



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**  
Centro Biomédico  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Adilson Fonseca Teixeira

**Avaliação do quimioterápico doxorubicina como agente fotossensibilizador  
em culturas de células MDA-MB-231 irradiadas com LED azul**

Rio de Janeiro

2018

Adilson Fonseca Teixeira

**Avaliação do quimioterápico doxorrubicina como agente fotossensibilizador em culturas de células MDA-MB-231 irradiadas com LED azul**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Andre Luiz Mencialha

Coorientador: Prof. Dr. Adenilson de Souza da Fonseca

Rio de Janeiro

2018

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

T266 Teixeira, Adilson Fonseca.  
Avaliação do quimioterápico doxorrubicina como agente fotossensibilizador em culturas de células MDA-MB-231 irradiadas com LED azul/ Adilson Fonseca Teixeira. – 2018.  
59 f.

Orientador: Andre Luiz Mencalha.  
Coorientador: Adenilson de Souza da Fonseca.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biotecnologias.

1. Mamas – Câncer – Quimioterapia - Teses. 2. Doxorrubicina - Teses. 4. Fotoquimioterapia - Teses. 5. Diodos emissores de luz – Teses. 6. Radiação não ionizante – Teses. I. Mencalha, Andre Luiz. II. Fonseca, Adenilson de Souza da. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 615.277.3:618.19-006

Bibliotecária: Kalina Silva CRB7/4377

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

---

Assinatura

---

Data

Adilson Fonseca Teixeira

**Avaliação do quimioterápico doxorrubicina como agente fotossensibilizador em culturas de células MDA-MB-231 irradiadas com LED azul**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 13 de julho de 2018.

Orientador:

Prof. Dr. Andre Luiz Mencialha  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Coorientador:

Prof. Dr. Adenilson de Souza da Fonseca  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Banca Examinadora:

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Tatiana de Almeida Simão  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Sheila Coelho Soares Lima  
Instituto Nacional de Câncer

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Nathalia de Oliveira Meireles da Costa  
Instituto Nacional de Câncer

Rio de Janeiro

2018

## **DEDICATÓRIA**

À minha família e amigos que estiveram ao meu lado incentivando o meu progresso e o desenvolvimento deste trabalho.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à Thaís, minha esposa e companheira incondicional. Sua presença e seu sorriso me motivaram e foram os pilares de sustentação para o meu crescimento. Sem seus braços para me segurar e seus ouvidos para que eu desabafasse essa dissertação nunca teria sido possível.

Aos meus pais, Rosemary e Julio, que desde sempre estiveram ao meu lado a cada passo. Se sou um homem formado e completo é porque nunca faltou carinho, incentivo colo ou cobrança. Ainda que despretensiosamente, vocês me ensinaram a fazer ciência ao evitar respostas prontas e incentivar meu criticismo. Vocês me formaram um questionador muito antes do meu contato com qualquer saber acadêmico e formal.

Aos meus segundos pais, meus tios Luciana e Adenilson. Vocês são minha inspiração como pessoas, como pais e como casal. O meu diploma de graduação se deve a vocês e toda a minha carreira desde então é dedicada ao trabalho e preocupação que vocês tiveram desde o momento em que me acolheram em sua casa – e antes e depois disso.

Aos amigos que adquiri ao longo de todo o período dentro da UERJ. Esta trajetória que começou no ano de 2008 só me trouxe boas companhias e inspirações profissionais. Vocês estiveram ao meu lado em todos os momentos da minha vida adulta. Vocês me ouviram reclamar quando era preciso e reclamaram de mim quando foi necessário. Vocês mostraram o quanto a formação de um biólogo é importante para o mundo e como podemos e devemos nos desenvolver para devolver a ele todos os privilégios que nos foram dados. Obrigado aos meus amigos mamilos Leão, Ester, Suellen, Isabela e Diego. Obrigado aos meus amigos de graduação Fred, Mylena e Nathalia Beatriz. Obrigado aos meus amigos de laboratório Andrezza, Isis, Juliana, Keila, Letícia, Larissa, Luiz e Matheus.

Ao Professor Doutor Andre Luiz Mencialha que me inspira como professor, cientista e orientador. Posso afirmar sem qualquer dúvida que fiz a melhor escolha possível ao retornar à vida acadêmica sob sua tutela. Você é uma das pessoas mais inteligentes com quem eu tive a oportunidade de conviver e sua postura profissional para com seus alunos é o que almejo para minha própria vida profissional. Obrigado pelos momentos de devaneio científico e pela indicação do caminho a ser seguido.

Ao Professor Doutor Adenilson de Souza da Fonseca, mais uma vez. Não haveria um eu biólogo se não houvesse um tio em quem me espelhar. Além do exemplo de homem que você sempre foi para mim, posso finalmente falar por experiência própria que você é meu

exemplo enquanto professor, cientista e orientador. Obrigado por ser meu GPS profissional e sempre apontar os caminhos menos tortuosos nessa vida acadêmica que é tão complicada.

Agradeço também às Professoras Doutoras Andréa Monte Alto Costa e Carolina Panis pela colaboração científica e disponibilidade para tirar minhas dúvidas técnicas e teóricas. Em um meio profissional onde o ego costuma falar tão alto, foi um prazer poder discutir meu projeto e contar com o apoio de pessoas tão bem intencionadas.

Finalmente, agradeço o suporte do Programa de Pós-Graduação em Biociências, da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e do Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq).

Num tempo de engano universal, dizer a verdade é um ato revolucionário.

*George Orwell (Nineteen Eighty-Four)*



## RESUMO

TEIXEIRA, Adilson Fonseca. **Avaliação do quimioterápico doxorrubicina como agente fotossensibilizador em culturas de células MDA-MB-231 irradiadas com LED azul.**

2018. 59 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2018.

Efeitos colaterais à quimioterapia são comuns a pacientes com câncer de mama triplo negativo. A terapia fotodinâmica poderia complementar este tratamento pela combinação de um cromóforo à radiação não ionizante de baixa potência capaz de gerar estresse oxidativo nas células tumorais. A utilização do quimioterápico doxorrubicina como fotossensibilizador e sua combinação à radiação não ionizante de baixa potência em comprimento de onda adequado poderia reduzir sua dose e efeitos adversos, melhorando a qualidade de vida do paciente. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar efeitos da doxorrubicina como fotossensibilizador associado ao LED azul de baixa potência em culturas de células de câncer de mama humana. Células da linhagem MDA-MB-231 foram cultivadas e submetidas à combinação entre diferentes concentrações de doxorrubicina e fluências de LED azul para avaliar: (i) localização da doxorrubicina por microscopia de fluorescência, (ii) viabilidade celular por WST-1, (iii) produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) por citometria de fluxo, (iv) expressão protéica de NF- $\kappa$ B por imunocitoquímica, e (v) níveis relativos de RNAm de IL1B, IL6 e IL8 através da Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa (qPCR). Os resultados obtidos a partir da microscopia de fluorescência demonstram que a doxorrubicina atinge o núcleo de células da linhagem MDA-MB-231 após 2h de incubação, mantendo-se presente neste compartimento celular 24 horas após o tratamento. Comparadas ao controle, culturas somente incubadas com doxorrubicina (25 nM) apresentaram 23% de redução na viabilidade celular, enquanto sua combinação ao LED azul (640 J/cm<sup>2</sup>) reduziu viabilidade celular em 40% após 24h. Após 48h de tratamento, a viabilidade celular nas culturas somente incubadas com doxorrubicina foi reduzida em 40%, enquanto em combinação ao LED azul a redução foi de 55%. A produção de EROs 30 minutos após o tratamento foi 22% maior nas células incubadas com doxorrubicina e irradiadas com LED azul em comparação às demais condições. Culturas apenas incubadas com doxorrubicina ou incubadas com doxorrubicina e irradiadas com LED azul apresentaram maior expressão protéica de NF- $\kappa$ B em diferentes tempos (30min, 12h e 24h). Comparadas ao controle ou a amostras somente irradiadas com LED azul, amostras apenas incubadas com doxorrubicina ou incubadas com doxorrubicina e irradiadas com LED azul apresentaram maiores níveis de RNAm para IL1B, IL6 e IL8. Estes resultados demonstram que a irradiação com LED azul de baixa potência aumenta a citotoxicidade da doxorrubicina em culturas da linhagem MDA-MB-231, aumenta os níveis de EROs, além de induzir a expressão de fatores pro-inflamatórios.

Palavras-chave: Câncer de mama. Terapia fotodinâmica. Doxorrubicina. Radiação não ionizante.

## ABSTRACT

Teixeira, Adilson Fonseca. **Evaluation of doxorubicin chemotherapeutical drug as a photosensitizer agent over MDA-MB-231 cell cultures irradiated with blue LED.** 2018. 59 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2018.

Adverse effects are common among triple negative breast cancer patients. Photodynamic therapy could complement their treatment combining a chromophore to low power non-ionizing radiation able to promote oxidative stress in cancer cells. Doxorubicin utilization as a photosensitizer and its combination with low power non-ionizing radiation at optimal wavelength could reduce doxorubicin doses and adverse effects, improving patient's quality of life. Thus, the aim of this work was to evaluate doxorubicin effects as a photosensitizer to low power blue LED on human breast cancer cell cultures. MDA-MB-231 cell cultures were cultivated and submitted to combination of different doxorubicin concentrations and low power blue LED fluences to evaluate: (i) localization of doxorubicin into cell by fluorescence microscopy, (ii) cell viability by WST-1, (iii) reactive oxygen species (ROS) generation by flow cytometry, (iv) NF- $\kappa$ B protein expression by immunocytochemistry, and (v) IL1B, IL6 and IL8 relative mRNA levels by quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR). Results obtained by fluorescence microscopy showed that doxorubicin localizes in MDA-MB-231 cell nuclei 2 hours after incubation, being nuclear doxorubicin staining observed also 24 hours after treatment. Compared to control, cell cultures incubated with doxorubicin (25nM) alone presented a reduction of 23% in cell viability, while doxorubicin combined to blue LED (640 J/cm<sup>2</sup>) reduced cell viability at 40% 24h after treatment. Cell viability 48h after treatment in cultures incubated with doxorubicin alone was reduced in 40%, while doxorubicin combination with blue LED reduced cell viability in 55%. EROs generation 30 minutes after treatment was 22% higher in cell cultures incubated with doxorubicin and irradiated with blue LED compared to other conditions. Cell cultures incubated with doxorubicin alone and cell cultures incubated with doxorubicin and irradiated with blue LED presented higher NF- $\kappa$ B protein staining at different periods of time (30 min, 12h and 24h). Compared to control not incubated with doxorubicin and not irradiated with blue LED, or compared to cell cultures irradiated with blue LED alone, IL1B, IL6 and IL8 mRNA levels were elevated in cell cultures incubated with doxorubicin alone and in cell cultures incubated with doxorubicin and irradiated with blue LED. These results demonstrate that low power blue LED irradiation increases doxorubicin cytotoxicity in MDA-MB-231 cell cultures, promotes ROS generation and induces pro-inflammatory cytokine expression.

Keywords: Breast cancer. Photodynamic therapy. Doxorubicin. Non-ionizing radiation.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Marcas características de um tumor maligno.....	19
Figura 2 –	Estimativa da incidência e mortalidade mundial de diferentes neoplasias.....	20
Figura 3 –	Estimativa da incidência de diferentes neoplasias no Brasil.....	20
Figura 4 –	Mecanismos de ação da doxorubicina.....	24
Figura 5 –	Diferenças entre emissões laser e LED.....	25
Figura 6 –	Coefficiente de absorção para radiação não ionizante de baixa potência segundo seu comprimento de onda.....	26
Figura 7 –	Tipos de reação promovidos pela terapia fotodinâmica.....	27
Tabela 1 –	Sequências e características dos iniciadores específicos de qPCR.....	36
Figura 8 –	Localização nuclear da doxorubicina em culturas de células MDA-MB-231.....	38
Figura 9 –	Viabilidade de culturas de células MDA-MB-231 incubadas com doxorubicina ou expostas ao LED azul de baixa potência.....	39
Figura 10 –	Viabilidade de culturas de células MDA-MB-231 tratadas com doxorubicina a 100 nM combinada a diferentes fluências de LED azul de baixa potência.....	41
Figura 11 –	Viabilidade de culturas de células MDA-MB-231 expostas ao LED azul a 640 J/cm <sup>2</sup> após incubação com diferentes concentrações de doxorubicina.....	42
Figura 12 –	Efeito do tratamento combinado entre doxorubicina e LED azul sobre culturas de células MDA-MB-231 ao longo do tempo.....	44
Figura 13 –	Níveis relativos de EROs em culturas de células MDA-MB-231 incubadas com doxorubicina e expostas ao LED azul.....	45
Tabela 2 –	Índices de intensidade de marcação protéica de NF-κB.....	46
Figura 14 –	Níveis relativos de RNAm de citocinas próinflamatórias em culturas de células MDA-MB-231 incubadas com doxorubicina e expostas ao LED azul.....	48

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTB	<i>Actin beta</i>
ALA	<i>Ácido 5-aminolevulínico</i>
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
BRCA1	<i>Breast cancer type 1 susceptibility protein</i>
BRCA2	<i>Breast cancer type 2 susceptibility protein</i>
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
CT	<i>Cycle threshold</i>
DAPI	<i>4',6'-diamidino-2-phenylindole</i>
DCFH-DA	<i>2',7'- Dichlorodihydrofluorescein diacetate</i>
DEPC	<i>Dietilpirocarbonato</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
dNTP	<i>Deoxynucleotide Triphosphate</i>
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ER	<i>Estrogen receptor</i>
ERBB2	<i>Erb-b2 receptor tyrosine kinase 2</i>
EROs	<i>Espécies reativas de oxigênio</i>
EUA	<i>Estados Unidos da América</i>
G2	<i>Gap 2</i>
HER2	<i>Humam epidermal growth factor receptor 2</i>
HPD	<i>Hematoporphyrin derivative</i>
I $\kappa$ B	<i>inhibitor of NF-<math>\kappa</math>B</i>
IC50	<i>Half maximun inhibitory concentration</i>
IL1B	<i>Interleukin 1 beta</i>
IL6	<i>Interleukin 6</i>
IL8	<i>Interleukin 8</i>
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
Laser	<i>Light amplification by stimulated emission of radiation</i>
LED	<i>Light emitting diode</i>
M	<i>Mitose</i>

m-THPC	<i>Meta-tetrahidroxifenilclorina</i>
NAD <sup>+</sup>	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide</i>
NADPH	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate hydrogen</i>
NF-κB	<i>Nuclear factor-kappa B</i>
OligodT	<i>Oligodeoxythymine</i>
pb	pares de bases nitrogenadas
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PgR	<i>Progesterone receptor</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
qPCR	<i>Quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RNA <sub>m</sub>	RNA mensageiro
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
TFD	Terapia fotodinâmica
TMTN	Tumor de mama triplo negativo
TNF-α	<i>Tumor necrosis factor alpha</i>
TP53	<i>Tumor protein p53</i>
UVA	Ultravioleta A
WST-1	<i>Water-soluble tetrazolium salts 1</i>

## LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcento
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	peróxido de hidrogênio
O <sub>2</sub>	gás oxigênio
nm	nanômetro
S <sub>0</sub>	estado fundamental
S <sub>n</sub>	estado excitado
S <sub>1</sub>	estado singleto
T <sub>1</sub>	estado tripleto
e	elétron
<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	oxigênio singleto
κ	kapa
α	alfa
°C	graus Celsius
min	minuto
CO <sub>2</sub>	gás carbônico
cm <sup>2</sup>	centímetro ao quadrado
mW	miliWatt
nM	nanomolar
rpm	rotações por minuto
mM	milimolar
NaCl	cloreto de sódio
KCl	cloreto de potássio
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	fosfato dissódico
NaK <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	fosfato dipotássico e sódico
mL	mililitro
J/cm <sup>2</sup>	Joule por centímetro ao quadrado
μg/mL	micrograma por mililitro
x	vezes
μL	microlitro
h	hora

mg/mL	miligrama por mililitro
µg	micrograma
U	unidade
s	segundo
p	valor-p
<	menor que
±	mais ou menos
>	maior que

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	16
1	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	18
1.1	<b>Câncer</b> .....	18
1.1.1	<u>Câncer de mama</u> .....	21
1.1.2	<u>Caracterização celular e molecular do câncer de mama</u> .....	21
1.2	<b>Quimioterapia</b> .....	22
1.3	<b>Terapia fotodinâmica</b> .....	24
1.3.1	<u>Terapia fotodinâmica e resposta inflamatória</u> .....	28
2	<b>OBJETIVOS</b> .....	30
2.1	<b>Objetivo geral</b> .....	30
2.2	<b>Objetivos específicos</b> .....	30
3	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	31
3.1	<b>Cultura de células</b> .....	31
3.2	<b>LED azul de baixa potência</b> .....	31
3.3	<b>Incubação com doxorrubicina e exposição ao LED azul</b> .....	31
3.4	<b>Microscopia de fluorescência</b> .....	32
3.5	<b>Viabilidade celular</b> .....	32
3.6	<b>Quantificação de espécies reativas de oxigênio</b> .....	33
3.7	<b>Análises imunocitoquímicas</b> .....	33
3.8	<b>Extração de RNA total</b> .....	34
3.9	<b>Síntese de DNA complementar</b> .....	35
3.10	<b>Reação em cadeia da polimerase quantitativa</b> .....	35
3.11	<b>Análises estatísticas</b> .....	36
4	<b>RESULTADOS</b> .....	38
4.1	<b>Localização nuclear da doxorrubicina</b> .....	38
4.2	<b>Avaliação da viabilidade celular em culturas de MDA-MB-231 em função da concentração de doxorrubicina e fluência de LED azul</b> .....	39
4.3	<b>Exposição ao LED azul de baixa potência não altera a IC50 da doxorrubicina</b> .....	40



4.4	<b>Exposição ao LED azul de baixa potência eleva a citotoxicidade induzida por doxorrubicina em culturas de MDA-MB-231.....</b>	<b>41</b>
4.5	<b>Efeito do LED azul de baixa potência sobre culturas celulares incubadas com doxorrubicina é tempo-dependente.....</b>	<b>43</b>
4.6	<b>A exposição ao LED azul de baixa potência eleva os níveis de EROs em culturas celulares incubadas com doxorrubicina.....</b>	<b>44</b>
4.7	<b>Combinação entre doxorrubicina e LED azul induz expressão de NF-<math>\kappa</math>B.....</b>	<b>45</b>
4.8	<b>Incubação com doxorrubicina e exposição ao LED azul elevam os níveis de RNAm de citocinas pró-inflamatórias.....</b>	<b>46</b>
5	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>49</b>
	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>54</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>55</b>

## INTRODUÇÃO

O câncer de mama é uma malignidade de abrangência mundial que afeta milhões de mulheres (FERLAY et al., 2012). Dentre seus subtipos, os tumores de mama triplo negativos são caracterizados como aqueles de pior prognóstico clínico. Além das elevadas capacidades proliferativa e metastática, estas neoplasias não apresentam alvos moleculares para tratamento, reduzindo as possibilidades de terapia a serem empregadas e sujeitando os pacientes ao uso de quimioterápicos de ação generalista (CLEATOR; HELLER; COOMBES, 2007; SANDHU et al., 2010). Por afetarem etapas comuns do ciclo celular e do metabolismo redox, por exemplo, estes medicamentos acabam por interferir com o funcionamento de células normais, causando efeitos adversos agudos e crônicos (YOUNG; OZOLS; MYERS, 1981; VOLKOVA; RUSSELL, 2011).

A doxorrubicina figura entre os quimioterápicos de primeira linha mais comumente utilizados no tratamento destes tipos de neoplasia. Seus mecanismos de ação envolvem a alquilação do *Deoxyribonucleic Acid* (DNA) e produção de espécies reativas de oxigênio (MIZUTANI et al., 2005). Dada sua metabolização e distribuição sistêmica, a doxorrubicina costuma afetar cardiomiócitos, sendo o uso prolongado deste medicamento e a exposição a doses elevadas associados ao desenvolvimento de cardiopatias (VOLKOVA; RUSSELL, 2011). Desta forma, o desenvolvimento de terapias que trabalhem em conjunto com a doxorrubicina de forma a minimizar seus efeitos adversos vem sendo o alvo de muitas pesquisas (CHEN et al., 2011; SCHMIDT et al., 2016; FENG et al., 2017).

Dentre as possibilidades estudadas para elevação da eficiência deste medicamento encontra-se a terapia fotodinâmica. Esta abordagem é baseada na administração de um cromóforo (fotossensibilizador) que, ao ser exposto à luz, absorve sua energia e a devolve ao meio. Tal tipo de reação, impulsionada por fontes de radiação não ionizante de baixa potência, é capaz de levar à produção de radicais livres que oxidam biomoléculas importantes, como lipídios de membrana, ácidos nucleicos e proteínas, alterando o metabolismo celular e dirigindo a célula tumoral à morte (YU, W. et al, 2017).

Levando em consideração que o desenvolvimento de novos fármacos ou fotossensibilizadores seja um processo longo e custoso, a necessidade de melhor compreender os medicamentos já existentes se torna uma realidade (KELLOFF, 1999; BEGLEY; ELLIS, 2012). Neste contexto, o já descrito espectro de absorção da doxorrubicina é atrativo para a terapia fotodinâmica. Este quimioterápico apresenta um máximo de absorção no espectro da

luz azul (BOMGAARS et al., 1997), o que possibilitaria aumentar sua atividade citotóxica como fotossensibilizador associado à esta radiação emitida por lasers e LEDs de baixa potência.

# 1 REVISÃO DA LITERATURA

## 1.1 Câncer

O câncer é uma doença de abrangência mundial que pode afetar virtualmente todos os tecidos biológicos humanos. Sua complexidade pode ser parcialmente compreendida através da análise dos fatores envolvidos em sua iniciação, promoção e progressão. Trata-se de uma doença multifatorial que depende da interação entre componentes genéticos e ambientais (HANAHAN; WEINBERG, 2011; FERLAY et al., 2012).

A definição de um tumor maligno, no entanto, vem sendo alterada com o passar dos anos. Inicialmente se imaginava que o câncer era o resultado de uma alteração tecidual decorrente da proliferação exacerbada de células fisiologicamente comprometidas (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Com o progresso das pesquisas no campo da biologia tumoral, no entanto, foram levantados dados que levam a uma visão mais complexa. O câncer é um tecido complexo composto por diferentes tipos celulares que interagem entre si. Mesmo as células não malignas, pertencentes ao estroma tumoral, devem ser enxergadas como atuantes no processo de carcinogênese e, desta forma, a compreensão de um tumor maligno deve incluir todo o seu microambiente (HANAHAN; WEINBERG, 2000; HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Em uma primeira revisão, Hanahan e Weinberg (2000) estabeleceram que todo câncer deveria apresentar seis características principais: (i) sinalização proliferativa sustentada, (ii) resistência a supressores de crescimento, (iii) ativação de mecanismos de invasão e metástase, (iv) replicação descontrolada, (v) indução de angiogênese e (vi) resistência à morte celular. Anos depois, em 2011, os mesmos autores propuseram uma atualização que levasse em consideração o microambiente tumoral como parte determinante do processo de carcinogênese (HANAHAN; WEINBERG, 2011), adicionando quatro novas características: (i) desregulação do metabolismo energético, (ii) evasão à morte mediada pelo sistema imune, (iii) inflamação e (iv) instabilidade genômica (Figura 1).

Figura 1 - Marcas características de um tumor maligno

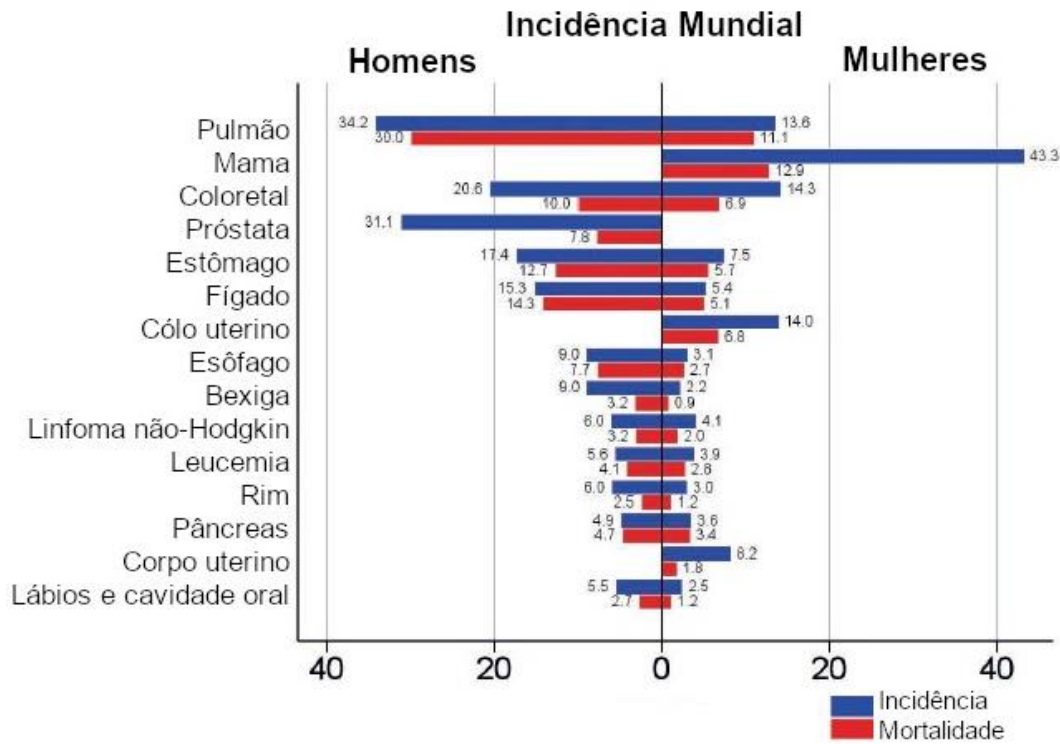


Fonte: Adaptada de HANAHAN; WEINBERG, 2011.

O correto entendimento destas características neoplásicas possibilita a compreensão de seus efeitos teciduais e sistêmicos. As alterações exercidas pelo desenvolvimento de um tumor maligno comprometem a qualidade de vida do paciente, levando-o a óbito em muitos casos (SWAIN; WHALEY; EWER, 2003). Os resultados compilados de pesquisas mundiais mostram que, excetuando-se o câncer de pele não-melanoma, mais de 14 milhões de novos casos de câncer foram diagnosticados ao redor do mundo somente em 2012 (FERLAY et al., 2012). Como mostrado na Figura 2, a maior incidência de câncer neste ano, em homens, atingiu o pulmão, enquanto em mulheres o sítio mais afetado foi a mama. Apenas no Brasil, a estimativa para incidência neste mesmo ano atingiu mais de 430 mil casos, enquanto sua atualização para os anos de 2018-2019 indica cerca de 420 mil novos casos de câncer (excetuando-se o câncer de pele não melanoma) por ano, segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA, 2018). A Figura 3 mostra que, similar ao quadro mundial, a mama também é o sítio mais afetado por câncer em mulheres, ainda que o câncer de próstata supere o número de casos de câncer de pulmão em homens. Somado a isso, 8,2 milhões de mortes ao redor do mundo (Figura 2) foram estimadas como consequência do desenvolvimento de tumores

malignos, enquanto no Brasil (Figura 3) estes números foram estimados em mais de 220 mil (excetuando-se o câncer de pele não melanoma) (FERLAY et al., 2012).

Figura 2 - Estimativa de incidência e mortalidade mundial de diferentes neoplasias



Nota: Os dados estão ajustados segundo a idade por 100 mil indivíduos.  
 Fonte: Adaptada de FERLAY et al., 2012.

Figura 3 - Estimativa da incidência de diferentes neoplasias no Brasil

Localização primária	Casos	Homens	Mulheres	Localização primária	Casos
Próstata	68.220			Mama Feminina	59.700
Traqueia, Brônquio e Pulmão	18.740			Cólon e Reto	18.980
Cólon e Reto	17.380			Colo do Útero	16.370
Estômago	13.540			Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.530
Cavidade Oral	11.200			Glândula Tireoide	8.040
Esôfago	8.240			Estômago	7.750
Bexiga	6.690			Corpo do Útero	6.600
Laringe	6.390			Ovário	6.150
Leucemias	5.940			Sistema Nervoso Central	5.510
Sistema Nervoso Central	5.810			Leucemias	4.860

Legenda: Os dados estão ajustados segundo a idade por 100 mil indivíduos.  
 Fonte: INCA, 2018.

### 1.1.1 Câncer de mama

O desenvolvimento do câncer de mama envolve fatores hormonais e reprodutivos, incluindo a nuliparidade, o desenvolvimento de uma primeira gestação após os trinta anos de idade e o histórico hormonal. Fatores ambientais incluem o consumo de bebidas alcoólicas, exposição a hormônios exógenos através de contraceptivos e reposição hormonal, exposição à radiação ionizante e estilo de vida desequilibrado, como dietas com elevado teor calórico e sedentarismo. Ainda, uma pequena proporção de cânceres de mama se deve a mutações germinativas, em particular, envolvendo os genes *breast cancer type 1 susceptibility protein* (BRCA1, do português, proteína de suscetibilidade ao câncer de mama tipo 1) e *breast cancer type 2 susceptibility protein* (BRCA2, do português, proteína de suscetibilidade ao câncer de mama tipo 2) (FERLAY et al., 2012).

Dentre todos os tipos de tumores malignos, o câncer de mama figura como o segundo mais comum em todo o mundo, sendo o mais frequente quando consideradas apenas as mulheres. Estimativas indicaram a ocorrência de 1,67 milhões de novos casos mundiais de câncer de mama em 2012, totalizando 25% de todos os tumores malignos (FERLAY et al., 2012). No Brasil, esta patologia apresentou estimativa de incidência igual a 67 mil novos casos em 2012, sendo estimados 60 mil novos casos para 2018 (INCA, 2018). Ainda, quanto ao número de mortes causadas pelo câncer de mama, a contagem para este mesmo ano atingiu 552 mil pacientes, o posicionando como a quinta maior causa de morte dentre todos os cânceres no mundo (FERLAY et al., 2012). No Brasil, entre os anos de 2010 e 2015, mais de 80 mil pacientes morreram em razão do câncer de mama (INCA, 2018).

### 1.1.2 Caracterização celular e molecular do câncer de mama

São reconhecidos mais de vinte diferentes subtipos de câncer de mama, sendo a maioria derivada de células epiteliais (carcinomas). Estes tumores são molecularmente divididos em cinco subgrupos: luminal A *basal-like*, luminal B, ERBB2+, (do português, similar a células basais) e *normal-like* (do português, similar a células normais). O subtipo *basal-like* é extensamente descrito na literatura, sendo definido através de marcação imunoistoquímica positiva para citoqueratinas 5/6 e 17. Ainda que a maioria destes tumores

*basal-like* também exiba ausência de marcação para o *estrogen receptor* (ER, do português, receptor de estrogênio), *progesterone receptor* (PgR, do português, receptor de progesterona) e *humam epidermal growth factor receptor 2* (HER2/ERBB2, do português, receptor para o fator de crescimento epidermal humano 2), há pacientes com tumores que manifestam tais moléculas de superfície. Assim, o termo “tumor de mama triplo negativo” (TMTN) vem a ser considerado não como um sinônimo para tumores *basal-like*, mas como uma caracterização específica utilizada para tumores que não expressem ER, PgR e receptor de HER2 (SANDHU et al., 2010; HUDIS; GIANNI, 2011).

Os TMTN correspondem a 15% de todos os casos de câncer de mama, apresentando o pior prognóstico clínico dentre as neoplasias mamárias. Estes tumores apresentam elevada contagem mitótica, escasso conteúdo estromal, necrose central, invasão acentuada, células em apoptose e resposta linfocítica estromal (FERLAY et al., 2012). Apesar de apresentarem intensa marcação protéica para o supressor tumoral p53, o gene *TP53* destas células tumorais encontra-se comumente mutado em regiões codificantes, havendo estudos que mostram uma taxa de mutação superior a 80% entre os tumores analisados (SORLIE et al., 2001). Assim, considerando que p53 normalmente haja como um ativador nas respostas de interrupção do ciclo celular mediante lesões ao DNA, reparo e/ou apoptose, a perda de função causada pelas mutações recorrentes é condizente com a alta taxa de aberrações genéticas encontradas nestes tumores (CLEATOR; HELLER; COOMBES, 2007).

Considerando que os TMTN não apresentem ER, PgR e receptor para HER2, nenhum tratamento baseado nestes alvos moleculares pode ser empregado contra estas neoplasias. Desta forma, os pacientes portadores de TMTN são submetidos a quimioterápicos que interferem com mecanismos de ação generalistas, como alquilantes de ácidos nucleicos e agregadores de tubulina. Estes agentes apresentam efetiva citotoxicidade sobre as células tumorais, mas possuem efeitos adversos por também interferirem com a homeostase de tecidos saudáveis (ISAKOFF, 2010; VOLKOVA; RUSSELL, 2011).

## 1.2 Quimioterapia

Diferentes quimioterápicos de ação generalista são empregados no tratamento de TMTN. Dentre eles destacam-se os protocolos terapêuticos envolvendo doxorrubicina,

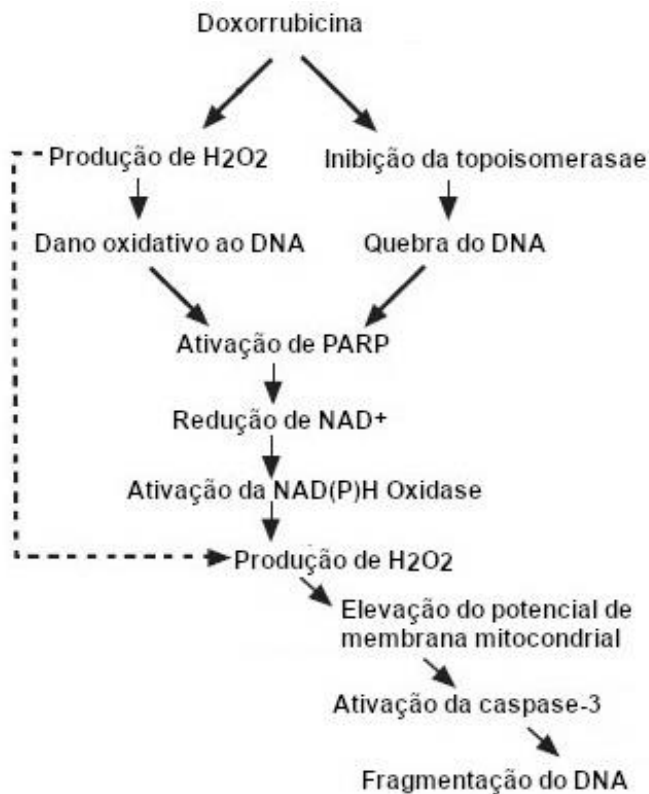


ciclofosfamida, metotrexato, fluoracil e derivados do taxol. Estes medicamentos podem ser empregados em conjunto ou isoladamente, antes ou depois da cirurgia (ISAKOFF, 2010).

A doxorubicina é uma antraciclina originalmente extraída de *Streptomyces peucetius* var. *caesius* (PARK et al., 2005). Além de seu emprego no tratamento de pacientes com câncer de mama, este quimioterápico também é usado contra osteosarcomas, linfomas e cânceres de esôfago, fígado, dentre outros (GEWIRTZ, 1999). Os mecanismos através dos quais a doxorubicina leva células cancerosas à morte incluem sua intercalação com ácidos nucleicos e consequente bloqueio da atividade da enzima topoisomerase II (GEWIRTZ, 1999). Alternativamente, a captação de doxorubicina pode levar à produção de radicais livres e consequente oxidação de lipídios de membranas, proteínas e DNA. Como a doxorubicina apresenta resíduos de paraquinona e paraidroquinona, ela pode reagir com enzimas como a citocromo P450 redutase, na presença de *Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate hydrogen* (NADPH), para formar o radical semiquinona via redução de um elétron, o que resulta em peróxido de hidrogênio (MIZUTANI et al., 2005) (Figura 4).

Os mecanismos através dos quais a doxorubicina atua em células tumorais, no entanto, também são capazes de afetar células saudáveis, causando efeitos agudos e crônicos, como a cardiotoxicidade, sendo associados ao aumento do risco de insuficiência cardíaca (VON HOFF et al., 1979; VOLKOVA; RUSSELL, 2011). Assim, o uso de técnicas complementares que sejam capazes de reduzir sua toxicidade vem sendo estudado. A ação cardioprotetora do dexrazoxano, por exemplo, foi inicialmente testada em ensaios pré-clínicos ao final de década de 1970 e, por apresentar efeitos benéficos, posteriormente o fármaco progrediu a ensaios clínicos (SWAIN; WHALEY; EWER, 2003). Sua capacidade cardioprotetora, no entanto, também reduz o efeito citotóxico da doxorubicina sobre as células tumorais, de forma que o uso combinado destes medicamentos só progride até que um limiar cumulativo tenha sido atingido (SWAIN; WHALEY; EWER, 2003). Desta forma, estratégias alternativas vêm sendo combinadas ao tratamento com doxorubicina para potencializar a ação dos tratamentos buscando minimizar efeitos adversos (CHEN et al., 2011; SCHMIDT et al., 2016).

Figura 4 - Mecanismos de ação da doxorrubicina



Legenda:  $H_2O_2$  = peróxido de hidrogênio; PARP = Poly(ADP-Ribose) Polymerase (do português, Poli (ADP-Ribose Polimerase);  $NAD^+$  = Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo.

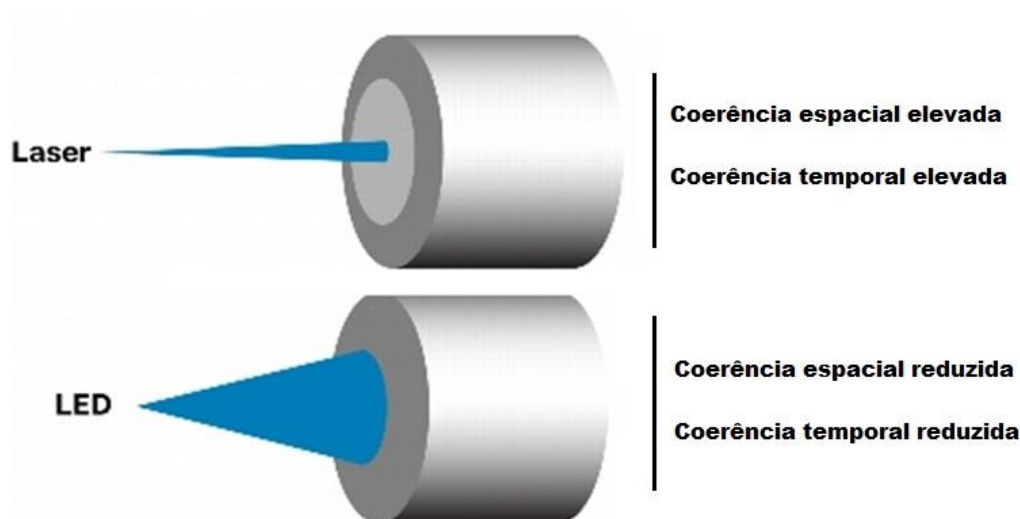
Fonte: Adaptada de MIZUTANI et al., 2005.

### 1.3 Terapia fotodinâmica

Uma vez que os efeitos colaterais da doxorrubicina constituem problema comum a pacientes com câncer, a sua combinação à terapia fotodinâmica (TFD) vem sendo estudada como uma das possibilidades que levem à redução das doses utilizadas deste quimioterápico (EDELL; CORTESE, 1988; ANIOGO; GEORGE; ABRAHAMSE, 2017). A TFD é baseada na administração de um cromóforo exógeno seguida da exposição à radiação não ionizante de baixa potência. Resumidamente, o cromóforo, ou fotossensibilizador, absorve a energia proveniente da radiação e a transfere para uma molécula intracelular, comumente o  $O_2$ . Este processo leva à produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) que podem reagir com biomoléculas e dirigir as células tumorais à morte (YU, W. et al., 2017).

Os *light amplification by stimulated emission of radiation* (laser, do português, amplificação da luz pela emissão estimulada da radiação) e os *light emitting diodes* (LED, do português, diodos emissores de luz) estão entre as principais fontes de radiação não ionizante de baixa potência utilizadas na TDF contra o câncer (BENERJEE et al., 2017; YU, W. et al., 2017). Enquanto fontes laser apresentam uma emissão com elevada coerência temporal e espacial, isto está ausente na radiação emitida por LED. Além disso, o feixe de radiação emitido por um LED apresenta divergência, o que aumenta a área exposta à radiação (MANG, 2004; BRANCALEON; MOSELEY, 2002; AGOSTINIS et al., 2011) (Figura 5).

Figura 5 - Diferenças entre emissões laser e LED

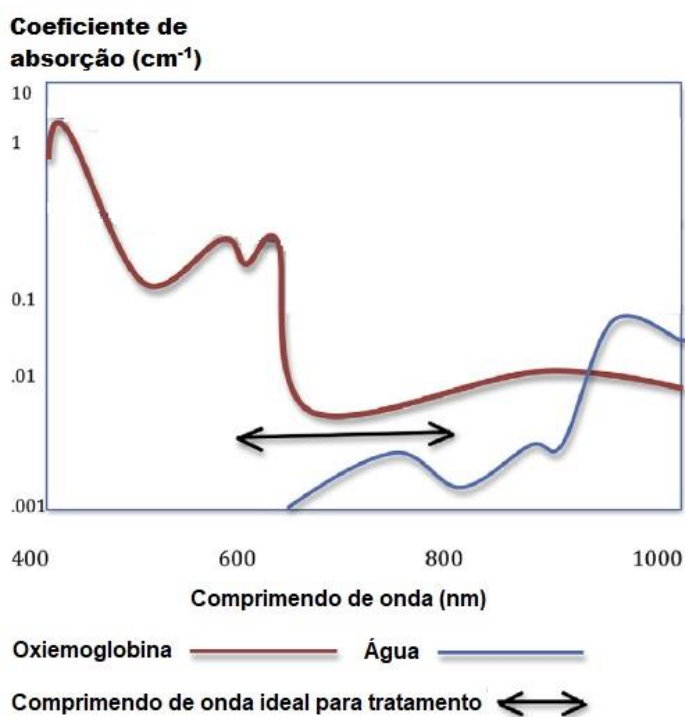


Fonte: Adaptada de DIFFERENCE..., 2013.

As características do tumor, como volume e localização, são determinantes na seleção de uma fonte emissora preferencial. Assim, a fonte LED é tipicamente empregada em sítios anômicos de superfícies irregulares por apresentar uma área de irradiação mais ampla. Há comercialmente disponíveis LED que emitem em diferentes comprimentos de onda, ou seja, LED que emitem radiação Ultravioleta A (UVA) (350 nm) até outros que emitem radiação infravermelha próxima (1100 nm) (MANG, 2004; BRANCALEON; MOSELEY, 2002; AGOSTINIS et al., 2011). A escolha do comprimento de onda a ser utilizado depende da localização do tumor e do cromóforo a ser empregado. Diferentes comprimentos de onda apresentaram capacidades distintas de penetração em tecidos biológicos, o que está relacionado à presença de moléculas absorvedoras (cromóforos) no tecido irradiado, o que interfere com a penetração do feixe de radiação (BENERJEE et al., 2017; YU, W. et al., 2017) (Figura 6). Além disso, as propriedades físico-químicas do fotossensibilizador devem

ser consideradas, uma vez que seu máximo de absorção deve ser próximo ou coincidir com o máximo de emissão da fonte radiativa. Por fim, a quantidade de energia fornecida também precisa ser considerada para o propósito de lesão celular induzida pela TFD. Assim, ainda que comprimentos de onda superiores a 800 nm apresentem significativa penetração tecidual, por exemplo, fontes com tal espectro de emissão tendem a não fornecer energia o suficiente para a produção de EROs e, desta forma, não costumam ser empregados para a TFD (DOLMANS; FUKUMURA; JAIN, 2003; YU, W. et al., 2017).

Figura 6 - Coeficiente de absorção para radiação não ionizante de baixa potência segundo seu comprimento de onda



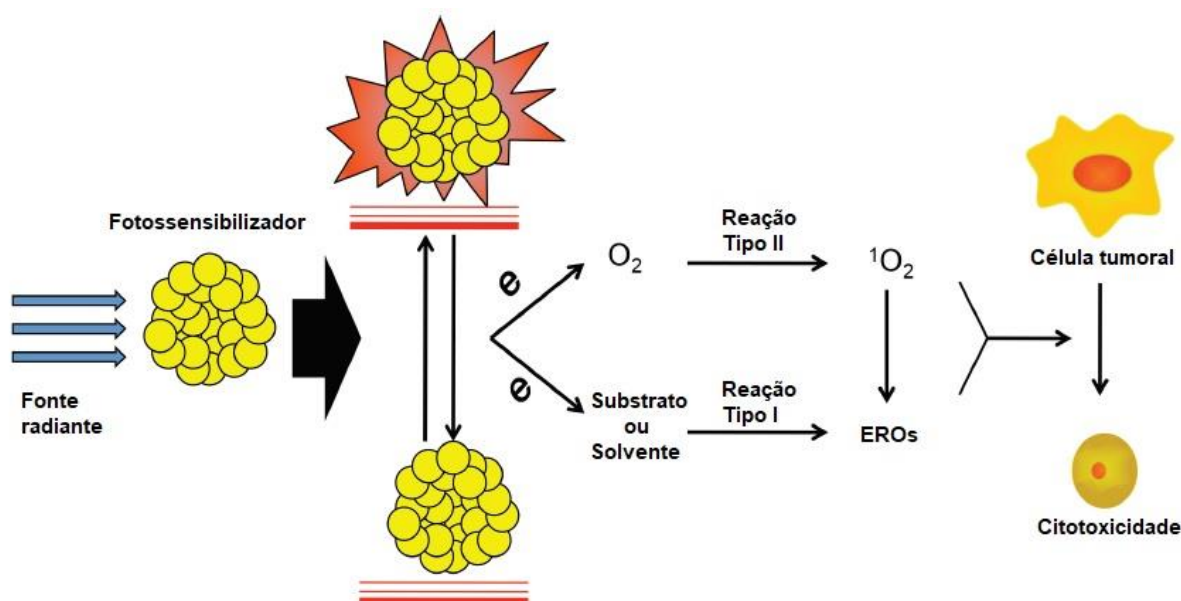
Legenda: Linha vermelha = coeficiente de absorção da oxiemoglobina; Linha azul = coeficiente de absorção da água; Seta dupla = comprimento de onda ideal para tratamento.

Fonte: Adaptada de BANERJEE et al., 2017.

Historicamente, o primeiro composto testado clinicamente como fotossensibilizador para TFD consistia em uma mistura de porfirinas chamada *hematoporphyrin derivative* (HPD, do português, derivado de hematoporfirina). Atualmente, diferentes moléculas são empregadas para esta abordagem, como o ácido 5-aminolevulínico (ALA) e a meta-tetraidroxifenilclorina (m-THPC), que apresentam máximos de absorção entre 600 e 800 nm (DOLMANS; FUKUMURA; JAIN, 2003; AGOSTINIS et al., 2011).

A absorção de um fóton por um fotossensibilizador promove a transição de um elétron de seu nível fundamental ( $S_0$ ) para um nível superior, ou excitado ( $S_n$ ), de energia. Ao perder energia, este elétron pode passar para um estado singleto ( $S_1$ ) ou, alternativamente, para um estado tripleto ( $T_1$ ). Esta energia, no entanto, pode ser transferida a diferentes moléculas, o que possibilita a distinção de dois processos diferentes (YU, W. et al., 2017) (Figura 7). Nas chamadas reações de tipo I, a energia é transferida ao substrato ou solvente, gerando radicais oxidativos que podem levar a célula à morte. As reações de tipo II, por outro lado, dependem da transferência de energia proveniente do fotossensibilizador ao oxigênio molecular, gerando oxigênio singleto, que pode atuar diretamente na oxidação de biomoléculas ou participar da produção de outras espécies reativas que podem desencadear a morte celular (CASTANO; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2004; ROBERTSON; EVANS; ABRAHAMSE, 2009).

Figura 7 - Tipos de reação promovidos pela terapia fotodinâmica



Legenda: e = elétron;  $O_2$  = gás oxigênio;  $^1O_2$  = oxigênio singleto; EROs = espécies reativas de oxigênio.  
Fonte: Adaptada de YU, W. et al., 2017.

Apesar da capacidade de absorção de energia radiante já ser reportada para alguns fármacos, poucos estudos tem focado sua atenção em suas propriedades físicas. Dentre os quimioterápicos avaliados, as imidazoacridinonas e o topotecano são capazes de gerar EROs em vesículas extracelulares e lisossomos após a sua iluminação, o que é descrito como um mecanismo relacionado à redução da viabilidade em culturas de células de câncer de mama que apresentam fenótipo de resistência a múltiplas drogas (GOLLER-BARON; ASSARAF, 2012). A doxorubicina já foi testada como cromóforo em soluções aquosas e etanólicas,

sendo observada a produção de oxigênio singlete mediante sua exposição à radiação não ionizante de baixa potência (RUIZ-GONZÁLEZ et al., 2017). Interessantemente, uma vez que a doxorubicina apresenta sua absorção máxima entre 450 e 500 nm, isto sugere que este fármaco possa atuar como um fotossensibilizador para a radiação azul (BOMGAARS et al., 1997). Assim, a associação com a luz azul poderia ser uma abordagem possível na redução da dose ou aumento da eficiência de ação da doxorubicina.

### 1.3.1 Terapia fotodinâmica e resposta inflamatória

O estresse oxidativo é um importante mecanismo de ação da TFD sobre células tumorais (BENERJEE et al., 2017; YU, W. et al, 2017). A habilidade de gerar radicais livres e espécies oxidativas é comumente explorada por pesquisadores ao testarem compostos antitumorais e outras terapias capazes de promover a morte celular através da alteração de vias metabólicas cruciais para a sobrevivência tumoral (LU et al., 2017; RICHARDS et al., 2018). No entanto, considerando a resistência de TMTN a diferentes terapias, a simples produção de EROs não culmina, necessariamente, em morte celular. Pacientes com estes subtipos neoplásicos de mau prognóstico costumam expressar níveis elevados de proteínas sensíveis à oxidação, o que previne o dano oxidativo gerado como objetivo do tratamento. De fato, a expressão elevada do *nuclear factor-kappa B* (NF- $\kappa$ B, do português, fator nuclear-kappa B) e de citocinas pró-inflamatórias parecem estar relacionadas a um fenótipo proliferativo, explicando parcialmente a resistência de TMTN aos tratamentos empregados (DAS; WHITE, 1997; SHAPOCHKA; ZALETOK; GNIDYUK, 2012; KAWCZYK-KRUPKA et al, 2018).

O NF- $\kappa$ B é uma família de fatores de transcrição composta por cinco membros: p65 (RelA), RelB, c-Rel, p105/p50 (NF- $\kappa$ B1) e p100/p52 (NF- $\kappa$ B2). Sua forma ativa capaz de se ligar ao DNA envolve a combinação destas proteínas como homodímeros ou heterodímeros. Estruturalmente, todas estas subunidades compartilham um domínio de homologia Rel em sua região N-terminal, o que media a dimerização, translocação ao núcleo e ligação ao DNA. O domínio de ativação transcricional está localizado na região C-terminal de RelA, RelB e c-Rel, mas se encontra ausente em p50 e p52. Assim, heterodímeros contendo p50, ou p52, e um das proteínas com domínio de ativação transcricional podem atuar como fatores de transcrição. Dímeros de p50 ou p52, por outro lado, ligam-se ao DNA, mas atuam como

repressores transcricionais. Através de sua ligação ao DNA, o NF- $\kappa$ B pode induzir a transcrição de diferentes citocinas, como *Interleukin 1 beta* (IL1B), *Interleukin 6* (IL6) e *Interleukin 8* (IL8), além de regular a transcrição de alguns de seus inibidores por retroalimentação negativa. Desta forma, a família NF- $\kappa$ B apresenta papel fundamental no controle de mecanismos de inflamação, imunidade, proliferação celular, desenvolvimento, sobrevivência e apoptose (PIKARSKY et al., 2004; CAPECE et al., 2017).

A forma inativa de NF- $\kappa$ B está presente no citoplasma da maioria dos tipos celulares e pode ser ativada por diferentes estímulos, como as citocinas pró-inflamatórias IL1B e TNF- $\alpha$ , além de lesões no DNA. Sua permanência no citoplasma está relacionada à sua ligação ao *inhibitor of NF- $\kappa$ B* (I $\kappa$ B, do português, proteínas inibitórias de NF- $\kappa$ B) que possuem um domínio capaz de se interagir com a região do NF- $\kappa$ B que se liga ao DNA. O evento chave na ativação do NF- $\kappa$ B, então, é a fosforilação do I $\kappa$ B que determina a degradação destas proteínas inibitórias via proteassoma (BHARTI; AGGARWAL, 2002; CAPECE et al., 2017).

Assim, compreender o papel do NF- $\kappa$ B como resposta a terapias baseadas em desequilíbrio redox pode levar a uma melhor compreensão dos fatores ligados à resistência tumoral à terapia. O melhor entendimento desta resistência, por sua vez, possibilitará o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas que minimizem os efeitos adversos dos tratamentos até então existentes e promovam melhoria na qualidade de vida dos pacientes.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Avaliar a utilização do quimioterápico doxorrubicina como agente fotossensibilizador em culturas de células de câncer de mama humana irradiadas com LED azul.

### **2.2 Objetivos específicos**

Avaliar em culturas de células de câncer de mama tratadas com doxorrubicina e/ou irradiadas com LED azul:

- a) viabilidade celular;
- b) níveis de espécies reativas de oxigênio;
- c) expressão protéica de NF- $\kappa$ B;
- d) níveis de RNA mensageiro de citocinas relacionadas à inflamação.



### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Cultura de células

Culturas de células de câncer de mama humano MDA-MB-231 (ATCC, HTB-26) foram usadas, esta células compõe o perfil TMTN. Foram mantidas em meio *Roswell Park Memorial Institute médium* (RPMI) (Sigma-Aldrich, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Sigma-Aldrich, EUA) inativado por aquecimento, 56°C por 30 min, e 1% de solução penicilina-estreptomicina-fungizona (Life Technologies, EUA), em atmosfera umidificada a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>.

#### 3.2 LED azul de baixa potência

Um LED azul de baixa potência foi adquirido juntamente à HTM Indústria de Equipamentos Eletro-Eletrônicos Ltda (Fluence, Brasil). O aplicador inclui três LEDs posicionados como os vértices de um triângulo equilátero. Cada LED apresenta uma área de emissão (*spot size*) de aproximadamente 0,28 cm<sup>2</sup>, sendo seu comprimento de onda igual a 470±10 nm. A potência de saída de cada LED é de 1500 mW.

#### 3.3 Incubação com doxorrubicina e exposição ao LED azul

Culturas de células foram incubadas com doxorrubicina (Bergamo Ltda, Brasil) nas concentrações de 25, 50 ou 100 nM por 2, 4 ou 24 ou 48 horas. Após a incubação, as células foram centrifugadas (1.500 rpm, 4 °C, 5 min) e lavadas duas vezes em solução *phosphate-buffered saline* (PBS, do português, salina fosfato-tamponada) de pH 7,4, composta por 137 mM de NaCl, 2,38 mM de KCl, 9,58 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e, 1,47 mM de NaK<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, de forma a eliminar a doxorrubicina não absorvida pelas células e ainda presente no sobrenadante.

Para a exposição ao LED azul de baixa potência,  $1 \times 10^5$  células foram transferidas a microtubos (1,5 mL), centrifugadas (1.500 rpm, 5 min) e o PBS removido. O aplicador de LED azul de baixa potência foi posicionado sobre os microtubos abertos contendo as suspensões celulares. As células foram expostas a fluências de 160, 320 ou 640 J/cm<sup>2</sup>, condizentes com a tempos de irradiação equivalentes a 30, 60 ou 120s, respectivamente. Alternativamente, para experimentos de imunocitoquímica, a exposição ao LED envolveu varredura de placas de 12 poços contendo células cultivadas sobre lamínulas.

Culturas de células foram submetidas a um dos seguintes tratamentos: (i) exposição ao LED azul, (ii) incubação com doxorrubicina ou (iii) incubação com doxorrubicina seguida pela exposição ao LED azul. Culturas de células não expostas ao LED azul e não incubadas com doxorrubicina foram utilizadas como controles.

### 3.4 Microscopia de fluorescência

Células MDA-MB-231 foram cultivadas sobre lamínulas e incubadas na presença ou ausência de doxorrubicina a 25 nM por diferentes períodos de tempo (2, 4 ou 24 horas), lavadas duas vezes com PBS e fixadas por tratamento com solução de paraformaldeído a 4% por 3 minutos. A sonda fluorescente *4',6'-diamidino-2-phenylindole* (DAPI, do português, 4',6'diamidino-2-fenilindol) foi adicionada a 0,2 µg/mL e procedeu-se incubação por 30 minutos a 37 °C no escuro com o objetivo de marcar o núcleo celular. A fluorescência emitida pela doxorrubicina e pelo DAPI foi detectada em vermelho e azul, respectivamente. Microscópio Observer A1 (Zeiss, Alemanha) e programa Axiovision (Zeiss, Alemanha) foram utilizados para captura de imagens individuais obtidas com magnificação de 40x. As imagens apresentadas são representativas de três experimentos independentes.

### 3.5 Viabilidade celular

Células cultivadas em meio RPMI foram transferidas para microplacas de 96 poços ( $15 \times 10^3$  células/poço). Após 30 minutos, 12, 24 ou 48 horas, o sobrenadante foi descartado e as estas culturas foram adicionados 100 µL de uma solução composta por 10 µL de WST-1

(Sigma-Aldrich, EUA) e 90  $\mu$ L de meio RPMI. As microplacas contendo culturas de células foram incubadas por 2 horas em atmosfera umedecida a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. A absorbância da solução foi mensurada em um leitor de *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) com pico de absorção equivalente ao comprimento de onda de 440 nm (Polaris Celer, Brasil). Frações de sobrevivência foram calculadas como a razão entre a absorbância obtida para células tratadas e a absorbância obtida para seus respectivos controles. Os resultados expressam um mínimo de três experimentos independentes.

### 3.6 Quantificação de espécies reativas de oxigênio

Após a incubação com doxorrubicina ou exposição ao LED azul de baixa potência, as culturas de células foram incubadas (30 min, 12h ou 24h), tripsinizadas, lavadas com PBS e recuperadas em tubos individuais, contendo 500  $\mu$ L de PBS. Foram adicionados 10  $\mu$ L de solução de DCFDH-DA (Sigma-Aldrich, EUA) a 25 mg/mL (absorção: 504 nm; emissão: 529 nm) para posterior incubação à temperatura ambiente por 30 minutos. A detecção das EROs foi realizada em citômetro de fluxo (BD FACScalibur™, EUA), sendo os valores quantificados como a média da intensidade de fluorescência captada pelo canal FLH-1. Um total de  $1 \times 10^4$  células foi avaliado por experimento. Valores relativos foram calculados como a razão entre os resultados obtidos para culturas de células tratadas e seus respectivos controles. Os resultados expressam um mínimo de três experimentos independentes.

### 3.7 Análises imunocitoquímicas

Lamínulas contendo  $1 \times 10^5$  células foram preparadas e fixadas com Citofix® (Dols, Brasil). Estas lamínulas foram incubadas por 15 minutos em solução contendo Triton a 0,1%, lavadas duas vezes com PBS e incubadas em solução contendo soro fetal bovino a 10% (Invitrogen, EUA) por 30 minutos. Anticorpos anti-NF- $\kappa$ B/p65 humano (1:200, sc-372, Santa Cruz Biotechnology, EUA) foram adicionados a cada lamínula em uma câmara úmida a 4 °C por 16h. Após a incubação, as lamínulas foram enxaguadas duas vezes em tampão aquoso proveniente do kit por 2 minutos, sendo adicionado o anticorpo secundário biotilado (LSAB

Dako, Dinamarca) segundo o protocolo do fabricante. As amostras foram contramarcadas utilizando hematoxilina de Harris (1 minuto), lavadas em água corrente (5 minutos), desidratadas em soluções com concentrações progressivamente maiores de etanol (70%, 85% e 100%), clarificadas em xilol, montadas e cobertas com lamínulas usando o meio de montagem não aquoso bálsamo do Canadá. As lâminas montadas foram analisadas de forma semiquantitativa através do programa Image J (*National Institute of Health*, EUA). As amostras foram analisadas por imunocitoquímica e a intensidade de marcação resultante foi semiquantificada e classificada entre 0 e 3, sendo: 0 para ausência de marcação, 1 para marcação fraca, 2 para marcação intermediária e, 3 para marcação forte. Os dados apresentados representam três experimentos independentes e são expressos em unidades arbitrárias.

### 3.8 Extração de RNA total

Cerca de  $3 \times 10^5$  células/poço foram cultivadas em placas de 6 poços e utilizadas durante a extração de RNA total. Após lavagem por duas vezes com PBS, um volume de 500  $\mu\text{L}$  de TRIzol® (Thermo Fisher, EUA) foi adicionado a cada poço, sendo o conteúdo homogeneizado, transferido para microtubos (1,5 mL) e incubado (temperatura ambiente, 10 minutos). Foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de clorofórmio, as amostras foram incubadas (temperatura ambiente, 5 minutos) e centrifugadas (12.000 rpm, 4 °C, 15 minutos) para separar as fases orgânica e aquosa. Sobrenadantes foram transferidos para outros tubos e 250  $\mu\text{L}$  de isopropanol foram adicionados. Após incubação (temperatura ambiente, 15 minutos), as preparações foram centrifugadas (12.000 rpm, 4 °C, 15 minutos), os sobrenadantes foram descartados e os precipitados foram lavados em solução etanol-dietilpirocarbonato (etanol 80%, dietilpirocarbonato 0,1% em água). Após nova centrifugação (12.000 rpm, 4 °C, 5 minutos), os sobrenadantes foram retirados, sendo o RNA total eluído em água-DEPC (0,1%) e armazenado (-80 °C) até o momento da síntese de DNA complementar.

### 3.9 Síntese de DNA complementar

A concentração de RNA total foi determinada em espectrofotômetro pela razão entre as densidades ópticas a 260 e 280 nm. Foi realizado tratamento com DNase I (Invitrogen, EUA) com o objetivo de eliminar possíveis contaminações com DNA genômico. Para tal, cerca de 2 µg de RNA total foram incubados com 1U de DNase e tampão DNase 10X em um volume total de 9 µL (15 min, 25 °C). A reação foi inativada por incubação com 1 µL de *Ethylenediamine tetraacetic acid* (EDTA) a 25 mM (65 °C, 10 min).

A síntese de *complementary DNA* (cDNA, em português, DNA complementar) foi realizada pelo uso de *SCRIPT cDNA syntesis kit* (Promega). Foram adicionados 4 µL de tampão 5X First-Strand, 1 µL de *Oligodeoxythymine* (OligodT) (500 µg/mL), 1 µL Deoxynucleotide Triphosphates (dNTP, em português, Desoxirribonucleotídeos Trifosfato) Mix (10 mM), 1 µL de Script Enzima RT à reação do RNA tratado com DNase. O protocolo de síntese envolveu a utilização de termociclador para incubação (50 min, 42 °C) para extensão da fita de cDNA com posterior inativação da enzima (15 min, 70 °C).

### 3.10 Reação em cadeia da polimerase quantitativa

A quantificação dos níveis relativos de RNAm envolveu o emprego da *quantitative Polymerase Chain Reaction* (qPCR, em português, Reação em cadeia da polimerase quantitativa), sendo as amostras amplificadas com primers (do português, iniciadores) específicos (Tabela 1). Uma quantidade igual a 1,5 µL de cada amostra de cDNA diluída 10x em água deionizada foi utilizada em uma reação contendo 5 µL de GoTaq qPCR Master Mix (Promega, EUA), 1,0 µL de solução iniciadores específicos a 1 µM e 2,5 µL de água deionizada para um volume final de 10 µL. As reações foram realizadas em triplicata através de uma máquina Rotor-Gene Q (Qiagen, EUA).

Tabela 1 - Sequências e características dos iniciadores específicos de qPCR

Gene	Sequência	Tm (°C)	Produto
ACTB	S: 5'- GAGCGCGGCTACAGCTT -3'	58,8	59 pb
	AS: 5'- TCCTTAATGTCACGCACGATTT -3'	60,3	
IL1B	S: 5'- CTGAAAGCTCTCCACCTCCAG -3'	60,1	141 pb
	AS: 5'- CACGCAGGACAGGTACAGAT -3'	59,5	
IL6	S: 5'- CAGAGCTGTGCAGATGAGTA -3'	57,0	169 pb
	AS: 5'- GCGCAGAATGAGATGAGTTG -3'	57,3	
IL8	S: 5'- TTCTGCAGCTCTGTGTGAAG -3'	58,1	127 pb
	AS: 5'- ACTCTCAATCACTCTCAGTTC -3'	54,7	

Legenda: ACTB : beta actina ; IL1B : interleucina 1 beta ; IL6: interleucina 6 ; IL8 : interleucina 8; S: iniciador senso ; AS: iniciador antissenso; Tm: *Temperature of melting* (do português, Temperatura de desnaturação); pb: pares de bases nitrogenadas.

Fonte: O autor, 2018.

As reações para amplificação de ACTB apresentaram uma etapa inicial de desnaturação (10 min, 95°C), seguida por 35 ciclos de repetição que incluíam desnaturação (20 s, 95°C) e anelamento acoplado à extensão (45 s, 65°C). As reações para amplificação de IL1B, IL6 e IL8 apresentaram uma etapa inicial de desnaturação (10 min, 95°C), seguida de 35 ciclos de repetição que incluíam desnaturação (20 s, 95°C), anelamento (20 s, 55°C) e extensão (20 s, 72°C).

A análise da curva de desnaturação foi realizada para todos os genes analisados, sendo a especificidade dos produtos de qPCR confirmada através de um único pico. Os níveis de expressão foram normalizados usando o gene humano beta-actina (ACTB) como referência. Os valores referentes ao *cycle threshold* (CT, do português, ciclo de amplificação condizente com o limiar de corte para fluorescência de fundo) foram analisados através do programa Microsoft Excel (Microsoft), empregando o método comparativo de CT ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ) (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001).

### 3.11 Análises estatísticas

Os dados são apresentados como média e desvio-padrão. Sua distribuição foi analisada segundo o teste de Kolmogorov-Smirnov. A comparação entre grupos foi realizada segundo o teste *Analysis of variance* (ANOVA), seguido pelo teste de Tukey ou teste de Kurskal-Wallis, e pós-teste de Dunn. As diferenças entre grupos foram consideradas significativas quando

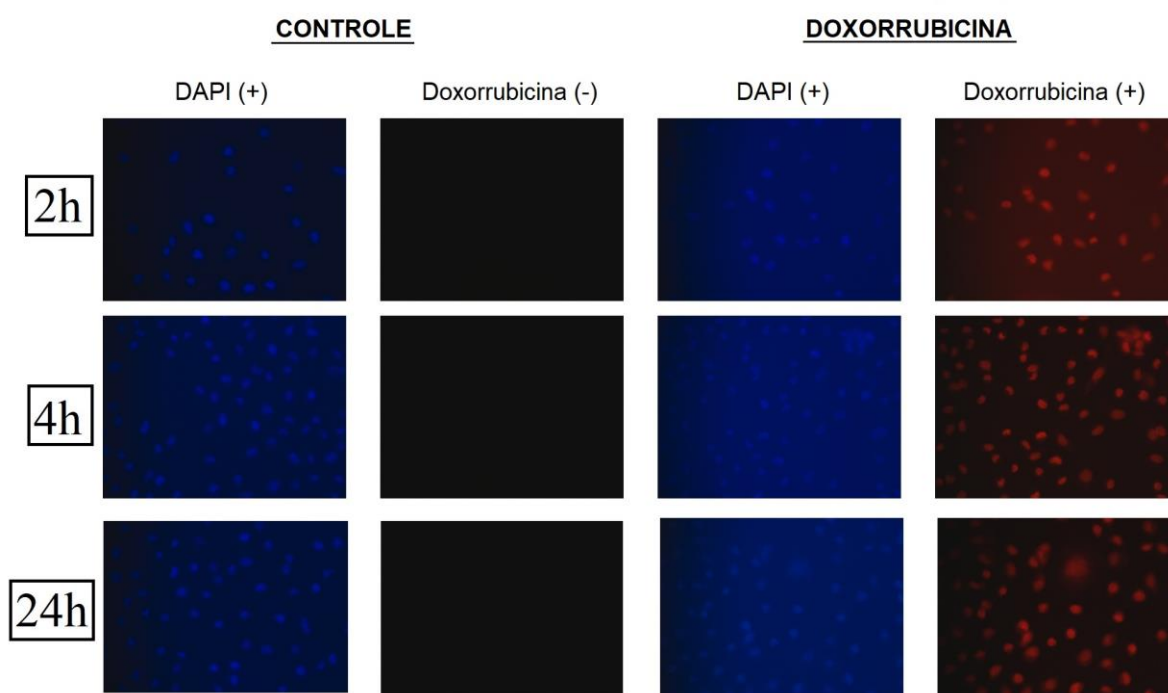
$p < 0,05$ . Os testes estatísticos foram realizados através do programa InStat Graphpad (GraphPad InStat version 5.0 para Windows 8, GraphPad Prism Software, EUA).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Localização nuclear da doxorubicina

Culturas de células da linhagem MDA-MB-231 foram incubadas com doxorubicina por diferentes períodos de tempo e analisadas por microscopia de fluorescência com o objetivo de determinar o período de tempo a partir do qual o quimioterápico poderia ser encontrado em seus núcleos. Como mostrado na Figura 8, nos períodos investigados (2, 4 ou 24 horas), células não incubadas com doxorubicina exibiram somente marcação por DAPI (azul) em seus núcleos. Células incubadas com doxorubicina exibiram a marcação para o quimioterápico (vermelho) em co-localização com a marcação para DAPI (azul), demonstrando que a doxorubicina apresenta localização nuclear após 2, 4 ou 24 horas de incubação. Estes resultados sugerem que os demais experimentos envolvendo atividade da doxorubicina sobre culturas da linhagem MDA-MB-231 possam ser realizados a partir de 2 horas de incubação.

Figura 8 - Localização nuclear da doxorubicina em culturas de células MDA-MB-231



Legenda: A localização nuclear da doxorubicina foi verificada em culturas de células MDA-MB-231 incubadas por 2, 4 ou 24 horas na presença ou ausência deste quimioterápico a 25 nM. DAPI: 4'6'-diamidino-2-fenilindol; (+) = presença da substância indicada; (-) = ausência da substância indicada. Imagens representam três experimentos independentes.

Fonte: O autor, 2018.

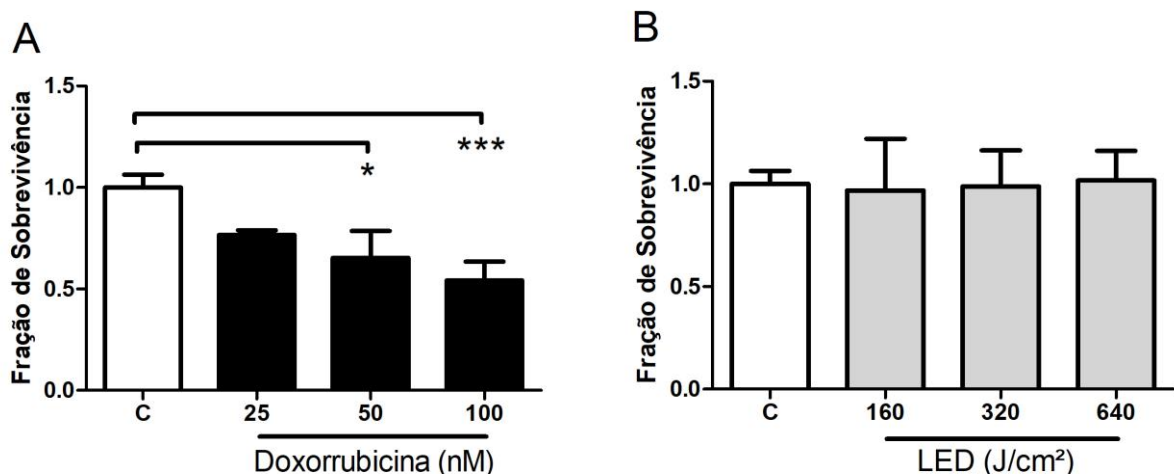


#### 4.2 Avaliação da viabilidade celular em culturas de MDA-MB-231 em função da concentração de doxorrubicina e fluência de LED azul

Culturas da linhagem MDA-MB-231 foram incubadas com doxorrubicina por 2 horas e tiveram sua viabilidade reduzida de forma concentração-dependente quando avaliadas 24 horas após o tratamento. Como mostrado na Figura 9A, quando comparadas às células não incubadas com doxorrubicina, as células incubadas com doxorrubicina a 25 nM demonstraram redução de  $23\% \pm 0,02\%$  de sua viabilidade celular ( $p > 0,05$ ). A incubação com doxorrubicina a 50 e 100 nM, em comparação ao controle, foi capaz de reduzir a viabilidade celular em  $35\% \pm 0,13\%$  ( $p < 0,05$ ) e  $46\% \pm 0,09\%$  ( $0 < 0,001$ ), respectivamente. Estes dados sugerem que, 24 horas após o tratamento, a doxorrubicina a 100 nM age como a *half maximum inhibitory concentration* (IC50, do português, metade da concentração inibitória máxima) para MDA-MB-231.

Com o objetivo de verificar se a exposição ao LED azul afeta a viabilidade de células MDA-MB-231, culturas desta linhagem foram expostas ao LED a diferentes fluências (160, 320 ou 640 J/cm<sup>2</sup>). A Figura 9B mostra que o LED azul não altera a viabilidade 24 horas após a exposição destas células a nenhuma das fluências avaliadas ( $p > 0,05$ ).

Figura 9 - Viabilidade de culturas de células MDA-MB-231 incubadas com doxorrubicina ou expostas ao LED azul de baixa potência



Legenda: A viabilidade de culturas de células MDA-MB-231 (A) incubadas com diferentes concentrações de doxorrubicina (25, 50 ou 100 nM) ou (B) expostas a diferentes fluências de LED azul fluências (160, 320 ou 640 J/cm<sup>2</sup>) foi avaliada 24h após o tratamento. C: células controle não tratadas. Resultados apresentados como média e desvio-padrão. (\*) =  $p < 0,05$  e (\*\*) =  $p < 0,001$  comparadas às células controle não tratadas. Resultados representam um mínimo de três experimentos independentes.

Fonte: O autor, 2018.

### 4.3 Exposição ao LED azul de baixa potência não altera a IC50 da doxorrubicina

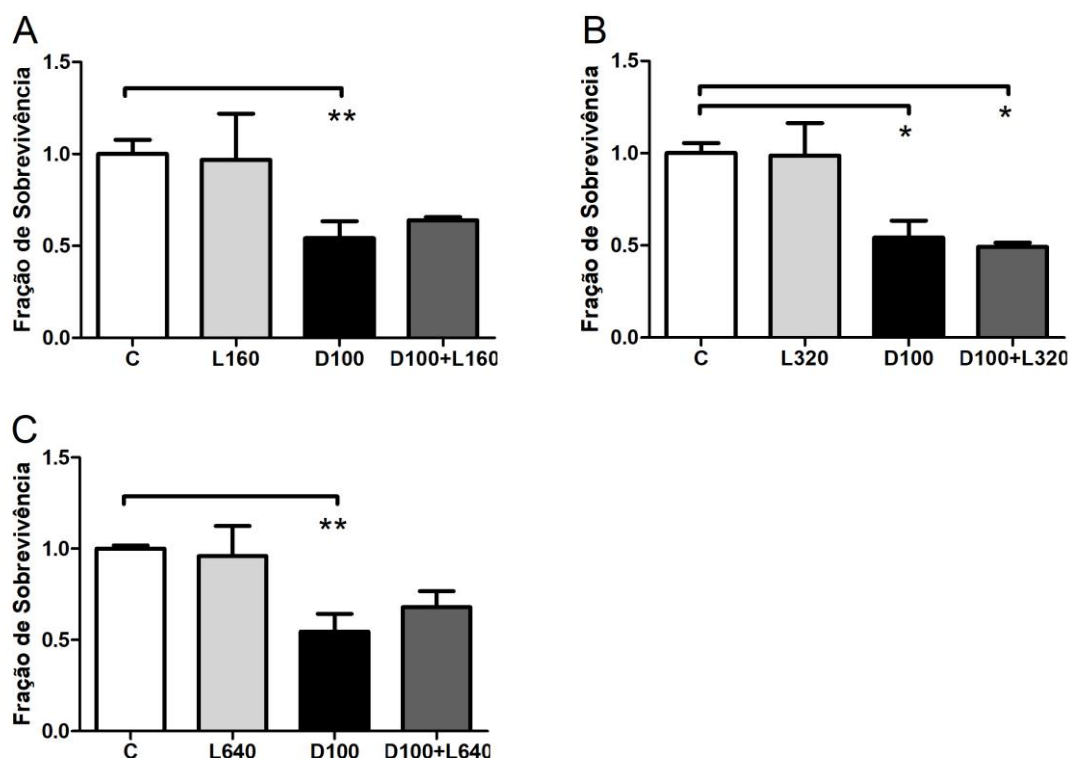
Com o objetivo de avaliar se a exposição ao LED azul poderia potencializar o efeito da doxorrubicina sobre a viabilidade de células MDA-MB-231, culturas de células foram incubadas com diferentes concentrações de doxorrubicina por 2 horas e expostas a diferentes fluências de LED azul, sendo a viabilidade celular avaliada 24 horas após o tratamento. A Figura 10A mostra que, comparadas ao controle não incubado com doxorrubicina e não exposto ao LED azul, células expostas a 160 J/cm<sup>2</sup> de LED azul não apresentaram alteração em sua viabilidade celular ( $p > 0,05$ ). Os dados nesta figura mostram que a incubação com doxorrubicina a 100 nM foi capaz de reduzir  $46\% \pm 0,09\%$  da viabilidade celular ( $p < 0,01$ ). A redução da viabilidade em células incubadas com doxorrubicina a 100 nM e expostas ao LED azul não foi estatisticamente significativa quando comparada ao controle não tratado ( $p > 0,05$ ). Além disso, não houve diferença na viabilidade celular entre células apenas incubadas com doxorrubicina a 100 nM e células incubadas com doxorrubicina a 100 nM e expostas ao LED azul ( $p > 0,05$ ).

Resultados similares foram obtidos após a exposição ao LED azul a 320 J/cm<sup>2</sup> para avaliar se o efeito da doxorrubicina poderia ser potencializado. Como mostrado na Figura 10B, comparada às células não incubadas com doxorrubicina e não expostas ao LED azul, a viabilidade celular em culturas de MDA-MB-231 expostas ao LED azul não foi alterada ( $p > 0,05$ ). A incubação com doxorrubicina a 100 nM reduziu em  $46\% \pm 0,09\%$  a viabilidade celular ( $p < 0,05$ ), e a incubação com doxorrubicina seguida da exposição ao LED azul reduziu em  $51\% \pm 0,02\%$  ( $p < 0,05$ ) a viabilidade celular. No entanto, mesmo considerando a exposição ao LED azul à fluência de 320 J/cm<sup>2</sup>, não houve diferença estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ) entre a viabilidade celular de culturas incubadas com doxorrubicina e culturas incubadas com doxorrubicina e expostas ao LED azul.

A Figura 10C mostra os resultados obtidos quanto à viabilidade de células expostas ao LED azul de baixa potência a 640 J/cm<sup>2</sup>. Comparadas com culturas não incubadas com doxorrubicina e não expostas ao LED azul, culturas celulares expostas ao LED azul não demonstraram alteração em sua viabilidade celular ( $p > 0,05$ ). Culturas de células incubadas com doxorrubicina a 100 nM exibiram redução de viabilidade celular igual a  $46\% \pm 0,09\%$  ( $p < 0,05$ ). Ainda, culturas incubadas com doxorrubicina e expostas ao LED azul não apresentam alteração significativa ( $p > 0,05$ ) em sua viabilidade celular. Como demonstrado em experimentos com culturas celulares incubadas com doxorrubicina a 100 nM com ou sem

exposição ao LED azul a 320 J/cm<sup>2</sup>, culturas celulares incubadas com doxorrubicina não demonstram diferença em sua viabilidade celular ( $p>0,05$ ) quando comparadas às culturas de células incubadas com doxorrubicina a 100 nM e expostas ao LED azul a 640 J/cm<sup>2</sup>.

Figura 10 - Viabilidade de culturas de células MDA-MB-231 tratadas com doxorrubicina a 100 nM combinada a diferentes fluências de LED azul de baixa potência



Legenda: A viabilidade de culturas de células MDA-MB-231 incubadas com doxorrubicina a 100 nM e expostas a diferentes fluências (A) 160 J/cm<sup>2</sup>, (B) 320 J/cm<sup>2</sup>, ou (C) 640 J/cm<sup>2</sup> de LED azul 24h após o tratamento foi avaliada. C: células controle não incubadas com doxorrubicina e não expostas ao LED azul; L160: LED azul a 160 J/cm<sup>2</sup>; L320: LED azul a 320 J/cm<sup>2</sup>; L640: LED azul a 640 J/cm<sup>2</sup>; D100: doxorrubicina a 100 nM; D10+L160: doxorrubicina a 100 nM combinada ao LED azul a 160 J/cm<sup>2</sup>; D100+L320: doxorrubicina a 100 nM combinada ao LED azul a 320 J/cm<sup>2</sup>; D100+L640: doxorrubicina a 100 nM combinada com LED azul a 640 J/cm<sup>2</sup>. Resultados apresentados como média e desvio-padrão. (\*) =  $p<0,05$  e (\*\*) =  $p<0,01$  comparada às células não incubadas com doxorrubicina e não expostas ao LED azul. Resultados representam um mínimo de três experimentos independentes.

Fonte: O autor, 2018.

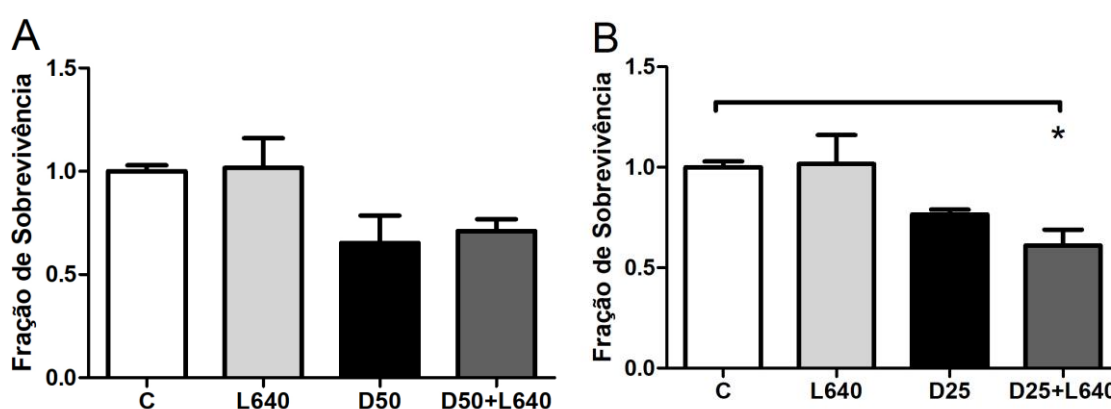
#### 4.4 Exposição ao LED azul de baixa potência eleva a citotoxicidade induzida por doxorrubicina em culturas de MDA-MB-231

Ainda que o efeito obtido 24 horas após o tratamento em culturas de células incubadas com doxorrubicina a 100 nM possa ter sido demasiadamente alto para que seja potencializado

pela exposição ao LED azul, foram avaliados os efeitos do LED azul a 640 J/cm<sup>2</sup> sobre culturas celulares de MDA-MB-231 incubadas com doxorrubicina a concentrações menores que sua IC<sub>50</sub>.

A Figura 11A mostra que, em comparação a culturas não incubadas com doxorrubicina e não expostas ao LED azul, a viabilidade em culturas celulares expostas ao LED azul a 640 J/cm<sup>2</sup> não foi alterada ( $p>0,05$ ). Ainda, culturas incubadas com doxorrubicina a 50 nM apresentaram redução em sua viabilidade celular, mas estes resultados não demonstraram significância estatística ( $p>0,05$ ). Culturas incubadas com doxorrubicina a 50 nM e expostas ao LED azul também não demonstraram alteração estatisticamente significativa ( $p>0,05$ ) em sua viabilidade celular.

Figura 11 - Viabilidade de culturas de células MDA-MB-231 expostas ao LED azul a 640 J/cm<sup>2</sup> após incubação com diferentes concentrações de doxorrubicina



Legenda: A viabilidade de culturas de células MDA-MB-231 expostas ao LED azul 640 J/cm<sup>2</sup> após incubação com doxorrubicina 50 nM (A) ou 25 nM (B) 24h após o tratamento foi avaliada. C: células controle não incubadas com doxorrubicina e não expostas ao LED azul; L640: LED azul a 640 J/cm<sup>2</sup>; D25: doxorrubicina a 25 nM; D50: doxorrubicina a 50 nM; D25+L640: doxorrubicina a 25 nM combinada ao LED azul a 640 J/cm<sup>2</sup>; D50+L640: doxorrubicina a 50 nM combinada ao LED azul a 640 J/cm<sup>2</sup>. Resultados apresentados como mediana e desvio-padrão. (\*) =  $p<0,05$  compara a células controle não incubadas com doxorrubicina e não expostas ao LED azul. Resultados representam um mínimo de três experimentos independentes.

Fonte: O autor, 2018.

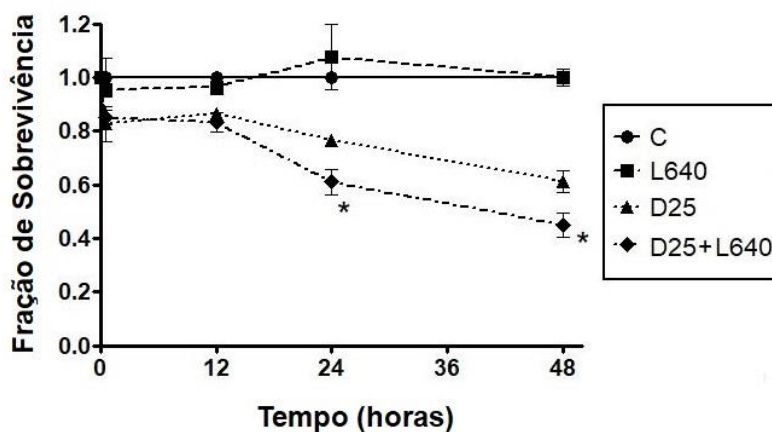
Os dados obtidos para a viabilidade celular de culturas incubadas com doxorrubicina a 25 nM são mostrados na Figura 11B. Comparada com controles não incubados com doxorrubicina e não expostos ao LED azul, a viabilidade celular de culturas expostas ao LED azul a 640 J/cm<sup>2</sup> não demonstrou qualquer alteração ( $p>0,05$ ). Culturas celulares incubadas com doxorrubicina a 25 nM apresentaram redução estatisticamente não significativa de 23%±0,02% em sua viabilidade celular ( $p>0,05$ ) quando comparadas ao controle não tratado.

No entanto, culturas de células incubadas com doxorubicina a 25 nM e expostas ao LED azul de baixa potência a 640 J/cm<sup>2</sup> apresentaram redução em sua viabilidade celular igual a 40%±0,08% quando comparadas ao controle não incubado com doxorubicina e não exposto ao LED azul (p<0,05).

#### **4.5 Efeito do LED azul de baixa potência sobre culturas celulares incubadas com doxorubicina é tempo-dependente**

Objetivando avaliar se o efeito da exposição ao LED azul de baixa potência sobre o efeito citotóxico induzido pela doxorubicina é tempo-dependente, culturas celulares de MDA-MB-231 foram incubadas com doxorubicina a 25 nM por 2 horas e expostas ao LED azul de baixa potência a 640 J/cm<sup>2</sup>. A viabilidade celular foi avaliada 30 minutos, 12, 24 e 48 horas após a exposição ao LED azul. Os dados apresentados na Figura 12 mostram que a exposição ao LED azul de baixa potência não altera a viabilidade celular em nenhum dos tempos testados, quando comparada ao controle não incubado com doxorubicina e não exposto ao LED azul (p>0,05). A incubação com doxorubicina promoveu redução da viabilidade celular em todos os períodos avaliados, ainda que de forma estatisticamente não significativa quando comparada à viabilidade celular em culturas não incubadas com doxorubicina e não expostas ao LED azul (p>0,05). Ainda, não houve diferença estatisticamente significativa na viabilidade celular de culturas incubadas com doxorubicina e expostas ao LED azul de baixa potência quando avaliados os períodos inferiores a 24 horas (p>0,05). No entanto, culturas submetidas a estas mesmas condições apresentaram redução em 40%±0,08% e 55%±0,08% de suas viabilidades celulares (p<0,05) após 24 e 48 horas de exposição ao LED azul, respectivamente.

Figura 12 - Efeito do tratamento combinado entre doxorubicina e LED azul sobre culturas de células MDA-MB-231 ao longo do tempo



Legenda: A viabilidade de culturas de células MDA-MB-231 incubadas com doxorubicina a 25 nM e expostas ao LED azul a 640 J/cm<sup>2</sup> após diferentes períodos de tempo (30 min, 12, 24 ou 48h) foram avaliadas. C(●): células controle não incubadas com doxorubicina e não expostas ao LED azul; L640(■): LED azul a 640 J/cm<sup>2</sup>; D25(▲): doxorubicina a 25 nM; D25+L640(◆): doxorubicina a 25 nM combinada ao LED azul a 640 J/cm<sup>2</sup>. Resultados apresentados como média e desvio-padrão. (\*) = p<0,05 comparadas às células controle não tratadas. Resultados representam um mínimo de três experimentos independentes.

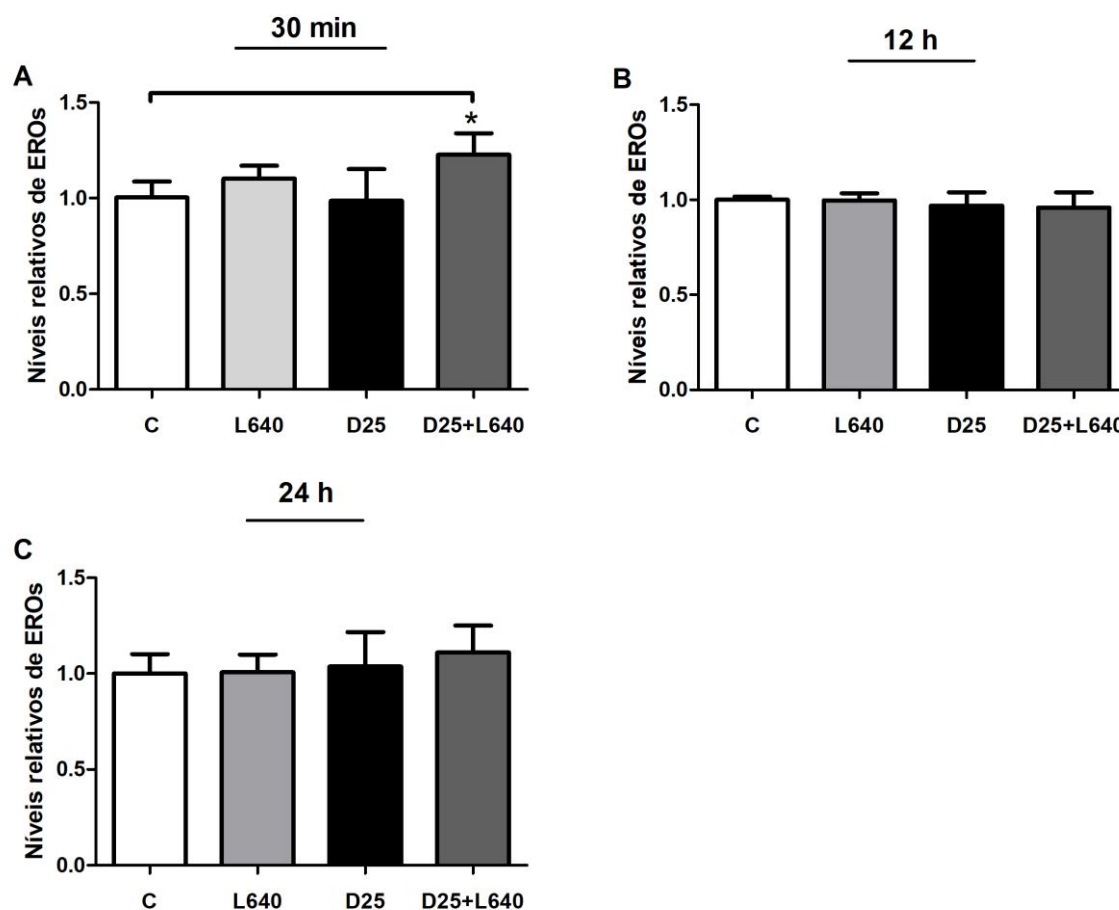
Fonte: O autor, 2018.

#### 4.6 A exposição ao LED azul de baixa potência eleva os níveis de EROs em culturas celulares incubadas com doxorubicina

Para investigar o mecanismo envolvido na promoção dos efeitos do LED azul de baixa potência sobre a atividade citotóxica induzida pela doxorubicina, os níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) foram avaliadas em culturas celulares de MDA-MB-231. Os dados apresentados na Figura 13A demonstram que, comparadas às culturas não incubadas com doxorubicina e não expostas ao LED azul, células apenas expostas ao LED azul a 640 J/cm<sup>2</sup>, assim como células apenas incubadas com doxorubicina a 25 nM, não demonstraram alterações estatisticamente significativas (p>0,05) nos níveis de EROs após 30 minutos de tratamento. No entanto, células incubadas com doxorubicina a 25 nM e expostas ao LED azul a 640 J/cm<sup>2</sup> apresentaram 22%±0,11% de elevação em seus níveis de EROs quando comparadas às células não incubadas com doxorubicina e não expostas ao LED azul (p<0,05). Não houve alterações nos níveis de EROs após 12 horas (Figura 13B) ou 24 horas

(Figura 13C) de incubação com a doxorrubicina e exposição ao LED azul de baixa potência ( $p > 0,05$ ).

Figura 13 - Níveis relativos de EROs em culturas de células MDA-MB-231 incubadas com doxorrubicina e expostas ao LED azul



Legenda: Os níveis relativos de EROs foram avaliados em culturas de células MDA-MB-231 incubadas com doxorrubicina a 25 nM e/ou expostas ao LED azul a 640 J/cm<sup>2</sup> (A) 30 minutos (B) 12h ou (C) 24h após o tratamento. C: células controle não incubadas com doxorrubicina e não expostas ao LED azul; L640: LED azul a 640 J/cm<sup>2</sup>; D25: doxorrubicina a 25 nM; D25+L640: doxorrubicina a 25 nM e LED azul a 640 J/cm<sup>2</sup>; EROs: espécies reativas de oxigênio. Resultados apresentados como média e desvio-padrão. (\*) =  $p < 0,05$  comparadas às células controle não tratadas. Resultados representam um mínimo de três experimentos independentes.

Fonte: O autor, 2018.

#### 4.7 Combinação entre doxorrubicina e LED azul induz expressão de NF- $\kappa$ B

Culturas de células MDA-MB-231 somente expostas ao LED azul a 640 J/cm<sup>2</sup>, somente incubadas com doxorrubicina a 25 nM ou, incubadas com doxorrubicina a 25 nM e expostas ao LED azul a 640 J/cm<sup>2</sup> foram avaliadas quando à marcação protéica de NF- $\kappa$ B.

A Tabela 2 mostra que, diferentemente das culturas de células controle não expostas ao LED azul e não incubadas com doxorrubicina ( $0,0 \pm 0,0$ ), culturas de células somente expostas ao LED azul ( $2,7 \pm 0,6$ ), culturas de células somente incubadas com doxorrubicina ( $2,3 \pm 0,6$ ), ou culturas de células incubadas com doxorrubicina e expostas ao LED azul ( $2,7 \pm 0,6$ ) exibiram marcação forte para NF- $\kappa$ B após 30 minutos de tratamento. A avaliação 12 horas após o tratamento mostrou que culturas de células controle não expostas ao LED azul e não incubadas com doxorrubicina ( $2,0 \pm 0,0$ ) demonstraram marcação intermediária para NF- $\kappa$ B. Neste mesmo período, culturas de células somente expostas ao LED azul ( $0,0 \pm 0,0$ ) não exibiram marcação, e culturas de células somente incubadas com doxorrubicina ( $2,7 \pm 0,6$ ) ou culturas de células incubadas com doxorrubicina e expostas ao LED azul ( $2,7 \pm 0,6$ ) mostraram marcação forte para NF- $\kappa$ B. A análise 24 horas após o tratamento exibiu resultados similares, com culturas controles não expostas ao LED azul e não incubadas com doxorrubicina ( $2,7 \pm 0,6$ ) demonstrando marcação forte, culturas de células expostas ao LED azul ( $0,3 \pm 0,6$ ) demonstrando marcação fraca, e culturas de células incubadas com doxorrubicina ( $3,0 \pm 0,0$ ), ou culturas de células incubadas com doxorrubicina e expostas ao LED azul ( $3,0 \pm 0,0$ ) demonstrando marcação forte para NF- $\kappa$ B.

Tabela 2 - Índices de intensidade de marcação protéica de NF- $\kappa$ B

<b>Tempo</b>	<b>Controle</b>	<b>LED</b>	<b>Doxorubicina</b>	<b>Doxorubicina + LED</b>
0.5h	$0.0 \pm 0.0$	$2.7 \pm 0.6$	$2.3 \pm 0.6$	$2.7 \pm 0.6$
12.0h	$2.0 \pm 0.0$	$0.0 \pm 0.0$	$2.7 \pm 0.6$	$2.7 \pm 0.6$
24.0h	$2.7 \pm 0.6$	$0.3 \pm 0.6$	$3.0 \pm 0.0$	$3.0 \pm 0.0$

Legenda: NF- $\kappa$ B: nuclear factor kappa-B (do português, fator nuclear kappa-B); Controle: Amostras não expostas ao LED azul e não incubadas com doxorrubicina; LED: amostras somente expostas ao LED azul ( $640 \text{ J/cm}^2$ ); Doxorubicina: amostras somente incubadas com doxorrubicina (25 nM); e Doxorubicina + LED: amostras incubadas com doxorrubicina (25 nM) e expostas ao LED azul ( $640 \text{ J/cm}^2$ ). Valores representam média  $\pm$  DP referentes a três experimentos independentes.

Fonte: O autor, 2018.

#### 4.8 Incubação com doxorrubicina e exposição ao LED azul elevam os níveis de RNAm de citocinas pró-inflamatórias

Objetivando avaliar se a incubação com doxorrubicina a 25 nM combinada à exposição ao LED azul a  $640 \text{ J/cm}^2$  também modularia citocinas pró-inflamatórias, os níveis



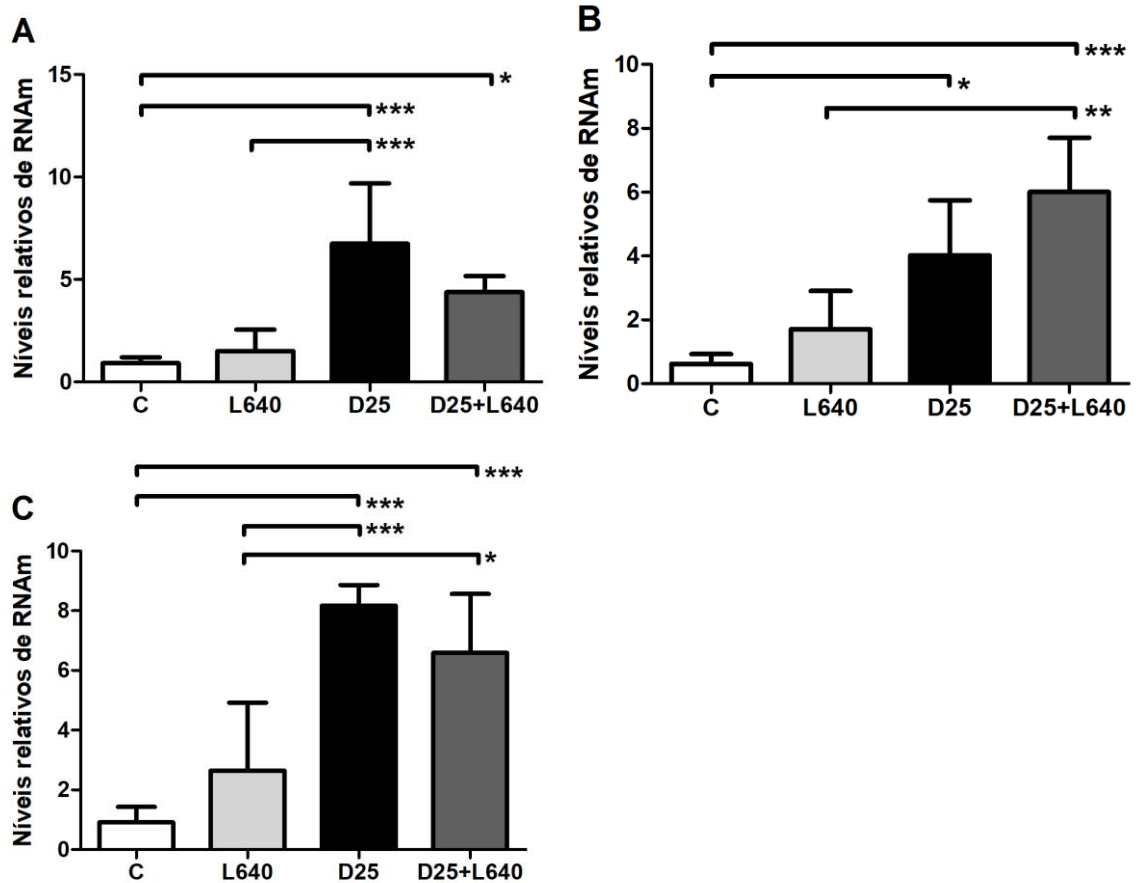
de RNAm de IL1B, IL6 e IL8 foram analisados por qPCR 24 horas após o tratamento. Os resultados obtidos são mostrados na Figura 14.

As análises dos níveis relativos de RNAm de interleucina 1 Beta (IL1B) apresentados na Figura 14A mostram que, comparados ao controle não incubado com doxorrubicina e não exposto ao LED azul, células expostas ao LED azul não apresentaram diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) em seus níveis de RNAm. No entanto, culturas de células incubadas com doxorrubicina ( $p < 0,001$ ) e culturas de células incubadas com doxorrubicina e expostas ao LED azul ( $p < 0,05$ ) apresentaram níveis relativos de RNAm para IL1B elevados. Ainda, culturas de células incubadas com doxorrubicina não apresentaram diferenças estatisticamente significativas ( $p > 0,05$ ) em seus níveis relativos de RNAm para IL1B quando comparadas aquelas culturas incubadas com doxorrubicina e expostas ao LED azul.

A Figura 14B mostra os resultados obtidos a partir das análises dos níveis relativos de RNAm da interleucina 6 (IL6) em culturas de células MDA-MB-231. Estes dados demonstram que, em comparação às células controle não incubadas com doxorrubicina e não expostas ao LED azul, células somente expostas ao LED azul não apresentaram alterações estatisticamente significativas ( $p > 0,05$ ) em seus níveis relativos de RNAm para IL6. Por outro lado, culturas de células incubadas com doxorrubicina ( $p < 0,05$ ) ou culturas de células incubadas com doxorrubicina e expostas ao LED azul ( $p < 0,001$ ) exibiram níveis relativos de RNAm para IL6 aumentados. Não houve diferenças estatisticamente significativas entre células somente incubadas com doxorrubicina e células incubadas com doxorrubicina e expostas ao LED azul ( $p > 0,05$ ).

Os resultados presentes na Figura 14C mostram as análises realizadas para os níveis relativos de RNAm da interleucina 8 (IL8) em culturas de células MDA-MB-231. Estes dados demonstram que células controle não incubadas com doxorrubicina e não expostas ao LED azul não apresentaram diferenças estatisticamente significativas ( $p > 0,05$ ) quando comparadas às culturas de células somente expostas ao LED azul. Células incubadas com doxorrubicina ( $p < 0,001$ ) ou incubadas com doxorrubicina e expostas ao LED azul ( $p > 0,001$ ) apresentaram níveis relativos de RNAm elevados em comparação às células controle não tratadas. A comparação entre células somente incubadas com doxorrubicina e células incubadas com doxorrubicina e expostas ao LED azul não demonstrou diferenças estatisticamente significativas ( $p > 0,05$ ).

Figura 14 - Níveis relativos de RNAm de citocinas próinflamatórias em culturas de células MDA-MB-231 incubadas com doxorrubicina e expostas ao LED azul



Legenda: Os níveis relativos de RNAm dos genes (A) IL1B, (B) IL6 e (C) IL8 foram avaliados por qPCR em culturas de células MDA-MB-231 incubadas com doxorrubicina a 25 nM e/ou expostas ao LED azul a 640 J/cm<sup>2</sup> 24h após o tratamento. C: células controle não tratadas; L640: LED azul a 640 J/cm<sup>2</sup>; D25: doxorrubicina a 25 nM; D25+L640: doxorrubicina a 25 nM e LED azul a 640 J/cm<sup>2</sup>. Resultados apresentados como média e desvio-padrão de cinco experimentos independentes. (\*) = p<0,05; (\*\*) = p<0,01 e (\*\*\*) = p<0,001.

Fonte: O autor, 2018.

## 5 DISCUSSÃO

Pacientes com câncer de mama que apresentam tumores sem uma assinatura molecular, como TMTN, são comumente submetidos a quimioterápicos não específicos (CLEATOR; HELLER; COOMBES, 2007; SIROHI et al., 2008). Dentre estes medicamentos, a doxorrubicina se encontra como uma opção frequentemente adotada. Por outro lado, o prolongamento do tratamento e o uso de doses elevadas estão diretamente relacionados a efeitos adversos, como cardiopatias (SWAIN; WHALEY; EWER, 2003; BERNSTEIN et al., 2005).

Embora a redução das doses empregadas de doxorrubicina possa minimizar os efeitos adversos, esta abordagem torna a retenção do efeito citotóxico sobre as células tumorais um desafio. Aliado a isso, a redução das doses pode promover a seleção de células tumorais resistentes, piorando a eficiência do tratamento (VON HOFF et al., 1979). Desta forma, para resolver estes problemas, tratamentos complementares como a TFD vem sendo testadas (HU et al., 2015; FENG et al., 2017).

O desenvolvimento de novos fármacos é um processo financeiramente custoso que, além disso, consome muito tempo, aumentando a importância da avaliação de fármacos já existentes com o objetivo de aumentar sua capacidade e eficácia de uso (KELLOFF, 1999; BEGLEY; ELLIS, 2012). Assim, com base no espectro de absorção da doxorrubicina (BOMGAARS et al., 1997) e sua capacidade de gerar espécies reativas de oxigênio quando exposta à radiação não ionizante de baixa potência (RUIZ-GONZÁLEZ et al., 2017), a doxorrubicina foi avaliada neste trabalho como um possível fotossensibilizador para a radiação emitida por LED azul.

Os resultados apresentados na Figura 8 demonstram a presença de doxorrubicina no núcleo de células MDA-MB-231 a partir de 2 horas. Uma vez que a doxorrubicina atinja o núcleo, a produção de EROs mediante exposição ao LED azul poderia aumentar os efeitos diretos e indiretos da doxorrubicina, sobretudo à molécula de DNA, promovendo morte celular por estresse oxidativo ou instabilidade genômica (LIN et al., 2016).

Ainda, esta internalização da doxorrubicina por células MDA-MB-231 a partir de duas horas de incubação mostrou-se eficiente em reduzir sua viabilidade celular 24 horas após o tratamento, como mostrado na Figura 9A. Estes dados são importantes, pois permitiram que as demais avaliações relativas ao efeito combinado da doxorrubicina ao LED azul pudessem ser realizadas descartando-se o meio de cultura no qual as células foram incubadas. Desta

forma, evitou-se que a absorção de energia ocorra por moléculas do quimioterápico que ainda não tenham sido absorvidas pelas células.

Emissões com comprimentos de onda correspondentes ao vermelho são as formas mais comuns de utilização de radiação não ionizante de baixa potência em protocolos de TFD, o que se relaciona à melhor caracterização de seus efeitos sobre tecidos biológicos (EDELL; CORTESE, 1988; XIA et al., 2014; ANIOGO; GEORGE; ABRAHAMSE, 2017). No entanto, para que a doxorrubicina atue como um fotossensibilizador é necessário uma radiação não ionizante de baixa potência na faixa do azul e, por si só, esta radiação não promova proliferação celular, como demonstrado para radiações em outros comprimentos de onda (PINHEIRO et al., 2002; SPERANDIO et al., 2013). A Figura 9B demonstra que o uso de LED azul nos parâmetros utilizados neste estudo não alterou a viabilidade celular do modelo empregado, o que reduziu o risco de anulação dos efeitos da TFD em células que possivelmente apresentassem menor concentração ou concentração nula de doxorrubicina em seu interior.

A incubação de culturas de células MDA-MB-231 com doxorrubicina a 100 nM antes da exposição ao LED azul de baixa potência não foi capaz de potencializar seus efeitos, como notado pela comparação com culturas apenas incubadas com doxorrubicina (Figura 10). É possível que a ausência de diferença entre os grupos comparados se deveu ao efeito preponderante da doxorrubicina a elevadas concentrações, uma vez que também não foram observadas diferenças na viabilidade de células incubadas com doxorrubicina a 50 nM e expostas ao LED azul (Figura 11A). Quando reduzidas as concentrações de doxorrubicina associadas à exposição ao LED azul de baixa potência, o efeito fotodinâmico foi observado com uma consequente obtenção de 40% de morte celular 24 horas após o tratamento (Figura 11B), reforçando a possibilidade de aumento da eficiência deste quimioterápico.

A doxorrubicina não é considerada um fotossensibilizador (American Cancer Society, 2015), o que poderia levantar questionamentos a respeito do efeito deste tratamento sobre a proliferação celular após 24 horas. Os resultados apresentados na Figura 12 mostram que células incubadas com doxorrubicina antes da exposição ao LED azul de baixa potência retiveram a taxa elevada de morte celular após 48 horas de tratamento.

Assim como em vários outros modelos tumorais, a linhagem de células MDA-MB-231 vem sendo testada contra agentes oxidativos capazes de causar danos a biomoléculas e, desta forma, disparar vias que culminem na morte celular (LU et al., 2017; RICHARDS et al., 2018). A eficiência da TFD também envolve a produção de EROs (CHAN; YU; YANG, 2000; GEDERAAS et al., 2005; HUANKANGA et al., 2014), o que aumenta as chances

dessa abordagem na obtenção de desfechos similares. Como demonstrado na Figura 13, a doxorrubicina exposta ao LED azul de baixa potência poderia agir como uma fotossensibilizador e elevar os níveis intracelulares de EROs 30 minutos após o tratamento.

Diferentes autores vêm questionando a mensuração da eficiência de um fotossensibilizador com base nos níveis de EROs produzidos após a exposição à radiação não ionizante de baixa potência (AVELINE; REDMOND, 1999) . Já foi demonstrado que, apesar da produção de uma menor quantidade de EROs, o cristal violeta pode ser mais efetivo como agente citotóxico em células cancerosas da linhagem HeLa do que o azul de metileno (OLIVEIRA et al., 2011) . Desta forma, as diferenças entre fotossensibilizadores podem ser derivadas de suas respectivas localizações intracelulares e, conseqüentemente, das diferentes estruturas afetadas nestes compartimentos (CASTANO; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2004; MROZ et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2011). Após a captação de doxorrubicina a partir do meio extracelular, o núcleo e as mitocôndrias são reportados como sendo seus principais locais de acumulação (BONDONNO et al., 2016; DARTIER et al., 2017). Assim, o aumento na produção de EROs em um compartimento específico poderia explicar a elevação na taxa de morte celular em culturas de MDA-MB-231 incubadas com doxorrubicina e expostas ao LED azul (Figura 12).

É possível que um pequeno desequilíbrio no estado redox das culturas de células MDA-MB-231 possa ativar certas vias sensíveis ao estresse oxidativo, causando a morte celular. De fato, já foi demonstrado que *physagulide P*, uma droga isolada a partir de *Physalis angulate L.*, age sobre a via da *c-Jun N-terminal kinase* (JNK, do português, cinase c-Jun N-terminal) através de EROs e promove uma parada no ciclo celular em G2/M, induzindo apoptose e autofagia (YU, P. et al., 2017). Além disso, experimentos com ácido glicirrízico demonstraram que sua atividade citotóxica sobre células MDA-MB-231 envolve a produção mitocondrial de EROs com conseqüente translocação de fatores indutores de apoptose para o núcleo (LIN et al., 2018).

Terapias contra TMTN são comumente baseadas em seus potenciais oxidativos (YU, P. et al., 2017; LIN et al., 2018), sendo a doxorrubicina um exemplo de quimioterápico de primeira linha usado com esta proposta (SWAIN; WHALEY; EWER, 2003; VOLKOVA; RUSSELL, 2011). No entanto, a resistência à terapia é um dos maiores problemas associados ao tratamento destes tumores e sua ocorrência é relacionada a várias características inerentes a este subtipo de câncer de mama. A existência de diferentes populações celulares em um mesmo tumor, por exemplo, dificulta a determinação de uma via específica a ser definida

como alvo vital. Além disto, a habilidade de tolerar estresse oxidativo é descrita como um importante mecanismo na progressão destas neoplasias (KARIHTALA et al., 2011).

O NF- $\kappa$ B é um dos fatores de transcrição mais importantes na resposta ao estresse oxidativo. Esta proteína é tipicamente superexpressa em células cancerosas (PYKARSKY et al., 2004), o que poderia explicar a marcação aumentada, observada ao longo do tempo, em células controle não expostas ao LED azul e não incubadas com doxorrubicina (Tabela 2).

Comumente, linhagens celulares que apresentam o fenótipo similar a TMTN, como a MDA-MB-231, exibem redução na expressão de NF- $\kappa$ B quando em apoptose mediada pelo tratamento com doxorrubicina (ALINEJAD et al., 2016; MAHJOUB et al., 2017) . No entanto, a Tabela 2 mostra resultados opostos, uma vez que a marcação para NF- $\kappa$ B permanece elevada em culturas incubadas com este quimioterápico após 0,5, 12 ou 24 horas. É importante salientar que as concentrações utilizadas nestes estudos ultrapassam a escala do milimolar (ALINEJAD et al., 2016; MAHJOUB et al., 2017), o que supera as concentrações de doxorrubicina empregadas neste trabalho. Aqui, a doxorrubicina foi testada em uma concentração máxima igual a 100 nM com o objetivo de reduzir os efeitos adversos e manter sua citotoxicidade através de sua combinação com o LED azul de baixa potência. De fato, outras pesquisas demonstraram que o aumento da atividade de NF- $\kappa$ B após o tratamento com concentrações baixas de doxorrubicina está relacionado à tentativa ineficaz de evitar a apoptose induzida por lesões ao DNA (DAS; WHITE, 1997; BIEN et al., 2004) . A ativação de NF- $\kappa$ B nestes casos parece ser dependente da degradação de I $\kappa$ B promovida pela doxorrubicina (BIEN et al., 2004; SHAPOCHKA; GALETOK; GNIDYUK, 2012).

A síntese de interleucinas induzida pela produção de EROs é um fenômeno bem caracterizado como resultado da TFD (GOLLNICK et al., 1997; WANG et al., 2015; KAWCZYK-KRUPKA et al., 2018), sendo as interleucinas IL1B, IL6 e IL8 alvos conhecidos de NF- $\kappa$ B (HARTMAN et al., 2013; SLATTERY et al., 2018). Como mostrado na Figura 13A, os níveis de RNAm destas citocinas foram avaliados e, em comparação às culturas de células não expostas ao LED azul e não incubadas com doxorrubicina, os níveis de RNAm de IL1B foram elevados em culturas de células somente incubadas com doxorrubicina e em culturas de células incubadas com doxorrubicina e expostas ao LED azul.

A Figura 13B mostra que, comparados ao controle, os níveis de RNAm de IL6 foram maiores em culturas de células incubadas com doxorrubicina e ainda mais elevados em culturas de células incubadas com doxorrubicina e expostas ao LED azul. Estes resultados estão de acordo com o papel de NF- $\kappa$ B como mediador da transcrição de IL6 em processos inflamatórios (ILIOPOULOS; HIRSCH; STRUHL, 2009; HARTMAN et al., 2013).

Investigações prévias demonstraram que culturas da linhagem de células MDA-MB-231 tratadas com doxorubicina apresentaram níveis elevados de NF- $\kappa$ B e IL6 (VYAS et al., 2017). Outros estudos, que empregaram como modelo para TFD camundongos BALB/c que receberam células da linhagem EMT6 de tumores de mama, demonstraram que níveis elevados IL6 (RNAm e proteína) estão relacionados ao aumento do infiltrado inflamatório e à redução do número de células tumorais nestes animais (GOLLNICK et al., 1997).

De maneira similar a IL1B e IL6, a expressão de IL8 também parece ser induzida por processos inflamatórios. Culturas de células somente incubadas com doxorubicina e culturas incubadas com doxorubicina e expostas ao LED azul apresentaram níveis mais altos de RNAm para IL8 do que células não incubadas com doxorubicina (Figura 13C).

Como discutido anteriormente sobre a atividade de NF- $\kappa$ B, culturas de células respondendo a estresse tendem a superexpressar algumas interleucinas pró-inflamatórias como estratégia de sobrevivência (GOLLNICK et al., 1997; WANG et al., 2015; KAWCZYK-KRUPKA et al., 2018). O estresse prolongado causado pelo tratamento apenas com doxorubicina, ou pela sua combinação ao LED azul de baixa potência, parece ser responsável pela indução da transcrição de citocinas pró-inflamatórias. Isto pode ser hipotetizado já que este efeito não foi observado em culturas de células controle não expostas ao LED azul e não incubadas com doxorubicina, tampouco em culturas apenas expostas ao LED azul.

NF- $\kappa$ B, IL1B, IL6 e IL8 são comumente associados à resistência tumoral contra tratamentos. No entanto, os resultados apresentados aqui para os níveis protéicos de NF- $\kappa$ B e para os níveis de RNAm de IL1B, IL6 e IL8 indicam não haver diferenças entre culturas tratadas apenas com doxorubicina e culturas tratadas por sua combinação ao LED azul. Assim é possível supor que o aumento da citotoxicidade promovida pelo tratamento combinado não esteja diretamente relacionada à promoção da resistência contra a doxorubicina. Estudos futuros empregando ensaios clonogênicos e linhagens com fenótipo resistente a múltiplas drogas deverão ser realizados de forma a averiguar tal relação.

## CONCLUSÃO

Com base nos resultados apresentados, concluímos que culturas de células MDA-MB-231 incubadas com doxorrubicina (25 nM) e irradiadas com LED azul de baixa potência (640 J/cm<sup>2</sup>) apresentam:

- a) a viabilidade após 24 e 48 horas de tratamento;
- b) maiores níveis relativos de espécies reativas de oxigênio 30 minutos após a irradiação;
- c) níveis elevados de expressão protéica para NF- $\kappa$ B;
- d) níveis elevados de RNAm de IL1B, IL6 e IL8.



## REFERÊNCIAS

- AGOSTINIS, P. *et al.* Photodynamic Therapy of Cancer: An Update. **Cancer J Clin.** v. 61, p. 250–281, 2011.
- ALINEJAD, V. *et al.* Co-delivery of IL17RB siRNA and doxorubicin by chitosan-based nanoparticles for enhanced anticancer efficacy in breast cancer cells. **Biomed. Pharmacother.** v. 83, p. 229-240, 2016.
- ANIOGO, E. C.; GEORGE, B. P. A.; ABRAHAMSE, H. Phthalocyanine induced phototherapy coupled with doxorubicin; a promising novel treatment for breast cancer. **Expert Rev. Anticancer Ther.** v. 17, p. 693-702, 2017.
- AVELINE, B. M.; REDMOND, R. W. Can cellular phototoxicity be accurately predicted on the basis of sensitizer photophysics? **Photochem. Photobiol.** v. 69, p. 306-316, 1999.
- BANERJEE, S. M. *et al.* Photodynamic therapy: Inception to application in breast cancer. **The Breast.** v. 31, p. 105-113, 2017.
- BEGLEY, C. G.; ELLIS, L. M. Raise standards for preclinical cancer research. **Nature.** v. 483, p. 531-533, 2012.
- BERNSTEIN, D. *et al.* Differential cardioprotective/cardiotoxic effects mediated by  $\beta$ -adrenergic receptor subtypes. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.** v. 289, p. H2441-H2449, 2005.
- BHARTI, A; AGGARWAL, B. Nuclear factor-kappa B and cancer: its role in prevention and therapy. **Biochemical Pharmacology.** v. 64, p. 883-888, 2002.
- BIEN, S. *et al.* Nuclear factor- $\kappa$ B mediates up-regulation of cathepsin b by doxorubicin in tumor cells. **Mol Pharmacol.** v. 65, p. 1092–1102, 2004.
- BOMGAARS, L. *et al.* The inactivation of doxorubicin by long ultraviolet light. **Cancer Chemother. Pharmacol.** v. 40, p. 506-512, 1997.
- BRANCALEON, L.; MOSELEY, H. Laser and non-laser light sources for photodynamic therapy. **Lasers Med. Sci.** v. 17, p. 173-186, 2002.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil. Brasília, 2018.
- BUONDONNO, I. *et al.* Mitochondria-targeted doxorubicin: a new therapeutic strategy against doxorubicin-resistant osteosarcoma. **Mol. Cancer Ther.** v. 15, p. 2640-2652, 2016.
- CAPECE, D. *et al.* Cancer secretome and inflammation: The bright and the dark sides of NF- $\kappa$ B. **Semin Cell Dev Biol.** v. 78, p. 51-61, 2018.

CASTANO, A. P.; DEMIDOVA, T N.; HAMBLIN, M R. Mechanisms in photodynamic therapy: part one—photosensitizers, photochemistry and cellular localization.

**Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**. v. 1, p. 279-293, 2004.

CHAN, W.; YU, J.; YANG, S. Apoptotic signalling cascade in photosensitized human epidermal carcinoma A431 cells: involvement of singlet oxygen, c-Jun N-terminal kinase, caspase-3 and p21-activated kinase 2. **Biochem. J.** v. 351, p. 221-232, 2000.

CHEN, Y. *et al.* Anticancer efficacy enhancement and attenuation of side effects of doxorubicin with titanium dioxide nanoparticles. **Int. J. Nanomedicine**. v. 6, p. 2321-2326, 2011.

CLEATOR, S.; HELLER, W.; COOMBES, R. C. Triple-negative breast cancer: therapeutic options. **Lancet Oncol.** v. 8, p. 235-244, 2011.

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

DAS, K. C.; WHITE, C. W. Activation of NF- $\kappa$ B by antineoplastic agents: role of protein kinase C. **J. Biol. Chem.** v. 272, p. 14914–14920, 1997.

DIFFERENCE between led and laser light source. 29 de maio de 2013. Disponível em: &lt;<https://community.fs.com/blog/difference-between-laser-light-source-and-led-light-source.html>&gt;. Acesso em: 27 de maio de 2018.

DOLMANS, D. E. J. G. J. D.; FUKUMURA, D.; JAIN, R. K. Photodynamic therapy for cancer. **Nat. Rev. Cancer**. v. 3, p. 380-387, 2003.

EDELL, E. S.; CORTESE, D. A. Combined effects of hematoporphyrin derivative phototherapy and adriamycin in a murine tumor model. **Lasers Surg. Med.** v. 8, p. 413-417, 1988.

FENG, C. *et al.* Tumor-specific delivery of doxorubicin through conjugation of pH-responsive peptide for overcoming drug resistance in cancer. **Int. J. Pharm.** v. 528, p. 322-333, 2017.

FERLAY, I. *et al.* GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence, and Mortality Worldwide: IARC Cancer Base No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. Disponível em: <<http://globocan.iarc.fr>>. Acesso em: 5 maio 2018.

GEDERAAS, O. A. *et al.* Cell specific effects of polyunsaturated fatty acids on 5-aminolevulinic acid based photosensitization. **Photochem. Photobiol. Sci.** v. 4, p. 383-389, 2005.

GEWIRTZ, D. A. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. **Biochem. Pharmacol.** v. 57, p. 727-741, 1999.

- GOLER-BARON, V.; ASSARAF, Y. G. Overcoming multidrug resistance via photodestruction of abcg2-rich extracellular vesicles sequestering photosensitive chemotherapeutics. **PLoS One**. v. 7, p. 35487-35499, 2012.
- GOLLNICK, S. O. *et al.* Altered expression of interleukin 6 and interleukin 10 as a result of photodynamic therapy in vivo. **Cancer Res**. v. 57, p. 3904-3909, 1997.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**. v. 144, p. 646-74, 2011.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**. v. 100, p. 57-70, 2000.
- HARTMAN, Z. C. *et al.* Growth of triple-negative breast cancer cells relies upon coordinate autocrine expression of the proinflammatory cytokines IL-6 and IL-8. **Cancer Res**. v. 73, p. 3470-3480, 2013.
- HU, J. *et al.* Design of tumor-homing and pH-responsive polypeptide-doxorubicin nanoparticles with enhanced anticancer efficacy and reduced side effects. **Chem. Comm**. v. 51, p. 11405-11408, 2015.
- HUANKANG, Z. *et al.* Cell specific effects of polyunsaturated fatty acids on 5-aminolevulinic acid based photosensitization. **Photodiagnosis Photodyn. Ther**. v. 11, p. 55-62, 2014.
- HUDIS, C. A.; GIANNI, L. Triple-Negative Breast Cancer: An Unmet Medical Need. **The Oncologist**. v. 16, p. 1-11, 2011.
- ILIOPOULOS, D.; HIRSCH, H. A.; STRUHL, K. An epigenetic switch involving NF- $\kappa$ B, Lin28, let-7 microRNA, and IL6 links inflammation to cell transformation. **Cell**. v. 139, p. 693-706, 2009.
- ISAKOFF, S. J. Triple Negative Breast Cancer: Role of Specific Chemotherapy Agents. **Cancer J**. v. 16, p. 53-61, 2010.
- KARIHTALA, P. *et al.* Oxidative stress and counteracting mechanisms in hormone receptor positive, triple-negative and basal-like breast carcinomas. **BMC Cancer**. v. 11, p. 262-267, 2011.
- KAWCZYK-KRUPKA, A. *et al.* Influence of ALA-mediated photodynamic therapy on secretion of interleukins 6, 8 and 10 by colon cancer cells in vitro. **Photodiagnosis Photodyn Ther**. v. 22, p. 137-139, 2018.
- KELLOFF, G. f. Perspectives on cancer chemoprevention research and drug development. **Adv. Cancer Res**. v. 78, p. 199-334, 1999.
- LIN, S. C. *et al.* Glycyrrhizic acid induces human MDA-MB-231 breast cancer cell death and autophagy via the ROS-mitochondrial pathway. **Oncol. Rep**. v. 39, p. 703-710, 2018.
- LIVAK, J. K.; SCHMITTGEN, T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. **Methods**. v. 25, p. 402-408, 2001.

LU, Y. *et al.* Khat promotes human breast cancer MDA- MB- 231 cell apoptosis via mitochondria and MAPK- associated pathways. **Oncol. Lett.** v. 14, p. 3947-3952, 2017.

MAHJOUB, M. A. *et al.* Combination treatment with dendrosomal nanocurcumin and doxorubicin improves anticancer effects on breast cancer cells through modulating CXCR4/NF- $\kappa$ B/Smo regulatory network. **Mol. Biol. Rep.** v. 44, p. 341–351, 2017.

MANG, T. S. Lasers and light sources for PDT: past, present and future. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy.** v. 1, p. 43-48, 2004.

MIZUTANI, H. *et al.* Mechanism of apoptosis induced by doxorubicin through the generation of hydrogen peroxide. **Life Sci.** v. 76, p. 1439-1453, 2005.

MROZ, P. *et al.* Functionalized fullerenes mediate photodynamic killing of cancer cells: Type I versus Type II photochemical mechanism. **Free Radic. Biol. Med.** v. 43, p. 711-719, 2007.

OLIVEIRA, C. S. *et al.* Major determinants of photoinduced cell death: Subcellular localization versus photosensitization efficiency. **Free Radic. Biol. Med.** v. 51, p. 824-833, 2011.

PARK, H. *et al.* Doxorubicin productivity improvement by the recombinant *Streptomyces peucetius* with high-copy regulatory genes cultured in the optimized media composition. **J. Microbiol. Biotechnol.** v. 15, p. 66–71, 2005.

PIKARSKY, E. *et al.* NF- $\kappa$ B functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. **Nature.** v. 431, p. 461-466, 2004.

PINHEIRO, A. L. *et al.* Does LLLT stimulate laryngeal carcinoma cells? An in vitro study, **Braz. Dent. J.** v. 13, p. 109-112, 2002.

RICHARDS, C. E. *et al.* Diterpenoid natural compound C4 (Crassin) exerts cytostatic effects on triple-negative breast cancer cells via a pathway involving reactive oxygen species. **Cell Oncol. (Dordr).** v. 41, p. 35-46, 2018.

ROBERTSON, C. A.; EVANS, D. H.; ABRAHAMSE, H. Photodynamic therapy (PDT): A short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology.** v. 96, p. 1–8, 2009.

RUIZ-GONZÁLEZ, R. *et al.* Photodynamic synergistic effect of pheophorbide a and doxorubicin in combined treatment against tumoral cells. **Cancers.** v. 9, p. 18-35, 2017.

SANDHU, R. *et al.* Microarray-based gene expression profiling for molecular classification of breast cancer and identification of new targets for therapy. **Lab. Med.** v. 41, p. 364-372, 2010.

SCHMIDT, C. *et al.* An abraded surface of doxorubicin-loaded surfactant-containing drug delivery systems effectively reduces the survival of carcinoma cells. **Biomedicines.** v. 4, p. 22-34, 2016.

SHAPOCHKA, D. O.; ZALETOK, S. P.; GNIDYUK, M. I. Relationship between NF- $\kappa$ B, ER, PR, HER2/Neu, Ki67, p53 expression in human breast cancer. **Exp. Oncol.** v. 34, p. 358–363, 2012.

SIROHI, B. *et al.* Platinum-based chemotherapy in triple-negative breast cancer. **Ann. Oncol.** vol. 19, p. 1847-1852, 2008.

SLATTERY, M. L. *et al.* The NF- $\kappa$ B signalling pathway in colorectal cancer: associations between dysregulated gene and miRNA expression. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.** v. 144, p. 269–283, 2018.

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

SPERANDIO, F. F. *et al.* Low-level laser therapy can produce increased aggressiveness of dysplastic and oral cancer cell lines by modulation of Akt/mTOR signaling pathway. **Biophotonics.** v. 6, p. 839-847, 2013.

SWAIN, S. M.; WHALEY, F. S.; EWER, M. S. Congestive heart failure in patients treated with doxorubicin. **Cancer.** v. 97, p. 2869-2879, 2003.

VOLKOVA, M.; RUSSELL, R. Anthracycline cardiotoxicity: prevalence, pathogenesis and treatment. **Curr. Cardiol. Rev.** v. 7, p. 214-220, 2011.

VON HOFF, D. D. *et al.* Risk factors for doxorubicin-induced congestive heart failure. **Ann Intern Med.** v. 91, p. 710-717, 1979.

WANG, X. *et al.* Stimulation of dendritic cells by DAMPs in ALA-PDT treated SCC tumor cells. **Oncotarget.** v. 42, p. 44688-44702, 2015.

XIA, W. *et al.* CpG oligodeoxynucleotide as immune adjuvant enhances photodynamic therapy response in murine metastatic breast cancer. **J. Biophotonics.** v. 7, p. 897-905, 2014.

YOUNG, R. C.; OZOLS, R. F.; MYERS, C. E. The anthracycline antineoplastic drugs. **N. Engl. J. Med.** v. 305, p. 139-153, 1981.

YU, P. *et al.* Anti-proliferation of triple-negative breast cancer cells with physagulide P: ROS/JNK signaling pathway induces apoptosis and autophagic cell death. **Oncotarget.** v. 8, p. 64032-64049, 2017.

YU, W. *et al.* A review and outlook in the treatment of osteosarcoma and other deep tumors with photodynamic therapy: from basic to deep. **Oncotarget.** v. 8, p. 39833-39848, 2017.