



Universidade de Brasília

Departamento de Biologia Celular

Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular

Ana Luísa de Gouvêa da Silva

Tese de Doutorado

**Avaliação da maturação de células dendríticas por
nanoestruturas de maghemita associadas a azul de
metileno para o tratamento de câncer de mama e de ovário
*in vitro***

Orientadora: Professora Sônia Nair Bão

Setembro, 2025

Ana Luísa de Gouvêa da Silva

**Avaliação da maturação de células dendríticas por
nanoestruturas de maghemita associadas a azul de
metileno para o tratamento de câncer de mama e de ovário
*in vitro***

Orientadora: Profa. Dra. Sônia Nair Bão

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Molecular) da Universidade de Brasília como parte integrante dos requisitos para a obtenção do título de Doutor.

Setembro, 2025

Dedico este trabalho a minha família que sempre acreditou em meus sonhos e foram meus maiores incentivadores. Vocês são a minha base: meus pais, Regina e Osvaldo, meu esposo, Cristiano, minha filha, Júlia e meu irmão Mateus.

Muito obrigada Vozinha, eu sei que a Senhora está aqui comigo, sempre. A Senhora sempre será uma inspiração!

Agradecimentos

Primeiramente, à Deus, que sempre vêm se mostrando estar presente nos mínimos detalhes. Obrigada, meu pai, pelos melhores caminhos e planos para minha vida. Sem Ele, nada se pode.

Aos meus amados pais, Regina e Osvaldo, meus maiores exemplos e minhas fortalezas. Agradeço imensamente por sempre estarem e se fazerem presentes em todos os meus passos, sempre apoiando meus sonhos e acreditando em meu potencial. Vocês sempre serão os meus maiores incentivadores e meus eternos portos seguros. Eu nunca na minha vida imagino como seria minha vida sem vocês. Obrigada por se dedicarem tanto por nós!

Ao meu irmão, Mateus, meu fiel escudeiro e meu companheiro! Com você minha vida é tão mais leve, você consegue me fazer cada dia mais feliz! Você é o meu orgulho!

Ao meu esposo, Cristiano, aquele quem escolhi dividir minha vida e construir minha família. Por inúmeros momentos eu pensei que não seria capaz, e você esteve aqui comigo para me apoiar e tornar esse sonho realidade. Você foi a minha melhor escolha, sem você nada disso seria possível. Obrigada pelas manhãs, tardes e noites que eu tive que me ausentar e você esteve lá, presente. Eu tenho tanta sorte de ser casada com você, viver com você é a realização de um sonho.

Às minhas amadas filhas, minha anjinha Liz e minha princesa Júlia. Vocês foram as minhas maiores surpresas e felicidades ao longo desses anos. Ser mãe de vocês foi a maior dádiva que Deus me pôde conceder. Com vocês minha vida faz muito mais sentido. Que eu possa orgulhá-las e ser a melhor mãe para vocês.

À minha orientadora, Professora Sônia, muito obrigada por me acolher ao longo desses 9 anos que estamos juntas. A Senhora sempre acreditou em meu trabalho e apoiou minhas decisões, obrigada por ser compreensível nos momentos mais complicados e por se fazer presente em todos esses anos.

Ao Professor Leonardo Paterno. Me lembro do dia que cheguei com a ideia principal do trabalho e o Senhor abraçou de cabeça erguida e me disse que tudo seria possível e, realmente, foi possível. Obrigada por todo carinho e dedicação sempre!

Ao Professor Dr. Daniel Ardisson, por todo o apoio e parceria. Obrigada por abrir as portas do LaVi e por contribuir para o desenvolvimento deste trabalho.

Às minhas amigas e cientistas maravilhosas, Giovanna Lobo, Heloísa Antoniella, Beatriz Campos e Giovanna Amaral. Quando eu precisei vocês sempre estavam lá! Obrigada por contribuírem tanto com esse trabalho e serem grandes amigas. Vocês tornaram meus dias muito mais leves e felizes.

Aos meus amigos científicos que fiz ao longo desses anos de pesquisa, Ingrid, Karine, Melissa, Luana, Marina Mesquita, Sarah Pinho, Júlia Penin, Sabrina Azevedo, Gabriel Pasquarelli e Felipe Diego. Sou muito grata por poder compartilhar com vocês os meus dias, por sempre me acolherem e trazer calma em meio ao caos.

À minha eterna cientista mais inspiradora, Bruna Guido, por ser esse exemplo de pesquisadora e ter me ensinado a viver a ciência da maneira mais linda possível. Você é uma inspiração, sempre me mostrando o tanto que a ciência é admirável e como ser cientista é algo para se orgulhar. Trabalhar com você é um verdadeiro sonho.

Aos meus amigos e colegas do Hospital da Criança, com quem tenho o prazer de conviver diariamente, Marina Ribeiro, Agenor de Castro, Ricardo Camargo, Brenno Martins, Lucas Souza, Robéria Mendonça, Tatiana Rusch, Caroliny Victoria, Rebeca Lima, Maria Elvira, Suzany Almeida, Cecília Viana, Janine Dias, Stefany Leal, Larissa Lemos, Micael Rosario eu nunca, na vida, imaginei poder trabalhar com pessoas tão inspiradoras, como vocês! Obrigada por me receberem com tanto carinho e me incentivarem todos os dias. Estar com vocês é uma verdadeira sorte!

Este trabalho é dedicado à minha vizinha, que sempre me apoiou em todos os meus sonhos. Hoje não poderá estar presente fisicamente para ver o resultado, vovó, mas tenho certeza de que a Senhora está olhando por nós daí de cima! Espero que tenha te dado muito orgulho!

E, por fim, ao CNPq e às agências de fomento – CAPES, FINEP, FAPDF, e ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Biologia Molecular) pelo financiamento deste trabalho. À Universidade de Brasília, que foi minha segunda casa por dez anos e me proporcionou momentos incríveis.

“L’essentiel est invisible pour les yeux”

(Le Petit Prince)

Resumo

O câncer de mama, segundo tipo mais comum, e o câncer de ovário, o mais letal dentre os tumores do aparelho reprodutor feminino, destacam-se pela alta incidência e letalidade. O desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, com o auxílio da nanotecnologia, vem ganhando destaque pela liberação controlada e direcionada de fármacos. Paralelamente, o papel do sistema imunológico no tratamento do câncer tem promovido o desenvolvimento de inúmeras pesquisas na área das imunoterapias focando naquelas capazes de promover uma resposta imune eficaz contra os tumores, como aquelas baseadas na ativação e maturação de células dendríticas. Estudos prévios demonstram a eficácia, *in vitro*, do uso de nanopartículas de maghemita associadas ao azul de metileno (MAGCIT-AM) para o tratamento de câncer de mama e de ovário. Assim, com base nesses achados, o presente trabalho incluiu a aplicação do MAGCIT-AM a fim de promover uma resposta imune antitumoral para o tratamento do câncer de mama e de ovário *in vitro*. Foram utilizadas duas linhagens celulares de carcinoma de mama humano (MDA-MB-231 e T-47D) e uma linhagem de câncer de ovário (A2780). MAGCIT-AM apresentou diâmetro hidrodinâmico de 60,93 nm com índice de polidispersão de 0,199 e potencial zeta de -20,9 mV. A endocitose das nanopartículas foi observada após 6 horas de tratamento, com grande acúmulo de nanopartículas internalizadas em estruturas bem delimitadas, semelhantes a lisossomos e/ou endossomos, conforme evidenciado por análise de microscopia eletrônica de transmissão (MET). A análise do mecanismo de morte e das vias oxidativas demonstrou aumento nos níveis de estresse oxidativo e de lipídeos peroxidados, acompanhado do envolvimento de enzimas antioxidantes. Por fim, ensaios de citometria de fluxo revelaram a modulação na biogênese de corpúsculo lipídico em linhagens de câncer de mama, a redução do potencial transmembranar mitocondrial, bem como a maturação das células dendríticas, evidenciada pelo aumento na expressão de marcadores CD86, CD11c, CD25, CD40 e HLA-DR, sugerindo que a morte celular induzida por MAGCIT-AM é capaz de promover a maturação de células dendríticas, reforçando o seu potencial como estratégia terapêutica para câncer de mama e de ovário.

Palavras-chave: Câncer de Mama; Câncer de Ovário; Nanobiotecnologia, Células Dendríticas e EROs.

Abstract

Breast cancer, the second most common type, and ovarian cancer, the most lethal among tumors of the female reproductive system, stand out due to their high incidence and mortality rates. The development of new therapeutic strategies supported by nanotechnology has gained prominence owing to the controlled and targeted drug delivery. In parallel, the role of the immune system in cancer treatment has driven the advancement of numerous studies in the field of immunotherapy, particularly those focused on eliciting an effective immune response against tumors, such as approaches based on dendritic cell activation and maturation. Previous studies have demonstrated the in vitro efficacy of maghemite nanoparticles associated with methylene blue (MAGCIT-AM) for the treatment of breast and ovarian cancers. Based on these findings, the present study investigated the application of MAGCIT-AM with the aim of promoting an antitumor immune response in vitro for the treatment of breast and ovarian cancers. Two human breast carcinoma cell lines (MDA-MB-231 and T-47D) and one ovarian cancer cell line (A2780) were used. MAGCIT-AM exhibited a hydrodynamic diameter of 60.93 nm, a polydispersity index of 0.199, and a zeta potential of -20.9 mV. Nanoparticle endocytosis was observed after 6 hours of treatment, with a substantial accumulation of internalized nanoparticles in well-defined structures resembling lysosomes and/or endosomes, as evidenced by transmission electron microscopy (TEM) analysis. The wound healing assay showed inhibition of tumor cell migration, including in MDA-MB-231 cells, which also exhibited a significant reduction in cell viability. Analysis of oxidative pathways revealed elevated oxidative stress levels, accompanied by the involvement of antioxidant enzymes. Finally, flow cytometry assays revealed modulation of lipid droplet biogenesis, reduction in mitochondrial membrane potential, and dendritic cell maturation, evidenced by increased expression of specific markers, like CD11c, CD86, HLA-DR, CD25 and CD40, suggesting that cell death induced by MAGCIT-AM is capable of promoting dendritic cell maturation, thereby reinforcing its potential as a therapeutic strategy for breast and ovarian cancer.

Keywords: Breast Cancer; Ovarian Cancer; Nanotechnology, Dendritic Cells, ROS.

Índice de Figuras

Figura 1. Número de mortes ocasionados pelo câncer no ano de 2022.....	20
Figura 2. Estimativas para o ano de 2023 das taxas brutas de incidência por 100 mil habitantes e do número de novos casos de câncer segundo sexo e localização primária.....	20
Figura 3. Características para o desenvolvimento de uma neoplasia.....	21
Figura 4. Distribuição percentual de órfãos maternos consequente da morte ocasionada por câncer pela idade da mãe no momento do falecimento.....	23
Figura 5. Taxa de mortalidade do câncer de mama, por 100.000 mulheres no Brasil entre os anos de 1980 a 2020.....	24
Figura 6. Taxa de incidência e mortalidade para o câncer de ovário em mulheres.....	26
Figura 7. Tipos de nanoestruturas desenvolvidas para terapias antineoplásicas.....	28
Figura 8. Geração de espécies reativas de oxigênio e seus efeitos no câncer.....	31
Figura 9. Mecanismos de inibição da apoptose em células tumorais.....	34
Figura 10. Geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) via reação de Fenton.....	36
Figura 11. Mecanismos de regulação da ferroptose.....	37
Figura 12. Papel pró-neoplásico da imunidade inata.....	39
Figura 13. Esquema simplificado da diferenciação e origem das células dendríticas.....	44
Figura 14. Esquema da apresentação cruzada de antígenos tumorais por células dendríticas aos linfócitos T.....	46
Figura 15. Diferenciação monocítica.....	48
Figura 16. Separação magnética de MAGCIT-AM por estante magnética.....	61
Figura 17. Esquema do estudo da maturação de células dendríticas e análise do perfil monocítico.....	62
Figura 18. Esquema de <i>gating</i> aplicado no painel 1 para a avaliação da maturação das CDs e do perfil monocitário em células submetidas ao sobrenadante de lisados tumorais previamente tratados com MAGCIT-AM.....	65
Figura 19. Esquema de <i>gating</i> aplicado no painel 1 para a avaliação da maturação das CDs e do perfil monocitário em células não submetidas ao sobrenadante de lisados tumorais previamente tratados com MAGCIT-AM.....	66
Figura 20. Esquema de <i>gating</i> aplicado no painel 2 para a avaliação da maturação das CDs em células submetidas ao sobrenadante de lisados tumorais previamente tratados com MAGCIT-AM.....	67
Figura 21. Esquema de <i>gating</i> aplicado no painel 2 para a avaliação da maturação das CDs em células não submetidas ao sobrenadante de lisados tumorais previamente tratados com MAGCIT-AM.....	68

Figura 22. Internalização de MAGCIT-AM em células tumorais após tratamento com o nanossistema (0,78 µg/mL de AM, 6 horas)	69
Figura 23. Internalização e movimentação de MAGCIT-AM em células de câncer após tratamento com o nanocomplexo (0,78 µg/mL de AM, 6 horas)	70
Figura 24. Internalização de MAGCIT-AM em células normais e tumorais.....	71
Figura 25. Proliferação celular da linhagem MDA-MB-231 por CFSE após tratamento com MAGCIT-AM (48 horas)	72
Figura 26. Ensaio de fragmentação nuclear em células tumorais.	73
Figura 27. Ensaio de biogênese de corpúsculo lipídico em células tumorais.....	74
Figura 28. Análise da alteração do potencial transmembranar mitocondrial ($\Delta\Psi$ M) em células tumorais.....	75
Figura 29. Análise da alteração do potencial transmembranar mitocondrial ($\Delta\Psi$ M) em células tumorais por microscopia confocal.....	76
Figura 30. Análise da alteração morfológica das células tumorais (A2780, T-47D e MDA-MB-231) após coloração com panótico rápido.....	78
Figura 31. Análise de <i>Wound Healing</i> nas linhagens tumorais.	79
Figura 32. Análise quantitativa da migração celular pelo ensaio de <i>Wound Healing</i>	80
Figura 33. Avaliação do estresse oxidativo e perfil antioxidante na linhagem T-47D após o tratamento com MAGCIT-AM.....	81
Figura 34. Avaliação do estresse oxidativo e perfil antioxidante na linhagem A2780 após o tratamento com MAGCIT-AM.....	82
Figura 35. Avaliação do estresse oxidativo e perfil antioxidante na linhagem MDA-MB-231 após o tratamento com MAGCIT-AM.....	83
Figura 36. Porcentagem de identificação das populações de monócitos e células dendríticas em diferentes painéis de marcação.....	85
Figura 37. Quantificação das populações monocíticas e das células dendríticas em PBMCs tratadas com o lisado tumoral.....	86
Figura 38. Perfil de ativação das células dendríticas mieloides após exposição à diferentes estímulos.....	87
Figura 39. Perfil de ativação das células dendríticas plasmocitoides após exposição à diferentes estímulos.....	88
Figura 40. Avaliação da viabilidade celular por alamarBlue™ das linhagem 4T1 e NIH/3T3 após 24, 48 e 72 horas de tratamento com MAGCIT-AM.....	90
Figura 41. Avaliação da viabilidade celular por alamarBlue™ das linhagem 4T1 e NIH/3T3 após 24, 48 e 72 horas de tratamento com AM livre.....	92

Figura 42. Figura 42. Modelo proposto para a ação do nanossistema MAGCIT-AM em células tumorais.....	103
--	-----

Índice de Quadros

Quadro 1. Reagentes utilizados ao longo dos estudos.....	52
Quadro 2. Painéis montados para análise imunofenotípica por citometria de fluxo.....	63
Quadro 3. Painéis selecionados para seguirem no estudo.....	63
Quadro 4. Anticorpos utilizados durante o estudo.....	64

Índice de Tabelas

Tabela 1. Concentração inibitória de 50% de MAGCIT-AM nas linhagens 4T1 e NIH-3T3 nos tempos de 24, 48 e 72h.....	92
Tabela 12 Concentração inibitória de 50% de AM livre nas linhagens 4T1 e NIH-3T3 nos tempos de 24, 48 e 72h.....	92

Lista de abreviaturas e siglas

°C	Graus Celsius
$^1\text{O}_2$	Oxigênio Singleto
•OH-	Radical Hidroxila
4T1	Linhagem tumoral de mama murino
A2780	Linhagem de carcinoma de ovário
AA	Ácido araquidônico
AM	Azul de metileno
APC	Células Apresentadores de Antígenos
ATP	Adenosina Trifosfato
BCRJ	Banco de Células do Rio de Janeiro
BRCA1	Proteína do tipo 1 de susceptibilidade ao câncer de mama
BRCA2	Proteína do tipo 2 de susceptibilidade ao câncer de mama
CAT	Catalase
CaCl_2	Cloreto de cálcio
cCD	Células dendríticas convencionais
CD	Células Dendríticas
CEO	Câncer Epitelial de Ovário
CFSE	Diacetato de carboxifluoresce succinimidil ester
CL	Corpúsculo lipídico
CO_2	Dióxido de Carbono
DAMPS	Padrões moleculares associados ao dano
DH	Diâmetro hidrodinâmico
DMEM	<i>Dubelcco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EMA	União Europeia de Medicamentos
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
Fe	Ferro
Fe^{3+}	Íon Férrico
$\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$	Maghemita
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
Globocan	Global Cancer Observatory
GLS	Glutaminase

GM-CSF	Fator estimulador das colónias de granulócitos e macrófagos
GPX	Glutathione Peroxidase
GPX4	Glutathione Peroxidase 4
GSH	Glutathione
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
HER2	Receptor do fator de crescimento epidermal humano 2
HLA-DR	Complexo de histocompatibilidade
HNO ₃	Ácido Nítrico
IA	Imunidade Adaptativa
IAPs	Indutores de apoptose
IARC	International Agency for Research on Cancer
IC ₅₀	Concentração Inibitória de 50%
IFN	Interferon
II	Imunidade Inata
IL	Interleucina
INCA	Instituto Nacional do Câncer
L-15	<i>Leibowitz medium</i>
LOX	Lipogenases
LPS	Lipopolissacarídeo
L-ROS	Lipídeos peroxidados
MAGCIT	Nanopartícula composta por maghemita e citrato
MAGCIT-AM	Nanopartícula de maghemita associada a azul de metileno
mCDs	Células dendríticas plasmocitoides
MDA-MB-231	Linhagem celular de adenocarcinoma mamário
MDSCs	Células supressoras derivadas de mieloides
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MHC	Complexo de Histocompatibilidade
moCDs	Células dendríticas monocitoides
MφC	Monócitos Clássicos
MφI	Monócitos Intermediários
MφNC	Monócitos Não-Clássicos
Na	Sódio

NaOH	Hidróxido de sódio
NIH/3T3	Linhagem de fibroblasto murino
NK	Células natural <i>killer</i>
NPM	Nanopartículas Metálicas
NOF	Nanopartículas de Óxido de Ferro
O	Oxigênio molecular
PAMPS	Padrões moleculares associados a patógenos
PBS	Tampão Fosfato Salina (<i>Phosphate buffered saline</i>)
pCDs	Células dendríticas plasmocitoides
PdI	Índice de Polidispersão
PI	Iodeto de Propídio (<i>propidium Iodide</i>)
PMBC	Células Mononucleadas do Sangue Periférico
PUFAS	Ácidos graxos poli-insaturados
PZ	Potencial Zeta
RA	Resposta Adaptativa
RE	Receptor de estrógeno
RP	Receptor de progesterona
RPMI-1640	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
SFB	Soro Fetal Bovino
SI	Sistema Imune
SII	Sistema Imune Inato
SIA	Sistema Imune adaptativo
SOD	Superóxido dismutase
T-47D	Linhagem celular de carcinoma ductal mamário
TAM	Macrófagos associados ao tumor
THP-1	Linhagem celular de monócito isolado de sangue periférico
TNBC	Câncer de mama triplo-negativo
WHO	<i>World Health Organization</i>

Sumário

1.	<i>Introdução</i>	19
1.1	Câncer	19
1.1.1	Câncer de mama	23
1.1.2	Câncer de Ovário	25
1.2	Terapias antineoplásicas	27
1.2.1	Nanopartículas Metálicas	28
1.2.2	Azul de Metileno	29
1.3	Nanobiotecnologia e Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)	30
1.4	Morte Celular	32
1.4.1	Ferroptose	35
1.5	O papel da Imunidade Inata no câncer	38
1.5.1	Células Dendríticas e Câncer	42
1.5.2	Os monócitos e seu envolvimento com as neoplasias	46
2.	<i>Justificativa</i>	50
3.	<i>Objetivos</i>	51
3.1	Objetivo geral	51
3.2	Objetivos específicos	51
4.	<i>Materiais e Métodos</i>	52
4.1	Reagentes	52
4.2	Síntese e caracterização do nanossistema	53
4.2.1	Nanopartículas de maghemita associadas ao azul de metileno (MAGCIT-AM). 53	
4.3	Modelos celulares e condições de cultura	53
4.3.1	Manutenção das linhagens celulares.....	53
4.4	Avaliação dos efeitos antitumorais do nanossistema	54
4.4.1	Avaliação da viabilidade celular de linhagens normais e tumorais murinas pós- tratamento com MAGCIT-AM.	54
4.4.2	Análise da proliferação celular tumoral de MDA-MB-231 após tratamento com MAGCIT-AM	54
4.4.3	Análise da internalização de MAGCIT-AM pelas células tumorais por meio de microscopia eletrônica de transmissão	55
4.4.4	Biogênese de corpúsculo lipídico em células tumorais	55
4.4.5	Análise do potencial transmembranar mitocondrial	56
4.4.6	Análise da fragmentação nuclear.....	56
4.4.7	Análise da migração de células tumorais após tratamento com MAGCIT-AM.	57
4.4.8	Análise da modulação do sistema antioxidante	57
4.4.8.1	Quantificação de proteínas com Bradford	57
4.4.8.2	Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio pós-tratamento com MAGCIT-AM.....	57

4.4.8.3	Ensaio de mensuração da atividade da superóxido dismutase.....	58
4.4.8.4	Estudo da atividade da enzima catalase	58
4.4.8.5	Quantificação dos níveis de glutathione	59
4.4.8.6	Quantificação de lipídeos peroxidados (TBARS) em células tumorais humanas	59
4.4.9	Análise da morfologia celular tumoral pós-tratamento por meio de microscópio de luz.	59
4.5	Avaliação do impacto imunológico.....	60
4.5.1	População de estudo e Aspectos Éticos	60
4.5.2	Obtenção das células mononucleares do sangue periférico (PBMC).....	60
4.5.3	Estudo da maturação de células dendríticas e perfil monocítico.....	61
4.5.4	Imunofenotipagem por citometria de fluxo	62
4.6	Análise estatística	68
5.	Resultados	69
5.1	Avaliação da internalização de MAGCIT-AM por MET e citometria de fluxo	69
5.2	Alteração da proliferação celular na linhagem MDA-MB-231	72
5.3	Fragmentação nuclear	73
5.4	Biogênese de corpúsculo lipídico	74
5.5	Análise da polarização mitocondrial.....	74
5.6	Alteração morfológica das células tumorais pós-tratamento com MAGCIT-AM	77
5.7	Migração celular: Wound Healing.....	78
5.8	Perfil bioquímico e avaliação do estresse oxidativo nas linhagens celulares.....	80
5.8.1	T-47D.....	80
5.8.2	A2780	82
5.8.3	MDA-MB-231	83
5.9	Análise da maturação das células dendríticas e do perfil monocitário.....	84
5.10	Análise da citotoxicidade de MAGCIT-AM em linhagens tumorais e normais murinas.	89
6.	Discussão.....	93
7.	Conclusão.....	101
8.	Perspectivas.....	104
9.	Referências Bibliográficas	105
10.	Apêndice.....	120

1. Introdução

1.1 Câncer

O câncer, um conjunto heterogêneo de doenças caracterizado principalmente pelo crescimento celular descontrolado e potencial de invasão, é considerado um dos principais problemas sociais, econômicos e de saúde pública do século XXI (Bray et al., 2024; Li et al., 2024; Siegel et al., 2024). Segundo dados da World Health Organization (WHO), as neoplasias foram responsáveis por uma a cada seis mortes globais no ano de 2021, contribuindo significativamente com o aumento dos índices de mortalidade no mundo (Bray et al., 2024).

As estimativas do Global Cancer Observatory (Globocan), produzidas pela International Agency for Research on Cancer (IARC), apontam que, em 2022, ocorreram 19,9 milhões de casos novos de câncer no mundo, incluindo o câncer de pele não melanoma (Globocan, 2022). Atualmente, o câncer representa a terceira principal causa de óbito entre pessoas de 30 a 69 anos em 177 dos 183 países, e se observa a ocorrência dessa doença em um a cada cinco indivíduos durante a sua vida (Ferlay et al., 2021; Bray et al., 2024). O impacto do câncer a nível global tem ganhado relevância no último século, tendo em vista que demonstra ser uma barreira para o aumento da expectativa de vida atual, além dos elevados custos sociais e econômicos (Daroudi et al., 2020; Alzehr et al., 2022; Chen et al., 2023).

Para o ano de 2020, segundo as estimativas do Globocan, observa-se um elevado número de mortes ocasionados pelas neoplasias, correspondendo a 9,7 milhões de óbitos desencadeados por essa doença (Figura 1).

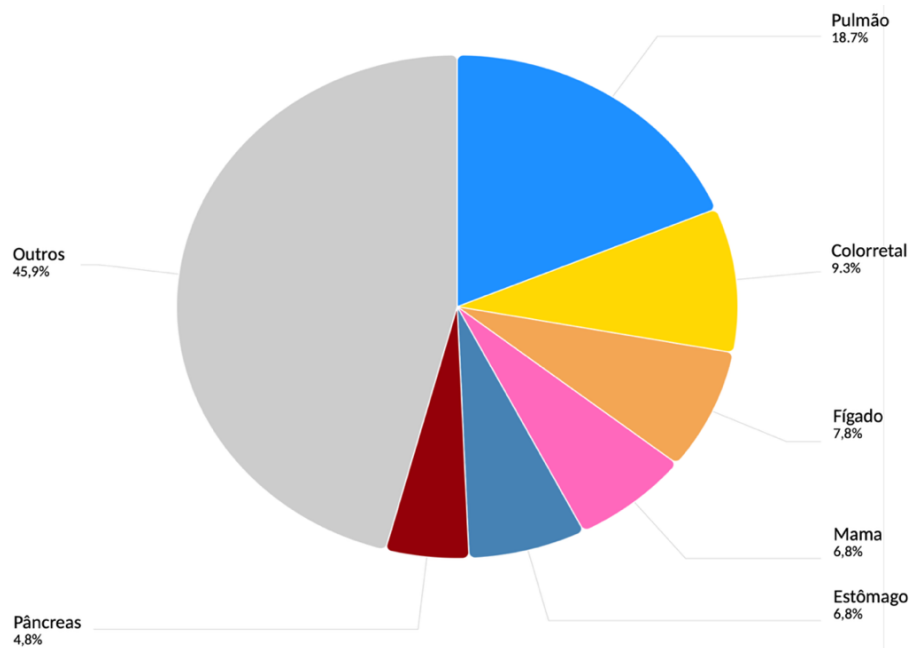


Figura 1. Número de mortes ocasionados pelo câncer no ano de 2022. Número total de óbitos pelas neoplasias em 2022. Dados correspondentes a todos os sexos e idades. (Fonte: Adaptada de Globocan, 2022). Criado em: <https://BioRender.com>.

No Brasil, para o triênio de 2023-2025, são estimados a ocorrência de 483 mil novos casos de câncer, excluindo os casos de pele não-melanoma (Figura 2) (INCA, 2023).

Localização Primária	Casos	%	Homens	Mulheres	Localização Primária	Casos	%
Próstata	71.730	30,0%			Mama feminina	73.610	30,1%
Cólon e reto	21.970	9,2%			Cólon e reto	23.660	9,7%
Traqueia, brônquio e pulmão	18.020	7,5%			Colo do útero	17.010	7,0%
Estômago	13.340	5,6%			Traqueia, brônquio e pulmão	14.540	6,0%
Cavidade oral	10.900	4,6%			Glândula tireoide	14.160	5,8%
Esôfago	8.200	3,4%			Estômago	8.140	3,3%
Bexiga	7.870	3,3%			Corpo do útero	7.840	3,2%
Laringe	6.570	2,7%			Ovário	7.310	3,0%
Linfoma não Hodgkin	6.420	2,7%			Pâncreas	5.690	2,3%
Fígado	6.390	2,7%			Linfoma não Hodgkin	5.620	2,3%

*Números arredondados para múltiplos de 10.

Figura 2. Estimativas para o ano de 2023 das taxas brutas de incidência por 100 mil habitantes e do número de novos casos de câncer segundo sexo e localização primária. (Fonte: INCA, 2023).

O desenvolvimento da massa tumoral é um resultado da correlação entre os fatores genéticos e agentes externos biológicos, químico ou físicos que podem iniciar ou promover o processo de carcinogênese (Hanahan & Weinberg, 2011; Martínez-Reyes & Chandel, 2021; Hanahan, 2022; Seferbekova et al., 2023). Estudos atuais relacionam o aumento da incidência

dessa doença juntamente com a idade avançada, tendo em vista o acúmulo de tempo de exposição aos fatores de risco juntamente com a tendência natural da perda na eficiência dos mecanismos de manutenção e reparo das funções celulares (Kruk et al., 2019; Takeshima & Ushijima, 2019; Stead & Bjedov, 2021; Zhang & Bozic, 2024). Além do envelhecimento, a alteração no comportamento e no ambiente, como por exemplo, o sedentarismo, a dieta e a exposição a poluentes, contribuem positivamente no aumento da incidência e da mortalidade por câncer (Kerr et al., 2017; Chiodi & Mondello, 2020; Wild et al., 2020; Hermelink et al., 2022; Byrne et al., 2023).

O processo de carcinogênese é iniciado por meio de uma sequência de eventos mutacionais que levam a duas principais características celulares, a proliferação descontrolada e a imortalidade celular. Hanahan, 2022, descreve que para o desenvolvimento e o estabelecimento da massa tumoral, são necessárias inúmeras alterações a nível sistêmico e celular, dentre elas a evasão ao sistema imunológico, a promoção da inflamação no ambiente tumoral, a imortalidade celular, a capacidade de invasão, a indução da angiogênese, a instabilidade genômica, a resistência a morte celular, a desregulação do metabolismo energético, a sinalização proliferativa, a evasão aos supressores de crescimento tumoral, a reprogramação epigenética, a microbiota polimórfica, a senescência celular e, por fim, a plasticidade fenotípica (Figura 3) (Hanahan & Weinberg, 2011; Hanahan, 2022).

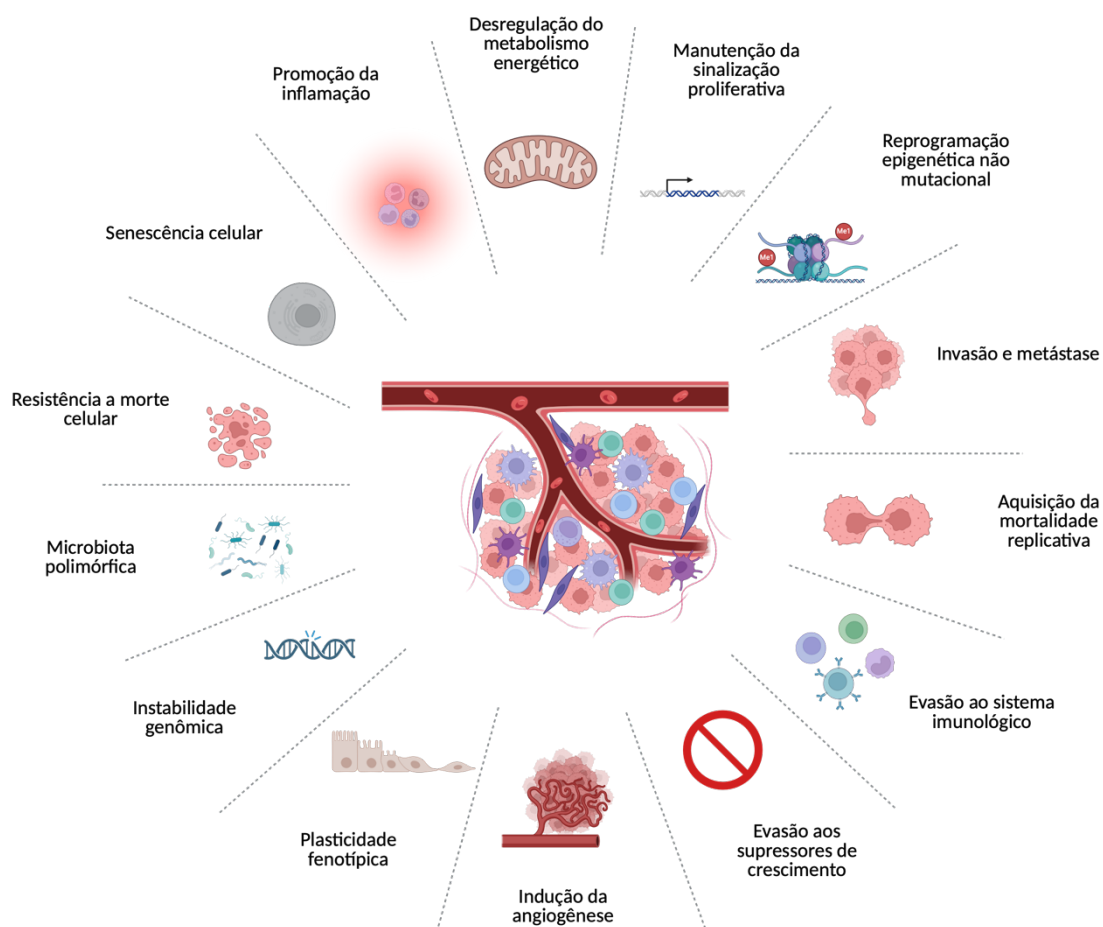


Figura 3. Características para o desenvolvimento de uma neoplasia. Principais fatores relacionados com a progressão do câncer como, evasão ao sistema imune, promoção da inflamação, imortalidade celular, capacidade de invasão, indução da angiogênese, instabilidade genômica, resistência a morte celular, desregulação do metabolismo energético, sinalização proliferativa, evasão aos supressores de crescimento celular, reprogramação epigenética, microbiota polimórfica, senescência celular e plasticidade fenotípica. (Fonte: Hanahan, 2022).

A metástase e o processo de angiogênese estão diretamente correlacionados com o aumento do número de mortes de pacientes acometidos por essa doença, tendo em vista que, uma vez disseminada pelo corpo e, estabelecida uma rede de fonte de nutrientes e de gases, essa célula neoplásica pode colonizar e comprometer a homeostase funcional dos órgãos podendo, assim, levar o paciente ao óbito (Fares et al., 2020; Ji et al., 2020; Peng et al., 2023; Han et al., 2024). O câncer é considerado uma doença silenciosa podendo permanecer assintomático durante longos períodos até se tornar detectável (Weimberg, 2014). O diagnóstico precoce,

juntamente com a melhor escolha terapêutica tem-se mostrado um fator fundamental para o sucesso do tratamento e o aumento da sobrevida do paciente (WHO, 2018).

1.1.1 Câncer de mama

O adenocarcinoma mamário é a segunda causa global de incidência de câncer, com 11,5% do total de casos. No ano de 2022, foram documentados 2,2 milhões de novos casos, correspondendo a 23,8% de todos os cânceres em mulheres, excluindo pele não melanoma, e cerca de 666 mil dessas pacientes vieram a óbito (Globocan, 2020). Para o Brasil, foram estimados cerca de 76.610 mil novos casos para o triênio de 2023 a 2025 (INCA, 2023). Estudo recente demonstra o impacto do câncer de mama nos índices de mortalidade de pacientes do sexo feminino, evidenciando o impacto social e familiar ocasionado por essa neoplasia, tendo em vista que aproximadamente um milhão de crianças se tornaram órfãs em 2020, sendo 25% ocasionadas por óbitos provenientes de câncer de mama (Figura 4) (Guida et al., 2022).

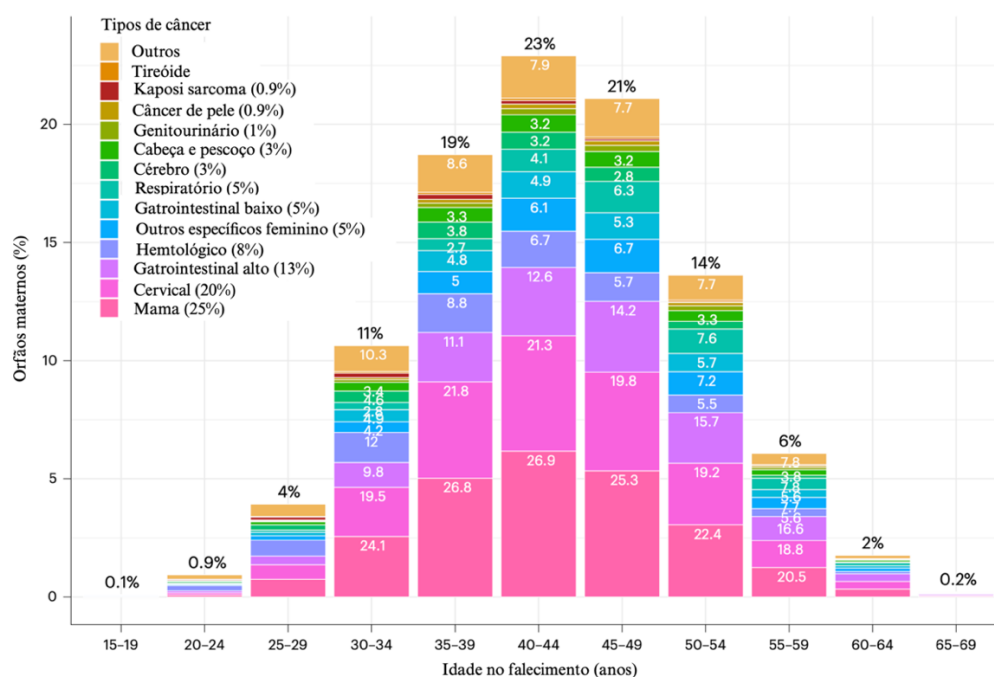


Figura 4. Distribuição percentual de órfãos maternos consequente da morte ocasionada por câncer pela idade da mãe no momento do falecimento. Percentual de crianças órfãs categorizadas por tipo de câncer (cores) e faixa etária da mãe no momento do falecimento. (Fonte: Adaptada de Guida et al., 2022).

Segundo dados do INCA, a taxa de mortalidade por câncer de mama, ajustada pela população mundial, foi de 12,58 óbitos a cada 100.000 mil mulheres em 2023 (INCA, 2023) (Figura 5). O monitoramento da presença dessa neoplasia ocorre principalmente com os exames

periódicos de toque e de mamografia (He et al., 2020; Obeagu & Obeagu, 2024; Wen et al., 2024). Assim como os demais tipos de câncer, o diagnóstico precoce do câncer de mama interfere significativamente em um bom prognóstico da doença (INCA, 2023).

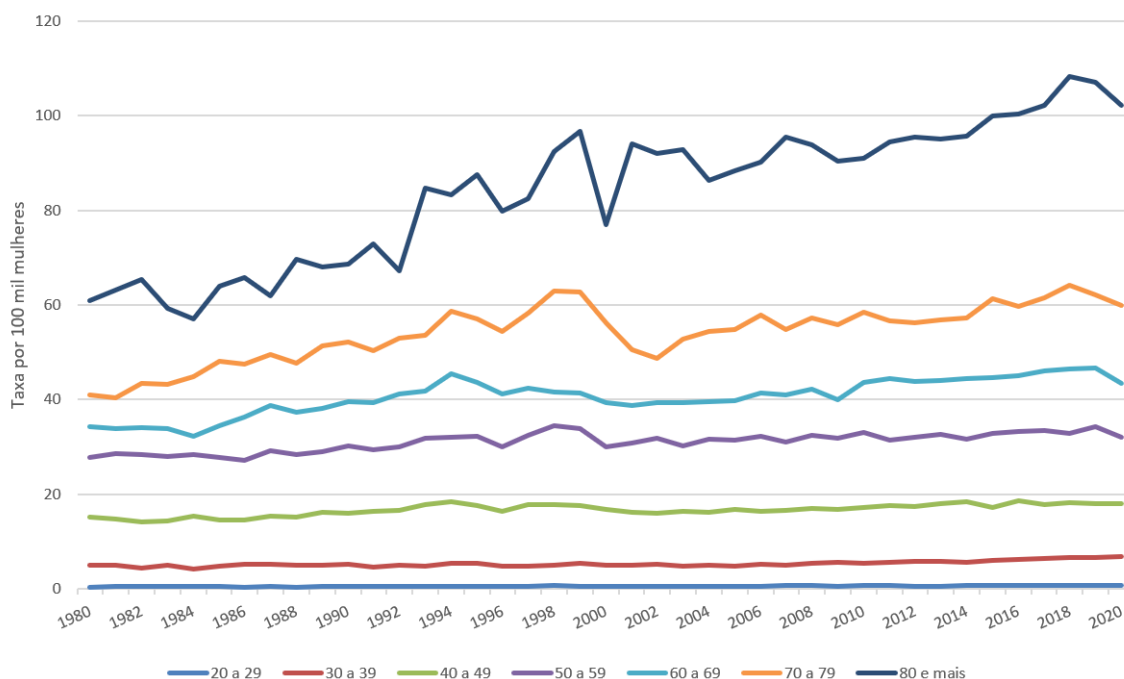


Figura 5. Taxa de mortalidade do câncer de mama, por 100.000 mulheres no Brasil entre os anos de 1980 a 2020. A figura retrata dados do Brasil onde a taxa de pacientes que vêm a óbito oriundo das complicações ocasionadas pelo câncer de mama aumenta ao longo da idade da paciente. (Fonte: INCA, 2022).

Nos últimos anos, foram sugeridas para esse tipo de câncer, cinco classificações moleculares, baseadas na técnica de *microarray* e imuno-histoquímica, dentre elas estão o luminal A, luminal B, HER2 e triplo negativo (Harbeck et al., 2019; Dass et al., 2021a; Popa et al., 2025). O subtipo luminal A (cerca de 40%-50% dos cânceres de mama totais) é caracterizado pela alta expressão de receptores hormonais, especificamente os de estrógeno (RE) e progesterona (RP), baixa proliferação celular ($Ki-67 < 15\%$) e ausência na amplificação de receptores HER2. O luminal B, correspondente a 20%-30% dos casos, é mais agressivo quando comparado ao luminal A e possui expressões variadas dos receptores hormonais, além de alta proliferação celular ($Ki-67$ entre 15%-20%). Esse subtipo apresenta amplificação variada de HER2 (Popa et al., 2025).

O câncer HER2+ e o triplo negativo (TN), 15%-20% e 15% dos casos, respectivamente, são aqueles que contribuem com o maior índice de mortalidade. O primeiro se caracteriza pela ausência de receptores hormonais (RE/PR negativos) associada a super expressão da proteína HER2, a qual está diretamente correlacionada com a sinalização da proliferação celular via PI3K/AKT/mTOR e RAS/MAPK, especialmente. Por fim, o TN, que está frequentemente associado a mutações em BRCA1/2 é caracterizado pela ausência dos receptores hormonais e da amplificação de HER2 juntamente com altos índices de proliferação celular, o tornando o mais agressivo e com altas taxas de metástase pulmonar e cerebral (Waks & Winer, 2019; Yin et al., 2020; Dass et al., 2021b; Popa et al., 2025).

1.1.2 Câncer de Ovário

O câncer de ovário é a segunda neoplasia ginecológica mais comum, ficando atrás apenas do câncer do colo de útero. Mundialmente, ele é o oitavo mais incidente entre as mulheres, correspondendo a 3,3% de todos os cânceres femininos (304.603 novos casos no ano de 2022) (WHO, 2022; Pragathi et al., 2023; INCA, 2023; Webb & Jordan, 2024). Apesar da sua baixa incidência, comparado com os demais cânceres que acometem as mulheres, essa neoplasia tem ganhado destaque devido à sua alta letalidade (Figura 6). Com a taxa de mortalidade aproximada de 63%, é considerada a neoplasia ginecológica mais letal, cenário agravado devido seus desafios nas estratégias de diagnóstico e prevenção assim como nas abordagens terapêuticas atualmente disponíveis (Bajwa et al., 2025). Para o Brasil são esperados cerca de 7.310 mil novos casos para o triênio de 2023-2025 (INCA, 2023).

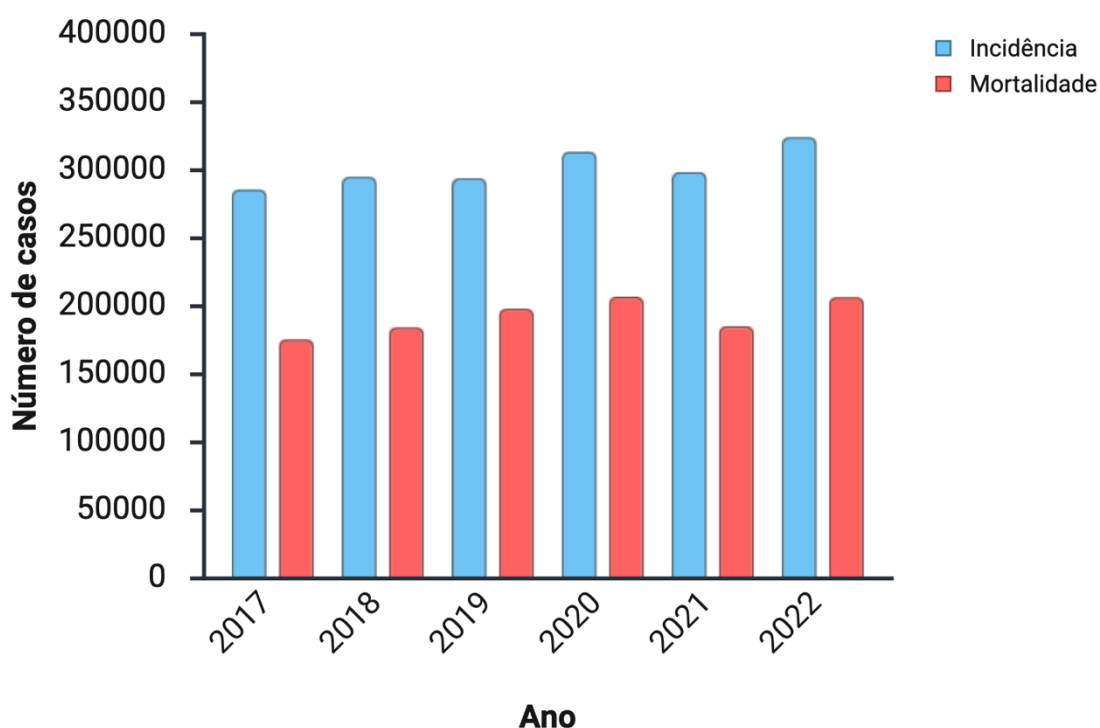


Figura 6. Taxa de incidência e mortalidade para o câncer de ovário em mulheres.

Dados brutos referentes à incidência e à mortalidade mundiais atribuídas ao câncer de ovário no ano de 2022. Observa-se que, apesar da sua menor incidência relativa entre os cânceres ginecológicos, o câncer de ovário é responsável por uma alta taxa de mortalidade, cerca de 63% das mulheres diagnosticadas. (Fonte: Elaborado pela autora (2025)). Criado em: <https://BioRender.com>.

Quase a totalidade das neoplasias ovarianas é derivada das células epiteliais que revestem o ovário (95%), o restante provém de células germinativas e de células estromais, as quais estão diretamente associadas a produção de hormônios (5%) (Köbel & Kang, 2022; Zamwar & Anjankar, 2022; Hollis & van Gent, 2024). O câncer epitelial de ovário corresponde a 4,3% das mortes em mulheres por câncer, ocasionando cerca de 140.000 mortes por ano (Sambasivan, 2022). Ele pode ser subdividido em cinco principais tipos correspondente aos seus graus histológicos sendo eles, carcinomas serosos de alto grau (70%), endometriais (10%), células claras (10%), carcinomas serosos de baixo grau (<5%) e mucinosas (3%) (Stewart et al., 2019; Köbel & Kang, 2022; Zhang et al., 2022). O carcinoma seroso de alto grau é o subtipo mais letal, caracterizado pela instabilidade genômica e a sua baixa taxa de sobrevida, de aproximadamente 5 anos (Sambasivan, 2022).

Fatores genéticos, como histórico familiar e mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2* estão intimamente correlacionados com a ocorrência dessa doença, assim como a menopausa tardia,

a menarca precoce, a endometriose e a nuliparidade. Um fator importante que vem sendo associado à alta mortalidade observada no câncer epitelial de ovário (CEO), é a ocorrência de metaplasia, capacidade das células se modificarem adquirindo características histológicas de outros tipos de tecidos provenientes da mesma linhagem germinativa (Zheng et al., 2018; Ferris et al., 2023).

Outro fator importante a ser considerado quando se trata desse tipo de neoplasia, é a resistência aos quimioterápicos juntamente com o diagnóstico tardio pela falta de sintomas em estágios iniciais. Estima-se que aproximadamente 70% das pacientes sejam diagnosticadas em estágios avançados da doença, fato que contribui para uma taxa de sobrevida global em 5 anos inferior a 50% (Asangba et al., 2023; Tavares et al., 2024). Além disso, embora a grande porcentagem das pacientes apresentem respostas iniciais ao tratamento, cerca de 80% desenvolvem resistência aos agentes quimioterápicos ao longo do tempo, incluindo alterações nos mecanismos de reparo de DNA, na captação e efluxo dos fármacos, na indução da autofagia e na evasão à apoptose (Tian et al., 2022; Beretta et al., 2024; Wang et al., 2024).

1.2 Terapias antineoplásicas

Anos de pesquisa forneceram diversas alternativas terapêuticas para o combate do câncer incluindo cirurgia, radioterapia, quimioterapia, terapia hormonal, terapia alvo e imunoterapia. Entretanto, essas técnicas podem não levar a erradicação completa das células tumorais e causar danos às células normais, portanto, apesar de promoverem um bom prognóstico ao paciente, apresentam inúmeros efeitos adversos e comprometimento da saúde e qualidade de vida dos mesmos (Goldberg, 2019; Mainini et al., 2021; Beg et al., 2021; Wang et al., 2024).

O tratamento de tumores sólidos adultos, em grande parte dos casos, se consiste inicialmente na realização da cirurgia para a ressecção total ou parcial desse tumor primário para que, posteriormente, se prossiga com as demais terapias, tendo em vista que a retirada cirúrgica é considerada uma terapia local, ou seja, efetiva apenas para tumores localizados, não metastáticos. Já as terapias sistêmicas, utilizadas para o tratamento de neoplasias que já passaram pelo processo de metástase, podem ser administradas de maneira pré-operatória, neoadjuvante, pós-operatória, adjuvante, ou de maneira combinada (Barzaman et al., 2020; Dass et al., 2021; Qu, 2023; Li et al., 2024).

A nanobiotecnologia, área que envolve a criação de materiais em escala nanométrica aplicados à biologia, tem se destacado pelo seu potencial no diagnóstico precoce e a entrega direcionada de fármacos (Goldberg, 2019; Sun et al., 2024; B. Wang et al., 2024). Os

nanocarreadores, normalmente na faixa de 1 a 100 nm, podem ser compostos por uma variedade de materiais e modificados visando a apresentação de características específicas, fornecendo, assim, novas possibilidades na inovação do diagnóstico e na terapia contra o câncer (Figura 10) (Lôbo et al., 2021; Hu et al., 2019; Liu et al., 2021; Chehelgerdi et al., 2023; Sun et al., 2024).

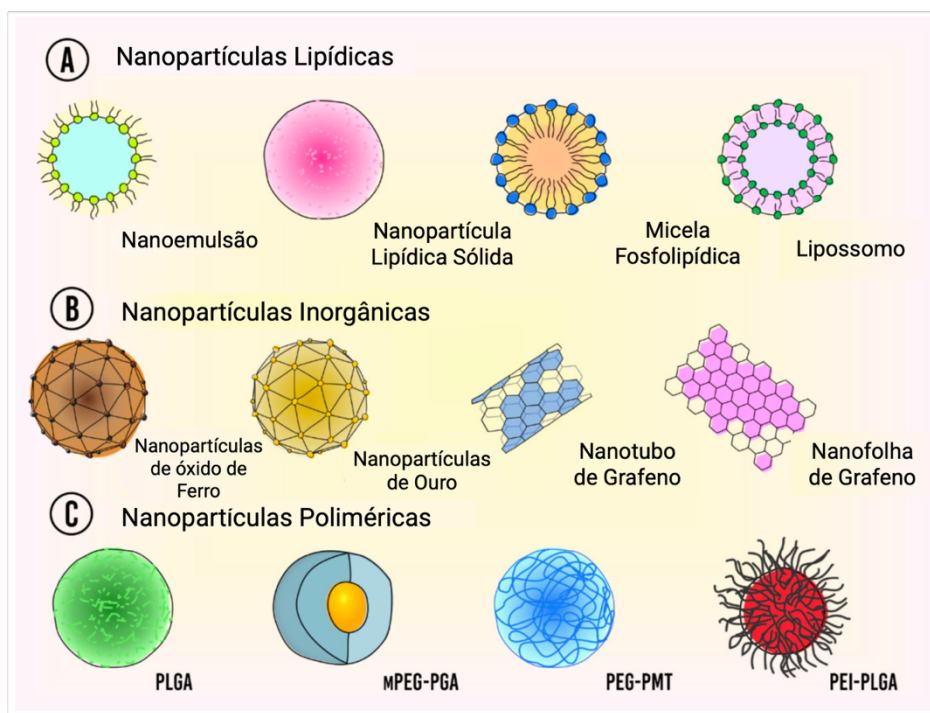


Figura 7. Tipos de nanoestruturas desenvolvidas para terapias antineoplásicas. (A) Nanopartículas lipídicas. (B) Nanopartículas inorgânicas. (C) Nanopartículas poliméricas (Fonte: Adaptada de Lôbo et al., 2021).

No contexto tumoral, as nanopartículas desempenham um papel crucial tanto no diagnóstico quanto na terapia de diversos tipos de neoplasias. Atualmente, essas nanoplateformas estão demonstrando um destaque no transporte de agentes terapêuticos diretamente para as células tumorais, minimizando, assim, os efeitos adversos e superando as limitações dos tratamentos convencionais, como a quimioterapia e a radioterapia (Gavas et al., 2021).

1.2.1 Nanopartículas Metálicas

Dentre os nanocarreadores que estão sendo desenvolvidos visando o tratamento de tumores, estão as nanopartículas metálicas (NPM), que podem ser constituídas de diferentes ferritas como ferro, manganês, zinco, cobalto, cobre, sendo as mais comuns compostas por

óxidos de ferro magnetita (Fe_3O_4) e maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) (Silva et al., 2021; Roshani et al., 2023; Lôbo et al., 2025). As nanopartículas de óxido de ferro (NOF) têm demonstrado um grande impacto no diagnóstico e na terapia de tumores, tendo em vista o superparagnetismo intrínseco, associado à química de superfície acessível e à baixa citotoxicidade (Canese et al., 2021; Korangath et al., 2024a).

Além de sua alta relação superfície/volume, um dos seus principais benefícios, as nanopartículas de óxido de ferro são capazes de atravessar as membranas das células tumorais e ficarem retidas no tecido neoplásico (Schneider et al., 2022; Shestovskaya et al., 2023; Korangath et al., 2024b). Sua biocompatibilidade e sua capacidade de biodegradação, devido ao ferro ser utilizado em inúmeros processos celulares e encontrados abundantemente no corpo humano, tornam as NOFs plataformas que não apresentam preocupações de toxicidade a longo prazo decorrentes dos seus subprodutos provenientes de sua degradação, uma vantagem perante as demais nanopartículas inorgânicas (Chung et al., 2021; Soomro et al., 2025).

1.2.2 Azul de Metileno

O azul de metileno (AM), um corante histológico fenotiazínico, possui como uma das suas principais características o seu alto poder de absorção da banda larga da luz vermelha (550 – 700 nm) e sua alta eficiência fotodinâmica. Um agente já aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) e pela União Europeia de medicamentos (EMA) para a administração oral e intravenosa no tratamento de metahemoglobinemia e que tem sido amplamente implementado em mecanismos de foto-oxidação de moléculas por meio de duas vias fotoquímicas (Grande et al., 2022; da Veiga Moreira, et al., 2024; da Veiga Moreira, et al., 2024).

Devido seu anel benzênico e sua hidrofilicidade, esse agente demonstra uma excelente penetração nas membranas celulares além de demonstrar um acúmulo seletivo em células cancerígenas, fatores que contribuem na sua eficácia para o tratamento oncológico (Taldaev et al., 2023). Em concentrações elevadas, as moléculas de AM passam a funcionar como agentes redutores e, seus radicais semi-reduzidos, podem comportar-se como superóxidos levando a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Mohseni et al., 2022).

Diversos estudos vêm demonstrando a importância do azul de metileno no tratamento de diversos tipos de câncer, incluindo colorretal, mama, melanoma, entre outros. Observa-se que as reações ocasionadas pela excitação de AM, causam diversos danos a biomoléculas contribuindo, assim, com a morte de células tumorais (da Veiga Moreira, Nleme, et al., 2024; Grande et al., 2022; Mohseni et al., 2022). Sua capacidade na ativação da via do fator nuclear

kappa B (NF- κ B) e na promoção da liberação de citocinas pró-inflamatórias, sugere um papel fundamental na estimulação da resposta imune (Bachurin et al., 2022).

Apesar de todas as suas qualidades, um dos principais obstáculos para a sua aplicação no ramo biomédico é a preparação de formulações farmacêuticas que conservem a sua eficiência terapêutica, fato que pode ser revertido por meio de sua funcionalização em nanossistemas (dos Santos et al., 2018; Silva et al., 2021; Hernandez et al., 2022).

1.3 Nanobiotecnologia e Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)

Um assunto que vem ganhando foco e sendo amplamente explorado da área de nanobiotecnologia voltada para o tratamento do câncer, é o potencial na produção de espécies reativas de oxigênio (Rodrigues et al., 2022). As EROs, um grupo de moléculas altamente reativas, compõem uma característica intrínseca do metabolismo aeróbico, sendo produzida constantemente a partir da respiração mitocondrial (Sarmiento-Salinas et al., 2021a). Apesar de estarem correlacionadas com a manutenção da homeostase redox, elas podem induzir danos a diversas biomoléculas quando produzidas em larga escala. Sua forma mais reativa e danosa é o oxigênio singlete (1O_2), uma forma excitada que não possui elétrons desemparelhados em sua última camada (Perillo et al., 2020; Nakamura & Takada, 2021).

Atualmente, sabe-se que o estresse oxidativo exibe um papel de dualidade nas células neoplásicas, podendo promover ou interromper o processo de carcinogênese (Sarmiento-Salinas et al., 2021a). Pesquisas demonstram que o microambiente tumoral possui características que estão intimamente associadas para a progressão do tumor como, pH ácido, hipóxia, aumento das espécies reativas de oxigênio e regulação positiva dos sistemas antioxidantes (Hayes et al., 2020; Zhang et al., 2023). Diante desse quadro, observa-se que as EROs estão envolvidas na regulação de inúmeras vias de sinalização que controlam importantes processos biológicos como, migração, diferenciação, proliferação, apoptose e até mesmo a expressão gênica (Di Carlo & Sorrentino, 2024; Iqbal et al., 2024).

Ainda que se comprove um papel positivo na progressão tumoral, as espécies reativas de oxigênio, em níveis elevados, exercem efeitos danosos em biomoléculas como, lipídeos, proteínas e DNA, podendo levar a mutações genéticas, comprometimento de membrana, agregação de proteínas e até mesmo a senescência e morte celular (Figura 11) (Sarmiento-Salinas et al., 2021b; An et al., 2024). Com a finalidade de evitar os efeitos deletérios ocasionados pelas EROs, as células dispõem de sistemas antioxidantes naturais que atuam na neutralização desses radicais livres. O sistema antioxidante pode atuar por meio de moléculas orgânicas não enzimáticas ou por enzimas que convertem essas espécies reativas em substâncias

menos nocivas ao organismo. Entre as principais enzimas antioxidantes estão a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutatona peroxidase (GPX), que previnem e controlam a formação de radicais livres, reduzindo sua propagação e o consequente aumento dos danos oxidativos (Panieri et al., 2020; Arfin et al., 2021). Já os antioxidantes não enzimáticos incluem compostos de origem dietética, como vitaminas, minerais e compostos fenólicos, que desempenham um papel crucial na neutralização dos radicais livres, como a glutatona, que atuam como cofatores de enzimas antioxidantes, fortalecendo o sistema de defesa contra o estresse oxidativo (Jomova et al., 2024).

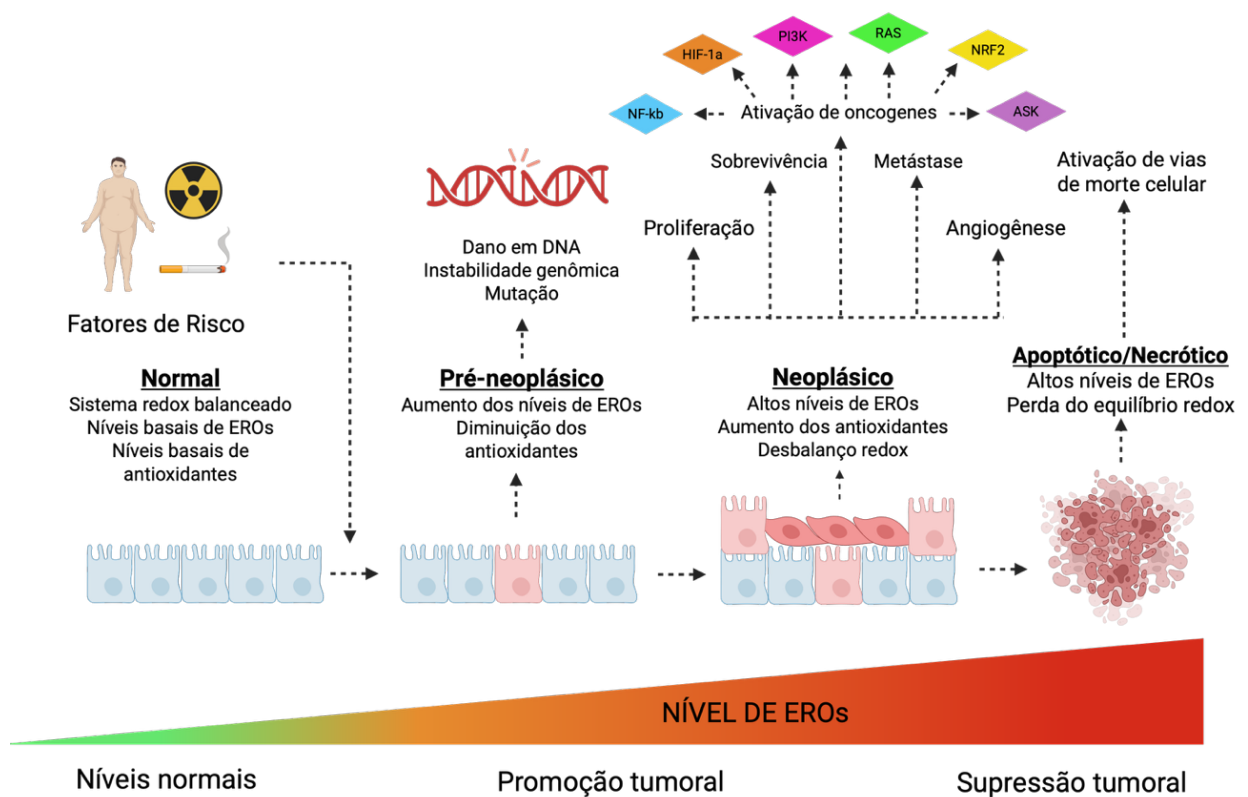


Figura 8. Geração de espécies reativas de oxigênio e seus efeitos no câncer. As espécies reativas de oxigênio podem ser geradas por fatores endógenos e exógenos, os quais atuam de diversas maneiras na progressão ou inibição do crescimento tumoral. Baixos níveis de EROs atuam na transmissão de mensageiros secundários para a manutenção da homeostase celular. Níveis moderados estão intimamente associados com a progressão de neoplasias, tendo em vista que aumentam o metabolismo e ativam os oncogenes, além de regular negativamente a ação dos antioxidantes. Por sua vez, níveis altos levam a morte celular desencadeada por um desbalanço energético e dano ao DNA (Fonte: Sarmiento-Salinas et al., 2021b).

Explorando esse potencial encontrado nas espécies reativas de oxigênio, pode-se observar que elas exibem um grande potencial para a eficácia do tratamento do câncer, tendo em vista que podem ocasionar inúmeros eventos, levando à destruição das células tumorais por meio da indução de apoptose e/ou necrose celular, ao desligamento da vasculatura tumoral e à ativação do sistema imune, podendo assumir um papel imunoestimulatório ou imunossupressivo (Qi et al., 2019; Ju et al., 2024). Estudos atuais demonstram que a produção de oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), um dos estados eletronicamente excitados do oxigênio molecular, nos compartimentos das células tumorais induzem vias de transduções de sinais que participam do desenvolvimento da resposta imune baseada na ativação das células dendríticas (Vedunova et al., 2022; Redkin et al., 2023).

1.4 Morte Celular

A morte celular, um processo biológico fundamental para a manutenção da homeostase tecidual e para a eliminação de células geneticamente alteradas ou disfuncionais, é um mecanismo que vem sendo amplamente explorado no âmbito do desenvolvimento de terapias antineoplásicas, especialmente pela sua relevância no controle da proliferação celular descontrolada (Rothlin et al., 2021; Newton et al., 2024). Atualmente, inúmeros estudos têm aprofundado e elucidado o conhecimento acerca dos principais mecanismos moleculares que regem esse fenômeno, permitindo a caracterização de seus diferentes subtipos. De acordo com a *Nomenclature Committee on Cell Death (NCCD)*, a morte celular pode ser subdivida em duas principais categorias, a morte celular acidental (ACD) e a morte celular regulada (RCD). De modo geral, aquela que ocorre de forma súbita por meio de lesões químicas, físicas ou mecânicas, ou aquela de forma regulada, mediada por vias intracelulares específicas, respectivamente (Shen et al., 2023).

A apoptose, um dos tipos mais bem caracterizado de morte celular, é um processo regulado e mediado por uma cascata altamente organizada de eventos moleculares que culmina na ativação de enzimas proteolíticas, denominadas caspases (Hollville & Martin, 2016; Moyer et al., 2025). Esse processo pode ser iniciado a partir de mecanismos intrínsecos, via mitocondrial, ou por mecanismos extrínsecos, via receptores de morte, como Fas e TNF-R. Morfológicamente, é caracterizada pela condensação de cromatina, redução do tamanho celular, fragmentação nuclear e, por fim, formação de corpos apoptóticos que serão rapidamente fagocitados por células vizinhas ou por fagócitos, evitando a liberação do conteúdo intracelular e, conseqüentemente, minimizando a inflamação (Mustafa et al., 2024).

Ao contrário do que se acreditava anteriormente, estudos recentes indicam que a apoptose e a ausência da inflamação nem sempre andam juntas. Em contextos específicos, como sob estresse celular intenso, dano persistente ou terapias antitumorais, os corpos apoptóticos podem liberar sinais conhecidos como padrões moleculares associados ao dano (DAMPs), incluindo ATP extracelular, HMGB1, DNA citoplasmático e calreticulina na superfície celular, que atuam ativando células do sistema imune, como células dendríticas e linfócitos T citotóxicos. Essa modalidade é denominada apoptose imunogênica, sendo relevante para a indução de respostas imunes adaptativas, especialmente no microambiente tumoral (Galluzzi et al., 2016; Galluzzi et al., 2018; Park et al., 2023).

Por sua vez, a morte celular accidental que exibe uma morfologia necrótica representa uma forma bem estabelecida de morte celular associada a lesões irreversíveis e colapso energético celular. Diferentemente da apoptose, esse tipo de morte é desencadeado por lesões químicas ou físicas intensas como, hipóxia, trauma mecânico, excesso de calor ou exposição prolongada a toxinas. Do ponto de vista morfológico, diferentemente da RCD, é caracterizada pela perda da integridade da membrana plasmática, liberação do conteúdo intracelular no espaço extracelular e indução de resposta inflamatória intensa (Newton et al., 2024). Contudo, de acordo com a NCCD são observadas formas de necrose reguladas, como a necroptose, ferroptose e piroptose, que ocorrem via vias moleculares específicas e podem ser moduladas por mecanismos intracelulares. Essas modalidades apresentam características morfológicas semelhantes à necrose clássica, mas envolvem proteínas sinalizadoras específicas e podem induzir inflamação de maneira controlada, desempenhando papéis fisiológicos e patológicos na defesa contra patógenos, na remodelação tecidual e no microambiente tumoral (Galluzzi et al., 2018; Galluzzi et al., 2016).

No contexto do processo de carcinogênese, a regulação da morte celular desempenha um papel de dualidade, podendo favorecer ou não a progressão tumoral (Peng et al., 2022; Hänggi & Ruffell, 2023; J. Qian et al., 2024; Dalseno et al., 2025). A apoptose, atua como um importante obstáculo durante a transformação de células neoplásicas. Células que adquirem instabilidade genômica e apresentam alterações metabólicas são normalmente direcionadas a esse tipo de morte celular impedindo, assim, que o erro perpetue. Entretanto, a maior possibilidade de controle dessa via, também possibilitou que muitos tumores desenvolvam mecanismos de evasão da mesma, por meio de mutações em genes supressores tumorais, como o TP53, ou pela up-regulação de proteínas antiapoptóticas, como a BCL-2 (Figura 7) (Ciccarese, 2022; Baldassarre et al., 2025).

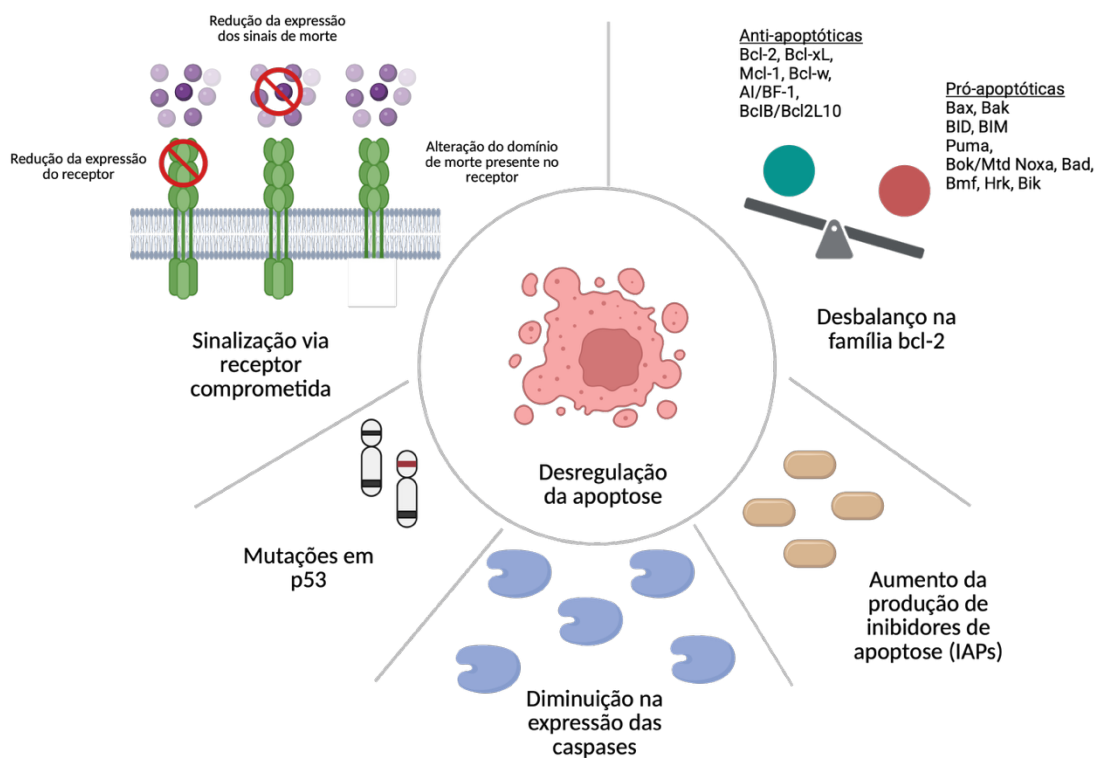


Figura 9. Mecanismos de inibição da apoptose em células tumorais. Células neoplásicas desenvolvem mecanismos de resistência à apoptose, incluindo o desbalanço das proteínas pró-apoptóticas vs anti-apoptóticas, mutações em genes da proteína TP53, inativação de caspases e de receptores de morte e aumento da síntese dos IAPs, fatores que atuam na evasão a morte celular programada contribuindo com a progressão tumoral. (Fonte: Adaptado de Wong, 2011).

Por outro lado, a necrose, ao promover a liberação de conteúdo intracelular e a ativação de resposta inflamatória, pode contribuir para a criação de um microambiente tumoral permissivo, rico em citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento, moléculas que favorecem a proliferação, angiogênese e evasão imunológica, desta forma, a presença de áreas extensas de necrose em inúmeros tumores sólidos se torna frequente (Karsch-Bluman et al., 2019; Chen et al., 2023; Yamamoto et al., 2023). Apesar da inflamação induzida pelas mortes celulares associadas ao rompimento de membrana desempenhar um papel benéfico para o desenvolvimento de neoplasias, dependendo de sua intensidade, duração e composição celular/molecular do infiltrado, esse processo pode desempenhar um papel importante para o reconhecimento e a eliminação das células tumorais pelo sistema imunológico (Lillo & Saleh, 2022). A liberação de conteúdos intracelulares e padrões moleculares associados ao dano

(PMADs), pode levar a ativação de células apresentadoras de antígenos, como macrófagos e células dendríticas, favorecendo, assim, a ativação de respostas imunes adaptativas antitumorais (Hänggi & Ruffell, 2023). Além da atividade celular, a liberação de citocinas pró-inflamatórias como IL1- β , TNF- α e IFN- γ , pode gerar um microambiente citotóxico, inibindo temporariamente a proliferação de células neoplásicas (Han et al., 2023; Zhang et al., 2023).

Nesse contexto, com o avanço das técnicas de biologia molecular e celular, juntamente com a oncologia, identificou-se e caracterizou-se outras modalidades de morte celular regulada, destacando-se a necroptose, a ferroptose, a piroptose e a autofagia (Tong et al., 2022; Shen et al., 2023; Newton et al., 2024).

1.4.1 Ferroptose

Estudos recentes vêm demonstrando uma crescente necessidade da indução de mecanismos alternativos que promovam a extinção de células neoplásicas visando pacientes portadores de tumores resistentes aos demais tipos de morte celular, como apoptose, necrose e autofagia (Tong et al., 2022). Diante da crescente resistência aos quimioterápicos utilizados atualmente na clínica, a ferroptose, um tipo de morte celular descrita por Dixon *et al.* em 2012, vem ganhando destaque por ser uma potencial via de erradicação de células tumorais (Dixon et al., 2012).

Esse tipo de morte celular é regulado de forma não apoptótica tendo o seu principal mecanismo de ação o aumento de lipídeos peroxidados (L-ROS) devido a internalização de íons de ferro para o ambiente citoplasmático e sua conversão em formas de ferro redox-ativas, em especial Fe²⁺, por meio da reação química de Fenton (Figura 8) (Niu et al., 2021; Jiang et al., 2021; Lei et al., 2022; Luo et al., 2022). A reação de Fenton, uma reação redox, se consiste na oxidação do íon ferro ferroso (Fe²⁺) pelo peróxido de hidrogênio (H₂O₂) resultando na formação do radical hidroxila ($\bullet$ OH-), uma espécie reativa de oxigênio de alta toxicidade, e do íon férrico (Fe³⁺).

específicas, com potencial para evadir mecanismos clássicos de resistência frequentemente observados em diversos tipos tumorais (Figura 9) (Lei et al., 2022; Ye et al., 2024).

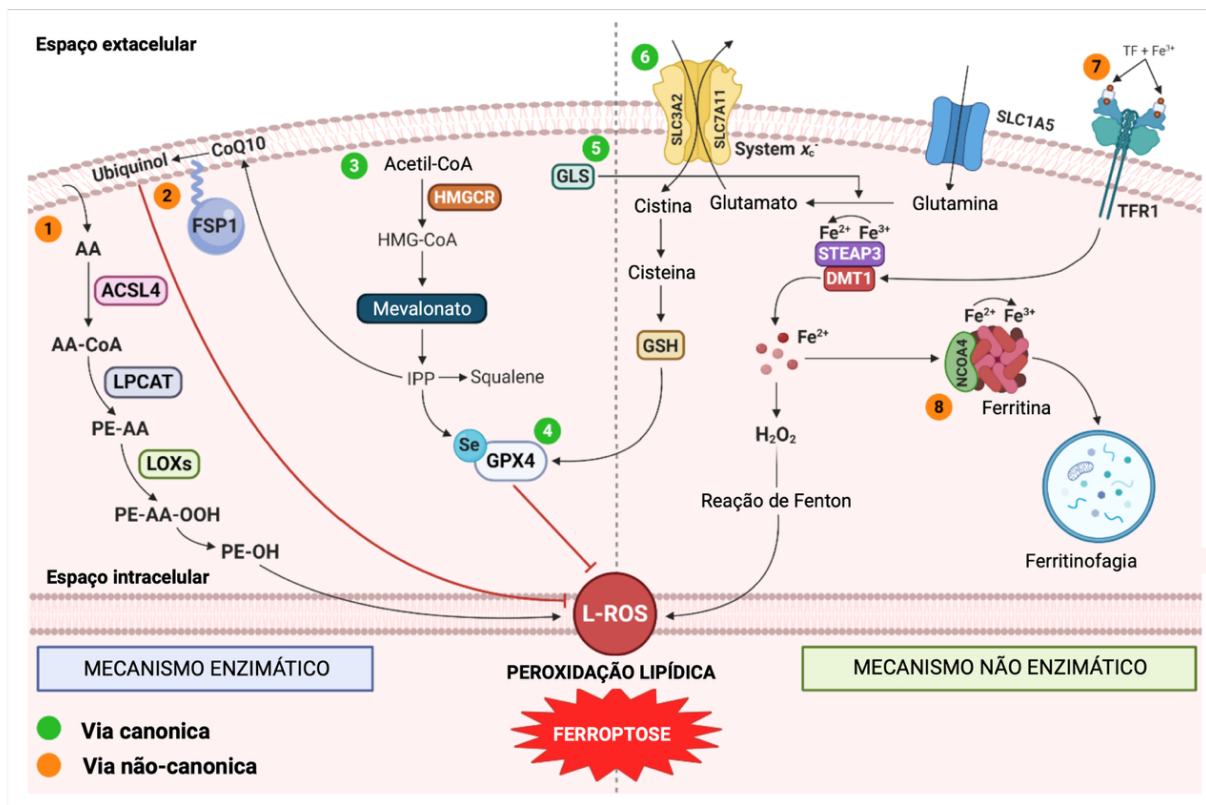


Figura 11. Mecanismos de regulação da ferroptose. As vias metabólicas correlacionadas com o controle da ferroptose são dadas em enzimáticas (esquerda) e não enzimáticas (direita), canônicas (verde) e não-canônicas (laranja). (1) Via do metabolismo lipídico - ácido araquidônico (AA) e outros ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) derivados da bicamada lipídica são metabolizados por ACSL4 e LPCAT e, posteriormente, oxidados por lipoxigenases (LOX) originando lipídeos peroxidados (L-ROS). (2) Via FSP1-CoQ10-NADPH – redução de coenzima Q10 (CoQ10) a ubiquinol pela proteína supressora de ferroptose 1 (FSP1) bloqueando a peroxidação lipídica. (3) Via do mevalonato - conversão de acetil-CoA em HMG-CoA por meio da 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMGCR), processo que resulta na adição de um resíduo de selenocisteína ao centro catalítico da enzima glutathione peroxidase 4 (GPX4), levando a sua ativação e à inibição da ferroptose. (4) Via GPX4 – enzima GPX4 catalisa a redução de peróxidos lipídicos prevenindo assim a formação exacerbada de L-ROS, consequentemente, do rompimento da membrana plasmática. (5) Via da glutaminólise – internalização da glutamina extracelular pelo membro 5 da família de transportadores de soluto 1 (SLC1A5) e sua conversão em glutamato por glutaminase (GLS). (6) Vias de ferroptose

induzidas por privação de cistina (CDI) – o aminoácido cistina é convertida em cisteína, molécula utilizada na produção de glutathione (GSH), portanto, a sua privação pelo comprometimento da troca de cistina extracelular por glutamato intracelular pelo sistema de membros 2 da família de transportadores de soluto 3 e 11 da família de transportadores de soluto 7, SLC3A2 e SLC7A11, respectivamente, desencadeia a ferroptose pela ausência de GSH. (7) Via do metabolismo de ferro – A internalização de Fe^{3+} pelos receptores de transferrina (TFR1) leva a sua conversão em Fe^{2+} no meio intracelular por metaloredutase STEAP3 e liberação do mesmo no citoplasma via transportador de metal divalente 1 (DMT1). Fe^{2+} participa da reação de fenton, produzindo L-ROS e levando à ferroptose. (8) Ferritinofagia – a enzima ferritina é responsável pelo armazenamento de ferro e redução de Fe^{2+} em Fe^{3+} limitando a reação de fenton, processo que pode ser regulado pelo coativador do receptor nuclear 4 (NCOA4) tendo em vista que a mesma medeia a degradação autofágica dessa enzima (ferritinofagia). (Fonte: Adaptada de Battaglia et al., 2020). Criado em: <https://BioRender.com>.

1.5 O papel da Imunidade Inata no câncer

O sistema imunológico, uma rede complexa de órgãos, tecidos, células e moléculas, desempenha um importante papel na manutenção da homeostase, na remoção de células mortas e na regeneração tecidual. Atuando como o principal defensor do organismo contra agentes patogênicos e células anormais, esse sistema é tradicionalmente classificado em dois grandes eixos, a imunidade inata (II) e a imunidade adaptativa (IA) (Carpenter & O'Neill, 2024).

A imunidade inata constitui a primeira linha de defesa do organismo e é composta por barreiras físicas, como pele e mucosa, por proteínas solúveis do sistema complemento e por células especializadas, como neutrófilos, monócitos/macrófagos e células natural killer (NK) (Frana et al., 2011; Basílio-Queirós & Mischak-Weissinger, 2023; Pradeu et al., 2024). Caracterizada por uma resposta rápida, inespecífica e desprovida de memória imunológica, a II é essencial para o reconhecimento inicial de células transformadas ou de padrões moleculares associados a patógenos (PMAPs) modulando, assim, respostas no microambiente tecidual que coordenam a reação local e orientam a resposta adaptativa subsequente (Li et al., 2023; Warrick et al., 2025). Diferentemente da imunidade inata, a imunidade adaptativa é constituída majoritariamente por linfócitos T e B e caracteriza-se por um eixo do sistema imunológico mais especializado, com um reconhecimento antigênico mais específico e formação da denominada memória imunológica, conferindo ao organismo uma resposta mais duradoura contra exposições tardias ao mesmo antígeno (Dobrovolskaia et al., 2016; R. Wang et al., 2024).

expressam proteínas de superfície específicas que estão correlacionadas com a progressão tumoral, fator retroalimentado pela secreção das células de IL-4 pelas células cancerígenas. Proteínas imunorreguladoras expressas por células neoplásicas (como TIE2, FoxM1 e MCT-1) contribuem com a formação de macrófagos associados ao tumor (TAM) potencializando ainda mais esse processo. A inibição da apresentação cruzada de antígenos pela competição de sGSN com o receptor de superfície cCD1 DNCR-1 prejudica a função anti-tumoral dessas células apresentadoras de antígenos. Assim como as Tregs podem suprimir as APCs como, cCD1 e cCD2, promovendo a progressão tumoral. O ácido láctico derivado do tumor, estimula a produção de Tregs e, ao mesmo tempo, reduz a expressão de IFN- α nas pCDs, tornando-as imunossupressoras, já as moCDs exibem funções pró-tumorais em alguns tipos de tumor principalmente pela elevada secreção de IL-23. As células cancerígenas interagem com os neutrófilos de maneiras diferentes, tornando-os imunossupressores e induzindo a formação de NETs, armadilhas extracelulares de neutrófilos. As células supressoras derivadas de mieloides (MDSCs) podem promover indiretamente a progressão do tumor, inibindo a atividade das células T ou promovendo a geração de Tregs. O microambiente tumoral suprime a função das células NK por meio de alterações superficiais, fragmentação mitocondrial e ausência de ligantes ativadores de receptores, facilitando, assim, a evasão imunológica. (Fonte: Adaptada de: Li et al., 2024).

A interação entre as células tumorais e o sistema imunológico tem ganhado enfoque devido a sua dinâmica complexa, refletida na imunoedição tumoral, um conceito bem estabelecido definido em três processos principais: eliminação, equilíbrio e escape (Gubin & Vesely, 2023). A eliminação é caracterizada pelo processo da imunovigilância ativa, na qual as células do sistema imune inato e adaptativo são responsáveis pelo reconhecimento e destruição total das células neoplásicas, impedindo o estabelecimento tumoral. Caso essa resposta inicial não seja plenamente eficaz, algumas células transformadas toleram o processo de eliminação, nesse cenário, o tumor não erradicado pode ser parcialmente controlado levando à fase de equilíbrio, um estado de restrição do crescimento tumoral. Por fim, a fase de escape é caracterizada pela supressão progressiva do microambiente tumoral favorecendo a inibição funcional das células efectoras, o recrutamento de células imunorreguladoras e a indução dos processos dos pontos de verificação imunológicos (Liu et al., 2023; Roerden & Spranger, 2025).

No câncer de mama e de ovário, a imunidade inata desempenha um papel importante tanto na vigilância imunológica como na progressão tumoral. Inicialmente, macrófagos, células natural killer (NK) e células dendríticas atuam na detecção e na eliminação das células

neoplásicas, entretanto, conforme a progressão tumoral ocorre, essas mesmas células podem ser reprogramadas e se associarem ao microambiente tumoral, assumindo, então um perfil pró-neoplásico e contribuindo para a progressão da doença (Baci et al., 2020; Luo et al., 2021). Estudos demonstram que, para o câncer de mama, a infiltração de macrófagos associados ao tumor (TAMs) com fenótipo M2, correlaciona-se com o aumento do processo de angiogênese, invasão e metástase. Já para o câncer de ovário evidências apontam que a presença de células supressoras de origem mieloide juntamente com a disfunção de células NK, contribuem significativamente para a evasão imunológica e a resistência aos tratamentos convencionais (Grebic et al., 2021; Margul et al., 2023).

Apesar da íntima correlação entre a imunidade inata e a progressão do câncer, algumas células imunológicas atuam no reconhecimento e no controle inicial do processo de carcinogênese, como as células apresentadoras de antígenos (APCs) que desempenham um papel fundamental unindo a resposta inata e adaptativa (Wang et al., 2024). As APCs são classificadas em profissionais, células dendríticas, macrófagos e linfócitos B, e não profissionais, que incluem células epiteliais tímicas, endoteliais, fibroblastos e astrócitos (Pishesha et al., 2022; Yang et al., 2023). Essas células, são responsáveis pelo reconhecimento, processamento e apresentação de antígenos às células T, dando origem a uma resposta adaptativa específica, fato que, no microambiente tumoral, diante da exposição contínua a sinais inflamatórios e imunossupressores, essa funcionalidade é comprometida, favorecendo a inibição da apresentação antigênica e, conseqüentemente, a evasão imunológica (Wang et al., 2024).

Apesar do conhecimento na importância da utilização do sistema imunológico no combate de diversos tipos de neoplasia, pesquisas atuais demonstram que as abordagens terapêuticas comumente aplicadas para o tratamento do câncer são imunossupressoras, tendo em vista que as doses administradas dos agentes quimioterápicos e da radiação ionizante são tóxicas para a medula óssea. Assim como os demais tratamentos, a cirurgia, técnica aplicada em inúmeros casos para a remoção do tumor primário, leva à diminuição das funções dos linfócitos e das células natural killer (NK) ocasionando o comprometimento do sistema imune do hospedeiro (Hreich et al., 2023; Li et al., 2024).

Diante deste cenário, estratégias terapêuticas que visam modular a resposta imune com a utilização de APCs, têm se destacado no âmbito da oncologia, tendo em vista que, recuperar a capacidade antigênica dessas células permite não apenas reverter o perfil imunossupressor tumoral, mas também potencializar a ativação de respostas adaptativas antineoplásicas (Jia et al., 2018; Redkin et al., 2023). Dentre as células apresentadoras de antígenos, as células

dendríticas são as que vem demonstrando maiores resultados no contexto antitumoral pois além da sua capacidade de captura, processamento e apresentação de antígenos, elas dispõem de uma capacidade intrínseca de ativar a RA, sem a necessidade de moléculas adicionais para intensificar esse processo, orquestrando respostas eficazes de linfócitos T citotóxicos (T. Zhang et al., 2023). Estudos demonstram que vacinas baseadas em CDs maduras oferecem resultados promissores na reativação da vigilância imune e, conseqüentemente na regressão tumoral (Lee et al., 2023). Assim, explorar os mecanismos de supressão das CDs no câncer e desenvolver técnicas que reestabeleçam sua ativação sugerem um processo fundamental para o avanço das imunoterapias mais eficazes (Moussion & Delamarre, 2024).

1.5.1 Células Dendríticas e Câncer

As células dendríticas (CD), células altamente especializadas, são amplamente reconhecidas pela sua capacidade de coordenar ambas as respostas imunes inatas e adaptativa (Schultze *et al.*, 2019). Responsáveis por detectar, capturar, processar antígenos e, posteriormente, apresentá-los aos linfócitos T naïve, as CDs se originam a partir de uma via hematopoietica específica, iniciando na medula óssea a partir de células-tronco hematopoieticas pluripotentes (Figura 13). Como descrito em Soltani et al, 2021, os progenitores dendríticos (CDPs), CD34⁺, CD123⁺ e HLA-DR⁺, se originam a partir de um caminho específico de diferenciação celular e resultam em duas principais subpopulações, as mieloides (cCD) e as plasmocitoides (pCD), sendo caracterizadas por diferentes marcadores transcricionais e imunofenotípicos.

As células dendríticas mieloides, também denominadas convencionais, representam o subtipo mais envolvido no controle e na modulação da resposta imune adaptativa. Classificam-se em dois grupos principais, cCD1 e cCD2, sendo o primeiro reconhecido pela sua alta capacidade de apresentação cruzada de antígenos via MHC-I e conseqüentemente ativação de células T CD8⁺, enquanto o segundo, essencial para a ativação de células T CD4⁺ e polarização em subtipos Th1, Th17 ou Th2 (Soltani et al., 2021; Moussion & Delamarre, 2024). As células dendríticas plasmocitoides, por sua vez, constituem um subtipo distinto, reconhecido por secretarem grandes quantidade de interferons do tipo I (IFN- α e IFN- β) em resposta a infecções virais. Diferentemente das cCDs, essas células possuem um fenótipo e um perfil funcional particular, expressando receptores toll-like específicos, como TLR7 e TLR9, que reconhecem material genético viral e endógeno (Fu et al., 2022).

Além das populações convencionais e plasmocitoides, destaca-se a existência de um terceiro tipo de células dendríticas, denominadas monocitoides (moCDs), as quais são

reconhecidas por não se originarem diretamente dos precursores dendríticos clássicos, mas sim, da diferenciação dos monócitos circulantes, especialmente em ambientes inflamatórios e neoplásicos (Soltani et al., 2021). Diferentemente das cCDs e das pCDs, as moCDs são abundantes em contexto de inflamação crônica e tumoral, onde podem assumir um papel contribuinte tanto para a ativação das respostas imunes quanto para a modulação do microambiente, assumindo um papel tolerogênico que favorece a evasão imunológica e o crescimento tumoral (Fu et al., 2020; Rigamonti et al., 2023a).

O processo de maturação das CDs é um evento fundamental para que essas células transicionem de um perfil especializado na captura de antígenos para um estado eficiente na apresentação e na ativação imunológica (Moon et al., 2025). Inicialmente, essas células encontram-se em um estado imaturo, caracterizado por uma alta capacidade fagocitária e uma redução das moléculas coestimulatórias e dos complexos de histocompatibilidade ((Macri et al., 2019; Yu et al., 2024). Ao entrarem em contato com sinais provenientes do microambiente, como DAMPs, PAMPs, citocinas pró-inflamatórias, entre outros, essas células passam por uma reprogramação funcional e imunofenotípica, levando ao aumento da expressão de moléculas de HLA-DR, de coestimulatórias (CD80, CD86 e CD40) e de quimiocinas, além da modulação no perfil de seus receptores, permitindo sua migração para os órgãos linfóides secundários onde interagem com células T naïve, promovendo a apresentação antigênica e subsequente ativação de respostas imunes específicas (Zanna et al., 2021).

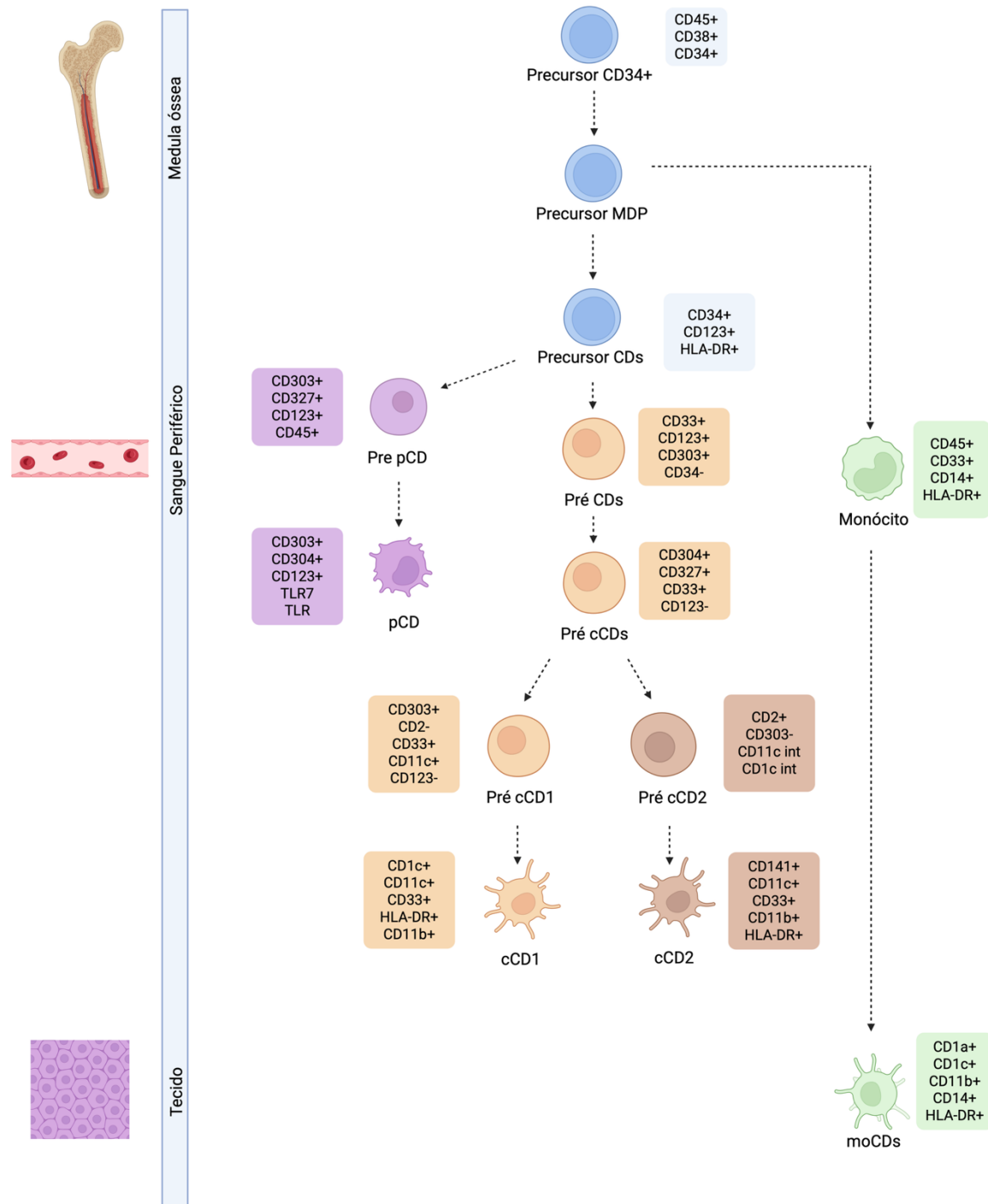


Figura 13. Esquema simplificado da diferenciação e origem das células dendríticas.

Diferenciação e caracterização fenotípica das células dendríticas humanas. Células-tronco hematopoiéticas (CD45⁺CD38⁺CD34⁺) originam precursores comuns de células dendríticas (CD34⁺CD123⁺HLA-DR⁺), que migram para o sangue periférico. No sangue, esses precursores dão origem a diferentes populações: células dendríticas plasmocitoides (pDCs), caracterizadas por CD303⁺, CD304⁺, CD327⁺, CD123⁺ e expressão de receptores TLR7/9; precursores de células dendríticas mieloides (CD33⁺CD123⁺CD303⁻CD34⁻), que se diferenciam em subtipos

de cDCs; e precursores monocíticos (CD45⁺CD33⁺CD14⁺HLA-DR⁺), que originam monócitos e posteriormente macrófagos ou células dendríticas inflamatórias. Nos tecidos, as pDCs mantêm o fenótipo CD303⁺CD2⁻CD33⁻CD11c⁻CD123⁺. As cDCs diferenciam-se em dois subtipos principais: cDC1 (CD141⁺CD11c⁺CD33⁺CD11b⁻HLA-DR⁺), especializadas em apresentação cruzada de antígenos; e cDC2 (CD1c⁺CD11c⁺CD33⁺CD11b⁺HLA-DR⁺), envolvidas na ativação de linfócitos T auxiliares. Além disso, monócitos derivados da medula (CD14⁺CD11c⁺CD33⁺HLA-DR⁺) podem se diferenciar em células dendríticas inflamatórias em contextos de infecção ou inflamação (Fonte: Elaborada pela autora (2025)). Criado em: <https://BioRender.com>.

Imunofenotipicamente, observa-se que as células imaturas expressam altos níveis de receptores de citocinas correlacionados com migração tecidual (CCR1, CCR5 e CCR6), modestos níveis de moléculas de adesão (CD54 e CD58) e baixos níveis de moléculas coestimuladoras (CD86, CD80 e CD40), enquanto, as maduras exibem um aumento na expressão de HLA-DR, nas moléculas de adesão (CD54 e CD58) e nas coestimulatórias (CD80, CD86 e CD40), bem como a substituição dos receptores de quimiocina para o receptor do tipo 7 (CCR7), correlacionado com a migração para órgãos linfoides secundários (Amon et al., 2020). O nível de maturação das CDs é um fator importante a ser considerado quando se propõe uma terapia voltada para o combate do câncer tendo em vista que estudos demonstram que o perfil maduro dessas células promove a imunidade contra o câncer enquanto as imaturas facilitam a tolerância ao mesmo (Macri et al., 2019; Moon et al., 2025).

Observando a biologia das CDs, no microambiente tumoral elas não exercem funções diferentes daquelas observadas em âmbito sistêmico, ou seja, possuem a capacidade de fagocitar as células neoplásicas mortas ou *debris* celulares e transportar os antígenos associados ao tumor para os linfonodos drenantes, onde apresentam para os linfócitos T específicos, ativando-os para respostas imunes específicas (Figura 14) (Del Prete et al., 2023; Xiao et al., 2023). A resposta imune adaptativa caracterizada pela presença de células B e T é intimamente dependente das células dendríticas que possuem um papel de gerar uma resposta imune específica, podendo então induzir tanto uma imunidade como uma tolerância (Salah et al., 2021; Lee et al., 2023; Pittet et al., 2023).

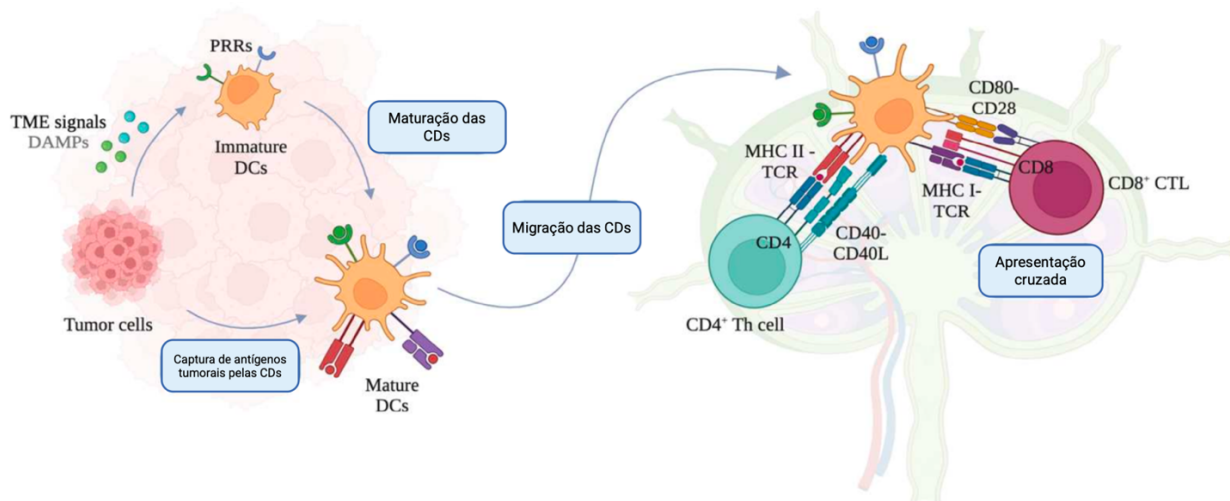


Figura 14. Esquema da apresentação cruzada de antígenos tumorais por células dendríticas aos linfócitos T. Os padrões moleculares associados ao dano (PMADs) liberados por células neoplásicas, são reconhecidos pelos receptores de padrão (PRPs) presentes nas CDs, levando a sua ativação no microambiente tumoral. Uma vez ativadas, essas células são responsáveis por capturar esses antígenos e migrar para os linfonodos sentinela, onde realizam a apresentação cruzada desses antígenos via moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) aos linfócitos efetores do tipo T naïve. A apresentação cruzada permite a ativação desses linfócitos T $CD4^+$ e T $CD8^+$ levando a indução de respostas antitumorais eficazes. (Fonte: Adaptada de Lee et al., 2023).

1.5.2 Os monócitos e seu envolvimento com as neoplasias

Os monócitos, fagócitos mononucleares derivados de precursores mielóides da medula óssea, representam a maior população de células imunes inatas que circulam na corrente sanguínea e se deslocam para tecidos durante processos inflamatórios (Dash et al., 2024; Mildner et al., 2024). Assim como as células dendríticas, são reconhecidos por estabelecerem um papel central na ponte entre a imunidade inata e a adaptativa, promovendo uma homeostase tecidual e a iniciação/propagação de respostas do hospedeiro a patógenos, controlando, assim, a resposta imunológica (Patel et al., 2021).

Além de suas funções clássica, a sua plasticidade de se diferenciarem em macrófagos e CDs mediante estímulo específico do microambiente em que se encontram, vem sendo estudado como um importante mecanismo quando o assunto está correlacionado com as terapias antineoplásicas e o desenvolvimento tumoral (Austermann et al., 2022). Estudo recentes, demonstram que essas células, em humanos, são subdivididas em três grupos principais de acordo com seus fatores transcricionais e marcadores imunofenotípicos, monócitos clássicos ($CD14^+$ e $CD16^-$), intermediários ($CD14^+$ e $CD16^+$) e não clássicos ($CD14^{lo}$ e $CD16^{++}$), os quais

apresentam perfis funcionais distintos que exercem papéis opostos atuando como reguladores do desenvolvimento ou favorecendo a progressão do câncer (Olingy et al., 2019).

Os monócitos clássicos (M ϕ C) representam a maior parte da população circulante e são caracterizados pela sua alta capacidade fagocítica, secreção de citocinas inflamatórias, como TNF- α e IL-6, rápida mobilização em resposta a sinais de dano tecidual ou infecção, além de sua plasticidade de diferenciação em macrófagos ou células dendríticas, exercendo um papel fundamental na homeostase tecidual (Chen et al., 2023; Mildner et al., 2024). Os monócitos intermediários (M ϕ I), por sua vez, compartilham características dos M ϕ C e dos monócitos não clássicos (M ϕ NC), tendo em vista que, assim como em sua nomenclatura, é um estado transitório entre as populações mais bem caracterizadas. Observando sua alta expressão de HLA-DR e o seu perfil secretor, nota-se que eles são importantes moduladores da resposta inflamatória e apresentadores de antígenos. Já os M ϕ NC, também conhecidos como vigilantes, apresentam uma atividade pró-inflamatória menos intensa, mas são os principais responsáveis pela vigilância do endotélio, remoção de detritos celulares e reparo tecidual (Austermann et al., 2022; Ugel et al., 2025).

Durante a hematopoiese, os monócitos se originam na medula óssea a partir da diferenciação de precursores mieloides comuns que geram os progenitores de monócitos e macrófagos (cMoPs). Concluído esse processo, os M ϕ são liberados na circulação principalmente com o fenótipo de M ϕ C que podem se diferenciar progressivamente nos subtipos M ϕ I e M ϕ NC em um processo contínuo e regulado por sinais inflamatórios (Mildner et al., 2024). Dentre os estímulos, destacam-se o fator estimulador de colônias de macrófagos (GM-CSF), interferons do tipo I, IL-10 e IL-1- β , além de produtos derivados de endotoxinas, como o LPS, que modulam a expressão dos receptores de superfície e regulam a polarização dessas células (Rigamonti et al., 2023b).

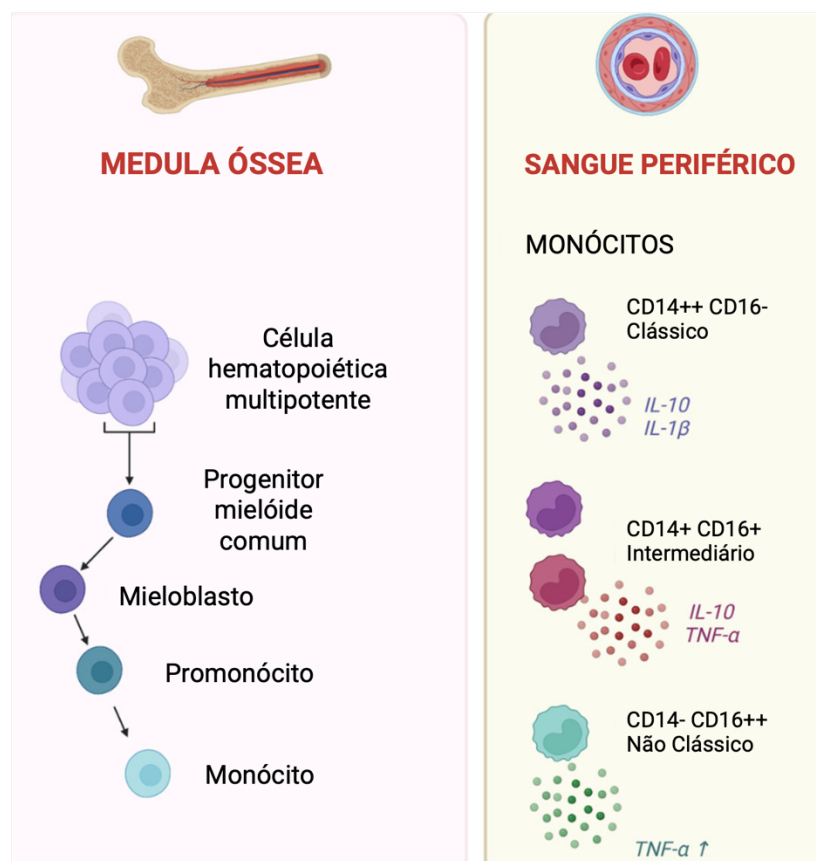


Figura 15. Diferenciação monocítica. Célula mesenquimais hematopoiéticas residentes na medula óssea originam às linhagens linfoides e mieloides. As etapas características da monopoiese incluem a diferenciação de mieloblastos para promonócitos e, posteriormente, para monócitos maduros. Atualmente são caracterizados três tipos de monócitos humanos fenotipicamente e funcionalmente distintos, descritos em monócitos clássicos, intermediários e não clássicos com suas respectivas moléculas excretadas mais representativas. (Fonte: Adaptada de Strizova et al., 2023).

Diante das inúmeras funções correlacionadas com os monócitos, sua relevância no contexto neoplásico tem se tornado cada vez mais evidente. Capaz de gerar um ambiente pró ou antitumoral, sua plasticidade celular os coloca como alvos potenciais visando o desenvolvimento de terapias antineoplásicas (Patysheva et al., 2022). Estudos atuais demonstram que a modulação monocítica voltada para perfis funcionalmente ativadores podem auxiliar na restauração da vigilância imunológica e promover respostas inflamatórias contra o tumor (Schetters et al., 2020; Kim et al., 2024). Além disso, o rastreamento da frequência e do fenótipo dos subtipos monocitários têm se mostrado um importante marcador prognóstico em

diversos tipos de câncer, podendo, também, indicar respostas antitumorais, precocemente, sobre terapias imunomoduladoras, como PD-1/PDL-1 (Shao et al., 2021).

2. Justificativa

Apesar dos avanços terapêuticos voltados para o combate das neoplasias, ainda se observa diversas limitações quando se diz a respeito da erradicação tumoral completa e qualidade de vida dos pacientes. Dados epidemiológicos atuais, demonstram que o adenocarcinoma mamário ainda exibe altas taxas de incidência em todo o mundo e o de ovário, apesar de não apresentar uma alta incidência, é considerado o mais letal dos ginecológicos (Globocan, 2022; INCA, 2023).

Nesse contexto, a busca por novos agentes terapêuticos que possam levar a uma menor toxicidade sistêmica tem sido amplamente estudada pela comunidade científica (Qian et al., 2020; Jin et al., 2020; Kaur et al., 2024). Além de visar o conforto do paciente e uma terapia mais direcionada, estudos atuais demonstram a importância da atuação do sistema imune para o tratamento do câncer, tendo em vista que o melhor tratamento para essa doença não consiste apenas na erradicação do tumor primário, mas também na ativação do sistema imunológico para reconhecer, rastrear e destruir todas as células tumorais remanescentes que estejam localizadas próximas ao local do tumor primário ou nas micrometástases ao longo do corpo do paciente (Park et al., 2018; Yang et al., 2021; Oliveira et al., 2024).

Trabalhos anteriores demonstram a eficácia *in vitro* da utilização de nanopartículas magnéticas associadas a azul de metileno para o tratamento do câncer de mama e de ovário (Silva et al., 2021). O azul de metileno, um corante histológico comumente utilizado na bancada, tem-se demonstrado um eficiente agente para a terapia anticâncer, devido ao seu elevado rendimento para a geração de oxigênio singleto e a sua seletividade tumoral, assim como as nanopartículas de óxido de ferro, que vem demonstrando sua importância como um nanocarreador voltado para a terapia antitumoral e o diagnóstico precoce (Zhao et al., 2018; Canese et al., 2021; Schneider et al., 2022; Taldaev et al., 2023; da Veiga Moreira et al., 2024). Diante deste cenário, o presente trabalho visa associar a nanobiotecnologia com o desencadeamento da maturação de células dendríticas para a obtenção de resposta imunológica específica contra células de câncer de mama e de ovário *in vitro*.

Diante desse panorama, o presente trabalho se justifica por investigar se a morte celular induzida por nanopartículas de maghemita associadas ao azul de metileno é capaz de reduzir a viabilidade de células tumorais de mama e ovário e, simultaneamente, promover a maturação de células dendríticas, configurando uma abordagem terapêutica dual com potencial aplicação futura em imunoterapia contra o câncer.

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

Investigar o potencial antitumoral e imunomodulador de nanopartículas magnéticas associadas ao azul de metileno (MAGCIT-AM) em células de câncer de mama e ovário *in vitro*, com ênfase na indução de morte celular e na maturação de células dendríticas.

3.2 Objetivos específicos

3.2.1 Caracterizar a interação das nanopartículas com células tumorais, incluindo internalização, efeitos sobre viabilidade, proliferação e migração celular.

3.2.2 Verificar a seletividade do nanossistema, comparando seus efeitos em células tumorais humanas e murinas com fibroblastos normais.

3.2.3 Investigar os mecanismos de morte celular induzida pelo tratamento, avaliando estresse oxidativo, alterações mitocondriais e nucleares, bem como modulação do sistema antioxidante.

3.2.4 Avaliar a capacidade imunomodulatória do tratamento, por meio da análise da maturação de células dendríticas e da modulação do perfil monocítico após exposição a células tumorais tratadas.

4. Materiais e Métodos

4.1 Reagentes

Os reagentes utilizados para a realização dos ensaios estão listados no quadro abaixo (Quadro 1).

Quadro 1. Reagentes utilizados ao longo dos estudos.

Fabricante	Materiais
Dinâmica, Brasil	Formaldeído P.A. – ACS; Acetona P.A. – ACS; Peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂); Ácido perclórico (HClO ₄); Dodecilsulfato de sódio (SDS), Ácido acético; Ácido tiobarbitúrico; Malonaldeído (MDA)
GIBCO, EUA	DMEM; RPMI; Soro Fetal Bovino (SFB); Tripsina 0,25% em EDTA; Solução Antibiótica (penicilina e estreptomicina)
Hatfield PA, EUA	Azul de metileno
Invitrogen, EUA	Alamar Blue; Carbovyfluorescein succinimidyl ester (CFSE); BODIPY; JC-1; LPS
Laborclin, Brasil	Tampão Fosfato Salino (PBS)
Molecular Probes, EUA	Iodeto de Propídeo, Prolong Gold
Polysciences, EUA	Tetróxido de ósmio; Acetato de uranila
Sigma-Aldrich, EUA	DAPI; Formvar solution; 2',7'-diacetato de diclorofluoresceína (H2DCFDA); bitartarato de epinefrina; Bradford; Fluoróforo orto-ftalaldeído fluoróforo orto-ftalaldeído; Ficoll® Paque PLUS
Vetec, Brasil	Paraformaldeído 37%, Cloreto férrico (FeCl ₃), Nitrato Férrico (Fe(NO ₃) ₃ ·9H ₂ O), Hidróxido de Sódio (NaOH)
VWR	Ácido Nítrico (HNO ₃), Acetona
BCRJ	MDA-MB-231, T-47D, A2780, HUVEC, NIH/3T3, 4T1

Fonte: Elaborado pela autora.

4.2 Síntese e caracterização do nanossistema.

4.2.1 Nanopartículas de maghemita associadas ao azul de metileno (MAGCIT-AM).

A síntese das nanopartículas de maghemita foi realizada no Laboratório de Polímeros e Nanomateriais (LabPolN) do Instituto de Química da Universidade de Brasília, sob supervisão do Prof. Dr. Leonardo Giordano Paterno, por meio da coprecipitação hidrotérmica em meio alcalino a 100 °C (Filomeno, 2015). Para o equilíbrio das cargas superficiais, as nanopartículas foram peptizadas em meio ácido aquoso ajustando-se o pH e a força iônica com uma solução de HNO₃. A funcionalização de sua superfície ocorreu por meio da solução de ácido cítrico utilizando o método da agregação da solução a 0,05 M às nanopartículas de maghemita a 90 mg/L. Posteriormente, a solução permaneceu em ultrassom durante 1 h e em diálise em água deionizada por 72 h com troca a cada 24 h. Por fim, a solução foi sonicada por 10 min a amplitude de 25% e o pH foi ajustado para o valor de 6.6 por meio da adição de solução de NaOH a 1 M. A adição do azul de metileno (AM) às nanopartículas funcionalizadas com citrato ocorreu por meio da junção, em agitação magnética constante, da solução de AM a 1 g/L às nanopartículas. A caracterização do nanossistema foi descrita em (Silva et al., 2021).

4.3 Modelos celulares e condições de cultura

4.3.1 Manutenção das linhagens celulares

A fim de elucidar o potencial terapêutico de MAGCIT-AM no contexto das neoplasias, foram selecionadas três linhagens celulares, sendo uma de câncer de ovário, A2780, e duas de câncer de mama, T-47D e MDA-MB-231. A escolha dos diferentes modelos para o estudo do câncer de mama, baseou-se nos subtipos clínicos com diferentes perfis de agressividade e resposta terapêutica, tendo em vista que a MDA-MB-231 é uma linhagem de carcinoma mamário do subtipo triplo negativo, apresentando um perfil mesenquimal altamente invasivo e metastático. Diferentemente, a T-47D, é uma linhagem pertencente ao subtipo luminal A, sendo assim, positiva para receptores de estrogênio e progesterona, com baixa expressão de HER2 e menor capacidade migratória (El-Masry et al., 2019; Yin et al., 2020; Gambardella et al., 2022). Como linhagens não tumorais humanas, foram utilizadas células endoteliais, HUVEC, e células de cultura primária de células mesenquimais não tumorais humanas de polpa dentária (HNTMC) foram obtidas a partir de cultivo primário de polpa dentária de voluntários saudáveis no Laboratório de Microscopia Eletrônica da Universidade de Brasília – UnB sob aprovação do Comitê de Ética Humana da Universidade de Brasília (UnBDOC 104934/2008).

Visando ensaios posteriores *in vivo*, utilizou-se duas linhagens murinas, sendo uma de fibroblasto embrionário de camundongos, NIH/3T3, e um modelo animal representativo do estágio IV do câncer de mama humano, a linhagem 4T1.

Portanto, para performar os ensaios *in vitro* as linhagens celulares foram cultivadas em meio RPMI, T-47D, RPMI, A2780, e L15, MDA-MB-231 e as linhagens murinas e normais humanas, HNTMC e HUVEC em meio DMEM *high glucose*. Todos os meios foram suplementados com 10% de soro fetal bovino (SFB) e antibiótico (100 µg/mL penicilina e 100 µg./mL estreptomicina) a 1%. As células foram mantidas em incubadora a 37 °C, 5% de CO₂ e umidade de 80%.

4.4 Avaliação dos efeitos antitumorais do nanossistema

4.4.1 Avaliação da viabilidade celular de linhagens normais e tumorais murinas pós-tratamento com MAGCIT-AM.

Visando ensaios *in vivo* futuros, foi realizado o ensaio de viabilidade celular a fim de verificar a citotoxicidade de MAGCIT-AM em células normais e tumorais murinas tratadas com o nanossistema. Para isso, utilizou-se o ensaio padrão por Alamar Blue (AlamarBlue™ Cell Viability Reagent, Invitrogen™). Células plaqueadas em placas de 96 poços e tratadas com diferentes concentrações de nanopartículas de maghemita associadas ao azul de metileno (MAGCIT-AM) (3,12; 1,56; 0,78 e 0,39 µg/mL) e AM (5,0; 2,5; 1,25 e 0,625 µg/mL) por diferentes tempos (24, 48 e 72 h), foram incubadas com o reagente AlamarBlue™ durante 2 h. Posteriormente, as células foram levadas ao espectrofotômetro SpectraMax M5 (Molecular Devices, EUA) e lidas por fluorescência (λ_{ex} . 560; λ_{em} . 590). O ensaio de Alamar Blue foi realizado em quintuplicata para cada concentração utilizada. Os experimentos ocorreram em série de três repetições.

4.4.2 Análise da proliferação celular tumoral de MDA-MB-231 após tratamento com MAGCIT-AM

Tendo em vista sua resistência específica ao tratamento com MAGCIT-AM, foi performedo experimento para elucidar se o nanossistema seria capaz de induzir alterações em seu perfil de proliferação celular. Para esse, as células MDA-MB-231 foram marcadas com carbovyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) na concentração final de 10 µM (diluído em PBS/BSA 0,1%) segundo as recomendações do fabricante (ThermoFisher). As células foram previamente marcadas e colocadas em cultura na concentração de $1,5 \times 10^5$ células por poço em placas de 12 poços. Após a adesão, as células receberam o tratamento com MAGCIT-AM e, passadas 48 h, foram analisadas por citometria de fluxo (FACSCalibur) (Becton Dickinson)

em canal FL-1, escala linear, com o auxílio do *software CellQuest-Pro* para aquisição dos dados e *software FlowJo VII* (Becton Dickinson) para análise.

4.4.3 *Análise da internalização de MAGCIT-AM pelas células tumorais por meio de microscopia eletrônica de transmissão*

Para a análise ultraestrutural, 1×10^6 células das linhagens tumorais humanas (A2780, T-47D e MDA-MB-231) foram plaqueadas em placas de 6 poços. Passado o tempo de tratamento, MAGCIT-AM a $0,78 \mu\text{g/mL}$, 6 horas, as células foram submetidas a lavagem com tampão PBS 1X e foram fixadas *overnight* à 4°C com a solução de Karnovsky, contendo 2% paraformaldeído (v/v), 2% glutaraldeído (v/v) e 0,1 M tampão cacodilato de sódio, pH 7.2. Posteriormente, as células foram pós-fixadas, por 30 min, com tetróxido de ósmio 2% (v/v) e ferrocianeto de potássio 0,8% (10 mM CaCl_2 em 0,2 M tampão cacodilato de sódio, pH 7.2). O material foi lavado em água destilada e contrastado *in block*, por 24 horas a 4°C , em solução de acetato de uranila a 0,5%. As amostras foram desidratadas em uma série gradual de acetona (50-100%) por 10 minutos e embebidas em resina *Spurr*. Cortes ultrafinos foram depositados em telinhas de cobre (*mesh* = 200 nm) e observados em Microscópio Eletrônico de Transmissão JEOL JEM-1011 (JEOL, Japan) a 80 kVA. A quantificação da internalização de MAGCIT-AM foi realizada por meio da análise de citometria de fluxo em que, 1×10^4 células previamente tratadas com MAGCITM-AM ($0,78 \mu\text{g/mL}$) por 6h foram desaderidas e passaram por processo de lavagem com tampão PBS 1X, posteriormente, foram fixadas em formaldeído 3,7%, lavadas, novamente, e lidas em citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson) em canal FL-4 em escala logarítmica, com auxílio do *software CellQuest-Pro* para aquisição dos dados e *software FlowJo VII* (Becton Dickinson) para análise.

4.4.4 *Biogênese de corpúsculo lipídico em células tumorais*

Para a análise da alteração na biogênese de corpúsculos lipídicos, após o tratamento com MAGCIT-AM por 48 h, as células tumorais humanas (1×10^5 células por poço) foram plaqueadas em placas de 24 poços e incubadas com o tratamento MAGCIT-AM na concentração de IC_{50} pré-estabelecida ($0,25 \mu\text{g/mL}$ para A2780, $0,59 \mu\text{g/mL}$ para T-47D e $3,12 \mu\text{g/mL}$ para MDA-MB-231) (Silva et al., 2021). Após 48 horas, as células foram coletadas, lavadas duas vezes com PBS 1X e marcadas com a sonda BODIPY 493/503 (Life Technologies) na diluição de 1/5000 em PBS 1X por 30 minutos. As amostras foram adquiridas por citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson) em canal FL-1 em escala logarítmica, com o auxílio do *software CellQuest-Pro* para aquisição dos dados e *software FlowJo VII* (Becton Dickinson) para análise.

4.4.5 Análise do potencial transmembranar mitocondrial

A fim de se analisar a interferência de MAGCIT-AM no potencial transmembranar mitocondrial, foi performedo um ensaio de citometria de fluxo com marcação para JC-1. Para isso, as células tumorais, A2780, T-47D e MDA-MB-231, (1×10^5 células por poço) foram plaqueadas em placas de 24 poços e incubadas com o tratamento MAGCIT-AM na concentração de IC_{50} pré-estabelecida (0,25 $\mu\text{g/mL}$ para A2780, 0,59 $\mu\text{g/mL}$ para T-47D e 3,12 $\mu\text{g/mL}$ para MDA-MB-231) (Silva et al., 2021). Após 24 horas, as células foram coletadas, lavadas duas vezes com PBS 1X e marcadas com a sonda JC-1 (ThermoFisher) na diluição de 1/5000 por 30 minutos. As amostras foram adquiridas por citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson) em canal FL-1 e FL-2 em escala linear, com o auxílio do *software CellQuest-Pro* para aquisição dos dados e *software FlowJo V10* (Becton Dickinson) para análise.

O estudo qualitativo da alteração do potencial transmembranar mitocondrial foi realizado em Microscópio Confocal de Varredura a Laser (Leica Microsystems). As células (1×10^4) foram plaqueadas em placas de 12 poços sob lamínulas redondas previamente esterilizadas. Após 24 h, foi adicionado o tratamento MAGCIT-AM na concentração de IC_{50} pré-estabelecida (0,25 $\mu\text{g/mL}$ para A2780, 0,59 $\mu\text{g/mL}$ para T-47D e 3,12 $\mu\text{g/mL}$ para MDA-MB-231) (Silva et al., 2021), por 6 h. O reagente fluorescente utilizado para a visualização foi o JC-1 (ThermoFisher) na diluição de 1/5000 por 30 minutos. Posteriormente, as lamínulas foram lavadas com PBS 1X e fixadas com formaldeído 3,7% por 15 min em agitação constante. Para a marcação do DNA celular, as lamínulas foram incubadas com DAPI 300 nM por 5 min em temperatura ambiente. Por fim, as lamínulas foram lavadas com PBS, novamente, e montadas com *Prolong Gold Antifade*.

4.4.6 Análise da fragmentação nuclear

O efeito de MAGCIT-AM sobre a fragmentação nuclear foi investigado por meio da utilização do agente fluorescente intercalante de nucleotídeos, o Iodeto de Propídeo (IP). A interpretação de dados baseou-se na relação diretamente proporcional da intensidade de fluorescência do IP com a quantidade de DNA no interior da célula. Para esse processo as células, A2780, T-47D e MDA-MB-231 foram semeadas em placas de 24 poços (1×10^5 células por poço) e tratadas por 48 horas. As células passaram pelo processo de lavagem com PBS 1x e foram expostas a solução de IP (20 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$ de RNase, 0,1% citrato de sódio, 0,1% triton) por 30 min à temperatura ambiente. Após o tempo de incubação, as células foram lavadas, novamente, com PBS 1X e ressuspensas. A análise ocorreu em citômetro de fluxo

FACSCalibur (BD Biosciences) em canal FL-3 em escala linear. Eventos que apresentaram fluorescência inferior à encontrada nas células em G0/G1 foram considerados casos de fragmentação nuclear. As amostras foram adquiridas com o auxílio do *software CellQuest-Pro* para aquisição dos dados e *software FlowJo V11* (Becton Dickinson) para análise.

4.4.7 *Análise da migração de células tumorais após tratamento com MAGCIT-AM*

Para a avaliação da capacidade migratória celular, foi performedo o ensaio de *Wound Healing*. As células A2780, T-47D e MDA-MB-231 foram plaqueadas em placas de 24 poços, passadas 24 h, foi utilizada uma ponteira de 200 μ L para retirar as células de maneira uniforme e cada poço lavado 3 vezes com PBS. Os poços designados, receberam o tratamento com a concentração de IC₅₀ pré-estabelecida em estudos anteriores (0,25 μ g/mL para A2780, 0,59 μ g/mL para T-47D e 3,12 μ g/mL para MDA-MB-231) ou somente meio de cultura acrescido de 1% de SFB. Após 48 h os poços foram fotografados em microscópio EVOS Cell Imaging Systems (ThermoFisher) do Laboratório de Nanobiotecnologia, Universidade de Brasília, UnB.

4.4.8 *Análise da modulação do sistema antioxidante*

4.4.8.1 *Quantificação de proteínas com Bradford*

Para normalização dos resultados, o conteúdo de proteínas das amostras foi quantificado pela metodologia que consiste na ligação do corante azul brilhante de Coomassie às proteínas presentes, denominado Bradford (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). A absorbância foi mensurada no comprimento de onda de $\lambda = 600$ nm. Albumina de soro bovino (BSA) 0,5 mg/ml foi utilizado como padrão.

4.4.8.2 *Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio pós-tratamento com MAGCIT-AM*

Os níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) foram mensurados nas células tumorais por meio do 2',7'-diacetato de diclorofluoresceína (H2DCFDA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), um marcador fluorogênico que, ao ser quebrado por esterases intracelulares não específicas, é transformado em diacetato de diclorofluoresceína (DCFH) gerando fluorescência ao reagir com as espécies reativas presentes nas células (Bonini et al., 2006). Para o experimento, 1×10^4 células foram plaqueadas em placas de 96 poços e os grupos referentes receberam o tratamento com MAGCIT-AM nas concentrações de IC₅₀ pré-determinadas em estudo anteriores (0,25 μ g/mL para A2780, 0,59 μ g/mL para T-47D e 3,12 μ g/mL para MDA-MB-231). Posteriormente, foi adicionado 193 μ L de tampão fosfato de sódio 75 mM (pH 7,5) e as células foram tratadas com 2 μ L de 0,5 mM H2DFDA e, imediatamente, iniciado a leitura

da fluorescência de modo cinético em 25 minutos com intervalos de 30 segundos para leitura do poço. As amostras foram determinadas pela intensidade da fluorescência detectada após excitação de 475 nm e emissão de 525 nm no aparelho SpectraMax M5 (Molecular Devices, EUA).

4.4.8.3 Ensaio de mensuração da atividade da superóxido dismutase

Para avaliar a influência do tratamento sobre a produção de uma das principais enzimas antioxidante que apresentam um papel importante na defesa celular contra as espécies reativas geradas em condição de estresse oxidativo, a superóxido dismutase (SOD), as células tumorais humanas previamente tratadas com MAGCIT-AM na concentração de IC₅₀ pré-estabelecida (0,25 µg/mL para A2780, 0,59 µg/mL para T-47D e 3,12 µg/mL para MDA-MB-231) foram lisadas por sonicação e dispostas em placa de 96 poços. A atividade da SOD foi detectada por espectrofotometria, com base na inibição da formação de adrenocromo, decorrente da oxidação da epinefrina pela ação da SOD (MIRSA; FRIDOVICH, 1972). No dia do experimento, preparou-se o tampão de carbonato de sódio 57,7 mM e mantido em temperatura constante de 30° C. Foi realizada uma curva basal com bitartarato de epinefrina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) 6 mM para verificar sua eficiência em microplaca de 96 poços. A absorbância foi medida cineticamente em intervalos de dez segundos, durante dois minutos, a um comprimento de onda de $\lambda = 490$ nm. Em seguida, as amostras foram adicionadas nos poços e a leitura se iniciou imediatamente após a pipetagem da epinefrina. Os resultados foram expressos em absorbância de 490 nm por µg de proteína.

4.4.8.4 Estudo da atividade da enzima catalase

A atividade da enzima catalase nas células foi padronizada para microplaca, seguindo uma adaptação da metodologia proposta por Hadwan (2018). As células T-47D, A2780 e MDA-MB-231 não tratadas e tratadas (0,25 µg/mL para A2780, 0,59 µg/mL para T-47D e 3,12 µg/mL para MDA-MB-231) foram coletadas dos frascos de cultura e lisadas por sonicação e expostas a 40 µL de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 10 mM em um microtubo de 1,5 mL permanecendo em incubação a 37 °C em banho-maria por 2 minutos. Após a incubação, às células foi acrescido 240 µL da solução de trabalho carbonato-cobalto, composta por 5% v/v de solução de nitrato de cobalto II, 5% v/v de solução de hexametáfosfato de sódio e 90% v/v de solução de bicarbonato de sódio, em seguida, 200 µL foram transferidos para os respectivos poços da placa de 96 poços. Na presença de bicarbonato de sódio, o peróxido de hidrogênio atua como agente oxidante sobre o cobalto II, convertendo-o em cobalto III e formando o complexo carbonato-

cobalto III, que apresenta coloração esverdeada. A placa foi incubada por 10 minutos em temperatura ambiente e em local isento de luz. A absorbância foi mensurada no espectrofotômetro GloMax (Promega, Madison, WI, EUA), no comprimento de onda de $\lambda = 440$ nm e os resultados foram expressos em absorbância 440 ng por μg de proteína.

4.4.8.5 *Quantificação dos níveis de glutathiona*

Os níveis de glutathiona (GSH) intracelulares foram determinados por meio do método cinético baseado na reação do fluoróforo orto-ftalaldeído (OPA, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), o qual reage com a GSH presente no sobrenadante após a lise celular (Senft et al., 2000). Para o ensaio, as células foram tratadas com MAGCIT-AM (0,25 $\mu\text{g/mL}$ para A2780, 0,59 $\mu\text{g/mL}$ para T-47D e 3,12 $\mu\text{g/mL}$ para MDA-MB-231) e lisadas com ácido perclórico (HClO_4) e transferidas para placa de 96 poços. Previamente à leitura das amostras, uma curva basal foi realizada com Glutathiona Reduzida (UBS) com 0,1 mM para validação do teste. Em cada poço da placa, foi pipetado 20 μL de OPA e incubada por 10 minutos. A intensidade da fluorescência foi detectada a excitação a 475 nm e emissão a 525 nm no GloMax (Promega). Os resultados do teste foram expressos em nmol por μg de proteína.

4.4.8.6 *Quantificação de lipídeos peroxidados (TBARS) em células tumorais humanas*

A fim de quantificar a lipoperoxidação, as células tumorais humanas controles ou tratadas com MAGCIT-AM (0,25 $\mu\text{g/mL}$ para A2780, 0,59 $\mu\text{g/mL}$ para T-47D e 3,12 $\mu\text{g/mL}$ para MDA-MB-231), foram coletadas e incubadas em um microtubo de 1,5 mL com 8,1% de SDS, 20% de ácido acético e 0,6% de ácido tiobarbitúrico (TBA). Em condições de alta temperatura e pH ácido, o TBA reage com o malonaldeído (MDA) na proporção (2:1), um dos produtos liberados durante a peroxidação lipídica, formando um composto colorimétrico (Ohkawa, 1979). A mistura foi aquecida a 95° C por 1 hora no banho-seco. Posteriormente, foi pipetado 200 μL em uma placa de 96 poços e a absorbância foi medida a um comprimento de onda de $\lambda = 490$ nm no aparelho de espectrofotômetro GloMax (Promega, Madison, WI, EUA). Os resultados foram expressos em absorbância de 490 nm por μg de proteína.

4.4.9 *Análise da morfologia celular tumoral pós-tratamento por meio de microscópio de luz.*

Para o estudo das alterações morfológicas das células tumorais (MDA-MB-231, T-47D e A780) foram plaqueadas 1×10^5 células de cada linhagem em placas de 12 poços. Após 24 h foi adicionado o tratamento MAGCIT-AM (0,78 $\mu\text{g/mL}$ de AM) ou somente o meio de cultura

a qual permaneceu incubada durante 48 h. Anteriormente à obtenção das imagens, realizou-se a marcação por meio do kit de panótico rápido. O panótico rápido é um kit composto por 3 soluções principais, solução de triarilmetano a 1% (fixador), solução de xantenos a 0,1% (corante ácido – coloração avermelhada/rosada) e solução de tiazinhas a 0,1% (corante básico – coloração arroxeada/azulada). As imagens foram obtidas com o auxílio do software AxioVision 100 no Microscópio EVOS Cell Imaging Systems (ThermoFisher) do Laboratório de Nanobiotecnologia, Universidade de Brasília, UnB.

4.5 Avaliação do impacto imunológico

4.5.1 População de estudo e Aspectos Éticos

A fim de analisar a maturação de células dendríticas e perfil monocítico de células provenientes de sangue periférico humano, mulheres voluntárias com idades entre 20 e 40 anos foram recrutadas por divulgação da pesquisa e convite direto. Após se informarem acerca dos objetivos e dos experimentos que seriam realizados, aquelas que concordaram em participar da pesquisa assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndice). Em cumprimento aos requisitos exigidos pela Resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde para pesquisas envolvendo seres humanos, o projeto, previamente, foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Ciências Humanas e Sociais (CEP/CHS) da Universidade de Brasília (UnB) sob número de protocolo 77090524.3.0000.0030.

Para a composição dos grupos experimentais, foram selecionadas, no total, seis mulheres, distribuídas em dois grupos de acordo com o uso ou não de métodos contraceptivos hormonais.

4.5.2 Obtenção das células mononucleares do sangue periférico (PBMC)

Para a obtenção das células mononucleares, foi realizada a coleta de 8 mL de sangue periférico de cada voluntária por punção venosa utilizando-se o adaptador de coleta a vácuo e tubos contendo anticoagulante, EDTA. PBMCs foram isoladas a partir da separação por gradiente de densidade Ficoll® Paque PLUS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), para isso, foram adicionados 4 mL de sangue para cada 2 mL de Ficoll e, a seguir, o material passou pelo processo de centrifugação a 400 rcf por 20 min, 90°, resultando na separação em 4 fases distintas: (i) células vermelhas + polimorfonucleares, (ii) Ficoll, (iii) PBMC e (iv) plasma. As células mononucleares foram transferidas para *eppendorff* estéril e foram realizadas duas lavagens com tampão PBS 1X. As PBMCs foram ressuspensas em meio RPMI 1640 e, após contagem, 1×10^6 células foram semeadas em placa de 6 poços e mantidas em meio RPMI 1640

suplementado com 10% de SFB e 1% de antibiótico (100 µg/mL penicilina e 100 µg/mL estreptomicina) e em incubadora a 37 °C, 5% de CO₂ e umidade de 80%.

4.5.3 *Estudo da maturação de células dendríticas e perfil monocítico*

Para o estudo da maturação das células dendríticas e avaliação do perfil monocítico, as células tumorais T-47D e A2780 foram tratadas, previamente, com MAGCIT-AM (0,78 µg/mL por 48h). Passado o tempo de incubação, segregou-se o sobrenadante e realizou-se a separação das nanopartículas por meio da utilização de rack magnética (DynaMag-2 magnetic rack – ThermoFisher) (Figura 16).

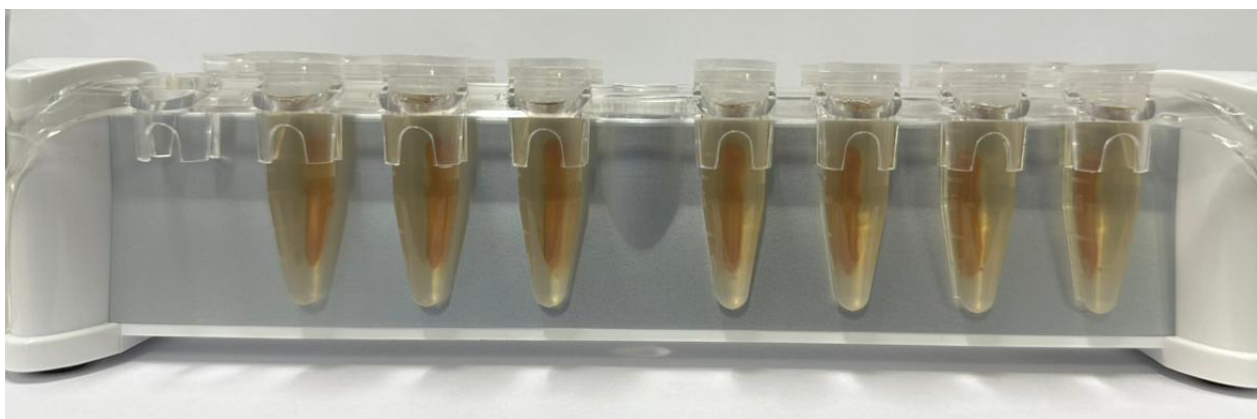


Figura 16. Separação magnética de MAGCIT-AM por estante magnética. A retirada do nanossistema presente no meio de cultura pós-tratamento das células tumorais foi realizado com o auxílio da rack magnética DynaMag-2 magnetic rack (ThermoFisher), evidenciando a propriedade magnética da nanopartícula.

O delineamento experimental baseou-se em quatro grupos, controle negativo (células com meio sem indução), controle positivo (células incubadas com LPS 1 µg/mL), indução com meio condicionado de A2780 e de T-47D (Figura 17). As PBMCs, anteriormente semeadas em placa de 6 poços, receberam 900µL (70%, do volume total) de sobrenadante, a qual permaneceram em contato por 24 horas em estufa a 37 °C, 5% de CO₂ e 80% de umidade.

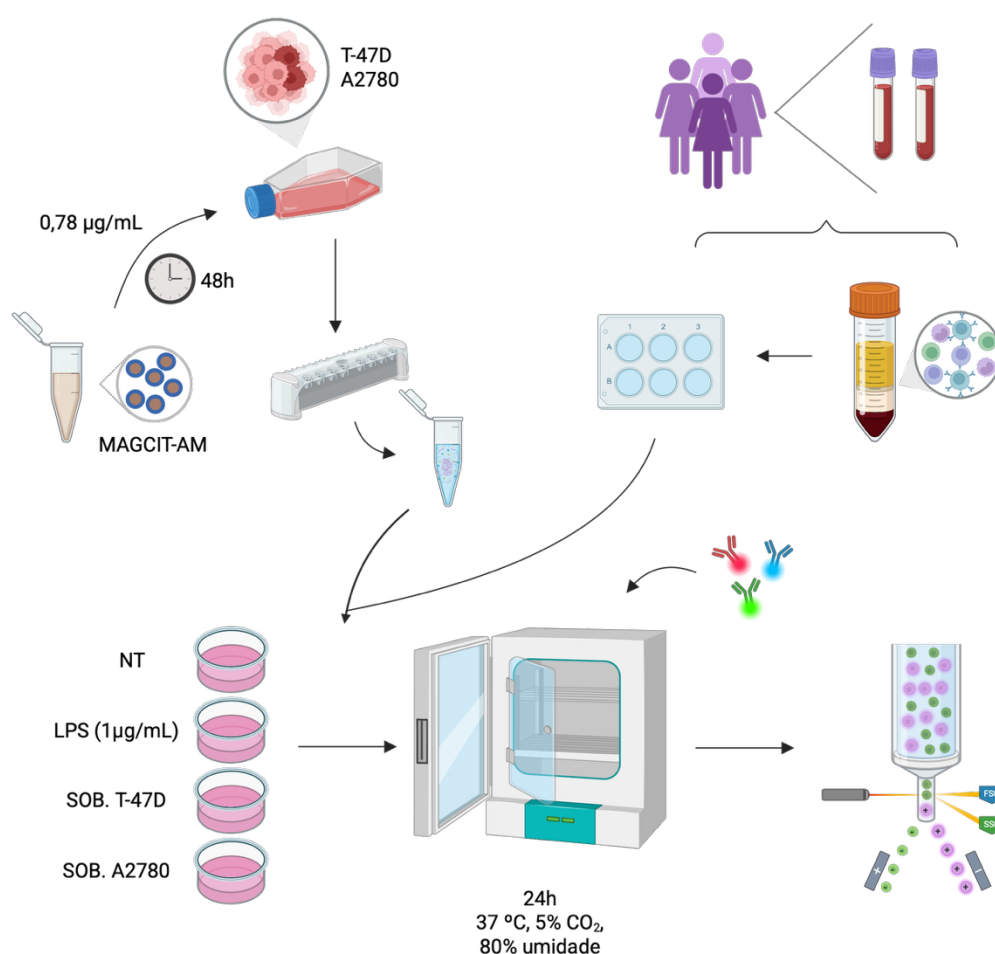


Figura 17. Esquema do estudo da maturação de células dendríticas e análise do perfil monocítico. Foi realizada a coleta de sangue periférico de voluntárias para o isolamento de PBMCs. Posteriormente essas células passaram pelo processo de incubação com o lisado tumoral obtido pós-tratamento com MAGCIT-AM, quando necessário, e realizada análise por citometria de fluxo após marcação com anticorpos. (Fonte: Elaborada pela autora (2025)). Criado em: <https://BioRender.com>.

4.5.4 Imunofenotipagem por citometria de fluxo

Com a finalidade de caracterizar as células PBMC pós estímulo, foram montados, previamente, cinco painéis de marcação contendo anticorpos monoclonais conjugados a fluorocromos específicos, com base na literatura e nos objetivos principais do estudo (Quadro 2).

Quadro 2. Painéis montados para análise imunofenotípica por citometria de fluxo.

	FITC	PE	PERCP CY5.5	PC7	APC	APCH7	HV450 /BV421	K. ORANGE
Painel 1	CD16	CD123	CD40	CD25	CD33	CD14	HLA-DR	CD45
Painel 2	CD11c	CD16	CD40	CD25	CD123	CD14	HLA-DR	CD45
Painel 3	CD80	CD86	CD11c	CD25	CD123	DR	CD33	CD45
Painel 4	CD11c	CD86	CD40	CD25	CD33	DR	CD123	CD45
Painel 5	CD11c	CD86	HLA- DR	CD25	CD33	CD14	CD123	CD45

Fonte: Elaborado pela autora.

Após a padronização e análise dos resultados preliminares com auxílio do *software* Infinicyt™ (Cytognos, S.L.), dois painéis foram selecionados para seguirem nos estudos finais, tendo em vista que apresentaram um melhor desempenho na distinção dos subtipos celulares, assim como na qualidade dos sinais fluorescentes (Quadro 3).

Quadro 3. Painéis selecionados para seguirem no estudo.

	FITC	PE	PERCP CY5.5	PC7	APC	APCH7	PB/BV421	K. ORANGE
Painel 1	CD16	CD123	CD40	CD25	CD33	CD14	HLA-DR	CD45
Painel 5	CD11c	CD86	DR	CD25	CD33	CD14	CD123	CD45

Fonte: Elaborado pela autora.

Para a marcação celular, primeiramente as células foram lavadas (1x) e ressuspensas com BD FACSFlow™ Sheath Fluid e foram incubadas com o agente de viabilidade celular FVS 780 (BD Horizon™ Fixable Stain 780) (899 µL de BD FACSFlow™ Sheath Fluid + 1 µL de FVS 780 + 100 µL de células ressuspensas) por 15 min, em temperatura ambiente protegidas da luz. Posteriormente, passaram pelo processo de centrifugação a 540 rcf por 5 minutos e pelo processo de lavagem. Após o descarte do sobrenadante, iniciou-se a marcação com os anticorpos (Quadro 4) que permaneceram em incubação por 15 minutos em temperatura ambiente no escuro. A lise de hemácias ocorreu com a incorporação da solução BD FACS™ Lysing Solution (diluição de 1:10 em PBS) por 15 minutos, em temperatura ambiente protegido da luz. Foi realizada a centrifugação (540 rcf, 5 minutos) e a lavagem com BD FACSFlow™ Sheath Fluid. Após a formação do *pellet*, as células foram ressuspensas e adquiridas em citômetro de fluxo BD FACSCanto™ II com o auxílio do *software* BD FACSDiva™ para aquisição dos dados.

Quadro 4. Anticorpos utilizados durante o estudo.

Anticorpos	Fabricante	Volume
CD16 FITC	Beckman Coulter	10 µL/amostra
CD123 PE	Beckman Coulter	5 µL/amostra
CD40 PerCpY5.5	Biolegend	5 µL/amostra
CD25 PeCy7	Becton Dickinson	2 µL/amostra
CD33 APC	Becton Dickinson	3 µL/amostra
CD14 APCH7	Becton Dickinson	3 µL/amostra
HLA-DR HV450	Becton Dickinson	2 µL/amostra
CD45 KO	Beckman Coulter	5 µL/amostra
CD11c FITC	Becton Dickinson	5 µL/amostra
CD86 PE	Invitrogen	5 µL/amostra
HLA-DR PerCp	Lifetech	5 µL/amostra
CD123 BV421	Becton Dickinson	5 µL/amostra
HLA-DR BV421	Becton Dickinson	3 µL/amostra

Fonte: Elaborado pela autora.

A análise dos dados foi realizada pelo *software* FlowJo V11 (Becton Dickinson Company). O esquema de *gating* desenvolvido está demonstrado nas figuras 18, 19, 20 e 21. Nos grupos tratados, foi observado um deslocamento na fluorescência do marcador APCH7 anti-CD14, possivelmente associado à internalização de AM remanescente no sobrenadante do lisado, portanto, para contornar essa variação, a definição das populações CD14⁺ foi realizada com base nos níveis de fluorescência observados na população linfocitária, que foi utilizada como referência interna tendo em vista que são negativas para o marcador em questão.

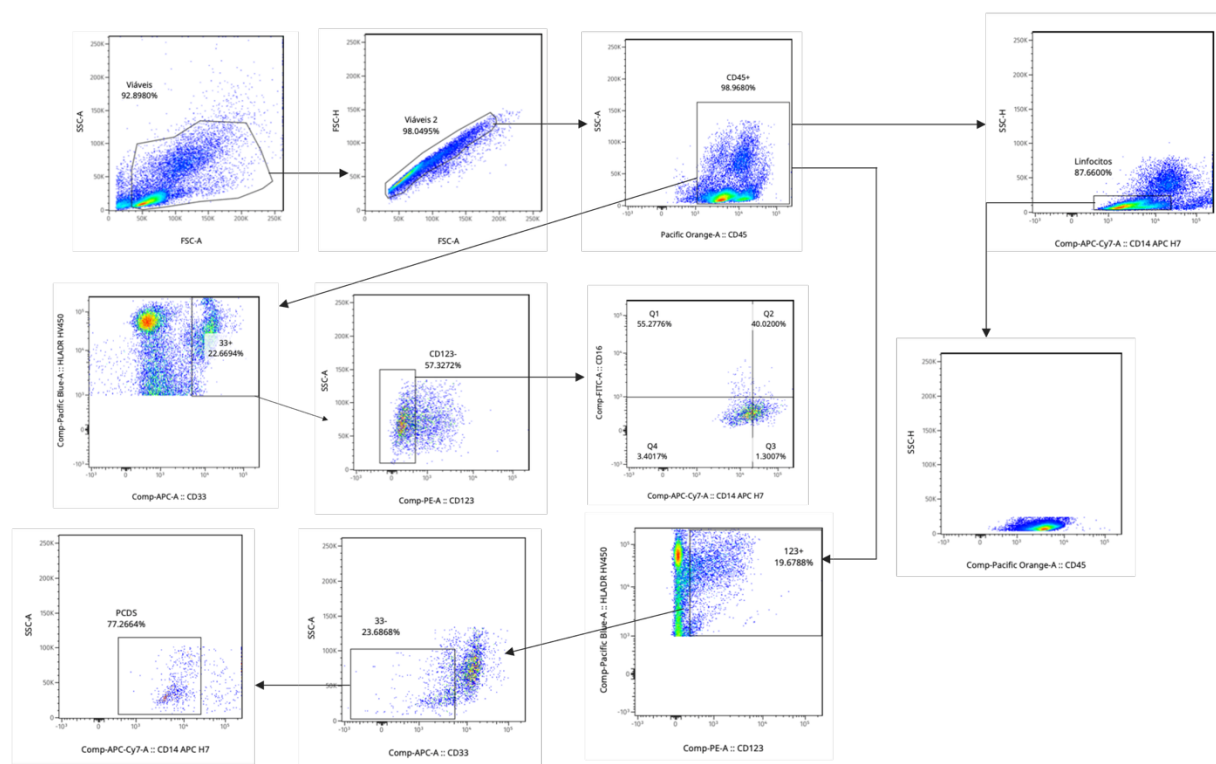


Figura 18. Esquema de *gating* aplicado no painel 1 para a avaliação da maturação das CDs e do perfil monocitário em células submetidas ao sobrenadante de lisados tumorais previamente tratados com MAGCIT-AM. As células passaram pelo processo de *gating* no software BD FACSDiva™, previamente, sendo distinguidas usando o BD Horizon™ Fixable Stain 780 e adquiridas apenas as populações viáveis. Posteriormente, foram feitas estratégias a fim de eliminar os *dupplets*, *debris* e as populações CD45⁻. As populações de cCDs, MφC, MφI e MφNC foram selecionadas pelos *gatings* HLA-DR⁺ e CD33⁺; SSC-A e CD123⁻; CD16 e CD14. Já as populações de pCDs foram obtidas através dos *gatings* HLA-DR⁺ e CD123⁺; SSC-A e CD33⁻; SSC-A e CD14⁻. (Fonte: Elaborado pela autora (2025)). Criado em: <https://BioRender.com>.

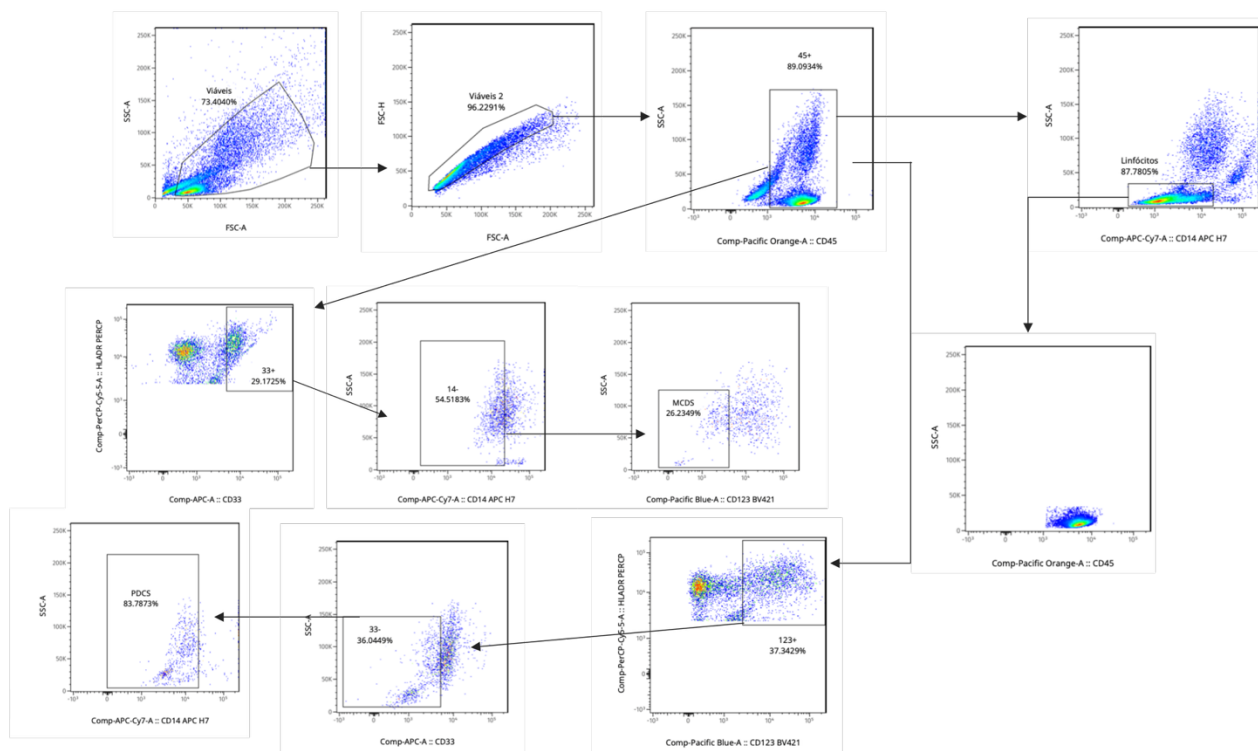


Figura 20. Esquema de *gating* aplicado no painel 2 para a avaliação da maturação das CDs em células submetidas ao sobrenadante de lisados tumorais previamente tratados com MAGCIT-AM. As células passaram pelo processo de *gating* no *software* BD FACSDiva™, previamente, sendo distinguidas usando o BD Horizon™ Fixable Stain 780 e adquiridas apenas as populações viáveis. Posteriormente, foram feitas estratégias a fim de eliminar os *dupplets*, *debris* e as populações CD45⁻. As populações de cCDs foram selecionadas pelos *gatings* HLA-DR⁺ e CD33⁺; SSC-A e CD123⁻; SSC-A e CD14⁻. Já as populações de pCDs foram obtidas através dos *gatings* HLA-DR⁺ e CD123⁺; SSC-A e CD33⁻; SSC-A e CD14⁻. (Fonte: Elaborado pela autora (2025)). Criado em: <https://BioRender.com>.

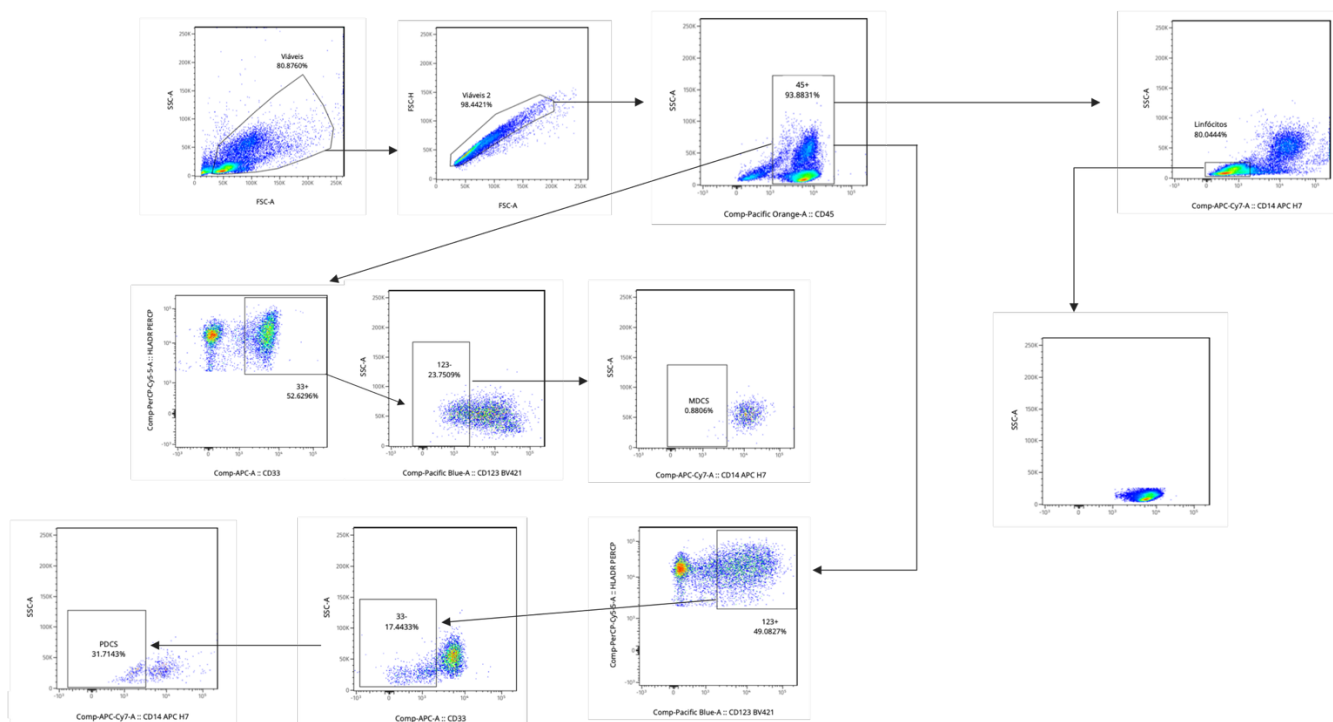


Figura 21. Esquema de *gating* aplicado no painel 2 para a avaliação da maturação das CDs em células não submetidas ao sobrenadante de lisados tumorais previamente tratados com MAGCIT-AM. As células passaram pelo processo de *gating* no *software* BD FACSDiva™, previamente, sendo distinguidas usando o BD Horizon™ Fixable Stain 780 e adquiridas apenas as populações viáveis. Posteriormente, foram feitas estratégias a fim de eliminar os *dupplets*, *debris* e as populações CD45⁻. As populações de cCDs foram selecionadas pelos *gatings* HLA-DR⁺ e CD33⁺; SSC-A e CD123⁻; SSC-A e CD14⁻. Já as populações de pCDs foram obtidas através dos *gatings* HLA-DR⁺ e CD123⁺; SSC-A e CD33⁻; SSC-A e CD14⁻. (Fonte: Elaborado pela autora (2025)). Criado em: <https://BioRender.com>.

4.6 Análise estatística

Os dados das análises quantitativas foram submetidos à análise de normalidade pelo teste Shapiro-Wilk. Para as amostras com distribuição normal (paramétricos) foram realizados os testes de variância simples (ANOVA), seguido pelo pós-teste de Tukey. Para os dados sem distribuição normal (não-paramétricos), foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn. As análises estatísticas foram realizadas pelo programa GraphPad Prism 10.0 (GraphPad software, EUA) e submetidas a testes com confiança estatística de 95%.

5. Resultados

5.1 Avaliação da internalização de MAGCIT-AM por MET e citometria de fluxo

Um passo de extrema importância para o desenvolvimento de novas plataformas visando o tratamento do câncer é o ensaio de citotoxicidade *in vitro*. Portanto, foi performedo o ensaio de Alamar Blue MAGCIT-AM em duas linhagens de carcinoma mamário (T-47D e MDA-MB-231), em uma linhagem de carcinoma de ovário (A2780) e em duas linhagens de células normais (HUVEC e HNTMC); resultados publicados em (Silva et al., 2021).

Tendo em vista a diferença expressiva nos ensaios de viabilidade celular, foi feita a análise de internalização de MAGCIT-AM por microscopia eletrônica de transmissão a fim de se elucidar os mecanismos de internalização do nanossistema pelas linhagens tumorais. Corroborando com os dados de citometria descritos em Silva et al., 2021 e com os achados na literatura (Wu et al., 2018; da Veiga Moreira et al., 2024), observa-se o acúmulo do nanossistema em lisossomos e/ou endossomos no citosol dessas células além da presença de prolongamentos citoplasmáticos indicando um processo de fagocitose (Figura 22).

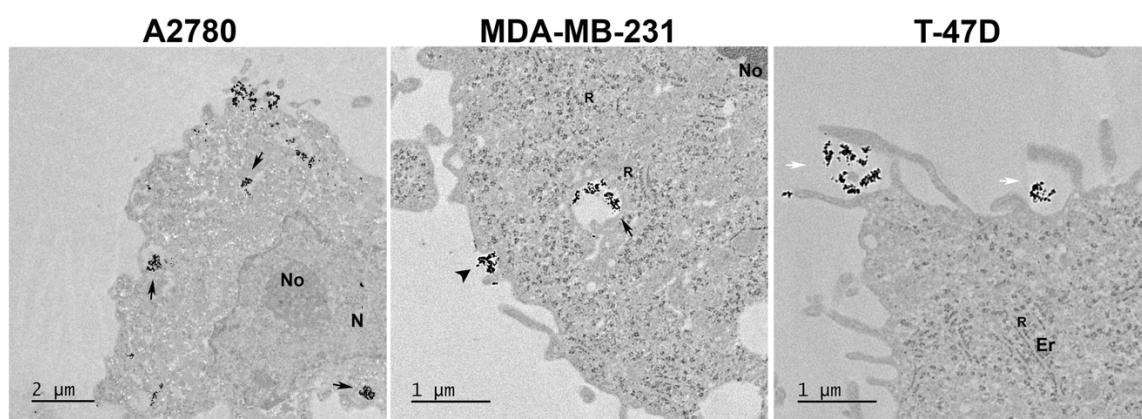


Figura 22. Internalização de MAGCIT-AM em células tumorais após tratamento com o nanossistema (0,78 µg/mL de AM, 6 horas). Imagens ultraestruturais das linhagens tumorais estudadas obtidas por microscopia eletrônica de transmissão (MET), demonstram a citolocalização de MAGCIT-AM em lisossomo/ endossomo (setas pretas). A presença de prolongamentos citoplasmáticos indica a fagocitose (setas brancas). Cabeça de seta preta indicam a invaginação da membrana, *N* núcleo, *No* nucléolo, *Er* Retículo endoplasmático e *R* ribossomos. Barra de escala = 2 µm e 1 µm.

Como pode se observar na figura 22, obtida em um maior aumento, é possível visualizar as estruturas vesiculares contendo MAGCIT-AM em seu interior, reforçando os mecanismos endocíticos/fagocíticos. Já na figura 23, que dispõe imagens com campo ampliado e menor aumento, nota-se um acúmulo mais extenso e generalizado de nanopartículas no ambiente intracelular, evidenciando que a distribuição citoplasmática de MAGCIT-AM não se restringe apenas à locais próximos a membrana plasmática, mas também em ambientes mais internos próximos do núcleo celular (Figura 23). Além da invaginação da membrana celular observada nas linhagens, também foi evidenciado a expansão dessa estrutura, uma indicação da captação de MAGCIT-AM por fagocitose.

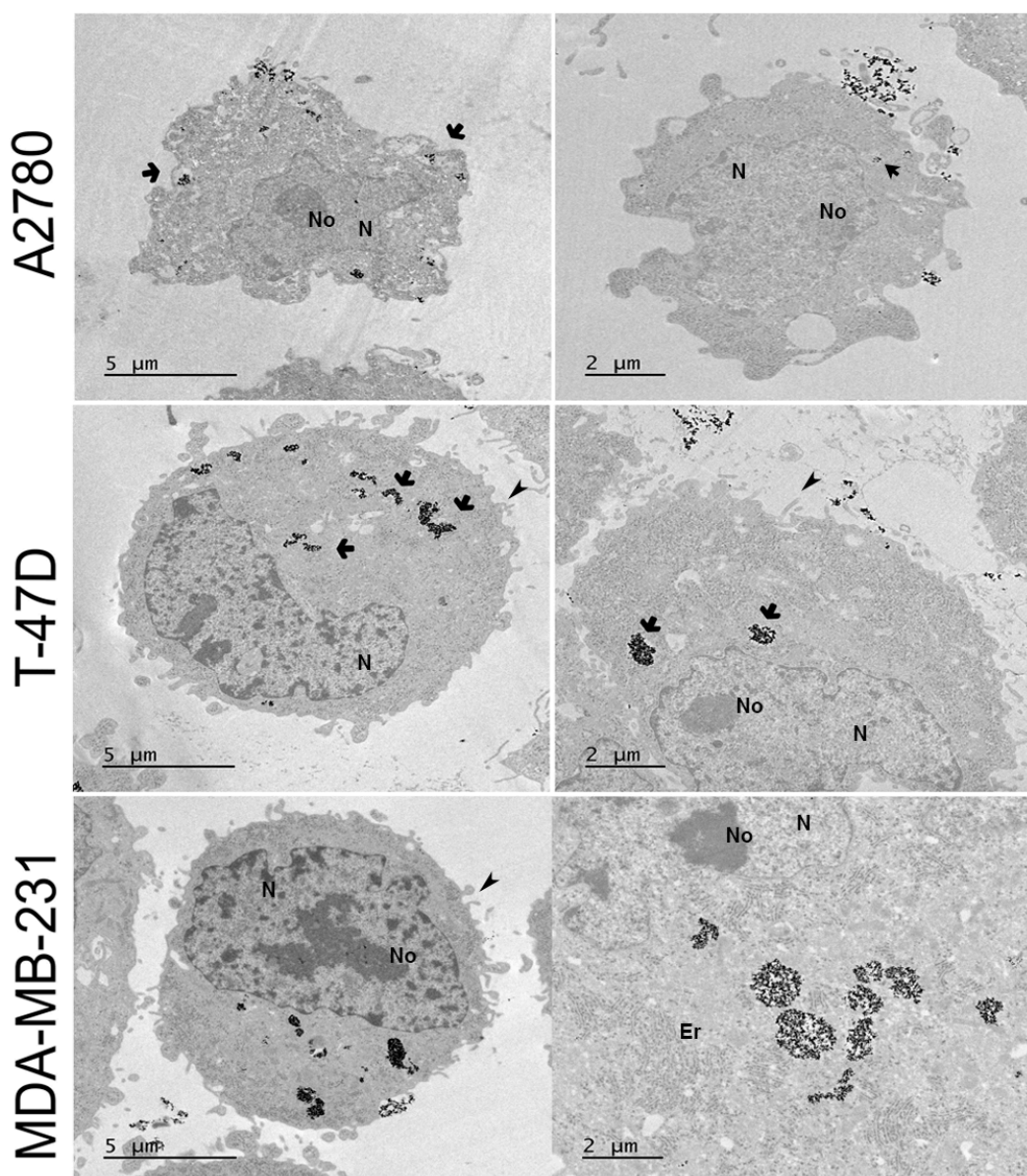


Figura 23. Internalização e movimentação de MAGCIT-AM em células de câncer após tratamento com o nanocomplexo (0,78 µg/mL de AM, 6 horas). Imagens ultraestruturais das linhagens tumorais estudadas obtidas por microscopia eletrônica de transmissão, demonstram a citolocalização de MAGCIT-AM em lisossomo/ endossomo (setas pretas). Cabeças de setas preta indicam a expansão de membrana plasmática, *N* núcleo, *No* nucléolo, *Er* Retículo endoplasmático. Barra de escala = 2 e 5 µm.

Ainda, pela citometria de fluxo, é possível se averiguar que não há diferença significativa nos níveis de internalização de MAGCIT-AM entre as linhagens celulares, incluindo as células não tumorais e a linhagem triplo negtiva, evidenciando que os resultados obtidos pelos ensaios de viabilidade celular são ocasionados devido ao mecanismo de ação da nanopartícula nos diferentes tipos celulares estudados, e não pela diferença na quantidade de partícula internalizada (Figura 24).

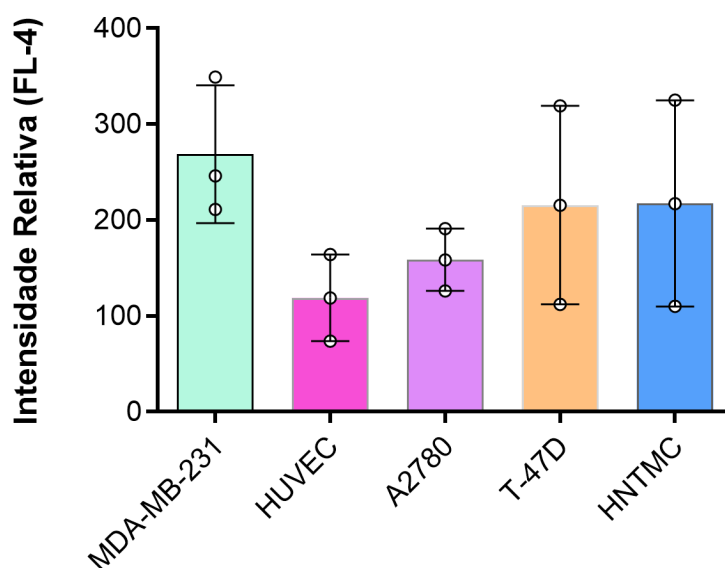


Figura 24. Internalização de MAGCIT-AM em células normais e tumorais. As células foram tratadas com o nanossistema (0,78 µg/mL de AM, por 6h) e analisadas por citômetro de fluxo FACSCalibur. Resultados apresentados em média ± desvio padrão referentes a 3 experimentos. Não se observa diferença estatística entre os grupos estudados.

5.2 Alteração da proliferação celular na linhagem MDA-MB-231

A linhagem MDA-MB-231, linhagem de câncer de mama triplo negativo humano, demonstrou ser mais resistente às alterações ocasionadas pelo nanossistema, como observado em Silva et al., 2021. Portanto, a fim de verificar se, apesar de demonstrar uma baixa porcentagem de morte celular derivada de MAGCIT-AM, a linhagem poderia estar sofrendo alguma alteração em seus níveis de proliferação celular, foi realizado o ensaio com CFSE, composto fluorescente que interagem com aminas citoplasmáticas (Quah et al., 2007).

Observando os resultados obtidos, nota-se que MAGCIT-AM foi capaz de inibir a proliferação dessas células *in vitro* 48 horas após o tratamento com a concentração de 0,78 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 25).

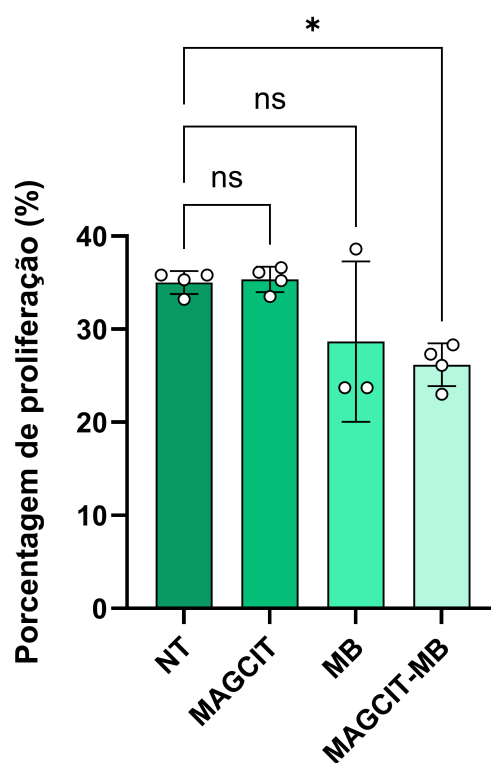


Figura 25. Proliferação celular da linhagem MDA-MB-231 por CFSE após tratamento com MAGCIT-AM (48 horas). Células foram incubadas com MAGCIT (3,84 $\mu\text{g/mL}$), azul de metileno livre (0,78 $\mu\text{g/mL}$) e MAGCIT-AM (0,78 $\mu\text{g/mL}$ de AM) por 48h. Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes em triplicata. ns = não significativo, * $p < 0.05$. *Tratamento comparado ao controle não tratado.

5.3 Fragmentação nuclear

A fragmentação nuclear uma alteração correlacionada com diversos tipos de morte celular, é caracterizada pela clivagem do material genético localizado no núcleo celular por nucleases originando fragmentos menores (Monier & Suzanne, 2021). Como observado pelos ensaios de morte celular por citometria de fluxo (Silva et al., 2021), MAGCIT-AM foi capaz de induzir ambos os tipos de via de morte celular apoptose e morte lítica, sendo predominantemente o segundo padrão, ainda se observando uma pequena porcentagem por apoptose.

Considerando a importância de se analisar a indução de fragmentação nuclear nas células tumorais humanas em resposta a MAGCIT-AM, foi realizada a marcação com iodeto de propídeo para citometria de fluxo, o qual, resultados inferiores ao de uma célula em interfase foram interpretados como células em fragmentação nuclear. Como apresentado na figura 26, as células controles apresentam valores significativamente inferiores às células tratadas com MAGCIT-AM, demonstrando que o nanossistema foi capaz de induzir uma maior taxa de fragmentação nuclear.

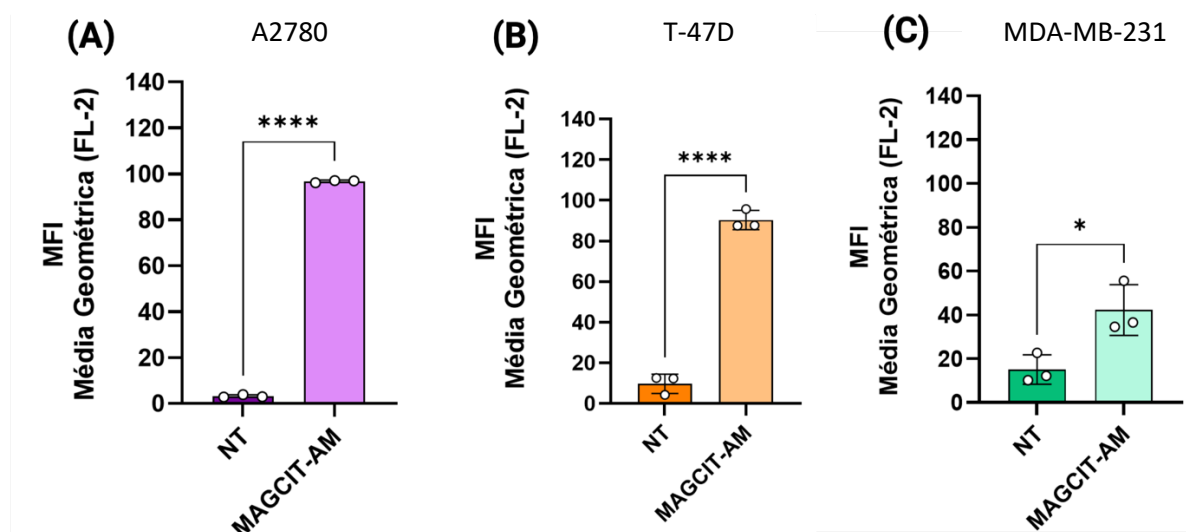


Figura 26. Ensaio de fragmentação nuclear em células tumorais. (A) A2780, (B) T-47D e (C) MDA-MB-231. Células foram incubadas com MAGCIT-AM (0,78 ug/mL de AM) por 24 horas. Após tratamento, as células foram marcadas com iodeto de propídeo (FL-2) e analisadas em citômetro de fluxo FACSCalibur. Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes em triplicata. * $p < 0.05$ e **** $p < 0.0001$. *Tratamento comparado ao controle não tratado.

5.4 Biogênese de corpúsculo lipídico

Observando a importância dos corpúsculos lipídicos, uma organela envolvida com o acúmulo dos lipídeos citoplasmáticos, no processo de desenvolvimento tumoral e o amplo papel dessas moléculas em diversos processos celulares como, crescimento, proliferação, diferenciação, mortalidade, foi avaliado a alteração no processo de biogênese do corpúsculo lipídico por meio de sua avaliação pela sonda BODIPY 493/503 (Life Technologies). Após 48 horas de tratamento, com o IC₅₀ pré-determinado, nas linhagens de câncer de mama (T-47D e MDA-MB-231) o grupo não tratado apresentou valores de fluorescência superiores quando comparados àqueles incubados com MAGCIT-AM, indicando que o nanossistema atua negativamente na formação dessa organela. Já para a linhagem de câncer de ovário, a A2780, os dados demonstram que o tratamento não promoveu nenhuma alteração na biogênese dessas estruturas (Figura 27).

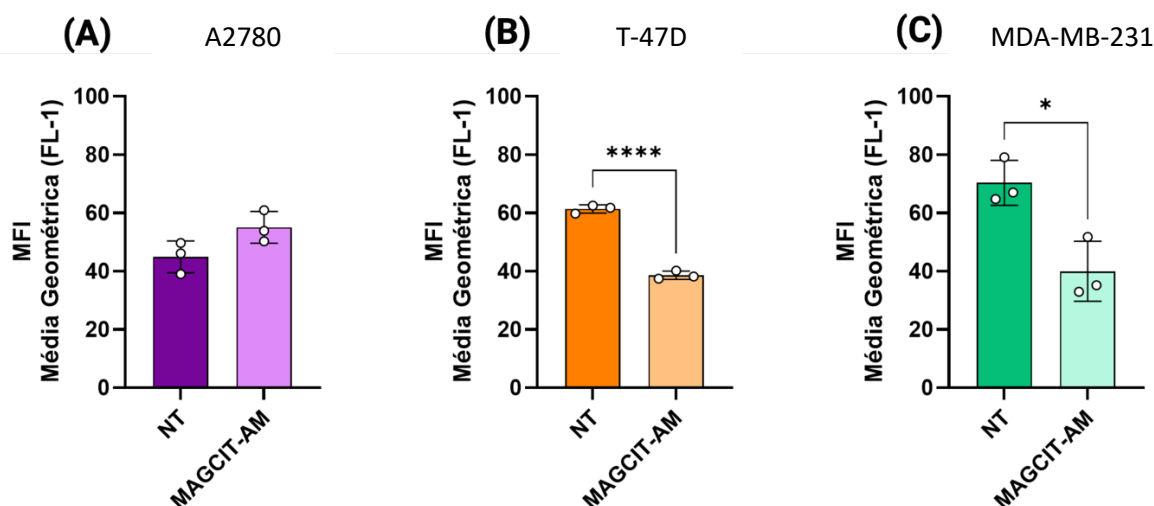


Figura 27. Ensaio de biogênese de corpúsculo lipídico em células tumorais. (A) A2780, **(B)** T-47D e **(C)** MDA-MB-231. Células foram incubadas com MAGCIT-AM (0,78 µg/mL de AM) por 48 horas. Após tratamento, as células foram marcadas com a sonda Bodipy (FL-1) e analisadas em citômetro de fluxo FACSCalibur. Os dados representam a média ± desvio padrão de três experimentos independentes em triplicata. * $p < 0.05$ e **** $p < 0.0001$. *Tratamento comparado ao controle não tratado.

5.5 Análise da polarização mitocondrial

O processo de morte celular é caracterizado pela sequência de diversos eventos intracelulares, dentre eles, a perda do potencial transmembranar mitocondrial ($\Delta\Psi$ M) (Sakamuru et al., 2022). Como um relevante marcador de dano mitocondrial, foi utilizado o

ensaio com o corante JC-1, em que, em células saudáveis, o JC-1 é internalizado e se acumula nas mitocôndrias, formando os agregados J e, conseqüentemente, florescendo na região do vermelho. Já em células não saudáveis, o corante entra em menor quantidade, devido a perda do $\Delta\Psi$ M, não atingindo a concentração necessária para desencadear a formação dos agregados J, mantendo a sua fluorescência verde (Smiley et al., 1991). Portanto, considerando o processo de funcionamento do JC-1, observa-se que a razão entre fluorescência vermelho/verde pode ser considerada uma avaliação direta do estado de $\Delta\Psi$ M, em que, quanto maior essa razão mais agregados J são formados, simbolizando uma célula saudável e, quanto menor essa razão poucos agregados J são formados, simbolizando uma célula não saudável (Rovini et al., 2021).

Tendo isso em vista, a composição de MAGCIT-AM e o seu potencial na geração de EROs, realizou-se o experimento para a análise dos efeitos do nanossistema na mitocôndria de células tumorais. De acordo com as análises de citometria, pode-se concluir que para as linhagens T-47D e A2780, MAGCIT-AM foi capaz de diminuir a razão de fluorescência vermelho/verde, sugerindo um processo de morte celular correlacionado com o dano mitocondrial (Figura 28). Para a linhagem MDA-MB-231, que já havia se mostrado mais resistente ao tratamento proposto, não se observou diferença significativa entre o grupo controle e tratado.

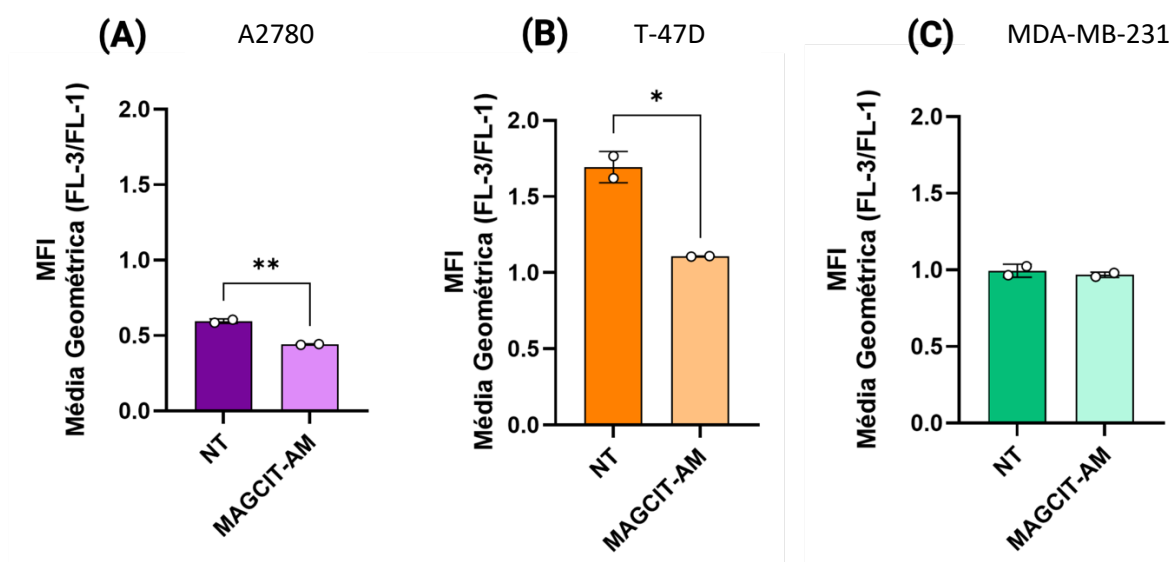


Figura 28. Análise da alteração do potencial transmembranar mitocondrial ($\Delta\Psi$ M) em células tumorais. (A) A2780, (B) T-47D e (C) MDA-MB-231. Células foram incubadas com MAGCIT-AM (0,78 μ g/mL de AM) por 6 horas. Após tratamento, as células foram marcadas com a molécula JC-1 e analisadas em citômetro de fluxo FACSCalibur (FL-1 e FL-2). Os dados representam a média da razão de FL-3/FL-1 $\pm$ desvio padrão de três experimentos

independentes em triplicata. * $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$. *Tratamento comparado ao controle não tratado.

Adicionalmente, a distribuição intracelular do corante e a integridade mitocondrial foram avaliadas por microscopia confocal, com o objetivo de avaliar qualitativamente o padrão de emissão do JC-1 e a alteração no $\Delta\Psi_M$ nas linhagens sensíveis ao tratamento. Corroborando com os ensaios de citometria observamos a predominância dos monômeros em relação aos dímeros após o tratamento com MAGCIT-AM nas linhagens exibiram alterações no potencial transmembranar mitocondrial, T-47D e A2780 (Figura 29).

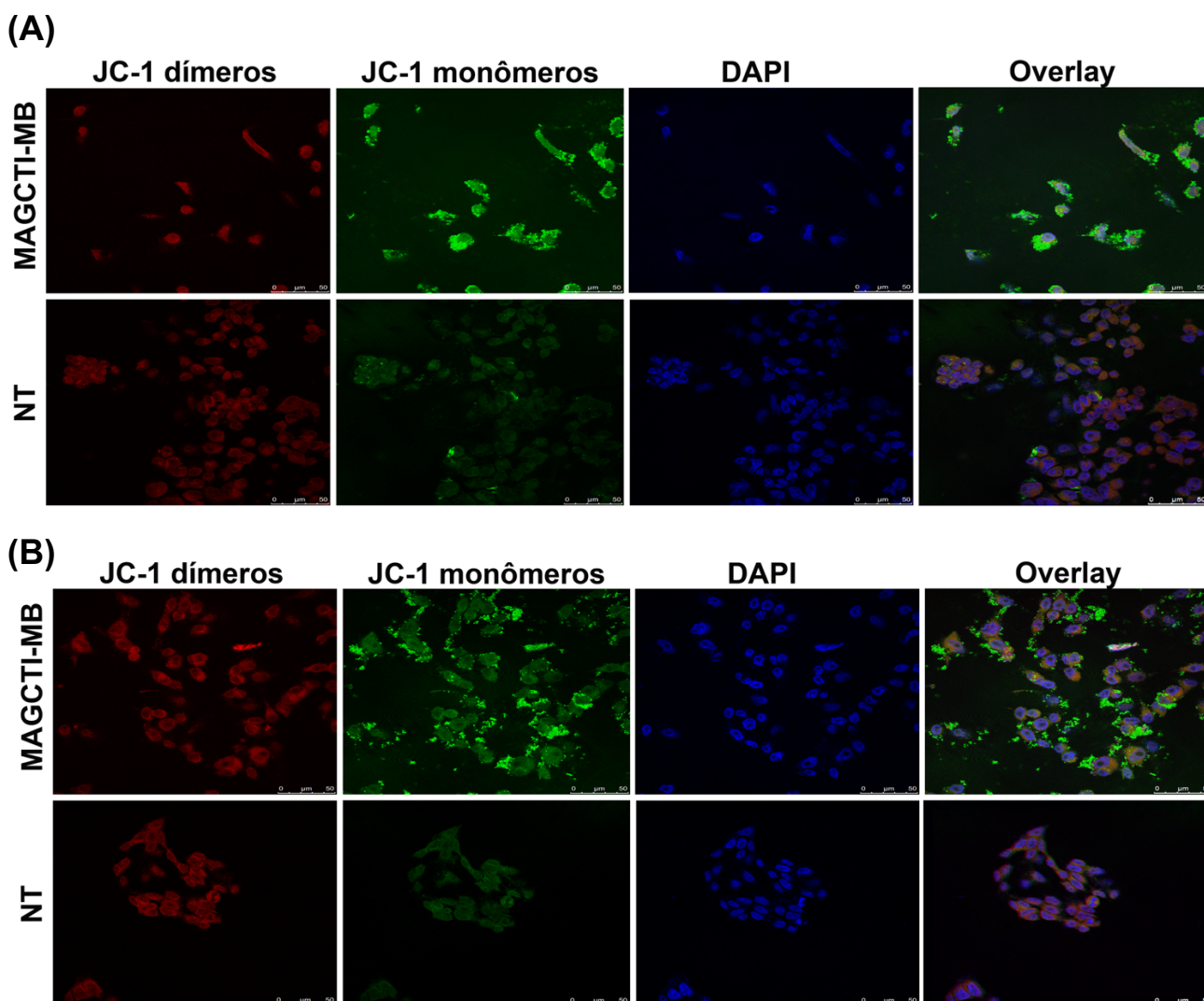


Figura 29. Análise da alteração do potencial transmembranar mitocondrial ($\Delta\Psi_M$) em células tumorais por microscopia confocal. Imagens de fluorescência das linhagens tumorais **(A)** A2780, **(B)** T-47D obtidas por microscopia confocal, demonstram a predominância de monômeros (verde) de JC-1 em relação aos seus dímeros (vermelho). Células

foram incubadas com MAGCIT-AM (0,78 µg/mL de AM) por 6 horas. Após tratamento, as células foram marcadas com a molécula JC-1. Barra de escala = 50 µm.

5.6 *Alteração morfológica das células tumorais pós-tratamento com MAGCIT-AM*

Para demonstrar as alterações morfológicas e estruturais nas células tumorais humanas, foi realizada microscopia de luz após o processo de coloração com panótico rápido, em que são evidenciados o citoplasma e o núcleo celular. Pôde-se observar que, após o tratamento com MAGCIT-AM (0,78 µg/mL por 48h), houve uma diminuição expressiva na quantidade de células aderidas nos grupos de T-47D e A2780. Além da perda de confluência, nota-se uma redução do tamanho celular, perda dos pontos focais de adesão e projeções citoplasmáticas (Figura 30).

A linhagem MDA-MB-231 apresentou alterações morfológicas, com uma leve redução da confluência celular e com perda dos pontos de adesão e aumento do tamanho celular. Em todas as linhagens estudadas, é possível se observar a internalização de MAGCIT-AM evidenciada pelo aglomerado de coloração marrom no citoplasma.

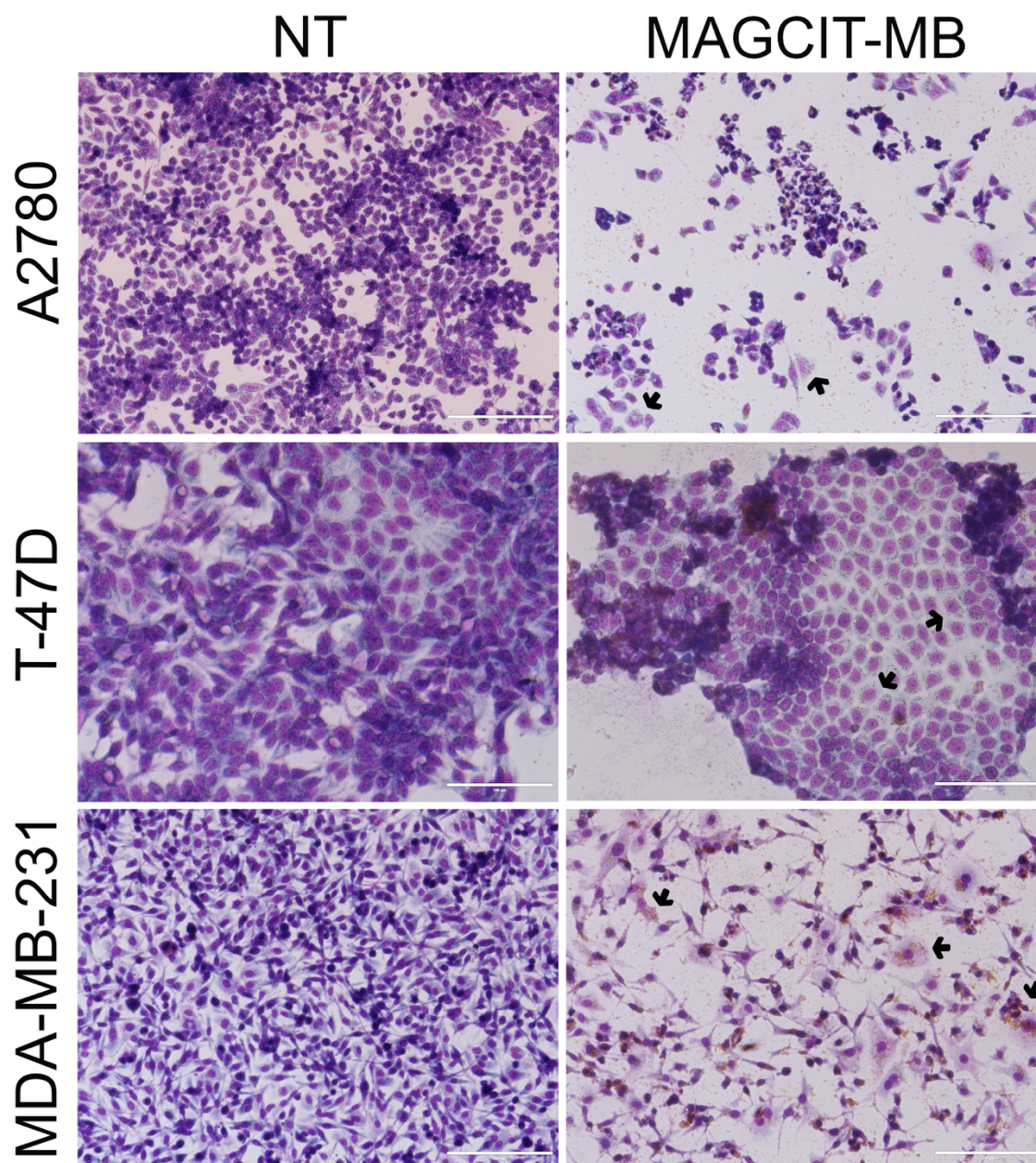


Figura 30. Análise da alteração morfológica das células tumorais (A2780, T-47D e MDA-MB-231) após coloração com panótico rápido. Células foram incubadas com MAGCIT-AM (0,78 $\mu\text{g/mL}$) por 48 horas. Após tratamento, as células foram coradas com o kit de panótico rápido e analisadas em microscópio de luz. Setas pretas indicam a internalização de MAGCIT-AM. Barra de escala = 100 μm .

5.7 Migração celular: *Wound Healing*

Objetivando-se investigar a atividade do nanossistema, MAGCIT-AM, interferir na capacidade migratória das células tumorais, foi realizado o ensaio de *Wound Healing*. Esse método se baseia na realização de uma ranhura padrão sobre o tapete celular confluyente e

aferição, ao longo do tempo, de sua dimensão (Kauanova et al., 2021). As imagens obtidas por microscopia de contraste de fase, demonstram que o tratamento com MAGCIT-AM reduziu significativamente a mobilidade celular em todas as linhagens tumorais avaliadas, quando comparadas aos seus respectivos controles não tratados (Figura 31). Adicionalmente, realizou-se a quantificação da área da ranhura no T0 e após 48h de tratamento do grupo controle não tratado e do grupo MAGCIT-AM, resultados que corroboram com as imagens obtidas (Figura 32).

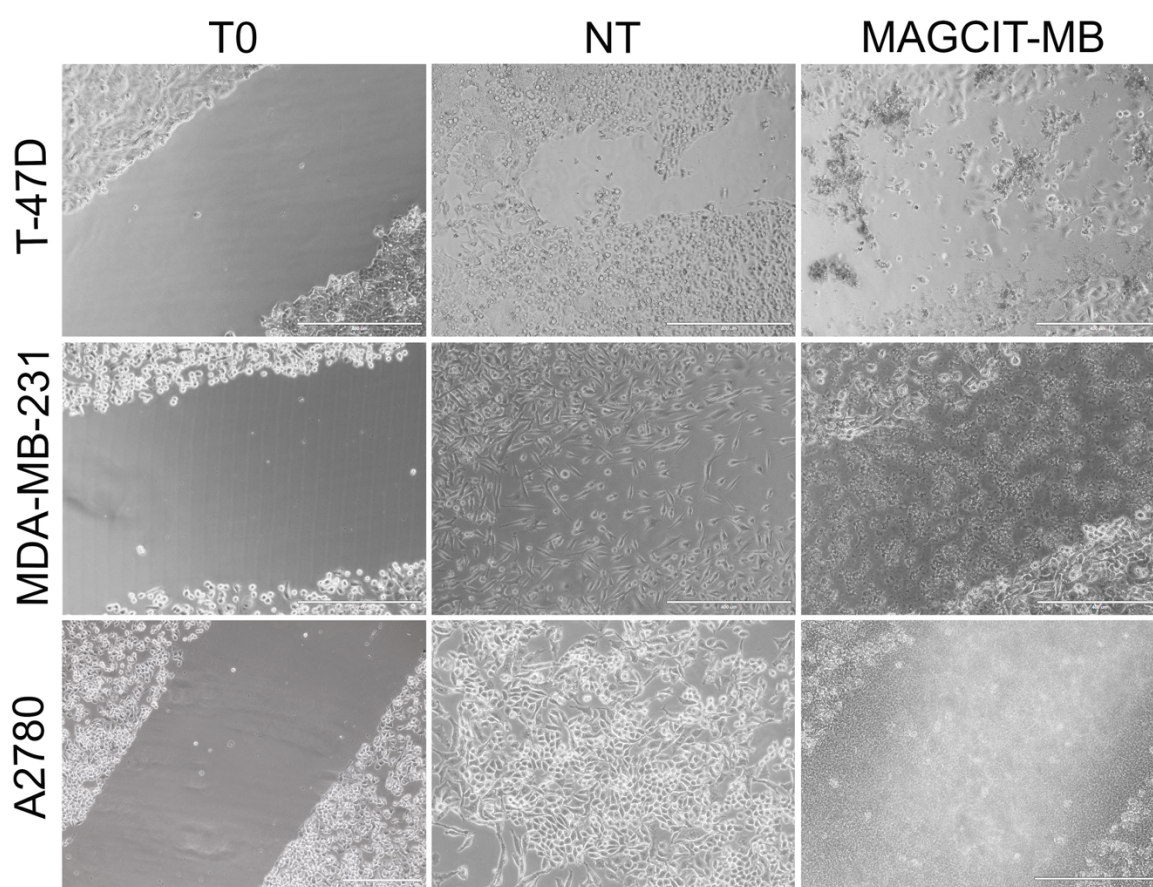


Figura 31. Análise de *Wound Healing* nas linhagens tumorais. As imagens indicam o tempo T₀, células controle após 48h e células após o tratamento com MAGCIT-AM por 48 horas. Barra de escala = 400 μ m.

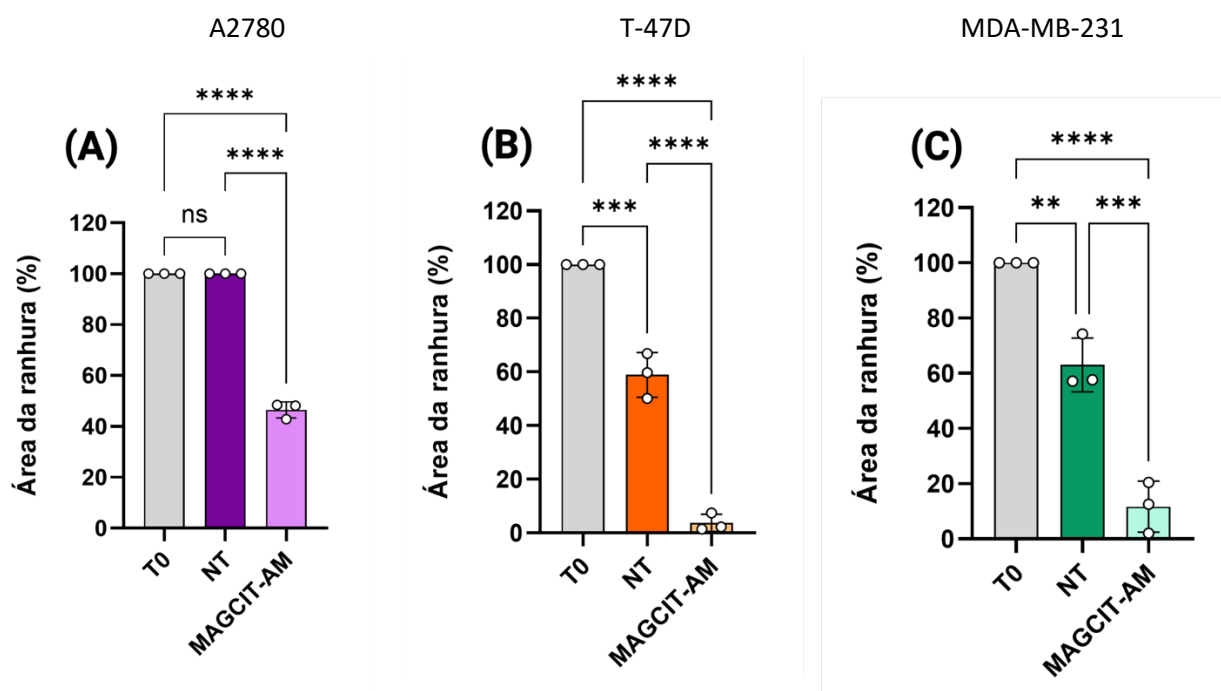


Figura 32. Percentual da área de fechamento da ranhura pelo ensaio de *Wound Healing*. A área da ferida foi mensurada no tempo T0 e após 48h de tratamento com MAGCIT-AM (0,25 µg/mL para A2780, 0,59 µg/mL para T-47D e 3,12 µg/mL para MDA-MB-231), utilizando o software ImageJ. Os gráficos representam a média de três campos por poço e mostram a porcentagem de fechamento da ferida em 48h, calculada com base na diferença entre as áreas iniciais e finais. A significância estatística foi determinada pelo teste *t* de Student, considerando ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ e **** $P < 0,0001$. * Tratamento comparado ao controle não tratado (NT).

5.8 Perfil bioquímico e avaliação do estresse oxidativo nas linhagens celulares

Com a finalidade de elucidar o mecanismo de ação do nanossistema e avaliar a sua associação com a modulação do estresse oxidativo celular, foram realizados os ensaios de peroxidação lipídica (TBARS), quantificação de espécies reativas de oxigênio, atividade das enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase e a catalase e dosagem de glutathiona total. Baseando-se na literatura e com a hipótese de ocorrência da morte celular ferroptose, foram escolhidos parâmetros que nos permitissem a compreensão geral dos distintos mecanismos de resposta das linhagens estudadas (Chen et al., 2018; Hayes et al., 2020; Masenga et al., 2023).

5.8.1 T-47D

A linhagem de câncer de mama, T-47D, responsiva ao tratamento, como descrito em Silva et al., 2021, não apresentou diferenças estatisticamente significativas nos níveis de glutathiona total (Figura 33A), catalase (Figura 33B) e superóxido dismutase (Figura 33C), após 24h de tratamento com o nanossistema. Resultados que, quando analisados juntamente com a

produção das espécies reativas de oxigênio e os níveis de peroxidação lipídica, indicam que a morte celular ocasionada, vista por citometria de fluxo, está correlacionada com a indução do estresse oxidativo. Pode-se observar com os demais ensaios, um aumento exacerbado na produção de EROs após 6h de tratamento (Figura 33D), o qual foi revertido após 24h de exposição a MAGCIT-AM (Figura 33E). Em contrapartida, nota-se que a peroxidação lipídica, indicada pela medida de TBARS, apresentou um aumento significativo apenas nas 24h pós-tratamento (Figura 33G), reforçando a hipótese de o aumento das espécies reativas de oxigênio estar sendo convertido em peroxidação lipídica, levando ao processo da ferroptose.

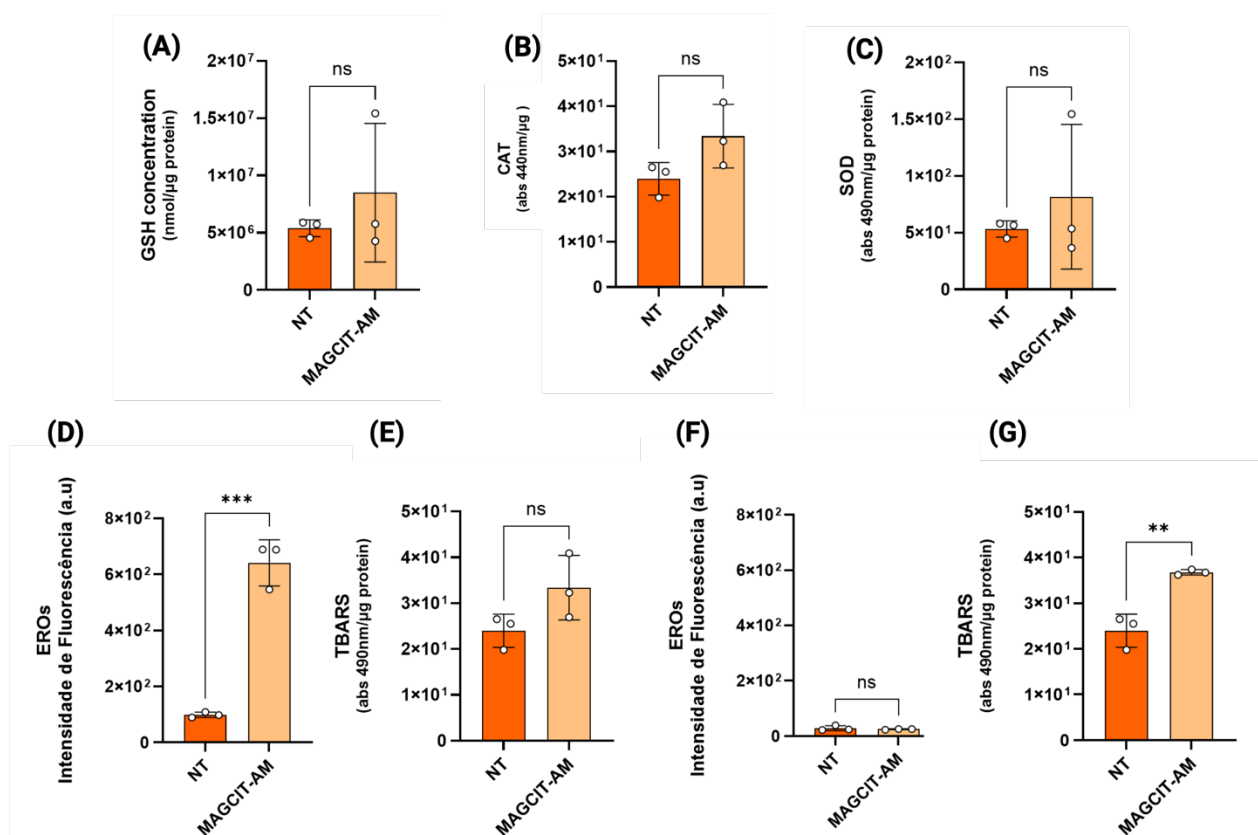


Figura 33. Avaliação do estresse oxidativo e perfil antioxidante na linhagem T-47D após o tratamento com MAGCIT-AM. Quantificação de (A) glutatona total (GSH), (B) catalase, (C) superóxido dismutase após 24h de tratamento (D) e (E) Representam os níveis de espécies reativas de oxigênio de lipídeos peroxidados em 6h, respectivamente e (F) e (G) representam os mesmos parâmetros após 24h de tratamento. Os tratamentos foram realizados com MAGCIT-AM (0,59 µg/mL) e os dados foram expressos como média ± desvio padrão, calculados a partir de três réplicas técnicas independentes. A significância estatística foi determinada pelo teste *t* de Student, considerando ***P* < 0,01, ****P* < 0,001. * Tratamento comparado ao controle não tratado (NT).

5.8.2 A2780

Na linhagem A2780, se observa uma resposta antioxidante mais bem estruturada ao tratamento de 24h com MAGCIT-AM, com aumentos estatisticamente significativos dos níveis de glutathiona total (Figura 34A), bem como na quantidade de CAT (Figura 34B) e SOD (Figura 34C). Com relação as espécies reativas de oxigênio, nota-se um aumento exacerbado nas primeiras 6 horas de tratamento (Figura 34D), processo revertido após 24h (Figura 34F), atingindo níveis inferiores aos observados no controle. Assim como na linhagem T-47D, observa-se uma conversão das EROs em lipídeos peroxidados, onde se constata elevados níveis dos mesmos, após 24h de tratamento (Figura 34G). Curiosamente, verifica-se elevados níveis de L-ROS nos controles não tratados nas primeiras 6h (Figura 34E), fato que prontamente é revertido pelo sistema antioxidante, como pode-se observar nos resultados de 24h (Figura 34).

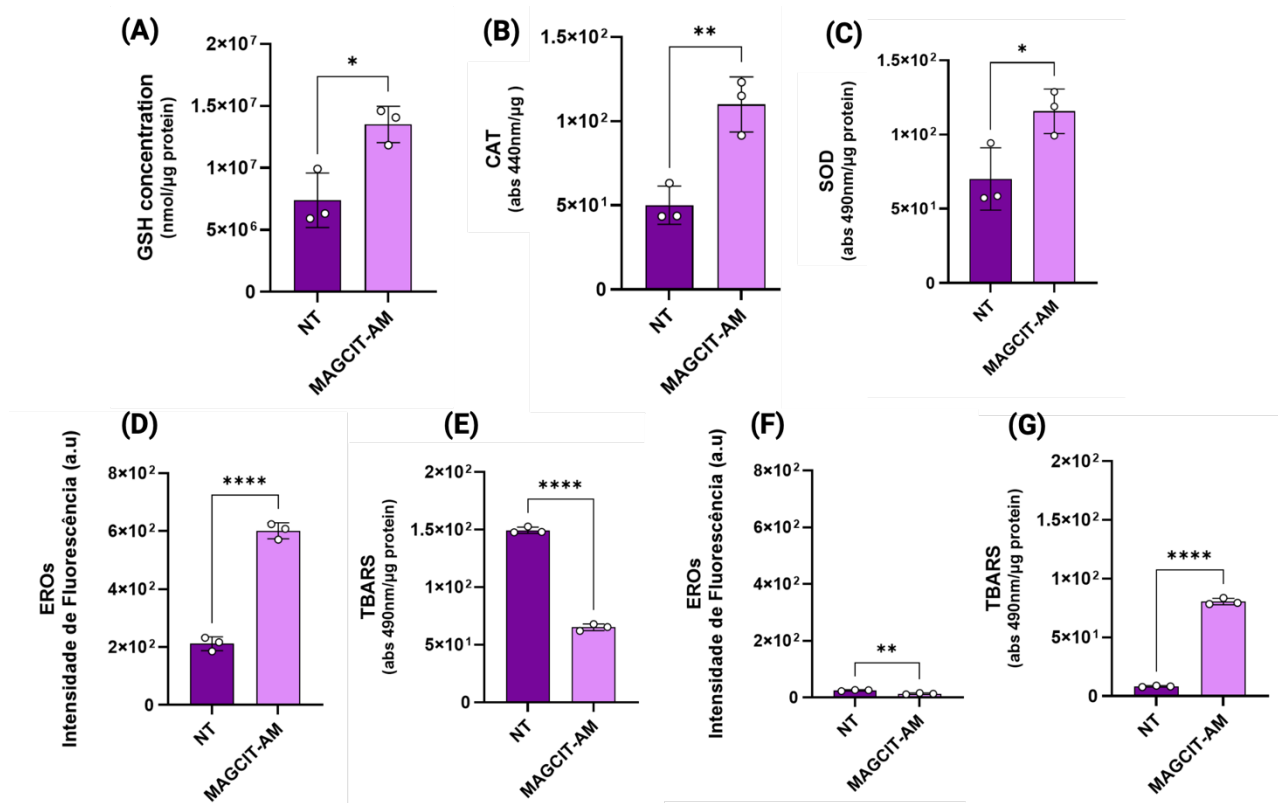


Figura 34. Avaliação do estresse oxidativo e perfil antioxidante na linhagem A2780 após o tratamento com MAGCIT-AM. Quantificação de (A) glutathiona total (GSH), (B) catalase, (C) superóxido dismutase após 24h de tratamento (D) e (E) Representam os níveis de espécies reativas de oxigênio de lipídeos peroxidados em 6h, respectivamente e (F) e (G) representam os mesmos parâmetros após 24h de tratamento. Os tratamentos foram realizados com MAGCIT-AM (0,25 μg/mL) e os dados foram expressos como média ± desvio padrão, calculados a partir de três réplicas técnicas independentes. A significância estatística foi

determinada pelo teste *t* de Student, considerando ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ e **** $P < 0,0001$.

* Tratamento comparado ao controle não tratado (NT).

5.8.3 MDA-MB-231

Tendo em vista a sua resistência ao tratamento, o perfil bioquímico correlacionado com o sistema antioxidante e com o estresse oxidativo é de extrema importância para elucidar os mecanismos que estão sendo modulados pela linhagem MDA-MB-231. Corroborando com a hipótese inicial, essas células demonstraram capacidade de reverter rapidamente os efeitos iniciais do aumento das espécies reativas de oxigênio. Embora não tenham apresentado aumentos estatisticamente significativos no níveis de glutathiona total (Figura 35A) e de SOD (Figura 35B), o tratamento com MAGCIT-AM não levou à efeitos danosos celulares, como observado em Silva et al., 2021. Tendo isso em vista, observa-se que o nanossistema foi capaz de induzir um aumento exacerbado das EROs nas primeiras 6h (Figura 35D) e convertê-las em L-ROS (Figura 35E), entretanto, mecanismos celulares demonstram reverter esse processo, em apenas 24h (Figuras 35F e 35G), por meio da produção de altos níveis de catalase (Figura 35C), enzima correlacionada com a decomposição de peróxido de hidrogênio e restauração do equilíbrio redox celular (Glorieux & Buc Calderon, 2024).

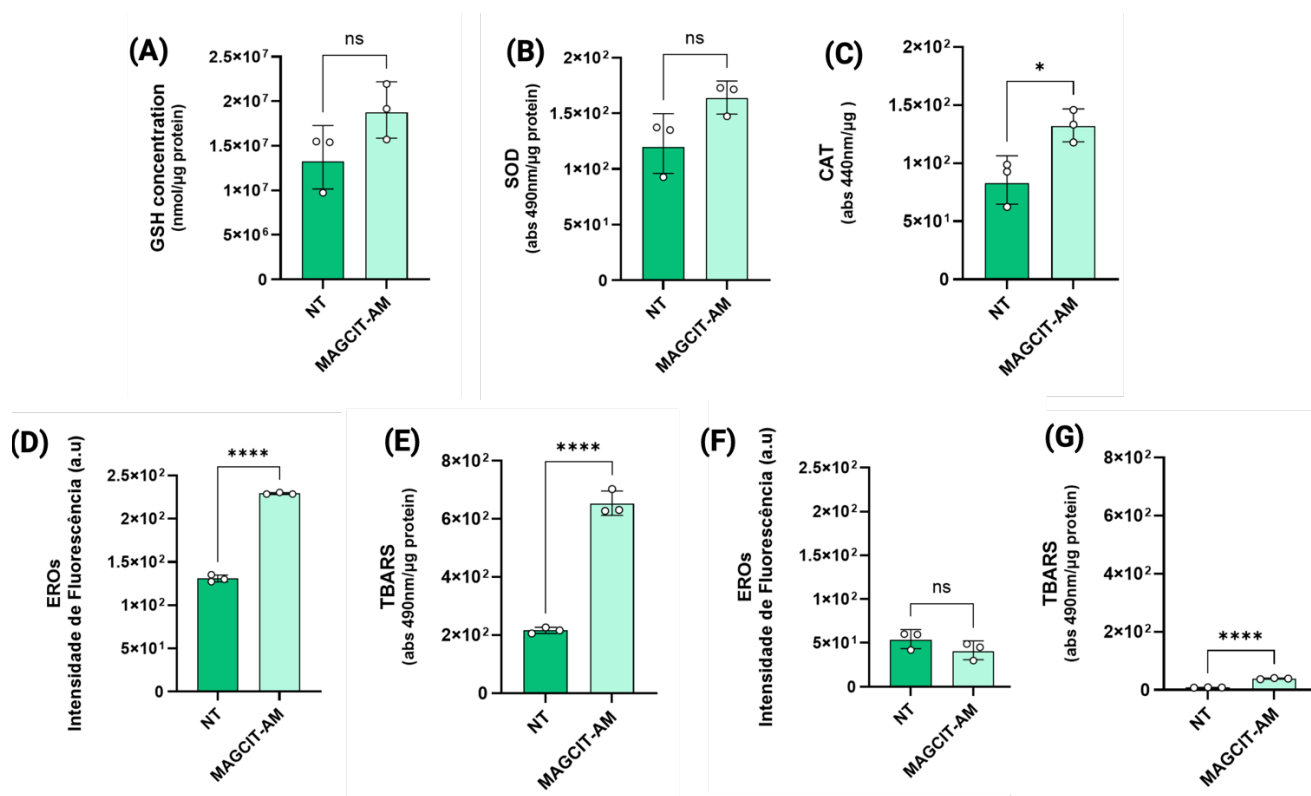


Figura 35. Avaliação do estresse oxidativo e perfil antioxidante na linhagem MDA-MB-231 após o tratamento com MAGCIT-AM. Quantificação de (A) glutathiona total (GSH),

(B) superóxido dismutase e (C) catalase após 24h de tratamento. (D) e (E) Representam os níveis de espécies reativas de oxigênio de lipídeos peroxidados em 6h, respectivamente e (F) e (G) representam os mesmos parâmetros após 24h de tratamento. Os tratamentos foram realizados com MAGCIT-AM (3,12 µg/mL) e os dados foram expressos como média ± desvio padrão, calculados a partir de três réplicas técnicas independentes. A significância estatística foi determinada pelo teste *t* de Student, considerando **P* < 0,05 e *****P* < 0,0001. * Tratamento comparado ao controle não tratado (NT).

5.9 *Análise da maturação das células dendríticas e do perfil monocitário*

A fim de elucidar a capacidade dos lisados de células tumorais tratadas com o nanossistema na modulação de células dendríticas, foi realizado o ensaio de imunofenotipagem com marcadores de maturação previamente descritos na literatura (Schaupp et al., 2020; Hölken & Teusch, 2023; Belabed et al., 2025). Para isso, foram obtidas as células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) de seis voluntárias. Optou-se pela escolha das linhagens tumorais humanas T-47D e A2780 tendo em vista que a linhagem MDA-MB-231 não apresentou morte celular expressiva, como observado pelos ensaios de citotoxicidade (Silva et al., 2021).

Como descrito anteriormente, as células dendríticas são subdivididas em diferentes populações de acordo com seus marcadores de superfície e suas funções, entretanto somente os subtipos mCDs e pCDS estão presentes no sangue periférico. Levando isso em consideração, realizou-se a montagem de dois painéis principais voltados para a separação de monócitos e células dendríticas de sangue periférico e, optou-se por aqueles que seriam capazes de selecionar melhor as populações de células dendríticas e monócitos (Figura 36).

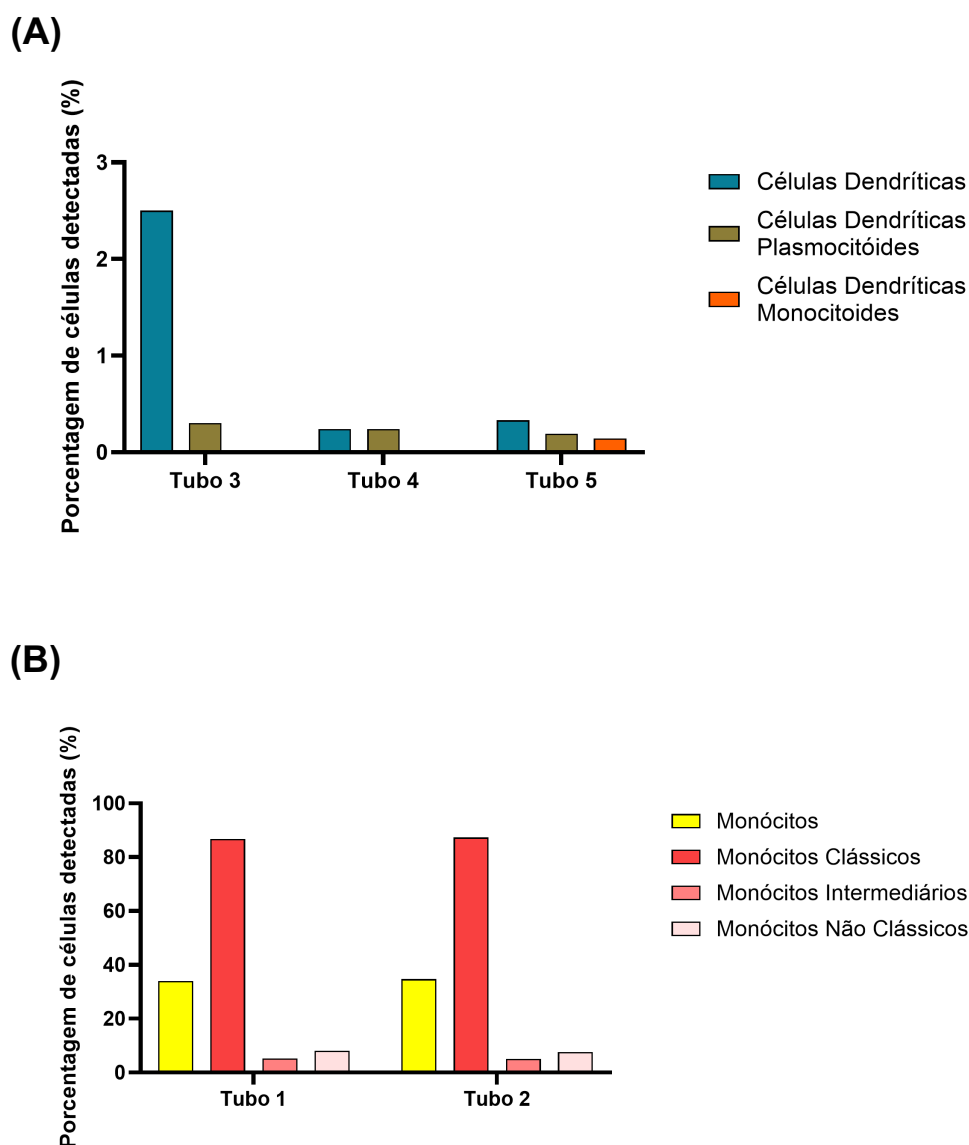


Figura 36. Porcentagem de identificação das populações de monócitos e células dendríticas em diferentes painéis de marcação. Os dados demonstram a eficiência de cada painel proposto na distinção imunofenotípica das subpopulações de (A) células dendríticas (plasmocitoides e mieloides) e (B) monocíticas (Monócitos Clássicos, Intermediários e Não Clássicos), sendo esse critério utilizado para a escolha final dos painéis utilizados ao longo dos experimentos.

Observando os resultados, a exposição das PBMCs ao lisado tumoral das linhagens A2780 e T-47D resultou em um aumento na porcentagem de ambos os tipos de células dendríticas, quando comparado ao controle não tratado e ao grupo estimulado apenas com LPS. Entretanto, essas mesmas exposições levaram a uma diminuição significativa da população de monócitos clássicos ($CD14^{++}$ e $CD16^{-}$ (Figura 37).

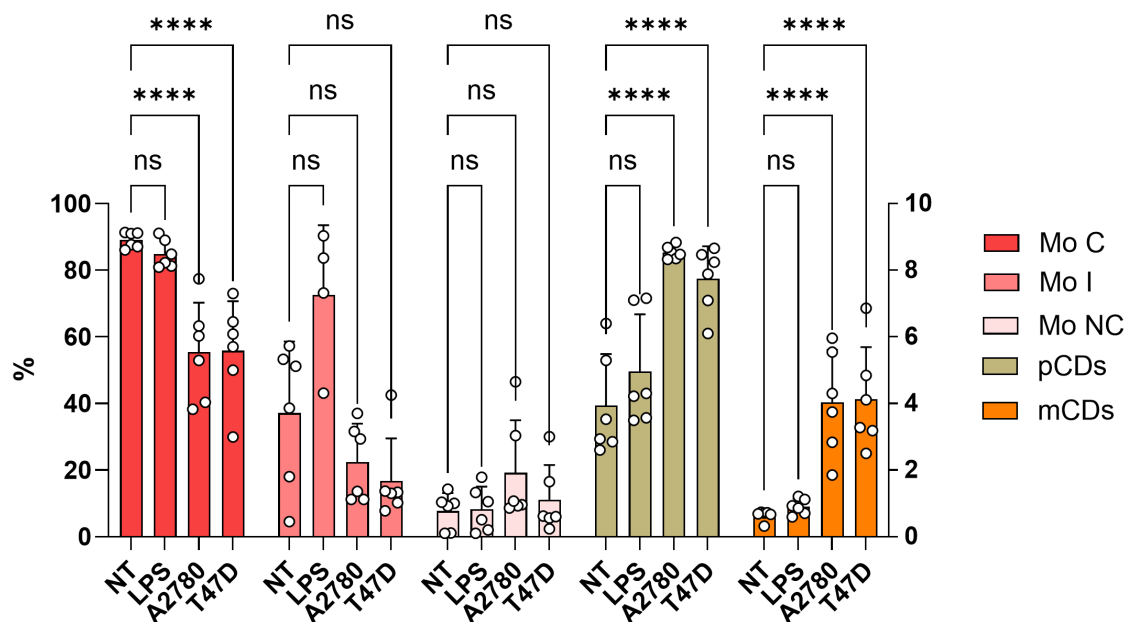


Figura 37. Quantificação das populações monocíticas e das células dendríticas em PBMCs tratadas com o lisado tumoral. Porcentagem dos monócitos clássicos (CD14⁺⁺ e CD16⁻), intermediários (CD14⁺ e CD16⁺) e não clássicos (CD14⁻ e CD16⁺⁺), bem como das células dendríticas plasmocitóides (pCDs) e mieloides (mCDs), nas condições controle, tratadas com LPS 1 µg/mL e após tratamento com lisado tumoral das linhagens A2780 e T-47D. Os dados representam média ± desvio padrão, calculados a partir de seis réplicas biológicas independentes. A significância estatística foi determinada pelo teste anova two-way, considerando **** $P < 0,0001$. * Tratamento comparado ao controle não tratado (NT).

A análise imunofenotípica das células dendríticas mieloides apontou um aumento estatisticamente significativo da expressão de marcadores CD40, CD25, CD86, CD11c em células tratadas com o lisado tumoral, excetuando-se HLA-DR. Assim como esperado, observou-se esse mesmo perfil em células tratadas com o LPS, lipopolissacarídeo componente altamente inflamatório da membrana externa de bactérias gram-negativas, excetuando-se a expressão de HLA-DR, em que não se teve diferença estatisticamente significativa (Figura 38).

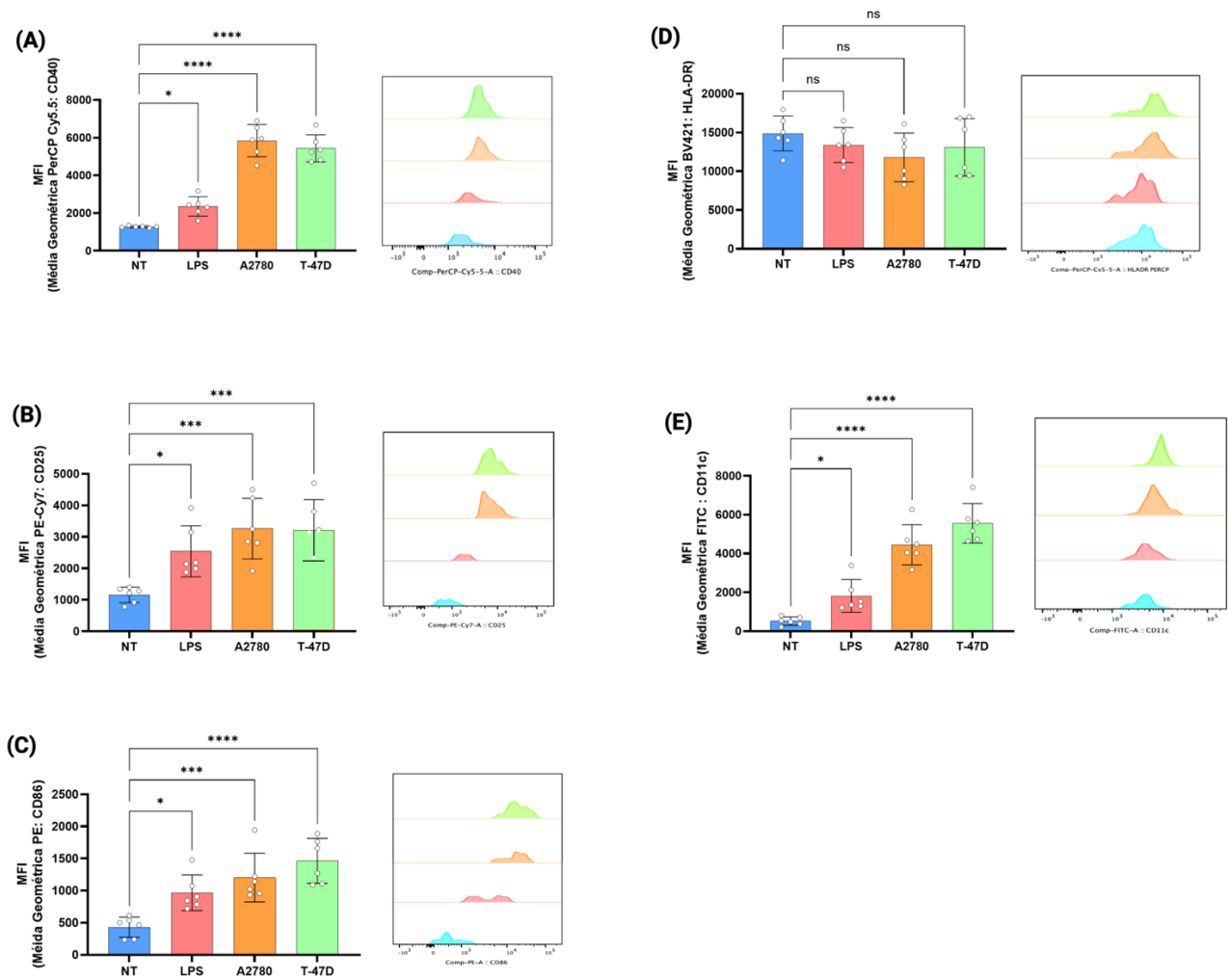


Figura 38. Perfil de ativação das células dendríticas mieloides após exposição à diferentes estímulos. Expressão dos marcadores (A) CD40, (B) CD25, (C) CD86, (D) HLA-DR e (E) CD11c em mCDs obtidas a partir de PBMCs incubadas com o lisado tumoral das linhagens A2780 e T-47D submetidas ao tratamento com MAGCIT-AM (0,78 $\mu\text{g/mL}$). O grupo tratado com LPS foi utilizado como controle positivo de ativação e o grupo controle (NT) incubado somente com meio de cultura. A análise foi realizada em citômetro de fluxo e os dados expressos como a média de fluorescência (MFI) $\pm$ desvio padrão, calculados a partir de seis réplicas biológicas independentes. A significância estatística foi determinada pelo teste anova *one-way* considerando * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$ e **** $P < 0,0001$. * Tratamento comparado ao controle não tratado (NT).

Assim como realizada a análise do perfil de marcadores nas mCDs, estudou-se essas mesmas proteínas de superfície nas células dendríticas plasmocitoides. Semelhantemente as

linhagens mieloides, as pCDs também apresentaram um aumento significativo na média da intensidade de fluorescência dos marcadores estudados, excetuando-se o HLA-DR, em que exibiu um aumento significativo comparado ao controle não estimulado. Curiosamente, o tratamento com LPS não promoveu o aumento na expressão de CD11c nem de HLA-DR, sugerindo uma modulação distinta dessa molécula sobre essa subpopulação (Figura 39).

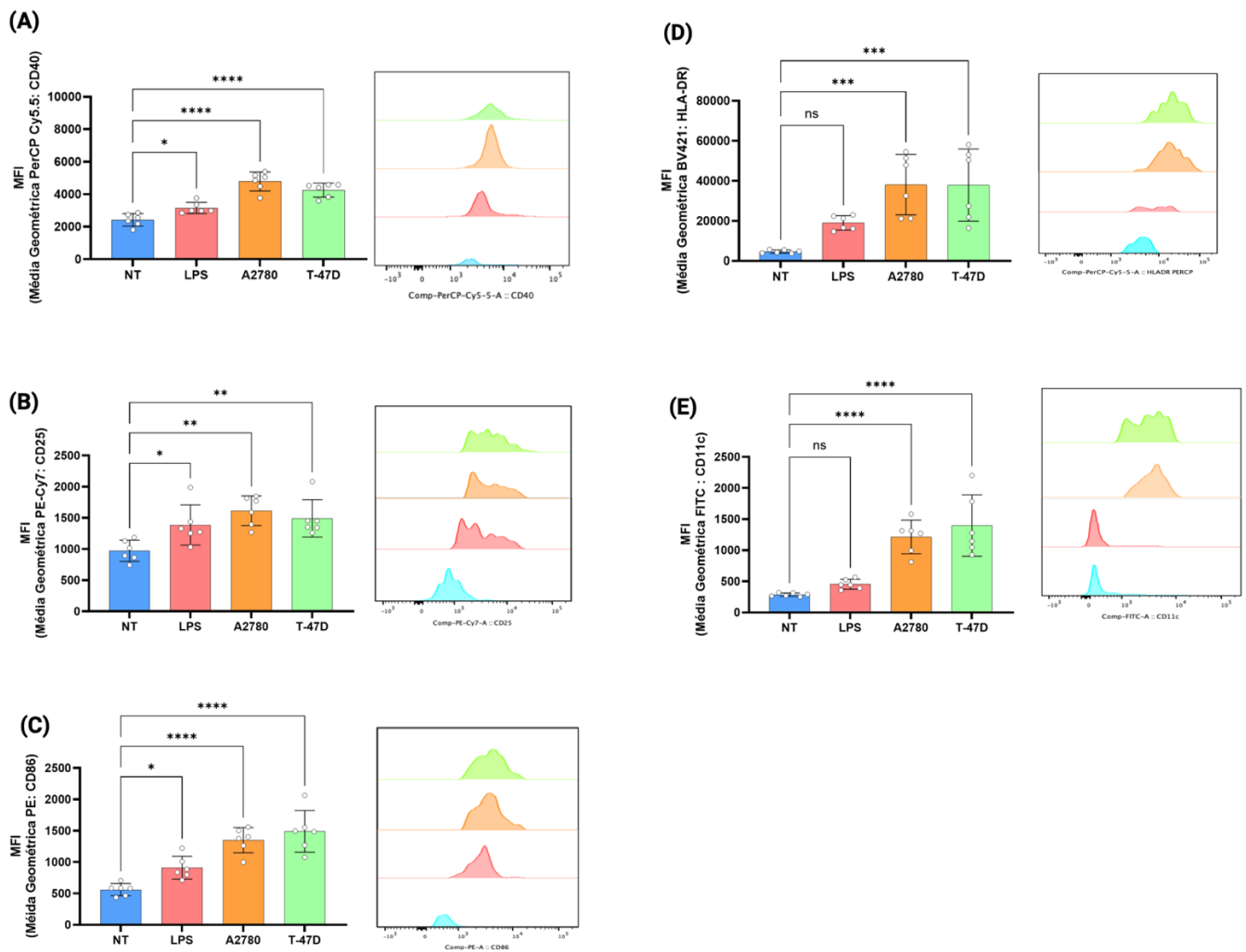


Figura 39. Perfil de ativação das células dendríticas plasmocitoides após exposição à diferentes estímulos. Expressão dos marcadores (A) CD40, (B) CD25, (C) CD86, (D) HLA-DR e (E) CD11c em pCDs obtidas a partir de PBMCs incubadas com o lisado tumoral das linhagens A2780 e T-47D submetidas ao tratamento com MAGCIT-AM (0,78 μ g/mL). O grupo tratado com LPS foi utilizado como controle positivo de ativação e o grupo controle (NT) incubado somente com meio de cultura. A análise foi realizada em citômetro de fluxo e os dados expressos como a média de fluorescência (MFI) $\pm$ desvio padrão, calculados a partir de seis

réplicas biológicas independentes. A significância estatística foi determinada pelo teste anova *one-way* considerando * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ e **** $P < 0,0001$. * Tratamento comparado ao controle não tratado (NT).

5.10 *Análise da citotoxicidade de MAGCIT-AM em linhagens tumorais e normais murinas.*

Como um passo extremamente importante para a aplicação do nanossistema desenvolvido em modelos biológicos *in vivo*, foram avaliadas as citotoxicidades de MAGCIT-AM em uma linhagem de carcinoma mamário murino (4T1) e em uma linhagem de fibroblasto murino, representando as células controles (NIH/3T3). As concentrações selecionadas para o tratamento foram determinadas como base aquelas utilizadas nos ensaios com linhagens humanas, sendo elas de 3,12; 1,56; 0,78 e 0,39 $\mu\text{g/mL}$ para MAGCIT-AM, baseando-se na quantidade de AM adsorvido na superfície magnética. Com a finalidade de averiguar a citotoxicidade de azul de metileno não funcionalizado com o núcleo de maghemita com citrato, foi avaliada a viabilidade celular após o tratamento com AM livre nas concentrações de 5,0, 2,5, 1,25 e 0,625 $\mu\text{g/mL}$.

Os resultados obtidos através da análise por alamarBlueTM, mostram que MAGCIT-AM apresenta toxicidade dose dependente em ambas as linhagens estudadas (Figura 40). Entretanto, a linhagem NIH/3T3 demonstra uma maior resistência após tratamento com MAGCIT-AM exibindo uma recuperação celular nos tempos de 48 e 72h (Figura 40B). A linhagem 4T1 mostrou-se mais susceptível ao tratamento com o nanossistema, tendo uma redução de aproximadamente 70% de sua viabilidade na maior concentração estudada (Figura 40^a).

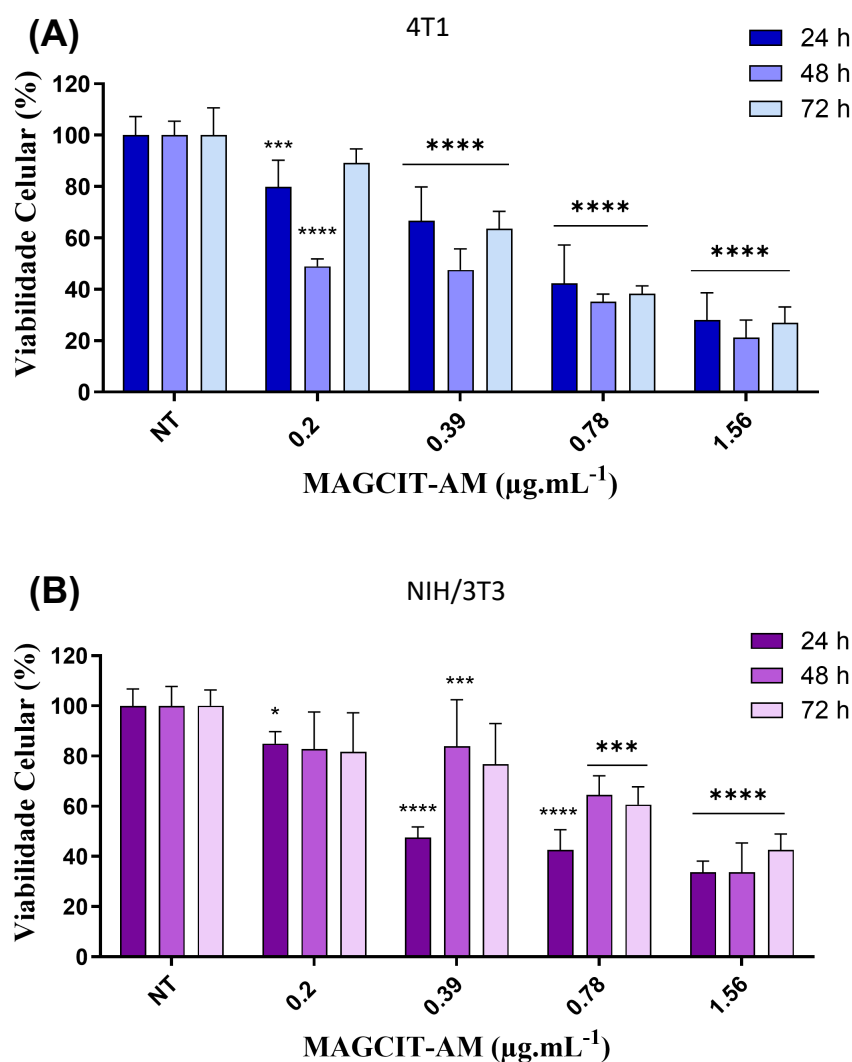


Figura 40. Avaliação da viabilidade celular por alamarBlue™ das linhagens 4T1 e NIH/3T3 após 24, 48 e 72 horas de tratamento com MAGCIT-AM. Gráficos de viabilidade das linhagens (A) 4T1 e (B) NIH3T3 após os tratamentos com MAGCIT-AM nas concentrações de 3,12, 1,56, 0,78 e 0,39 µg/mL após 24, 48 e 72 horas de tratamento. As barras representam a viabilidade celular em percentual para cada linhagem após os tratamentos nas concentrações indicadas. Os dados representam a média $\pm$ SEM de três experimentos independentes em triplicata * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$ e **** $P < 0,0001$. *tratamento comparado ao controle NT.

Já os ensaios realizados com AM livre, demonstram que as linhagens exibiram uma maior resistência a esse composto não funcionalizado, evidenciando que a redução da viabilidade celular ocorre apenas em concentrações superiores de azul de metileno quando comparadas com aquelas utilizadas de maneira conjugada (Figura 41).

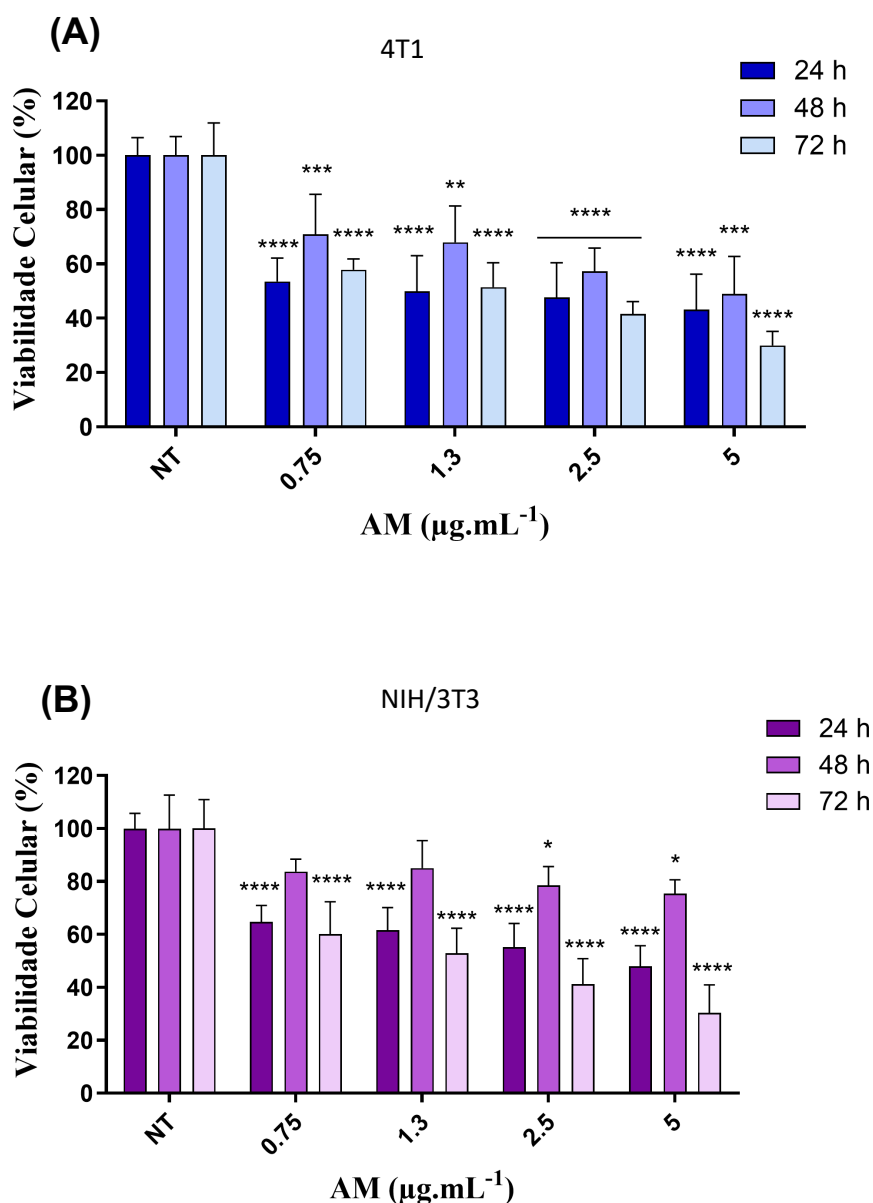


Figura 41. Avaliação da viabilidade celular por alamarBlue™ das linhagem 4T1 e NIH/3T3 após 24, 48 e 72 horas de tratamento com AM livre. Gráficos de viabilidade das linhagens (A) 4T1 e (B) NIH3T3 após os tratamentos com AM livre nas concentrações de 5,0, 2,5, 1,25 e 0,625 µg/mL após 24, 48 e 72 horas de tratamento. As barras representam a viabilidade celular em percentual para cada linhagem após os tratamentos nas concentrações indicadas. Os dados representam a média $\pm$ SEM de três experimentos independentes em triplicata *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001 e ****P<0.0001. *tratamento comparado ao controle NT.

Por fim, para sintetizar os resultados obtidos com os ensaios de viabilidade celular das linhagens murinas, foram realizados os cálculos da concentração inibitória de 50% para ambos os tratamentos propostos. Corroborando com os resultados observados, os valores de IC50 para

ambas as linhagens reduzem à medida que a concentração de MAGCIT-AM (Tabela 1) e AM (Tabela 2) aumentam.

Tabela 1. Concentração inibitória de 50% de MAGCIT-AM nas linhagens 4T1 e NIH-3T3 nos tempos de 24, 48 e 72h.

Tempo	24h	48h	72h
4T1	0,60 µg/mL	0,42 µg/mL	0,54 µg/mL
NIH-3T3	0,30 µg/mL	0,93 µg/mL	0,77 µg/mL

Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 2. Concentração inibitória de 50% de AM livre nas linhagens 4T1 e NIH-3T3 nos tempos de 24, 48 e 72h.

Tempo	24h	48h	72h
4T1	> 5 µg/mL	> 5 µg/mL	4,90 µg/mL
NIH-3T3	> 5 µg/mL	> 5 µg/mL	4,32 µg/mL

Fonte: Elaborado pela autora.

Associado a esse processo, nota-se que a linhagem 4T1 se mostra mais sensível ao tratamento com o nanossistema, quando comparado com o azul de metileno livre. Outro fator interessante observado, é o aumento dos valores de IC50 ao longo do tempo pela linhagem normal, sugerindo uma possível recuperação celular (Tabela 1).

6. Discussão

O desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas voltadas para o combate das neoplasias vem impulsionando diversos estudos acadêmicos mundiais (Mainini et al., 2021; Joshi et al., 2024; Sun et al., 2024). Apesar dos avanços tecnológicos terem contribuído para a melhora na qualidade de vida dos pacientes, os tratamentos convencionais amplamente utilizados na clínica ainda promovem inúmeros efeitos adversos comprometendo a qualidade de vida dessas pessoas (Papież & Krzyściak, 2021). Atrelado a esses fatores, o diagnóstico tardio, a erradicação incompleta das células neoplásicas e as mudanças nos hábitos de vida como, tabagismo, sedentarismo, obesidade, entre outros, têm contribuído para o aumento global das incidências e mortalidade por neoplasias (Kerr et al., 2017; Hermelink et al., 2022; Ferris et al., 2023; Obeagu & Obeagu, 2024). Nesse contexto, a nanobiotecnologia têm ganhado ênfase pela sua capacidade de promover uma entrega direcionada de fármacos, erradicação completa do tecido neoplásico e diminuição dos efeitos sistêmicos adversos (Mainini et al., 2021; Sun et al., 2024). Dentre as plataformas desenvolvidas, as nanopartículas magnéticas, especialmente aquelas compostas por óxidos de ferro, como a maghemita, vêm se mostrando uma plataforma multifuncional e promissora, uma vez que podem ser facilmente funcionalizadas com diversos agentes e guiadas por campos magnéticos externos (Zhao et al., 2018; Canese et al., 2021; Chung et al., 2021; Silva et al., 2021; Schneider et al., 2022).

Objetivando-se a contribuição de novas ferramentas para o combate do câncer, o presente estudo realizou o desenvolvimento de uma nanopartícula magnética composta por um núcleo de maghemita e ácido cítrico funcionalizada com um corante comumente encontrado, o azul de metileno (AM) (MAGCIT-AM) (Silva et al., 2021). A escolha pelo AM, um corante fenotiazínico, se baseou pelas suas propriedades redox amplamente conhecidas, sendo capaz de modular respostas oxidativas além de atuar como um agente fotossensibilizador em estratégias de terapia fotodinâmica (Yaroslavsky *et al.*, 2019). Em ambientes celulares tumorais, conhecidamente distintos de células normais em termos de metabolismo e estresse oxidativo, o uso de nanoplataformas, como MAGCIT-AM, promove efeitos citotóxicos seletivos, tendo em vista que os níveis basais de espécies reativas de oxigênio são mais altos em células tumorais comparadas às células não modificadas (Chen et al., 2018; Hayes et al., 2020; Arfin et al., 2021; Masenga et al., 2023; Ju et al., 2024).

A caracterização do nanossistema utilizado no presente trabalho, evidenciou a ligação eletrostática entre o núcleo magnético e o AM, além de se mostrar estável ao longo do tempo, como descrito em Silva et al., 2021. A versatilidade funcional de MAGCIT-AM não se restringe

apenas à erradicação de células tumorais, mas também ao diagnóstico, especialmente por técnicas de imagem por ressonância magnética (MRI), uma vez que o núcleo de maghemita pode atuar como um agente de contraste permitindo a sua detecção (Talluri & Malla, 2019; Anese et al., 2021; Rezaei, 2022; Sun et al., 2024). Outro fator relevante a ser abordado, é a possibilidade de se utilizar as propriedades fotossensíveis do azul de metileno como o centro da terapia, onde, a exposição desse composto a comprimentos de onda específicos induz a produção de espécies reativas de oxigênio promovendo danos às biomoléculas e, por fim, morte celular; terapia denominada fotodinâmica (TFD) (dos Santos et al., 2017; Grande et al., 2022; Taldaev et al., 2023).

Como observado em estudos anteriores, o nanossistema foi capaz de promover, de maneira específica, a morte de células tumorais de ovário, A2780, e de mama, T-47D, não levando a danos consideráveis nas células normais, HUVEC e HNTMC, e à linhagem MDA-MB-231 (Silva et al., 2021). Nesse contexto, compreender os mecanismos envolvidos nessa seletividade torna-se essencial para entender a modulação e os processos celulares envolvidos com MAGCIT-AM. Entre esses mecanismos, destaca-se a importância da avaliação da internalização do nanomaterial pelas células-alvo, tendo em vista que a capacidade dos processos de endocitose/fagocitose, interferem diretamente na geração das espécies reativas de oxigênio e na morte celular (Augustine et al., 2020; de Boer et al., 2022). Com isso, a análise por microscopia eletrônica de transmissão realizada nesse estudo elucidou a presença de grandes quantidades do nanossistema no interior das células tratadas, evidenciando sua localização em lisossomos e/ou endossomos no citosol das células tumorais, além de prolongamentos citoplasmáticos, indicando um possível processo de fagocitose. De fato, estudos anteriores sustentam que os mecanismos de endocitose envolvidos na internalização de nanopartículas metálicas estão relacionados à via endocítica da clatrina em células de câncer de mama (Calero *et al.*, 2015), corroborando com demais resultados que comprovam a presença de azul de metileno em sítios lisossomais (Lu *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2018; da Veiga Moreira, Schwartz, et al., 2024).

Tendo em vista a possível ocasionalidade do tratamento MAGCIT-AM estar atuando de maneira seletiva devido a diferença na quantidade de material internalizado entre as linhagens estudadas, foi performedo o ensaio de internalização por citometria de fluxo, explorando as propriedades fluorescentes do AM (da Veiga Moreira, et al., 2024). Com esse ensaio, foi possível concluir que não há diferença estatisticamente significativa na quantidade de nanopartículas internalizadas, sugerindo, então, que as diferenças biológicas das linhagens estudadas estão contribuindo consideravelmente para as respostas divergentes.

A proliferação celular fator importante quando se trata do controle do processo de carcinogênese, é um importante aspecto a ser considerado visando uma terapia antineoplásica (Martínez-Reyes & Chandel, 2021; Hanahan, 2022; de Visser & Joyce, 2023). Tendo em vista que a proliferação descontrolada das células tumorais está diretamente associada à progressão do câncer, foi performedo o ensaio de CFSE a fim de elucidar como esse processo estava sendo controlado na linhagem MDA-MB-231, representativa do subtipo triplo negativo do câncer de mama, que apresentou uma resistência ao tratamento proposto (Silva et al., 2021). A redução em suas taxas de proliferação celular após o tratamento com MAGCIT-AM, mesmo na ausência de alterações significativas na viabilidade indicam um possível efeito citostático, com possível interferência no ciclo celular, em vez de um efeito citotóxico imediato. Inúmeros compostos com ação mitocondrial e indução de estresse oxidativo têm sido correlacionados com bloqueios em fases do ciclo celular, mesmo sem indução de morte celular (Hao et al., 2022; Yang et al., 2023).

Ainda avaliando as diferentes respostas ao tratamento com o nanossistema e, considerando sua indução a diferentes tipos de morte celular, incluindo a apoptose, foram elucidados os índices de fragmentação nuclear nas três linhagens estudadas. Como observado nos ensaios de citometria, ocorreu um aumento significativo na fragmentação nuclear em todas as células tumorais estudadas. A fragmentação nuclear é um evento morfológico característico da apoptose ou de tipos de morte celular derivadas de estresse exacerbado, achados que, em conjunto com os ensaios de morte celular, descritos em Silva et al., 2021, comprovam a indução da morte celular por apoptose, ainda que a intensidade dessa resposta varie de acordo com as diferentes linhagens (Monier & Suzanne, 2021).

Os corpúsculos lipídicos (CL) são as formas mais comuns de armazenamento de lipídeos citoplasmáticos encontrados em células animais (Li et al., 2020; Molendijk et al., 2020; Antunes et al., 2022). Essas organelas se caracterizam pela sua dinamicidade e multifuncionalidade sendo delimitadas por uma monocamada de fosfolipídeos associados a proteínas estruturais e, podendo ser compostas de lipídeos neutros como, os triacilgliceróis (TAG) e ésteres de colesterol (Antunes *et al.*, 2022). Funcionalmente, sabe-se que os corpúsculos lipídicos, além de atuar no armazenamento dos lipídeos, estão intimamente ligados com a sinalização celular, o metabolismo energético e na produção de mediadores inflamatórios (Olzmann & Carvalho, 2019; Antunes et al., 2022). Tendo em vista sua importância e todas as vias celulares em que essas organelas estão associadas, observa-se a sua contribuição com os mecanismos de diferenciação e proliferação celular, pontos chave para o processo de carcinogênese (De Gonzalo-Calvo *et al.*, 2015; Cruz *et al.*, 2019). Estudos atuais demonstram

que diferentes tipos de neoplasias exibem os níveis de lipogênese aumentados como um fator comum, sendo esse achado mais evidente em alguns tipos de câncer, como o de mama (Huang et al., 2025; Cruz et al., 2020).

Como um dos principais alvos almejados pela nossa terapia, foi realizado o ensaio com a utilização do marcador BODIPY para avaliação da modulação dessas organelas pelo nanossistema, a qual, a partir da análise por citometria de fluxo foi possível observar uma redução na quantidade dessas organelas em ambas as linhagens de câncer de mama analisadas, T-47D e MDA-MB-231. A reprogramação metabólica é uma das características principais envolvidas no processo da carcinogênese, portanto, a interferência no metabolismo dos lipídeos das células tumorais reflete na redução da sustentação das vias de proliferação e sobrevivência celular, em especial em células de câncer de mama, que são conhecidas por levarem ao aumento dessas organelas e a associarem ao pior prognóstico (Dogan et al., 2024; Safi et al., 2024).

No decorrer da vida celular, a mitocôndria, principal organela correlacionada com a homeostase energética de células eucariotas, utiliza substratos oxidáveis, através de sua membrana, para produzir um gradiente eletroquímico de prótons que, futuramente, será utilizado para a produção da molécula de energia, o ATP (Zorova *et al.*, 2018). Durante o processo de morte, devido aos poros na membrana e o aumento da permeabilidade mitocondrial, o $\Delta\Psi$ diminui decorrente da perda do gradiente eletroquímico, o que torna o potencial transmembranar mitocondrial um importante parâmetro na análise da saúde celular (Sakamuru et al., 2022; Vringer & Tait, 2023).

Nos últimos anos, estudaram-se diversos marcadores que avaliavam o $\Delta\Psi$, dentre eles está o JC-1, uma molécula catiônica lipofílica que exhibe naturalmente uma fluorescência verde. Essa molécula é capaz de atravessar a membrana mitocondrial, onde se acumula, e começa a formação de complexos reversíveis denominados agregados J que exibem a fluorescência no espectro vermelho (Sivandzade et al., 2019). A análise da razão dímeros/monômeros pela sonda JC-1 evidenciou a disfunção mitocondrial acentuada nas duas linhagens sensíveis ao tratamento (Vringer & Tait, 2023). A perda do potencial de membrana mitocondrial é um dos eventos precoces e irreversíveis correlacionado com a via intrínseca da apoptose, fato que, quando observado com os resultados de fragmentação nuclear, reforça o envolvimento da mitocôndria com as respostas ao tratamento com MAGCIT-AM e a ocorrência da morte celular por apoptose (Peng et al., 2023; Winter et al., 2023). Outro fato a ser abordado, é a ausência dessa disfunção na linhagem MDA-MB-231, fortalecendo a sua maior resistência ao estresse mitocondrial, possivelmente devido ao seu metabolismo antioxidante.

Como forma de avaliar a alteração da morfologia celular após o tratamento com o nanossistema, foi realizada a coloração das células tumorais com o kit panótico rápido e análise em microscópio de luz. Como observado na literatura, as células A2780 e T-47D exibem a morfologia fusiforme e arredondadas formando aglomerados, enquanto a linhagem MDA-MB-231 exibem uma morfologia predominantemente fusiforme (Kim *et al.*, 2019; Loutfy *et al.*, 2019; Gomis-Tena *et al.*, 2020), estruturas alteradas após o tratamento com MAGCIT-AM. Imagens microscópicas permitem observar que nas linhagens A2780 e T-47D, sofreram alterações morfológicas como perda de adesão e retração citoplasmática, enquanto que, na linhagem MDA-MB-231 observa um aumento do volume celular associada à nanopartículas internalizadas e uma leve redução da confluência.

O processo de migração celular é um fator de extrema importância para o processo de carcinogênese (Hanahan, 2022). De acordo com Li *et al.*, 2020, a motilidade celular está intimamente correlacionada com a capacidade das células se deslocarem para órgãos e tecidos distantes podendo assim, levar a formação de tumores metastáticos. Dessa forma, a capacidade de um agente terapêutico interferir negativamente nesse processo, representa uma vantagem significativa quando se diz a respeito de terapias eficazes (Lee et al., 2024) Como observado em ensaio de *Wound Healing*, MAGCIT-AM foi capaz de reduzir expressivamente o fechamento da ferida artificialmente criada na monocamada celular. Tais achados corroboram com dados da literatura, que abordam acerca das nanopartículas atuarem no citoesqueleto, na adesão celular ou nas vias de sinalização associadas à reorganização estrutural e dinâmica da células., sugerindo que a nanopartícula desenvolvida é capaz de interferir diretamente nos mecanismos que regulam a migração celular, um processo essencial para a progressão tumoral e a ocorrência de metástases (Králavec et al., 2020; Liu et al., 2021; Lee et al., 2024).

Tendo em vista os achados descritos ao longo do trabalho, hipotetizou-se que o principal mecanismo indutor da morte celular não seria o corante azul de metileno, mas sim, o núcleo composto por maghemita e ácido cítrico. Após busca na literatura, foi possível averiguar uma morte celular programada ocasionada pelo aumento das quantidades de ferro intracelular, recentemente descrita como ferroptose (J. Li et al., 2020; Jiang et al., 2021; Tong et al., 2022; Han et al., 2024). Portanto, a fim de elucidar os mecanismos bioquímicos associados ao tratamento com o nanossistema e confirmar se esse tipo de morte lítica estava sendo ocasionada, foram performados os ensaios de catalase, superóxido dismutase, glutathione total, lipoperoxidação e quantificação das espécies reativas de oxigênio.

A análise do perfil bioquímico da linhagem T-47D tratada com o nanossistema revelou informações importantes acerca dos mecanismos envolvidos nesse processo. Os resultados não

significativos nos níveis de glutathiona total, catalase e superóxido dismutase, indicam, uma falha no sistema antioxidante dessas células, levando a uma sobrecarga oxidativa que superam os mecanismos de controle do estresse ocasionado. Associado a esse processo, a elevação abrupta nos níveis de EROs nas primeiras 6 horas pós-tratamento, indica, um estresse oxidativo agudo, capaz de desencadear a modulação de vias celulares importantes. Como observado, essa produção exacerbada de espécies reativas de oxigênio foi revertida após 24h, sugerindo uma possível ação do sistema antioxidante, entretanto, essa compensação não foi suficiente para impedir a formação de lipídeos peroxidados, observada após 24h de exposição.

Já a linhagem A2780, demonstra ter uma resposta antioxidante mais robusta e organizada frente ao tratamento com MAGCIT-AM, com o aumento nos níveis de catalase, SOD e glutathiona total e a diminuição das espécies reativas de oxigênio 24h após o tratamento. Entretanto, assim como na linhagem T-47D, observa-se altos níveis de EROs nas primeiras 6h após tratamento juntamente com um aumento de lipídeos peroxidados após 24h, indicando que ambas as linhagens estão sendo submetidas aos mesmos processos de morte celular e que o sistema antioxidante não está sendo capaz de neutralizar completamente os danos oxidativos gerados, resultando na indução da morte celular. Portanto, a sequência dos eventos bioquímicos observados com o aumento de EROs nas primeiras 6h, juntamente com a elevação tardia de L-ROS, sugere o envolvimento da ferroptose como mecanismo de ação predominante nas linhagens sensíveis ao tratamento.

Interessantemente, como esperado, a linhagem MDA-MB-231 exibiu um perfil bioquímico diferente das outras linhagens estudadas. Corroborando com a hipótese inicial, essas células demonstram uma capacidade eficiente de reverter os efeitos iniciais do aumento das EROs. Apesar de não apresentarem aumentos significativos nos níveis de SOD e GSH, observa-se que essa linhagem foi capaz de neutralizar o estresse oxidativo visto nas primeiras 6h de tratamento, principalmente por meio do aumento significativo nos níveis de catalase. Ainda, se observa que os altos níveis de lipídeos peroxidados encontrados após 6h de tratamento, são totalmente controlados, reduzindo drasticamente nas 18h posteriores, totalizando as 24h de análise. Esses dados, indicam que a resistência observada ao longo do estudo, pode estar associada a uma resposta antioxidante baseada na ação da catalase, sendo capaz de impedir o estresse oxidativo celular e, conseqüentemente, a sua morte por ferroptose (Glorieux & Buc Calderon, 2024).

Visando o entendimento das consequências do tratamento com o nanossistema na modulação de células imunológicas e, observando a crescente importância dessa análise nas terapias antineoplásicas, foram realizados o ensaio exposição de PBMCs ao lisado de células

tumorais pré-tratadas com MAGCIT-AM (Gu et al., 2019; Lôbo et al., 2021; Yang et al., 2024). Tendo em vista que a linhagem MDA-MB-231, ao longo do trabalho, demonstrou ser resistente ao tratamento, optou-se por realizar esses ensaios apenas com as linhagens A2780 e T-47D, que se mostraram sensíveis ao nanossistema.

A exposição das PBMCs aos lisados tumorais, resultou em alterações significativas não só em células dendríticas, mas também na população monócítica. Os ensaios de imunofenotipagem demonstram uma redução significativa da população de monócitos clássicos (CD14⁺⁺ e CD16⁻), células conhecidas por possuírem uma dualidade frente ao desenvolvimento tumoral (Schetters et al., 2020; Austermann et al., 2022). Estudos demonstram que essa população pode atuar de maneira imunossupressora, inibindo a atividade de outras células do sistema imunológico, como as células T, por meio da produção de arginase e espécies reativas de oxigênio, contribuindo assim, para o crescimento tumoral, além de promoverem a metástase por meio do aumento das capacidades invasivas das células tumorais (Alwani et al., 2022; Dash et al., 2024; Kim et al., 2024). Entretanto, demais estudos demonstram a capacidade dessas células no recrutamento de células NK para o sítio tumoral e evidenciam a sua importância na indução da fagocitose e na apresentação de antígenos tumorais, contribuindo para o controle dessas células (Patysheva et al., 2022; Shao et al., 2021).

Interessantemente, a diminuição na população de MφC, derivado do tratamento com MAGCIT-AM, e sua, consequente redução na função do processo de apresentação de antígenos, pode ser contornada pelo mesmo nanossistema. A ativação de células dendríticas é um processo essencial para a indução de respostas imunes adaptativas eficazes contra tumores, sendo marcada pela expressão de moléculas de coestimulação e de apresentação propriamente descritas, como CD11c, CD86, CD40, CD25, HLA-DR. No presente estudo, a análise imunofenotípica demonstrou que o lisado de células tumorais provenientes do tratamento com MAGCIT-AM foi capaz de promover a maturação de ambas as populações principais das células dendríticas humanas, as mielóides e as plasmocitoides. Nas pCDs, a exposição aos lisados foi capaz de promover o aumento, estatisticamente significativo, de todas as proteínas avaliadas. Em contrapartida, a linhagem mieloide também apresentou um perfil de ativação após a exposição a lisados tumorais, com um aumento significativo nos mesmos marcadores coestimulatórios e de maturação, excetuando-se o HLA-DR, achados que refletem um mecanismo diferente de ativação das pCDs. Estudos demonstram o aumento de marcadores de superfície como CD80, CD86, CD83, HLA-DR, CD11c está diretamente associado à maturação fenotípica dessas células, bem como à sua capacidade de ativar linfócitos do tipo T efetores, contribuindo com a resposta imune antitumoral (Macri et al., 2019; Aldahlawi & Zaher, 2023;

Moon et al., 2025). Além de evidenciarem a importância de uma maior quantidade de células plasmocitóides em comparação com as mielóides, tendo em vista que as pCDs demonstram ser mais benéficas para o desenvolvimento de uma imunidade antitumoral e as mCDs possuem um perfil mais imunossupressor, promovendo a progressão neoplásica (Hernandez et al., 2022; Luo, 2022).

Por fim, visando a progressão nos estudos com MAGCIT-AM, foram realizados os ensaios de citotoxicidade em linhagens normais e tumorais de mama murinas. Como observado, o nanossistema foi capaz de induzir uma maior redução da viabilidade celular nas células tumorais, quando comparadas às linhagens não neoplásicas, o mesmo fenômeno observado com células humanas. O desenvolvimento de plataformas que aspiram a mais direcionalidade às células tumorais têm ganhado destaque em diversos estudos, tendo em vista que essa propriedade possibilita a redução dos efeitos adversos sistêmicos associados às terapias atuais, ao mesmo tempo que potencializa os efeitos anti-tumorais (Tian et al., 2022; Ganji et al., 2023; L. Sun et al., 2023).

Em conclusão, os dados obtidos por esse trabalho demonstram o potencial terapêutico de MAGCIT-AM no tratamento de câncer de mama e de ovário. O nanossistema desenvolvido foi capaz de alterar o metabolismo oxidativo e originar diferentes respostas oxidativas nas três linhagens estudadas, A2780, T-47D e MDA-MB-231. Evidências, indicam o aumento da peroxidação lipídica derivada do tratamento com MAGCIT-AM, fato correlacionado com o aumento do estresse oxidativo celular. Além disso, a exposição de PBMCs ao lisado dessas células tumorais previamente tratadas com a nanopartícula reforçam o potencial imunomodulador do lisado de células tumorais tratadas previamente com o nanossistema desenvolvido, evidenciando não apenas a sua capacidade na maturação fenotípica das populações de células dendríticas, mas também alterando a frequência de monócitos circulantes.

7. Conclusão

Os resultados obtidos evidenciam que o nanossistema MAGCIT-AM é internalizado pelas células tumorais, acumulando-se em compartimentos citoplasmáticos e desencadeando alterações morfológicas como perda de confluência, redução do tamanho celular, diminuição dos pontos focais de adesão e retração das projeções citoplasmáticas. Embora não tenham sido observadas diferenças significativas na quantidade de nanopartículas internalizadas entre as linhagens, foi possível constatar que o nanossistema compromete negativamente a proliferação celular, mesmo em contextos de maior resistência, como no caso da linhagem MDA-MB-231.

O tratamento também resultou em aumento da fragmentação nuclear em células tumorais, indicando um efeito pró-apoptótico. Além disso, verificou-se que o MAGCIT-AM interfere na formação de corpúsculos lipídicos em linhagens de câncer de mama, sugerindo uma modulação adversa de processos metabólicos associados à sobrevivência celular. Alterações no potencial de membrana mitocondrial foram observadas em linhagens sensíveis, reforçando a correlação entre o dano mitocondrial e a indução de morte celular. Em contrapartida, a linhagem MDA-MB-231 apresentou um perfil mais resistente, sustentado pela ativação de mecanismos antioxidantes capazes de neutralizar os efeitos do estresse oxidativo.

De forma consistente, foi identificado que o nanossistema promove aumento na geração de espécies reativas de oxigênio, rapidamente convertidas em lipídeos peroxidados, o que reforça seu impacto na indução de estresse oxidativo em células tumorais suscetíveis. Por outro lado, a capacidade de resposta antioxidante da linhagem MDA-MB-231 se destacou como o principal mecanismo associado à sua sobrevivência frente ao tratamento.

Além dos efeitos diretos sobre células tumorais, observou-se que o lisado proveniente de células tratadas com MAGCIT-AM modulou populações imunes humanas, promovendo a maturação de células dendríticas plasmocitoides e mieloides, com aumento da expressão de marcadores relacionados à ativação, ao mesmo tempo em que reduziu a proporção de monócitos clássicos. Esses achados sugerem um potencial papel imunomodulador relevante do nanossistema.

Por fim, em modelos celulares murinos, o tratamento com MAGCIT-AM demonstrou reduzir de maneira mais expressiva a viabilidade de células tumorais em

comparação a células não tumorais, reforçando seu potencial translacional como estratégia terapêutica a ser explorada em estudos futuros.

Com base nos resultados obtidos, foi possível propor um modelo hipotético para explicar a ação do nanossistema MAGCIT-AM. Nesse modelo, após a internalização pelas células tumorais, o nanossistema favorece a entrada de íons férricos e sua redução mediada por proteínas transportadoras, como STEAP3 e DMT1. Esse processo culmina na geração de íons ferrosos que, ao reagirem com o peróxido de hidrogênio intracelular, desencadeiam a reação de Fenton, promovendo a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e resultando em ferroptose e lise das células tumorais. A liberação do conteúdo tumoral no microambiente pode, então, ser captada por células apresentadoras de antígeno, em especial células dendríticas, levando à sua ativação e maturação, evidenciada pelo aumento de marcadores como CD25, HLA-DR, CD40, CD80 e CD11c. Dessa forma, o modelo sugere não apenas um efeito direto do nanossistema sobre a viabilidade tumoral, mas também um potencial papel imunomodulador, capaz de integrar a morte celular induzida à ativação da resposta imune adaptativa (Figura 42).

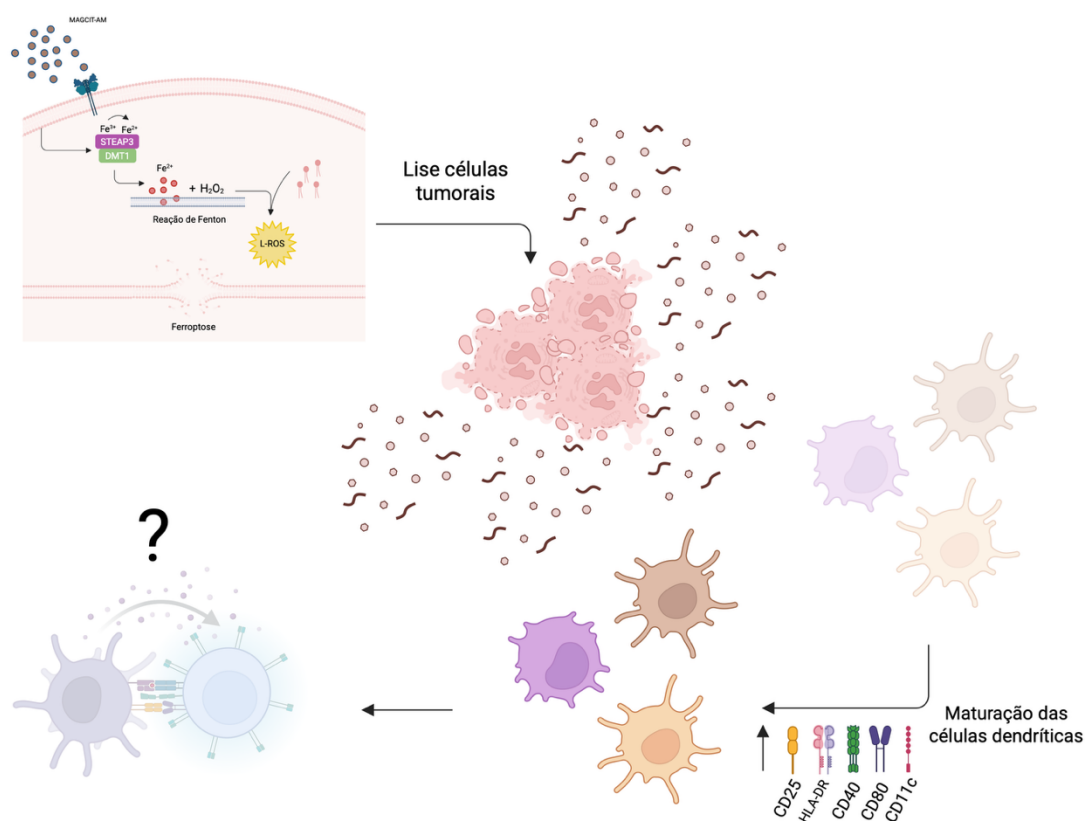


Figura 42. Modelo proposto para a ação do nanossistema MAGCIT-AM em células tumorais. Após internalização, o nanossistema favorece a entrada de íons férricos e sua redução mediada por proteínas transportadoras (como STEAP3 e DMT1), levando à formação de íons ferrosos. Estes participam da reação de Fenton, resultando na geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e culminando em ferroptose e lise das células tumorais. O conteúdo liberado no microambiente pode ser reconhecido por células apresentadoras de antígeno, promovendo a ativação e maturação de células dendríticas, evidenciada pelo aumento de marcadores de superfície como CD25, HLA-DR, CD40, CD80 e CD11c. Esse modelo integra o efeito citotóxico direto do nanossistema à sua potencial ação imunomoduladora.

8. Perspectivas

As perspectivas propostas para a continuidade deste trabalho são:

- Associação de MAGCIT-AM à terapia fotodinâmica, visando amplificar os efeitos do nanossistema em linhagens resistentes.
- Investigar a atividade de MAGCIT-AM na ativação do sistema imunológico *in vivo*;
- Avaliar *in vivo* os efeitos da terapia mediada por MAGCIT-AM por meio de análises clínicas, bioquímicas, hematológicas assim como a regressão tumoral e sobrevida de camundongos.

9. Referências Bibliográficas

- Aldahlawi, A. M., & Zaher, K. S. A. **Dendritic Cell-Based Immunity: Screening of Dendritic Cell Subsets in Breast Cancer-Bearing Mice.** Journal of Microscopy and Ultrastructure, 2023.
- Alwani, A. et al. **The Role of miRNA in Regulating the Fate of Monocytes in Health and Cancer.** Biomolecules, 2022.
- Alzehr, A., Hulme, C., Spencer, A., & Morgan-Trimmer, S. **The economic impact of cancer diagnosis to individuals and their families: a systematic review.** Cancer Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, 2022.
- Amon, L. et al. **The ontogenetic path of human dendritic cells.** Molecular Immunology, 2020.
- An, X. et al. **Oxidative cell death in cancer: mechanisms and therapeutic opportunities.** Cell Death and Disease Springer Nature, 2024.
- Antunes, P. et al. **Lipid Droplets in Cancer: From Composition and Role to Imaging and Therapeutics.** Molecules, 2022.
- Arfin, S. et al. **Oxidative stress in cancer cell metabolism.** Antioxidants, 2021.
- Asangba, A. E. et al. **Diagnostic and prognostic potential of the microbiome in ovarian cancer treatment response.** Scientific Reports, 2023.
- Augustine, R. et al. **Cellular uptake and retention of nanoparticles: Insights on particle properties and interaction with cellular components.** Materials Today Communications, 2020.
- Austermann, J., Roth, J., & Barczyk-Kahlert, K. **The Good and the Bad: Monocytes' and Macrophages' Diverse Functions in Inflammation.** Cells, 2021.
- Austermann, J., Roth, J., & Barczyk-Kahlert, K. **The Good and the Bad: Monocytes' and Macrophages' Diverse Functions in Inflammation.** Cells, 2023.
- Bachurin, S. O. et al. **Conjugates of Methylene Blue with Cycloalkaneindoles as New Multifunctional Agents for Potential Treatment of Neurodegenerative Disease.** International Journal of Molecular Sciences, 2022.
- Baci, D. et al. **The ovarian cancer tumor immune microenvironment (Time) as target for therapy: A focus on innate immunity cells as therapeutic effectors.** International Journal of Molecular Sciences, 2020.
- Bajwa, A. et al. **Death-ision: the link between cellular resilience and cancer resistance to treatments.** Molecular Cancer, 2025.
- Barzaman, K. et al. **Breast cancer: Biology, biomarkers, and treatments.** International Immunopharmacology, 2020.
- Basílio-Queirós, D., & Mischak-Weissinger, E. **Natural killer cells- from innate cells to the discovery of adaptability.** Frontiers in Immunology, 2023.
- Battaglia, A. M. et al. **Ferroptosis and cancer: Mitochondria meet the “iron maiden” cell death.** Cells, 2020

- Beg, S. et al. **Nanomedicinal strategies as efficient therapeutic interventions for delivery of cancer vaccines.** Seminars in Cancer Biology, 2021
- Belabed et al. **Cholesterol mobilization regulates dendritic cell maturation and the immunogenic response to cancer.** Nature Immunology, 2025.
- Beretta, G. L. et al. **Deubiquitinases in Ovarian Cancer: Role in Drug Resistance and Tumor Aggressiveness.** International Journal of Biological Sciences, 2024.
- Boncheva, I. **Role of Iron in Epidermal Infection.** McGill Science Undergraduate Research Journal, 2023.
- Bonini, M. G. et al. **The oxidation of 2',7'-dichlorofluorescein to reactive oxygen species: A self-fulfilling prophesy?** Free Radical Biology and Medicine, 2006
- Bray, F. et al. **Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries.** CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2024.
- Byrne, S. et al. **Lifestyle, genetic risk and incidence of cancer: A prospective cohort study of 13 cancer types.** International Journal of Epidemiology, 2023
- Calero M. et al. **Characterization of interaction of magnetic nanoparticles with breast cancer cells.** Journal of Nanobiotechnology, 2015.
- Canese, R., Vurro, F., & Marzola, P. **Iron oxide nanoparticles as theranostic agents in cancer immunotherapy.** Nanomaterials, 2021
- Carpenter, S., & O'Neill, L. A. J. **From periphery to center stage: 50 years of advancements in innate immunity.** Cell, 2024.
- Chehelgerdi, M. et al. **Progressing nanotechnology to improve targeted cancer treatment: overcoming hurdles in its clinical implementation.** Molecular Cancer, 2023.
- Chen, J. et al. **Prognostic value of tumor necrosis based on the evaluation of frequency in invasive breast cancer.** BMC Cancer, 2023
- Chen, S. et al. **Estimates and Projections of the Global Economic Cost of 29 Cancers in 204 Countries and Territories from 2020 to 2050.** JAMA Oncology, 2023.
- Chen, X., Li, Y., Xia, H., & Chen, Y. H. **Monocytes in Tumorigenesis and Tumor Immunotherapy.** Cells, 2023
- Chen, Y., Zhou, Z., & Min, W. **Mitochondria, oxidative stress and innate immunity.** Frontiers in Physiology, 2018.
- Chiodi, I., & Mondello, C. **Life style factors, tumor cell plasticity and cancer stem cells.** Mutation Research - Reviews in Mutation Research, 2020.
- Chung, S., Revia, R. A., & Zhang, M. **Iron oxide nanoparticles for immune cell labeling and cancer immunotherapy.** Nanoscale Horizons, 2021.
- Ciccarese, F. **Cancer Metabolism and Resistance to Cell Death: Novel Therapeutic Perspectives.** Biomedicines, 2022.
- Cruz, A. L. S. et al. **Lipid droplets: platforms with multiple functions in cancer hallmarks.** Cell Death and Disease, 2020.

- da Veiga Moreira, J. et al. **Methylene Blue Metabolic Therapy Restrains In Vivo Ovarian Tumor Growth.** *Cancers*, 2024
- da Veiga Moreira, J., Schwartz, L., & Jolicoeur, M. **In Vitro Methylene Blue and Carboplatin Combination Triggers Ovarian Cancer Cells Death.** *International Journal of Molecular Sciences*, 2024.
- Dalseno, D., Gajic, N., Flanagan, L., & Tait, S. W. G. **Cell death and cancer: Metabolic interconnections.** *Cell Reports*, 2025.
- Daroudi, R., Sargaxi, N., Hovasin, A., & Cheikhy-Chaman, M. **The impact of socioeconomic factors on cancer survival rate.** *BCCR*, 2020.
- Dash, S. P., Gupta, S., & Sarangi, P. P. **Monocytes and macrophages: Origin, homing, differentiation, and functionality during inflammation.** *Heliyon*, 2024.
- Dass, S. A. et al. **Triple negative breast cancer: A review of present and future diagnostic modalities.** *Medicina*, 2021a.
- Dass, S. A. et al. **Triple negative breast cancer: A review of present and future diagnostic modalities.** *Medicina*, 2021b.
- de Boer, I., Richards, C. J., & Åberg, C. **Simultaneous Exposure of Different Nanoparticles Influences Cell Uptake.** *Pharmaceutics*, 2022.
- de Visser, K. E., & Joyce, J. A. **The evolving tumor microenvironment: From cancer initiation to metastatic outgrowth.** *Cancer Cell*, 2023.
- Del Prete, A. et al. **Dendritic cell subsets in cancer immunity and tumor antigen sensing.** *Cellular and Molecular Immunology*, 2023.
- Di Carlo, E., & Sorrentino, C. **Oxidative Stress and Age-Related Tumors.** *Antioxidants*, 2024.
- Dixon, S. J. et al. **Ferroptosis: An iron-dependent form of nonapoptotic cell death.** *Cell*, 2012.
- Dobrovolskaia, M. A., Shurin, M., & Shvedova, A. A. **Current understanding of interactions between nanoparticles and the immune system.** *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2016.
- Dogan, S. et al. **Identification of Lipid Droplet-Associated Genes in Breast Cancer Patients.** *Lipidology*, 2024.
- dos Santos, A. F. et al. **Methylene blue photodynamic therapy induces selective and massive cell death in human breast cancer cells.** *BMC Cancer*, 2017.
- dos Santos, M. S. et al. **Nanographene oxide- methylene blue as phototherapies platform for breast tumor ablation and metastasis prevention in a syngeneic orthotopic murine model.** *Journal of Nanobiotechnology*, 2018.
- El-Masry, O. S., Brown, B. L., & Dobson, P. R. M. **AMPK activation of apoptotic markers in human breast cancer cell lines with different p53 backgrounds: MCF-7, MDA-MB-231 and T47D cells.** *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 2019.
- Fares, J. et al. **Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited.** *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2020.

Ferlay, J. et al. **Cancer statistics for the year 2020: An overview.** International Journal of Cancer, 2021.

Ferris, J. S. et al. **Risk factors for developing both primary breast and primary ovarian cancer: A systematic review.** Critical Reviews in Oncology/Hematology, 2023.

Filomeno, C. L. **Dispersões de Nanopartículas Magnéticas do tipo Core-Shell MFe₂O₄@ γ -Fe₂O₃ em Solventes Polares: Reatividade Eletroquímica e o papel da Interface Óxido/Solução nas propriedades Coloidais.** 2015. 146 f. Tese (Doutorado em Química Analítica). Instituto de Química e Chimie Analytique de Paris Centre, Universidade de Brasília e Universidade Pierre et Marie Curie, Brasília, Paris, 2015.

Frana, A. et al. **Macrophage scavenger receptor A mediates the uptake of gold colloids by macrophages in vitro.** Nanomedicine, 2011.

Fu, C., Zhou, L., Mi, Q. S., & Jiang, A. **Dc-based vaccines for cancer immunotherapy.** Vaccines, 2020.

Fu, C., Zhou, L., Mi, Q. S., & Jiang, A. **Plasmacytoid Dendritic Cells and Cancer Immunotherapy.** Cells, 2022.

Galluzzi, L. et al. **Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018.** Cell Death & Differentiation, 2018.

Galluzzi, L. et al. **Regulated cell death and adaptive stress responses.** Cell Mol Life Sci., 2016

Gambardella, G. et al. **A single-cell analysis of breast cancer cell lines to study tumour heterogeneity and drug response.** Nature Communications, 2022.

Ganji, C. et al. **Mitochondrial-targeted nanoparticles: Delivery and therapeutic agents in cancer.** Drug Discovery Today, 2023.

Gavas, S., Quazi, S., & Karpiński, T. M. **Nanoparticles for Cancer Therapy: Current Progress and Challenges.** Nanoscale Research Letters, 2021.

GLOBAL CANCER OBSERVATORY (GLOBOCAN). Disponível em: < <https://gco.iarc.fr> >. Data de acesso: 20 de julho de 2025.

Glorieux, C., & Buc Calderon, P. **Targeting catalase in cancer.** Redox Biology, 2024.

Goldberg, M. S. **Improving cancer immunotherapy through nanotechnology.** Nature Reviews Cancer, 2019.

Gomis-Tena J. et al. **When Does the IC₅₀ Accurately Assess the Blocking Potency of a Drug?** Journal of Chemical Information and Modeling, 2020.

Grande, M. P. D. et al. **Methylene blue and photodynamic therapy for melanomas: Inducing different rates of cell death (necrosis and apoptosis) in B16-F10 melanoma cells according to methylene blue concentration and energy dose.** Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, 2022.

Grande, M. P. et al. **Methylene blue and photodynamic therapy for melanomas: Inducing different rates of cell death (necrosis and apoptosis) in B16-F10 melanoma cells according to methylene blue concentration and energy dose.** Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, 2022.

- Grebic, D. et al. **The Role of Innate Immunity in the Pathogenesis of Breast Cancer.** Breast Care, 2021.
- Gu, P. et al. **Rational Design of PLGA Nanoparticle Vaccine Delivery Systems to Improve Immune Responses.** Molecular Pharmaceutics, 2019.
- Gubin, M. M., & Vesely, M. D. **Cancer Immunoediting in the Era of Immuno-oncology.** Clinical Cancer Research, 2022.
- Guida, F. et al. **Global and regional estimates of orphans attributed to maternal cancer mortality in 2020.** Nature Medicine, 2022.
- Han, J., Wu, M., & Liu, Z. **Dysregulation in IFN- γ signaling and response: the barricade to tumor immunotherapy.** Frontiers in Immunology, 2023.
- Han, S. et al. **Analysis of metastasis related risk factors and clinical relevance in adult soft tissue sarcoma.** Oncology Letters, 2024.
- Han, S. et al. **Nanobiotechnology boosts ferroptosis: opportunities and challenges.** In **Journal of Nanobiotechnology**, 2024.
- Hanahan, D. **Hallmarks of Cancer: New Dimensions.** Cancer Discovery, 2022.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. **Hallmarks of cancer: The next generation.** Cell, 2011.
- Hänggi, K., & Ruffell, B. **Cell death, therapeutics, and the immune response in cancer.** Cell Press, 2023.
- Hao, X. et al. **Disrupted mitochondrial homeostasis coupled with mitotic arrest generates antineoplastic oxidative stress.** Oncogene, 2022.
- Harbeck, N., et al. **Breast cancer.** Nature Reviews Disease Primers, 2019.
- Hayes, J. D., Dinkova-Kostova, A. T., & Tew, K. D. **Oxidative Stress in Cancer.** Cell Press, 2020.
- He, Z. et al. **A review on methods for diagnosis of breast cancer cells and tissues.** Cell Proliferation, 2020.
- Hermelink, R. et al. **Sedentary behavior and cancer—an umbrella review and meta-analysis.** European Journal of Epidemiology, 2022.
- Hernandez, J. S. T et al. **Characterization of Fe₃O₄ Nanoparticles for Applications in Catalytic Activity in the Adsorption/Degradation of Methylene Blue and Esterification.** Molecules, 2022.
- Hernandez, S. S.; Jakobsen, M. R. & Bak, R. O. **Plasmacytoid Dendritic Cells as a Novel Cell-Based Cancer Immunotherapy.** International Journal of Molecular Science, 2022.
- Hölken, J. M., & Teusch, N. **The Monocytic Cell Line THP-1 as a Validated and Robust Surrogate Model for Human Dendritic Cells.** International Journal of Molecular Sciences, 2023.
- Hollis, R. L., & van Gent, M. D. J. M. **Advances toward improved understanding and treatment of uncommon ovarian cancer types and subtypes.** Frontiers, 2024.
- Hollville, E., & Martin, S. J. **Measuring apoptosis by microscopy and flow cytometry.** Current Protocols in Immunology, 2016.

<https://doi.org/10.3390/nano11081950>

Hu, G. et al. **Nanoparticles targeting macrophages as potential clinical therapeutic agents against cancer and inflammation.** *Frontiers in Immunology*, 2019.

Huang, X., Liu, B., & Shen, S. **Lipid Metabolism in Breast Cancer: From Basic Research to Clinical Application.** *Cancers*, 2025.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Disponível em: < <https://www.gov.br/inca/pt-br>>. Data de acesso: 20 julho de 2025.

Iqbal, M. J. et al. **Interplay of oxidative stress, cellular communication and signaling pathways in cancer.** *Cell Communication and Signaling*, 2024.

Janho dit Hreich, S., Hofman, P., & Vouret-Craviari, V. **The Role of IL-18 in P2RX7-Mediated Antitumor Immunity.** *International Journal of Molecular Sciences*, 2023.

Ji, L., Fan, L., Zhu, X., Gao, Y., & Wang, Z. **A Prognostic Model for Breast Cancer With Liver Metastasis.** *Frontiers in Oncology*, 2020.

Jia, J. et al. **Interactions Between Nanoparticles and Dendritic Cells: From the Perspective of Cancer Immunotherapy.** *Frontiers in Oncology*, 2018

Jiang, X., Stockwell, B. R., & Conrad, M. **Ferroptosis: mechanisms, biology and role in disease.** *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2021.

Jin, C., Wang, K., Oppong-Gyebi, A., & Hu, J. **Application of nanotechnology in cancer diagnosis and therapy - A mini-review.** *International Journal of Medical Sciences*, 2020.

Jomova, K. et al. **Several lines of antioxidant defense against oxidative stress: antioxidant enzymes, nanomaterials with multiple enzyme-mimicking activities, and low-molecular-weight antioxidants.** *Arch Toxicol.*, 2024.

Joshi, D. C. et al. **Novel therapeutic agents in clinical trials: emerging approaches in cancer therapy.** *Discover Oncology*, 2024.

Ju, S. et al. **Oxidative Stress and Cancer Therapy: Controlling Cancer Cells Using Reactive Oxygen Species.** *International Journal of Molecular Sciences*, 2024.

Kalbasi, A., & Ribas, A. **Tumour-intrinsic resistance to immune checkpoint blockade.** *Nature Reviews Immunology*, 2020.

Karsch-Bluman, A. et al. **Tissue necrosis and its role in cancer progression.** *Oncogene*, 2019.

Katkar, G., & Ghosh, P. **Macrophage states: there's a method in the madness.** *Trends in Immunology*, 2023.

Kauanova, S., Urazbayev, A., & Vorobjev, I. **The Frequent Sampling of Wound Scratch Assay Reveals the “Opportunity” Window for Quantitative Evaluation of Cell Motility-Impeding Drugs.** *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2021.

Kaur, P. et al. **Nanotechnology for boosting ovarian cancer immunotherapy.** *Journal of Ovarian Research*, 2024.

Kerr, J., Anderson, C., & Lippman, S. M. **Physical activity, sedentary behaviour, diet, and cancer: an update and emerging new evidence.** *The Lancet Oncology*, 2017

- Kim, J. et al. **Targeted deletion of CD244 on monocytes promotes differentiation into anti-tumorigenic macrophages and potentiates PD-L1 blockade in melanoma.** *Molecular Cancer*, 2024.
- Kim, S. J. et al. **Understanding of ROS-Inducing Strategy in Anticancer Therapy.** *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019.
- Köbel, M., & Kang, E. Y. **The Evolution of Ovarian Carcinoma Subclassification.** *Cancers*, 2022.
- Korangath, P. et al. **Iron Oxide Nanoparticles Inhibit Tumor Progression and Suppress Lung Metastases in Mouse Models of Breast Cancer.** *ACS Nano*, 2024a.
- Korangath, P. et al. **Iron Oxide Nanoparticles Inhibit Tumor Progression and Suppress Lung Metastases in Mouse Models of Breast Cancer.** *ACS Nano*, 2024b.
- Královec, K. et al. **Disruption of cell adhesion and cytoskeletal networks by thiol-functionalized silica-coated iron oxide nanoparticles.** *International Journal of Molecular Sciences*, 2020.
- Kruk, J. et al. **Review Article Psychological Stress and Cellular Aging in Cancer: A Meta-Analysis.** *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019.
- Lee, K. W., Yam, J. W. P., & Mao, X. **Dendritic Cell Vaccines: A Shift from Conventional Approach to New Generations.** *Cells*, 2023.
- Lee, Y. T. et al. **Drug-Free Mesoporous Silica Nanoparticles Enable Suppression of Cancer Metastasis and Confer Survival Advantages to Mice with Tumor Xenografts.** *ACS Applied Materials and Interfaces*, 2024.
- Lei, G., Zhuang, L., & Gan, B. **Targeting ferroptosis as a vulnerability in cancer.** *Nature Reviews Cancer*, 2022.
- Li, C. et al. **Innate immune cells in tumor microenvironment: A new frontier in cancer immunotherapy.** *iScience Elsevier*, 2024.
- Li, H. et al. **Advancements in conventional cancer therapy combined with immunotherapy.** *Endoscopic Ultrasound*, 2024.
- Li, J. et al. **Ferroptosis: past, present and future.** *Cell Death and Disease*, 2020.
- Li, W. et al. **Global cancer statistics for adolescents and young adults: population based study.** *Journal of Hematology and Oncology*, 2024.
- Li, W. S. et al. **Innate immune response restarts adaptive immune response in tumors.** *Frontiers in Immunology*, 2023.
- Li, Z., Liu, H., & Luo, X. **Lipid droplet and its implication in cancer progression.** *Am J Cancer Res*, 2020.
- Lillo, S., & Saleh, M. **Inflammasomes in Cancer Progression and Anti-Tumor Immunity.** *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2022.
- Liu, J., Kang, L., Smith, S., & Wang, C. **Transmembrane MUC18 Targeted Polydopamine Nanoparticles and a Mild Photothermal Effect Synergistically Disrupt Actin Cytoskeleton and Migration of Cancer Cells.** *Nano Letters*, 2021.

- Liu, S., Sun, Q., & Ren, X. **Novel strategies for cancer immunotherapy: counter-immunoediting therapy.** Journal of Hematology and Oncology, 2023.
- Liu, Z. et al. **Photodynamic immunotherapy of cancers based on nanotechnology: recent advances and future challenges.** Journal of Nanobiotechnology, 2021
- Lôbo, G. C. N. B. et al. **Nanocarriers Used in Drug Delivery to Enhance Immune System in Cancer Therapy.** Pharmaceutics, 2021.
- Lôbp, G. C. N. B. et al. **Copper Oxide Nanorods: Potential Agents against Breast Cancer.** ACS Applied Bio Materials, 2025.
- Loutfy, S. A. et al. **Anti-proliferative activities of metallic nanoparticles in an in vitro Breast Cancer Model.** Asian Pac J Cancer Prev, 2019.
- Lu Y. et al. **Methylene blue-mediated photodynamic therapy induces mitochondria-dependent apoptosis in HeLa Cell.** Journal of Cellular Biochemistry, 2008.
- Luo, N. **Editorial: Tumor microenvironment in cancer hallmarks and therapeutics.** Frontiers in Molecular Bioscience, 2022.
- Luo, T., Wang, Y., & Wang, J. **Ferroptosis assassinates tumor.** Journal of Nanobiotechnology, 2022.
- Luo, X. et al. **Shaping Immune Responses in the Tumor Microenvironment of Ovarian Cancer.** Frontiers in Immunology, 2021.
- Macri, C. et al. **Monitoring dendritic cell activation and maturation.** Methods in Molecular Biology, 2019.
- Mainini, F. et al. **Nanobiotechnology and immunotherapy: Two powerful and cooperative allies against cancer.** Cancers, 2021.
- Margul, D., Yu, C., & AlHilli, M. M. **Tumor Immune Microenvironment in Gynecologic Cancers.** Cancers, 2023.
- Martínez-Reyes, I., & Chandel, N. S. **Cancer metabolism: looking forward.** Nature Reviews Cancer, 2021.
- Masenga, S. K. et al. **Mechanisms of Oxidative Stress in Metabolic Syndrome.** International Journal of Molecular Sciences, 2023.
- Mildner, A., Kim, K. W., & Yona, S. **Unravelling monocyte functions: From the guardians of health to the regulators of disease.** Discovery Immunology, 2024.
- Mohseni, H. et al. **In vitro evaluation of the intensifying photodynamic effect due to the presence of plasmonic hollow gold nanoshells loaded with methylene blue on breast and melanoma cancer cells.** Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, 2022.
- Molendijk, J. et al. **Lipid mechanisms in hallmarks of cancer.** Molecular Omics, 2020.
- Monier, B., & Suzanne, M. **Orchestration of force generation and nuclear collapse in apoptotic cells.** International Journal of Molecular Sciences, 2021.
- Moon, C. Y. et al. **Dendritic cell maturation in cancer.** Em Nature Reviews Cancer, 2025.
- Moussion, C., & Delamarre, L. **Antigen cross-presentation by dendritic cells: A critical axis in cancer immunotherapy.** Seminars in Immunology, 2024.

- Moyer, A., Tanaka, K., & Cheng, E. H. **Apoptosis in Cancer Biology and Therapy**. Annual Reviews, 2025.
- Mukhopadhyay, A. et al. **Challenges and opportunities in ovarian cancer care: A qualitative study of clinician perspectives from 24 low- and middle-income countries**. Journal of Cancer Policy, 2025.
- Mustafa, M. et al. **Apoptosis: A Comprehensive Overview of Signaling Pathways, Morphological Changes, and Physiological Significance and Therapeutic Implications**. Cells, 2024.
- Nakamura, H., & Takada, K. **Reactive oxygen species in cancer: Current findings and future directions**. Cancer Science, 2021.
- Nasir, I. et al. **Tumor macrophage functional heterogeneity can inform the development of novel cancer therapies**. Trends in Immunology, 2023.
- Newton, K. et al. **Cell death**. Cell, 2024.
- Niu, B. et al. **Application of glutathione depletion in cancer therapy: Enhanced ROS-based therapy, ferroptosis, and chemotherapy**. Biomaterials, 2021.
- Obeagu, E. I., & Obeagu, G. U. **Breast cancer: A review of risk factors and diagnosis**. Medicine, 2024.
- Ohkawa, H.; Ohishi, N. & Yagi, K. **Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction**. Analytical Biochemistry, 1979.
- Olingy, C. E., Dinh, H. Q., & Hedrick, C. C. **Monocyte heterogeneity and functions in cancer**. Journal of Leukocyte Biology, 2019.
- Oliveira, I. et al. **Synthetic and biological nanoparticles for cancer immunotherapy**. Biomaterials Science, 2024.
- Olzmann, J. A., & Carvalho, P. **Dynamics and functions of lipid droplets**. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2019.
- Panieri, E. et al. **Potential applications of NRF2 modulators in cancer therapy**. Antioxidants, 2020.
- Papież, M. A., & Krzyściak, W. **Biological therapies in the treatment of cancer—update and new directions**. In **International Journal of Molecular Sciences**, 2021.
- Park, W., Heo, Y. J., & Han, D. K. **New opportunities for nanoparticles in cancer immunotherapy**. Biomaterials Research, 2018.
- Park, W. et al. **Diversity and complexity of cell death: a historical review**. Experimental & Molecular Medicine, 2023.
- Patel, A. A., Ginhoux, F., & Yona, S. **Monocytes, macrophages, dendritic cells and neutrophils: an update on lifespan kinetics in health and disease**. Immunology, 2021.
- Patysheva, M. et al. **Monocyte programming by cancer therapy**. Frontiers in Immunology, 2022.
- Peng, F. et al. **Regulated cell death (RCD) in cancer: key pathways and targeted therapies**. Signal Transduction and Targeted Therapy, 2022.

Peng, P. et al. **Systematically Prognostic Analyses of Gastric Cancer Patients with Ovarian Metastasis.** Genetics Research, 2023.

Peng, Z. et al. **Enhanced Apoptosis and Loss of Cell Viability in Melanoma Cells by Combined Inhibition of ERK and Mcl-1 Is Related to Loss of Mitochondrial Membrane Potential, Caspase Activation and Upregulation of Proapoptotic Bcl-2 Proteins.** International Journal of Molecular Sciences, 2023.

Perillo, B. et al. **ROS in cancer therapy: the bright side of the moon.** Experimental and Molecular Medicine, 2020.

Pishesha, N., Harmand, T. J., & Ploegh, H. L. **A guide to antigen processing and presentation.** Nature Reviews Immunology, 2022.

Pittet, M. J. et al. **Dendritic cells as shepherds of T cell immunity in cancer.** Immunity, 2023.

Popa, M. T. et al. **Breast Cancer: A Heterogeneous Pathology. Prognostic and Predictive Factors – A Narrative Review.** Em Chirurgia, 2025.

Pradeu, T. et al. **The conceptual foundations of innate immunity: Taking stock 30 years later.** Immunity, 2024.

Pragathi, Y. et al. **An updated review on ovarian cancer.** International Journal of Current Innovations in Advanced Research, 2023.

Qi, T. et al. **A pH-Activatable nanoparticle for dual-stage precisely mitochondria-targeted photodynamic anticancer therapy.** Biomaterials, 2019.

Qian, C., & Cao, X. **Dendritic cells in the regulation of immunity and inflammation.** Seminars in Immunology, 2018.

Qian, C., Yang, L. J., & Cui, H. **Recent Advances in Nanotechnology for Dendritic Cell-Based Immunotherapy.** Frontiers in Pharmacology, 2020.

Qian, J. et al. **Cell Death: Mechanisms and Potential Targets in Breast Cancer Therapy.** International Journal of Molecular Sciences, 2024.

Qu, Z. **Investigating Conventional and Novel Methods for Treatment of Cancer.** ACM International Conference Proceeding Series, 2023.

Quah, B. J. **Monitoring lymphocyte proliferation in vitro and in vivo with the intracellular fluorescent dye carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester.** Nature Protocol, 2007.

Redkin, T. S. et al. **Dendritic Cells Pulsed with Tumor Lysates Induced by Tetracyanotetra(aryl)porphyrazines-Based Photodynamic Therapy Effectively Trigger Anti-Tumor Immunity in an Orthotopic Mouse Glioma Model.** Pharmaceuticals, 2023.

Rezaei, M. **A Review of Recent Advances in Iron Oxide Nanoparticles as a Magnetic Agent in Cancer Diagnosis and Treatment.** Quarterly of Horizon of Medical Sciences, 2022.

Rigamonti, A., Villar, J., & Segura, E. **Monocyte differentiation within tissues: a renewed outlook.** Trends in Immunology, 2023a.

Rigamonti, A., Villar, J., & Segura, E. **Monocyte differentiation within tissues: a renewed outlook.** Trends in Immunology, 2023b.

- Rodrigues, M. C. **An Overview on Immunogenic Cell Death in Cancer Biology and Therapy.** Pharmaceutics, 2022.
- Roerden, M., & Spranger, S. **Cancer immune evasion, immunoediting and intratumour heterogeneity.** Nature Reviews Immunology, 2025.
- Roshani, M. et al. **Metal nanoparticles as a potential technique for the diagnosis and treatment of gastrointestinal cancer: a comprehensive review.** Cancer Cell International, 2023.
- Rothlin, C. V., Hille, T. D., & Ghosh, S. **Determining the effector response to cell death.** Nature Reviews Immunology, 2021.
- Rovini, A. et al. **Quantitative analysis of mitochondrial membrane potential heterogeneity in unsynchronized and synchronized cancer cells.** FASEB Journal, 2021.
- Safi, R., Menéndez, P., & Pol, A. **Lipid droplets provide metabolic flexibility for cancer progression.** FEBS Letters, 2024.
- Sakamuru, S. et al. **Mitochondrial Membrane Potential Assay.** Methods in Molecular Biology, 2022.
- Salah, A. et al. **Insights Into Dendritic Cells in Cancer Immunotherapy: From Bench to Clinical Applications.** Frontiers in Cell and Developmental Biology, 2021.
- Sambasivan, S. **Epithelial ovarian cancer: Review article.** Cancer Treatment and Research Communications, 2022.
- Sarmiento-Salinas, F. L. et al. **Reactive oxygen species: Role in carcinogenesis, cancer cell signaling and tumor progression.** Life Sciences, 2021a.
- Sarmiento-Salinas, F. L. et al. **Reactive oxygen species: Role in carcinogenesis, cancer cell signaling and tumor progression.** Life Sciences, 2021b.
- Schaupp, L. et al. **Microbiota-Induced Type I Interferons Instruct a Poised Basal State of Dendritic Cells.** Cell, 2020.
- Schettters, S. T. T. et al. **Monocyte-derived APCs are central to the response of PD1 checkpoint blockade and provide a therapeutic target for combination therapy.** Journal for ImmunoTherapy of Cancer, 2020.
- Schneider, M. G. M. et al. **Biomedical Applications of Iron Oxide Nanoparticles: Current Insights Progress and Perspectives.** Pharmaceutics, 2022.
- Seferbekova, Z. et al. **Spatial biology of cancer evolution.** Nature Reviews Genetics, 2023.
- Senft, A.; Dalton, T. P.; Shertzer, H. G. **Determining Glutathione and Glutathione Disulfide Using the Fluorescence Probe o-Phthalaldehyde.** Analytical Biochemistry, 2000.
- Shao, Y. et al. **Baseline monocyte and its classical subtype may predict efficacy of PD-1/PD-L1 inhibitor in cancers.** Bioscience Reports, 2021.
- Shen, S., Shao, Y., & Li, C. **Different types of cell death and their shift in shaping disease.** Cell Death Discovery, 2023.
- Shestovskaya, M. V. et al. **Iron Oxide Nanoparticles in Cancer Treatment: Cell Responses and the Potency to Improve Radiosensitivity.** Pharmaceutics, 2023.

Siegel, R. L., Giaquinto, A. N., & Jemal, A. **Cancer statistics, 2024**. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2024.

Silva, A. L. G. et al. **Methylene blue associated with maghemite nanoparticles has antitumor activity in breast and ovarian carcinoma cell lines**. Cancer Nanotechnology, 2021.

Smiley, A. T. et al. **Intracellular heterogeneity in mitochondrial membrane potentials revealed by a J-aggregate-forming lipophilic cation JC-1**. Proc. Natl. Acad. Sci USA, 1991.

Soltani, S., Mahmoudi, M., & Farhadi, E. **Dendritic Cells Currently under the Spotlight; Classification and Subset Based upon New Markers**. Immunological Investigations, 2021.

Soomro, R. et al. **A novel plant-based approach for synthesis of iron oxide nanoparticles and cancer therapy**. Discover Chemistry, 2025.

Stead, E. R., & Bjedov, I. **Balancing DNA repair to prevent ageing and cancer**. Experimental Cell Research, 2021.

Stewart, C., Ralyea, C., & Lockwood, S. **Ovarian Cancer: An Integrated Review**. Seminars in Oncology Nursing, 2019.

Strizova, Z. et al. **M1/M2 macrophages and their overlaps – myth or reality?**. Clinical Science, 2023.

Sun, L. et al. **Smart nanoparticles for cancer therapy**. Signal Transduction and Targeted Therapy, 2023.

Sun, S., Yang, Q., Jiang, D., & Zhang, Y. **Nanobiotechnology augmented cancer stem cell guided management of cancer: liquid-biopsy, imaging, and treatment**. Journal of Nanobiotechnology, 2024.

Sun, W. et al. **Combination Using Magnetic Iron Oxide Nanoparticles and Magnetic Field for Cancer Therapy**. The Chemical Record, 2024.

Takeshima, H., & Ushijima, T. **Accumulation of genetic and epigenetic alterations in normal cells and cancer risk**. Precision Oncology, 2019.

Taldaev, A. et al. **Methylene blue in anticancer photodynamic therapy: systematic review of preclinical studies**. Frontiers in Pharmacology, 2023.

Talluri, S., & Malla, R. R. **Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles (SPIONs) for Diagnosis and Treatment of Breast, Ovarian and Cervical Cancers**. Current Drug Metabolism, 2019.

Tavares, V. et al. **A Comprehensive Review of Ovarian Cancer Management in an Era of Advancements**. International Journal of Molecular Sciences, 2024.

Tian, H. et al. **Enhancing the therapeutic efficacy of nanoparticles for cancer treatment using versatile targeted strategies**. Journal of Hematology and Oncology, 2022.

Tian, W. et al. **Extracellular vesicles in ovarian cancer chemoresistance, metastasis, and immune evasion**. Cell Death and Disease, 2022.

Tong, X. et al. **Targeting cell death pathways for cancer therapy: recent developments in necroptosis, pyroptosis, ferroptosis, and cuproptosis research**. Journal of Hematology and Oncology, 2022.

Ugel, S., Canè, S., De Sanctis, F., & Bronte, V. **Monocytes in the Tumor Microenvironment**. 2025.

Vedunova, M. et al. **DC vaccines loaded with glioma cells killed by photodynamic therapy induce Th17 anti-tumor immunity and provide a four-gene signature for glioma prognosis**. Cell Death and Disease, 2022.

Vringer, E., & Tait, S. W. G. **Mitochondria and cell death-associated inflammation**. Cell Death and Differentiation, 2023.

Waks, A. G., & Winer, E. P. **Breast Cancer Treatment: A Review**. Journal of the American Medical Association, 2019.

Wang, B. et al. **Current advance of nanotechnology in diagnosis and treatment for malignant tumors**. Signal Transduction and Targeted Therapy, 2024.

Wang, C. et al. **Antigen presenting cells in cancer immunity and mediation of immune checkpoint blockade**. Em Clinical and Experimental, 2024.

Wang, L. et al. **Drug resistance in ovarian cancer: from mechanism to clinical trial**. Em Molecular Cancer, 2024.

Wang, R. et al. **The interaction of innate immune and adaptive immune system**. Em MedComm, 2024.

Warrick, K. A, **Bidirectional Communication Between the Innate and Adaptive Immune Systems.**, Annual Review Pathology, 2025.

Webb, P. M., & Jordan, S. J. Global epidemiology of epithelial ovarian cancer. Em **Nature Reviews Clinical Oncology** , 2024.

Weinberg, R. A. **The biology of Cancer**. Second. Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC, 2014.

WORLD AND HEALTH ORGANIZATION. Disponível em: < <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>>. Data de acesso: 20 de julho de 2025.

Wen, X. et al. **Breast cancer diagnosis: A systematic review**. Biocybernetics and Biomedical Engineering, 2024.

Winter, J. M., Yadav, T., & Rutter, J. **Stressed to Death: Mitochondrial stress responses connect respiration and apoptosis in cancer**. Mollecular Cell, 2022.

Wong, R. S. Y. **Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment**. Journal of Experimental & Clinical Cnacer Research, 2024.

Wu, P. T, et al. Methylene-Blue-Encapsulated Liposomes as Photodynamic Therapy Nano Agents for Breast Cancer Cells. **Nanomaterials**, 2018.

Xiao, Z. et al. **Impaired function of dendritic cells within the tumor microenvironment**. Frontiers in Immunology, 2023.

Yamamoto, A. et al. **Metastasis from the tumor interior and necrotic core formation are regulated by breast cancer-derived angiopoietin-like 7**. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2023.

- Yang, K. et al. **The war between the immune system and the tumor - using immune biomarkers as tracers.** Biomarker Research, 2024.
- Yang, K., Halima, A., & Chan, T. A. **Antigen presentation in cancer — mechanisms and clinical implications for immunotherapy.** Nature Reviews Clinical Oncology, 2023.
- Yang, M. et al. **The application of nanoparticles in cancer immunotherapy: Targeting tumor microenvironment.** Bioactive Materials, 2021.
- Yang, W. S. et al. **Regulation of ferroptotic cancer cell death by GPX4.** Cell, 2014.
- Yang, Y. et al. **The mechanisms of action of mitochondrial targeting agents in cancer: inhibiting oxidative phosphorylation and inducing apoptosis.** Frontiers in Pharmacology, 2023.
- Yaroslavsky A. N. et al. **Fluorescence Polarization of Methylene Blue as a sensitive Marker of Breast Cancer at the Cellular Level.** Scientific Reports, 2019.
- Ye, L. et al. **Metabolism-regulated ferroptosis in cancer progression and therapy.** Cell Death and Disease, 2024.
- Yin, L. et al. **Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress.** m Breast Cancer Research, 2020.
- Yu, Z. et al. **Photothermal-Triggered Extracellular Matrix Clearance and Dendritic Cell Maturation for Enhanced Osteosarcoma Immunotherapy.** ACS Applied Materials and Interfaces, 2024.
- Zamwar, U. M., & Anjankar, A. P. **Aetiology, Epidemiology, Histopathology, Classification, Detailed Evaluation, and Treatment of Ovarian Cancer.** Cureus, 2022.
- Zanna, M. Y. et al. **Review of dendritic cells, their role in clinical immunology, and distribution in various animal species.** International Journal of Molecular Sciences, 2021.
- Zhang, R. et al. **Molecular Biomarkers for the Early Detection of Ovarian Cancer.** International Journal of Molecular Sciences, 2022.
- Zhang, R., & Bozic, I. **Accumulation of Oncogenic Mutations During Progression from Healthy Tissue to Cancer.** Bulletin of Mathematical Biology, 2024.
- Zhang, T. et al. **Antigen cross-presentation in dendritic cells: From bench to bedside.** Biomedicine and Pharmacotherapy, 2023.
- Zhang, Y. et al. **ILC1-derived IFN- γ regulates macrophage activation in colon cancer.** Biology Direct, 2023.
- Zhang, Z. et al. **Redox signaling in drug-tolerant persister cells as an emerging therapeutic target.** eBioMedicine, 2023.
- Zhao, Y. et al. **Iron Oxide Nanoparticles-Based Vaccine Delivery for Cancer Treatment.** Molecular Pharmaceutics, 2018.
- Zheng, G. et al. **Familial risks of ovarian cancer by age at diagnosis, proband type and histology.** PLoS ONE, 2018.
- Zorova L. D. et al. **Mitochondrial membrane potential.** Anal. Biochem., 2018.

10. Apêndice



Laboratório de Microscopia e Microanálises
Departamento de Biologia Celular
Instituto de Ciências Biológicas
Universidade de Brasília - UnB

1

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE

Convidamos o(a) senhor(a) a participar voluntariamente do projeto de pesquisa **“Avaliação da ativação do sistema imunológico através de azul de metileno associado a nanoestruturas para câncer de mama e de ovário *in vitro*”**, sob a responsabilidade da Profa. Sônia Nair Bão e a participação da doutoranda Ana Luisa de Gouvêa da Silva. O objetivo desta pesquisa é **avaliar a ativação de células dendríticas, provenientes de células mononucleares de sangue periférico, visando o desenvolvimento de um novo tratamento para câncer de mama e de ovário.**

O(a) senhor(a) receberá todos os esclarecimentos necessários antes e no decorrer da pesquisa e lhe asseguramos que seu nome não aparecerá, sendo mantido o mais rigoroso sigilo pela omissão total de quaisquer informações que permitam identificá-lo(a).

A sua participação **consistirá em autorizar a coleta de 15 mL sangue de uma veia localizada no braço. Esse sangue será utilizado para a obtenção de células denominadas de monócitos as quais, faremos nossos estudos analisando a sua diferenciação e possível maturação de células dendríticas.**

A coleta de sangue será semelhante à coleta dos exames, feita habitualmente pelo paciente no laboratório, para exames de rotina. O local da inserção da agulha pode ficar roxo após a punção, chamado de hematoma, que desaparece com o passar dos dias. A coleta será realizada por pesquisadores capacitados para tal procedimento e com a utilização de materiais estéreis e descartáveis.

Todas as análises dos dados, assim como a coleta, previamente agendada (tempo estimado de 10 minutos), ocorrerão no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Microanálises e no Laboratório de Imunologia e Inflamação da Universidade de Brasília – UnB.

Caso aceite participar desse estudo, você deverá assinar este documento concordando com a coleta do seu sangue para o propósito descrito acima.

Os potenciais riscos decorrentes de sua participação na pesquisa será o desconforto decorrente da agulha em sua pele para a retirada do sangue. Se você aceitar participar, estará contribuindo para o desenvolvimento de um possível novo tratamento para o câncer de mama e de ovário.

O(a) Senhor(a) pode se recusar a participar de qualquer procedimento que lhe traga constrangimento, podendo desistir de participar da pesquisa em qualquer momento sem nenhum prejuízo para o(a) senhor(a).

Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo os materiais utilizados durante a coleta, assim como o deslocamento para o local. A mesma será absorvida pelo orçamento da pesquisa. Assim como, não há compensação financeira relacionada a sua participação, a qual será voluntária.

Caso haja algum dano direto ou indireto decorrente de sua participação nessa pesquisa, você receberá assistência integral e gratuita, pelo tempo que for necessário, obedecendo os dispositivos legais vigentes no Brasil. Caso o(a) senhor(a) sinta algum desconforto relacionado aos procedimentos adotados durante a pesquisa, o(a) senhor(a) pode procurar o pesquisador responsável para que possamos ajudá-lo.

Os resultados da pesquisa serão divulgados na Universidade de Brasília podendo ser publicados posteriormente. Os dados e materiais serão utilizados somente para esta pesquisa e ficarão sob a guarda do pesquisador por um período de cinco anos, após isso serão destruídos.

Ao final da pesquisa, o(a) senhor(a) será convidado(a) para a defesa de tese em que



**Laboratório de Microscopia e Microanálises
Departamento de Biologia Celular
Instituto de Ciências Biológicas
Universidade de Brasília - UnB**

apresentaremos os resultados da pesquisa aos participantes e falaremos sobre os avanços nos tratamentos para o câncer de mama e de ovário, evidenciando o uso da nanobiotecnologia e ativação do sistema imunológico. Caso tenha interesse, o(a) senhor(a) também poderá solicitar por e-mail seus resultados.

Se o(a) Senhor(a) tiver qualquer dúvida em relação à pesquisa, por favor telefone para Dra. Sônia Nair Bão na Universidade de Brasília no telefone (61) 31073122, disponível inclusive para ligação a cobrar, e e-mail snbao@unb.br.

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Ciências Humanas e Sociais (CEP/CHS) da Universidade de Brasília. O CEP é composto por profissionais de diferentes áreas cuja função é defender os interesses dos participantes da pesquisa em sua integridade e dignidade e contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos. As dúvidas com relação à assinatura do TCLE ou os direitos do participante da pesquisa podem ser esclarecidas pelo telefone (61) 3107-1592 ou do e-mail cep_chs@unb.br.

Caso concorde em participar, pedimos que assine este documento que foi elaborado em duas vias, uma ficará com o pesquisador responsável e a outra com o Senhor(a).

Nome/Assinatura

Dra. Sônia Nair Bão

Pesquisadora Responsável

Brasília, _____ de _____ de _____.

Produções acadêmicas durante o doutorado

Published at Cancer Nanotechnology

Methylene blue associated with maghemite nanoparticles has antitumor activity in breast and ovarian carcinoma cell lines

Ana Luísa G. Silva, Natália V. Carvalho, Leonardo G. Paterno, Ludmilla D. Moura, Cleber L. Filomeno, Eneida de Paula and Sônia N. Bão

Abstract

Cancer constitutes group of diseases responsible for the second largest cause of global death, and it is currently considered one of the main public health concerns nowadays. Early diagnosis associated with the best choice of therapeutic strategy, is essential to achieve success in cancer treatment. In women, breast cancer is the second most common type, whereas ovarian cancer has the highest lethality when compared to other neoplasms of the female genital system. The present work, therefore, proposes the association of methylene blue with citrate-coated maghemite nanoparticles (MAGCIT–MB) as a nanocomplex for the treatment of breast and ovarian cancer. In vitro studies showed that T-47D and A2780 cancer cell lines underwent a significant reduction in cell viability after treatment with MAGCIT–MB, an event not observed in non-tumor (HNTMC and HUVEC) cells and MDA-MB-231, a triple-negative breast cancer cell line. Flow cytometry experiments suggest that the main mechanism of endocytosis involved in the interiorization of MAGCIT–MB is the clathrin pathway, whereas both late apoptosis and necrosis are the main types of cell death caused by the nanocomplex. Scanning electron microscopy and light microscopy reveal significant changes in the cell morphology. Quantification of reactive oxygen species confirmed the MAGCIT–MB cytotoxic mechanism and its importance for the treatment of tumor cells. The lower cytotoxicity of individual solution of maghemite nanoparticles with citrate (MAGCIT) and free methylene blue (MB) shows that their association in the nanocomplex is responsible for its enhanced therapeutic potential in the treatment of breast and ovarian cancer in vitro. Treatment with MAGCIT–MB induces the death of cancer cells but not normal cells. These results highlight the importance of the maghemite core for drug delivery and for increasing methylene blue activity, aiming at the treatment of breast and ovarian cancer.

Keywords: Iron oxide nanoparticles, Cytotoxicity, Antitumor effect, ROS

Nanocarriers Used in Drug Delivery to Enhance Immune System in Cancer Therapy

Giovanna C. N. B. Lôbo, Karen L. R. Paiva, Ana Luísa G. Silva, Marina M. Simões, Marina A. Radicchi and Sônia N. Bão

Abstract

Cancer, a group of diseases responsible for the second largest cause of global death, is considered one of the main public health problems today. Despite the advances, there are still difficulties in the development of more efficient cancer therapies and fewer adverse effects for the patients. In this context, nanobiotechnology, a materials science on a nanometric scale specified for biology, has been developing and acquiring prominence for the synthesis of nanocarriers that provide a wide surface area in relation to volume, better drug delivery, and a maximization of therapeutic efficiency. Among these carriers, the ones that stand out are those focused on the activation of the immune system. The literature demonstrates the importance of this system for anticancer therapy, given that the best treatment for this disease also activates the immune system to recognize, track, and destroy all remaining tumor cells.

Keywords: nanocarriers; immune system; nanobiotechnology; câncer

Potential Biological Properties of Lycopene in a Self-Emulsifying Drug Delivery System

Sônia Nair Bão, Manuela Machado, Ana Luisa Da Silva, Adma Melo, Ana Rita Malheiro, Rui Fernandes, José Roberto S. A. Leite and Manuela Pintado, Sara Cunha, Sérgio S. Sousa, Andreanne G. Vasconcelos, João Relvas and Manuela Pintado

Abstract

In recent years, lycopene has been highlighted due to its antioxidant and anti-inflammatory properties, associated with a beneficial effect on human health. The aim of this study was to advance the studies of antioxidant and anti-inflammatory mechanisms on human keratinocytes cells (HaCaT) of a self-emulsifying drug delivery system (SEDDS) loaded with lycopene purified from red guava (nanoLPG). The characteristics of nanoLPG were a hydrodynamic diameter of 205 nm, a polydispersity index of 0.21 and a zeta potential of -20.57 , providing physical stability for the nanosystem. NanoLPG demonstrated antioxidant capacity, as shown using the ORAC methodology, and prevented DNA degradation (DNA agarose). Proinflammatory activity was evaluated by quantifying the cytokines TNF- α , IL-6 and IL-8, with only IL-8 showing a significant increase ($p < 0.0001$). NanoLPG showed greater inhibition of the tyrosinase and elastase enzymes, involved in the skin aging process, compared to purified lycopene (LPG). In vitro treatment for 24 h with 5.0 $\mu\text{g/mL}$ of nanoLPG did not affect the viability of HaCaT cells. The ultrastructure of HaCaT cells demonstrated the maintenance of morphology. This contrasts with endoplasmic reticulum stresses and autophagic vacuoles when treated with LPG after stimulation or not with LPS. Therefore, the use of lycopene in a nanoemulsion may be beneficial in strategies and products associated with skin health.

Keywords: nanomedicine; skin care; carotenoid; antioxidant; guava fruit.

Copper Oxide Nanorods: Potential Agents against Breast Cancer

Giovanna C. N. B. Lôbo, Ana Luísa G. Silva, Karine B. Barros-Cordeiro, Raquel das Neves Almeida, Ingrid Gracielle Martins da Silva, Matheus Pereira Sales, Leonardo Giordano Paterno, and Sônia N. Bão.

Abstract

Breast cancer is the second most prevalent type of cancer worldwide and the leading cause of cancer-related mortality among women. Despite substantial advancements in scientific research, cancer continues to pose a major challenge due to its high global incidence. While numerous nontargeted therapies have been developed, nanotechnology-based platforms are emerging as a promising future for cancer treatment. In this context, we investigated the in vitro antitumor activity of citrate-coated Copper oxide nanorods (CuO-nr, aspect ratio~3) against breast cancer cells. The CuO-nr colloids demonstrated stability for over 120 days under ambient conditions, with an average hydrodynamic diameter of 107.1 ± 0.67 nm and a zeta potential of -23.8 ± 1.87 mV. Cell viability assays showed that CuO-nr were minimally harmful to nontumor fibroblast cells but highly cytotoxic to MCF-7 breast cancer cells. Flow cytometry analysis suggested that early apoptosis may be the primary mechanism of cell death induced by these nanoparticles. Furthermore, significant alterations in cell morphology were observed through scanning electron microscopy. These findings indicate that citrate-coated CuO-nr possess effective antitumor activity and hold promise as potential agents for targeted cancer therapy.

Keywords: biotechnology, metallic nanoparticles, breast cancer, biocompatible nanoparticles.

Zika virus reprograms microglial mitochondrial metabolism to support immune activation and viral replication: Omega-3 DHA counteracts neuroinflammation and viral persistence

Heloísa Antoniella Braz-de-Melo, Fernanda Gomes Lago, Rafael Corrêa, Igor de Oliveira Santos, Paula Maria Quaglio Bellozi, Raquel das Neves Almeida, Wagner Fontes, Mariana de Sousa Castro, Aline Maria Araújo Martins, Raphaela Meneses Oliveira, Nadia Martins Serpa Rossi, Gabriel Pasquarelli-do-Nascimento, Ana Luisa Gouvea, Paulo Sousa Prado, Andreza Fabro de Bem, Sônia Nair Bão, Bergmann Morais Ribeiro, Stevens Kastrup Rehen, Thomas Christopher Williams, Gary P. Kobinger, Kelly Grace Magalhães.

Abstract

Microglial cells exhibit crucial metabolic adaptations to maintain neural homeostasis. However, their dysregulated activation during infections can lead to neurotoxicity and contribute to neuroinflammatory disorders. Understanding microglial physiological and metabolic changes during immune activation is essential for identifying protective targets against neuroinflammation. This study investigates how Zika virus (ZIKV) alters microglia metabolism during inflammation, highlighting cellular adaptations that sustain oxidative metabolism linked to cell survival throughout cellular activation and viral replication. After identifying an enriched abundance of proteins related to oxidative phosphorylation and cellular component organization in the global proteomics of mouse brains following ZIKV exposure, we investigated the relevance of these pathways during in vitro infection of human microglia. ZIKV infection led to cytoskeleton remodeling via β -tubulin reallocation, which characterized an ameboid-like phenotype. Despite the indication of a shift toward aerobic glycolysis due to decreased intracellular glucose, which indicates its consumption, and accumulation of tricarboxylic acid cycle (TCA) intermediates, ZIKV-infected microglia exhibit enhanced respiratory capacity and abundance of smaller-sized mitochondria in the perinuclear region. The accumulation of citrate, succinate, and malate, while maintaining mitochondrial function, suggests an important metabolic adaptation towards biosynthetic pathways that sustain cell viability under stress. Decreased intracellular glutamate abundance supports mitochondrial oxidative metabolism. Pre-treatment with the anti-inflammatory Docosahexaenoic Acid (DHA)

mitigates ZIKV-induced metabolic alterations by reducing pro-inflammatory markers, downregulating viral entry receptors, and lowering microglial activation and viral load. This study reveals that while ZIKV induces cell death in neuronal-like cells, the mitochondrial adaptation observed in microglial infection could be a key to maintaining cell survival throughout neuroinflammation. Our findings elucidate a novel cellular adaptation during ZIKV infection involving β -tubulin reorganization and metabolic dynamics, reflecting microglial flexibility and resistance during neuroinflammation, and demonstrating the therapeutic potential of DHA in mitigating ZIKV-induced pathology.

Under preparation

Evaluation of dendritic cell maturation induced by maghemite-based nanostructures associated with methylene blue for the in vitro treatment of breast and ovarian cancer

Ana Luísa G. Silva, Beatriz C. Araújo, Giovanna N. B. Lôbo, Cleber L. Filomeno, Roberia M. Pontes, Leonardo G. Paterno, Ricardo Camargo, Daniel M. P. Árdisson-Araújo, Sônia N. Bão

Premiações e Indicações à Prêmios

2021 – X Simpósio do Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular, Universidade de Brasília

Prêmio: Melhor trabalho na grande área Biologia Celular, Desenvolvimento e Câncer.

2024 – XIII Simpósio do Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular, Universidade de Brasília

Prêmio: Melhor resumo do painel de Biologia Celular e Imunologia.