

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

MARIANA LÔBO MOREIRA

Detecção de espécies reativas de oxigênio em células tumorais mamárias durante terapia
fotodinâmica por meio de ressonância paramagnética eletrônica

BRASÍLIA
2024

MARIANA LÔBO MOREIRA

Detecção de espécies reativas de oxigênio em células tumorais mamárias durante terapia
fotodinâmica por meio de ressonância paramagnética eletrônica

Dissertação apresentada como requisito parcial
obrigatório para obtenção do título de Mestre pelo
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas da Faculdade de Ciências da Saúde da
Universidade de Brasília.

Orientadora: Prof.^a Dra. Fabiane Hiratsuka Veiga de
Souza

BRASÍLIA

2024

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de ensino, estudo ou pesquisa, desde que citada a fonte.

Ld Lôbo Moreira , Mariana
 Detecção de espécies reativas de oxigênio em células
 tumorais mamárias durante terapia fotodinâmica por meio de
 ressonância paramagnética eletrônica / Mariana Lôbo
 Moreira ; orientador Fabiane Hiratsuka Veiga de Souza. --
 Brasília, 2024.
 62 p.

 Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) --
 Universidade de Brasília, 2024.

 1. Espécies Reativas de Oxigênio. 2. Ressonância
 Paramagnética Eletrônica. 3. Terapia Fotodinâmica. 4. Azul
 de metileno. I. Hiratsuka Veiga de Souza, Fabiane , orient.
 II. Título.

Mariana Lôbo Moreira

Detecção de espécies reativas de oxigênio em células tumorais mamárias durante terapia fotodinâmica por meio de ressonância paramagnética eletrônica

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 29 de outubro de 2024.

Banca Examinadora

Prof.^a Dra. Fabiane Hiratsuka Veiga de Souza – Universidade de Brasília

Prof. Dr. Luis Alexandre Muehlmann – Universidade de Brasília

Prof. Dr. Lucas Danilo Dias – Unievangélica

Agradecimentos

A conclusão deste trabalho representa um marco significativo na minha trajetória acadêmica e profissional. É com o coração repleto de gratidão que reconheço e agradeço a todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a realização desta conquista.

À Deus, rendo meu sincero agradecimento. A Tua mão sempre esteve presente, conduzindo-me com fé e determinação até a concretização desta conquista.

Aos meus pais, Marcos e Amélia, expresso a minha mais profunda gratidão. Vocês sempre foram meu alicerce, oferecendo amor incondicional e apoio inestimável. Obrigada por me trazerem até aqui. Ao meu irmão, Eduardo, meu eterno companheiro e confidente. Sua amizade e apoio foram fontes de inspiração e motivação.

Aos amigos e familiares, que torceram e acompanharam de perto cada passo desta jornada, muito obrigada. A presença de cada um de vocês, seja através de palavras, orações ou gestos, foi fundamental neste processo.

À minha orientadora, Fabiane, deixo o meu eterno agradecimento. Agradeço por expandir minha visão além da pesquisa acadêmica, demonstrando a nobreza da docência e seu poder transformador na vida das pessoas. Sua dedicação e paixão pela ciência são verdadeiramente inspiradoras.

Aos colaboradores, Prof. Dr. Paulo Eduardo Narcizo de Souza, Prof.^a Dr^a Sônia Nair Bão e Prof.^a MSc Giovanna de Carvalho, muito obrigada. Esse agradecimento decorre principalmente do comprometimento e da prontidão com que se dispuseram a contribuir com o meu trabalho.

À Universidade de Brasília, especificamente, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, agradeço pela oportunidade de realizar pesquisa científica.

Aos meus gestores, Izabel e Gustavo, agradeço pela compreensão e suporte. A liderança empática e o olhar atento às necessidades e interesses individuais foram determinantes para minha evolução nesta jornada.

Minha fórmula para a grandeza de um ser humano é o *amor fati*: que ninguém queira nada diferente, nem para frente, nem para trás, nem por toda a eternidade. Não meramente suportar o que é necessário, ainda menos escondê-lo...mas amá-lo.

Friedrich Nietzsche

Resumo

A terapia fotodinâmica (TFD) tem se mostrado promissora no tratamento de diversos tipos de câncer, incluindo o de mama. Essa abordagem se baseia na interação entre um fotossensibilizador, luz e oxigênio molecular. O fotossensibilizador ativado pela luz reage com o oxigênio molecular presente nas células, gerando espécies reativas de oxigênio (ERO), que são altamente tóxicas para as células cancerosas, levando à sua destruição. Por muitos anos, o oxigênio singleto foi considerado a principal ERO envolvida na TFD. Entretanto, o papel dos radicais centrados em oxigênio, como o superóxido, tem sido discutido com mais frequência em protocolos de TFD. O objetivo deste estudo foi padronizar um método de detecção de radical superóxido por ressonância paramagnética eletrônica (RPE), utilizando marcadores de spin da classe das hidroxilaminas cíclicas, em cultura de células tumorais mamárias submetidas à TFD. Utilizamos azul de metileno como agente fotossensibilizador em células murinas 4T1, gerando ERO mediante ativação com luz de LED de 660 nm. A detecção da produção total de ERO foi feita com o marcador de spin CMH, que é permeável à célula e que, após reação com estes radicais, gera um sinal de nitróxido que pode ser quantificado por espectroscopia de RPE. Os resultados demonstraram que, após a irradiação com luz de LED, o azul de metileno promoveu um aumento de cinco vezes na produção total de ERO em células tumorais. O pré-tratamento das células com superóxido dismutase (SOD) impermeável promoveu atenuação na concentração de nitróxido em 53,9%, fornecendo estimativa da produção extracelular de radical superóxido. Já a formação intracelular de superóxido foi estimada pelo tratamento com PEG-SOD, que é permeável às células. Confirmamos a utilidade do marcador de spin específico mitocondrial mito-TEMPO-H em células 4T1 para medir o aumento de 243% da formação do superóxido mitocondrial gerado após TFD. Em conclusão, foi possível estabelecer um protocolo de detecção de superóxido em diferentes compartimentos celulares após TFD, envolvendo a combinação de marcadores de spin e enzimas com diferentes permeabilidades celulares e marcadores de spin projetados para acumular-se rapidamente nas mitocôndrias, permitindo a obtenção de informações exclusivas sobre a localização da produção de superóxido.

Abstract

Photodynamic therapy (PDT) has shown promise in the treatment of several types of cancer, including breast cancer. This approach is based on the interaction between a photosensitizer, light and molecular oxygen. The light-activated photosensitizer reacts with molecular oxygen present in cells, generating reactive oxygen species (ROS), which are highly toxic to cancer cells, leading to their destruction. For many years, singlet oxygen was considered the main ROS involved in PDT. However, the role of oxygen-centered radicals, such as superoxide, has been discussed more frequently in PDT protocols. The aim of this study was to standardize a method for detecting superoxide radicals by electron paramagnetic resonance (EPR), using spin labels of the cyclic hydroxylamine class, in cultured mammary tumor cells subjected to PDT. We used methylene blue as a photosensitizing agent in murine 4T1 cells, generating ROS upon activation with 660 nm LED light. Total ROS production was detected using the spin marker CMH, which is cell-permeable and, after reacting with these radicals, generates a nitroxide signal that can be quantified by EPR spectroscopy. The results demonstrated that, after irradiation with LED light, methylene blue promoted a five-fold increase in total ROS production in tumor cells. Pretreatment of cells with impermeable superoxide dismutase (SOD) promoted a 53.9% attenuation in nitroxide concentration, providing an estimate of extracellular superoxide radical production. Intracellular superoxide formation was estimated by treatment with PEG-SOD, which is cell-permeable. We confirmed the usefulness of the mitochondrial-specific spin marker mito-TEMPO-H in 4T1 cells to measure the 243% increase in mitochondrial superoxide formation generated after PDT. In conclusion, it was possible to establish a protocol for detecting superoxide in different cellular compartments after PDT, involving the combination of spin markers and enzymes with different cellular permeabilities and spin markers designed to rapidly accumulate in mitochondria, allowing to obtain unique information on the location of superoxide production.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Incidência e mortalidade de diferentes tipos de câncer em mulheres no Brasil no ano de 2022.....	17
Figura 2 – Patogênese do câncer de mama	19
Figura 3 – Mecanismo de regulação mitocondrial ao estresse oxidativo	22
Figura 4 – Diagrama de Jablonski.....	25
Figura 5 – Transições de nível de energia e configurações eletrônicas do oxigênio molecular	28
Figura 6 - Diagrama dos processos celulares desencadeados pela TFD.....	30
Figura 7 – Estrutura química do azul de metileno.....	31
Figura 8 – Estruturas químicas de sondas de hidroxilaminas cíclicas	34
Figura 9 – Esquema metodológico para avaliação da produção de superóxido extracelular	38
Figura 10 – Esquema metodológico para avaliação da produção de superóxido intracelular.....	39
Figura 11 – Esquema metodológico para avaliação da produção de superóxido mitocondrial.....	40
Figura 12 – Avaliação da citotoxicidade do AM em células NIH-3T3 (controle) e 4T1-Luc (tumoral) no escuro	41
Figura 13 – Avaliação do efeito fotodinâmico em células NIH-3T3 (controle) e 4T1-Luc (tumoral) por AM (1,25 µg/mL) e irradiação com luz de LED 660 nm durante 60 segundos.	43
Figura 14 – Produção de nitróxido medidas por RPE em células NIH-3T3 (controle) e 4T1-Luc (tumoral) após tratamento com AM e irradiação com LED 660 nm	44
Figura 15 – Produção de nitróxido medidas por RPE em células NIH-3T3 (controle) e 4T1-Luc (tumoral) com pré-tratamento de SOD e tratamento com AM e irradiação com LED 660 nm	46
Figura 16 – Detecção de radical superóxido no sobrenadante de células NIH-3T3 (controle) e 4T1-Luc (tumoral) com pré-tratamento de SOD e tratamento com AM e irradiação com LED 660 nm	47
Figura 17 – Produção de nitróxido medidas por RPE em células NIH-3T3 (controle) e 4T1-Luc (tumoral) com e sem pré-tratamento de PEG-SOD e tratamento com AM e irradiação com LED 660 nm.	48

Figura 18 – Produção de nitróxido medidas por RPE em células NIH-3T3 (controle) e 4T1-Luc (tumoral) com tratamento com AM e irradiação com LED 660 nm e mito-TEMPO-H.....	49
--	-----------

Lista de abreviaturas

AM	Azul de metileno
APAF-1	Fator ativador de protease apoptótica 1
ATP	Adenosina trifosfato
CAT	Catalase
CDIS	Carcinoma ductal <i>in situ</i>
CMH	1-hidroxi-3-metoxycarbonil-2,2,5,5-tetrametilpirrolidina
DAMPs	Padrões moleculares associados a danos
DETC	Trihidrato de dietilditiocarbamato de sódio
DF	Deferoxamina
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTPA	Ácido dietilenotriaminopentacético
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico
EPM	Erro padrão da média
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FS	Fotossensibilizador
GPX	Glutathione peroxidase
GR	Glutathione reductase
GSH	Glutathione
GSSG	Glutathione oxidada
IC	Superóxido intracelular
ICS	Cruzamento intersistema
IDH	Índice de desenvolvimento humano
KHB	Tampão de Krebs-Henseleit
lncRNAs	Transcrição de RNAs longos não codificantes
LED	Diodo emissor de luz
MCI	Morte celular imunogênica
MSDCs	Células supressoras derivadas de mieloides
mitoTEMPO-H	1-hidroxi-4-[2-trifenilfosfonio-acetamido]-2,2,6,6-tetrametilpiperidina
μL	Microlitro
μM	Micromolar

µg	Micrograma
mL	Mililitro
NADP ⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato hidrogenado
NIH/3T3	Células de fibroblastos normal murino 3T3
nM	Nanomolar
NOX	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato hidrogenado oxidases
OMS	Organização Mundial de Saúde
PEG-SOD	Polietilenoglicol superóxido dismutase
pH	Potencial hidrogeniônico
POD	Peroxidase
PRRs	Receptores de reconhecimento de padrões
PTFE	Poli-tetra-flúor-etileno
PRX	Peroxirredoxina
RPE	Ressonância paramagnética eletrônica
RPMI-1640	<i>Roswell Park Memorial Institute</i> médio 1640
SN	Sobrenadantes
SOD	Superóxido dismutase
TFD	Terapia fotodinâmica
TR	Tiorredoxina redutase
TRX	Tiorredoxinas
TRXO	Tiorredoxina oxidada
UA	Unidades arbitrárias
UI	Unidades internacionais
4T1-Luc	Células de carcinoma mamário murino

Lista de símbolos

Ca^{2+}	Íons cálcio
Cu	Cobre
Fe^{2+}	Íon ferroso
Fe^{3+}	Íon férrico
$^1\text{FS}^*$	Fotossensibilizador no estado singleto excitado
$^3\text{FS}^*$	Fotossensibilizador no estado tripleto excitado
$^3\text{FS}^{\bullet-}$	Fotossensibilizador no estado tripleto em sua forma reduzida
$^3\text{FS}^{\bullet+}$	Fotossensibilizador no estado tripleto em sua forma oxidada
$^1\text{O}_2$	Oxigênio singleto
$^3\text{O}_2$	Oxigênio tripleto
$\text{HO}^{\bullet}$	Radical hidroxila
H_2O	Monóxido de di-hidrogênio
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
$\text{HO}_2^{\bullet}$	Radical peridroxil
HOCl	Ácido hipocloroso
Mn	Manganês
NO	Óxido nítrico
O_2	Oxigênio molecular
$\text{O}_2^{\bullet-}$	Ânion superóxido
O_2^{2-}	Íon peróxido
$\text{O}_2^{\bullet-}$	Ânion superóxido
ONOO^-	Peroxinitrito

Sumário

1	Introdução.....	15
2	Revisão da literatura	16
2.1	Câncer de mama	16
2.1.1	Epidemiologia.....	16
2.1.2	Fisiopatologia	18
2.1.3	Tratamento.....	20
2.2	Espécies reativas de oxigênio (ERO)	21
2.3	Terapia fotodinâmica (TFD).....	23
2.3.1	Fotossensibilizador (FS).....	31
2.4	Deteção de ERO por Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE)	32
3	Objetivos.....	35
3.1	Objetivo Geral	35
3.2	Objetivos específicos.....	35
4	Metodologia.....	36
4.1	Materiais e reagentes	36
4.2	Ensaio de viabilidade celular.....	36
4.3	Avaliação do efeito fotodinâmico.....	37
4.4	Deteção da produção de superóxido por RPE em diferentes compartimentos celulares.....	37
4.5	Análise estatística	40
5	Resultados e Discussão.....	41
6	Conclusão	51
7	Referências bibliográficas	52

1 Introdução

O câncer de mama é um dos tipos de câncer mais prevalentes em todo o mundo, apresentando elevados índices de morbidade e mortalidade (FERLAY et al., 2020). Apesar dos avanços significativos nas tecnologias de diagnóstico e tratamento, o câncer de mama continua sendo um grande desafio terapêutico, principalmente por conta da heterogeneidade da doença e dos mecanismos celulares adaptativos relacionados à resistência tumoral (BIANCHINI et al., 2016). Com isso, surge a necessidade de explorar abordagens que ampliem a compreensão dos processos biológicos envolvidos e contribuam para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficazes e direcionadas.

A terapia fotodinâmica (TFD) tem ganhado destaque como uma abordagem inovadora para o tratamento do câncer, devido à sua capacidade de induzir a morte celular de maneira seletiva. Esse tratamento utiliza um fotossensibilizador (FS), que ao ser ativado pela luz em um comprimento de onda específico, gera espécies reativas de oxigênio (ERO), responsáveis por provocar danos celulares irreversíveis (FRIEDBERG et al., 2017; ALSAAB et al., 2020). Estudos recentes indicam que, além do oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), outras ERO altamente reativas estão envolvidas na produção do dano oxidativo, ampliando assim o entendimento sobre os mecanismos de ação da TFD (PRZYGODA et al., 2023).

A eficácia da TFD está diretamente relacionada à dinâmica das ERO no microambiente tumoral. A concentração e a distribuição espacial dessas moléculas altamente reativas são parâmetros críticos para o sucesso terapêutico (ABRAHAMSE; HAMBLIN, 2016; DOS SANTOS et al., 2019). A Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) tem sido empregada para a detecção e quantificação precisa de ERO, utilizando sondas de spin específicas para monitorar a geração de radicais livres. Esta metodologia tem se mostrado eficaz na avaliação da distribuição das ERO em ambientes intra e extracelulares durante a TFD, possibilitando a compreensão sobre aspectos da cinética oxidativa (BACELLAR et al., 2018; ELAJAILI et al., 2019).

Este estudo visa estabelecer um método para detecção e análise da distribuição espacial de ERO geradas durante TFD em células epiteliais de carcinoma mamário murino 4T1-Luciferase (4T1-Luc). A metodologia emprega a RPE em associação com sondas de spin específicas e agentes antioxidantes, permitindo a quantificação e localização dos radicais livres formados. O entendimento dos fotodanos gerados pode resultar no desenvolvimento de estratégias terapêuticas que maximizem a eficácia citotóxica nas células neoplásicas, ao mesmo tempo que minimizem os efeitos deletérios sobre os tecidos adjacentes.

2 Revisão da literatura

2.1 Câncer de mama

2.1.1 Epidemiologia

O câncer de mama é um dos tipos de câncer mais comum e a principal causa de mortalidade associada ao câncer entre mulheres em todo o mundo (ALVES et al., 2023; HERRERA-QUINTANA; VÁZQUEZ-LORENTE; PLAZA-DIAZ, 2024), representando um grande desafio para a saúde pública (FENG et al., 2018). A fim de viabilizar estratégias globais, a Organização Mundial de Saúde (OMS) inaugurou a Iniciativa Global do Câncer de Mama em 2021. O objetivo era centralizar as iniciativas em três pilares: (1) promoção da saúde para detecção precoce; (2) diagnóstico oportuno; (3) gerenciamento abrangente do câncer de mama (WILKINSON; GATHANI, 2022).

A promoção da saúde concentra-se na educação em saúde, visando aumentar a conscientização sobre a saúde da mama para garantir a percepção de sinais e sintomas sugestivos de malignidade e, dessa forma, auxiliar no diagnóstico precoce da doença (WILKINSON; GATHANI, 2022). Para alcançar os resultados ideais no tratamento do câncer de mama, é essencial que o diagnóstico seja feito de forma oportuna (MUTEBI et al., 2020). Estudos evidenciam que o diagnóstico realizado no estágio inicial pode curar cerca de 70 a 80% dos pacientes (HERRERA-QUINTANA; VÁZQUEZ-LORENTE; PLAZA-DIAZ, 2024). Assim, o diagnóstico é acompanhado da implementação de estratégias para proporcionar o acesso e a entrega do tratamento multimodal do câncer de mama – com intenção curativa ou paliativa (MUTEBI et al., 2020).

Um dos grandes desafios da iniciativa é a variação dos cenários globais. Isso pode ser retratado a partir da correlação entre a incidência do câncer de mama e o índice de desenvolvimento humano (IDH) do território. Em 2020, foram registrados cerca de 2,26 milhões de casos incidentes de câncer de mama no mundo, majoritariamente em países mais desenvolvidos (WILKINSON; GATHANI, 2022). No entanto, observa-se uma tendência descendente da mortalidade nesses países (SANTOS et al., 2022), fato que pode ser atribuído ao sucesso na implementação do diagnóstico precoce da doença (MUTEBI et al., 2020).

Em contrapartida, os países menos desenvolvidos apresentam taxas de mortalidade alarmantes. Em 2020, o câncer de mama provocou 685.000 mortes em mulheres no mundo, sendo quase dois terços registrados em regiões menos desenvolvidas (WILKINSON; GATHANI, 2022). Isso pode ser atribuído aos obstáculos financeiros e logísticos dos países menos desenvolvidos, que apresentam limitações na detecção precoce e no acesso ao

diagnóstico e aos tratamentos adequados. Posto isso, enfrentar o câncer de mama globalmente exige uma orientação estratégica, visando diminuir as disparidades existentes (MUTEBI et al., 2020).

No Brasil, é possível verificar um grande destaque na incidência de câncer de mama em comparação com os demais tipos de câncer, se observado o público feminino do país (Figura 1). Cabe mencionar que o Ministério da Saúde prioriza a detecção precoce do câncer de mama, no entanto, o rastreamento é feito apenas em mulheres que buscam espontaneamente os serviços de saúde (TOMAZELLI et al., 2023). Isso contribui significativamente para a persistência de altos níveis de diagnósticos em estágios avançados da doença (DIAS et al., 2024). Por consequência, a mortalidade por câncer de mama permanece elevada, uma vez que o diagnóstico tardio representa o principal fator para a letalidade deste tipo de câncer (SANTOS et al., 2022).

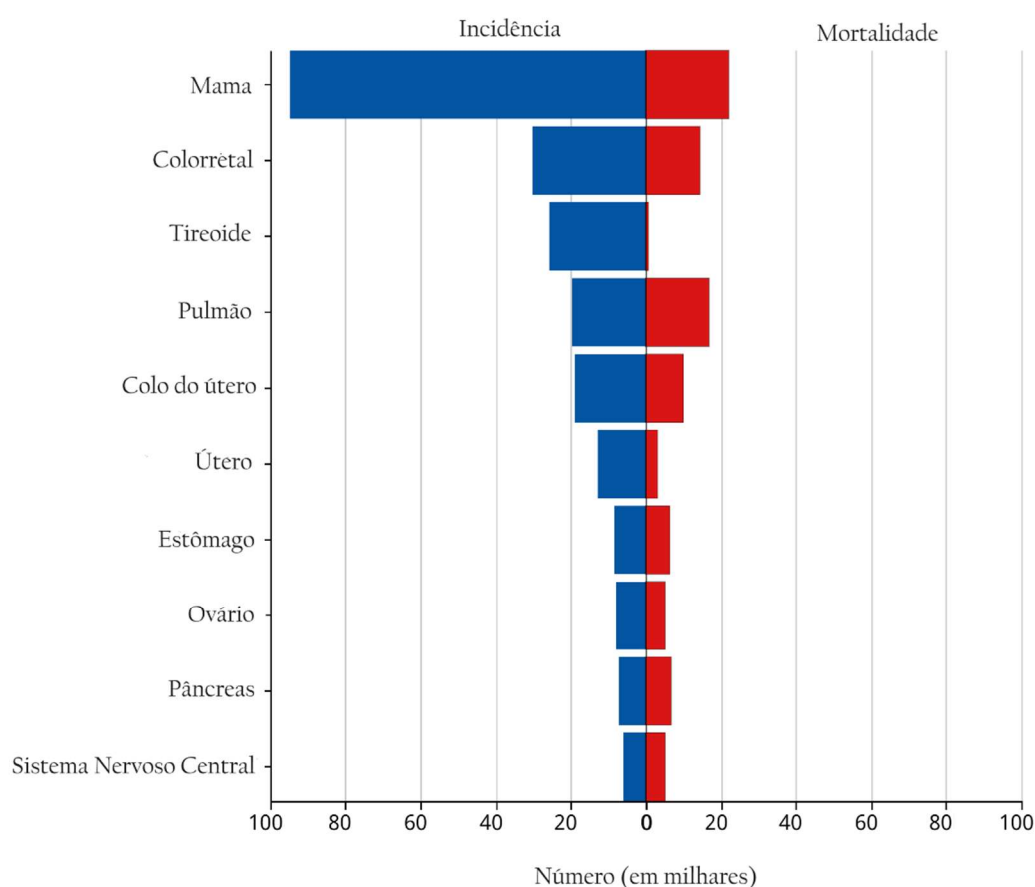


Figura 1 – Incidência e mortalidade de diferentes tipos de câncer em mulheres no Brasil no ano de 2022. O gráfico mostra a incidência (azul) e a mortalidade (vermelho) em número absoluto por tipo de câncer. O câncer de mama é o mais comum, com uma grande diferença entre incidência e mortalidade, o que sugere um bom nível de detecção e tratamento. Embora o câncer de mama seja o mais detectado, apresenta a maior mortalidade entre os tipos analisados, evidenciando a gravidade da doença e a importância de aprimorar os tratamentos e as medidas preventivas. Fonte: Adaptado de *Global Cancer Observatory* da OMS de 2022. Produção gráfica da *International Agency for Research on Cancer* (<http://gco.iarc.fr/today>).

A natureza complexa do câncer de mama representa um obstáculo significativo na redução das taxas de mortalidade (MOKOENA; GEORGE; ABRAHAMSE, 2021). Esta complexidade resulta da heterogeneidade da doença, que se manifesta nos níveis genético, molecular e clínico. Tal variabilidade impõe desafios consideráveis na determinação precisa do diagnóstico, prognóstico, avaliação de risco e seleção da terapia mais adequada (HOUGHTON, 2021; KAWIAK, 2022; ALVES et al., 2023). Consequentemente, torna-se crucial aprofundar o entendimento da fisiopatologia do câncer de mama e desenvolver abordagens terapêuticas mais eficazes e personalizadas. Estas medidas visam aprimorar os desfechos clínicos e, por conseguinte, diminuir a mortalidade associada à doença (FENG et al., 2018).

2.1.2 Fisiopatologia

A mama é composta por diferentes tecidos e apresenta de 15 a 20 lobos de tecido glandular dispostos radialmente ao redor do mamilo (MOKOENA; GEORGE; ABRAHAMSE, 2021). Esses lobos são constituídos por lóbulos e ductos, responsáveis pela produção de leite e passagem de leite até o mamilo, respectivamente (MCGHEE; STEELE, 2020). A mama e a axila também apresentam linfonodos, que são segmentos pertencentes ao sistema linfático, encarregados do transporte de células do sistema imune (MOKOENA; GEORGE; ABRAHAMSE, 2021). Os linfonodos desempenham um papel importante no crescimento de células metastáticas e na disseminação secundária, sendo reconhecido como um indicador relevante para o prognóstico do câncer de mama (JI et al., 2023).

O câncer de mama é uma doença multifatorial (MANOUCHERI et al., 2022), podendo ser etiológicamente categorizada como:

- (a) Fatores de risco fixos: idade, sexo feminino, genética, biomarcadores imunológicos, características raciais ou étnicas, histórico familiar de câncer de mama e menopausa tardia (SUN et al., 2017; FENG et al., 2018; POOROLAJAL et al., 2021; OBEAGU; OBEAGU, 2024).
- (b) Fatores de risco modificáveis: consumo de bebidas alcoólicas, tabagismo, falta de atividade física, alto índice de massa corporal, alto teor de gordura na dieta, controle de natalidade com contraceptivos hormonais, não engravidar ou ter uma gravidez tardia e terapia de reposição hormonal após a menopausa (SUN et al., 2017; FENG et al., 2018; POOROLAJAL et al., 2021; OBEAGU; OBEAGU, 2024).

O câncer de mama surge a partir da proliferação descontrolada de células epiteliais da mama, resultado de múltiplos fatores carcinogênicos (HERRERA-QUINTANA; VÁZQUEZ-

LORENTE; PLAZA-DIAZ, 2024). Essas células apresentam alterações que comprometem sua funcionalidade normal, podendo levar a condições mamárias não cancerosas, hiperplasias, cistos ou tumores benignos (OBEAGU; OBEAGU, 2024). A proliferação de células anormais no epitélio ductal ou lobular pode resultar no desenvolvimento de lesões pré-invasivas conhecidas como carcinoma *in situ*. Contudo, uma vez que as células tumorais rompem a membrana basal e invadem o estroma adjacente, o câncer é classificado como carcinoma invasivo (NOLAN, LINDEMAN E VISVADER, 2023), esquema representado na Figura 2.

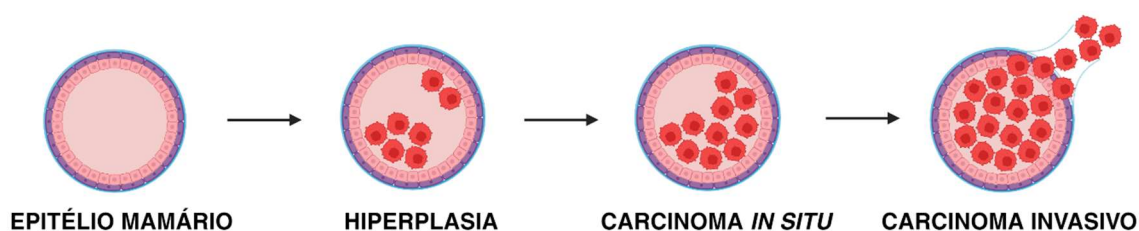


Figura 2 – Patogênese do câncer de mama. O diagrama mostra as principais fases do desenvolvimento do câncer de mama, evidenciando as mudanças celulares e estruturais que ocorrem ao longo do processo, desde as alterações no epitélio mamário até a invasão do estroma circundante. Fonte: Adaptado de NOLAN; LINDEMAN; VISVADER, 2023.

O carcinoma ductal *in situ* (CDIS) é o tipo mais prevalente de câncer de mama, contudo somente 10 a 30% dos casos progridem para a forma invasiva. A progressão para a doença invasiva ou metastática pode ser predita por biomarcadores específicos (NOLAN; LINDEMAN; VISVADER, 2023). A metástase refere-se ao processo que o tumor primário se desenvolve para um tumor secundário distal. Este processo é influenciado por múltiplos mecanismos celulares, incluindo a invasão do tumor primário, a evasão tumoral, a regulação do microambiente e a transição epitélio-mesenquimal (PARK et al., 2022). O prognóstico para o câncer de mama metastático é desfavorável, representando mais de 90% das mortes associadas ao câncer de mama. Embora os tratamentos tenham avançado, muitos pacientes com metástases ainda não têm possibilidade de cura (HERRERA-QUINTANA; VÁZQUEZ-LORENTE; PLAZA-DIAZ, 2024).

Após a definição do diagnóstico, o câncer de mama é classificado com base no tamanho do tumor, no estado dos linfonodos e na presença de metástases. O estágio do câncer de mama pode ser diferenciado por estágios iniciais (0–I) e avançados (II–IV). O estágio 0 refere-se ao CDIS, enquanto os estágios I a IV são considerados formas invasivas do câncer. O grau do câncer reflete na diferenciação celular, no tamanho e no padrão de crescimento da metástase.

O estadiamento do câncer de mama auxilia na padronização do tratamento para que seja possível instituir as melhores abordagens terapêuticas (MOKOENA; GEORGE; ABRAHAMSE, 2021).

2.1.3 Tratamento

A ressecção cirúrgica é um dos principais pilares para o tratamento do câncer, sendo uma das modalidades terapêuticas mais antigas e recorrentes (CHEN et al., 2019). No câncer de mama, o tratamento cirúrgico abrange a lumpectomia, que consiste na remoção parcial do tecido mamário, e a mastectomia, que envolve a remoção total da mama (MOKOENA; GEORGE; ABRAHAMSE, 2021). Embora seja um procedimento rotineiro, evidências indicam que a cirurgia representa um fator de risco para a promoção de micrometástases pré-existentes e para o surgimento de novas metástases (SHURIN; BARALDI; SHURIN, 2021), além de efeitos indesejáveis como inflamação, sensibilidade, alterações na aparência da mama, depressão e outros (MOKOENA; GEORGE; ABRAHAMSE, 2021).

O protocolo de tratamento padrão do câncer de mama é a cirurgia acompanhada de radioterapia e quimioterapia com a finalidade de remover completamente as células tumorais e, com isso, reduzir a probabilidade de recorrência (MOKOENA; GEORGE; ABRAHAMSE, 2021; YE et al., 2023). A radioterapia utiliza a radiação de fótons de alta energia para tratar o câncer, agindo diretamente ao causar danos ao DNA das células tumorais e indiretamente ao causar estresse oxidativo e danos às biomoléculas (GONG et al., 2021). Um desafio significativo na aplicação da radioterapia é a otimização do tratamento para aumentar as disparidades entre as características do tumor e do tecido circundante e, assim, minimizar os agravos ao tecido saudável (SCHAUE; MCBRIDE, 2015).

Por outro lado, a quimioterapia tem como estratégia a administração de agentes quimioterápicos para mitigar ou inibir o crescimento das células cancerosas (WEI et al., 2021). O mecanismo de ação dos quimioterápicos é multifacetado, englobando desde a alteração da estrutura química do DNA até a inibição da síntese e alteração na transcrição de ácidos nucleicos (LI et al., 2022). No entanto, o tratamento apresenta desafios significativos, como a toxicidade sistêmica, a resistência a múltiplos fármacos, a supressão do sistema imunológico e outros (BUKOWSKI; KCIUK; KONTEK, 2020; MONTERAN et al., 2022).

Embora evidências sustentem a eficácia dos tratamentos convencionais e da combinação de diferentes modalidades terapêuticas, essas abordagens apresentam limitações significativas (WANG; MINDEN, 2022; KESHARWANI et al., 2023). Essas restrições evidenciam a

necessidade de investigações mais aprofundadas que possam elucidar os processos biológicos subjacentes à resposta terapêutica e à progressão tumoral. Neste contexto, torna-se fundamental desenvolver metodologias capazes de identificar e caracterizar alterações moleculares no microambiente tumoral, visando aprimorar as estratégias de intervenção e expandir o conhecimento científico sobre os mecanismos de desenvolvimento e resposta ao tratamento (NEOPHYTOU et al., 2021; HERRERA-QUINTANA; VÁZQUEZ-LORENTE; PLAZA-DIAZ, 2024).

2.2 Espécies reativas de oxigênio (ERO)

Os organismos multicelulares contam com uma complexa rede de sinais extracelulares e intracelulares para facilitar a comunicação célula-célula em diversos processos fisiológicos. O oxigênio molecular (O_2) é essencial para a sobrevivência de organismos aeróbicos, sendo considerado o substrato mais utilizado no corpo humano por conta de seu envolvimento em vários processos bioquímicos (BAIK; JAIN, 2020). Em termos gerais, 95% do oxigênio utilizado no metabolismo celular contribui para a produção de energia, enquanto os 5% restantes originam metabólitos reativos, conhecidos como ERO (NAKAI; TSURUTA, 2021).

As ERO são espécies químicas de tamanho reduzido, caracterizadas pelo tempo de vida curto e alta reatividade, originadas da redução parcial do O_2 (LI et al., 2021). Os intermediários reativos do O_2 são rapidamente convertidos em compostos tóxicos, capazes de causar danos celulares por meio da oxidação de proteínas, lipídios, carboidratos e ácidos nucleicos (EGEA; JIMÉNEZES-ALTAVÓ; CAMPUZANO, 2020). Entre os principais tipos de ERO, destaca-se o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o oxigênio singlete (1O_2), o radical hidroxila ($HO^\bullet$), os peróxidos (O_2^{2-}) e os superóxidos ($O_2^{\bullet -}$) (ESPINOZA et al., 2021).

A produção de ERO advém do metabolismo oxidativo ou da resposta celular a mecanismos de defesa (TAUFFENBERGER; MAGISTRETTI, 2021). Essa produção ocorre em diversas organelas celulares, incluindo mitocôndrias, peroxissomos, retículo endoplasmático, membrana plasmática e citosol (DI MEO et al., 2016; LI et al., 2021). Estudos indicam que a produção de ERO é majoritariamente realizada nas mitocôndrias. Inicialmente, isso foi atribuído à formação de metabólitos indesejáveis da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial (ETC), no entanto, evidências recentes demonstram que essa produção ocorre de maneira contínua e regulada (ZHANG et al., 2022).

A formação de ERO mitocondriais está intrinsecamente ligada à função mitocondrial e às respostas fisiológicas do organismo. A produção basal destas espécies é essencial para a

manutenção da homeostase celular. Contudo, produções elevadas desencadeiam mecanismos de adaptação celular e, se persistentes, podem levar ao estresse oxidativo e consequentes danos celulares. Um exemplo importante desse equilíbrio é o mecanismo de regulação dos níveis de ERO, que envolve a conversão do $O_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 na matriz mitocondrial pela enzima superóxido dismutase (SOD). O H_2O_2 formado pode ser neutralizado por diferentes enzimas: a glutathiona peroxidase (GPX), que utiliza glutathiona reduzida como cofator para convertê-lo em água; a peroxirredoxina (PRX), que atua por meio de um mecanismo cisteína-dependente; e a catalase (CAT), responsável por converter o H_2O_2 em água e O_2 com alta eficiência, especialmente em altas concentrações de peróxido. Este processo de detoxificação, ilustrado na Figura 3, exemplifica a complexa rede de regulação das ERO no ambiente celular (LISMONT; REVENCO; FRANSEN, 2019; MAPUSKAR et al., 2021; ZHANG et al., 2022).

A SOD desempenha um papel fundamental na regulação de ERO e influencia a via metabólica do óxido nítrico (NO). O NO pode ser rapidamente inativado ao reagir com $O_2^{\bullet-}$, formando peroxinitrito ($ONOO^-$), um potente oxidante associado a danos celulares. A importância da SOD também é evidenciada por meio da presença de múltiplas isoformas em diferentes compartimentos celulares, como: SOD1 (Cu/ZnSOD) presente no citosol e no ambiente intermembranar mitocondrial; SOD2 (MnSOD) presente na matriz mitocondrial; SOD3 (EC-SOD) presente no espaço extracelular. Cabe mencionar que todas as isoformas exigem um metal catalítico (Cu ou Mn) para sua ativação (FUKAI; USHIO-FUKAI, 2011; UDOMSAK et al., 2024).

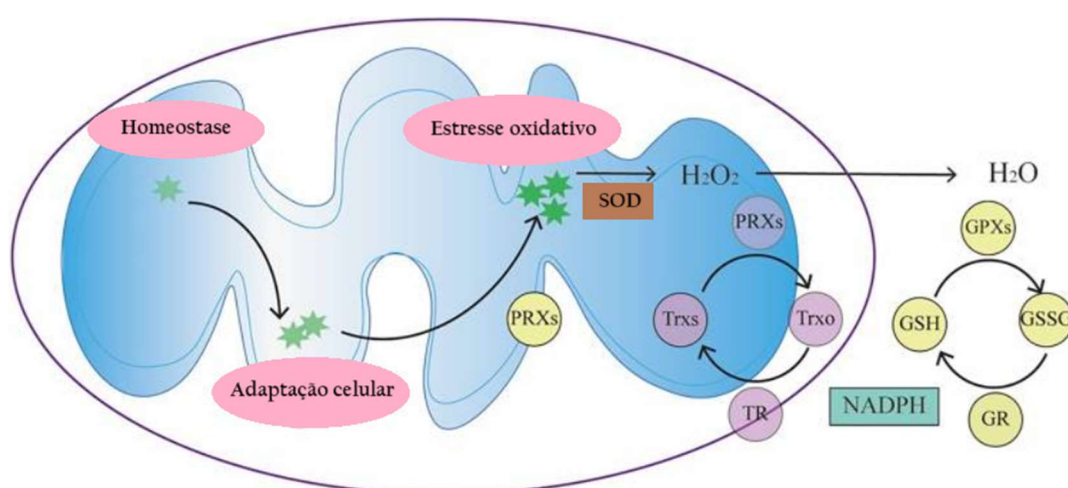


Figura 3 – Mecanismo de regulação mitocondrial ao estresse oxidativo. A Superóxido Dismutase (SOD) converte o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O H_2O_2 é subsequentemente reduzido a água (H_2O) pelas enzimas peroxirredoxina (PRXs) e glutathiona peroxidase (GPXs), utilizando NADPH como fonte de elétrons. A glutathiona (GSH) é oxidada em glutathiona oxidada (GSSG) e restaurada pela glutathiona redutase (GR). Essas vias são essenciais para a manutenção da homeostase, adaptação celular e resposta ao estresse oxidativo. Siglas: TR: Tiorredoxina redutase; Trxs: Tiorredoxinas; Trxo: Tiorredoxina oxidada. Fonte: Adaptado de ZHANG et al., 2022

As NADPH oxidases (NOX), juntamente com as SODs, constituem as principais fontes enzimáticas endógenas para regulação de ERO. A família NOX ocupa várias localizações celulares, contribuindo para a produção localizada de ERO em compartimentos celulares específicos (BEDARD E KRAUSE, 2007; SIES E JONES, 2020). Há uma relação significativa entre as NOXs e a regulação do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), uma via de sinalização fundamental para a sobrevivência celular (PESHAVARIYA et al., 2009). Além disso, destaca-se sua participação na modulação da atividade imunossupressora das células supressoras derivadas de mieloides (MDSCs), que ocasionam a supressão da atividade das células T, comum em contextos inflamatórios e neoplásicos (GABRILOVICH; NAGARAJ, 2009).

De modo geral, existe um equilíbrio entre o estado redox adequado e o estresse oxidativo, sendo uma condição que depende das taxas relativas de produção e degradação (BRIEGER et al., 2012). Quando esses sistemas antioxidantes são sobrecarregados, o acúmulo excessivo de ERO leva à disfunção celular e à indução de morte celular. O estresse oxidativo prolongado está intimamente ligado ao desenvolvimento de doenças crônicas, como doenças neurodegenerativas, cardiovasculares e câncer, fato que reforça a importância de um controle do estado redox celular (PIZZINO et al., 2017; GLORIEUX et al., 2024).

Em especial, o câncer está intrinsecamente relacionado às altas concentrações de ERO, decorrentes de alterações genéticas, proliferação celular acelerada e modificações no metabolismo. As células tumorais desenvolveram mecanismos adaptativos notáveis para prosperar nesse ambiente oxidativo hostil. Essas células se ajustam através do fortalecimento de seus sistemas antioxidantes, permitindo-lhes manter os níveis de ERO abaixo do limiar citotóxico, mas dentro de uma faixa pró-tumorigênica ideal (GORRINI; HARRIS; MAK et al., 2013). Esta adaptação não apenas possibilita a sobrevivência das células tumorais em condições de estresse oxidativo, mas também confere vantagens adicionais, como resistência ao tratamento e capacidade de progressão da doença. Diante dessa complexa interação entre as células tumorais e o ambiente oxidativo, há um interesse crescente no desenvolvimento de terapias inovadoras que visem modular o equilíbrio redox (SHAH; ROGOFF, 2021; YANG et al., 2018).

2.3 Terapia fotodinâmica (TFD)

Os primeiros relatos sobre o efeito fotodinâmico e o desenvolvimento do conceito de TFD foram registrados há mais de um século. Essa descoberta ocorreu ao observar que, quando

certos microrganismos eram incubados com corantes específicos, tornavam-se sensibilizados, e a exposição à luz resultava em morte celular (KESSEL, 2019; RAHMAN et al., 2022). No entanto, essa consequência não ocorria em microrganismos mantidos no escuro ou em sistemas sem oxigênio, o que originou maior interesse nos critérios necessários para que a ação fotodinâmica se manifestasse (ABRAHAMSE; HAMBLIN, 2016).

Rapidamente, a TFD se destacou por sua crescente aplicação em diversas áreas terapêuticas. A quantidade de indicações é constantemente ampliada, incluindo câncer, infecções, doenças inflamatórias, ginecológicas, urológicas, gastroenterológicas, dermatológicas e neurológicas (ABRAHAMSE; HAMBLIN, 2016; OSKROBA et al., 2024). Destaca-se sua efetividade no tratamento de câncer devido à sua natureza minimamente invasiva com alta seletividade, baixa propensão para desenvolvimento de resistência medicamentosa e potencial para ser combinada com outras modalidades terapêuticas (FALK-MAHAPATRA; GOLLNICK, 2020; KIM; CHANG, 2023).

Esses benefícios são alcançados a partir da associação entre FS, luz visível com comprimento de onda adequado para ativação do FS e oxigênio tecidual. O FS se concentra no ambiente celular e tem a capacidade de penetrar em diversas organelas celulares, tais como mitocôndrias, lisossomos, retículo endoplasmático, complexo de Golgi e membranas plasmáticas (OSKROBA et al., 2024). A reação fotoquímica gerada a partir da TFD é responsável pela formação de ERO e, por consequência, a eliminação de células neoplásicas, microrganismos patogênicos e tecidos indesejados. Isso ocorre quando os cromóforos são expostos à luz em um comprimento de onda específico, capaz de excitá-los a um estado de alta energia (ABRAHAMSE; HAMBLIN, 2016; ROSSIN et al., 2020).

A TFD inicia-se com a absorção de luz pelo FS, que promove a transição do estado fundamental para um estado singleto excitado ($^1\text{FS}^*$), representado na Figura 4. Após a excitação eletrônica, ocorrem transições entre diferentes níveis de energias vibracionais e rotacionais dentro do $^1\text{FS}^*$. Nesse processo, o FS transita de seu estado fundamental (S_0) para um estado singleto excitado mais elevado (S_2). Este, por sua vez, decai rapidamente para o estado S_1 por meio de conversão interna, redirecionando a energia disponível para outras rotas de dissipação (JIA et al., 2023). É importante destacar que esse estado é instável, fato que pode gerar a retomada para o estado fundamental. Caso o processo de relaxamento do $^1\text{FS}^*$ implique na emissão de fótons, o processo é reconhecido como fluorescência. Na TFD, a ocorrência da fluorescência é indesejável, visto que promove a dispersão de energia e a consequente, redução na produção de ERO (ABRAHAMSE; HAMBLIN, 2016; WANG et al., 2023).

Alternativamente, o $^1\text{FS}^*$ pode desencadear o cruzamento intersistema (ICS), um processo que envolve a mudança na multiplicidade de spin por meio da inversão do spin dos elétrons para um estado tripleto excitado ($^3\text{FS}^*$) (OSKROBA et al., 2024). Este estado é relativamente estável e não permite a retomada direta para o $^1\text{FS}^*$. No entanto, o retorno do $^3\text{FS}^*$ ao estado fundamental ocorre por meio de fosforescência, que libera energia na forma de fótons (DABROWSKI, 2017; IMRAN et al., 2021). Cabe destacar que o $^3\text{FS}^*$ é o principal marcador para a formação de ERO durante a TFD, sendo responsável por desencadear dois tipos de reações, que contribuem para o efeito terapêutico da TFD (WANG et al., 2023).

Na reação do Tipo I, o $^3\text{FS}^*$ reage com substratos presentes no microambiente celular, levando à produção de $\text{O}_2^{\cdot-}$ de maneira direta ou indireta. Na reação direta, o $^3\text{FS}^*$ reage com o O_2 , resultando na oxidação do $^3\text{FS}^*$ e na formação de $\text{O}_2^{\cdot-}$, conforme descrito na Equação 1. Na reação indireta, o $^3\text{FS}^*$ reage com o NADPH, um dos principais agentes redutores envolvidos na homeostase das ERO. Nessa reação, o $^3\text{FS}^*$ atua como um aceptor de elétrons, sendo convertido à sua forma reduzida ($^3\text{FS}^{\cdot-}$). Subsequentemente, o $^3\text{FS}^{\cdot-}$ reage com o O_2 e origina o $\text{O}_2^{\cdot-}$, ao passo que o FS retorna ao seu estado fundamental, como representado na Equação 2 e 3 (DABROWSKI, 2017; DUBACH; SAN SEGUNDO-ACOSTA; MURPHY, 2024).

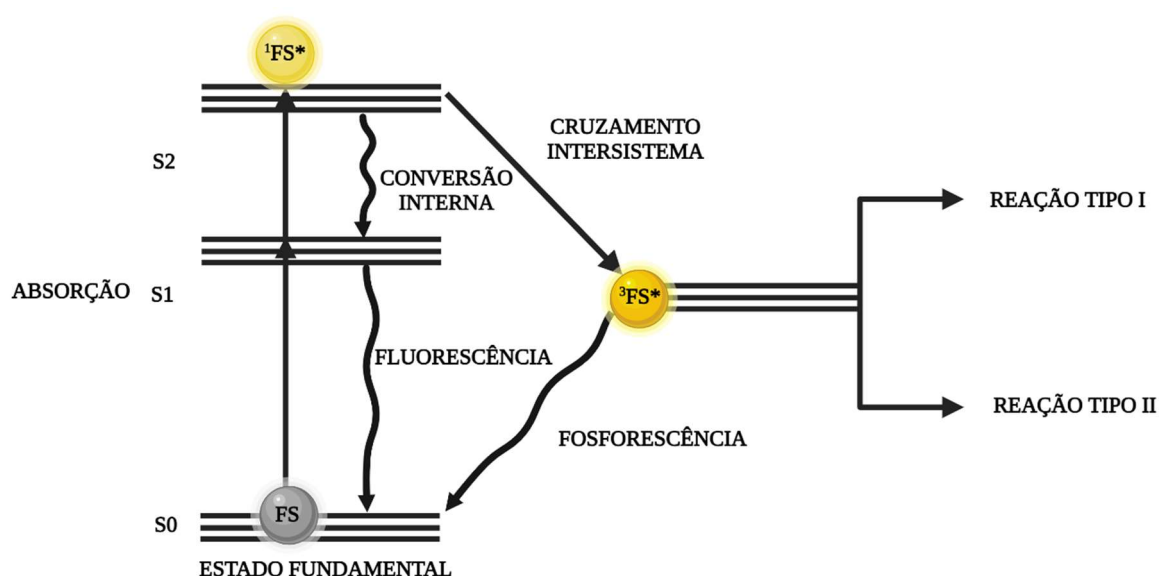
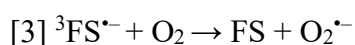
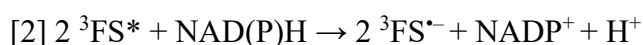
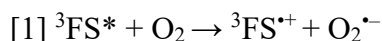
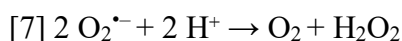
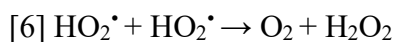
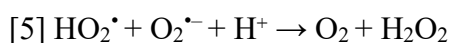
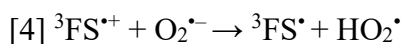


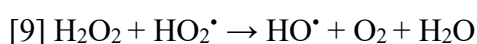
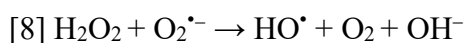
Figura 4 – Diagrama de Jablonski. Representação do processo de ativação fotodinâmica para formação de ERO. FS: fotossensibilizador no estado fundamental; $^1\text{FS}^*$: fotossensibilizador no estado singleto excitado; $^3\text{FS}^*$: fotossensibilizador no estado tripleto excitado. Fonte: Autoria própria.

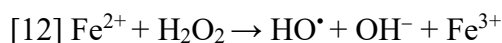
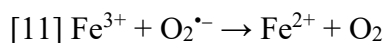
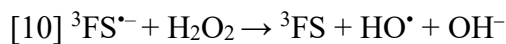
O FS em seu estado oxidado ($^3\text{FS}^{*+}$), produto da reação direta, reage com o $\text{O}_2^{\cdot-}$ e promove a formação do radical peridroxil ($\text{HO}_2^{\cdot}$), conforme demonstrado na Equação 4. Esse radical atua como precursor de H_2O_2 como ilustrado na Equação 5 e 6. O H_2O_2 destaca-se entre os demais tipos de ERO devido à sua estabilidade, abundância no meio celular e alta permeabilidade, desempenhando um papel fundamental na sinalização celular e na regulação do estresse oxidativo (RECZEK; CHANDEL, 2015; DABROWSKI, 2017; WANG et al., 2018; LENNICKE; COCHEMÉ, 2021).

A dismutação do $\text{O}_2^{\cdot-}$, representada na Equação 7, é catalisada pela SOD. Apesar de não apresentar uma forte ação oxidante, o $\text{O}_2^{\cdot-}$ é potencialmente tóxico para o ambiente celular. Dessa maneira, a SOD desempenha um papel central na regulação dos níveis de $\text{O}_2^{\cdot-}$ e por consequência, dos seus constituintes (DABROWSKI, 2017; WANG et al., 2018). Sabe-se que ao promover essa regulação, a SOD pode prejudicar a indução de apoptose em células tumorais ao bloquear vias de sinalização importantes. O efeito protetor sobre as células tumorais pode comprometer a eficácia da TFD ao diminuir a citotoxicidade resultante dessas vias oxidativas (UDOMSAK et al., 2024).

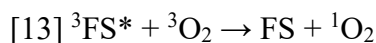


A CAT, de forma análoga à SOD, atua como uma enzima antioxidante essencial ao catalisar o H_2O_2 em O_2 e H_2O , prevenindo o acúmulo desse composto nas células. No entanto, o H_2O_2 também pode participar de reações com o $\text{O}_2^{\cdot-}$ ou o $\text{HO}_2^{\cdot}$, conforme apresentado nas equações 8 e 9. Essas interações promovem a formação de $\text{HO}^{\cdot}$ altamente reativos, sendo capazes de degradar biomoléculas essenciais e inativar antioxidantes naturais. É importante destacar que a transferência de elétrons por parte do $^3\text{FS}^*$, bem como a interação com íons ferro através da Reação de Fenton desencadeiam a formação da $\text{HO}^{\cdot}$, intensificando o potencial de dano oxidativo, representado respectivamente nas equações 10, 11 e 12. Dessa maneira, compreende-se a importância da reação de Tipo I, uma vez que promove a produção de ERO, resultando em estresse oxidativo e danos às células tumorais (DABROWSKI, 2017; ZHANG et al., 2020; UDOMSAK et al., 2024).





Na reação do Tipo II, o ${}^3\text{FS}^*$ transfere a energia absorvida dos fótons de luz diretamente para o oxigênio no estado tripleto (${}^3\text{O}_2$), promovendo a formação de ${}^1\text{O}_2$, conforme ilustrado na Equação 13 (DABROWSKI, 2017). A presença do ${}^3\text{O}_2$ é um passo fundamental nesse processo, visto sua atuação como substrato essencial para a geração do ${}^1\text{O}_2$, que desencadeia os efeitos citotóxicos desejados na TFD (WANG et al., 2023). Portanto, a eficácia dessa reação está intrinsecamente ligada à disponibilidade de O_2 no ambiente tumoral e à capacidade do FS realizar uma transferência de energia eficiente durante a ativação por luz (CUI et al., 2024).



As transições eletrônicas e configurações de spin do O_2 , destacados na Figura 5, são fundamentais para compreensão dos diferentes níveis energéticos e propriedades reativas em sistemas biológicos (GHOGARE; GREER, 2016; MAHARJAN; BHATTARAI, 2022). Ao passo que o estado fundamental tripleto $\text{O}_2({}^3\Sigma_g^-)$ é excitado por meio da transferência de energia, ocorre a conversão para o estado singlete excitado $\text{O}_2({}^1\Delta_g)$ ($\Delta E = 0.98 \text{ eV}$, $\lambda = 1270 \text{ nm}$), como demonstrado na Figura 5. Cabe mencionar que o $\text{O}_2({}^1\Delta_g)$, primeiro estado excitado, apresenta elétrons pareados com spins antiparalelos, aumentando assim sua capacidade oxidativa em comparação ao $\text{O}_2({}^3\Sigma_g^-)$. O próximo nível de singlete excitado $\text{O}_2({}^1\Sigma_g^+)$ envolve uma reorganização eletrônica com os elétrons ocupando orbitais moleculares diferentes, resultando em um estado de maior energia e menor estabilidade ($\Delta E = 0.56 \text{ eV}$, $\lambda = 1925 \text{ nm}$). A conversão interna do estado $\text{O}_2({}^1\Sigma_g^+)$ para $\text{O}_2({}^1\Delta_g)$ é rápida, o que contribui para a dissipação da energia desse estado de alta excitação (MAHARJAN; BHATTARAI, 2022; ANDRÉS et al., 2024; CUI et al., 2024).

O ${}^1\text{O}_2$ é uma espécie altamente reativa e apresenta propriedades eletrofílicas, tornando-o capaz de promover a oxidação de diversas biomoléculas (MUROTOMI et al., 2023). Embora a combinação dos mecanismos de Tipo I e Tipo II ofereça uma abordagem otimizada, estudos indicam que a TFD é mais eficaz quando a reação do Tipo I está ativa, contribuindo diretamente para a produção de espécies altamente reativas, que desempenham um papel fundamental na citotoxicidade e na destruição eficiente das células-alvo (DABROWSKI, 2017).

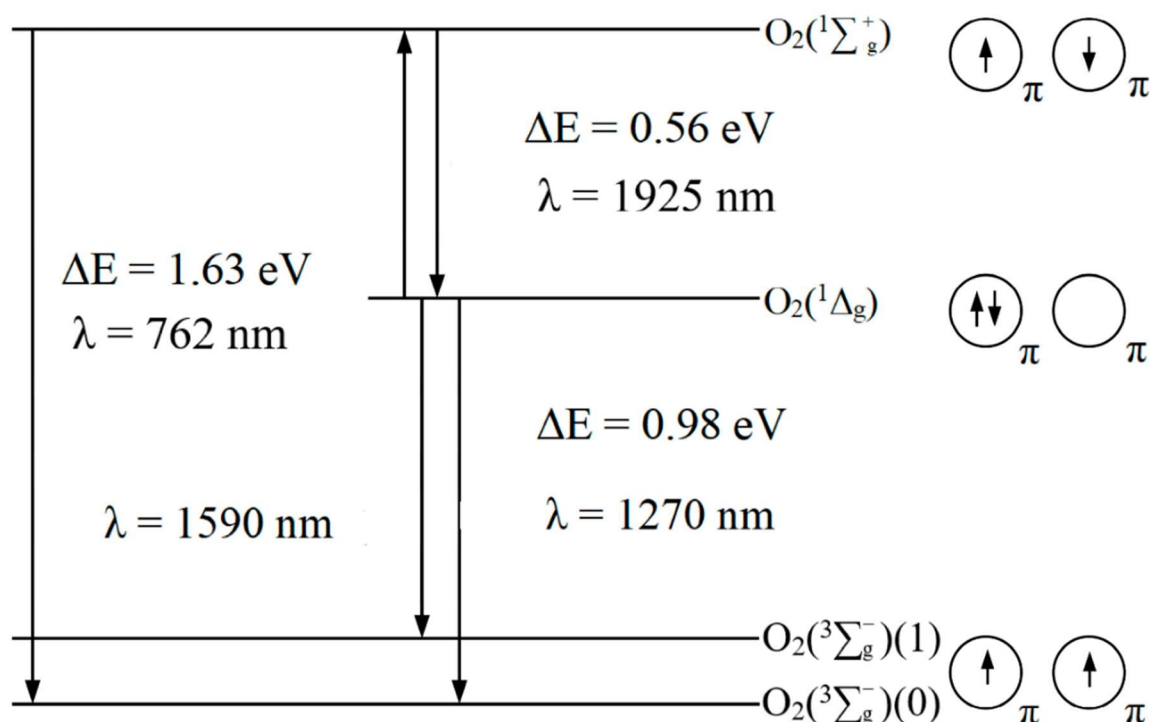


Figura 5 – Transições de nível de energia e configurações eletrônicas do oxigênio molecular. A figura mostra as transições entre o estado fundamental tripleto $O_2(^3\Sigma_g^-)$ e os estados singlete excitados $O_2(^1\Delta_g)$ e $O_2(^1\Sigma_g^+)$. Os valores de ΔE representam a diferença de energia (em elétron-volts), e λ refere-se ao comprimento de onda associado à transição (em nanômetros). As configurações de spin dos elétrons em orbitais antiligantes π são representadas para cada estado eletrônico. Fonte: Adaptado de ANDRÉS et al., 2024.

Os danos celulares promovem a liberação de componentes intracelulares conhecidos como padrões moleculares associados a danos (DAMPs, do inglês *Damage Associated Molecular Patterns*). Esses DAMPs atuam como sinalizadores moleculares que, ao interagir com receptores de reconhecimento de padrões (PRRs, do inglês *Pattern Recognition Receptors*), desencadeiam uma cascata complexa de sinalização imunológica. Esse processo desempenha um papel essencial na ativação do sistema imune e na regulação dos mecanismos de morte celular (FALK-MAHAPATRA; GOLLNICK, 2020).

Embora a ação fotodinâmica afete muitos alvos, três mecanismos principais são induzidos por fotodano, sendo eles, apoptose, necrose e autofagia. A apoptose, um tipo de morte celular programada, é frequentemente observada em resposta a danos moderados causados pela TFD (DOS SANTOS et al., 2019). Este processo é caracterizado pela ativação irreversível das caspases, fragmentação do DNA, condensação da cromatina, surgimento de bolhas na superfície celular e formação de corpos apoptóticos. A localização mitocondrial do FS desencadeia uma cascata de eventos, que culmina na morte celular programada. Este processo inicia-se com a liberação do citocromo C para o citosol, seguida pela ativação do fator ativador

de protease apoptótica 1 (APAF-1), que por sua vez, desencadeia a cascata das caspases, amplificando o sinal apoptótico e garantindo a execução eficiente do programa de morte celular (DABROWSKI, 2017; VAN STRATEN et al., 2017).

A necrose, um processo de morte celular não programada, é desencadeada por danos severo às membranas celulares ou pela produção intensa e rápida de ERO que supera a capacidade antioxidante da célula. Este fenômeno é caracterizado por uma série de eventos celulares deletérios, incluindo uma diminuição significativa dos níveis de ATP, ruptura da membrana plasmática, vacuolização do citoplasma e liberação descontrolada do conteúdo intracelular. Como consequência, ocorre uma robusta resposta inflamatória no microambiente circundante. A indução da necrose está intrinsecamente ligada a diversos fatores celulares, destacando-se a produção excessiva de ERO mitocondriais, danos aos lisossomos e a sobrecarga intracelular de íons cálcio (Ca^{2+}) (AGOSTINIS et al., 2011). Estes eventos coletivamente contribuem para o colapso da integridade celular e a subsequente morte por necrose.

Estudos mostram que a modulação dos mecanismos de morte celular na TFD está intrinsecamente ligada às doses de luz aplicadas. Observa-se uma predominância da apoptose quando são empregadas doses mais baixas de luz, enquanto a aplicação de doses mais elevadas favorece a ocorrência da necrose (DABROWSKI, 2017). Esta relação dose-dependente entre a intensidade luminosa e o tipo de morte celular induzida destaca a importância da calibração dos parâmetros de tratamento na TFD para otimizar seus efeitos terapêuticos (MROZ et al., 2011).

A autofagia é um processo celular caracterizado pela formação de autofagossomos, responsáveis por englobar organelas celulares e componentes citoplasmáticos. Os autofagossomos se fundem com lisossomos formando autolisossomos, neste processo ocorre a degradação e reciclagem do material englobado. Embora inicialmente tenha sido reconhecida como um mecanismo citoprotetor, a autofagia também pode induzir a morte celular em resposta à TFD, especialmente quando a apoptose está comprometida (KESSEL; OLEINICK, 2009; DABROWSKI, 2017). Sabe-se que baixas doses de luz induz a autofagia como um mecanismo protetivo, ao passo que doses elevadas, promove a indução de mecanismos de morte celular a partir da autofagia (AGOSTINIS et al., 2011; DABROWSKI, 2017).

A Figura 6 sintetiza as reações fotoquímicas envolvidas na aplicação da TFD, incluindo a formação das ERO ao longo do sistema e as subseqüentes alterações celulares desencadeadas pelo processo fotodinâmico.

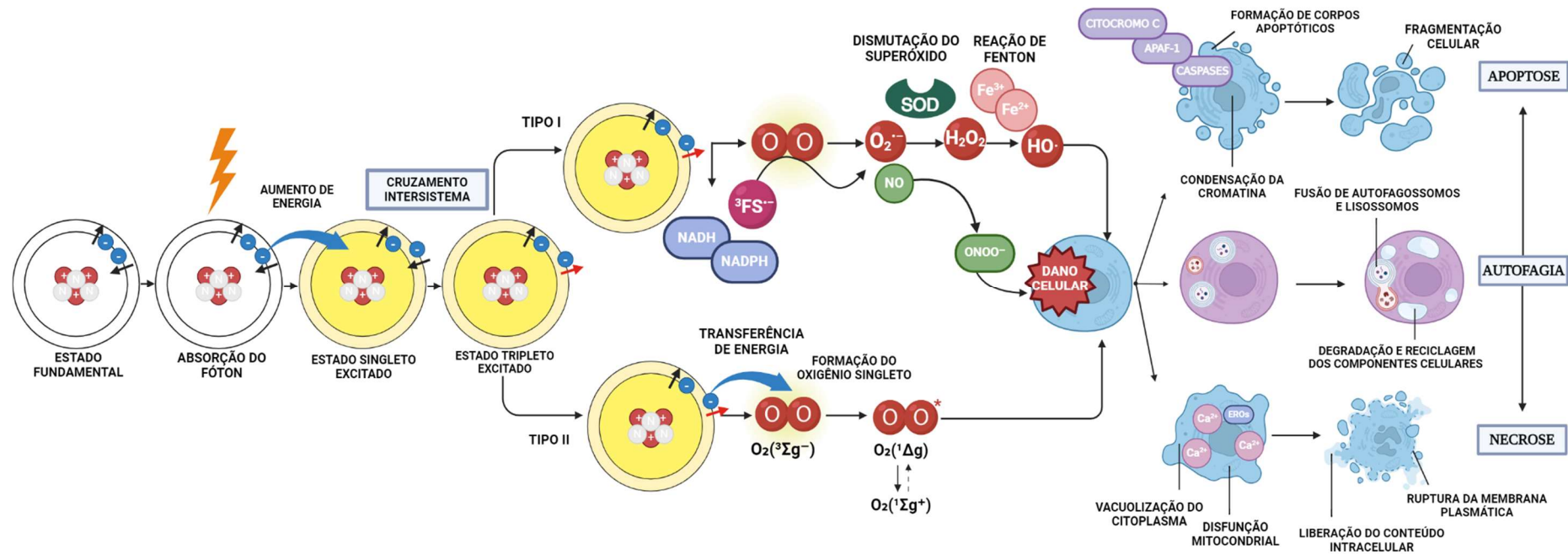


Figura 6 - Diagrama dos processos celulares desencadeados pela TFD. A absorção de fótons pelo FS resulta em estados excitados, levando à formação de ERO. As ERO desencadeiam danos celulares, ocasionando a morte celular por apoptose, necrose ou a partir de mecanismos autofágicos, dependendo da intensidade e extensão do dano. Abreviações: APAF-1: Fator Ativador de Protease de Apoptose-1; Ca^{2+} : Íons cálcio; $^3FS^{\cdot-}$: Fotossensibilizador no estado tripleto em sua forma reduzida; Fe^{2+} : Íon ferroso; Fe^{3+} : Íon férrico; H_2O_2 : Peróxido de hidrogênio; $HO^{\cdot}$: Radical hidroxila; NADH: Nicotinamida Adenina Dicleotídeo; NADPH: Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato); NO: Óxido nítrico; ONOO $^-$: Peroxinitrito; O_2 : Oxigênio molecular; $O_2^{\cdot-}$: Superóxido; SOD: Superóxido dismutase. Fonte: Adaptado de ALVAREZ; SEVILLA, 2024.

2.3.1 Fotossensibilizador (FS)

A eficácia da TFD está diretamente relacionada à efetividade do FS escolhido para compor o sistema, visto seu importante papel nos processos anteriormente descritos (WAINGADE; MEDIKERI; RATHOD, 2022). As características ideais para escolha de um FS incluem: (1) acúmulo no tecido alvo; (2) alta produção de $^1\text{O}_2$; (3) baixa toxicidade na ausência de luz; (4) tempo de meia vida curto; (5) comportamento anfifílicos; (6) pico de absorção de luz entre 600 nm e 800 nm. Nesse contexto, diversos avanços têm sido implementados para desenvolver FS que atendam a esses critérios, resultando no aumento da aplicabilidade e eficácia da TFD (TARDIVO et al., 2005; DOBSON; QUEIROZ, 2018; CORREIA et al., 2021; ZHOU et al., 2021).

O azul de metileno (AM), conhecido por cloreto de 3,7-bis(dimetilamino)fenazatiônio e representado na Figura 7, é um composto bem estabelecido e utilizado em diversas aplicações clínicas (XUE; THAIVALAPPIL; CAO, 2021). Este composto fenotiazínico destaca-se por sua capacidade de foto-oxidação de moléculas naturais e sintéticas, sendo empregado na TFD tem de diferentes tipos de câncer, incluindo no câncer de mama (TARDIVO et al., 2005; DOS SANTOS et al., 2017). Como FS, o AM apresenta propriedades farmacológicas favoráveis, devido à sua baixa toxicidade tecidual e reduzido peso molecular. Essas propriedades permitem uma entrega rápida e segura aos tecidos-alvo, otimizando sua eficácia terapêutica (XUE; THAIVALAPPIL; CAO, 2021; LAW; LEUNG; XU, 2023).

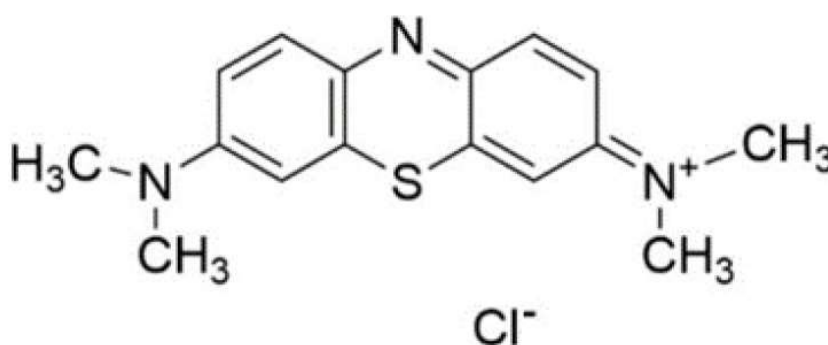


Figura 7 – Estrutura química do azul de metileno. Fonte: LAW; LEUNG; XU, 2023.

O AM apresenta características que permitem sua distribuição em vários compartimentos celulares e organelas. Sua lipofilicidade suficiente e carga positiva facilitam a travessia de membranas celulares, sendo atraído pelo ambiente eletroquímico negativo da matriz mitocondrial. Devido a essa propriedade, o AM se concentra preferencialmente nas

mitocôndrias, alcançando níveis até 1000 vezes superiores ao citosol. Esse acúmulo seletivo nas mitocôndrias é particularmente relevante para suas aplicações terapêuticas, especialmente na TFD direcionada a estas organelas (TARDIVO et al., 2005).

No entanto, é importante notar que o AM não se acumula exclusivamente nas mitocôndrias. Sua distribuição em vários compartimentos celulares depende de fatores como a densidade óptica do corante, o comprimento de onda de excitação e o rendimento quântico do $^1\text{O}_2$. Essa distribuição abrangente, combinada à acumulação seletiva em organelas específicas, faz do AM uma molécula versátil para intervenções com diferentes alvos celulares (TARDIVO et al., 2005).

Além de um FS bem selecionado, existem outros fatores que afetam a eficiência da TFD como a presença de oxigênio e o acúmulo de FS em tecidos-alvo (ZHOU et al., 2021). A proliferação e o crescimento das células tumorais exigem um alto consumo de oxigênio. Diversos segmentos tumorais exibem um microambiente hipóxico, resultando na redução do efeito da TFD e ocasionando o comprometimento da efetividade do tratamento (WANG et al., 2023). Outro fator limitante para o depósito de FS em tecidos-alvo é a complexidade enfrentada no tratamento de tumores profundos. Dada a ativação da maioria dos FS por meio de luz de comprimento de onda curto (400-700 nm), ocorre o comprometimento da capacidade de penetração tecidual. Além disso, altas concentrações de FS podem levar à formação de agregados, o que afeta a produção de ERO e reduz a eficiência na absorção de luz e conversão ao estado tripleto (JI; WEI; YANG, 2022).

Apesar das limitações identificadas, há uma crescente percepção sobre o potencial da TFD como estratégia efetiva no tratamento do câncer (ALZEIBAK et al., 2021). Contudo, os experimentos e estudos clínicos são escassos, tornando relevante a realização de mais estudos com intuito de avançar o domínio da técnica e ampliar suas aplicações terapêuticas (ZHANG; LI, 2018).

2.4 Detecção de ERO por Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE)

O desequilíbrio entre a produção de ERO e a atividade antioxidante resulta no acúmulo de danos oxidativos em biomoléculas. Diante desse acúmulo, surgem marcadores do estresse oxidativo, tais como nucleotídeos modificados, produtos da peroxidação lipídica e constituição de proteínas carboniladas. As disfunções celulares estão associadas às mudanças no estado redox ou na sinalização redox celular e não demonstram correlação com o acúmulo de marcadores específicos de estresse oxidativo.

Portanto, a avaliação de marcadores de estresse oxidativo não oferece uma compreensão molecular precisa do estresse oxidativo e da sinalização celular, sendo necessário o desenvolvimento de métodos específicos e sensíveis para detectar ERO. É importante ressaltar que, embora não haja um método de referência universalmente aceito para a detecção de ERO, várias abordagens eficazes têm sido implementadas (DIKALOV; POLIENKO; KIRILYUK, 2018).

A detecção de ERO em diferentes compartimentos celulares e teciduais é fundamental para ampliar a compreensão sobre a sinalização e o impacto do estresse oxidativo no meio biológico. Entre os métodos disponíveis atualmente, a RPE destaca-se como o único método direto para avaliação de radicais livres de maneira precisa. Esse método permite a detecção de níveis fisiológicos com alta especificidade, sendo responsável por fornecer rigor às abordagens experimentais no campo da biologia redox (ELAJAILI et al., 2019).

A detecção de radicais livres de curta duração por RPE requer o uso de sondas moleculares específicas, denominadas como marcadores de spin. Essas sondas interagem com os radicais transitórios, convertendo-os em radicais mais estáveis e de vida prolongada, que podem então ser quantificados por meio da técnica de RPE (ELAJAILI et al., 2023). Também existe uma variedade de sondas de spin que podem medir uma gama de espécies de radicais livres biologicamente relevantes (ELAJAILI et al., 2019). É importante destacar a distinção entre *spin traps* (armadilhas de spin) e *spin probes* (sondas de spin). As armadilhas de spin estabelecem uma ligação covalente com o radical por meio de uma reação de adição, ao passo que as sondas de spin são oxidadas pelas ERO sem que ocorra ligações (DIKALOV; HARRISON, 2014).

As hidroxilaminas cíclicas constituem um dos tipos mais empregados de sondas de spin, exemplos ilustrados na Figura 8 (ELAJAILI et al., 2019). Essas sondas são oxidadas por ERO com constante de velocidade de $\sim 10^3\text{--}10^4\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$. A oxidação origina nitróxidos estáveis detectáveis via RPE e com vida útil de várias horas em culturas celulares. A alta constante de velocidade favorece a detecção, visto que minimiza a competição entre os nitróxidos com os antioxidantes celulares e assim, aumenta a precisão no quantitativo de $\text{ERO}_{\text{intracelular}}$ (DIKALOV; HARRISON, 2014).

A detecção por meio de sondas de spin da classe das hidroxilaminas cíclicas oferece uma alta sensibilidade no equipamento de RPE de banda X. Essa avançada tecnologia possibilita a medição de concentrações extremamente baixas de radicais e outras espécies paramagnéticas, tanto em ambientes *in vitro*, quanto em amostras teciduais (BERG et al., 2014). Uma característica específica das hidroxilaminas cíclicas é a capacidade de monitorar

diretamente a produção de ERO no nível celular, subcelular e tecidual em tempo real e em temperatura ambiente. Esse acompanhamento é realizado observando o acúmulo de radicais nitróxido por RPE (DIKALOV; HARRISON, 2014).

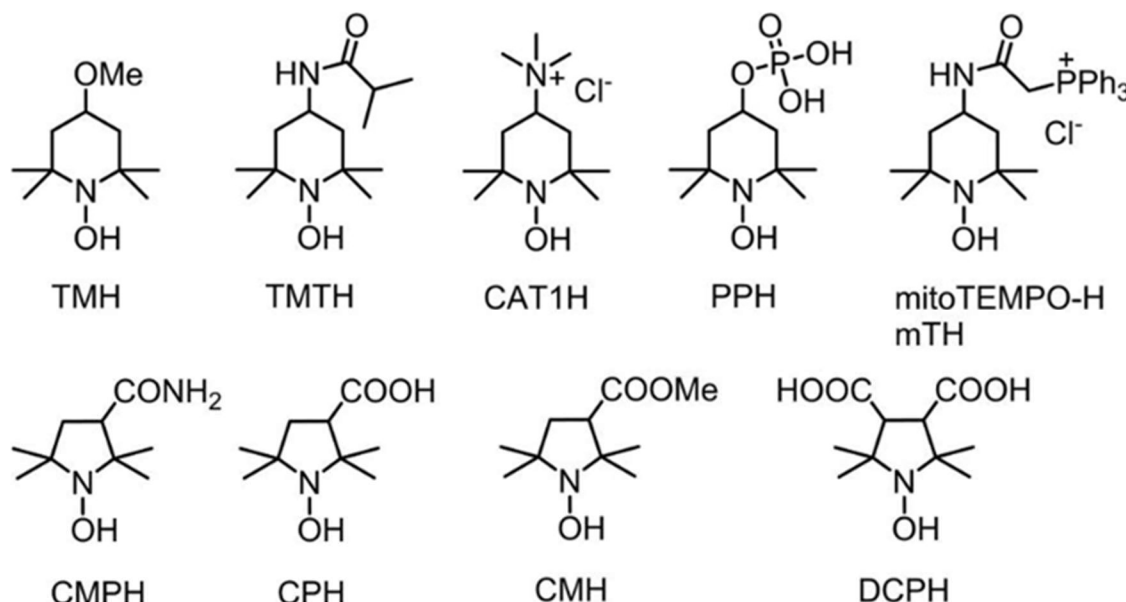


Figura 8 – Estruturas químicas de sondas de hidroxilaminas cíclicas. Fonte: Adaptado de DIKALOV; POLIENKO; KIRILYUK, 2018.

Há uma diversidade de sondas da classe das hidroxilaminas cíclicas, variando pela carga elétrica entre catiônicas, aniônicas e neutras ou pela lipofilicidade e permeabilidade celular (Figura 8). A alta permeabilidade do 1-hidroxi-3-metoxycarbonil-2,2,5,5-tetrametilpirrolidina (CMH) permite a detecção de ERO intra e extracelular, ao passo que o ativo 1-hidroxi-4-[2-trifenilfosfonio-acetamido]-2,2,6,6-tetrametilpiperidina (mitoTEMPO-H) concentra-se especificamente na detecção nas mitocôndrias (DIKALOV; HARRISON, 2014).

Cabe destacar que a oxidação de hidroxilaminas cíclicas não é exclusiva para $O_2^{\cdot-}$, portanto, a utilização de controles específicos é fundamental para verificar a natureza das ERO envolvidas na geração do sinal do radical nitróxido. Isso é notável pela utilização da SOD, impermeável à célula e responsável pela identificação do $O_2^{\cdot-}$ extracelular e do polietilenoglicol superóxido dismutase (PEG-SOD), permeável à célula e responsável pela identificação de $O_2^{\cdot-}$ intracelular (DIKALOV et al., 2011; DIKALOV; HARRISON, 2014; ELAJAILI et al., 2019).

O objetivo principal desse processo é minimizar a produção de artefatos e aumentar a precisão na interpretação das respostas celulares. A combinação de diferentes tipos de hidroxilaminas com controles adequados permite uma compreensão mais detalhada dos processos celulares envolvidos no tratamento proposto (DIKALOV; POLIENKO; KIRILYUK, 2018).

3 Objetivos

3.1 Objetivo Geral

- Padronizar métodos de detecção de ERO e, especificamente, de radicais superóxido em diferentes compartimentos celulares, utilizando hidroxilaminas cíclicas associadas à RPE, em cultura de células tumorais mamárias submetidas à TFD.

3.2 Objetivos específicos

- Padronizar os parâmetros físicos envolvidos na aplicação da TFD;
- Padronizar um método de detecção de ERO em cultura de células tumorais mamárias submetidas à TFD;
- Padronizar um método de detecção de superóxidos extracelulares em cultura de células tumorais mamárias submetidas à TFD;
- Padronizar um método de detecção de superóxidos citosólicos em cultura de células tumorais mamárias submetidas à TFD.
- Padronizar um método de detecção de superóxidos mitocondriais em cultura de células tumorais mamárias submetidas à TFD.

4 Metodologia

4.1 Materiais e reagentes

As células epiteliais de carcinoma mamário murino 4T1-Luciferase (4T1-Luc) e os fibroblastos murinos 3T3 (NIH/3T3) foram adquiridos no Banco de Células do Rio de Janeiro no Brasil. As células foram gentilmente concedidas pela Profª Drª Sônia Nair Bão e os ensaios celulares foram realizados no Laboratório de Microscopia e Microanálise no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília. Para realização do cultivo e manutenção celular, foi utilizado o meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) para células NIH/3T3 e *Roswell Park Memorial Institute* médio 1640 (RPMI-1640) para 4T1-Luc, ambos suplementadas com soro fetal bovino inativado a 10% e antibiótico penicilina (100 UI.mL^{-1}) e estreptomicina ($100 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$) a 1%, com o pH ajustado para 7,2. Para a avaliação da viabilidade celular, foi utilizado o reagente Alamar Blue (AlamarBlue™ Cell Viability Reagent, Invitrogen™). O AM foi adquirido em Hatfield PA, EUA. As hidroxilaminas cíclicas utilizadas como marcadores de spin foram o CMH (Noxygen, Alemanha) e o mitoTEMPO-H (Enzo Life Sciences, EUA). As enzimas SOD e sua versão conjugada com polietilenoglicol, a PEG-SOD, foram obtidas da Sigma-Aldrich, EUA. O Tampão Krebs Hepes (KHB), o trihidrato de dietilditiocarbamato de sódio (quelante de cobre) e a deferoxamina (quelante de ferro) foram obtidos da Noxygen (Alemanha).

4.2 Ensaio de viabilidade celular

A fim de verificar a viabilidade celular das linhagens NIH/3T3 e 4T1-Luc diante do AM, realizou-se o ensaio com células sem tratamento e células tratadas com o FS, ambas no meio de cultivo estabelecido. As concentrações utilizadas no ensaio seguiram o protocolo previsto por Santos, 2017, portanto, avaliou-se as concentrações de $1,25 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$, $2,5 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$, $3,75 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$, $5 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $10 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ de AM. Foram semeadas 5×10^3 de células NIH/3T3 e 4T1-Luc em microplacas de 96 poços e tratadas com diferentes concentrações de AM. A placa foi mantida em incubadora úmida por 24h e transcorrido esse período, as células foram incubadas com 110 μL de *Alamar Blue* e retornaram à incubadora por mais 2h 30 min. A leitura em fluorescência foi realizada em espectrofotômetro Spectramax M5 (Molecular Devices – USA) (λ_{ex} 560; λ_{em} 590). Optou-se pela concentração de AM que apresentou a menor citotoxicidade no escuro para aplicação nos ensaios de TFD, sendo considerado como ideal a concentração de $1,25 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ de AM.

4.3 Avaliação do efeito fotodinâmico

A aplicação da TFD foi dada a partir de um sistema emissor de luz de LED (Diodo Emissor de Luz, do inglês *Light Emitting Diode*) no comprimento de onda específico de 660 nm. O sistema foi projetado e constituído no Laboratório de Software e Instrumentação em Física Aplicada na Universidade de Brasília (UnB) pelo Prof. Dr. Paulo Eduardo Narcizo de Souza. O equipamento era composto por um LED de 660 nm (modelo GP-100Wr6-G42M-Z3GL, *Green Powertech Solutions Limited*), controlado por modulação de largura de pulso aplicada à uma onda quadrada de 480 Hz. O controle térmico do equipamento ocorre por meio de um refrigerador de água comercial (Corsair H95), desempenhando um papel de dissipador de calor ligado ao LED de alta potência.

A padronização dos ensaios de TFD para determinação da fototoxicidade foi feita a partir do plaqueamento de 5×10^3 de células NIH/3T3 e 4T1-Luc em microplacas de 96 poços. As células foram divididas em: (1) células sem tratamento e (2) células tratadas com AM e emissão do LED 660 nm. Verificou-se a viabilidade celular nas irradiâncias de 7,5, 15, 22,5 mW/cm², com distanciamento de 12 cm entre a placa do LED e a base do aparelho, garantindo a emissão uniforme sobre os poços avaliados. Decorrido o tempo de irradiação de 60 segundos, as células foram incubadas por mais 24 h para verificação da viabilidade celular com aferição da fluorescência em espectrofotômetro. Considerou-se a redução da viabilidade das células 4T1-Luc, bem como a preservação da integridade da linhagem NIH/3T3 para definir a potência de 15 mW/cm², durante 60 s, para aplicação da TFD nos ensaios seguintes. Essa condição permitiu a aplicação de uma fluência de 0.9 J/cm². Os ensaios foram realizados em triplicata para avaliar o desempenho celular frente à TFD.

4.4 Detecção da produção de superóxido por RPE em diferentes compartimentos celulares

O princípio fundamental desta técnica baseia-se na transformação química das hidroxilaminas cíclicas, que são inicialmente moléculas diamagnéticas, em nitróxidos paramagnéticos quando reagem com ERO. Esta mudança no estado magnético da molécula é a chave para a detecção e quantificação das ERO. Quando expostas a ERO, as hidroxilaminas cíclicas, como o CMH, rapidamente se oxidam, formando radicais nitróxidos estáveis. Estes radicais, por possuírem elétrons desemparelhados, geram um sinal característico no espectro de RPE, cuja intensidade é diretamente proporcional à quantidade de ERO presentes no sistema.

Para a detecção de ERO nos diferentes compartimentos celulares, realizou-se o plaqueamento de 5×10^4 de células NIH-/3T3 e 4T1-Luc em placas de 24 poços e mantidas em incubadora úmida durante 24 horas. Decorrido esse período, as células receberam diferentes condições de tratamento.

Para a detecção total de ERO preparou-se uma solução estoque de 10 mM de CMH, dissolvido em KHB. Este tampão continha 25 mM de deferoxamina (DF, quelante de ferro) e 5 mM de trihidrato de dietilditiocarbamato de sódio (DETC, quelante de cobre), utilizados para minimizar a oxidação do CMH por metais de transição. As soluções foram preparadas imediatamente antes dos experimentos e mantidas em gelo durante todo o decorrer dos mesmos. Foram adicionados 12,5 μL de CMH para atingir a concentração final de 200 μM , em seguida adicionou-se o fotossensibilizador diluído em KHB em volume total de 500 μL e realizadas as irradiações com luz de LED 660 nm (fluência de 0.9 J/cm^2).

Para avaliar a produção de superóxido extracelular, os poços foram pré-tratados com SOD, representação na Figura 9. Adicionou-se 10 μL /poço de solução de trabalho de SOD para atingir a concentração final de 50 U/mL e incubados por 10 min a 37°C antes da adição de CMH e AM. As placas foram irradiadas por 60 segundos (fluência de 0.9 J/cm^2), em seguida incubadas por 50 min em incubadora úmida a 37°C . Posteriormente à incubação, 400 μL do sobrenadante foram colocados em seringa de 1 mL e imediatamente congelados em nitrogênio líquido. A placa foi mantida sobre gelo durante o procedimento.



Figura 9 – Esquema metodológico para avaliação da produção de superóxido extracelular. Fonte: Autoria própria.

Para avaliar a produção de superóxido intracelular, os poços foram pré-tratados com PEG-SOD, conforme ilustrado na Figura 10. Adicionou-se 14 μL /poço de solução de trabalho

de PEG-SOD para atingir a concentração final de 100 U/mL e incubados por 10 min a 37 °C antes da adição de CMH e AM. As placas foram irradiadas por 60 segundos (fluência de 0.9 J/cm²), em seguida, incubadas por 50 min em incubadora úmida a 37°C. Posteriormente à incubação, 400 µL do sobrenadante foram retirados. Em seguida, as células foram raspadas e ressuspensas com o auxílio de uma pipeta. Utilizou-se uma seringa, na qual foram colocados 200 µL de água, congelados em nitrogênio líquido, em seguida 50 µL da suspensão de células, que também foram congeladas e então mais 200 µL de água, congelando então todo o conteúdo da seringa. Todas as amostras foram armazenadas a -80 °C até as medidas de RPE.



Figura 10 – Esquema metodológico para avaliação da produção de superóxido intracelular. Fonte: Autoria própria.

Para avaliar a produção de superóxido mitocondrial, esquema representado na Figura 11, adicionou-se 5,3 µL/poço de solução de trabalho de mito-TEMPO-H para atingir a concentração final de 250 µM e incubados por 10 min a 37 °C antes da adição de AM. O restante do procedimento foi idêntico ao descrito acima para avaliar a produção de superóxido intracelular. Todas as amostras foram armazenadas a -80 °C até as medidas de RPE.

Para a curva de calibração das medidas de ERO, foram preparadas amostras a partir de uma solução estoque de 10 mM do padrão: 3-carboxi-proxilo (CP•) (Noxygen, Alemanha) preparado em KHB e diluído a concentrações de 0, 5, 10, 50, e 100 µM. Exatamente 400 µL das amostras de calibração foram transferidos seringas de 1 mL e congelados instantaneamente em nitrogênio líquido.

As medidas de RPE foram realizadas em um espectrômetro Bruker EMX500, utilizando a banda X (9,35 GHz), potência 2 mW e campo de modulação de 200 Gauss, constante de tempo de 10 ms, tempo de varredura de 600 G e 5 varreduras adicionados em conjunto para cada medição. Os parâmetros e a análise dos dados foram baseados em metodologia padronizada e adaptados de acordo com as necessidades do nosso estudo.



Figura 11 – Esquema metodológico para avaliação da produção de superóxido mitocondrial. Fonte: Autoria própria.

4.5 Análise estatística

A análise estatística dos dados foi realizada utilizando o software GraphPad Prism 10.0. As comparações estatísticas foram efetuadas por análise de variância a dois fatores (ANOVA Two-Way), seguido pelo pós-teste de Tukey. O nível de significância estatística foi estabelecido em 95% de confiança. Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). Diferenças entre grupos foram consideradas estatisticamente significativas quando o valor de p foi menor que 0,05 ($p < 0,05$).

5 Resultados e Discussão

Uma das características fundamentais na seleção de um FS é sua capacidade de não desempenhar um caráter tóxico até a ativação pela luz (DOBSON; QUEIROZ, 2017). Dessa forma, foi necessário avaliar a citotoxicidade das linhagens perante o AM. Para determinar a viabilidade celular no escuro, as células NIH-3T3 e 4T1-Luc foram tratadas com diferentes concentrações de AM. Com base no protocolo descrito por Santos (2017), foram estabelecidas as concentrações de $1,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $2,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $3,75 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de AM para o ensaio.

A Figura 12 apresenta os índices de viabilidade celular das duas linhagens celulares após o tratamento com diferentes concentrações de AM. Ambas as linhagens demonstraram sensibilidade ao AM, com diminuição progressiva da viabilidade conforme o aumento da concentração. Notavelmente, as células 4T1-Luc exibiram maior susceptibilidade ao tratamento, apresentando reduções mais acentuadas na viabilidade em comparação com as NIH-3T3, especialmente em concentrações acima de $2,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Esta diferença foi particularmente evidente na concentração de $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$, onde a viabilidade das células 4T1-Luc caiu para 36%, enquanto as NIH-3T3 mantiveram uma viabilidade de 67%. Esses achados sugerem uma potencial seletividade do AM, indicando sua capacidade de afetar diferentemente distintas linhagens celulares. Esse comportamento é consistente com a literatura, que aponta uma maior citotoxicidade em células tumorais em razão do seu metabolismo acelerado. Em contraste, as células normais apresentam maior viabilidade celular no tratamento com concentrações equivalentes (DOBSON; QUEIROZ, 2017).

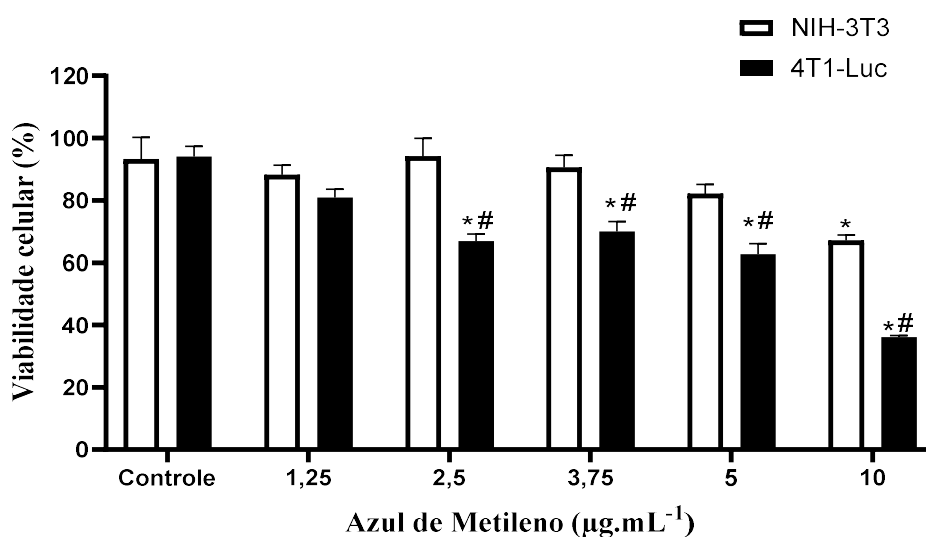


Figura 12 – Avaliação da citotoxicidade do AM em células NIH-3T3 (controle) e 4T1-Luc (tumoral) no escuro. As colunas representam a viabilidade celular diante das concentrações de $1,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $2,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $3,75 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de AM. Dados representam média $\pm$ EPM, $n = 4$. # $p < 0,05$ (comparado com células NIH-3T3 na mesma concentração de AM) e * $p < 0,05$ (comparado com o respectivo grupo controle).

Selecionamos a concentração de $1,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de AM para prosseguir com os ensaios de fototoxicidade porque nesta concentração ambas as linhagens celulares mantiveram alta viabilidade, próxima ao controle, o que permite observar os efeitos específicos da fototoxicidade, sem confundi-los com a toxicidade direta do AM, além de garantir que haja um número de células suficientes para o estudo. Assim, foi possível investigar se a fotoativação do AM pode induzir efeitos tóxicos adicionais, mesmo em concentrações que são relativamente seguras sem exposição à luz, fornecendo informações valiosas sobre seu potencial como agente fototerapêutico.

A otimização da TFD requer uma cuidadosa seleção e ajuste de diversos parâmetros físicos para garantir sua eficácia e segurança. A literatura, notadamente os trabalhos de Torezan e Niwa (2009) e Algorri et al. (2021), destaca vários fatores determinantes para a eficácia da TFD, incluindo a taxa de fluência, o tempo de irradiação, o espectro de emissão, a distribuição espacial da luz e a irradiância.

Para minimizar possíveis variações no sistema, buscou-se a padronização desses fatores. As condições específicas estabelecidas para o estudo foram: uso de um LED de 660 nm, com uma fluência de $0,9 \text{ J/cm}^2$, aplicada durante um tempo de irradiação de 60 segundos, mantendo uma distância de 12 cm entre a placa do LED e a base do aparelho. Com o intuito de otimizar ainda mais o processo, foi conduzido um ensaio específico para selecionar a irradiância mais adequada, demonstrado na Figura 13. O objetivo principal era encontrar um equilíbrio entre a eficácia terapêutica e a segurança, mitigando os danos indesejados que poderiam ser causados por irradiâncias mais elevadas, ao mesmo tempo evitando a insuficiente ativação do AM, que poderia ocorrer com irradiâncias mais baixas (ABRAHAMSE; HAMBLIN, 2016). Neste contexto, foram avaliadas as irradiâncias de: 7,5, 15, 22,5 mW/cm^2 , mantendo constantes os outros parâmetros previamente estabelecidos.

Os resultados demonstraram que a irradiação apenas com luz de LED (irradiância de 15 mW/cm^2), na ausência do FS, promoveu aumento na viabilidade de ambos os tipos celulares. Esse aumento pode ser explicado pelo fenômeno da fotobiomodulação, também conhecido como bioestimulação. Esse processo ocorre quando a luz em comprimentos de onda específicos, particularmente na faixa do vermelho (630-670 nm), interage diretamente com componentes celulares fotorreceptores, especialmente a enzima citocromo c oxidase presente na cadeia transportadora de elétrons mitocondrial, o que desencadeia uma cascata de eventos celulares que promovem o metabolismo e a proliferação celular. Quando a luz é absorvida pela citocromo c oxidase, ocorre uma otimização do transporte de elétrons na cadeia respiratória, resultando em maior eficiência na produção de ATP. Este aumento na disponibilidade energética celular,

por sua vez, estimula diversos processos biológicos, incluindo a síntese de DNA e proteínas, além de ativar fatores de transcrição relacionados à proliferação celular (KARU, 2008).

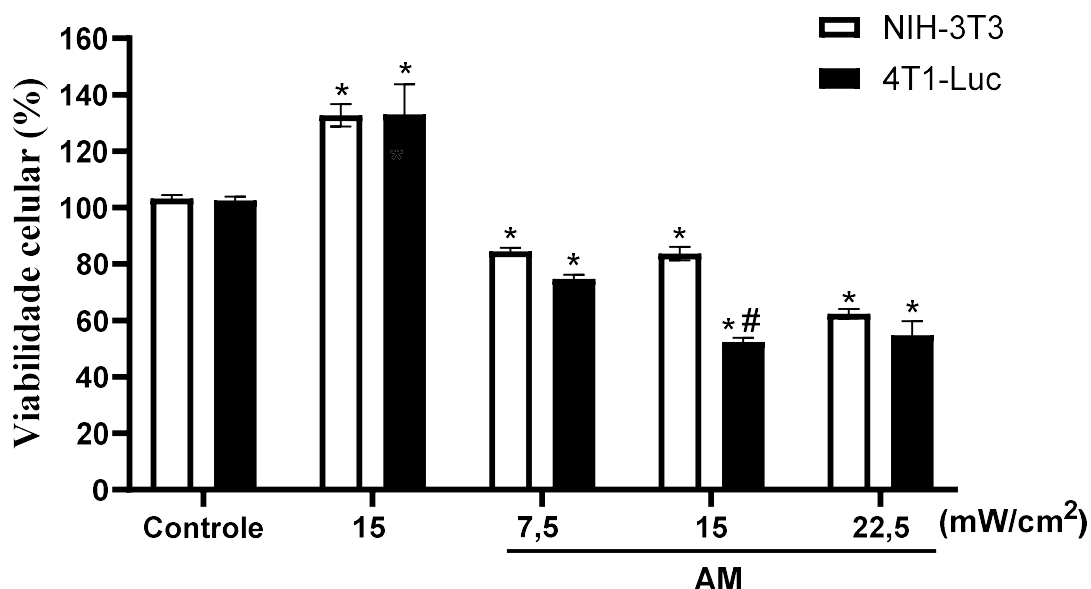


Figura 13 – Avaliação do efeito fotodinâmico em células NIH-3T3 (controle) e 4T1-Luc (tumoral) por AM (1,25 µg/mL) e irradiação com luz de LED 660 nm durante 60 segundos. Foram testadas as irradiâncias de 7,5, 15 e 22,5 mW/cm². A exposição das células somente à luz de LED 15 mW/cm², na ausência de AM, promoveu aumento da viabilidade celular. Dados representam média ± EPM, n = 4. # p < 0,05 (comparado com células NIH-3T3 sob a mesma irradiação) e * p < 0,05 (comparado com o respectivo grupo controle).

Verificou-se, ainda, que após a irradiância de 22,5 mW/cm² houve redução na viabilidade tanto de células normais quanto tumorais de maneira não seletiva. A irradiância de 15 mW/cm² foi a que promoveu maior redução na viabilidade das células tumorais 4T1-Luc (-49%), em comparação às células normais NIH-3T3 (-18%). Isto sugere que esta irradiância específica fornece energia suficiente para ativar o fotossensibilizador e induzir a morte celular nas células tumorais, causando poucos danos às células normais circundantes. Com base nessa evidência, padronizou-se o uso da irradiância de 15 mW/cm² para os ensaios subsequentes de detecção de ERO.

A detecção de ERO durante a TFD é fundamental para compreender e otimizar o tratamento. As ERO são os principais agentes responsáveis pelo efeito citotóxico da TFD, tornando sua medição essencial para avaliar diretamente a eficácia do tratamento (DOS SANTOS et al., 2019; ZHANG et al., 2020). Além disso, a produção de ERO pode servir como indicador precoce do potencial sucesso do tratamento. Geralmente, uma maior produção está correlacionada com uma maior eficácia terapêutica, permitindo prever os resultados e, se necessário, ajustar o tratamento (DOUGHERTY et al., 1998, DUSE et al., 2018).

No presente estudo, utilizou-se hidroxilaminas cíclicas associadas à RPE para quantificar a produção de ERO durante a TFD. A Figura 14 apresenta a produção de nitróxido após tratamento com AM e irradiação com LED de 660 nm nas duas linhagens celulares: NIH-3T3 e 4T1-Luc. Nos grupos branco (apenas meio de cultura) e controle (apenas células em meio de cultura), ambas as linhagens celulares exibiram níveis negligenciáveis de nitróxido. Da mesma forma, a exposição isolada ao LED de 660 nm não provocou aumento significativo na produção de nitróxido, indicando que a luz por si só não induz estresse oxidativo considerável nas células.

O tratamento apenas com AM resultou em aumento na produção de ERO, quando comparado ao grupo controle. Essa característica do AM já foi verificada em outros estudos (RODRÍGUEZ-CÓRDOVA et al., 2019; JIANG et al., 2019; WU et al., 2019) e indica sua capacidade em induzir um certo nível de estresse oxidativo nas células, mesmo sem ativação pela luz. Uma possível explicação é a capacidade do AM em interagir com a cadeia de transporte de elétrons mitocondrial. O AM pode entrar na mitocôndria e criar uma via alternativa para o fluxo de elétrons, aceitando elétrons do NADH no complexo I e transferindo-os diretamente para o citocromo c, que pode resultar em um aumento na produção de superóxido nos complexos I ou III (PATIL et al., 2020; GUREEV et al., 2022). Além disso, o AM também pode interagir com íons metálicos como ferro e cobre, catalisando a reação de Fenton, que converte H_2O_2 em $HO^\bullet$ (IMPERT et al., 2003).

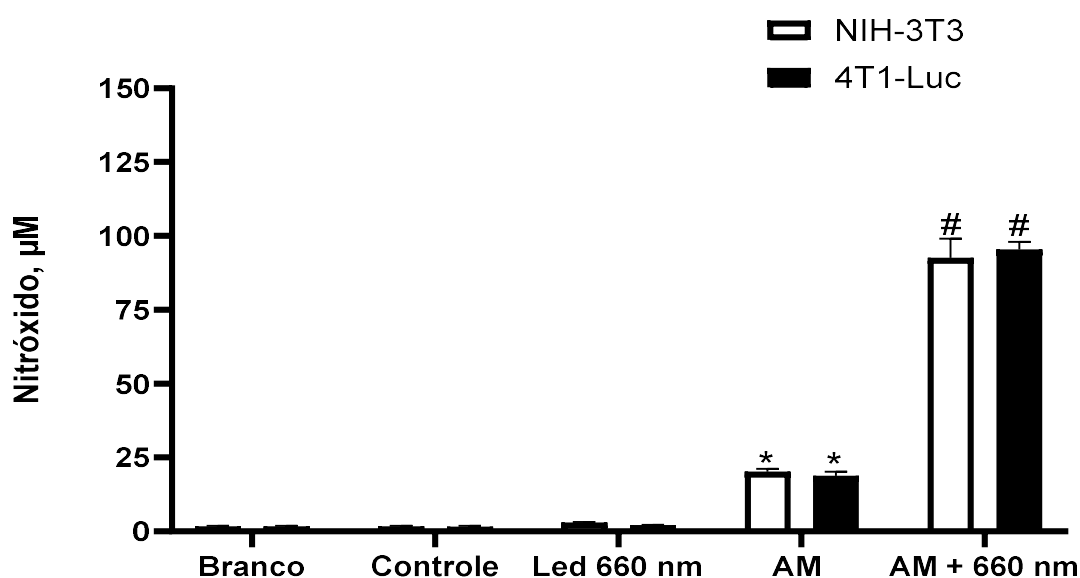


Figura 14 – Produção de nitróxido medidas por RPE em células NIH-3T3 (controle) e 4T1-Luc (tumoral) após tratamento com AM e irradiação com LED 660 nm. As colunas são segmentadas em 6 grupos, sendo: (1) branco, composto apenas pelo meio de cultura celular; (2) controle, caracterizado pelo meio de cultura e a linhagem descrita; (3) Led 660 nm, irradiação aplicada frente ao meio celular e linhagem descrita; (4) AM, somente o FS aplicado no escuro; (5) AM + 660 nm, tratamento com FS e irradiação com LED. A Figura demonstra a formação de nitróxidos durante TFD. Dados representam média $\pm$ EPM, $n = 3$. Diferença significativa * $p < 0,05$ (comparado com o respectivo grupo controle) e # $p < 0,05$ (comparado com o respectivo grupo AM)

Cabe ressaltar que, embora esses mecanismos possam levar ao estresse oxidativo, o AM também tem sido estudado por seus potenciais efeitos terapêuticos em certas condições, particularmente em baixas doses (OZ et al., 2009; YANG et al., 2017). O equilíbrio entre seus efeitos pró-oxidantes e antioxidantes pode depender de fatores como concentração, estado redox celular e contexto fisiológico.

Como esperado, os resultados demonstraram aumento significativo na produção de nitróxido quando o AM foi ativado pela irradiação de 660 nm, atingindo níveis aproximadamente cinco vezes superiores aos observados no grupo que recebeu apenas AM. Este aumento na produção de nitróxido pode ser atribuído a uma série de processos fotoquímicos e biológicos desencadeados pela ativação do AM (WAINWRIGHT; CROSSLEY, 2002). Quando o AM absorve fótons da luz de 660 nm, ele é excitado para um estado de maior energia. Neste estado, o AM pode interagir eficientemente com o oxigênio molecular presente no ambiente celular, promovendo a formação de $^1\text{O}_2$ (DEROA; CRUTCHLEY, 2002). Além disso, o AM excitado pode participar de reações de transferência de elétrons, gerando outras ERO como o ânion superóxido e o radical hidroxila (ZHAO; XU, 2013).

O aumento na concentração de nitróxido observado após a fotoativação do AM foi consideravelmente maior do que a soma dos efeitos do AM e da luz LED quando aplicados separadamente. Este efeito sinérgico sugere que a combinação de AM e luz não apenas soma seus efeitos individuais, mas potencializa significativamente a geração de espécies reativas e, conseqüentemente, a produção de nitróxidos (HAMBLIN; HASAN, 2004).

Embora as células NIH-3T3 e 4T1-Luc tenham apresentado diferentes sensibilidades ao AM ativado (Figura 13), não se observou diferença na produção de nitróxido entre as duas linhagens (Figura 14). Este resultado alinha-se com o estudo de Scheinok et al. (2020), que não encontrou diferença significativa na produção global de ERO entre células de câncer de colo do útero humano do tipo selvagem SiHa e células SiHaF3 superinvasivas.

Contudo, a literatura indica que a produção de ERO é geralmente elevada nas células tumorais devido ao aumento da taxa metabólica, mutações genéticas e hipóxia relativa (PERILLO et al., 2020). Além disso, evidências sugerem que células tumorais são mais sensíveis aos agentes geradores de ERO em comparação com as células normais. Glorieux et al. (2024) revisaram as diferenças significativas entre células normais e tumorais em seus estados redox dinâmicos, mecanismos de regulação e capacidade de lidar com o estresse oxidativo e responder a agentes moduladores de ERO. Os autores descreveram que células normais e cancerosas exibem perfis de transcrição distintos de RNAs longos não codificantes

(lncRNAs) em resposta ao estresse oxidativo. Essa descoberta sugere que os lncRNAs podem desempenhar um papel importante na modulação da resposta diferencial ao estresse de ERO entre células normais e cancerosas. No entanto, os mecanismos moleculares e bioquímicos responsáveis por essa diferença de sensibilidade ainda não foram completamente elucidados, indicando a necessidade de mais pesquisas nesta área.

Em cultura de células, o uso do CMH associado ao pré-tratamento com as enzimas SOD (impermeável) e PEG-SOD (permeável) permite a diferenciação entre superóxidos citosólicos e extracelulares.

A Figura 15 apresenta a medida da concentração de nitróxidos por RPE nas duas linhagens celulares: NIH-3T3 e 4T1-Luc, após o tratamento com AM ativado pela irradiação de 660 nm em comparação ao grupo controle. A contribuição do superóxido extracelular foi validada por meio do pré-tratamento com SOD, em que se observou redução na amplitude do espectro de RPE, quando comparado com células que não receberam esse tratamento. A diferença entre as concentrações de nitróxido com e sem o pré-tratamento com SOD representa a produção de superóxido extracelular, uma vez que a SOD é uma enzima não permeável à membrana celular, restringindo sua atividade ao espaço extracelular (DIKALOV et al., 2007; MAURYA; NAMDEO, 2021). Por outro lado, o CMH, sendo permeável à membrana, tem a capacidade de reagir com o superóxido tanto no ambiente intracelular quanto no extracelular, formando um radical nitróxido estável que pode ser quantificado por RPE (DIKALOV et al., 2011).

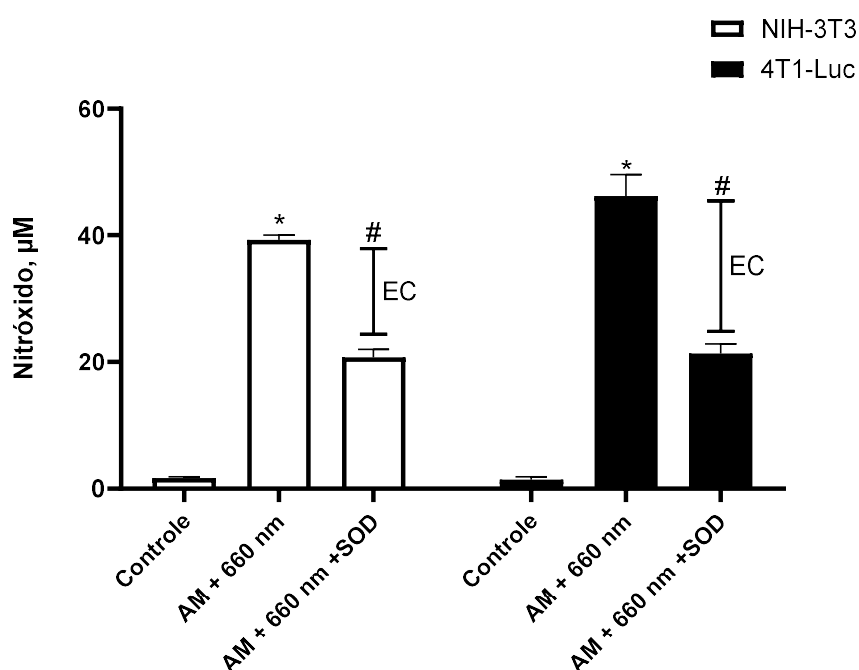


Figura 15 – Produção de nitróxido medidas por RPE em células NIH-3T3 (controle) e 4T1-Luc (tumoral) com pré-tratamento de SOD e tratamento com AM e irradiação com LED 660 nm. A figura demonstra o papel da SOD em neutralizar as ERO e evidenciar a produção de superóxido extracelular e total. EC = Superóxido

Extracelular. Dados representam média e desvio padrão, $n = 3$. Diferença significativa * $p < 0,05$ (comparado com o respectivo grupo controle) e # $p < 0,05$ (comparado com o respectivo grupo AM + 660 nm).

Quando as células são expostas apenas ao CMH, a sonda reage com todo o superóxido disponível, independentemente de sua localização, resultando em um sinal de RPE que representa a produção total de superóxido. Contudo, ao pré-tratar as células com SOD, cria-se uma condição onde o superóxido extracelular é rapidamente eliminado antes que possa interagir com o CMH. Consequentemente, o sinal de RPE observado nesta condição reflete principalmente a produção intracelular de superóxido, já que a SOD não penetra nas células para afetar o superóxido interno (GRIENDLING et al., 2016).

A diferença entre essas duas condições (com e sem pré-tratamento com SOD) fornece uma medida quantitativa do superóxido produzido especificamente no espaço extracelular, pois representa a porção do sinal que foi suprimida pela ação da SOD no ambiente fora das células. Esta abordagem permite discriminar entre a produção total de superóxido e a produção específica no espaço extracelular, permitindo não apenas a quantificação de ERO, mas também a determinação de sua localização celular e o papel protetor da SOD no controle desse processo (ELAJAILI et al., 2019).

A Figura 16 apresenta espectros de RPE representativos, gerados pelo tratamento das células com CMH e AM ativado, com ou sem o pré-tratamento com SOD. Demonstra-se que o sinal de nitróxido foi inibido pela SOD em ambas as linhagens celulares.

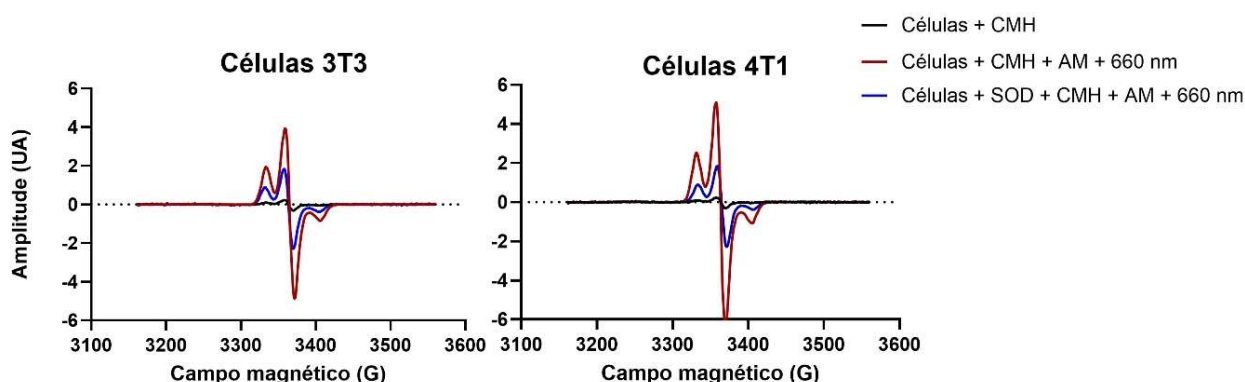


Figura 16 – Detecção de radical superóxido no sobrenadante de células NIH-3T3 (controle) e 4T1-Luc (tumoral) com pré-tratamento de SOD e tratamento com AM e irradiação com LED 660 nm. Espectros de RPE de nitróxidos detectados a 77 K após o tratamento das células com CMH (200 μ M) e com ou sem pré-tratamento de SOD (50 U/mL) e tratamento com AM e irradiação com LED 660 nm. Siglas: UA: Unidades arbitrárias.

Um experimento semelhante foi conduzido utilizando PEG-SOD com o intuito de analisar o perfil de produção de superóxido intracelular (Figura 17). A PEG-SOD é uma forma

modificada da SOD que foi conjugada com polietilenoglicol (PEG), alterando suas propriedades físico-químicas e permitindo que ela atravessasse membranas celulares (VERONESE et al., 2002). Quando as células foram expostas ao AM ativado por irradiação de 660 nm, verificou-se aumento significativo na concentração de nitróxido em ambas as linhagens celulares, em comparação ao grupo controle. Assim como observado com a SOD convencional, o pré-tratamento com PEG-SOD resultou em redução significativa na produção de nitróxidos ($p < 0,05$), evidenciando a diminuição dos níveis de superóxido intracelular, ou seja, confirmando a eficácia da PEG-SOD em neutralizar o superóxido intracelular (IC).

A capacidade da PEG-SOD de inibir superóxidos intracelulares a torna uma ferramenta importante para validar a participação específica destes radicais (em comparação com a produção total de ERO), além de analisar a dinâmica de produção de superóxidos em sistemas celulares (DIKALOV & HARRISON., 2014; ELAJAILI, et al., 2021).

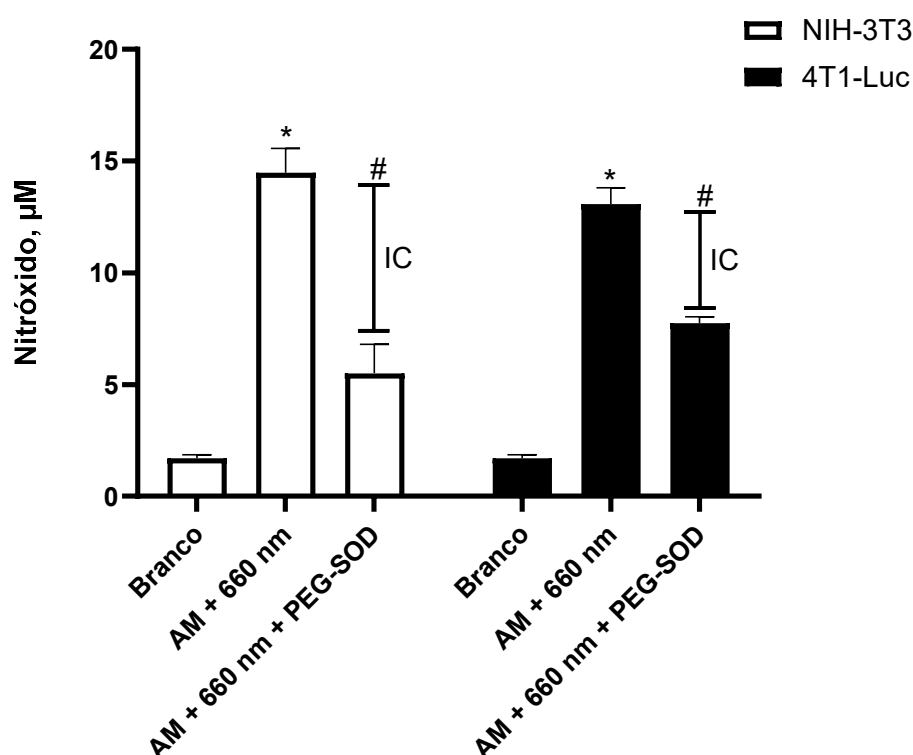


Figura 17 – Produção de nitróxido medidas por RPE em células NIH-3T3 (controle) e 4T1-Luc (tumoral) com e sem pré-tratamento de PEG-SOD e tratamento com AM e irradiação com LED 660 nm. A figura demonstra o papel da PEG-SOD em neutralizar as ERO e evidenciar a produção de superóxido intracelular. IC = Superóxido Intracelular. Dados representam média e desvio padrão, $n = 3$. Diferença significativa * $p < 0,05$ (comparado com o respectivo grupo controle) e # $p < 0,05$ (comparado com o respectivo grupo AM + 660 nm).

Após avaliarmos a produção extra e intracelular de superóxidos, investigamos a produção mitocondrial de superóxido nas linhagens celulares NIH-3T3 e 4T1-Luc, utilizando a sonda específica mito-TEMPO-H (Figura 18). Esta sonda é uma versão modificada do composto TEMPO, que foi especialmente projetada para se acumular seletivamente nas

mitocôndrias (NAZAREWICZ et al., 2013). Os resultados mostram que, na condição de controle, ambas as linhagens apresentaram níveis basais baixos de nitróxidos, indicando uma produção mínima de superóxido mitocondrial. A exposição isolada à luz LED de 660 nm não provocou um aumento significativo na produção de superóxido mitocondrial em nenhuma das linhagens celulares.

O tratamento das células apenas com AM resultou em aumento na concentração de nitróxido em ambas as linhagens. Este efeito moderado pode ser atribuído à capacidade do AM de interagir com componentes mitocondriais, mesmo na ausência de fotoativação. Contudo, a combinação de AM com irradiação a 660 nm desencadeou um aumento expressivo na concentração de nitróxidos, quando comparado com o tratamento isolado com AM, destacando o efeito sinérgico entre o fotossensibilizador e a luz na indução do estresse oxidativo mitocondrial.

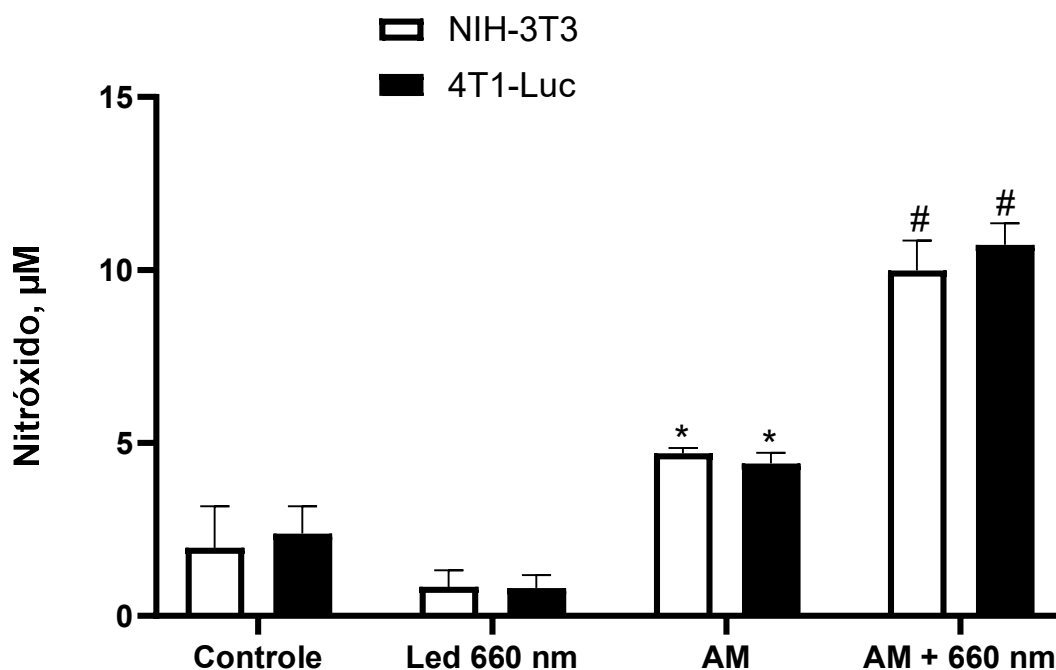


Figura 18 – Produção de nitróxido medidas por RPE em células NIH-3T3 (controle) e 4T1-Luc (tumoral) com tratamento com AM e irradiação com LED 660 nm e mito-TEMPO-H. A figura evidencia os níveis de nitróxido a partir do uso do mitoTEMPO-H e o envolvimento mitocondrial na TFD. Dados representam média $\pm$ EPM, $n = 3$. Diferença significativa * $p < 0,05$ (comparado com o respectivo grupo controle) e # $p < 0,05$ (comparado com o respectivo grupo AM).

A sonda mito-TEMPO-H é uma ferramenta altamente específica utilizada na detecção de superóxido mitocondrial em sistemas biológicos. A estrutura química do mito-TEMPO-H incorpora características cruciais que determinam sua funcionalidade. A molécula possui um grupo trifenilfosfônio (TPP⁺) ligado covalentemente, que confere uma carga positiva e lipofilicidade à sonda (MURPHY, M.P., 2008). Estas propriedades são fundamentais para sua

capacidade de atravessar membranas biológicas e se concentrar nas mitocôndrias, impulsionada pelo potencial de membrana mitocondrial negativo. Uma vez dentro da mitocôndria, o mito-TEMPO-H atua como um captador eficiente de superóxido. A reação entre o superóxido e a sonda resulta na formação de um radical nitróxido estável e detectável por RPE (DIKALOV & HARISSON, 2014; ELAJAILI, et al., 2021).

A utilização da sonda mito-TEMPO-H possibilitou a detecção específica do superóxido gerado nas mitocôndrias, corroborando a hipótese de que estas organelas são um importante local de ação da TFD com AM. De fato, o mito-TEMPO-H tem sido utilizado para avaliar a produção de superóxido mitocondrial em diferentes contextos biológicos e patológicos, em diversos campos de pesquisa, desde estudos sobre câncer e doenças cardiovasculares até investigações sobre doenças neurodegenerativas e toxicologia (DIKALOVA et al., 2010; DIKALOV et al., 2011).

6 Conclusão

A presente pesquisa demonstrou com sucesso a padronização de um método eficaz para a detecção de ERO e, especialmente, de radical superóxido em células tumorais mamárias submetidas à TFD, utilizando a técnica de RPE associada a marcadores de spin da classe das hidroxilaminas cíclicas. Os resultados obtidos revelaram um aumento significativo na produção de superóxidos após a aplicação da TFD.

A utilização do AM como fotossensibilizador, em conjunto com a irradiação por luz LED de 660 nm, mostrou-se eficiente na geração de ERO, resultando em um aumento de cinco vezes na produção total de superóxidos nas células tumorais 4T1. Além disso, a aplicação de diferentes abordagens experimentais, como o uso de SOD impermeável e PEG-SOD permeável, confirmou a participação dos superóxidos produzidos por TFD e permitiu discriminar entre a produção extracelular e intracelular destas espécies.

Destaca-se, ainda, a validação do marcador de spin específico mitocondrial mito-TEMPO-H, que possibilitou a quantificação precisa do aumento na formação de superóxido mitocondrial após a TFD. Este achado é particularmente relevante, considerando o papel central das mitocôndrias na regulação do metabolismo celular e na indução de morte celular.

Em suma, este estudo contribui significativamente para o avanço do conhecimento sobre os mecanismos moleculares envolvidos na TFD, especialmente no que diz respeito à produção e distribuição de radicais superóxido. A metodologia desenvolvida oferece uma ferramenta valiosa para futuras investigações neste campo, podendo auxiliar no aprimoramento de protocolos de TFD e no desenvolvimento de terapias mais eficazes para o tratamento do câncer de mama e, potencialmente, de outros tipos de câncer.

7 Referências bibliográficas

ABRAHAMSE, Heidi; HAMBLIN, Michael R. New photosensitizers for photodynamic therapy. *Biochemical Journal*, v. 473, n. 4, p. 347-364, 2016.

AGOSTINIS, Patrizia et al. Photodynamic therapy of cancer: an update. *CA: a cancer journal for clinicians*, v. 61, n. 4, p. 250-281, 2011.

ALGORRI, Jose Francisco et al. Light technology for efficient and effective photodynamic therapy: A critical review. *Cancers*, v. 13, n. 14, p. 3484, 2021.

ALSAAB, Hashem O. et al. Progress in clinical trials of photodynamic therapy for solid tumors and the role of nanomedicine. *Cancers*, v. 12, n. 10, p. 2793, 2020.

ALVES, Lyvia et al. Biomarkers in breast cancer: an old story with a new end. *Genes*, v. 14, n. 7, p. 1364, 2023.

ALZEIBAK, Razan et al. Targeting immunogenic cancer cell death by photodynamic therapy: past, present and future. *Journal for immunotherapy of cancer*, v. 9, n. 1, 2021.

ANDRÉS, Celia María et al. Reactivity and Applications of Singlet Oxygen Molecule. *IntechOpen*, 2024.

BACELLAR, Isabel et al. Photodynamic efficiency: from molecular photochemistry to cell death. *International journal of molecular sciences*, v. 16, n. 9, p. 20523-20559, 2015.

BAIK, Alan H.; JAIN, Isha H. Turning the oxygen dial: balancing the highs and lows. *Trends in cell biology*, v. 30, n. 7, p. 516-536, 2020.

BEDARD, Karen; KRAUSE, Karl-Heinz. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiological reviews*, v. 87, n. 1, p. 245-313, 2007.

BERG, Kirsti et al. A high precision method for quantitative measurements of reactive oxygen species in frozen biopsies. *PloS one*, v. 9, n. 3, p. e90964, 2014.

BIANCHINI, Giampaolo et al. Triple-negative breast cancer: challenges and opportunities of a heterogeneous disease. *Nature reviews Clinical oncology*, v. 13, n. 11, p. 674-690, 2016.

BRIEGER, Katharine et al. Reactive oxygen species: from health to disease. *Swiss medical weekly*, v. 142, n. 3334, p. w13659-w13659, 2012.

BUKOWSKI, Karol; KCIUK, Mateusz; KONTEK, Renata. Mechanisms of multidrug resistance in cancer chemotherapy. *International journal of molecular sciences*, v. 21, n. 9, p. 3233, 2020.

CHEN, Zhiwei et al. Surgical stress and cancer progression: the twisted tango. *Molecular cancer*, v. 18, p. 1-11, 2019.

CIRCU, Magdalena L.; AW, Tak Yee. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free radical biology and medicine*, v. 48, n. 6, p. 749-762, 2010.

CORREIA, José H. et al. Photodynamic therapy review: principles, photosensitizers, applications, and future directions.

DĄBROWSKI, Janusz M. Reactive oxygen species in photodynamic therapy: mechanisms of their generation and potentiation. In: *Advances in inorganic chemistry*. Academic Press, 2017. p. 343-394. *Pharmaceutics*, v. 13, n. 9, p. 1332, 2021.

DEROA, Maria C.; CRUTCHLEY, Robert J. Photosensitized singlet oxygen and its applications. *Coordination chemistry reviews*, v. 233, p. 351-371, 2002.

DIAS, Maria Beatriz Kneipp et al. Adequacy of provision of procedures for early detection of breast cancer in the Brazilian Unified National Health System: a cross-sectional study conducted in Brazil and its regions, 2019. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 40, p. e00139723, 2024.

DIKALOV, Sergey I. et al. Production of extracellular superoxide by human lymphoblast cell lines: comparison of electron spin resonance techniques and cytochrome C reduction assay. *Biochemical pharmacology*, v. 73, n. 7, p. 972-980, 2007.

DIKALOVA, Anna E. et al. Therapeutic targeting of mitochondrial superoxide in hypertension. *Circulation research*, v. 107, n. 1, p. 106-116, 2010.

DIKALOV, Sergey I. et al. EPR detection of cellular and mitochondrial superoxide using cyclic hydroxylamines. *Free radical research*, v. 45, n. 4, p. 417-430, 2011.

DIKALOV, Sergey I.; HARRISON, David G. Methods for detection of mitochondrial and cellular reactive oxygen species. *Antioxidants & redox signaling*, v. 20, n. 2, p. 372-382, 2014.

DIKALOV, Sergey I.; POLIENKO, Yuliya F.; KIRILYUK, Igor. Electron paramagnetic resonance measurements of reactive oxygen species by cyclic hydroxylamine spin probes. *Antioxidants & Redox Signaling*, v. 28, n. 15, p. 1433-1443, 2018.

DI MEO, Sergio et al. Role of ROS and RNS sources in physiological and pathological conditions. *Oxidative medicine and cellular longevity*, v. 2016, n. 1, p. 1245049, 2016.

DOBSON, Jane; DE QUEIROZ, Genilson Fernandes; GOLDING, Jon P. Photodynamic therapy and diagnosis: Principles and comparative aspects. *The Veterinary Journal*, v. 233, p. 8-18, 2018.

DOS SANTOS, Ancély Ferreira et al. Methylene blue photodynamic therapy induces selective and massive cell death in human breast cancer cells. *BMC cancer*, v. 17, p. 1-15, 2017.

DOS SANTOS, Ancély Ferreira et al. Photodynamic therapy in cancer treatment-an update review. *J. Cancer Metastasis Treat*, v. 5, n. 25, p. 10.20517, 2019.

DOUGHERTY, Thomas J. et al. Photodynamic therapy. *Journal of National Cancer Institute*, v. 90, n. 12, p. 889-905, 1998.

DUBACH, Victor RA; SAN SEGUNDO-ACOSTA, Pablo; MURPHY, Bonnie J. Structural and mechanistic insights into *Streptococcus pneumoniae* NADPH oxidase. *Nature Structural & Molecular Biology*, p. 1-9, 2024.

DUSE, Lili et al. Low level LED photodynamic therapy using curcumin loaded tetraether liposomes. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, v. 126, p. 233-241, 2018.

EGEA, Gustavo; JIMÉNEZ-ALTAYÓ, Francesc; CAMPUZANO, Victoria. Reactive oxygen species and oxidative stress in the pathogenesis and progression of genetic diseases of the connective tissue. *Antioxidants*, v. 9, n. 10, p. 1013, 2020.

ELAJAILI, Hanan B. et al. Use of electron paramagnetic resonance in biological samples at ambient temperature and 77 K. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, n. 143, p. e58461, 2019.

ELAJAILI, Hanan B. et al. Use of electron paramagnetic resonance (EPR) to evaluate redox status in a preclinical model of acute lung injury. *Molecular Imaging and Biology*, p. 1-8, 2023.

ESPINOZA, Eli M. et al. Advances in imaging reactive oxygen species. *Journal of Nuclear Medicine*, v. 62, n. 4, p. 457-461, 2021.

FALK-MAHAPATRA, Riddhi; GOLLNICK, Sandra O. Photodynamic therapy and immunity: an update. *Photochemistry and photobiology*, v. 96, n. 3, p. 550-559, 2020.

FENG, Yixiao et al. Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. *Genes & diseases*, v. 5, n. 2, p. 77-106, 2018

FERLAY, Jacques et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *International journal of cancer*, v. 144, n. 8, p. 1941-1953, 2019.

FRIEDBERG, Joseph S. et al. A phase I study of Foscan-mediated photodynamic therapy and surgery in patients with mesothelioma. *The Annals of thoracic surgery*, v. 75, n. 3, p. 952-959, 2003.

FUKAI, Tohru; USHIO-FUKAI, Masuko. Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxidants & redox signaling*, v. 15, n. 6, p. 1583-1606, 2011.

GABRILOVICH, Dmitry I.; NAGARAJ, Srinivas. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nature reviews immunology*, v. 9, n. 3, p. 162-174, 2009.

GHOGARE, Ashwini A.; GREER, Alexander. Using singlet oxygen to synthesize natural products and drugs. *Chemical reviews*, v. 116, n. 17, p. 9994-10034, 2016.

GLORIEUX, Christophe et al. Targeting ROS in cancer: rationale and strategies. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 23, n. 8, p. 583-606, 2024.

GRIENDLING, Kathy K. et al. Measurement of reactive oxygen species, reactive nitrogen species, and redox-dependent signaling in the cardiovascular system: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation research*, v. 119, n. 5, p. e39-e75, 2016.

GONG, Liuyun et al. Application of radiosensitizers in cancer radiotherapy. *International journal of nanomedicine*, p. 1083-1102, 2021.

GORRINI, Chiara; HARRIS, Isaac S.; MAK, Tak W. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. *Nature reviews Drug discovery*, v. 12, n. 12, p. 931-947, 2013.

GUREEV, A. P. et al. The Effect of Methylene Blue and Its Metabolite—Azure I—on Bioenergetic Parameters of Intact Mouse Brain Mitochondria. *Biochemistry (Moscow), Supplement Series B: Biomedical Chemistry*, v. 16, n. 2, p. 148-153, 2022.

HAMBLIN, Michael R.; HASAN, Tayyaba. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease?. *Photochemical & Photobiological Sciences*, v. 3, n. 5, p. 436-450, 2004.

HERRERA-QUINTANA, Lourdes; VÁZQUEZ-LORENTE, Héctor; PLAZA-DIAZ, Julio. Breast Cancer: Extracellular Matrix and Microbiome Interactions. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 25, n. 13, p. 7226, 2024.

HOUGHTON, Serena C.; HANKINSON, Susan E. Cancer progress and priorities: breast cancer. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention*, v. 30, n. 5, p. 822-844, 2021.

IMRAN, Muhammad et al. Electron spin dynamics in excited state photochemistry: recent development in the study of intersystem crossing and charge transfer in organic compounds. *Physical Chemistry Chemical Physics*, v. 23, n. 30, p. 15835-15868, 2021.

IMPERT, Olga et al. Kinetics and mechanism of a fast leuco-Methylene Blue oxidation by copper (II)–halide species in acidic aqueous media. *Dalton Transactions*, n. 3, p. 348-353, 2003.

Ji, Bin; WEI, Minjie; YANG, Bin. Recent advances in nanomedicines for photodynamic therapy (PDT)-driven cancer immunotherapy. *Theranostics*, v. 12, n. 1, p. 434, 2022.

Ji, Haoran et al. Lymph node metastasis in cancer progression: molecular mechanisms, clinical significance and therapeutic interventions. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, v. 8, n. 1, p. 367, 2023.

JIA, Jiedong et al. Revolutionizing cancer treatment: Nanotechnology-enabled photodynamic therapy and immunotherapy with advanced photosensitizers. *Frontiers in Immunology*, v. 14, p. 1219785, 2023.

JIANG, Chunlan et al. Methylene blue-mediated photodynamic therapy induces macrophage apoptosis via ROS and reduces bone resorption in periodontitis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2019, n. 1, p. 1529520, 2019.

KARU, Tiina I. Mitochondrial signaling in mammalian cells activated by red and near-IR radiation. *Photochemistry and photobiology*, v. 84, n. 5, p. 1091-1099, 2008.

KAWIAK, Anna. Molecular research and treatment of breast cancer. *International journal of molecular sciences*, v. 23, n. 17, p. 9617, 2022.

KESHARWANI, Prashant et al. Gold nanoparticles and gold nanorods in the landscape of cancer therapy. *Molecular Cancer*, v. 22, n. 1, p. 98, 2023.

KESSEL, David. Photodynamic therapy: a brief history. *Journal of clinical medicine*, v. 8, n. 10, p. 1581, 2019.

KESSEL, David; OLEINICK, Nancy L. Initiation of autophagy by photodynamic therapy. *Methods in enzymology*, v. 453, p. 1-16, 2009.

KIM, Tae Eun; CHANG, Ji-Eun. Recent studies in photodynamic therapy for cancer treatment: From basic research to clinical trials. *Pharmaceutics*, v. 15, n. 9, p. 2257, 2023.

- LAW, Siu Kan; LEUNG, Albert Wing Nang; XU, Chuanshan. Photodynamic Action of Curcumin and Methylene Blue against Bacteria and SARS-CoV-2—A Review. *Pharmaceuticals*, v. 17, n. 1, p. 34, 2023.
- LENNICKE, Claudia; COCHEMÉ, Helena M. Redox metabolism: ROS as specific molecular regulators of cell signaling and function. *Molecular Cell*, v. 81, n. 18, p. 3691-3707, 2021.
- LI, Bingqian et al. Nano-drug co-delivery system of natural active ingredients and chemotherapy drugs for cancer treatment: a review. *Drug Delivery*, v. 29, n. 1, p. 2130-2161, 2022.
- LI, Dan et al. Reactive oxygen species as a link between antioxidant pathways and autophagy. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2021, p. 1-11, 2021.
- LIM, Dong-Jin. Methylene blue-based nano and microparticles: fabrication and applications in photodynamic therapy. *Polymers*, v. 13, n. 22, p. 3955, 2021.
- LISMONT, Celien; REVENCO, Iulia; FRANSEN, Marc. Peroxisomal hydrogen peroxide metabolism and signaling in health and disease. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 20, n. 15, p. 3673, 2019.
- MAHARJAN, Prabal Singh; BHATTARAI, Hitesh Kumar. Singlet oxygen, photodynamic therapy, and mechanisms of cancer cell death. *Journal of oncology*, v. 2022, n. 1, p. 7211485, 2022.
- MANOUCHEHRI, E. et al. Understanding breast cancer risk factors: is there any mismatch between laywomen perceptions and expert opinions. *BMC cancer*, v. 22, n. 1, p. 309, 2022.
- MAPUSKAR, Kranti A. et al. Mitochondrial superoxide dismutase in cisplatin-induced kidney injury. *Antioxidants*, v. 10, n. 9, p. 1329, 2021.
- MAURYA, Radheshyam; NAMDEO, Madhulika. Superoxide dismutase: A key enzyme for the survival of intracellular pathogens in host. *Reactive Oxygen Species*, 2021.
- MCGHEE, Deirdre E.; STEELE, Julie R. Breast biomechanics: what do we really know?. *Physiology*, v. 35, n. 2, p. 144-156, 2020.
- MOKOENA, Dimakatso R.; GEORGE, Blassan P.; ABRAHAMSE, Heidi. Photodynamic therapy induced cell death mechanisms in breast cancer. *International journal of molecular sciences*, v. 22, n. 19, p. 10506, 2021.

- MONTERAN, Lea et al. Chemotherapy-induced complement signaling modulates immunosuppression and metastatic relapse in breast cancer. *Nature Communications*, v. 13, n. 1, p. 5797, 2022.
- MROZ, Pawel et al. Cell death pathways in photodynamic therapy of cancer. *Cancers*, v. 3, n. 2, p. 2516-2539, 2011.
- MURPHY, Michael P. Targeting lipophilic cations to mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, v. 1777, n. 7-8, p. 1028-1031, 2008.
- MUROTOMI, Kazutoshi et al. Significance of singlet oxygen molecule in pathologies. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 24, n. 3, p. 2739, 2023.
- MUTEBI, Miriam et al. Breast cancer treatment: A phased approach to implementation. *Cancer*, v. 126, p. 2365-2378, 2020.
- NAKAI, Kozo; TSURUTA, Daisuke. What are reactive oxygen species, free radicals, and oxidative stress in skin diseases?. *International journal of molecular sciences*, v. 22, n. 19, p. 10799, 2021.
- NAZAREWICZ, Rafal R. et al. Does scavenging of mitochondrial superoxide attenuate cancer prosurvival signaling pathways? *Antioxidants & redox signaling* vol. 19,4, 2013.
- NEOPHYTOU, Christiana M. et al. The role of tumor microenvironment in cancer metastasis: Molecular mechanisms and therapeutic opportunities. *Cancers*, v. 13, n. 9, p. 2053, 2021.
- NOLAN, Emma; LINDEMAN, Geoffrey J.; VISVADER, Jane E. Deciphering breast cancer: from biology to the clinic. *Cell*, v. 186, n. 8, p. 1708-1728, 2023.
- OBEAGU, Emmanuel Ifeanyi; OBEAGU, Getrude Uzoma. Breast cancer: A review of risk factors and diagnosis. *Medicine*, v. 103, n. 3, p. e36905, 2024.
- OSKROBA, Aleksander et al. Photodynamic Therapy and Cardiovascular Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 25, n. 5, p. 2974, 2024.
- OZ, Murat; LORKE, Dietrich E.; PETROIANU, George A. Methylene blue and Alzheimer's disease. *Biochemical pharmacology*, v. 78, n. 8, p. 927-932, 2009.
- PARK, Misung et al. Breast cancer metastasis: mechanisms and therapeutic implications. *International journal of molecular sciences*, v. 23, n. 12, p. 6806, 2022.

PATIL, S.; MOOSA, D.; ALDERETE, J. Methylene blue-induced oxidative stress enhances the antimicrobial efficacy of photodynamic therapy against *Trichomonas vaginalis*. *Parasitology Research*, v. 119, n. 10, p. 3439-3445, 2020.

PERILLO, Bruno et al. ROS in cancer therapy: the bright side of the moon. *Experimental & molecular medicine*, v. 52, n. 2, p. 192-203, 2020.

PESHAVARIYA, Hitesh et al. NADPH oxidase isoform selective regulation of endothelial cell proliferation and survival. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, v. 380, p. 193-204, 2009.

PIZZINO, Gabriele et al. Oxidative stress: harms and benefits for human health. *Oxidative medicine and cellular longevity*, v. 2017, n. 1, p. 8416763, 2017.

POOROLAJAL, Jalal et al. Factors for the primary prevention of breast cancer: a meta-analysis of prospective cohort studies. *Journal of research in health sciences*, v. 21, n. 3, p. e00520, 2021.

PRZYGODA, Maria et al. Cellular Mechanisms of Singlet Oxygen in Photodynamic Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 24, n. 23, p. 16890, 2023.

RAHMAN, Betul et al. Photodynamic therapy for peri-implant diseases. *Antibiotics*, v. 11, n. 7, p. 918, 2022.

RECZEK, Colleen R.; CHANDEL, Navdeep S. ROS-dependent signal transduction. *Current opinion in cell biology*, v. 33, p. 8-13, 2015.

RODRÍGUEZ-CÓRDOVA, Rosalva Josefina et al. Differential Response of BEAS-2B and H-441 Cells to Methylene Blue Photoactivation. *Anticancer Research*, v. 39, n. 7, p. 3739-3744, 2019.

ROSSIN, Ariane R. de S. et al. Terapia Fotodinâmica em Eletrofiação: Revisão de técnicas e aplicações. *Química Nova*, v. 43, p. 613-622, 2020.

SANTOS, Mayara Simonelly Costa dos. Entrega de fotossensibilizadores mediada por nanofolhas de óxido de grafeno para terapias fotodinâmica e fototérmica combinadas no tratamento de carcinoma mamário in vitro e in vivo. 2017. [170] f., il. Tese (Doutorado em Biologia Molecular)—Universidade de Brasília, Brasília, 2017.

SANTOS, Tainá Bastos dos et al. Prevalência e fatores associados ao diagnóstico de câncer de mama em estágio avançado. *Ciência & Saúde Coletiva*, v. 27, n. 02, p. 471-482, 2022.

SCHAUER, Dörthe; MCBRIDE, William H. Opportunities and challenges of radiotherapy for treating cancer. *Nature reviews Clinical oncology*, v. 12, n. 9, p. 527-540, 2015.

SCHEINOK, Samantha et al. An EPR study using cyclic hydroxylamines to assess the level of mitochondrial ROS in superinvasive cancer cells. *Cell biochemistry and biophysics*, v. 78, p. 249-254, 2020.

SHAH, Manish A.; ROGOFF, Harry A. Implications of reactive oxygen species on cancer formation and its treatment. In: *Seminars in Oncology*. WB Saunders, 2021. p. 238-245.

SHURIN, Michael R.; BARALDI, James H.; SHURIN, Galina V. Neuroimmune regulation of surgery-associated metastases. *Cells*, v. 10, n. 2, p. 454, 2021.

SIES, Helmut; JONES, Dean P. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nature reviews molecular cell biology*, v. 21, n. 7, p. 363-383, 2020.

SUN, Yi-Sheng et al. Risk factors and preventions of breast cancer. *International journal of biological sciences*, v. 13, n. 11, p. 1387, 2017.

TARDIVO, Joao Paulo et al. Methylene blue in photodynamic therapy: From basic mechanisms to clinical applications. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, v. 2, n. 3, p. 175-191, 2005.

TAUFFENBERGER, Arnaud; MAGISTRETTI, Pierre J. Reactive oxygen species: beyond their reactive behavior. *Neurochemical Research*, v. 46, n. 1, p. 77-87, 2021.

TOMAZELLI, Jeane et al. Evaluation of breast cancer screening indicators in the female population using the National Health System, Brazil, 2018-2019: a descriptive study. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, v. 32, n. 2, p. e2022567, 2023.

TOREZAN, Luís; NIWA, Ane Beatriz Mautari; FESTA NETO, Cyro. Terapia fotodinâmica em dermatologia: princípios básicos e aplicações. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 84, p. 445-459, 2009.

UDOMSAK, Wachirawit et al. Antioxidant Enzymes in Cancer Cells: Their Role in Photodynamic Therapy Resistance and Potential as Targets for Improved Treatment Outcomes. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 25, n. 6, p. 3164, 2024.

VAN STRATEN, Demian et al. Oncologic photodynamic therapy: basic principles, current clinical status and future directions. *Cancers*, v. 9, n. 2, p. 19, 2017.

VERONESE, Francesco M. et al. Polyethylene glycol–superoxide dismutase, a conjugate in search of exploitation. *Advanced drug delivery reviews*, v. 54, n. 4, p. 587-606, 2002.

- WAINGADE, Manjushri; MEDIKERI, Raghavendra S.; RATHOD, Pooja. Effectiveness of methylene blue photosensitizers compared to that of corticosteroids in the management of oral lichen planus: a systematic review and meta-analysis. *Journal of dental anesthesia and pain medicine*, v. 22, n. 3, p. 175, 2022.
- WAINWRIGHT, Mark; CROSSLEY, Kent B. Methylene blue-a therapeutic dye for all seasons?. *Journal of chemotherapy*, v. 14, n. 5, p. 431-443, 2002.
- WANG, Yiling; MINDEN, Audrey. Current molecular combination therapies used for the treatment of breast cancer. *International journal of molecular sciences*, v. 23, n. 19, p. 11046, 2022.
- WANG, Ying et al. Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling. *Journal of Cell Biology*, v. 217, n. 6, p. 1915-1928, 2018.
- WANG, Youchao et al. Theranostics with photodynamic therapy for personalized medicine: to see and to treat. *Theranostics*, v. 13, n. 15, p. 5501, 2023.
- WEI, Guoqing et al. Recent progress in nanomedicine for enhanced cancer chemotherapy. *Theranostics*, v. 11, n. 13, p. 6370, 2021.
- WILKINSON, Louise; GATHANI, Toral. Understanding breast cancer as a global health concern. *The British journal of radiology*, v. 95, n. 1130, p. 20211033, 2022.
- WU, Po-Ting et al. Methylene-blue-encapsulated liposomes as photodynamic therapy nano agents for breast cancer cells. *Nanomaterials*, v. 9, n. 1, p. 14, 2018.
- XUE, Huijing; THAIVALAPPIL, Abhirami; CAO, Kan. The potentials of methylene blue as an anti-aging drug. *Cells*, v. 10, n. 12, p. 3379, 2021.
- YANG, Haotian et al. The role of cellular reactive oxygen species in cancer chemotherapy. *Journal of experimental & clinical cancer research*, v. 37, p. 1-10, 2018.
- YANG, Shao-Hua et al. Alternative mitochondrial electron transfer for the treatment of neurodegenerative diseases and cancers: Methylene blue connects the dots. *Progress in neurobiology*, v. 157, p. 273-291, 2017.
- YE, Feng et al. Advancements in clinical aspects of targeted therapy and immunotherapy in breast cancer. *Molecular cancer*, v. 22, n. 1, p. 105, 2023.
- YIN, Huiyong; XU, Libin; PORTER, Ned A. Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis. *Chemical reviews*, v. 111, n. 10, p. 5944-5972, 2011.

YOUNIS, Muhammad Rizwan et al. Inorganic nanomaterials with intrinsic singlet oxygen generation for photodynamic therapy. *Advanced Science*, v. 8, n. 21, p. 2102587, 2021.

ZHAO, Zhenwen; XU, Yan. An extremely simple method for extraction of lysophospholipids and phospholipids from blood samples. *Journal of lipid research*, v. 51, n. 3, p. 652-659, 2010.

ZHANG, Baoyi et al. Role of mitochondrial reactive oxygen species in homeostasis regulation. *Redox Report*, v. 27, n. 1, p. 45-52, 2022.

ZHANG, Qianyu; LI, Libo. Photodynamic combinational therapy in cancer treatment. *J. BUON*, v. 23, n. 3, p. 561-567, 2018.

ZHANG, Zi-Jian et al. Photodynamic therapy regulates fate of cancer stem cells through reactive oxygen species. *World Journal of Stem Cells*, v. 12, n. 7, p. 562, 2020.

ZHOU, Zhaojie et al. Advances in photosensitizer-related design for photodynamic therapy. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 16, n. 6, p. 668-686, 2021.