

**UNIVERSIDADE DO GRANDE RIO “PROF. JOSÉ DE SOUZA HERDY”
UNIGRANRIO**

BRUNA FLOR FERREIRA

**Naftodiantronas Naturais Blefarisminas -B e -C Como Fotossensibilizadores para
Terapia Fotodinâmica de Células de Câncer de Mama Triplo Negativo MDA-MB- 231**

RIO DE JANEIRO

2025

UNIVERSIDADE DO GRANDE RIO “PROF. JOSÉ DE SOUZA HERDY”
UNIGRANRIO

BRUNA FLOR FERREIRA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza
Herdy”, como requisito parcial para a obtenção do título
de Bacharel em Biomedicina.

Orientador: Carlos Augusto Gomes Soares

RIO DE JANEIRO

2025

BRUNA FLOR FERREIRA

**Naftodiantronas Naturais Blefarisminas -B e -C Como Fotossensibilizadores para
Terapia Fotodinâmica de Células de Câncer de Mama Triplo Negativo MDA-MB-231**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza
Herdy”, como requisito parcial para a obtenção do título
de Bacharel em Biomedicina.

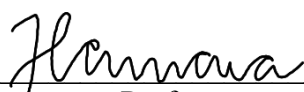
Orientador: Carlos Augusto Gomes Soares

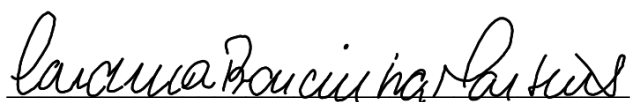
Aprovada em:

Duque de Caxias, 24 de NOVEMBRO de 2025.

BANCA EXAMINADORA


Prof. ____ (orientador)


Prof. ____


Prof. ____

AGRADECIMENTOS

Eu, Bruna Flor, agradeço primeiramente a Deus. Pois sem Ele nada disso seria possível de ser realizado, em todos os momentos eu tive certeza da presença d'Ele nessa trajetória. Agradeço também a minha mãe Claudia que não mediu esforços para que eu concluísse a faculdade. Segundo ela, essa é a maior herança que pode ser deixada aos filhos, o conhecimento.

Agradeço também a minha avó materna Maria José que sempre incentivou meus estudos e me apoiou desde o início do curso. Agradeço também aos meus melhores amigos, João Pedro Carvalho e Lucas Ferreira Dias, que compartilharam comigo esta caminhada, a faculdade seria bem árdua sem eles, nós compartilhamos momentos de aflição e de alegria. Sou grata pela vida deles, e esperançosa para compartilharmos das nossas vidas profissionais mais pra frente.

Agradeço ao meu namorado Moacyr, pelo apoio em momentos difíceis e que duvidei muito da minha capacidade na reta final do curso, mas graças a sua fé em mim pude ver que era competente para terminar o que comecei.

Agradeço ao meu orientador, Carlos pela oportunidade, e ao Coorientador Victor por todos os ensinamentos até o presente momento.

Agradeço a todos que me apoiaram até aqui, familiares e amigos!

SUMÁRIO

RESUMO.....	7
1 INTRODUÇÃO.....	8
1.1 Câncer.....	9
1.2 Câncer de Mama.....	11
1.3 Terapia Fotodinâmica (TFD).....	14
1.4 As Blefarisminas.....	15
2 OBJETIVOS.....	15
3 METODOLOGIA.....	16
3.1 Cultivo e manutenção da linhagem celular MDA-MB-321.....	16
3.3 Tratamento das células MDA-MB-2231 com naftodiantronas com e sem irradiação luminosa.....	17
3.4 Determinação da densidade celular para os tratamentos com Blefarisminas -B e -C, com e sem irradiação luminosa.....	18
3.5 Teste colorimétrico da viabilidade celular pelo método do MTT.....	19
3.6 Extração de RNA.....	19
3.6 Síntese de cDNA.....	21
3.7 Reações de RT-qPCR.....	22
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
4.1 Análise dos resultados de MTT.....	25
4.2 Análise dos resultados do RT-qPCR.....	28
5 CONCLUSÃO.....	29
PERSPECTIVAS FUTURAS:.....	29
REFERÊNCIAS.....	30

NAFTODIANTRONAS NATURAIS BLEFARISMINAS -B E -C COMO FOTOSSENSIBILIZADORES PARA TERAPIA FOTODINÂMICA DE CÉLULAS DE CÂNCER DE MAMA TRIPLO NEGATIVO MDA-MB-231

Bruna Flor Ferreira¹

Carlos Augusto Gomes Soares²

RESUMO

A pesquisa investiga a atividade fotodinâmica das Blefarisminas -B e -C, pigmentos produzidos por protozoários ciliados *Blepharisma japonicum* e estruturalmente semelhantes à Naftodiantrona vegetal hipericina produzida por *Hypericum perforatum* e reconhecida pela elevada capacidade de geração de espécies reativas de oxigênio sob irradiação luminosa. O estudo considera a relevância biológica do câncer, caracterizado por falhas nos mecanismos de reparo, proliferação e morte celular, e destaca a heterogeneidade tumoral, com ênfase no câncer de mama triplo-negativo (“TNBC” - do inglês), modelo utilizado devido à sua agressividade e baixa resposta terapêutica. Para avaliar o potencial das Blefarisminas como fotossensibilizadores, a pesquisa emprega os pigmentos solubilizados em etanol (absoluto ou 70%) em tratamentos de células MDA-MB-231 de TNBC. As células MDA-MB-231 permanecem em cultivo contínuo, passam pelo processo de semeadura e recebem os tratamentos de diferentes concentrações de Blefarisminas e Hipericina na proporção 1:1000, sendo posteriormente submetidas às condições de iluminação ou manutenção no escuro. Após o período de incubação, a viabilidade celular é determinada pelo método do MTT, que quantifica a atividade metabólica por meio da formação de cristais de formazan. Os resultados demonstram que as Blefarisminas reduzem a viabilidade de forma significativa após fotoativação, enquanto apresentam menor citotoxicidade na ausência de luz, mostrando perfil compatível com um fotossensibilizador eficaz. Análises comparativas do nível de transcritos dos genes NRF2 e HMOX1 associados à resposta a insultos oxidativos e homeostase celular redox foram realizadas por RT-qPCR em células tumorais tratadas e não-tratadas com Blefarisminas, com e sem irradiação luminosa e são apresentados. A pesquisa conclui que os pigmentos de *B. japonicum* apresentam potencial para aplicação em terapia fotodinâmica, com efeito fotoinduzido relevante e desempenho semelhante entre os veículos utilizados na solubilização.

Palavras-chave: Blefarisminas. Câncer de mama triplo-negativo. Terapia fotodinâmica. Fotossensibilizadores. Pigmentos naturais.

ABSTRACT

The research investigates the photodynamic activity of blepharismins B and C, pigments produced by the ciliated protozoan *Blepharisma japonicum* and structurally similar to the plant naphthodianthrone hypericin produced by *Hypericum perforatum*, known for its high capacity to generate reactive oxygen species under light irradiation. The study considers the biological relevance of cancer, characterized by failures in repair, proliferation, and cell death mechanisms, and highlights tumor heterogeneity, with emphasis on triple-negative breast cancer (TNBC), the model used due to its aggressiveness and poor therapeutic response. To evaluate the potential of blepharismins as photosensitizers, the research employs pigments solubilized in ethanol (absolute or 70%) to treat MDA-MB-231 TNBC cells. The MDA-MB-231 cells remain in continuous culture, undergo the seeding process, and receive treatments with different concentrations of blepharismins and hypericin at a 1:1000 ratio, followed by exposure to light or maintenance in the dark. After the incubation period, cell viability is determined using the MTT assay, which quantifies metabolic activity through the formation of formazan crystals. The results show that blepharismins significantly reduce viability after photoactivation, while exhibiting lower cytotoxicity in the absence of light, indicating a profile consistent with an effective photosensitizer. Comparative analyses of transcript levels of the NRF2 and HMOX1 genes—associated with responses to oxidative insults and redox cellular homeostasis—were performed by RT-qPCR in tumor cells treated and untreated with blepharismins, with and without light irradiation, and are presented. The research concludes that the pigments from *B.*

¹ Graduanda do curso de Biomedicina na Universidade do Grande Rio – (UNIGRANRIO).

² Doutor em Ciências Biológicas – Genética na Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) .

japonicum show potential for application in photodynamic therapy, demonstrating a relevant photoinduced effect and similar performance between the solvents used for solubilization.

Keywords: Blepharismins. Triple-negative breast cancer. Photodynamic therapy. Photosensitizers. Natural pigments.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

O câncer é uma anormalidade celular caracterizada pela falha dos mecanismos de morte celular, proliferação e reparo celular, podendo levar ao aparecimento de populações celulares atípicas em um tecido ou órgão. Quando o número dessas células ultrapassa 1 milhão, pode-se demonstrar o aparecimento do câncer (Roy et al., 2016). No funcionamento celular normal, o ciclo celular é um processo altamente regulado, possuindo diferentes mecanismos extra e intracelulares que mantêm a homeostase e diminuem a probabilidade de erro. Dentre os mecanismos presentes durante o ciclo, existem as ciclinas e CDKs (*Cyclin-dependent kinases*; Quinases dependentes de ciclinas) que regulam a passagem da célula nas diferentes fases do ciclo (Fases G1, S, G2 e Mitótica). Somado à regulação das fases, existem proteínas responsáveis pelo reparo celular em diferentes níveis ou indução de morte, como a p53 (Karidio e Sandler, 2021).

Antes que ocorra o tumor em si e a progressão para o câncer como patologia, há uma sequência de fatores, sendo estes nomeados em três pilares da carcinogênese (Kumari; Munjal; Bhatia, 2024). A eficiência dos sistemas de reparo é importante para impedir a acumulação de lesões na molécula de DNA. Quando mecanismos responsáveis pela recombinação homóloga, reparo por excisão ou reparo de erros de emparelhamento (Mismatch repair - MMR) ficam comprometidas, mutações se agrupam e ocorre o aumento da probabilidade de ativação de oncogenes ou a perda de supressores tumorais (Clarke; Mostoslavsky, 2022).

As células com danos irreparáveis devem ser eliminadas por diferentes mecanismos de morte celular programada, como a apoptose. Células tumorais geralmente inibem os sinais pró-apoptóticos ou reforçam vias antiapoptóticas, possibilitando que células danificadas sobrevivam, resistam a terapias e contribuam para progressão do tumor (Morana; Wood; Gregory, 2022). Ativação que é sustentada por oncogenes aumenta a demanda replicativa e gera estresse na forquilha de replicação. Esse estresse gera instabilidade genômica, criando mutações adicionais que favorecem seleção clonal e crescimento desordenado das células (Macheret; Halazonetis, 2015).

A carcinogênese resulta da interação entre reparo que não aconteceu devidamente, evasão da morte celular e proliferação aumentada. Os danos que não foram corrigidos

persistem, células que deveriam morrer continuam vivas e permanecem a proliferarem, amplificam mutações, este ciclo que favorece transformação em tumor (Torgovnick; Schumacher, 2015). No contexto sistêmico estabelece-se o microambiente tumoral, que é formado pela integração de diferentes componentes celulares, tumorais e não-tumorais, que em concerto, por uma série de comunicação/sinalizações parácrinas, autócrinas e justácrinas, integram múltiplos elementos, incluindo diferentes tipos de células estromais, de infiltrados imunes e células residentes associadas aos tecidos circunvizinhos incluindo células de tecido adiposo, que em conjunto com as células tumorais estabelecem a biogênese deste microambiente tumoral, numa dinâmica de processos permissivos. A progressão tumoral, como evasão do sistema imune, angiogênese e dinâmicas da matriz extracelular. Durante a sua proliferação, as células da componente tumoral iniciam a secreção de diferentes proteínas e fatores de sinalização, como por exemplo a VEGF, que cria uma ramificação dos vasos sanguíneos permitindo a nutrição e possível metástase (Anderson e Simon, 2020). A matriz extracelular e a membrana fornece estabilidade para o tumor, enquanto as células auxiliares como as células estromais e adipócitos a auxiliam na nutrição e formação de outras estruturas, como os novos vasos sanguíneos. Por fim, as células imunes são provenientes da inflamação e podem agir tanto suprimindo quanto favorecendo o crescimento tumoral (Ramos et al., 2024).

O câncer representa um desafio para a saúde pública global e com foco principal de atenção no objetivo de prolongar a expectativa de vida em todo o mundo, impulsionando a pesquisa e novas técnicas para a inovação em saúde com urgência. O Instituto Nacional de Câncer fez uma estimativa que do ano de 2023 ao ano de 2025 teriam 704 mil casos novos de câncer, estando dentro dessa estimativa o câncer de mama em mulheres, com incidência de 20,3% que equivale a 74 mil casos, sendo esse o mais incidente até o ano de 2023, computando 2,3 milhões de novos casos (Inca, 2023).

As maiores taxas de mortalidade por câncer de mama no Brasil são observadas na Região Sul e nos estados do Rio de Janeiro, São Paulo e Pernambuco. Sugerindo que tenha maior incidência por conta do estilo de vida e a residência em lugares mais urbanizados. Indo mais a fundo, a mulher que possui baixa renda per capita, pouca escolaridade, sem planos de saúde, que reside em zona rural ou em área sem acesso a cuidados e exames como a mamografia, possui menos chances de realizar o rastreamento, isso faz com que aumente a mortalidade (Inca, 2019).

1.2 Câncer de Mama

O câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais comum entre as mulheres, sendo caracterizado pelo crescimento descontrolado de células nas glândulas mamárias. Podendo ocorrer em diferentes faixas etárias, embora o risco aumente significativamente após os 50 anos, especialmente em mulheres após a menopausa. Fatores como predisposição genética (BRCA1 e BRCA2), menarca precoce, menopausa tardia, uso de terapia hormonal e obesidade estão associados ao aumento da exposição estrogênica, o que contribui para o desenvolvimento da doença. Além disso, hábitos alimentares e estilo de vida também influenciam o risco, podendo ser modificados para prevenção (Wiggs et al., 2021). O estrogênio está diretamente envolvido na regulação do crescimento e diferenciação das células mamárias, podendo aumentar o risco de mutações em mulheres com alterações nos genes BRCA1 e BRCA2 (Hilakivi-Clarke, 2000).

Embora a maioria dos cânceres de mama esteja associada a mutações adquiridas, cerca de 5% a 10% dos cânceres de mama são hereditários. As mutações nos genes do câncer de mama (BRCA-1 e 2) são responsáveis pela maior parte dos casos. Os cânceres de mama hereditários ocorrem em famílias e se desenvolvem em uma idade mais precoce do que os demais casos. BRCA1 e BRCA2 são genes supressores de tumor e as mutações neles podem prejudicar no reparo do DNA, aumentar a frequência de quebra do DNA e a instabilidade genômica, favorecendo assim a carcinogênese (Chetrit et al., 2017) (Figura 1). Os cânceres de mama associados a essas mutações geralmente são triplo-negativos, tendo prognóstico ruim e se desenvolvem em mulheres mais jovens, frequentemente em ambas as mamas. Os cânceres associados ao BRCA1 exibem mais pleomorfismo, aumento mitótico e menos formação de túbulos, todos são indicativos de tumores de alto grau. Essas mutações são responsáveis por apenas 16% a 20% do risco familiar de câncer de mama na população geral (Rajaneesh, 2023).

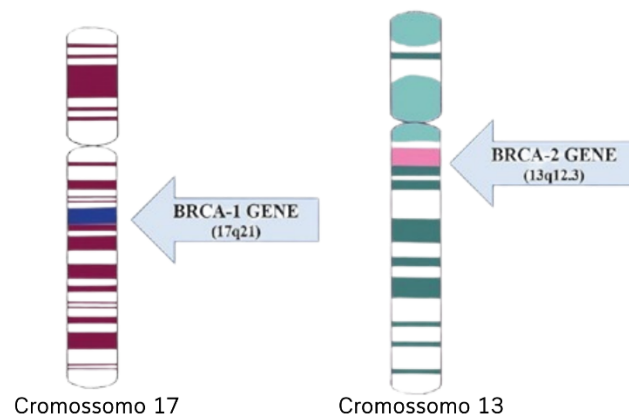


Figura 1 - Genes supressores tumorais – adaptado de Rajaneesh, 2023

O carcinoma ductal in situ (CDIS) é um tipo de câncer de mama não invasivo, podendo ser considerado o estágio inicial da doença. Ele tem início nas células epiteliais que estão revestindo os ductos mamários, canais esses que transportam o leite dentro da mama, mas ainda não ultrapassa a membrana basal que separa os ductos do restante do tecido mamário. Desta forma o tumor se comporta dentro do ducto sem invasão no tecido ao redor, sendo chamado de *in situ* (em latim, “no lugar”) (Grimm, 2021).

A presença de um componente lobular no tumor mamário inicial está relacionada a um risco aumentado para o desenvolvimento de um segundo câncer de mama. Além disso, o histórico de CDIS também representa um importante fator de risco, pois estudos indicam que mulheres previamente tratadas para CDIS possuem uma probabilidade aproximada de 3% e 6% de desenvolver um novo CDIS ou câncer de mama invasivo após 5 e 10 anos do tratamento, respectivamente. De forma semelhante, pesquisas mostram que pacientes com tumores de receptor hormonal negativo (RH⁻), especialmente aquelas diagnosticadas em faixas etárias mais jovens entre 20 e 30 anos, apresentam maior tendência ao surgimento de um segundo câncer de mama contralateral (acontecendo na mama oposta). Em contrapartida, nos casos de tumores com receptor hormonal positivo (RH⁺), a terapia endócrina, particularmente com o uso de inibidores da aromatase sendo esses medicamentos para tratamento do câncer de mama hormônio-dependente, ou seja, tumores que crescem sob a influência do estrogênio. Demonstra eficácia na redução desse risco em cerca de 33% (Kramer et al, 2019).

A segunda reincidência do câncer de mama geralmente apresenta características mais agressivas, incluindo alto grau histológico e nuclear, subtipos HER-2 positivos ou triplo-negativos, sendo frequentemente diagnosticados em estágios avançados (III ou IV). A predominância desses fenótipos agressivos pode estar relacionada ao efeito seletivo das terapias adjuvantes sistêmicas prévias, que reduzem a ocorrência de tumores menos agressivos e permitem o surgimento de linhagens celulares mais resistentes (Ding, 2024).

O câncer de mama é uma doença heterogênea, e por conta disso é dividido em subtipos moleculares, que auxiliam a compreensão do seu comportamento e a definir o tratamento mais adequado. Esses subtipos são determinados pela presença ou ausência de receptores hormonais (como estrogênio e progesterona) e pela expressão da proteína HER2 (Conant e Soo, 2021). Existem quatro tipos principais: luminal A, luminal B, HER2-enriquecido (HER2 +) e triplo-negativo (TNBC).

Os subtipos moleculares do câncer de mama são essenciais para definir o prognóstico e tratamento, pois os subtipos apresentam comportamentos biológicos diferentes. O tipo luminal A costuma ter crescimento mais lento e melhor prognóstico, com taxa de proliferação celular baixa. Esse tipo responde a terapia hormonal. O luminal B também é hormônio-dependente, é mais agressivo e pode exigir quimioterapia, possuindo índice de Ki-67 elevado, sendo essas proteínas presentes no processo de divisão celular. No HER2+ apresenta altos níveis da proteína HER2, o que favorece a multiplicação das células tumorais, podendo ser tratado com terapias-alvo, como o trastuzumabe e o pertuzumabe, que fazem o bloqueio da sinalização celular e fazem a redução do avanço tumoral (Perou et al., 2000).

O tipo triplo-negativo se caracteriza o mais agressivo, pois não expressa nenhum receptor hormonal e nem HER2, sendo tratado com quimioterapia. Estudos recentes apontam que o uso de inibidores de Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) (Bianchini et al., 2016). Estes inibidores são uma classe de fármacos para tratamento de alguns tipos de câncer, incluindo o de mama especialmente para BRCA1 ou BRCA2 (Menezes et al., 2022).

Para a identificação e rastreamento do câncer de mama, o exame convencional utilizado é a mamografia (Samuel, 1987). A mamografia é a técnica mais utilizada para o rastreamento de câncer de mama em todo o mundo (Filho et al., 2022) A mamografia gera uma imagem bidimensional utilizando raios X com baixa energia. Esses raios X auxiliam no diagnóstico através de alterações morfológicas, sendo essas, massas, calcificações ou áreas

com deformidades. A sensibilidade da mamografia é de 75% em média, podendo ser menor, por volta de 50% em pessoas com meia-idade e possuindo alta espessura de tecido mamário. Há também outros exames para rastreamento como resultados clínicos (Iranmakani, 2020).

A mastectomia poderá ser indicada em diversos cenários no tratamento do câncer de mama, especialmente quando a cirurgia conservadora da mama (CCM) não é aplicável ou apresenta resultados estéticos ou oncológicos, não garantindo que o tumor seja completamente retirado. Em tumores que possuem grande volume relativo à mama, doença multicêntrica (mais de uma parte comprometida pelo tumor), presença de células cancerígenas a margem após tentativas de ressecção, contraindicação à radioterapia ou presença de mutação genética de alto risco como BRCA1 ou BRCA2 (Waks & Winer, 2019). Em casos como estes, a mastectomia sendo, total ou modificada, oferece melhor controle local ou é preferida pelo quadro do paciente, garantindo margens livres e adequada retirada de tecido com tumor (De la Cruz Ku et al., 2022).

1.3 Terapia Fotodinâmica (TFD)

A Terapia Fotodinâmica (TFD) é uma ferramenta terapêutica que através do uso de um fotossensibilizador (FS) de baixa toxicidade e sua ativação por irradiação luminosa sob comprimento de onda específico e na presença de oxigênio molecular nas células geram singlets de oxigênio, forma eletronicamente excitada da molécula de oxigênio molecular, e diferentes espécies reativas de oxigênio (EROs) de alta citotoxicidade, sendo estas capazes de reagir com diferentes macromoléculas e componentes celulares, como proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos, promovendo danos oxidativos e a morte das células tumorais (Correia Et Al., 2021). Esse método é seletivo, fazendo com que o fotossensibilizador se mantenha preferencialmente nas células e tecidos tumorais, sendo ativado quando iluminado, minimizando os danos às células normais. Além do efeito citotóxico direto, a TFD também induz uma resposta imune antitumoral e pode comprometer a vascularização associada ao tumor. Essa combinação de efeitos faz com que a TFD tenha eficácia terapêutica e seja menos invasiva para o tratamento de diversos tipos de câncer (Karanam; Kundu; Manna, 2023).

A interação fotodinâmica depende da presença simultânea de fotossensibilizador (FS), luz e oxigênio para gerar espécies reativas que matam as células. Muitos FS comerciais têm baixa seletividade por tecido, realizando interação também em células saudáveis. A penetração da luz visível é limitada, restringindo a eficácia em lesões profundas. A hipóxia do

tumor diminui a geração de espécies reativas dependentes de oxigênio, comprometendo o rendimento da terapia fotodinâmica em micro ambientes hipóxicos, por este motivo a eficácia da TFD é ainda condicionada pela disponibilidade local de oxigênio, podendo menor em tumores hipóxicos (Agostinis et al., 2011).

1.4 As Blefarisminas

O protozoários ciliados pigmentados *Blepharisma* spp., como o *B. japonicum* presente na Ásia e África, e *B. sinuosum* presente na América do Sul, são capazes de produzir compostos fotossensíveis denominados Blefarisminas, estruturalmente semelhantes à hipericina que é extraída da planta *Hypericum perforatum* (Erva de São João) e com potencial para aplicação em terapia fotodinâmica (TFD), sendo ambas Naftodiantronas. Os pigmentos existentes em *B. japonicum* incluem 5 tipos de Blefarisminas, -A, -B, -C, -D e -E (Figura 2). Em trabalho recente nosso grupo mostrou que as Blefarisminas -B e -C possuem elevada atividade fotoinduzida, induzindo alterações em fosfolípidios e membranas celulares após exposição à luz, o que resulta em efeitos citotóxicos que reagem às células tumorais (Cavaleiro et al., 2020).

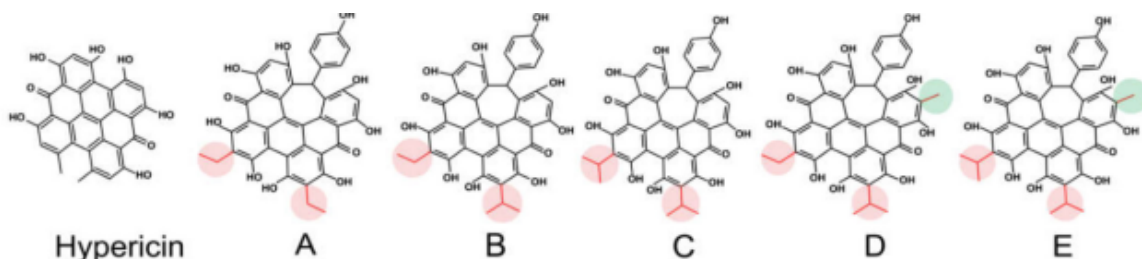


Figura 2 – A imagem representa quimicamente as estruturas dos principais das naftodiantronas encontrados no *Hypericum perforatum* (Hypericin) e *Blepharisma* spp. (Blefarisminas -A, -B, -C, -D e -E). (Adaptado de Cavaleiro et al., 2020).

2 OBJETIVOS

I) Quantificar os efeitos das Blefarisminas -B e -C na viabilidade de células tumorais de câncer de mama triplo-negativo MDA-MB-231 após acúmulo celular em comparação com hipericina, com e sem irradiação luminosa.

II) Quantificar as variações transcritos de genes associados a proteção/ homeostase redox celular incluindo o regulador NRF2 e HMOX1 (H-01) após os tratamentos com a Blefarisminas -B e -C comparativamente à hipericina, com e sem irradiação luminosa.

3 METODOLOGIA

3.1 Cultivo e manutenção da linhagem celular MDA-MB-321

A linhagem celular que será utilizada para cultura no presente trabalho é a MDA-MB-231. Sendo essa, um tipo celular de adenocarcinoma de mama, triplo-negativa, estando estas presentes em tecido epitelial. As células foram cultivadas em garrafas Corning com filtro, as manutenções foram feitas de dois em dois dias. A linhagem MDA-MB-231 possui um bom crescimento, em dois dias as células já apresentavam 100% de confluência nas condições de 37° C em 5% de CO₂

Os métodos de manutenção foram, troca de meio Dmem High Glucose, com 1% de Piruvato de sódio adicionado e 1% de Penicilina-Estreptomicina, gibco acrescido de 10% de soro fetal bovino inativado (SFB) (Gibco, New York, USA Código de Ref: 12657029), apenas quando o intervalo de tempo não era suficiente para que a célula ficasse confluenta o bastante para fazer a passagem de uma garrafa para a outra. Além da troca de meio, o outro método foi a passagem, onde pegamos a garrafa antiga, removemos o meio velho por completo, logo após lavamos com HBSS Solução Salina Balanceada de Hanks (HBSS), após a lavagem, 1 mL de tripsina (Trypsin 0,25% - gibco) é adicionada. Essa garrafa vai para a incubadora por 5 minutos, desta forma elas estarão soltas. Após isso, esse 1mL de tripsina + células são adicionadas a um falcon com 3 mL de meio totalizando 4 mL. Esse valor será dividido para duas garrafas já com 3 mL de meio. O volume final das garrafas será de 5 mL. Para o experimento. O meio de cultura não contém antibiótico.

Os procedimentos de passagem, congelamento e descongelamento foram preestabelecidos (Cavaleiro et al., 2020). As alíquotas congeladas contendo a suspensão celular em solução de congelamento (90% SFB – Soro Fetal Bovino; 10% DMSO – dimetilsulfóxido), estão dispostas em caixas com divisórias para armazenamento de criotubos retiradas do nitrogênio líquido. Após isso o microtubo com estoque de célula foi colocado dentro do fluxo e deixado descongelar em temperatura ambiente, após isso foi ser adicionado esse 1 mL a um falcon de 15 mL contendo 2 mL de meio com antibiótico e centrifugado a

1300 RPM (300 G) / 3 min. Descartando assim, o sobrenadante logo após a centrifugação, as células ressuspensas em meio de cultura e repassadas para garrafa de 25 cm² com 5 mL de meio fresco com antibiótico e incubadas à 37 °C/ 5% CO₂.

No congelamento, preferencialmente cultivadas em garrafas de 25 cm² eram utilizados. Para isto, a suspensão celular era centrifugada a 1.300 RPM (300 G) / 3 min, descartando o sobrenadante e fazer a ressuspensão das células em solução de congelamento (90% SFB; 10% DMSO) e todo o volume repassado para microtubo. Imediatamente, os criotubos eram armazenados em um Mr. Frosty contendo isopropanol, que permite o congelamento lento, e mantidos à temperatura de -80°C. Antes de estocar em nitrogênio líquido. Para o monitoramento de contaminações biológicas, as culturas eram rotineiramente observadas em microscópio ótico.

3.2 Pigmentos empregados

A Hipericina comercial (CAS 548-04-9, Santa Cruz®) foi utilizada e as Blefarisminas purificadas a partir de *B. japonicum* pelo grupo colaborador do professor doutor Federico Buonanno (do Departamento de SFBCT, Laboratório de Protistologia e Didática da Biologia, Universidade de Macerata - (UNIMC), Itália). Os pigmentos foram mantidos em solução estoque em etanol absoluto, conforme descrito (Cavaleiro et al., 2020), ou etanol 70% para minimizar erros de evaporação e efeitos ensejados nas células tratadas As soluções estoques eram ajustadas para 1000x na concentração de uso.

3.3 Tratamento das células MDA-MB-2231 com naftodiantronas com e sem irradiação luminosa.

Os testes de citotoxicidade, em primeiro momento foi realizada a avaliação de concentração celular para ser utilizada nos tratamentos com os pigmentos. Para que isso fosse levado adiante, após tripsinização, a suspensão celular era diluída (1:10 – 180 uL de meio e 20 uL de suspensão celular) em meio de cultura sem antibióticos e 10 µL empregados para contagem em câmara de Neubauer utilizando microscópio ótico. Para determinação do número de células, foi utilizado o cálculo de concentração celular de Neubauer, conforme descrito por Freshney (2005) e Camacho-Fernández (2018). A partir da concentração inicial, foi calculado o volume para a concentração final desejada. A concentração celular utilizada para o plaqueamento em placas de 96 poços (Biofil) foi de 1×10^5 volume final de 100 µL /

poço. Em seguida, as placas foram para a incubadora a 37 °C/ 5% CO₂ por 24 h e 48 h após aplicado o tratamento.

3.4 Determinação da densidade celular para os tratamentos com Blefarisminas -B e -C, com e sem irradiação luminosa.

A densidade celular para os testes de citotoxicidade utilizada, foi a partir da semeadura inicial 1×10^5 células/mL, em duas placas de cultura de 96 poços (Jet Biofil Cell and tissue culture plates - 96 well) representando as condições escuro e claro (dark-light) para os testes de fotoativação. Após pré-incubação por 24 h para adesão das células, o meio de cultura foi trocado por meio fresco sem antibiótico com tratamento já aplicado em diferentes concentrações. O tratamento foi adicionado na proporção de 1:1000. Sendo 1 uL do pigmento e 999 uL de meio sem antibiótico. Foram feitos 15 estoques em diferentes molaridades, alguns estoques dos pigmentos, tanto Blefareimina B, quanto a Blefarismina C foram solubilizados em Etanol Absoluto e outras alíquotas foram solubilizadas em Etanol 70%, apresentando resultados similares. As culturas eram colocadas na incubadora por 24 h para acúmulo dos pigmentos (Kneipp, em preparação). Logo em seguida, as condições light eram irradiadas por 30 minutos dentro do fluxo laminar sem a tampa da placa com a distância entre a placa e a luz de 10 centímetros com luz LED branca (6w, Kian) (Cavaleiro, 2020). As placas dark foram armazenadas fora da incubadora e protegidas com papel alumínio, para que não tenha contato com a luz da sala de cultura, juntamente ao tempo da placa clara. Após a iluminação, ambas placas foram incubadas por 48 h.

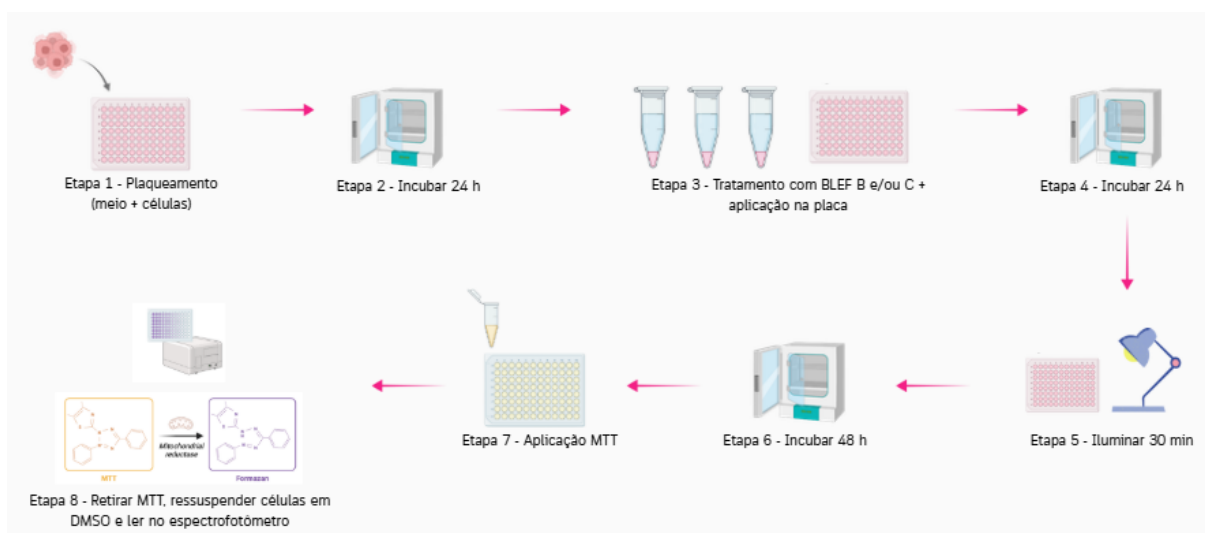


Figura 3 Esquema das etapas do teste MTT, adaptado de Mosmann, 1983 | Modelos científicos do BioRender

3.5 Teste colorimétrico da viabilidade celular pelo método do MTT

A viabilidade celular foi determinada por teste de redução de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio brometo] (MTT - Sigma-Aldrich, Missouri, USA, Código de Ref: 475989) método foi adaptado de Mosmann (1983). O MTT é um corante solúvel em Tampão Fosfato Salino 1X (PBS). Após os eventos discurridos em 2.4.1, é feita a aplicação do MTT em cada placa, tanto clara quanto escura. Sendo utilizado 10 uL de solução de MTT em cada poço.

Após a aplicação, estas placas ficarão na incubadora por 2 h. Ao passar o período elas são levadas ao fluxo, nós retiramos o MTT + tratamento e depois embalamos com papel alumínio, levando para a leitura no Espectrofotômetro. A leitura deve ser ajustada para endpoint, ajustado para o comprimento de onda de 570 nanômetros, além disso, devemos selecionar o poços que utilizamos na placa. Esta etapa do processo é um método colorimétrico que consiste na redução do MTT por redutases mitocondriais celulares, que formam em cristais de formazan, que são insolúveis e apresentam coloração roxa. Esses cristais são formados devido a algumas ou todas as células sobreviverem ao tratamento, fazendo assim, a redução. Os resultados foram expressos pelos valores referentes ao tratamento controle com etanol.

3.6 Extração de RNA

O processo de extração de RNA aconteceu a partir da purificação, utilizando as células em culturas tratadas com diferentes condições. As células foram semeadas em 2 placas de 12 poços (JetBiofil, Guandong, China, Código de Ref: TCP 011012), uma placa foi submetida a irradiação de luz (placa light) após o tratamento, enquanto a outra placa (dark) no mesmo período de iluminação era mantida em temperatura ambiente e envolvida com papel alumínio para proteção luminosa. A semeadura em placa foi feita com a adição de 1 mL de suspensão celular/poço a 100.000 células/mL e após 24h de incubação a 37 °C/ 5% CO₂ eram tratadas com 3 condições. As condições a serem analisadas foram não tratada, onde apenas o meio era trocado, a condição EtOH, com a adição de etanol em concentração avaliada antes em relação aos fotossensibilizadores. O processo de iluminação (LED branco, 6W a 10 cm de

distância por 30 minutos) foi realizada após 24 horas de tratar as células, em seguida foi realizada a extração do RNA após 2 h/48 h da irradiação de luz.

A etapa de purificação de RNA foi realizada através da utilização do liit High Pure RNA Tissue Kit (Roche, Ref: 12033674001). A princípio, foi realizada a remoção de 1 mL de meio presente que estava presente em cada poço, e adicionado individualmente em tubos eppendorfs de 1,5 mL identificados corretamente de acordo com a condição anotada na placa, seguido lavagem com 500 uL de DPBS 1x, em seguida da lavagem os 500 uL foram adicionados em seus respectivos tubos, ao final, a adição de 600 µL em cada poço de uma solução feita a partir de 400 uL do tampão de lise juntamente com 200 uL de uma solução de DPBS 1x com o detergente triton x-100 em uma proporção de 33% por amostra.

As primeiras etapas que foram descritas acontecem sequencialmente e de forma individual, um poço de cada vez. Após realizar essas etapas em todos os poços, os tubos de microcentrífuga de 1,5 mL foram centrifugados a 1000g / 3 min. O sobrenadante presente em cada tubo era descartado.

Em cada um dos poços da placa, restou 600 uL, desta forma pode ser lavado com cuidado cada poço com o seu próprio tampão de lise. Essas células já lisadas presentes no tampão, foram combinadas e homogeneizadas com os pellets dos seus respectivos eppendorfs. Em seguida os eppendorfs foram levados ao vortex por 15 segundos e logo após foram centrifugados as 13.000 g/2minutos. Os 600 uL foram adicionados aos seus respectivos tubos de filtro com membrana e encaixados em seus tubos de coleta previamente identificados, retornando a centrifugação a 13.000 g/ 30 s, seguido do descarte do líquido presente no tubo de coleta, limpeza do mesmo e encaixe com o tubo de filtro. No momento seguinte, foi adicionado de forma precisa 95 uL de uma solução de DNase 1 no centro de cada membrana. Esta solução foi constituída de 90 uL de tampão de incubação da DNase 1 acrescido de 10 uL do tampão de solubilização contendo a enzima, por amostra. Sendo necessário a espera de 15 minutos para que aconteça o processo de ação enzimática. Foi feita a adição de 500 uL do tampão de lavagem 1, para a limpeza das membranas de quaisquer resíduos possíveis e para fortalecimento das interações do RNA com a mesma.

Os tubos então, foram centrifugados a 8000 g/15 s, com o descarte do líquido presente nos tubos de coleta, limpeza dos mesmos e encaixe com os tubos de filtro. Após a etapa com o tampão de lavagem 1, o mesmo procedimento foi repetido utilizando 500 uL do tampão de lavagem 2. Em seguida, após o encaixe dos tubos de coleta nos tubos de filtro, foram

adicionados 300 uL do tampão de lavagem 2, procedendo-se à centrifugação a 13.000 g/ 2 minutos. Ao término dessa etapa, os tubos de coleta foram descartados e os tubos de filtro passaram a ser acoplados em tubos eppendorfs de 1,5 mL já identificados, destinados ao estoque do RNA após a etapa posterior de eluição.

Para a obter o RNA purificado associado às membranas, foram adicionados, 30 uL do tampão de eluição diretamente no centro das membranas, seguido de centrifugação a 8.000 g/ 1 minuto. Após essa primeira eluição, com o objetivo de maximizar a dissociação do RNA purificado da membrana, os 30 uL presentes em cada tubo de estoque foram pipetados com cuidado e atenção novamente, sendo colocados sobre suas respectivas membranas em cada tubo de filtro e submetidos a uma última centrifugação a 8.000 g/ 1 minuto.

Na conclusão desta etapa, os tubos de filtro foram descartados, e os tubos de estoque contendo o RNA purificado das amostras foram imediatamente colocados em gelo e encaminhados para quantificação do material genético ou, alternativamente, armazenados em freezer a -80 °C. A quantificação do material genético após o processo de extração de RNA purificado foi realizada por meio do espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Ref. ND-2000), pela disponibilidade do Laboratório de Genética Molecular Vegetal (IB, UFRJ). A partir disto, o RNA total purificado obtido das amostras foi utilizado para a reação de síntese de cDNA, a fim de que seja possível sua futura utilização para a análise de genes-alvo por meio da técnica de RT-qPCR.

3.6 Síntese de cDNA

As reações para obtenção dos cDNAs foram realizadas utilizando o kit Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche), responsável por converter o RNA purificado em DNA complementar (cDNA) por meio da ação de uma transcriptase reversa. Para cada amostra, foram pipetados inicialmente 9,4 uL em microtubos de PCR de 200 (0,2) uL, volume que incluía entre 200 e 600 ng de RNA eluído mantido em gelo, conforme os valores obtidos na quantificação, sendo o volume restante completado com água ultrapura de grau PCR quando necessário. Após a transferência do RNA para os microtubos, foram adicionados 2 uL de primers hexâmeros aleatórios, utilizados para hibridização em diferentes regiões do RNA total. As amostras foram mantidas em gelo até serem submetidas ao termociclador Veriti a 65 °C por 10 minutos, etapa destinada ao acoplamento dos primers, sendo então imediatamente resfriadas em gelo e retornadas ao fluxo laminar. Durante essa etapa, foi preparado o mix

enzimático necessário para a transcrição reversa, composto por tampão específico, desoxirribonucleotídeos (dNTPs) a 10 mM, Ditioneitol (DTT), inibidor de RNase e a enzima transcriptase reversa que protege a enzima de oxidação e auxilia na manutenção da atividade enzimática, 0,5 µL de Protector RNase inibitor (40U/ uL) buscando prevenir a degradação do RNA devido a variação de temperatura durante a ciclagem e por fim 1,1 µL da própria enzima transcriptase reversa, com os valores citados referentes a uma amostra. Em seguida, 8,6 uL dessa solução foram adicionados a cada microtubo contendo RNA e primers, totalizando 20 uL por reação.

As amostras foram novamente mantidas em gelo até passarem pelo protocolo de ciclagem no termociclador, que consistiu em 29 °C por 10 minutos, 48 °C por 60 minutos, 85 °C por 5 minutos e, por fim, manutenção a 4 °C. Ao término da ciclagem, os cDNAs produzidos foram armazenados a -20 °C para posterior utilização nas análises de expressão relativa por RT-qPCR.

3.7 Reações de RT-qPCR

Com o objetivo de detectar modificações na expressão gênica ocasionadas pelo tratamento com os fotossensibilizadores (FSs) sobre genes envolvidos no metabolismo do estresse oxidativo em células de câncer de mama, adotou-se a técnica de transcrição reversa seguida de PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR). Essa abordagem envolve a síntese de DNA complementar (cDNA) a partir do RNA total purificado e a amplificação exponencial desse cDNA usando a reação em cadeia da polimerase (PCR). Por meio da utilização de iniciadores específicos para os genes de interesse, a polimerase estende precisamente as regiões-alvo se estiverem presentes nas amostras. Como a reação contém um agente intercalante de DNA, a fluorescência liberada durante a amplificação pode ser medida em tempo real em um aparelho de qPCR QuantStudio 12K Flex. A quantificação da expressão pode ser realizada de forma absoluta ou relativa, comparando-se com um gene de referência previamente definido (Souza et al., 2024).

Essa metodologia foi escolhida para avaliar a expressão relativa de genes relacionados ao estresse oxidativo nas células de câncer de mama submetidas aos diferentes tratamentos. As expressões analisadas dos genes foram; NRF2, HMOX1, 36B4 e RPL22 , por conta da relação com resposta celular ao estresse oxidativo.

No contexto das análises de expressão gênica por RT-qPCR, cada par de primers utilizado se refere a um gene específico onde o nível de transcrição se busca quantificar. No presente, estavam disponíveis primers para sete genes; NRF2, HMOX1, APEX1, ATF4, STAT3, 36B4 e RPL22. Porém, apenas NRF2 e HMOX1 foram selecionados para discussão no presente trabalho, por estarem diretamente relacionados à resposta celular ao estresse oxidativo.

O gene NRF2 codifica um fator de transcrição central na indução de genes citoprotetores. Em condições de estresse oxidativo, NRF2 se move para o núcleo e ativa sequências regulatórias conhecidas como elementos de resposta antioxidante (Antioxidant Response Elements - AREs), permitindo a transcrição de diversos genes envolvidos na defesa antioxidante. Entre esses genes-alvo, o HMOX1, que codifica a enzima heme oxigenase-1, frequentemente utilizada como marcador da ativação da via NRF2 devido à sua indução para condições de estresse redox (Liao et al., 2024). A detecção da expressão desses genes pode ser realizada por meio da amplificação do cDNA obtido a partir do RNA total das amostras, utilizando primers específicos que reconhecem suas respectivas sequências. Assim, o RT-qPCR mede os níveis de expressão que já estavam presentes ao final da amostra (Reichard; Motz; Puga, 2007).

No presente estudo, foram empregados os genes 36B4 (RPLP0) e RPL22, como genes referência. Ambos codificadores de proteínas ribossomais e possuindo expressão estável em diferentes condições experimentais. A inclusão de múltiplos genes de referência aumenta a confiabilidade estatística da normalização, garantindo maior confiabilidade na análise da expressão relativa dos genes de interesse (Fiddler et al., 2021).

Todos os pares de primers utilizados foram testados para análise da sua funcionalidade através da reação de RT-qPCR. Logo após o cDNA de amostra celular pronto, foram feitas quatro replicatas, e diluições seriadas nas 1x (assim teria $\frac{1}{4}$ da concentração do cDNA), 1/2x, 1/4x, 1/8x e 1/16x, com água (H₂O) ultra pura de PCR em forma de controle negativo.

A abordagem metodológica foi adotada a partir da utilização do GoTaq qPCR Master Mix (Promega, Ref: A6001). Que consistiu do método de preparação de um mix de PCR para cada par de primer e das amostras de cDNA dos tratamentos nas células adicionando em placa de 96 poços voltada para reações de qPCR MicroAmpl 0,1 mL (Thermo FisherScientific, Ref: 434607), logo seguido do processo de amplificação quantitativa em tempo real.

A preparação dos mixes de PCR para cada par de primers foi realizada da seguinte maneira: visando um volume final de 8 μ L por poço, inicialmente foram adicionados 2 μ L de água ultrapura grau PCR em um microtubo de 1,5 mL. Em seguida, acrescentaram-se 1 μ L da solução contendo o primer senso e 1 μ L da solução contendo o primer antissenso, ambos preparados a 5 μ M. Após a combinação dos primers, foram adicionados 5 μ L do reagente Bryt Green (2 $\times$), fornecido pelo kit, que contém todos os componentes necessários para a reação de amplificação, incluindo os dNTPs, o tampão com MgCl₂, estabilizadores enzimáticos, a DNA polimerase GoTaq e o intercalante fluorescente Bryt Green.

Finalizada a solução, foi realizada a preparação das amostras para reação. Os cDNAs das amostras foram diluídos em H₂O ultra pura de grau de PCR em uma proporção 1:4, com a água sendo utilizada como controle negativo da reação em cada grupo de primers. O preenchimento da placa de 96 poços foi organizado feito da seguinte forma: 4 linhas em triplicata técnica para cada um dos 7 pares de primers, com as 3 primeiras linhas contendo cDNAs de amostras celulares e a quarta com o controle negativo. Foi adicionado em cada poço 8 μ L da solução dos primers correlativos e 2 μ L de amostra, com volume final de solução para a reação de ampliação de 10 μ L. Após concluir a etapa de pipetagem na placa, ela foi selada com filme ótico adesivo MicriAmp (ThermoFisher Scientific, Ref: 4360954), protegida da luz com papel alumínio e levada para uma etapa de centrifugação a 1500 rpm/ 4° C/ 2 min. Efetuou-se o armazenamento da placa na geladeira até o momento da reação de polimerização, ocorrendo no mesmo dia da realização do procedimento. O processo de RT-qPCR foi realizado pelo equipamento Quantstudio 12K Flex (ThermoFisher Scientific, Ref: 4471088).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A linhagem celular MDA-MB-231, derivada de câncer de mama triplo-negativo e reconhecida por seu caráter altamente agressivo e invasivo, foi selecionada para os experimentos devido à gravidade clínica frequentemente associada a esse subtipo tumoral (Shuya, 2016). A linhagem celular apresentou um tempo estimado de 2 a 3 dias até chegar no nível de confluência ideal para a passagem, onde nas condições de cultivo testadas as primeiras 24 h propicia a adesão celular nas garrafas de cultura.

Os gráficos tanto do RT-qPCR quanto de MTT foram montados a partir do programa Graphpad Prism.

4.1 Análise dos resultados de MTT

Na literatura não há relato do uso das Blefarisminas para terapia fotodinâmica em células tumorais de câncer de mama. Por este motivo será comparada a atividade destes pigmentos com a hipericina, outra Naftodiantrona, de ampla aplicação e descrição na literatura..

A análise pode ser realizada através das Figuras 4 a 6, indicando o efeito das Blefarisminas na viabilidade celular das células MDA-MB-231, relativo aos tratamentos controle com etanol. Nota-se um efeito dose dependente das Blefarisminas testadas após iluminação. Os tratamentos não-iluminados não têm efeito significativo. A baixa viabilidade celular comprova a eficácia do tratamento da placa com irradiação de luz branca. Os gráficos também evidenciam que a taxa de viabilidade é inversamente proporcional à concentração de Blefarisminas, possivelmente devido a maior concentração da molécula dentro da célula, o que está sendo investigado.

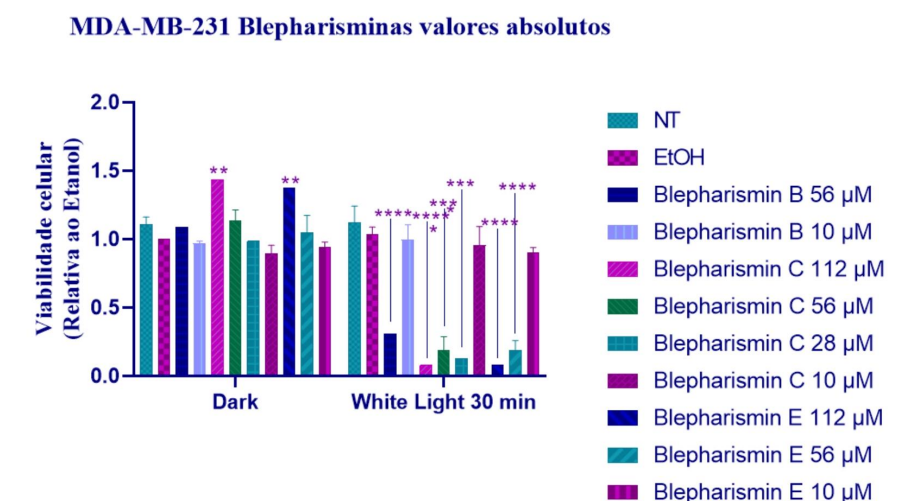


Figura 4 - Viabilidade celular da linhagem MDA-MB-231 em tratamentos com diferentes concentrações de Blefarisminas (B, C e E) no claro e escuro. Testes com 1×10^5 células/mL incubadas por 48 h. A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT. Gráfico representando as condições postas em placa em relação ao etanol. O símbolo (*) indica diferença significativa ($p < 0,05$), neste caso representa as mesmas concentrações em pigmentos diferentes comparando a eficiência do tratamento em relação ao etanol.

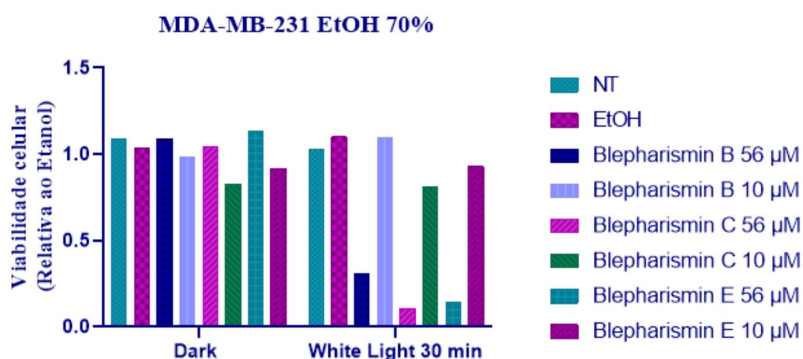


Figura 5 - O gráfico compara diferentes concentrações de Blefarismina solubilizadas em Etanol 70%. Pode-se ser comparado com o gráfico 4, que demonstra que o pigmento mantém a sua atividade diluído em Etanol 70%

MDA-MB-231 compilado de Hipericina em etanol absoluto

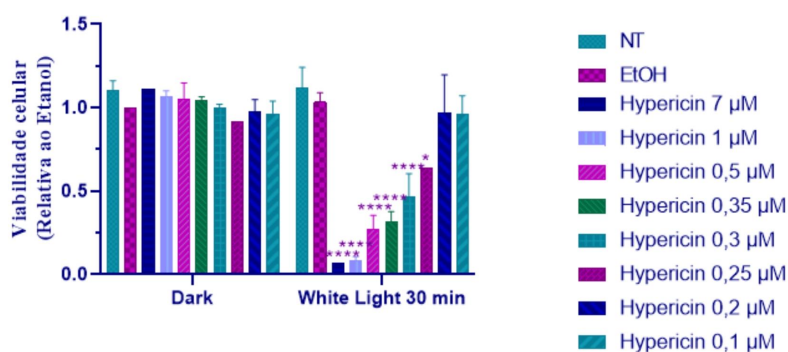


Figura 6 - Gráfico que compara variadas concentrações de Hipericina em condições de luz e escuro para o tratamento de células de câncer de mama da linhagem MDA-MB-231. (*) indica diferença significativa ($p < 0,05$), neste caso representa as mesmas concentrações em pigmentos diferentes comparando a eficiência do tratamento em relação ao etanol.

A análise deste resultado evidencia que a Hipericina, quando testada em maiores concentrações, demonstra uma eficácia significativa resultando em redução da taxa de viabilidade celular em níveis mais eficazes do que as blefarisminas. Um efeito

dose-dependente é evidente, com efeitos significativos na viabilidade celular até 0,25 μM de hipericina. A hipericina também não demonstrou redução na viabilidade celular no escuro.

A diminuição da viabilidade celular mediada pela Hipericina ocorre principalmente por intermédio da terapia fotodinâmica, esse processo depende da ativação por irradiação luminosa da Hipericina. Esse processo possui sua grande importância devido a citotoxicidade induzida e a morte celular relacionada a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) pela TFD, deste modo será causado danos às estruturas das células. As EROs podem levar à morte celular através da autofagia, necrose ou apoptose (Czarnecka-Czapczyńska et al., 2025)

O mecanismo do tipo II é responsável após a ativação do fotossensibilizador atingir o estado excitado triplete, transferindo a energia para o oxigênio molecular presente nas células. Será produzido oxigênio singlete, sendo este altamente citotóxico. O produto dessas EROs é o estresse celular. A localização da hipericina dentro da célula determina os alvos moleculares de acordo com o perfil fotocitotóxico. A hipericina, quando foi encapsulada em micelas F127 (F127/HYP), demonstrou acúmulo no retículo endoplasmático (RE) e nas mitocôndrias. Nas mitocôndrias a morte celular primariamente será induzida através dos danos causados a elas através da irradiação de luz. A Hipericina juntamente com a terapia fotodinâmica causa uma inibição irreversível do complexo III da cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria, em ênfase no centro de quinoloxidação. O centro quinoloxidante é o sítio onde o quinol (Coenzima Q reduzida) é oxidado, transferindo elétrons para o citocromo C e impulsionando a produção de ATP através da fosforilação oxidativa (Souza et al., 2022).

O dano mitocondrial depende da quantidade de luz irradiada sob a placa e a concentração do pigmento, sendo possível colapso bioenergético que favorecerá a morte celular por necrose e diminuição de defesas contra vias de morte celular. As vias de morte celular podem ser necrose, na literatura sendo o predominante. Autofagia e peroxidação lipídica particularmente em MDA-MDA-231 foram induzidas através da irradiação e o tratamento com a Hipericina, essa linhagem, segundo a literatura possui incapacidade de desintoxicar peróxidos lipídicos, sendo suscetível a peroxidação lipídica por TFD (Theodossiou et al., 2019). O efeito citotóxico da hipericina é dose-dependente e seletivo para linhagens de células tumorais quando ativada pela luz. Na ausência de luz (citotoxicidade), a hipericina não demonstrou redução na viabilidade celular. No entanto, o tratamento com

Hipericina e Blefaresmina, com foco no experimento realizado por mim, no escuro mostrou uma redução dose-dependente na sobrevivência celular (Muttiah et al., 2023).

4.2 Análise dos resultados do RT-qPCR

Os dados obtidos até o momento indicam que houve indução da expressão de resposta celular associada a estresse oxidativo maior em células sob tratamento com Blefarismina -B 10 uM mesmo sem iluminação. Apesar desta concentração ser sub-letal, indicado pelos testes de viabilidade, é no entanto capaz de induzir a resposta celular ao ataque oxidativo. Novos testes estão em andamento para verificar a resposta sob iluminação e em comparação com tratamentos empregando Blefarismina -C.

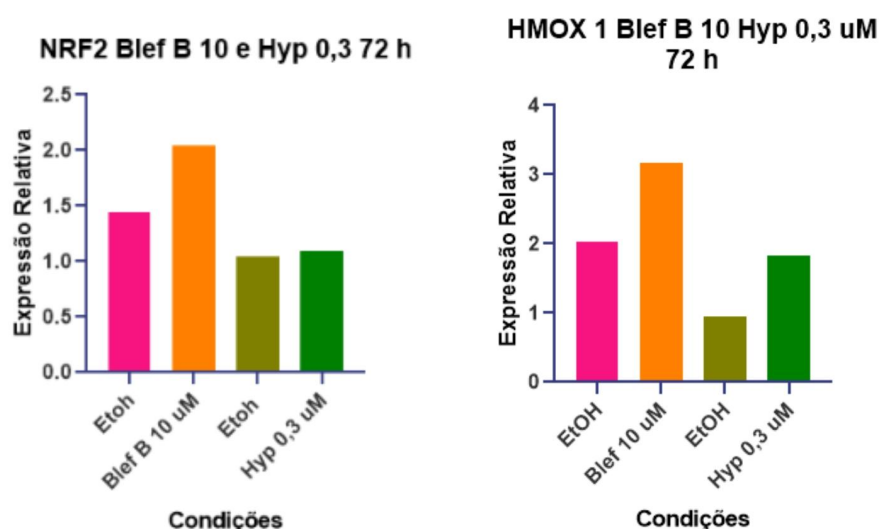


Figura 7 - Gráfico compara os diferentes pigmentos, Blefaresmina e Hipericina na expressão dos dois genes, HMOX1 e NRF-2.

Ao submeter as amostras de cDNA à análises de qPCR, observou-se que os grupos tratados com a Blefarismina B à 10 uM apresentou uma maior expressão de HMOX1 e NRF-2, evidenciando a ativação desses genes, que comprovam a presença de estresse oxidativo causada pela Blefaresmina B, pois em um cenário de estresse oxidativo, a NRF-2 atua promovendo a expressão do HMOX1, gerando a proteína HO-1 (Liu et al., 2022). Entretanto, o Fe^{2+} acumulado dentro da célula atua a favor da oxidação, levando a produção de mais EROs e, juntamente com a peroxidação dos lipídios de membrana que é acelerada

devido a reação de fenton, que quebra o peróxido de hidrogênio em duas moléculas de hidroxila, uma na forma iônica e outra na forma radical (Talvenmak et al., 2019). Por fim, com o acúmulo de ferro, EROs e lipídios oxidados, ocorre uma tensão na membrana plasmática que inevitavelmente gera o seu rompimento, levando a morte celular. Esse processo é chamado de ferroptose (Dixon e Olzmann, 2024).

Esses resultados demonstram que, mesmo em concentrações menores, ocorre um cenário de insulto oxidativo, mesmo em concentrações mais baixas de Blefaresmina B e mesmo sem a excitação luminosa. Logo, é possível supor que em concentrações mais elevadas, ocorre uma maior produção de EROs, resultando em um maior estresse oxidativo.

5 CONCLUSÃO

- A Blefaresmina B e C são solúveis tanto em etanol absoluto quanto em etanol 70%, oferecendo igual atividade sobre as células tratadas
- As concentrações de 56 uM e 28 uM de Blefarisminas -B e -C demonstraram alta citotoxicidade após acúmulo nas células MDA-MB-231. Testes adicionais estão em andamento para cálculo acurado da concentração letal de 50% (LC50).
- Diferentemente da hipericina, a Blefarismina-B mesmo sob concentração subletal de 10uM e sem irradiação luminosa é capaz de induzir a expressão dos genes NRF2 e HMOX-1, indicando ataque oxidativo.
- A viabilidade do pigmento decaiu após longos períodos em etanol 70% e testes com novos estoques precisarão ser refeitos

PERSPECTIVAS FUTURAS:

- Testar outras concentrações para cálculo da LC50.

REFERÊNCIAS

- AGOSTINIS, P. et al. Photodynamic therapy of cancer: an update. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 61, n. 4, p. 250–281, 2011.
- ALVES, A. C. S. et al. Aspectos botânicos, químicos, farmacológicos e terapêuticos do *Hypericum perforatum* L. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Campinas, v. 16, n. 3, p. 593-606, 2014.
- ANDERSON, Nicole M.; SIMON, M. Celeste. The tumor microenvironment. **Current biology: CB**, v. 30, n. 16, p. R921–R925, 2020.
- Aysola K, Desai A, Welch C, Xu J, Qin Y, Reddy V, Matthews R, Owens C, Okoli J, Beech DJ, Piyathilake CJ, Reddy SP, Rao VN. Triple Negative Breast Cancer - An Overview. **Hereditary Genet.** 2013;2013(Suppl 2):001. doi: 10.4172/2161-1041.S2-001. PMID: 25285241; PMCID: PMC4181680.
- BAE, Taegeun; HALLIS, Steffanus Pranoto; KWAK, Mi-Kyoung. Hypoxia, oxidative stress, and the interplay of HIFs and NRF2 signaling in cancer. **Experimental & molecular medicine**, v. 56, n. 3, p. 501–514, 2024.
- Bechet, D. et al. (2008) ‘Nanoparticles as vehicles for delivery of photodynamic therapy agents’, **Trends in Biotechnology**, 26(11), pp. 612–621. doi:10.1016/j.tibtech.2008.07.007.
- CARVALHO, E. et al. Molecular subtypes and mechanisms of breast cancer: Precision medicine approaches for targeted therapies. **Cancers**, v. 17, n. 7, p. 1102, 2025.
- Cavaleiro J, Oliveira NB, Ribeiro TA, Guimarães LF, Fernandes NM, da Silva-Neto ID, Marszaukowski F, Wohnrath K, Barreto CB Jr, Schweikert M, Petroni G, Ortenzi C, Buonanno F, Picciani PHS, Oliveira ON Jr, Soares CAG. Distinguishing Activities in the Photodynamic Arsenal of the Pigmented Ciliates *Blepharisma sinuosum* Sawaya, 1940 and *Blepharisma japonicum* Suzuki, 1954 (Ciliophora: Heterotrichea). **Photochem Photobiol.** 2020 Nov;96(6):1251-1266. doi: 10.1111/php.13288. Epub 2020 Jun 29. PMID: 32472704.
- CHECCUCCI, G. et al. Chemical structure of blepharismine, the photosensor pigment for *Blepharisma japonicum* J. am. Chem. Soc. 1997, 119, 5762–5763. **Journal of the American Chemical Society**, v. 119, n. 40, p. 9588–9588, 1997.
- Chen, Q. et al. (2023) ‘Clinicopathological characteristics and features of molecular subtypes of breast cancer at high altitudes’, *Frontiers in Oncology*, 12. doi:10.3389/fonc.2022.1050481.

CHETRIT, L. et al. *A systematic review of the international prevalence of BRCA1/2 mutation in women with breast cancer*. BMC Cancer, v. 17, p. 1-14, 2017. Disponível em: PMC.

CLARKE, Sarah; MOSTOSLAVSKY, Raul. DNA repair as a shared hallmark in cancer and ageing. *Frontiers in Aging*, v. 3, p. 1-15, 2022. DOI: 10.3389/fragi.2022.949014

CONANT, E. F.; SOO, M. S. *Molecular subtypes of breast cancer: a review for breast radiologists*. *Journal of Breast Imaging*, v. 3, n. 1, p. 12-24, 2021. DOI: 10.1093/jbi/wbaa110.

COSTA, L. D. L. N.; SARDINHA, A. H. L.; VERZARO, P. M.; LISBOA, L. L. C.; BATISTA, R. F. L. Mortalidade por Câncer de Mama e Condições de Desenvolvimento Humano no Brasil. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 65, n. 1, e-12050, 2019. DOI: 10.32635/2176-9745.RBC.2019v65n1.50.

CZARNECKA-CZAPCZYŃSKA, Magdalena *et al.* Hypericin photodynamic therapy induces cytotoxicity and modulates cytokine secretion in MCF-7 breast cancer cells. *Journal of clinical medicine*, v. 14, n. 21, p. 7514, 2025.

MUTTIAH BARATHANA, AHMAD KHUSAIRY ZULPA, KUMUTHA MALAR VELLASAMY, ZARIDATUL AINI IBRAHIM B, SEE MEE HOONG, VANITHA MARIAPPAND, GOPINATH VENKATRAMAN AND JAMUNA VADIVELU (ED.). Hyperforin-mediated anticancer mechanisms in MDA-MB-231 cell line: insights into apoptotic mediator modulation and caspase activation. *[S.l.]*: Journal of Taibah University for Science, 2023. v. 17

DE LA CRUZ KU, G. et al. *Surgical management of breast cancer: breast conservation and mastectomy*. *Cancer Treatment Reviews*, v. 103, p. 102337, 2022.

DE SOUZA, Maria V. F. *et al.* Effects of hypericin encapsulated on Pluronic F127 photodynamic therapy against triple negative breast cancer. *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP*, v. 23, n. 5, p. 1741–1751, 2022.

Ding L, Xu Y, Li C, Chen X. Clinical characteristics, prognosis, and prognostic factors of patients with second primary triple-negative breast cancer: a study based on Surveillance, Epidemiology, and End Results database. *Eur J Cancer Prev*. 2025 Jul 1;34(4):316-328. doi: 10.1097/CEJ.0000000000000929. Epub 2024 Nov 21. PMID: 39602200.

DIORI KARIDIO, Ibrahim; SANLIER, Senay Hamarat. Reviewing cancer's biology: an eclectic approach. *Journal of the Egyptian National Cancer Institute*, v. 33, n. 1, p. 32, 2021.

DIXON, Scott J.; OLZMANN, James A. The cell biology of ferroptosis. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 25, n. 6, p. 424–442, 2024.

DOU, Tingting *et al.* Nrf2/ARE pathway involved in oxidative stress induced by Paraquat in human neural progenitor cells. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2016, n. 1, p. 8923860, 2016.

EL-MIR, Mahmoud; NEJAD, Aida; KIM, Daniel; et al. The apoptosis paradox in cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 23, n. 3, p. 1328, 2022. DOI: 10.3390/ijms23031328

Fernandes, N. M.; Dias, R. J.; Senra, M.; Soares, C. A.; da Silva-Neto, I. D. Morphology and 18S rDNA gene sequence of *Blepharisma sinuosum* Sawaya, 1940 (Ciliophora: Heterotrichea) from Brazil. *European Journal of Protistology*, v. 49, n. 4, p. 623-633, 2013. DOI:10.1016/j.ejop.2013.04.003.

FIDDLER, J. L. et al. Evaluation of candidate reference genes for quantitative real-time PCR in a rat model of dietary iron deficiency. *Genes & Nutrition*, v. 16, 2021. DOI: 10.1186/s12263-021-00698 0

FILHO, et al. Advances in breast cancer screening modalities and status of global screening programs. *Chronic Diseases & Translational Medicine*, v. 8, n. 2, p. 112-123, 2022. DOI:10.1002/cdt3.21.

GIESE, A. C. A cytotoxin from *Blepharisma*. **The biological bulletin**, v. 97, n. 2, p. 145–149, 1949.

Grimm LJ, Rahbar H, Abdelmalak M, Hall AH, Ryser MD. Ductal Carcinoma in Situ: State-of-the-Art Review. *Radiology*. 2022 Feb;302(2):246-255. doi: 10.1148/radiol.211839. Epub 2021 Dec 21. PMID: 34931856; PMCID: PMC8805655.

HAAKE, Linda Rebecca *et al.* Viability and radiosensitivity of human tumor cells from breast and colon are influenced by *Hypericum perforatum* extract HP01. **International journal of molecular sciences**, v. 26, n. 2, p. 622, 2025.

Hilakivi-Clarke L. Estrogens, BRCA1, and breast cancer. *Cancer Res*. 2000 Sep 15;60(18):4993-5001. PMID: 11016617.

IRANMAKANI, S. et al. A review of various modalities in breast imaging: technical aspects and clinical outcomes. **The Egyptian Journal of Radiology and Nuclear Medicine**, v. 51, n. 1, 2020.

JU, Y.; ZHOU, Q. The impact of photodynamic therapy on cellular immune function in patients with cervical HPV infection. **Clinics (Sao Paulo, Brazil)**, v. 80, n. 100537, p. 100537, 2025.

KRAMER, Iris; SCHAAPVELD, Michael; OLDENBURG, Hester S. A. et al. *The Influence of Adjuvant Systemic Regimens on Contralateral Breast Cancer Risk and Receptor Subtype*. Journal of the National Cancer Institute, v. 111, n. 7, p. 709-718, 2019.

LIAO, X. et al. Mechanism of minocycline activating Nrf2/Hmox1 pathway to prevent ferroptosis and alleviate acute compartment syndrome. **Journal of orthopaedic surgery and research**, v. 19, n. 1, p. 686, 2024.

LIU, Shuyu *et al.* Protection of human lens epithelial cells from oxidative stress damage and cell apoptosis by KGF-2 through the Akt/Nrf2/HO-1 pathway. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2022, n. 1, p. 6933812, 2022.

LORD, Christopher J.; ASHWORTH, Alan. DNA repair mechanisms in cancer development and therapy. *Journal of Applied Genetics*, v. 56, p. 365–378, 2015. DOI: 10.1007/s13353-015-0285-3

KUMARI, L.; MUNJAL, S.; YADAV, R.; KUMAR, Y.; BHATIA, A. *Cancer stem cell, chromosomal instability, and cancer immunity*. **Exploration of Immunology**, v. 4, p. 169–188, 2024. DOI: <https://doi.org/10.37349/ei.2024.00135>

MACHERET, Morgane; HALAZONETIS, Thanos D. Estresse na replicação do DNA como uma característica marcante do câncer. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, v. 10, p. 425-448, jan. 2015. DOI: 10.1146/annurev-pathol-012414-040424

MENEZES, Maria Clara Saad; RAHEEM, Farah; MINA, Lida; ERNST, Brenda; BATALINI, Felipe. *PARP Inhibitors for Breast Cancer: Germline BRCA1/2 and Beyond*. *Cancers*, v. 14, n. 17, 2022. DOI: 10.3390/cancers14174332.

NAFEE, N. et al. Antibiotic-free nanotherapeutics: hypericin nanoparticles thereof for improved in vitro and in vivo antimicrobial photodynamic therapy and wound healing. **International journal of pharmaceutics**, v. 454, n. 1, p. 249–258, 2013.

Pelosi, M. S., Leite, I., Passos, L., Ferreira, C., Sabaa-Srur, A. U. O., & Fialho, E. (2020). Avaliação físico-química e capacidade antioxidante do extrato de buriti (*Mauritia flexuosa* L.) e atividade antitumoral em linhagem celular de câncer de mama MDA-MB-231 / Physico-chemical evaluation and antioxidant capacity of buriti extract and antitumor activity in breast cancer cell line MDA-MB-231. *Brazilian Journal of Development*, 6(4), 17493–17515. <https://doi.org/10.34117/bjdv6n4-064>

Rajaneesh, Nanda; Venkatesh, Samhitha .Modificações no estilo de vida e fatores genéticos que afetam o câncer de mama. *Anais de Doenças da Mama* 1(1):p 8-14, jul-dez 2023. | DOI: 10.4103/abd.abd_11_21

RAMOS, Bianca Figueiredo; LUSTOSA, Maria Alice. Câncer de mama feminino e psicologia. **Revista da SBPH**, Rio de Janeiro, v. 12, n. 1, p. 85-97, jun. 2009.

RAMOS, M. I. P. et al. Understanding the matrix: collagen modifications in tumors and their implications for immunotherapy. *Journal of Translational Medicine*, v. 22, Art. 382, 2024. DOI: 10.1186/s12967-024-05199-3.

Reichard, J. F., Motz, G. T. & Puga, Á. ***Heme oxygenase-1 induction by Nrf2 requires inactivation of the transcriptional repressor BACH1***. *Nucleic Acids Research*, v. 35, n. 21, p. 7074–7086, 2007. DOI: 10.1093/nar/gkm638.

ROY, P. S.; SAIKIA, B. J. Cancer and cure: A critical analysis. **Indian journal of cancer**, v. 53, n. 3, p. 441–442, 2016.

Samuel E. The role of mammography in the detection of breast cancer. *S Afr Med J*. 1987 Jun 20;71(12):779-80. PMID: 3299760.

SOUZA, Andressa de Vasconcelos e; FARIA, Caroline Coelho de; PEREIRA, Leonardo Matta; FERREIRA, Andrea Claudia Freitas; TORRES, Pedro Henrique Monteiro; FORTUNATO, Rodrigo Soares. *Gene Expression and Prognostic Value of NADPH Oxidase Enzymes in Breast Cancer*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 6, p. 3464, 2024. DOI: 10.3390/ijms25063464.

TALVENMÄKI, Harri *et al*. Fenton's reaction-based chemical oxidation in suboptimal conditions can lead to mobilization of oil hydrocarbons but also contribute to the total removal of volatile compounds. **Environmental science and pollution research international**, v. 26, n. 33, p. 34670–34684, 2019.

THEODOSSIOU, Theodossis A. *et al*. Simultaneous defeat of MCF7 and MDA-MB-231 resistances by a hypericin PDT-tamoxifen hybrid therapy. *NPJ breast cancer*, v. 5, n. 1, p. 13, 2019.

WAKS, A. G.; WINER, E. P. *Breast Cancer Treatment: A Review*. *JAMA*, v. 321, n. 3, p. 288-300, 2019.

Watanabe Y, Edashige K, Kobuchi H, Kato Y, Matsuoka T, Utsumi T, Yoshioka T, Horton AA, Utsumi K. Photoactivated inhibition of superoxide generation and protein kinase C activity in neutrophils by blepharismine, a protozoan photodynamically active pigment. *Biochem Pharmacol.* 1995 Feb 14;49(4):529-36. doi: 10.1016/0006-2952(94)00409-f. PMID: 7872958.

WIGGS, A. G. et al. *The effects of diet and exercise on endogenous estrogens and subsequent breast cancer risk in postmenopausal women. Frontiers in Endocrinology*, v. 12, p. 732255, 2021. DOI: 10.3389/fendo.2021.732255.

WIGGS, Alleigh G. *et al.* The effects of diet and exercise on endogenous estrogens and subsequent breast cancer risk in postmenopausal women. *Frontiers in endocrinology*, v. 12, p. 732255, 2021.

WU, J. et al. NEK2 affects the ferroptosis sensitivity of gastric cancer cells by regulating the expression of HMOX1 through Keap1/Nrf2. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 480, n. 1, p. 425–437, 2025.

Yano S, Takehara K, Miwa S, Kishimoto H, Tazawa H, Urata Y, Kagawa S, Bouvet M, Fujiwara T, Hoffman RM. In Vivo Isolation of a Highly-aggressive Variant of Triple-negative Human Breast Cancer MDA-MB-231 Using Serial Orthotopic Transplantation. *Anticancer Res.* 2016 Aug;36(8):3817-20. PMID: 27466482.

YOUNUS, L. A. et al. Photodynamic therapy in cancer treatment: properties and applications in nanoparticles. **Brazilian Journal of Biology**, v. 84, p. e268892, 2023.