(1): p. 1-10.
9. Hu, Q., et al., *Recent advances of cocktail chemotherapy by combination drug delivery systems*. Advanced drug delivery reviews, 2016. **98**: p. 19-34.
10. Parhi, P., C. Mohanty, and S.K. Sahoo, *Nanotechnology-based combinational drug delivery: an emerging approach for cancer therapy*. Drug discovery today, 2012. **17**(17-18): p. 1044-1052.
11. Tabosa do Egito, E., et al., *New techniques for preparing submicronic emulsions: application to amphotericin B*. STP pharma sciences, 1994. **4**(2): p. 155-162.
12. Candido, N.M., et al., *Combining photodynamic therapy and chemotherapy: improving breast cancer treatment with nanotechnology*. Journal of biomedical nanotechnology, 2018. **14**(5): p. 994-1008.
13. Jardim-Perassi, B.V., et al., *Effect of melatonin on tumor growth and angiogenesis in xenograft model of breast cancer*. PloS one, 2014. **9**(1): p. e85311.
14. Bouzin, C., et al., *Digital pathology: elementary, rapid and reliable automated image analysis*. Histopathology, 2016. **68**(6): p. 888-96.

15. Weibel, E., *Principles and methods for the morphometric study of the lung and other organs*. Lab Invest, 1963. **12**: p. 131-155.
16. Jurczyszyn, K., et al., *Assessment of in vivo experiments: The newly synthesized porphyrin with proper light source enhanced effectiveness of PDT comparing to 5-ALA-mediated PDT*. Photodiagnosis Photodyn Ther, 2017. **18**: p. 179-184.
17. Laszlo, I.-P., et al., *The in vivo modulatory effects of Cornus mas extract on photodynamic therapy in experimental tumors*. Photodiagnosis and photodynamic therapy, 2020. **30**: p. 101656.
18. Longo, J.P.F., et al., *Photodynamic therapy with aluminum-chloro-phthalocyanine induces necrosis and vascular damage in mice tongue tumors*. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 2009. **94**(2): p. 143-146.
19. Goel, H.L. and A.M. Mercurio, *VEGF targets the tumour cell*. Nature Reviews Cancer, 2013. **13**(12): p. 871-882.
20. Lisnjak, I., et al., *Effect of photodynamic therapy on tumor angiogenesis and metastasis in mice bearing Lewis lung carcinoma*. Exp Oncol, 2005. **27**(4): p. 333-335.
21. Pettigrew, C.A. and T.G. Cotter, *Deregulation of cell death (apoptosis): implications for tumor development*. Discovery medicine, 2009. **8**(41): p. 61-63.
22. Whitacre, C.M., et al., *Photodynamic therapy with the phthalocyanine photosensitizer Pc 4 of SW480 human colon cancer xenografts in athymic mice*. Clinical Cancer Research, 2000. **6**(5): p. 2021-2027.
23. George, B.P., H. Abrahamse, and N.M. Hemmaragala, *Anticancer effects elicited by combination of Rubus extract with phthalocyanine photosensitiser on MCF-7 human breast cancer cells*. Photodiagnosis and photodynamic therapy, 2017. **19**: p. 266-273.
24. Machado, F.C., et al., *Effect of curcumin-nanoemulsion associated with photodynamic therapy in breast adenocarcinoma cell line*. Bioorganic & medicinal chemistry, 2019. **27**(9): p. 1882-1890.
25. Hu, D., et al., *Oxygen-generating hybrid polymeric nanoparticles with encapsulated doxorubicin and chlorin e6 for trimodal imaging-guided combined chemo-photodynamic therapy*. Theranostics, 2018. **8**(6): p. 1558.
26. Qiao, L., et al., *ALA-PDT inhibits proliferation and promotes apoptosis of SCC cells through STAT3 signal pathway*. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, 2016. **14**: p. 66-73.
27. Akli, S., et al., *Cdk2 is required for breast cancer mediated by the low-molecular-weight isoform of cyclin E*. Cancer research, 2011. **71**(9): p. 3377-3386.
28. Patel, P., et al., *Dual Inhibition of CDK4 and CDK2 via Targeting p27 Tyrosine Phosphorylation Induces a Potent and Durable Response in Breast Cancer Cells*. Mol Cancer Res, 2018. **16**(3): p. 361-377.

29. Yang, W., et al., *ErbB2 overexpression correlates with increased expression of vascular endothelial growth factors A, C, and D in human breast carcinoma*. Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society, 2002. **94**(11): p. 2855-2861.
30. Chao, W. and P.A. D'Amore, *IGF2: epigenetic regulation and role in development and disease*. Cytokine Growth Factor Rev, 2008. **19**(2): p. 111-20.
31. Tominaga, K., et al., *Addiction to the IGF2-ID1-IGF2 circuit for maintenance of the breast cancer stem-like cells*. Oncogene, 2017. **36**(9): p. 1276-1286.
32. Wang, J.Y., *Regulation of cell death by the Abl tyrosine kinase*. Oncogene, 2000. **19**(49): p. 5643-50.
33. Lo Muzio, L., et al., *Expression and prognostic significance of apoptotic genes in oral squamous cell carcinoma*. Mol Carcinog, 2014. **53**(4): p. 264-71.
34. Wang, W., et al., *Polymorphisms of the FAS and FASL genes and risk of breast cancer*. Oncology letters, 2012. **3**(3): p. 625-628.
35. Opferman, J.T. and A. Kothari, *Anti-apoptotic BCL-2 family members in development*. Cell Death & Differentiation, 2018. **25**(1): p. 37-45.
36. Krajewska, M., et al., *Bcl-B expression in human epithelial and nonepithelial malignancies*. Clinical Cancer Research, 2008. **14**(10): p. 3011-3021.
37. Nougarede, A., et al., *Breast Cancer Targeting through Inhibition of the Endoplasmic Reticulum-Based Apoptosis Regulator Nr1h3/BCL2L10*. Cancer Res, 2018. **78**(6): p. 1404-1417.
38. Kung, G., et al., *A novel role for the apoptosis inhibitor ARC in suppressing TNF α -induced regulated necrosis*. Cell Death & Differentiation, 2014. **21**(4): p. 634-644.
39. Ziegler, D.S., et al., *Resistance of human glioblastoma multiforme cells to growth factor inhibitors is overcome by blockade of inhibitor of apoptosis proteins*. J Clin Invest, 2008. **118**(9): p. 3109-22.
40. Medina-Ramirez, C.M., et al., *Apoptosis inhibitor ARC promotes breast tumorigenesis, metastasis, and chemoresistance*. Cancer Res, 2011. **71**(24): p. 7705-15.

CAPÍTULO 3

6. CONCLUSÕES

No estudo *in vivo* para análise da eficiência do tratamento sinérgico proposto, independente do tempo de tratamento e doses de irradiação, conclui-se que após administração de NE-PcDoxo + TFD ocorreram:

- Regressão tumoral por apoptose e extensa necrose após administração de NE-PcDoxo + TFD;
- Diminuição dos níveis de VEGF e Ki67, sugestivos de colapso vascular e diminuição do índice mitótico, respectivamente;
- Diminuição da expressão de genes-alvo de fármacos;
- Aumento da expressão de genes envolvidos na via de apoptose.

Diante do exposto, os tratamentos sinérgicos envolvendo fotossensibilizador e administração de quimioterapia mais TFD forneceram uma significativa resposta antitumoral. Assim, sugere-se que esta terapia combinada pode bloquear consideravelmente o desenvolvimento do tumor mamário, proporcionando um melhor prognóstico do que as terapias convencionais utilizadas atualmente e é considerada uma solução promissora entre as novas terapias antitumorais direcionadas.

7. REFERÊNCIAS

- AGOSTINIS, P. et al. Photodynamic therapy of Cancer: an update. **CA Cancer J Clin.**, v. 61, n. 1, p. 250-281, 2011.
- AKRAM, M. et al. Tailoring of Au-TiO₂ nanoparticles conjugated with doxorubicin for their synergistic response and photodynamic therapy applications. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 384, n. 1, pp. 112040, 2019.
- ALBERTS, B. et al. **Biologia molecular da célula**. 6ª Edição. Porto Alegre: Artmed, 2017.
- ALBERTS, B. et al. **Fundamentos da Biologia Celular**. 3ª Edição. Porto Alegre: Artmed, 2011.
- ALI, S. et al. Effective phthalocyanines mediated photodynamic therapy with doxorubicin or methotrexate combination therapy at sub-micromolar concentrations *in vitro*. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 22, n. 1, pp. 51-64, 2018.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. **Cancer facts & figures 2017**. Disponível em: <<https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/annual-cancer-facts-and-figures/2017/cancer-facts-and-figures-2017.pdf>>. Acesso em: 25 jan. 2020.
- ARIFFIN, A. et al. Releasing pressure in tumors: what do we know so far and where do we go from here? A review. **Cancer Res**, v. 74, n. 10, pp. 2655-62, 2014.
- AUGUSTINE, R. et al. Imaging cancer cells with nanostructures: Prospects of nanotechnology driven non-invasive cancer diagnosis. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 294, n. 1, p. 102457, 2021.
- BANDAK, S. et al. Reduced UV-induced degradation of doxorubicin encapsulated in polyethyleneglycol-coated liposomes. **Pharmaceutical Research**, v. 16, n.6, pp. 841-846, 1999.
- BANERJEE, S.M. et al. Photodynamic therapy: Inception to application in breast cancer. **The Breast**, v. 31, n. 1, p. 105-113, 2017.
- BARZAMAN, K. et al. Breast cancer: Biology, biomarkers, and treatments. **International Immunopharmacology**, v. 84, n. 1, p. 106535, 2020.
- BASPINAR, Y. et al. Curcumin and piperine loaded zein-chitosan nanoparticles: Development and in-vitro characterization. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 26, n. 1, pp. 323-334, 2018.
- BAZYLINSKA U. et al. Nanoemulsion-templated multilayer nanocapsules for cyanine-type photosensitizer delivery to human breast carcinoma cells. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 47, n. 1, p. 406-420, 2012.
- BENNETT, R. L.; LICHT, J. D. Targeting Epigenetics in Cancer. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 58, p. 187-207, 2018.
- BERTUCCI, F. et al. How basal are triple-negative breast cancers? **International Journal of Cancer**, v. 123, n. 1, p. 236-240, 2008.
- BOIX-MONTESINOS, P. et al. The past, present, and future of breast cancer models for nanomedicine development. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 173, n. 1, p. 306-330, 2021.

BOUZIN, C. et al., Digital pathology: elementary, rapid and reliable automated image analysis. **Histopathology**, v. 68, n. 6, pp. 888-896, 2016.

BRANNON-PEPPAS, L.; BLANCHETTE, J.O. Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. **Adv Drug Deliver Rev**, v. 64, n.1, p. 206-212, 2012.

BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, Hoboken, v. 68, n. 6, p. 394-424, Nov. 2018.

BRODIN, N.P. et al. Photodynamic therapy and its role in combined modality anticancer treatment. **Technol. Cancer Res. Treat.**, v. 14, n. 4, p. 355-368, 2015.

CAMERIN, M. et al. Delivery of a hydrophobic phthalocyanine photosensitizer using PEGylated gold nanoparticle conjugates for the in vivo photodynamic therapy of amelanotic melanoma. **Photochem Photobiol Sci**, v. 15, n. 5, pp. 618-625, 2016.

CANDIDO, N. et al. Combining photodynamic therapy and chemotherapy: improving breast cancer treatment with nanotechnology. **Journal of biomedical nanotechnology**. V. 14, n. 5, pp. 994-1008, 2018.

CARDAMA, G. A. et al. Rho GTPases as therapeutic targets in cancer (Review). **Int J Oncol.**, v. 51, n. 4, p.1025-1034, 2020.

CARDIFF, R. D. et al. Mammary Gland. In: **Comparative Anatomy and Histology**, 2th ed., pp. 487–509, 2018.

CASTILHO-FERNANDES, A. et al. Photodynamic process induced by chloro-aluminum phthalocyanine nanoemulsion in glioblastoma. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 19, n. 1, p. 221-228, 2017.

CHANG-QING, Y. et al. Recent treatment progress of triple negative breast câncer. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 151, n. 1, p. 40-53, 2020.

CHEN, G. et al. Advances in cancer theranostics using organic-inorganic hybrid nanotechnology. **Applied Materials Today**, v. 23, n. 1, p. 101003, 2021.

CHENG, L. et al. Functional Nanomaterials for Phototherapies of Cancer. **Chem Rev**, v. 114, n. 21, p. 10869–10939, 2014.

CHRISTOWITZ, T. et al. Mechanisms of doxorubicin-induced drug resistance and drug resistant tumour growth in a murine breast tumour model. **BMC Cancer**, v. 19, n. 757, 2019.

CHUDY, M. et al. Lab-on-a-chip systems for photodynamic therapy investigations. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 101, n. 1, p. 37-51, 2018.

CIRIELLO, G.; MAGNANI, L. The many faces of cancer evolution. **iScience**, v. 24, n. 5, p. 102403, 2021.

CLAYTON, N. S; RIDLEY, A. J. Targeting Rho GTPase Signaling Networks in Cancer. **Front. Cell Dev. Biol.**, v. 8, n. 1, p. 222, 2020.

D'ANGELO, N. et al. Development of PEG-PCL-based polymersomes through design of experiments for co-encapsulation of vemurafenib and doxorubicin as chemotherapeutic drugs. **Journal of Molecular Liquids**, *in press corrected proof*, pp.118166, 2021.

DANIELL, M. D.; HILL, J. S. A history of photodynamic therapy. **Aust N Z J Surg**, v. 61, n. 5, p. 340-348, 1991.

DARTIER, J. et al. ATP-dependent activity and mitochondrial localization of drug efflux pumps in doxorubicin-resistant breast cancer cells. **Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.**, v. 1861, n. 1, pp. 1075-1084, 2017.

D'HALLEWIN, M. et al. Photodynamic therapy with intratumoral administration of Lipid-Based mTHPC in a model of breast cancer recurrence. **Lasers Surg Med**, v. 40, n. 8, pp. 543-9, 2008.

DLUGASZEWSKA, J. et al. Antimicrobial and anticancer photodynamic activity of a phthalocyanine photosensitizer with N-methyl morpholinumethoxy substituents in nonperipheral positions. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 172, n. 1, p. 67-79, 2017.

DOUGHERTY, T. J. et al. Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors. **Cancer Res**, v. 38, n. 8, p. 2628-2635, 1978.

DOUGHERTY, T. J. Photodynamic therapy - new approaches. **Semin Surg Oncol**, v. 5, n. 1, p. 6-16, 1989.

DOUSTVANDI, M. et al. Photodynamic therapy using zinc phthalocyanine with low dose of diode laser combined with doxorubicin is a synergistic combination therapy for human SK-MEL-3 melanoma cells. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 28, n. 1, pp. 88-97, 2019.

ELBAYOUMI, T.A.; TORCHILIN, V.P. Tumor-targeted nanomedicines: enhanced antitumor efficacy in vivo of doxorubicin-loaded, long-circulating liposomes modified with cancer-specific monoclonal antibody. **Clin Cancer Res**, v. 15, n. 6, p. 1973-1980, 2009.

ETCHEVERRY, M. E. et al. Photodynamic therapy in fibrosarcoma BALB/c animal model: Observation of the rebound effect. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 21, n. 1, p. 98-107, 2018.

FERLAY, J. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **International Journal of Cancer**, Genève, v. 136, n. 5, p. 359-386, 2015.

FRANCHI, L.P. et al. In vitro effects of photodynamic therapy induced by chloroaluminum phthalocyanine nanoemulsion. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 16, n. 1, p. 100-105, 2016.

GEETIKA, A. et al. A Breast Cancer Review: Through the Eyes of the Doctor, Nurse, and Patient. **Journal of Radiology Nursing**, v. 36, n. 3, p. 158-165, 2017.

GROBMYER, S.R. et al. Nanoparticle delivery for metastatic breast cancer. **Maturitas**, v. 73, n. 1, p. 19-26, 2012.

HAHN, W. C. et al. An expanded universe of cancer targets. **Cell**, v. 184, n. 5, p. 1142-1155, 2021.

HARBECK, N. et al. Breast cancer. **Nat Rev Dis Primers**, v. 5, n. 1, p. 019-0111, 2019.

HE, Z. et al. Nano-delivery vehicle based on chlorin E6, photodynamic therapy, doxorubicin chemotherapy provides targeted treatment of HER-2 negative, $\alpha\beta$ 3-positive breast cancer. **Pharmacological Research**, v. 160, n. 1, pp. 105184, 2020.

HELDIN, C. et al. High interstitial fluid pressure - an obstacle in cancer therapy. **Nat Rev Cancer**, v. 4, n. 10, pp. 806-813, 2004.

HONG, E. J. et al. Targeted and effective photodynamic therapy for cancer using functionalized nanomaterials. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 6, n. 4, p. 297-307, 2016.

HÖRMANN, K.; ZIMMER, A. Drug delivery and drug targeting with parenteral lipid nanoemulsions - A review. **Journal of Controlled Release**, v. 223, n. 1, p. 85-98, 2016.

HOSNI, M. et al. Reviewing ensemble classification methods in breast câncer. **Computer Methods and Programs in Biomedicine**, v. 177, n. 1, p. 89-112, 2019.

HU, Q. et al. Recent advances of cocktail chemotherapy by combination drug delivery systems. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 98, n. 1, p. 19-34, 2016.

INCA – Instituto Nacional do Câncer. Estadiamento: Disponível em: < <https://www.inca.gov.br/estadiamento>>. Acesso em: 18/11/2019.

INCA - Instituto Nacional do Câncer. Ministério da saúde. Estimativa 2020: Incidência de câncer no Brasil. Disponível em: < <http://www.inca.gov.br/estimativa/2020/estimativa-2020.pdf> >. Acesso em: 03 mar. 2020.

JARDIM-PERASSI, B. et al. Effect of melatonin on tumor growth and angiogenesis in xenograft model of breast cancer. **PloS one**, v. 9, n. 1, pp. e85311, 2014.

JI, Y. et al. Direct quantitation of free, encapsulated, total doxorubicin and doxorubicinol in stabilized frozen human plasma to support a BE study of liposomal doxorubicin. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.189, n. 1, pp. 113388, 2020.

JIANG, W.G. et al. Tissue invasion and metastasis: Molecular, biological and clinical perspectives. **Seminars in Cancer Biology**, v. 35, n. 1, p. S244-S275, 2015.

JIN, S.; YE, K. Targeted drug delivery for breast cancer treatment. **Recent Pat Anticancer Drug Discov**, v. 8, n. 2, p. 143-153, 2013.

KAMMERER, E. et al. Proton therapy for locally advanced breast cancer: A systematic review of the literature. **Cancer Treatment Reviews**, v. 63, n. 1, p. 19-27, 2018.

KAST, K.; RHIEM, K. Familial Breast Cancer - Targeted Therapy in Secondary and Tertiary Prevention. **Breast Care**, v. 10, n. 1, p. 27-31, 2015.

KATO, H. History of photodynamic therapy - past, present and future. **Gan To Kagaku Ryoho**, v. 23, n. 1, p. 8-15, 1996.

KESSEL, D. Death pathways associated with photodynamic therapy. **Med Laser Appl**, v. 21, n. 4, p. 219-224, 2006.

KHOSRAVI-FAR, R. et al Activation of Rac1, RhoA, and mitogen-activated protein kinases is required for Ras transformation. **Mol Cell Biol.**, v. 15, n. 1, p. 6443-6453, 1995.

KLOCHKOV, S. G. et al. Implications of nanotechnology for the treatment of cancer: Recent advances. **Seminars in Cancer Biology**, v. 69, n. 1, p. 190-199, 2021.

KOSTIV, U. et al. Phthalocyanine-Conjugated Upconversion NaYF₄:Yb(3+)/Er(3+) @SiO₂ Nanospheres for NIR-Triggered Photodynamic Therapy in a Tumor Mouse Model.

ChemMedChem, v. 12, n. 24, pp. 2066-2073, 2017.

KUBIAK, M. et al. Cell reactions and immune responses to photodynamic therapy in oncology. **Postepy Hig. Med. Dosw.**, v. 70, n. 1, p. 735-742, 2016.

LEANDRO, F. Z. et al. Evaluation of theranostic nanocarriers for near-infrared imaging and photodynamic therapy on human prostate cancer cells. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 154, n. 1, p. 341-349, 2017.

LEE, M. V. et al. BRCA-associated cancers: Role of imaging in screening, diagnosis, and management. **Radiographics**, v. 37, n. 1, p. 1005-1023, 2017.

LEUNIG, M. et al. Photodynamic therapy-induced alterations in interstitial fluid pressure, volume and water content of an amelanotic melanoma in the hamster. **Br J Cancer**, v. 69, n. 1, pp. 101-113, 1994.

LODISH, H. et al. **Molecular Cell Biology**, 4, ed. Ed. W. H. Freeman, Nova Iorque, 2000.

LONGO, J.P.F. et al. Photodynamic therapy with aluminum-chloro-phthalocyanine induces necrosis and vascular damage in mice tongue tumors. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 94, n. 2, p. 143-146, 2009.

LONGO, J.P.F. et al. Prevention of distant lung metastasis after photodynamic therapy application in a breast cancer tumor model. **J Biomed Nanotechnol.**, v. 12, n. 1, p. 689-699, 2016.

LÓPEZ-MARÍN, N. et al. In silico modelling of apoptosis induced by photodynamic therapy. **Journal of Theoretical Biology**, v. 436, n. 1, p. 8-17, 2018.

LUO, D. et al. Doxorubicin encapsulated in stealth liposomes conferred with light-triggered drug release. **Biomaterials**, v. 75, n. 1, p. 193-202, 2016.

LV, Z. et al. Rac1/AK1 signaling promotes epithelial-mesenchymal transition of podocytes in vitro via triggering β -catenin transcriptional activity under high glucose conditions. **Int J Biochem Cell Biol**. V. 45, n. 1, p. 255-264, 2013.

MAEDA, H. et al. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. **J Control Release**, v. 65, n. 1-2, p. 271-284, 2000.

MENDES, S. et al. Uptake by breast carcinoma of a lipidic nanoemulsion after intralesional injection into the patients: a new strategy for neoadjuvant chemotherapy. **Gynecol Oncol**, v. 112, n. 2, pp. 400-4, 2009.

MIAO, L. et al. Nanoformulations for combination or cascade anticancer therapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 115, n. 1, p. 3-22, 2017.

MORAES, M. et al. Effects of photodynamic therapy mediated by nanoemulsion containing chloro-aluminum phthalocyanine: a histologic and immunohistochemical study in human gingiva. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 12, n. 1, p. 592-597, 2015.

MUEHLMANN, L. A. et al. Aluminum-phthalocyanine chloride associated to poly(methyl vinyl ether-co-maleic anhydride) nanoparticles as a new third-generation photosensitizer for anticancer photodynamic therapy. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, n. 1, p. 1199-1213, 2014.

NASCIMENTO, R.G.; OTONI, K. M. Histological and molecular classification of breast cancer: what do we know? **Mastology**, v. 30, n. 1, p. e20200024, 2020.

NAYAK, D. et al. Quinacrine and curcumin synergistically increased the breast cancer stem cells death by inhibiting ABCG2 and modulating DNA damage repair pathway. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 119, n. 1, pp. 105682, 2020.

NGUYEN, H. et al. Incorporation of chemotherapeutic agent and photosensitizer in a low temperature-sensitive liposome for effective chemo-hyperthermic anticancer activity. **Expert Opin Drug Deliv**, v. 14, n. 2, pp. 155-164, 2017.

NÚÑEZ et al. An overview of the effective combination therapies for the treatment of breast cancer. **Biomaterials**, v. 97, n. 1, p. 34-50, 2016.

O'BRIEN, M. et al. Reduced cardiotoxicity and comparable efficacy in a phase III trial of pegylated liposomal doxorubicin HCl (CAELYX/Doxil) versus conventional doxorubicin for first-line treatment of metastatic breast cancer. **Ann. Oncol.**, v. 15, n. 3, pp. 440-449, 2004.

ONAFUYE, H. et al. Doxorubicin-loaded human serum albumin nanoparticles overcome transporter-mediated drug resistance in drug-adapted cancer cells. **Beilstein J. Nanotechnol.**, v.10, n. 1, pp. 1707-1715, 2019.

ONISZCZUK, A. et al. The potential of photodynamic therapy (PDT) - Experimental investigations and clinical use. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 83, n. 1, p. 912-929, 2016.

PARHI, P. C. et al. Nanotechnology-based combinational drug delivery: an emerging approach for cancer therapy. **Drug Discov. Today**, v.17, n. 1, p. 1044-1052, 2012.

PAULA, C. S. et al. Chloroaluminium phthalocyanine polymeric nanoparticles as photosensitisers: Photophysical and physicochemical characterisation, release and phototoxicity *in vitro*. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 49, n. 3, p. 371-381, 2013.

PENG, J. et al. Hollow silica nanoparticles loaded with hydrophobic phthalocyanine for near-infrared photodynamic and photothermal combination therapy. **Biomaterials**, v. 34, n. 32, pp. 7905-7912, 2013.

PEROU, C.M. et al. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 747-752, 2000.

PHI, L. et al. Cancer stem cells (CSCs) in drug resistance and their therapeutic implications in cancer treatment. **Stem Cells Int.**, v. 2018, n. 1, pp. 1-16, 2018.

PORTILHO, F. A. et al. Antitumor activity of photodynamic therapy performed with nanospheres containing zinc-phthalocyanine. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 11, n. 41, p.1-14, 2013.

PORTO-MASCARENHAS, E. C. Salivary biomarkers in the diagnosis of breast cancer: A review. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 110, n. 1, p. 62-73, 2017.

QIN, S. Y. et al. Drug self-delivery systems for cancer therapy. **Biomaterials**, v. 112, n.1, p. 234-247, 2017.

QIU, R.G. et al. A role for Rho in Ras transformation. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 92, n. 1, p.11781-11785, 1995.

RAI, V. K. et al. Nanoemulsion as pharmaceutical carrier for dermal and transdermal drug delivery: Formulation development, stability issues, basic considerations and applications. **Journal of Controlled Release**, v. 270, n. 1, p. 203-225, 2018.

RICCI-JUNIOR, E. et al. Nanocarriers as phototherapeutic drug delivery system: Appraisal of three different nanosystems in an *in vivo* and *in vitro* exploratory study. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 21, n. 1, p. 43-49, 2018.

ROBISON, J.E; PERREARD, L.; BERNARD, P.S. State of the science: molecular classifications of breast cancer for clinical diagnostics. **Clinical Biochemistry**, v. 37, n. 7, p. 572-578, 2004.

RODRIGUES, M. C. Photodynamic therapy mediated by aluminium-phthalocyanine nanoemulsion eliminates primary tumors and pulmonary metastases in a murine 4T1 breast adenocarcinoma model. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 204, n. 1, p. 111808, 2020.

RUI, Lei-Lei. et al. Functional organic nanoparticles for photodynamic therapy. **Chinese Chemical Letters**, v. 27, n. 8, p. 1412-1420, 2016.

RUSSO et al. Comparative Study of Human and Rat Mammary Tumorigenesis. **Pathology Reviews**, pp. 217-251, 1990.

SABINA, Y. et al. New insights into the activities and toxicities of the old anticancer drug doxorubicin. **The FEBS Journal**, v. 288, n. 21, pp. 6095-6111, 2021.

SAHAI, E.; MARSHALL, C.J. Differing modes of tumour cell invasion have distinct requirements for Rho/ROCK signalling and extracellular proteolysis. **Nat Cell Biol.**, v. 5, n. 1, p. 711-719, 2003.

SHAPIRA, A. et al. Nanomedicine for targeted cancer therapy: Towards the overcoming of drug resistance. **Drug Resistance Updates**, v. 14, n. 1, p. 150-163, 2011.

SHERIEN, M. et al. The role of microRNAs in photodynamic therapy of cancer. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 142, n. 1, p. 550-555, 2017.

SHI, X. et al. Chondroitin sulfate-based nanoparticles for enhanced chemo-photodynamic therapy overcoming multidrug resistance and lung metastasis of breast cancer. **Carbohydrate Polymers**, v. 254 n. 1, pp. 117459, 2021.

SINGH, Y. et al. Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 252, n. 1, p. 28-49, 2017.

SORLIE, T. et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 98, n. 19, p. 10869-10874, 2001.

SORLIE, T. et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. **Proc Natl Acad Sci**, v. 100, n. 14, p. 8418-8423, 2003.

STEWART, B. W.; WILD, C. P. (Ed.). **World Cancer Report: 2014**. Lyon: IARC, 2014.

SUN, Y.S. et al. Risk Factors and Preventions of Breast Cancer. **Int J Biol Sci**, v. 13, n. 1, p. 1387-1397, 2017.

TABOSA DO EGITO, E. et al. New techniques for preparing submicronic emulsions: application to amphotericin B. **STP pharma sciences**, v. 4, n. 2, pp. 155-162, 1994.

TANG, Y. et al. Classification, Treatment Strategy, and Associated Drug Resistance in Breast Cancer. **Clinical Breast Cancer**, v. 16, n. 5, p. 335-343, 2016.

TAO, K. et al. Imagable 4T1 model for the study of late stage breast cancer. **BMC Cancer**, v. 8, p. 228, 2008.

THOMPSON & THOMPSON. **Genética e câncer**. In: Genética Médica. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2002.

VIOR, M. C. G. et al. A comparative study of a novel lipophilic phthalocyanine incorporated into nanoemulsion formulations: photophysics, size, solubility and thermodynamic stability. **Dyes and Pigments**, v. 91, n. 1, p. 208-214, 2011.

WACHOWSKA, M. et al. Immunological aspects of antitumor photodynamic therapy outcome. **Cent. Eur. J. Immunol.**, v. 40, n. 1, p. 481-485, 2015.

WANG, Y. et al. Graphene oxide covalently grafted upconversion nanoparticles for combined NIR mediated imaging and photothermal/photodynamic cancer therapy. **Biomaterials**, v. 34, n. 31, pp. 7715-7724, 2013.

WANG, Y. et al. Sequentially self-assembled polysaccharide-based nanocomplexes for combined chemotherapy and photodynamic therapy of breast cancer. **Carbohydrate Polymers**, v. 203, n. 1, pp. 203-213, 2019.

WEIBEL, E. Principles and methods for the morphometric study of the lung and other organs. **Lab Invest**, v. 12, n. 1, pp. 131-155, 1963.

WENNINGMANN, N. et al. Insights into doxorubicin-induced cardiotoxicity: molecular mechanisms, preventive strategies, and early monitoring. **Molecular Pharmacology**, v. 96, n. 2, pp. 219-232, 2019.

YONCHEVA, K. et al. Encapsulation of doxorubicin in chitosan-alginate nanoparticles improves its stability and cytotoxicity in resistant lymphoma L5178 MDR cells. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 59, n. 1, pp. 101870, 2020.

ZAFAR, A. et al. Novel nanotechnology approaches for diagnosis and therapy of breast, ovarian and cervical cancer in female: A review. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 61, n. 1, p. 102198, 2021.

ZHANG, J. et al. An updated overview on the development of new photosensitizers for anticancer photodynamic therapy. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, In Press, Corrected Proof, September 2017.

ZHANG, R.X. et al. Nanomedicine of synergistic drug combinations for cancer therapy - strategies and perspectives. **J. Control. Release**, v. 240, n. 1, p. 489–503, 2016.