**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA**

LEONARDO BARCELOS DE PAULA

**EFEITOS DA NANOEMULSÃO DE FTALOCIANINA CLORO-
ALUMÍNIO NA REGULAÇÃO DA VIA DO FATOR DE
CRESCIMENTO EPIDERMAL EM GLIOBLASTOMA E
MEDULOBLASTOMA**

**Ribeirão Preto
2015**

LEONARDO BARCELOS DE PAULA

Efeitos da nanoemulsão de ftalocianina cloro-alumínio na
regulação da via do fator de crescimento epidermal em
glioblastoma e meduloblastoma

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Genética da
Faculdade de Medicina de Ribeirão
Preto para a obtenção do título de
Doutor em Ciências.

Área de concentração:
Genética

Orientador:
Prof. Dr. Antonio Claudio Tedesco

Ribeirão Preto
2015

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

de Paula, Leonardo Barcelos.

Efeitos da nanoemulsão de ftalocianina cloro-alumínio na regulação da via do fator de crescimento epidermal em glioblastoma e meduloblastoma / Leonardo Barcelos de Paula. Ribeirão Preto, 2015.

111 f. : il.; 30 cm.

Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / Universidade de São Paulo. Área de concentração: Genética.

Orientador: Tedesco, Antonio Claudio.

1. Terapia Fotodinâmica, 2. Nanotecnologia, 3. Expressão gênica, 4. Câncer de cérebro.

FICHA DE APROVAÇÃO

Nome: de PAULA, Leonardo Barcelos

Título: Efeitos da nanoemulsão de ftalocianina cloro-alumínio na regulação da via do fator de crescimento epidermal em glioblastoma e meduloblastoma

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto para a obtenção do título de Doutor em Ciências, área de concentração Genética.

Aprovado em: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora:

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedico este trabalho às pessoas inesquecíveis em minha vida...

À minha mãe, **Margareth Maria Barcelos de Paula**, pela dedicação em tempo integral e seu amor sincero e único. Sempre lutou pela felicidade de seus filhos fortalecendo cada passo nosso através de sua imensa ternura, braços fortes e coração puro. Mulher, companheira, guerreira, lutadora, protetora, amiga, meu anjo... minha mãe! Mãe, obrigado pelo eterno amor, carinho, gratidão, pela confiança deposita em mim e por estar sempre ao meu lado onde quer que eu esteja...

Ao meu pai, **Adahil de Paula Rodrigues**, meu herói que sempre me orientou não com base nas suas próprias experiências, mas sim, demonstrando que em cada experiência existe uma lição a ser aprendida. Sempre procurou dar a melhor educação para os seus filhos mostrando o quanto é necessário a busca do conhecimento para continuar caminhando na vida. Na verdade, pai não é aquele que sempre diz “não faça isso” ou “faça aquilo”, mas sim faça o melhor de acordo com os seus princípios. Pai, obrigado por ser esse amigo sempre presente, atento, amoroso e por ter me dado todo o suporte para que eu pudesse alcançar todos os meus objetivos da melhor maneira possível.

Ao meu irmão, **Leandro Barcelos de Paula**, amigo que eu posso contar sempre em qualquer momento. Meu carinho, admiração e respeito por você não tem fronteiras. Não importa a nossa distância, sempre seremos irmãos-amigos.

À minha irmã, **Ludmilla Barcelos de Paula**, amiga que eu posso contar sempre. Está sempre disposta a me oferecer seu abraço e seu carinho incondicional. Sempre me divertiu, me surpreendeu e claro, me aconselhou quando necessário.

À minha namorada, **Marcela Dambrowski dos Santos**, pelo amor, carinho e pelos inúmeros momentos inesquecível que compartilhamos juntos. Não há palavras que possam descrever a minha profunda admiração e o carinho que tenho por você.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, mestre e amigo **Dr. Antonio Claudio Tedesco** pela oportunidade de me agregar ao seu grupo e por compartilhar de seus conhecimentos que, sem dúvida, contribuíram para o meu crescimento seja ele pessoal e/ou profissional. Ter sido seu orientado me proporcionou experiências e aprendizados únicos que eu irei levar pelo resto de minha vida. O convívio no dia-a-dia proporcionou oportunidades de enriquecimento intelectual, pessoal e, principalmente, amadurecimento profissional. Sob sua orientação, a palavra profissionalismo sempre foi marcante em seus ensinamentos. Ser membro do Centro de Nanotecnologia e Engenharia Tecidual é um grande diferencial na minha vida profissional. Parabéns pelo empenho e competência frente à pesquisa, por todo apoio e suporte para o desenvolvimento desse trabalho e por sempre me incentivar a alcançar os meus objetivos. Não tenho dúvida de que você será o meu eterno mestre. Sempre terá o meu respeito e admiração.

Ao **Dr. Fernando Lucas Primo**, pelo compartilhamento de sua experiência na vida acadêmica e pelos momentos de grandes ensinamentos para o meu crescimento profissional e pessoal.

Aos amigos do Centro de Nanotecnologia e Engenharia Tecidual (CNET-USP). Muito obrigado!!

Aos Prof(a)s. **Dr. Antonio Rossi** e **Dra. Nilce Maria Martinez-Rossi** pertencentes ao Laboratório de Biologia Molecular de Fungos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP), Departamento de Genética, que me acolheram desde o início por todo o apoio e dedicação no auxílio do desenvolvimento desse trabalho. A colaboração de vocês foi de suma importância. À **Dra. Nalu Teixeira de Aguiar Peres** por todo auxílio no desenvolvimento desse trabalho.

Ao Prof. **Dr. Luiz Gonzaga Tone** do Laboratório de Pediatria do Departamento de Puericultura e Pediatria da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto (FMRP-HC-USP), pela colaboração no desenvolvimento desse trabalho. Ao **Augusto Faria Andrade** pelo apoio e discussões científicas, mas principalmente, pela sincera amizade.

Ao Prof. **Dr. Vitor Marcel Faça** do Departamento de Bioquímica e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP), pela colaboração e apoio no

desenvolvimento dos experimentos na área de proteômica. À **Gabriela Solano Canchaya** e **Vera Lúcia Epifânio** pelo auxílio e amizade.

Ao **Dr. Marcelo Pinto Rodrigues** do Laboratório de Enziomologia do Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP-USP), pela colaboração e auxílio nas análises dos experimentos de microscopia confocalna área de proteômica.

À **Susie Adriana Penha Nalon**, secretária da Pós-graduação do Departamento de Genética (FMRP-USP), por sempre ajudar e auxiliar nos momentos burocráticos que deparamos durante esse período.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)**, pela bolsa de doutorado concedida que, sem dúvida, sem este auxílio tudo teria sido muito mais complicado.

À **Universidade de São Paulo** e ao **Departamento de Genética**, sempre preocupados na formação de excelentes pesquisadores e profissionais.

À todos que de alguma forma contribuíram para a execução desse trabalho, deixo registrado a minha eterna gratidão.

“Querem que vos ensine o modo de chegar à ciência verdadeira? Aquilo que se sabe, saber que se sabe; aquilo que não se sabe, saber que não se sabe; na verdade é este o saber.”

Confúcio (551 a.C. – 479 a.C.)

RESUMO

de Paula, L. B. Efeitos da nanoemulsão de ftalocianina cloro-alumínio na regulação da via do fator de crescimento epidermal em glioblastoma e meduloblastoma. 2015. 111 páginas. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil.

O glioblastoma multiforme (GBM) pode desenvolver-se rapidamente sem evidências clínicas, radiológicas ou morfológicas de um tumor precursor menos maligno. Entretanto, um novo tumor pode desenvolver-se a partir de células gliais normais ou de suas precursoras, sendo chamado de GBM primário. Já meduloblastoma é um tumor embrionário maligno do cerebelo, cuja incidência ocorre preferencialmente em crianças de até 7 anos. Os tumores de cérebro se diferem entre si em nível molecular. A amplificação do gene EGFR (Receptor do Fator de Crescimento Epidermal) com consequente elevação da expressão do receptor de EGF (Fator de Crescimento Epidermal) é mais proeminente em GBM primário quando comparado com GBM secundário e está presente também em meduloblastoma. O presente trabalho consiste em investigar o perfil de expressão gênica da via EGF e o perfil proteico de genes supressores de tumor e oncogenes de linhagens de células tumorais de glioblastoma e meduloblastoma após o tratamento com terapia fotodinâmica (TFD). O conhecimento da ação da TFD em tumores cerebrais em nível molecular permitiu a detecção de genes que participam da regulação da expressão gênica de outras vias de sinalização como RTK/Ras/PI3-K e AKT/MAPK que são responsáveis pela proliferação celular aumentada, sobrevivência ou resistência a apoptose e perda de aderência e migração, podendo revelar alto grau de invasividade. Portanto, o tratamento com terapia fotodinâmica em células tumorais do cérebro acrescenta informações relevantes sobre o processo de proliferação celular e da biologia do câncer.

Palavras-chave: Terapia Fotodinâmica; Nanotecnologia; Expressão gênica; Câncer de cérebro.

ABSTRACT

de Paula, L. B. Effects of nanoemulsion-chloro-aluminum phthalocyanine in the regulation of epidermal growth factor pathway in glioblastoma and medulloblastoma. 2015. 111 pages. Thesis (Doctoral Degree) – Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil.

Glioblastoma multiforme (GBM) can develop quickly without clinical, radiological or morphological of a less malignant precursor tumor. However, a new tumor can grow from normal glial cells or their precursors, is called the primary GBM. Medulloblastoma is also a malignant embryonic tumor of the cerebellum, whose incidence occurs preferentially in children under 7 years. Brain tumors differ from between them at the molecular level. The amplification of the EGFR gene (Growth Factor Receptor Epidermal) with an increase in the expression of EGF receptor (Epidermal Growth Factor) is the main cause in primary GBM compared to secondary GBM and is also present in medulloblastoma. This work to investigate the gene expression profile of the EGF pathway and the protein profile of tumor suppressor genes and oncogenes tumor cell lines of glioblastoma and medulloblastoma after treatment with photodynamic therapy (PDT). PDT's share knowledge in brain tumors at the molecular level allowed to discovery of genes that participate in the regulation of gene expression of other RTK/Ras/PI3-K and AKT/MAPK signaling pathways such as that are responsible for the increased cell proliferation, survival or resistance to apoptosis and loss of adhesion and migration, and may reveal a high degree of invasiveness. For this reason, treatment with photodynamic therapy in brain tumor cells adds relevant information about the process of cellular proliferation and cancer biology.

Keywords: Photodynamic therapy; nanotechnology; Gene expression; Brain cancer.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Mosaico de tumores apresenta população de diferentes tipos celulares.

Er

ror! Bookmark not defined.

Figura 2 - Teorias sobre a origem dos glioblastomas. A primeira teoria (a), sugere que os glioblastomas são originados a partir de células gliais maduras que sofrem mutações em oncogenes e genes supressores tumorais, levando à desdiferenciação celular e ao desenvolvimento do tumor. A segunda teoria (b) sugere que tais tumores se originam a partir de células progenitoras que sofrem eventos de transformação durante o desenvolvimento.

Er

ror! Bookmark not defined.

Figura 3 - Vias de alterações genéticas mais comuns envolvidas na progressão de astrocitomas difusos (classificação de acordo com a OMS). O esquema mostra que o glioblastoma primário se manifesta *de novo*, sem qualquer evidência clínica ou histopatológica da existência de uma lesão maligna anterior e o glioblastoma secundário se desenvolve a partir de um astrocitoma de baixo grau ou de um astrocitoma anaplásico. Adaptado de (Ohgaki e Kleihues, 2007).

Er

ror! Bookmark not defined.

Figura 4 - Diagrama de Jablonski para o processo de fotossensibilização, onde λ = absorção de luz de comprimento de onda adequado, S_0 = estado fundamental, S_1 = primeiro estado excitado singlete, S_n = estados excitados singlete superiores, T_1 = primeiro estado excitado triplete, T_n = estados excitados triplete superiores, Φ_{ic} = rendimento quântico de conversão interna, Φ_{isc} = rendimento quântico de cruzamento intersistema, k_f = constante de velocidade de fluorescência, k_p = constante de velocidade de fosforescência, k_{ET} = constante de transferência de energia. Adaptado de Lakowicz (2006).

Er

ror! Bookmark not defined.

Figura 5 - Modelo representativo da estrutura de uma partícula coloidal de uma nanoemulsão do tipo óleo em água (Primo et al., 2008).

Er
ror! Bookmark not defined.

Figura 6 - Estrutura de uma ftalocianina associada com Cloro-alumínio (ClAl) (Siqueira-Moura et al., 2010).

Er
ror! Bookmark not defined.

Figura 7 - Representação esquemática do processo de preparação NE/ClAlPc.

Er
ror! Bookmark not defined.

Figura 8 - Sistema laser de diodo (675 nm) utilizado para os tratamentos de irradiação com NE/ClAlPc.

Er
ror! Bookmark not defined.

Figura 9 - Espectros de absorção (a) e de emissão de fluorescência (b) com bandas normalizadas no UV-VIS para a ClAlPc 5,0 $\mu\text{mol/L}$ em etanol; espectroscópico (—) e após incorporação em NE (—) com $\lambda_{\text{excitação}} = 610 \text{ nm}$; fendas espectrais = 10/10 nm e integração = 0,1 s.

Er
ror! Bookmark not defined.

Figura 10 – Morfologia da nanoemulsão contendo 0,025 mg/mL de ClAlPc obtida por Microscopia Eletrônica de Transmissão . Alta resolução de 70kV e aumento de 14.000x.

Er
ror! Bookmark not defined.

Figura 11 - Viabilidade celular da concentração de NE/ClAlPc *in vitro* na ausência de luz. Ctrl: amostras controles de células cultivadas com 3% de soro fetal bovino; 0,0: amostras que correspondem a NE na ausência do fármaco fotossensível (“vazia”); 0,5; 1,0; 5,0; 10: amostras com a concentração de ClAlPc em NE por $\mu\text{mol/L}$. 1: linhagem celular de glioblastoma grau III (U343); 2: linhagem celular de glioblastoma grau IV (U87MG); 3: linhagem celular de meduloblastoma (UW473). Desvio padrão ($\pm$ SD) para n = 3.

ror! Bookmark not defined.

Figura 12 - Ensaio de proliferação celular das linhagens de glioblastoma e meduloblastoma na presença de 0,5 $\mu\text{mol/L}$ de NE/CIAIPc e sob diferentes condições de irradiação. (A) Glioblastoma grau III (U343); (B) Glioblastoma grau IV (U87MG); e (C) Meduloblastoma (UW473). Ctrl: amostras controles de células cultivadas com 3% de soro fetal bovino; Ctrl-E: amostras controles com NE/CIAIPc na ausência de luz visível; Ctrl-L: amostras controles que foram submetidas à luz visível na dose de 700 mJ/cm^2 na ausência de NE/CIAIPc; L1: amostras com NE/CIAIPc submetidas à luz visível na dose de 100 mJ/cm^2 ; L2: amostras com NE/CIAIPc submetidas à luz visível na dose de 200 mJ/cm^2 ; L3: amostras com NE/CIAIPc submetidas à luz visível na dose de 700 mJ/cm^2 . A significância estatística foi expressa em *p < 0,05.

Er

ror! Bookmark not defined.

Figura 13 - Localização subcelular da nanoemulsão carregada com o fármaco fotossensível (NE/CIAIPc). U343: Glioblastoma grau III; U87MG: Glioblastoma grau IV; UW473: Meduloblastoma; DAPI (azul): marcação nuclear; Faloidina (verde): marcação de filamentos de actina; CIAIPc (vermelho): marcação da nanoemulsão carregada com ftalocianina cloro-alumínio.

Er

ror! Bookmark not defined.

Figura 14 - Ensaio de morte celular das linhagens de glioblastoma e meduloblastoma na presença da NE/CIAIPc (0,5 $\mu\text{mol/L}$) sob diferentes condições submetidas à luz visível após 48 horas. Ctrl: amostras controles de células cultivadas com 3% de soro fetal bovino; Ctrl-E: amostras controles com NE/CIAIPc na ausência de luz visível; Ctrl-L: amostras controles que foram submetidas à luz visível na dose de 700 mJ/cm^2 na ausência de NE/CIAIPc; L1: amostras com NE/CIAIPc submetidas à luz visível na dose de 100 mJ/cm^2 ; L3: amostras com NE/CIAIPc submetidas à luz visível na dose de 700 mJ/cm^2 . A significância estatística foi expressa em *p < 0,05.

Er

ror! Bookmark not defined.

Figura 15 - Expressão gênica relativa da via de EGF da linhagem de glioblastoma de grau III (U343) após o tratamento com terapia fotodinâmica - TFD (100 mJ/cm²). Ctrl: amostras controles de células cultivadas com 3% de soro fetal bovino. A significância estatística foi expressa em *p <0,05.

Er

ror! Bookmark not defined.

Figura 16 – Processos biológicos nos quais os genes diferencialmente expressos na linhagem de glioblastoma de grau III (U343) estão envolvidos. Base de dados: *Gene Ontology* (PANTHER v.8.0) e/ou KEGG (v.73.0).

Er

ror! Bookmark not defined.

Figura 17 - Expressão gênica relativa da via de EGF da linhagem de glioblastoma de grau IV (U87MG) após o tratamento com terapia fotodinâmica - TFD (100 mJ/cm²). Ctrl: amostras controles de células cultivadas com 3% de soro fetal bovino. A análise estatística foi realizada por *two-way* (ANOVA) seguido do teste de Bonferroni. A significância estatística foi expressa em *p <0,05.

Er

ror! Bookmark not defined.

Figura 18 - Processos biológicos nos quais os genes diferencialmente expressos na linhagem de glioblastoma de grau IV (U87MG) estão envolvidos. Base de dados: *Gene Ontology* (PANTHER v.8.0) e/ou KEGG (v.73.0).

Er

ror! Bookmark not defined.

Figura 19 - Expressão gênica relativa da via de EGF da linhagem de meduloblastoma (UW473) após o tratamento com terapia fotodinâmica - TFD (100 mJ/cm²). Ctrl: amostras controles de células cultivadas com 3% de soro fetal bovino. A análise estatística foi realizada por *two-way* (ANOVA) seguido do teste de Bonferroni. A significância estatística foi expressa em *p <0,05.

Er

ror! Bookmark not defined.

Figura 20 - Processos biológicos nos quais os genes diferencialmente expressos na linhagem de meduloblastoma (UW473) estão envolvidos. Base de dados: *Gene Ontology* (PANTHER v.8.0) e/ou KEGG (v.73.0).

ror! Bookmark not defined.

Figura 21 - Expressão relativa dos genes *CHUK* e *MAPK8* observada nas linhagens de glioblastoma (U87MG) e meduloblastoma (UW473). Controle (Ctrl): amostras controles de células cultivadas com 3% de soro fetal bovino; Terapia Fotodinâmica (TFD): amostras de células que foram submetidas ao tratamento. A significância estatística foi expressa em *p <0,05.

ror! Bookmark not defined.

Figura 22 – Processos biológicos nos quais os genes *CHUK* e *MAPK8* estão envolvidos. Base de dados: *Gene Ontology* (PANTHER v.8.0) e/ou KEGG (v.73.0).

ror! Bookmark not defined.

Figura 23 - Análise do extrato celular pelo método de monitoramento de reações múltiplas (MRM) após o tratamento com TFD das linhagens de glioblastoma (U343 e U87MG) e meduloblastoma (UW473). HE4: *human epididymis protein 4*; TWIST: *Twist-related protein 1*; TIMP1: *tissue inhibitors of metalloproteinases*; FN1: *fibronectin 1*; MMP2: *metalloproteinase-2*; SOD2: *Superoxide dismutase 2*; OLFM4: *olfactomedin-4*; MMP9: *metalloproteinase-9*.

ror! Bookmark not defined.

Figura 24 - Expressão de BRCA1, HER2/ErbB2 e PTEN por *western blotting*. Imuno-marcação das linhagens celulares U87MG, U343 e UW473 antes (Ctrl: controle) e depois do tratamento com TFD: Terapia Fotodinâmica (100 mJ/cm²) após um período de 24 horas. KDa: peso molecular das proteínas. A proteína GAPDH foi utilizada para controle experimental.

ror! Bookmark not defined.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Paineis dos peptídeos proteotípicos utilizados no desenvolvimento do método de monitoramento de reações múltiplas.

Er

ror! Bookmark not defined.

Tabela 2 - Tamanho de partícula, potencial zeta e polidispersidade da nanoemulsão na ausência (NE) e na presença (NE/ClAlPc) do fármaco fotossensível (ClAlPc).

Er

ror! Bookmark not defined.

Tabela 3 - Concentrações dos extratos proteicos obtidos das linhagens celulares na ausência e presença do tratamento com terapia fotodinâmica.

Er

ror! Bookmark not defined.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%	Por cento
°	Grau
°C	Graus Celsius
®	Marca registrada
±	Mais ou menos
<	Sinal de menor
Å	Angstrom
A/GC	meduloblastomas anaplásicos/de grandes células
ABI1	do inglês <i>Abelson interactor 1</i>
ACN	Acetonitrila
AKT	conhecida como Proteína quinase B (PKB)
AKT1	do inglês <i>RAC-alpha serine/threonine-protein kinase</i>
AKT2	do inglês <i>RAC-beta serine/threonine-protein kinase</i>
AKT3	do inglês <i>RAC-gamma serine/threonine-protein kinase</i>
Al ³⁺	do inglês <i>trivalent aluminium</i>
ARAF	do inglês <i>Serine/threonine-protein kinase A-Raf</i>
ATCC	do inglês <i>American Type Culture Collection</i>
BAD	do inglês <i>BCL2-associated death promoter</i>
BAX	do inglês <i>Transforming Growth Factor, Alpha</i>
BCL2	do inglês <i>Cell BCL2-associated X protein</i>
BRAF	do inglês <i>Serine/threonine-protein kinase B-Raf</i>
BRCA1	do ingles <i>Breast cancer type 1 susceptibility protein</i>
CAM	do inglês <i>Cell adhesion molecule</i>
CAV1	do inglês <i>Caveolin-1</i>
CAV2	do inglês <i>Caveolin-2</i>
CBL	do inglês <i>Casitas B-lineage Lymphoma</i>
CDH1	do inglês <i>Cadherin-1</i>
cDNA	do inglês <i>Complementary desoxiribonucleic acid</i>
CHUK	do inglês <i>Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit alpha</i>
CID	do ingles <i>Colision Induced Dissociation</i>
ClAlPc	do inglês <i>Chloroaluminium Phthalocyanine</i>
cm ²	Centímetros quadrados
CO ₂	Dióxido de Carbono
CSK	do inglês <i>Tyrosine-protein kinase CSK</i>
CTNNB1	do inglês <i>Cadherin-associated protein, beta 1</i>
DAPI	do ingles <i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>
DIRAS3	do inglês <i>DIRAS family, GTP-binding RAS-like 3</i>
DMEM	do inglês <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	do inglês <i>Dimethyl Sulfoxide</i>
DNA	do inglês <i>Desoxiribonucleic acid</i>
DO	Densidade óptica
DOK2	do inglês <i>Docking protein 2</i>
DTT	do inglês <i>Dithiothreitol</i>
EGF	do inglês <i>Epidermal growth factor</i>
EGFR	do inglês <i>Epidermal growth factor receptor</i>

ELK1	do inglês <i>ETS domain-containing protein Elk-1</i>
EPS8	do inglês <i>Epidermal growth factor receptor kinase substrate 8</i>
ERBB2	do inglês <i>Receptor tyrosine-protein kinase erbB-2</i>
ERK	do inglês <i>Extracellular signal-regulated kinases</i>
ERK	do ingles <i>Extracellular signal-regulated kinases</i>
EROS	Espécie reativa de oxigênio
EUA	Estados Unidos da América
FA	Fase Aquosa
FDA	do inglês <i>Food and Drug Administration</i>
FFCLRP	Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão
FITC	do ingles <i>Fluorescein isothiocyanate</i>
FO	Fase Orgânica
FOS	do inglês <i>Proto-oncogene protein c-fos</i>
GAB1	do inglês <i>GRB2-associated-binding protein 1</i>
GBM	Glioblastoma multiforme
GRB2	do inglês <i>Growth factor receptor-bound protein 2</i>
Gy	do ingles <i>Gray</i>
HCl	Ácido Clorídrico
HIF1	do inglês <i>Hypoxia-inducible factors</i>
HRAN	Hospital Regional da Asa Norte
HRAS	do inglês <i>HRAS-like suppressor 3</i>
IAA	iodoacetamida
IDH1	do inglês <i>Isocitrate Dehydrogenase-1</i>
IKBKB	do inglês <i>Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit beta</i>
IKBKE	do inglês <i>Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit epsilon</i>
IKBKG	do inglês <i>Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit gamma</i>
INCON	Instituto de Nanobiotecnologia do Centro-Oeste e Norte
JAK1	do inglês <i>Janus kinase 1</i>
JAK2	do inglês <i>Janus kinase 2</i>
JUN	do inglês <i>c-Jun-amino-terminal kinase-interacting protein 1-like</i>
KRAS	do inglês <i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
Kv	do inglês <i>Kilovolts</i>
L	Litros
LOH	do inglês <i>Loss of heterozygosity</i>
m ²	metros quadrados
MAP2K1	do inglês <i>Mitogen-activated protein kinase kinase 1</i>
MAP2K2	do inglês <i>Mitogen-activated protein kinase kinase 2</i>
MAP2K4	do inglês <i>Mitogen-activated protein kinase kinase 4</i>
MAP2K7	do inglês <i>Mitogen-activated protein kinase kinase 7</i>
MAP3K1	do inglês <i>Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1</i>
MAPK	do inglês <i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MAPK1	do inglês <i>Mitogen-activated protein kinase 1</i>
MAPK10	do inglês <i>Mitogen-activated protein kinase 10</i>
MAPK3	do inglês <i>Mitogen-activated protein kinase 3</i>
MAPK8	do inglês <i>Mitogen-activated protein kinase 8</i>
MAPK9	do inglês <i>Mitogen-activated protein kinase 9</i>
MDM2	do inglês <i>Mouse double minute 2 homolog (gene)</i>
mdm2	do inglês <i>Mouse double minute 2 homolog (protein)</i>

MDR	do inglês <i>Multidrug Resistance</i>
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
mg	Miligrama
mJ	Mili-Jaules
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mm	Milímetros
mm ²	Milímetros quadrado
MO	Medula Óssea
MRAS	do inglês <i>Muscle RAS oncogene homolog</i>
MTT	do inglês “Dimethyl thiazolyl diphenyl tetrazolium salt”
MUC1	do inglês <i>Mucin 1</i>
mV	Mili-volts
MYC	do inglês (<i>c-Myc</i>) <i>is a regulator gene that codes for a transcription factor</i>
NCK1	do inglês <i>Cytoplasmic protein NCK1</i>
NE	Nanoemulsão
NFKB1	do inglês <i>Nuclear factor NF-kappa-B p105 subunit</i>
NFKB2	do inglês <i>Nuclear factor NF-kappa-B p100 subunit</i>
NFκB	do inglês <i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
nm	Nanômetro
nmol	nanomolar
NRAS	do inglês <i>Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog</i>
O ₂	Oxigênio
OMS	Organização Mundial da Saúde
p	Valor-p
P13K	do inglês <i>Phosphoinositide 3-kinase</i>
p16INK4a	do inglês <i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A, multiple tumor suppressor 1</i>
p53	do inglês <i>TP53-target gene 3 protein-like</i>
PAK1	do inglês <i>Serine/threonine-protein kinase PAK 1</i>
pAKT	AKT fosforilada
PBS	do inglês <i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	do inglês <i>Polimerase chain reaction</i>
PDGF	do inglês <i>Platelet-derived growth factor</i>
PDK1	do inglês <i>Pyruvate Dehydrogenase Kinase 1</i>
PDKs	do inglês <i>Phosphoinositide-dependent kinase</i>
PDPK1	do inglês <i>Phosphoinositide-dependent kinase-1</i>
Pgp	P-glicoproteína
pH	Potencial hidrogeniônico
PI	do inglês <i>Propidium iodide</i>
PI3K	do inglês <i>Phosphoinositide 3-kinase</i>
PIK3C2A	do inglês <i>Phosphatidylinositol-4-phosphate 3-kinase C2 domain-containing alpha polypeptide</i>
PIK3C2B	do inglês <i>Phosphatidylinositol-4-phosphate 3-kinase C2 domain-containing beta polypeptide</i>
PIK3CA	do inglês <i>Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit alpha</i>
PIK3CB	do inglês <i>Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit beta isoform</i>
PIK3CD	do inglês <i>Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit delta isoform</i>
PIK3R1	do inglês <i>Phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit alpha</i>
PIK3R2	do inglês <i>Phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit beta</i>
PIP2	do inglês <i>Phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate</i>

PIP3	do inglês <i>Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate</i>
PKB	do inglês <i>Protein Kinase B</i>
PLCG1	do inglês <i>Phospholipase C, gamma 1</i>
PRKCA	do inglês <i>Protein kinase C alpha (PKCα)</i>
PRKCB	do inglês <i>Protein kinase C beta type</i>
PRKCD	do inglês <i>Protein kinase C delta type</i>
PRKCE	do inglês <i>Protein kinase C epsilon type</i>
PRKCG	do inglês <i>Protein kinase C gamma type</i>
PRKCQ	do inglês <i>Protein kinase C theta (PKC-θ)</i>
PRKCZ	do inglês <i>Protein kinase C, zeta</i>
PTEN	do inglês <i>Phosphatase and tensin homolog</i>
PTK2	do inglês <i>PTK2 protein tyrosine kinase 2 (PTK2)</i>
PXN	do inglês <i>Paxillin</i>
RAB5A	do inglês <i>Ras-related protein Rab-5A</i>
RAC1	do inglês <i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1</i>
RAF1	do inglês <i>RAF proto-oncogene serine/threonine-protein kinase</i>
RAS	do inglês
RASA1	do inglês <i>RAS p21 protein activator 1</i>
Rb	Retinoblastoma
REL	do inglês <i>Proto-oncogene c-Rel</i>
RELA	do inglês <i>Transcription factor p65</i>
RELB	do inglês <i>Transcription factor RelB</i>
RHOA	do inglês <i>Ras homolog gene family, member A</i>
RHOB	do inglês <i>Ras homolog gene family, member B,</i>
RHOC	do inglês <i>Ras homolog family member C</i>
RHOD	do inglês <i>Ras homolog family member D</i>
RHOG	do inglês <i>Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) alpha</i>
RNA	do inglês <i>Ribonucleic acid</i>
RND3	do inglês <i>Rho family GTPase 3</i>
rpm	rotações por minuto
RRAS	do inglês <i>related RAS viral (r-ras) oncogene homolog</i>
RRAS2	do inglês <i>related RAS viral (r-ras) oncogene homolog 2</i>
RT-PCR	do inglês <i>Reverse transcriptase-polymerase chain reaction</i>
RTK	do inglês <i>Receptor tyrosine kinase</i>
SD	do inglês <i>Standard deviation</i>
SDS-PAGE	do inglês <i>Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
SFB	Soro Fetal Bovino
SHC1	do inglês <i>SHC (Src homology 2 domain containing) transforming protein 1</i>
SHC3	do inglês <i>SHC (Src homology 2 domain containing) transforming protein 3</i>
SHH	do inglês <i>Sonic Hedgehog</i>
SNC	Sistema Nervoso Central
SOS1	do inglês <i>Son of sevenless homolog 1</i>
SOS2	do inglês <i>Son of sevenless homolog 2</i>
SP	São Paulo
SRC	do inglês <i>Tyrosine-protein kinase Src</i>
STAT1	do inglês <i>Signal transducer and activator of transcription 1</i>
STAT3	do inglês <i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>
TBS-T	do inglês <i>Tris-Buffered Saline and Tween 20</i>

TCGA	do inglês <i>The Cancer Genome Atlas</i>
TFD	Terapia Fotodinâmica
TGFA	do inglês <i>Transforming Growth Factor, Alpha</i>
™	do inglês <i>Trademark symbol</i>
TMZ	Temozolamida
TP53	do inglês <i>TP53-target gene 3 protein-like</i>
TWIST	do inglês <i>TWIST family bHLH transcription factor 1</i>
UNB	Universidade de Brasília
Unico	Unidade de Cosmiatria, Cirurgia e Oncologia
Unifesp	Universidade Federal de São Paulo
USP	Universidade de São Paulo
UV	Ultra violeta
UV-VIS	radiação ultra-violeta na região da luz visível
V	Volume
v/v	Volume/Volume
VAV1	do inglês <i>Vav 1 guanine nucleotide exchange factor</i>
VAV2	do inglês <i>Vav 2 guanine nucleotide exchange factor</i>
VAV3	do inglês <i>Vav 3 guanine nucleotide exchange factor</i>
VEGF	do inglês <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VEGFR	do inglês <i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptors</i>
WNT	do inglês <i>Wingless</i>
xg	do inglês <i>G-Force</i>
Zn ²⁺	Zinco
α-MEM	do inglês <i>Minimum Essential Medium Alpha</i>
β	beta
μg	Microgramas
μL	Microlitro
μm	Micrômetro
μmol	Micromolar

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	26
1.1 GLIOMA – ASPECTOS GERAIS	26
1.1.1 Classificação em relação ao tipo celular	Error! Bookmark not defined.
1.1.2 Classificação em relação à localização tumoral	Error! Bookmark not defined.
1.1.3 Classificação em relação à malignidade tumoral	Error! Bookmark not defined.
1.2 GLIOBLASTOMA MULTIFORME	27
1.2.1 Etiologia	27
1.2.2 Características histológicas e tumorais dos GBMs	Error! Bookmark not defined.
1.3 ALTERAÇÕES GENÉTICAS EM GBMS	28
1.4 PROGNÓSTICO E TERAPIA DOS GBMS	29
1.5 MEDULOBLASTOMA – ASPECTOS GERAIS	30
1.5.1 Classificação histológica	Error! Bookmark not defined.
1.5.2 Classificação molecular	Error! Bookmark not defined.
1.5.3 Outros possíveis marcadores para prognósticos	Error! Bookmark not defined.
1.6 TERAPIA FOTODINÂMICA	32
1.6.1 Sistema de liberação de fármacos	33
1.6.2 Fármacos fotossensíveis: Ftalocianinas	Error! Bookmark not defined.
2. OBJETIVOS	36
2.1 OBJETIVO GERAL	36
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
3. MATERIAL E MÉTODOS	38
3.1 PREPARAÇÃO DA FORMULAÇÃO	38
3.1.1 Nanoemulsão conjugada com ftalocianina cloro-alumínio	Error! Bookmark not defined.

3.1.2	Caracterização da nanoemulsão conjugada com cloro-alumínio ftalocianina por espectroscopia de fluorescência	Error! Bookmark not defined.
3.2	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO	Error! Bookmark not defined.
3.3	PADRONIZAÇÃO DAS CULTURAS CELULARES	38
3.4	ENSAIOS FUNCIONAIS NAS LINHAGENS DE GLIOBLASTOMA E MEDULOBLASTOMA	39
3.4.1	Ensaio de proliferação celular	39
3.4.2	Análise da localização subcelular da nanoemulsão conjugada com ftalocianina cloro-alumínio	Error! Bookmark not defined.
3.4.3	Estudo do mecanismo de morte celular	39
3.5	ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA	40
3.5.1	Extração de RNA total	40
3.5.2	Quantificação de RNA	40
3.5.3	Construção do cDNA	41
3.5.4	Análise da via de sinalização EGF	Error! Bookmark not defined.
3.6	ANÁLISE PROTEÔMICA DIRIGIDA	41
3.6.1	Obtenção e purificação do extrato celular total	41
3.6.2	Quantificação de proteínas	42
3.6.3	Digestão de proteínas	42
3.6.4	Purificação das amostras	43
3.6.5	Método de monitoramento de reações múltiplas	Error! Bookmark not defined.
3.6.6	Análise de proteínas oncogênicas e supressoras de tumor	Error! Bookmark not defined.
3.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	43

4. RESULTADOS

4.1	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA NE/CLALPC	Error! Bookmark not defined.
4.2	CARACTERIZAÇÃO DA MORFOLOGIA DAS NANOEMULSÕES	Error! Bookmark not defined.
4.3	ENSAIOS DE PROLIFERAÇÃO CELULAR	Error! Bookmark not defined.
4.4	ANÁLISE DA LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR DA NANOEMULSÃO	Error! Bookmark not defined.

4.5 EFEITOS DA TERAPIA FOTODINÂMICA NA INDUÇÃO DO MECANISMO DE MORTE CELULAR _**ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.**

4.6 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA _____ **ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.**

4.7 ANÁLISE PROTEÔMICA _____ **ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.**

4.7.1 Avaliação pelo método de monitoramento de reações múltiplas__ **Error! Bookmark not defined.**

4.7.2 Caracterização das proteínas BRCA1, HER2/ERBB2, PTEN___ **Error! Bookmark not defined.**

5. DISCUSSÃO _____ **ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.**

6. CONCLUSÕES _____ **46**

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS _____ **47**

ANEXO _____ **53**

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 GLIOMA – ASPECTOS GERAIS

Glioma é um dos tipos de tumor primário mais comum do Sistema Nervoso Central (SNC) adulto. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) é classificado em quatro graus: astrocitoma pilocítico (grau I), astrocitoma de baixo grau (grau II), astrocitoma anaplásico (grau III) e glioblastoma multiforme (GBM) (grau IV), sendo que a graduação está relacionada ao aumento da malignidade e agressividade (Kleihues e Cavenee, 2000).

Em função da complexidade do cérebro e do seu papel central na manutenção da homeostase do organismo, os sintomas secundários aos gliomas – tanto neurológicos quanto não neurológicos – acometem os pacientes ao longo do curso da patologia, tais como epilepsia, confusão, alterações de personalidade, problemas de visão, de audição, locomotores, cardiorrespiratórios, dentre outros. Com maior severidade, pode ocorrer embolia pulmonar e trombose, levando o paciente ao óbito (Pytel e Lukas, 2009). Por outro lado, os gliomas raramente apresentam metástase (Van Meir et al., 2010).

O aumento no número de diagnósticos de casos de gliomas e outros tipos tumorais pode estar relacionado à melhora das técnicas de diagnóstico (como ressonância magnética e tomografia computadorizada), a um maior acesso da população a exames de diagnóstico e/ou à mudanças da expectativa de vida e o “envelhecimento” da população (Van Meir et al., 2010). Além disso, a exposição a fatores ambientais são fatores de risco para o desenvolvimento, não só de tumores cerebrais, mas também para outros tipos de tumor (Preston-Martin, 1996).

A OMS descreveu a classificação de glioma utilizada atualmente, publicada por quatro autores em diferentes trabalhos (Brat et al., 2007; Fuller e Scheithauer, 2007; Louis et al., 2007; Nakazato, 2008), baseada em dados moleculares e epidemiológicos desse tumor. Desta forma, a classificação dos gliomas é descrita a partir de três parâmetros: o tipo celular, a localização tumoral e o grau de malignidade.

casos, quimioterapia e/ou radioterapia são utilizadas como terapia primária (Brat et al., 2007; Fuller e Scheithauer, 2007; Louis et al., 2007; Nakazato, 2008).

1.2 GLIOBLASTOMA MULTIFORME

1.2.1 Etiologia

Há duas teorias principais quanto às células que originam os glioblastomas. A primeira, e mais antiga, sugere que os glioblastomas são originados a partir de células gliais maduras (astrócitos ou oligodendrócitos) que sofrem mutações em oncogenes e genes supressores tumorais, levando à desdiferenciação celular e ao desenvolvimento do tumor (Maher et al., 2001). A segunda teoria e mais aceita, sugere que tais tumores se originam a partir de células progenitoras que sofrem eventos de transformação durante o desenvolvimento (Van Meir et al., 2010). Tais células, após a transformação oncogênica, passam a ser células iniciadoras de tumor (Singh et al., 2004).

O GBM pode desenvolver-se rapidamente sem evidências clínicas, radiológicas ou morfológicas de um tumor precursor menos maligno, ou seja, pode desenvolver-se *de novo* a partir de células gliais normais ou suas precursoras, sendo chamado de GBM primário. O GBM secundário surge de forma progressiva, a partir de astrocitomas de baixo grau, sendo este, menos frequente que os GBMs primários (Collins et al., 2005). Os tumores de glioblastoma diferem entre si em nível molecular. O termo ‘multiforme’ se refere à condição heterogênea na qual o mesmo fenótipo pode ser resultado de mutações em diferentes subgrupos de genes.

1.3 ALTERAÇÕES GENÉTICAS EM GBMS

Em GBMs, a amplificação do Receptor do Fator de Crescimento Epidermal (EGFR) foi a primeira alteração gênica descrita presente em grande parte dos tumores (Libermann et al., 1985). Entretanto, a amplificação do gene EGFR com consequente elevação da expressão do receptor de EGF (Fator de Crescimento Epidermal) é mais proeminente no glioblastoma primário em comparação ao glioblastoma secundário (Nicholas et al., 2006).

Em 1989, estudos de cariótipos e perda de heterozigose definiram *loci* supressores tumorais nos cromossomos 9, 10 e 17 (James et al., 1989). Posteriormente, caracterizou-se como o principal alvo de alterações o gene supressor tumoral *TP53*, localizado no cromossomo 17, que monitora danos ao DNA, modula apoptose, controla a dinâmica do ciclo celular e permite às células repararem tal dano ou disparar mecanismos de morte celular (Rao e James, 2004). A inativação do gene supressor de tumor *TP53*, por sua vez, é mais frequente no glioblastoma secundário. Entretanto, o glioblastoma primário apresenta maior ocorrência de amplificação no gene *MDM2*. A proteína mdm2 liga-se ao *TP53* e é responsável por “enganar” o controle do crescimento celular mediado pela proteína p53. Outros dois alvos alterados em GBMs e de alta relevância foram descritos em 1993 e 1997, quando o inibidor de progressão no ciclo celular e o supressor tumoral *PTEN* (codifica proteína homóloga à fosfatase e tensina) foram identificados como os genes supressores tumorais perdidos nos cromossomos 9 e 10, respectivamente (Van Meir et al., 2010). A deleção total ou perda de heterozigose no cromossomo 10, ou mutações no gene supressor de tumor *PTEN*, aportado neste cromossomo, são mais comuns no glioblastoma primário comparado ao secundário.

A última alteração genética típica de GBM foi descrita em 2008, quando foi mostrado que os genes codificadores da isocitrato desidrogenase 1 (*IDH1*) apresentam-se mutados em gliomas de baixo grau e um grupo de GBMs (Dang et al., 2009). A mutação no gene da *IDH1* produz um efeito oncogênico indireto, através da ativação da via do fator de transcrição induzido por hipóxia (*HIF1*), permitindo a adaptação metabólica das células tumorais à ambientes de hipóxia e privação de nutrientes (Jansen et al., 2010).

A classificação de GBMs em primários (originados de células astrocíticas ou progenitoras) ou secundários (originados a partir de tumores de astrocitomas de

grau II e III), é baseada no processo de gliomagenese e das vias que se encontram alteradas nas células tumorais. Existem várias alterações genéticas diferenciadas na progressão dos astrocitomas difusos e eventos como amplificação do gene EGFR e hiperexpressão estão presentes em aproximadamente 40 e 60%, dos glioblastomas primários, sendo eventos raros na progressão de glioblastomas secundários (Ohgaki e Kleihues, 2007).

Em 2005 foi iniciado o projeto piloto Atlas do Genoma de Cânceres (The Cancer Genome Atlas – TCGA - <http://tcga.cancer.gov>), sendo o maior projeto de descrição de mutações desenvolvido até o momento. Devido à elevada malignidade e baixa eficiência das terapias, o GBM foi um dos primeiros tumores incluídos nas análises do TCGA. Em 2008, foi publicado o primeiro conjunto de dados obtido pelo TCGA sobre GBMs (McLendon et al., 2008). Com base nestes dados, três vias de controle de proliferação e morte celular se mostram alteradas em GBM, explicando mais de 90% da origem destes tumores: (a) Via dos Receptores Tirosina Cinase (RTK)/RAS/PI3k – alterada em 88% dos GBMs; (b) Via da proteína p53 - alterada em 87% dos GBMs; (c) Via da proteína do Retinoblastoma (Rb) – alterada em 77% dos GBMs.

1.4 PROGNÓSTICO E TERAPIA DOS GBMS

Desde meados da década de 80, compostos para o tratamento de gliomas vem sendo pesquisados. Entre estes compostos destacam-se quimioterápicos eficientes usados em outros tipos de tumores sólidos, como a cisplatina, a carmustina e a lomustina (Kaup et al., 2001; Kim et al., 2004; Natsume et al., 2008; Jiguet Jiglaire et al., 2014; Pastwa et al., 2014), bem como moduladores do sistema imune e do metabolismo celular como proliferação (EGFR) e angiogênese (VEGFR – Receptor do Fator de Crescimento Endotelial Vascular) (Atkins et al., 2015). Porém, nenhum destes compostos mostrou-se eficiente em aumentar a sobrevida e melhorar o prognóstico dos pacientes, e atualmente, deixaram de ser utilizados como terapia primária em GBMs. Além disso, diferentemente de outros tipos tumorais, o prognóstico de pacientes com GBM pouco se alterou nos últimos 10 anos.

Os tumores de grau IV, apresentam características marcantes que incluem exagerada proliferação, necrose, instabilidade genética e quimiorresistência (Furnari et al., 2007). Devido a estas características, GBMs são difíceis de tratar e

apresentam mau prognóstico, com média de sobrevida de menos de um ano (Collins et al., 2005).

O primeiro avanço para o tratamento de GBMs se deu após a aprovação do uso do quimioterápico temozolomida (TMZ) em 2003, este agente alquilante aumentou a sobrevida dos pacientes em 12-15 meses (Stupp et al., 2005). A dificuldade de tratamento dos GBMs é multifatorial e está relacionada à falta de entendimento da doença, à resistência a drogas e radiação ionizante, além da barreira hematoencefálica. (Kanu et al., 2009). O tratamento atual é baseado em um protocolo desenvolvido por Stupp et al. (2009) que consiste em ressecção cirúrgica da massa tumoral tanto quanto possível, seguida de radioterapia (geralmente 60Gy em frações de 2Gy) concomitante com a quimioterapia com TMZ (75mg/m² por 42 dias). Neste cenário, os GBMs são comumente incluídos por oncologistas entre os tipos tumorais de mais difícil tratamento, permanecendo um desafio para a oncoterapia (Tran e Rosenthal, 2010; Almeida et al., 2015; Missios et al., 2015).

1.5 MEDULOBLASTOMA – ASPECTOS GERAIS

Meduloblastoma é um tumor embrionário maligno do cerebelo, cuja incidência ocorre preferencialmente em crianças de até 7 anos. Cerca de 70% ocorrem antes dos 16 anos de idade e, entre os adultos, 80% ocorrem entre 21 e 40 anos de idade. Essa neoplasia é ligeiramente mais frequente no sexo masculino (1,5:1) (Giangaspero et al., 2006; Martínez León, 2011; Gerber et al., 2014).

Meduloblastomas são classificados histologicamente em cinco tipos: clássico, desmoplásico/nodular, com extensa nodularidade, anaplásico e de grandes células (Giangaspero et al., 2006; Gerber et al., 2014). Os meduloblastomas clássicos são neoplasias densamente celulares, constituídas por células pequenas e redondas/ovais com alta relação núcleo/citoplasma; são os mais frequentes e correspondem a 70-80% de todos os meduloblastomas (Entz-Werle et al., 2008; Martínez León, 2011). Meduloblastomas desmoplásicos/nodulares e com extensa nodularidade são comuns em lactentes e crianças mais jovens e podem apresentar maior sobrevida global quando comparados ao tipo clássico (Martínez León, 2011).

O meduloblastoma é curável em aproximadamente 70% dos casos (Gottardo et al., 2014). Atualmente, os tratamentos consistem na ressecção cirúrgica, radioterapia e quimioterapia. Embora a taxa de sobrevida global tenha aumentado nos últimos

anos, os pacientes continuam sofrendo com sequelas terapêuticas de ordem neurológica, endocrinológica e social (Northcott et al., 2011).

Pacientes com 3 anos de idade ou mais, com tumores totalmente retirados (resíduo tumoral após a cirurgia menor que 1,5cm²) e sem disseminação leptomeningea ou doença metastática ao diagnóstico são classificados como “risco padrão”. Todos os outros pacientes que não se enquadram nesses critérios são classificados como “alto risco” (Giangaspero et al., 2006; Gerber et al., 2014). Essa classificação de risco não considera a grande heterogeneidade existente entre os pacientes e entre a biologia dos tumores, havendo casos em que há tratamento excessivo resultando em maior morbidade, e casos que mereceriam maior agressividade terapêutica (Kool et al., 2008; Northcott et al., 2012; Gerber et al., 2014).

Northcott et al. (2012) avaliaram o perfil de expressão gênica e as aberrações no número de cópias do DNA em amostras de 103 meduloblastomas primários com análise imunohistoquímica de 294 outros meduloblastomas e identificaram quatro subgrupos moleculares distintos: WNT (do inglês, *Wingless*), SHH (do inglês, *Sonic Hedgehog*), grupo C e grupo D (Northcott et al., 2012). De acordo com Northcott et al. (2012) os tumores podem ser classificados dentro desses subgrupos por meio de quatro marcadores imunohistoquímicos (98% de confiabilidade), os quais são praticamente específicos para cada uma das variantes moleculares, da seguinte maneira: DKK1 (do inglês, *Dickkopf-related protein 1*) seria marcador do subgrupo WNT, SFRP1 (do inglês, *secreted frizzled-related protein 1*) do subgrupo SHH, NPR3 (do inglês, *natriuretic peptide receptor 3*) do grupo C e KCNA1 (do inglês, *potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, member 1*) do grupo D. Os subgrupos WNT e SHH são assim denominados devido às respectivas vias de sinalização, as quais têm importância fundamental em na patogênese da doença (Kool et al., 2012; Taylor et al., 2012).

Os subgrupos descritos são distintos nos aspectos demográficos, nas apresentações clínica e histológica, no perfil transcricional, nas anormalidades genéticas e quanto ao prognóstico clínico (Northcott et al., 2012; Taylor et al., 2012). Baseado nessas diferenças foi desenvolvido pelo *St. Jude Children's Research Hospital* o protocolo (SJMB03) de estratificação de risco para tratamento do meduloblastoma em crianças acima de 3 anos de idade (Gottardo et al., 2014), que tem sido utilizado como modelo para outro estudo do *St. Jude Children's Hospital*, atualmente em fase II, cuja finalidade é estratificar a terapêutica dos meduloblastomas conforme o risco

clínico e o subgrupo molecular, “*A Clinical and Molecular Risk-Directed Therapy for Newly Diagnosed Medulloblastoma*” (SJMB12).

Um quinto subgrupo, designado como “sem outras especificações”, poderia ser incluso para tumores raros com fenótipo melanótico (meduloblastoma melanocítico) ou rabdomioblástico (medulomioblastoma) por não se encaixarem dentro dos quatro subgrupos originais e pela dificuldade em classificá-los devido à limitação de amostragem (Gottardo et al., 2014).

Entretanto, essas técnicas de diagnósticos moleculares demandam intensa análises de bioinformática para interpretação dos resultados, exigindo mão-de-obra especializada e equipamentos de altíssimo custo, o que inviabiliza sua realização na prática clínica pela maioria dos laboratórios (Northcott et al., 2012). Portanto, há a necessidade de pesquisas voltadas para estabelecer marcadores capazes de identificar esses os subgrupos moleculares de forma rápida, prática e econômica, para o benefício dos pacientes com meduloblastoma.

1.6 TERAPIA FOTODINÂMICA

A Terapia Fotodinâmica (TFD) é uma modalidade terapêutica que emprega a combinação de luz visível, o fármaco fotossensível e oxigênio molecular presente nas células, que de forma independente não apresentam toxicidade para o organismo (Torchilin, 2005; Somani et al., 2010; Lin et al., 2015). De modo geral, o tratamento das neoplasias cutâneas por TFD consiste na administração do fármaco seguida de irradiação com laser monocromático no comprimento de onda de absorção máxima do fármaco fotossensível, geralmente na região do visível do espectro eletromagnético.

O objetivo principal da TFD é induzir a morte do tecido neoplásico por um processo de fotossensibilização com redução da massa tumoral, minimizando ao máximo os danos aos tecidos vizinhos e possíveis efeitos colaterais, sendo estas as principais vantagens da TFD frente aos demais tratamentos clássicos contra o câncer, como a quimioterapia, a radioterapia e intervenção cirúrgica. Na última década, houve um grande aumento das pesquisas em TFD devido ao seu reconhecimento por parte da agência norte-americana FDA (*US. Food and Drug Administration*) como uma terapia eficaz para o tratamento de diversas doenças, incluindo o câncer (Retêl et al., 2009; Chen et al., 2013; Fan et al., 2014).

O processo de fotossensibilização de uma célula consiste na associação do fármaco às membranas plasmáticas e sua permeação para o citosol de forma passiva, por difusão ou osmose, ou de forma ativa, por transporte ativo ou endocitose (Castano et al., 2004). A TFD está fundamentada em reações fotooxidativas, nas quais o fármaco fotossensível após ser excitado por luz visível em comprimento de onda adequado, passa do seu estado fundamental (S_0) para o primeiro estado excitado singleto (S_1), seguido pela conversão ao estado tripleto (T_1) via cruzamento intersistemas, de acordo com o diagrama de Jablonski (Lakowicz e Masters, 2008).

1.6.1 Sistema de liberação de fármacos

A eficácia de um dispositivo terapêutico contra o câncer é medida por meio da sua habilidade de reduzir e/ou eliminar tumores sem danificar tecidos vizinhos saudáveis. A meta final de um tratamento contra o câncer é aumentar a sobrevida e proporcionar uma qualidade de vida ao paciente. Desta forma, aumentar a especificidade local e a internalização podem melhorar a eficácia e adesão do paciente ao tratamento e diminuir a possibilidade de efeitos colaterais comuns durante os tratamentos clássicos. Para que um fármaco tenha uma ação eficiente contra o tumor, é necessário que algumas barreiras fisiológicas e bioquímicas sejam superadas, como a resistência do tumor ao fármaco, distribuição e biotransformação e inativação do fármaco no organismo (Lim et al., 2013; Almeida et al., 2014).

Os mecanismos celulares de resistência a fármacos compreendem as alterações nas atividades de alguns sistemas enzimáticos específicos na regulação da apoptose e nos mecanismos de transporte. Dentre estes mecanismos, destaca-se o MDR (*multidrug resistance* ou resistência a múltiplos fármacos) (Tada, 2007; Bae et al., 2011; del Burgo et al., 2014), termo genérico utilizado para definir estratégias que as células cancerosas usam para inibir os efeitos de drogas anticancerígenas convencionais e podendo ser intrínsecas ou adquiridas em função do tratamento (Jabr-Milane et al., 2008; del Burgo et al., 2014). A MDR é um fenômeno multifatorial e pode resultar de um decréscimo do acúmulo intracelular da substância antitumoral, fazendo com que ela não atinja uma concentração efetiva no interior da célula cancerosa. Este mecanismo de resistência consiste no efluxo das drogas para fora das células devido, principalmente, à superexpressão de uma proteína de transporte denominada P-glicoproteína (Pgp), a qual transporta

inespecificamente diversas moléculas para o exterior da célula ou para outros compartimentos celulares (Persidis, 1999; Wager et al., 2011; Rubenstein e Rakic, 2013; Abdallah et al., 2015).

Sistemas nanoparticulados oferecem melhorias na terapia contra o câncer, pois apresentam especificidade local, habilidade em escapar da MDR e eficiência na liberação de fármacos antineoplásicos. Atualmente uma série de sistemas nanoparticulados vem sendo explorados para o tratamento do câncer. As propriedades destes materiais foram desenvolvidas para promover uma liberação específica no tumor. Por exemplo, podem ser utilizadas superfícies hidrofóbicas para aprimorar o tempo de circulação e superfícies carregadas positivamente para aumentar a endocitose (Oh et al., 2009; Siqueira-Moura et al., 2013; Bolfarini et al., 2014).

As nanopartículas atualmente utilizadas nas pesquisas contra o câncer incluem dendrímeros (Tedesco et al., 2003; Primo et al., 2008; Nishiyama et al., 2009), lipossomas (Siqueira-Moura et al., 2013; Bolfarini et al., 2014), polímeros nanoparticulados, micelas, nanopartículas proteicas, nanopartículas de cerâmica, nanopartículas virais, nanopartículas metálicas (de Paula et al., 2012; de Paula et al., 2014) e nanotubos de carbono (Nishiyama et al., 2009; Spencer et al., 2015). A funcionalização destes sistemas de veiculação cria uma superfície furtiva de opsonização, a ligação a proteínas plasmáticas e pode aumentar o tempo de circulação evitando a remoção da partícula da circulação sanguínea pelo sistema retículo-endotelial.

Além disso, os tecidos tumorais apresentam difusão limitada devido à rápida e desordenada proliferação de células. Esta limitação na difusão afeta principalmente a nutrição, excreção e oxigenação do tecido tumoral. A vascularização incompleta do tumor resulta na formação de espaço intersticiais da ordem de 100 nm a 1µm, os quais são facilmente permeados por nanopartículas. A combinação da má vascularização e baixa drenagem linfática resulta em um processo denominado aumento da retenção e permeação, o qual propicia a retenção seletiva de sistemas de liberação nanoparticulados pelo tumor (Krasneci et al., 2003).

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o perfil de expressão gênica da via Fator de Crescimento Epidermal e o perfil proteico de genes supressores de tumor e oncogenes de linhagens de células tumorais humanas após o tratamento com terapia fotodinâmica.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Caracterizar a morfologia da nanoemulsão conjugada com fármaco fotossensível.
 - b) Avaliar a citotoxicidade da nanoemulsão conjugada com fármaco fotossensível e a proliferação celular nos grupos controle e tratados com terapia fotodinâmica.
 - c) Analisar a localização subcelular da nanoemulsão conjugada com fármaco fotossensível em linhagens celulares de glioblastoma e meduloblastoma.
 - d) Investigar os efeitos da terapia fotodinâmica na indução do mecanismo de morte celular.
 - e) Determinar o perfil de expressão dos genes envolvidos nos processos de apoptose, proliferação e adesão celular nos grupos controle e tratados com terapia fotodinâmica.
 - f) Avaliar os extratos proteicos das linhagens celulares de glioblastoma e meduloblastoma após o tratamento com terapia fotodinâmica.
 - g) Caracterizar proteínas que estão associadas a oncogenes e genes supressores de tumor nas linhagens de glioblastoma e meduloblastoma.
-

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 PREPARAÇÃO DA FORMULAÇÃO

A preparação da nanoemulsão conjugada com ftalocianina cloro-alumínio foi realizada pelo colaborador Dr. Fernando Lucas Primo e foi cedida gentilmente para a realização deste trabalho. O procedimento desenvolvido resultou na patente denominada: *“Primo, F.L.; Siqueira-Moura, M.P.; Tesdesco, A. C. Nanoemulsão e nanocápsulas poliméricas contendo agentes fotossensíveis, método para sua preparação e aplicação no tratamento por meio de processos ativados por irradiação luminosa na região visível do espectro eletromagnético de neoplasias tópicas ou sistêmicas e outras doenças causadas por fungos, bactérias ou vírus. 2007, Brasil.*

Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: PI07063210.

3.2 PADRONIZAÇÃO DAS CULTURAS CELULARES

Todas as linhagens foram cultivadas e expandidas no Centro de Nanotecnologia e Engenharia Tecidual, na Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FFCLRP-USP).

As células foram cultivadas em frascos de cultura de 75 mm² em DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium* - Gibco, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco, EUA), 20 µg/mL de ampicilina/estreptomicina (USB Corporation, EUA) e 0,3 µg/mL de gentamicina (Gibco, EUA) durante 6-7 dias. Durante todo o período, as células foram mantidas a 37°C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ e 95% ar atmosférico, sendo os meios trocados a cada 2 dias.

Após o cultivo, as células foram removidas dos frascos de cultura por lavagem com solução tampão 1x (*Hanks' Balanced Salt Solution* - Gibco, EUA) e tripsina 0,25% (Gibco, EUA) e contadas em um hemocitômetro. Para a montagem do banco de células, estas foram cultivadas em frascos de cultura de 150 mm² e, posteriormente, congeladas em solução de SFB com 10% de DMSO (*Dimethyl Sulfoxide* - Sigma Aldrich, EUA).

3.3 ENSAIOS FUNCIONAIS NAS LINHAGENS DE GLIOBLASTOMA E MEDULOBLASTOMA

3.3.1 Ensaio de proliferação celular

A determinação da concentração ideal de NE/ClAlPc a ser utilizada nas linhagens celulares foi realizada por meio de ensaio colorimétrico MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio], (Sigma Aldrich, EUA). O MTT é um sal de cor amarela que é reduzido para cristais de formazan, de cor púrpura, por proteinases mitocondriais, ativas apenas em células viáveis (Mosmann, 1983).

Para avaliação dos efeitos da presença de luz visível no crescimento celular, foram realizados ensaios de proliferação pelo método de coloração com Giemsa de células fixadas (Galfi et al., 2005; Castro-Gamero et al., 2012). As linhagens celulares foram cultivadas em placas de 24 poços em meio sem fenol e sem SFB e então submetidas a três diferentes doses de energia de luz visível: 100 mJ/cm², 200 mJ/cm² e 700mJ/cm², com o sistema laser de diodo Eagle da Quantum Tech operando em 675 nm (**Error! Reference source not found.**), acoplado a uma fibra óptica a uma potência máxima de saída de 14 mW/cm² de forma contínua. Tais doses foram utilizadas, pois a luz vermelha tem uma característica de maior penetração em tecidos permitindo maior fotoestimulação do fármaco fotosensível para desencadear os processos celulares.

3.3.2 Estudo do mecanismo de morte celular

O ensaio para detecção de morte celular foi realizado através da marcação de células apoptóticas com Anexina-V - Isotiocianato de fluoresceína (FITC) (BD Biosciences Pharmigen, EUA) e iodeto de propídeo (PI). Anexina-V é uma molécula que apresenta alta afinidade pela fosfatidilserina, se ligando a esta especificamente. A fosfatidilserina é um fosfolipídio presente na face interna da membrana das células. Sua externalização ocorre durante o processo de apoptose e funciona como um sinal para que os fagócitos removam as células sinalizadas pelo processo de fagocitose. Já a marcação positiva com PI indica que as células perderam a integridade da membrana, portanto entraram em processo de morte celular, preferencialmente por necrose, de acordo com a literatura (Sessions et al., 2014;

Chen et al., 2015). Após o plaqueamento de 4×10^5 células e o tratamento com as diferentes doses (100 mJ/cm^2 e 700 mJ/cm^2 , com o sistema laser de diodo Eagle da Quantum Tech em 675 nm), as células foram tripsinizadas e centrifugadas a 1000 rpm por 5 minutos a 4°C , lavadas com PBS gelado e ressuspensas em 200 μL de tampão de ligação 1x (BD Biosciences Pharmigen, EUA). As células foram então coradas com 5 μL de anexina e 50 μL de uma solução de PI (50 μM) e incubadas, protegidas da luz, em temperatura ambiente. As células foram analisadas em um citômetro de fluxo BD FACSCalibur™ (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA), sendo este equipamento cedido gentilmente pelo Prof. Dr. Luiz Gonzaga Tone do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto. Os experimentos foram realizados em triplicata em três tempos diferentes.

3.4 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA

3.4.1 Extração de RNA total

Foi realizada a extração do RNA total de células dos grupos controle e tratado, utilizando o reagente Trizol (Invitrogen™, Carlsbad, CA, EUA). Inicialmente, as células foram tripsinizadas e centrifugadas em tubos tipo *eppendorf* de 1,5 mL. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* de cada amostra foi ressuspensa em 1,0 mL do reagente Trizol e mantido à temperatura ambiente por 15 minutos de acordo com as instruções do fabricante. Para cada 1,0 mL da suspensão foram adicionados 200 μL de clorofórmio (Sigma Aldrich, EUA) e os tubos centrifugados a 12.000 xg por 15 minutos a 4°C . A fase aquosa foi transferida para um novo tubo, onde foi acrescentado etanol 70% (v/v). Posteriormente, as amostras de RNA foram ressuspensas em 50 μL de água deionizada e tratadas com dietilpirocarbonato (DEPC, Acros Organics), livre de RNase, sendo armazenada a -70°C até a construção do DNA complementar (cDNA).

3.4.2 Quantificação de RNA

A quantificação das amostras de RNA total foi realizada no NanoDrop 2000 (Invitrogen™, Carlsbad, CA, EUA), estes estudos foram realizados em colaboração com a Profa. Dra. Nilce Martinez-Rossi do Departamento de Genética, Faculdade de

Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP). A leitura foi realizada a partir de uma alíquota de 1,0 μL de RNA total, nos comprimentos de onda de 260, 280, 230 e 320 nm, para detectar a concentração de RNA/ μL nas amostras e/ou contaminação por interferentes (fenol e proteínas).

3.4.3 Construção do cDNA

O cDNA foi sintetizado através da reação de transcrição reversa, com a utilização do *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems). Em um tubo tipo *eppendorf* foi adicionado 2 μg de RNA total e foi tratado com 1U de DNase-I. após esse procedimento foram adicionados 2 μL de tampão 10X, 0,8 μL de tampão dNTP mix 25X (100mM), 1,0 μL de *random primer* e 1,0 μL de *multiscribe reverse transcriptase*. Foi adicionada água livre de nucleases quantidade suficiente para 20 μL . A reação foi incubada por 10 minutos a 25°C, seguida por 2 horas a 37°C e, finalmente, 5 minutos a 85°C. A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi realizada utilizando a enzima Taq polimerase (Gibco, EUA) no termociclador Mastercycle Gradient (Eppendorf, Hamburg, Alemanha), nas seguintes condições: 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 42°C e 2 minutos a 72°C, e extensão final de 7 minutos a 72°C.

3.5 ANÁLISE PROTEÔMICA DIRIGIDA

As análises de proteômica dirigida foram realizadas em colaboração com o Prof. Dr. Vitor Marcel Faça, do Departamento de Bioquímica e Imunologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP).

3.5.1 Obtenção e purificação do extrato celular total

Na obtenção dos *pellets* celulares foram utilizadas, para cada linhagem celular, 02 placas de 24 poços para cada grupo experimental, controle e tratado (100 mJ/cm²), contendo 1,5 x 10⁶ células/poço. A dose de luz visível (100 mJ/cm²) associada a NE/ClAlPc foram utilizadas para obter maior quantidade de células viáveis para realizar a extração de proteínas dessas células que foram submetidas ao processo de fotoestimulação. As placas de 24 poços foram lavadas 3 vezes com PBS estéril, posteriormente foi adicionado 500 μL de uma solução contendo ureia 8M/Tris (pH

8,5) com 5 μ L de inibidor de protease. Posteriormente, foi extraído o material celular por raspagem usando o raspador de células (*cell scraper*) e coletado a solução contendo as células, em um tubo tipo *ependorf* de 1,5 mL, o qual foi colocado imediatamente em gelo para evitar a degradação das proteínas por proteinases. Após essa etapa, as amostras foram agitadas vigorosamente, sendo submetidas ao processo de sonicação ultrassom (Cole-Parmer, EUA) por 5 minutos por 3 vezes consecutivas e, posteriormente, centrifugadas por 30 minutos a 20.000 xg. Foi coletado o sobrenadante como extrato total celular para quantificação.

3.5.2 Quantificação de proteínas

Determinou-se a concentração de proteínas de cada amostra usando o método colorimétrico de Bradford (Bradford, 1976) (Quick Start™ Bradford Protein Assay Kit, BIORAD) para ensaio em microplaca. Foi utilizado albumina bovina como padrão na confecção da curva de calibração. Na curva de calibração foi realizado a variação de 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 μ g de albumina. Todas as amostras foram diluídas na proporção adequada para a realização da quantificação (1:50; 1:100; 1:200). Em cada poço da microplaca havia um volume final de 20 μ L. Após aplicação do padrão e das amostras, foi adicionado 200 μ L da solução de Bradford e incubado por 10 minutos na ausência de luz. Logo após esse procedimento, foi realizado a leitura (595 nm) das microplacas em um espectrofotômetro (Cecil CE 3021, Cambridge, Reino Unido) segundo as instruções do fabricante. Todas as amostras foram quantificadas em triplicata.

3.5.3 Digestão de proteínas

Foram utilizados 50 μ g de extrato celular das amostras, controle e tratado, de glioblastoma e meduloblastoma que foram ressuspensos em tampão ureia 8M/Tris (pH 8,5). Adicionou-se 33 μ L de ditioneitol (DTT) 100 mM e incubou-se por 30 minutos a 37°C. Em seguida, foi adicionado 7 μ L de iodoacetamida (IAA) 0,5 M recém preparada e deixou alquilar as amostras por 30 minutos à temperatura ambiente no escuro. Após o processo de alquilação, adicionou-se 740 μ L de Tris 100 mM (pH 8,0) para diminuir o pH das amostras. Tripsina (Promega, Madison, EUA) diluída em Tris 0,2 M (concentração 0,1 μ g/ μ L) (pH 8,0) foi adicionada para atingir uma razão de 1:50 da enzima. As amostras foram incubadas com tripsina por 2

horas a 37°C. Após esse período, adicionou uma nova alíquota de tripsina para atingir uma razão de 1:100 da enzima e, novamente, foi incubada por 16 horas ou *overnight* a 37°C.

3.5.4 Purificação das amostras

As amostras foram purificadas em colunas de extração de fase-reversa (Oasis – Waters) com 1 mL de acetonitrila grau analítico (ACN) e foram equilibradas com 1,0 mL ACN 5%/ácido fórmico 0,01%. Em seguida, as amostras foram carregadas nas colunas e lavadas 2 vezes com uma mistura de ACN 5%/ácido fórmico 0,01%. As amostras foram eluídas em um tubo novo tipo *eppendorf* de 1,5 mL com 500 µL de ACN 70%/ácido fórmico 0,01%. Após o processo de purificação, o material eluído foi secado em *SpeedVac* (Vacufuge™ 5301 Concentrator, Eppendorf™). Finalmente, as amostras purificadas foram ressuspendidas em 50 µL de ACN 5%/ácido fórmico 0,01% para serem utilizadas nas análises subsequentes.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada através da média dos experimentos e comparada pelo teste *Two Way* ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. Essa análise foi realizada com o auxílio dos softwares (*GraphPad* 6.0 Software, San Diego, CA, EUA) e SPSS 15.0 (SPSS Inc. Chicago, EUA). Valores de $p < 0.05$ foram considerados como significantes.

CONCLUSÕES

4. CONCLUSÕES

A formulação escolhida para o desenvolvimento deste trabalho apresenta propriedades físico-químicas de acordo com o exigido pelos princípios da tecnologia farmacêutica, possuindo propriedades nanotecnológicas ideais, como alta compatibilidade biológica e eficiência adequada de incorporação de fármaco, de suma importância para serem utilizados em um novo protocolo terapêutico baseado em Terapia Fotodinâmica (TFD). Os parâmetros fotofísicos obtidos foram importantes para se atestar o potencial fotodinâmico do fármaco em meio homogêneo e também após sua incorporação no sistema de liberação desenvolvido. Portanto, a veiculação da ClAlPc em nanoemulsão não alterou o perfil fotofísico, conferindo à formulação as propriedades necessárias para utilização em ensaios *in vitro* e testes biológicos empregando-se fotoestímulo com laser de baixa potência.

A análise da expressão gênica da via EGF possibilitou identificar uma das várias associações possíveis entre o perfil de expressão de linhagens de glioblastoma e meduloblastoma na progressão tumoral. Isto sem dúvidas irá auxiliar no maior entendimento da biologia e do desenvolvimento do câncer para que se possa tratar os pacientes de forma mais eficaz e com baixo índice de efeitos colaterais. Novos estudos envolvendo sistemas de liberação de fármacos associados a terapia fotodinâmica devem ser realizados, agora *in vivo*, para que se possa consolidar a proposta de novas alternativas para procedimentos terapêuticos no tratamento de cânceres.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdallah HM, Al-Abd AM, El-Dine RS, El-Halawany AM. P-glycoprotein inhibitors of natural origin as potential tumor chemo-sensitizers: A review. *Journal of Advanced Research*. 2015; 6(1):45-62.
- Almeida JP, Chaichana KL, Rincon-Torroella J, Quinones-Hinojosa A. The Value of Extent of Resection of Glioblastomas: Clinical Evidence and Current Approach. *Current neurology and neuroscience reports*. 2015; 15(2):1-13.
- Almeida JPM, Figueroa ER, Drezek RA. Gold nanoparticle mediated cancer immunotherapy. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2014; 10(3):503-14.
- Atkins RJ, Ng W, Stylli SS, Hovens CM, Kaye AH. Repair mechanisms help glioblastoma resist treatment. *Journal of Clinical Neuroscience*. 2015; 22(1):14-20.
- Bae KH, Chung HJ, Park TG. Nanomaterials for cancer therapy and imaging. *Molecules and cells*. 2011; 31(4):295-302.
- Bolfarini GC, Siqueira-Moura MP, Demets GJ, Tedesco AC. Preparation, characterization, and in vitro phototoxic effect of zinc phthalocyanine cucurbit [7] uril complex encapsulated into liposomes. *Dyes and Pigments*. 2014; 100:162-7.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*. 1976; 72(1):248-54.
- Brat DJ, Scheithauer BW, Fuller GN, Tihan T. Newly codified glial neoplasms of the 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System: angiocentric glioma, pilomyxoid astrocytoma and pituicytoma. *Brain pathology*. 2007; 17(3):319-24.
- Castano AP, Demidova TN, Hamblin MR. Mechanisms in photodynamic therapy: part one—photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*. 2004; 1(4):279-93.
- Castro-Gamero AM, Borges KS, da Silva Silveira V, Lira RCP, Queiroz RdPG, Valera FCP, et al. Inhibition of nuclear factor- κ B by dehydroxymethylepoxyquinomicin induces schedule-dependent chemosensitivity to anticancer drugs and enhances chemoinduced apoptosis in osteosarcoma cells. *Anti-cancer drugs*. 2012; 23(6):638-50.
- Chen HH, Yuan H, Cho H, Sosnovik DE, Josephson L. Cytoprotective nanoparticles by conjugation of a polyhis tagged annexin V to a nanoparticle drug. *Nanoscale*. 2015.
- Chen J, Shao R, Zhang XD, Chen C. Applications of nanotechnology for melanoma treatment, diagnosis, and theranostics. *International journal of nanomedicine*. 2013; 8:2677.
-

- Collins AT, Berry PA, Hyde C, Stower MJ, Maitland NJ. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer research*. 2005; 65(23):10946-51.
- Dang L, White DW, Gross S, Bennett BD, Bittinger MA, Driggers EM, et al. Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature*. 2009; 462(7274):739-44.
- de Paula LB, Primo FL, Jardim DR, Morais PC, Tedesco AC. Development, characterization, and in vitro trials of chloroaluminum phthalocyanine-magnetic nanoemulsion to hyperthermia and photodynamic therapies on glioblastoma as a biological model. *Journal of applied physics*. 2012; 111(7):07B307.
- de Paula LB, Primo FL, Pinto MR, Morais PC, Tedesco AC. Combination of hyperthermia and photodynamic therapy on mesenchymal stem cell line treated with chloroaluminum phthalocyanine magnetic-nanoemulsion. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. 2014.
- del Burgo LS, Pedraz J, Orive G. Advanced nanovehicles for cancer management. *Drug discovery today*. 2014; 19(10):1659-70.
- Entz-Werle N, Velasco V, Neuville A, Geoerger B, Mathieu MC, Guerin E, et al. Do medulloblastoma tumors meet the food and drug administration criteria for anti-erbB2 therapy with trastuzumab? *Pediatric blood & cancer*. 2008; 50(1):163-6.
- Fan Z, Fu PP, Yu H, Ray PC. Theranostic nanomedicine for cancer detection and treatment. *Journal of Food and Drug Analysis*. 2014; 22(1):3-17.
- Fuller GN, Scheithauer BW. The 2007 revised World Health Organization (WHO) classification of tumours of the central nervous system: newly codified entities. *Brain Pathology*. 2007; 17(3):304-7.
- Furnari FB, Fenton T, Bachoo RM, Mukasa A, Stommel JM, Stegh A, et al. Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes & development*. 2007; 21(21):2683-710.
- Galfi P, Neogrady Z, Amberger A, Margreiter R, Csordas A. Sensitization of colon cancer cell lines to butyrate-mediated proliferation inhibition by combined application of indomethacin and nordihydroguaiaretic acid. *Cancer detection and prevention*. 2005; 29(3):276-85.
- Gerber N, Mynarek M, von Hoff K, Friedrich C, Resch A, Rutkowski S. Recent developments and current concepts in medulloblastoma. *Cancer treatment reviews*. 2014; 40(3):356-65.
- Giangaspero F, Wellek S, Masuoka J, Gessi M, Kleihues P, Ohgaki H. Stratification of medulloblastoma on the basis of histopathological grading. *Acta neuropathologica*. 2006; 112(1):5-12.
- Gottardo NG, Hansford JR, McGlade JP, Alvaro F, Ashley DM, Bailey S, et al. Medulloblastoma Down Under 2013: a report from the third annual meeting of the International Medulloblastoma Working Group. *Acta neuropathologica*. 2014; 127(2):189-201.

- Jabr-Milane L, van Vlerken L, Devalapally H, Shenoy D, Komareddy S, Bhavsar M, et al. Multi-functional nanocarriers for targeted delivery of drugs and genes. *Journal of Controlled Release*. 2008; 130(2):121-8.
- James CD, Carlbom E, Nordenskjold M, Collins VP, Cavenee WK. Mitotic recombination of chromosome 17 in astrocytomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1989; 86(8):2858-62.
- Jansen M, Yip S, Louis DN. Molecular pathology in adult gliomas: diagnostic, prognostic, and predictive markers. *The Lancet Neurology*. 2010; 9(7):717-26.
- Jiguet Jiglaire C, Baeza-Kallee N, Denicolaï E, Barets D, Metellus P, Padovani L, et al. *Ex vivo* cultures of glioblastoma in three-dimensional hydrogel maintain the original tumor growth behavior and are suitable for preclinical drug and radiation sensitivity screening. *Experimental cell research*. 2014; 321(2):99-108.
- Kanu OO, Hughes B, Di C, Lin N, Fu J, Bigner DD, et al. Glioblastoma multiforme oncogenomics and signaling pathways. *Clinical medicine Oncology*. 2009; 3:39.
- Kaup B, Schindler I, Knüpfer H, Schlenzka A, Preiß R, Knüpfer M. Time-dependent inhibition of glioblastoma cell proliferation by dexamethasone. *Journal of neuro-oncology*. 2001; 51(2):105-10.
- Kim JW, Kim SY, Park SY, Kim YM, Kim JM, Lee MH, et al. Mesenchymal progenitor cells in the human umbilical cord. *Annals of hematology*. 2004; 83(12):733-8.
- Kleihues P, Cavenee WK. Pathology and genetics of tumours of the nervous system: International Agency for Research on Cancer 2000.
- Kool M, Korshunov A, Remke M, Jones DT, Schlanstein M, Northcott PA, et al. Molecular subgroups of medulloblastoma: an international meta-analysis of transcriptome, genetic aberrations, and clinical data of WNT, SHH, Group 3, and Group 4 medulloblastomas. *Acta neuropathologica*. 2012; 123(4):473-84.
- Kool M, Koster J, Bunt J, Hasselt NE, Lakeman A, Van Sluis P, et al. Integrated genomics identifies five medulloblastoma subtypes with distinct genetic profiles, pathway signatures and clinicopathological features. *PloS one*. 2008; 3(8):e3088.
- Krasnici S, Werner A, Eichhorn ME, Schmitt-Sody M, Pahernik SA, Sauer B, et al. Effect of the surface charge of liposomes on their uptake by angiogenic tumor vessels. *International journal of cancer*. 2003; 105(4):561-7.
- Lakowicz JR, Masters BR. Principles of fluorescence spectroscopy. *Journal of Biomedical Optics*. 2008; 13(2):9901.
- Libermann TA, Nusbaum HR, Razon N, Kris R, Lax I, Soreq H, et al. Amplification, enhanced expression and possible rearrangement of EGF receptor gene in primary human brain tumours of glial origin. 1985.
- Lim C-K, Heo J, Shin S, Jeong K, Seo YH, Jang W-D, et al. Nanophotosensitizers toward advanced photodynamic therapy of cancer. *Cancer letters*. 2013; 334(2):176-87.
-

- Lin L, Xiong L, Wen Y, Lei S, Deng X, Liu Z, et al. Active Targeting of Nano-Photosensitizer Delivery Systems for Photodynamic Therapy of Cancer Stem Cells. *Journal of Biomedical Nanotechnology*. 2015; 11(4):531-54.
- Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta neuropathologica*. 2007; 114(2):97-109.
- Maher EA, Furnari FB, Bachoo RM, Rowitch DH, Louis DN, Cavenee WK, et al. Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter. *Genes & development*. 2001; 15(11):1311-33.
- Martínez León M. Review and update about medulloblastoma in children. *Radiología (English Edition)*. 2011; 53(2):134-45.
- McLendon R, Friedman A, Bigner D, Van Meir EG, Brat DJ, Mastrogiannis GM, et al. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature*. 2008; 455(7216):1061-8.
- Missios S, Abbassy M, Vogelbaum MA, Recinos PF. Use of Image Fluorescence in the Resection of Gliomas. *Current Surgery Reports*. 2015; 3(1):1-6.
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*. 1983; 65(1):55-63.
- Nakazato Y. The 4th edition of WHO classification of tumours of the central nervous system published in 2007. *No shinkei geka Neurological surgery*. 2008; 36(6):473.
- Natsume A, Wakabayashi T, Ishii D, Maruta H, Fujii M, Shimato S, et al. A combination of IFN- β and temozolomide in human glioma xenograft models: implication of p53-mediated MGMT downregulation. *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 2008; 61(4):653-9.
- Nicholas MK, Lukas RV, Jafri NF, Faoro L, Salgia R. Epidermal growth factor receptor-mediated signal transduction in the development and therapy of gliomas. *Clinical Cancer Research*. 2006; 12(24):7261-70.
- Nishiyama N, Morimoto Y, Jang W-D, Kataoka K. Design and development of dendrimer photosensitizer-incorporated polymeric micelles for enhanced photodynamic therapy. *Advanced drug delivery reviews*. 2009; 61(4):327-38.
- Northcott PA, Shih DJ, Remke M, Cho Y-J, Kool M, Hawkins C, et al. Rapid, reliable, and reproducible molecular sub-grouping of clinical medulloblastoma samples. *Acta neuropathologica*. 2012; 123(4):615-26.
- Oh JM, Choi SJ, Lee GE, Han SH, Choy JH. Inorganic Drug-Delivery Nanovehicle Conjugated with Cancer-Cell-Specific Ligand. *Advanced Functional Materials*. 2009; 19(10):1617-24.
- Ohgaki H, Kleihues P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *The American journal of pathology*. 2007; 170(5):1445-53.
- Pastwa E, Poplawski T, Lewandowska U, Somiari SB, Blasiak J, Somiari RI. Wortmannin potentiates the combined effect of etoposide and cisplatin in human

- glioma cells. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2014; 53:423-31.
- Persidis A. Cancer multidrug resistance. *Nature biotechnology*. 1999; 17(1):94-5.
- Preston-Martin S. Epidemiology of primary CNS neoplasms. *Neurologic clinics*. 1996; 14(2):273-90.
- Primo FL, Bentley MV, Tedesco AC. Photophysical studies and in vitro skin permeation/retention of Foscan®/nanoemulsion (NE) applicable to photodynamic therapy skin cancer treatment. *Journal of nanoscience and nanotechnology*. 2008; 8(1):340-7.
- Pytel P, Lukas RV. Update on diagnostic practice: tumors of the nervous system. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 2009; 133(7):1062-77.
- Rao RD, James CD. Altered molecular pathways in gliomas: an overview of clinically relevant issues. *Seminars in oncology*; 2004: Elsevier; 2004. p. 595-604.
- Retèl VP, Hummel MJ, van Harten WH. Review on early technology assessments of nanotechnologies in oncology. *Molecular oncology*. 2009; 3(5):394-401.
- Rubenstein J, Rakic P. Cellular Migration and Formation of Neuronal Connections: Comprehensive Developmental Neuroscience: Academic Press 2013.
- Sessions JW, Hanks BW, Lewis TE, Jensen BD, Lindstrom DL, Burnett SH. Saline Solution Effects on Propidium Iodide Uptake in Nano-injected HeLa Cells. *ASME 2014 International Design Engineering Technical Conferences and Computers and Information in Engineering Conference*; 2014: American Society of Mechanical Engineers; 2014. p. V004T09A6-VT09A6.
- Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, et al. Identification of human brain tumour initiating cells. *nature*. 2004; 432(7015):396-401.
- Siqueira-Moura MP, Primo FL, Espreafico EM, Tedesco AC. Development, characterization, and photocytotoxicity assessment on human melanoma of chloroaluminum phthalocyanine nanocapsules. *Materials Science and Engineering: C*. 2013; 33(3):1744-52.
- Somani B, Moseley H, Eljamel M, Nabi G, Kata S. Photodynamic diagnosis (PDD) for upper urinary tract transitional cell carcinoma (UT-TCC): Evolution of a new technique. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*. 2010; 7(1):39-43.
- Spencer DS, Puranik AS, Peppas NA. Intelligent nanoparticles for advanced drug delivery in cancer treatment. *Current Opinion in Chemical Engineering*. 2015; 7:84-92.
- Stupp R, Hegi ME, Mason WP, van den Bent MJ, Taphoorn MJ, Janzer RC, et al. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *The lancet oncology*. 2009; 10(5):459-66.
- Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJB, et al. Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *New England Journal of Medicine*. 2005; 352(10):987-96.

Tada DB. Desenvolvimento de nanopartículas fotossensibilizadoras: Universidade de São Paulo; 2007.

Taylor MD, Northcott PA, Korshunov A, Remke M, Cho Y-J, Clifford SC, et al. Molecular subgroups of medulloblastoma: the current consensus. *Acta neuropathologica*. 2012; 123(4):465-72.

Tedesco AC, Rotta J, Lunardi CN. Synthesis, photophysical and photochemical aspects of phthalocyanines for photodynamic therapy. *Current Organic Chemistry*. 2003; 7(2):187-96.

Torchilin VP. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nature reviews Drug discovery*. 2005; 4(2):145-60.

Tran B, Rosenthal M. Survival comparison between glioblastoma multiforme and other incurable cancers. *Journal of Clinical Neuroscience*. 2010; 17(4):417-21.

Van Meir EG, Hadjipanayis CG, Norden AD, Shu HK, Wen PY, Olson JJ. Exciting New Advances in Neuro-Oncology: The Avenue to a Cure for Malignant Glioma. CA: a cancer journal for clinicians. 2010; 60(3):166-93.

Wager TT, Villalobos A, Verhoest PR, Hou X, Shaffer CL. Strategies to optimize the brain availability of central nervous system drug candidates. *Expert opinion on drug discovery*. 2011; 6(4):371-81.

Photobiostimulation on Wound Healing Treatment by ClAlPc-nanoemulsion from a Multiple-Wavelength Portable Light Source on a 3D-Human Stem Cell Dermal Equivalent

F.L. Primo¹, L.B. de Paula¹, M.P. de Siqueira-Moura¹ and A.C. Tedesco^{*,1}

¹*Departamento de Química, Laboratório de Fotobiologia e Fotomedicina, Centro de Nanotecnologia e Engenharia Tecidual, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 14040-901, Ribeirão Preto-SP, Brazil*

Abstract: This research evaluated the effect of multiple-wave lasertherapy on the healing process of surgical wounds based on *in vitro* models denominated stem-dermal equivalents. These human skin models were obtained from a co-culture of dermal cells and bone marrow mesenchymal stem cells. The experimental tests were carried out using a LED portable to multiple waves (operating at 660 nm and 810 nm) at different doses to induce photobiostimulation (10 to 70 mJ.cm⁻²). Moreover, a photosensitizer drug was employed as a new advanced designed nanomaterial, being a nanoemulsion with biopolymers to obtain an efficient drug delivery system to release lipophilic compounds. The studies were performed considering the light combination application monitoring the kinetic contraction of the dermal equivalent model and the quantification of important macromolecules (as metalloproteases derivatives), related directly with wound healing process. Results showed that an appropriate photomodulation using the combination of both wavelengths (in the red and infrared range) is possible, such that it can contribute to wound healing therapy and/or other pathological skin disease treatment.

Keywords: 3D-dermal equivalents, mesenchymal stem cells, multiple-wave light source, nanobiotechnology, phthalocyanine, tissue engineering, zymography, photodynamic process, low-level-laser, human skin.

INTRODUCTION

Lasertherapy (LT) and light-emitting diode therapy (LEDT) have been extensively used in the last five to 10 years as important therapeutic alternatives to several clinical approaches which are widely employed, from aesthetic procedures in the removal of wrinkles and skin hollows to treating many skin diseases, including cancer [1-4]. LT and LEDT applied on renewal are based on filling of the grooves from induced endogenous production of the collagen and elastin which is one of the key factors in the cutaneous restructuring, or reconstruction in tissue engineering process [1, 2, 5]. However, the LT has been evaluated recently as an adjuvant to bone reconstruction, a wound healing process accelerator and as an anti-inflammatory protocol to topical treat skin diseases. Fangel *et al.* 2011 [1] showed that LT improves bone repair process in osteopenic rats as recently demonstrated by Zancanela *et al.* 2011 [6]. Lee *et al.* 2011 [7] revealed that the low-level light treatment with infrared light at 1072 nm can enhance the natural immune response against the skin infection, increasing the migration of primary cytokines that are activated promptly after the bacterial intrusion, which induces possible use of this infrared light for the treatment of local infections and for management of the wound healing process. Moreover, Schindl *et al.* 2000 [8] showed that low-intensity LT may be responsible for the positive effect observed in a non-destructive photobiological process induced in the athermic tissue response.

On the other hand, the photosensitizer drugs (PS) employed in this study belong to the second generation of molecules used in photodynamic therapy (PDT) and photodynamic processes (PDP). These therapies have been used for treatment of several oncological, dermatological, and ophthalmic diseases and more recently for wound healing [9-13]. PDP is based on activation of the photosensitizer drug by visible light at a specific wavelength in the presence of molecular oxygen (O₂) and consecutively, photointeraction of these reactive species within the specific site leads to synthesis and biological release of regulated biomolecules such as cytokines, proteases, enzymes and DNA/RNA [14-17].

The association of LT and PDP has proved to be a procedure with great advantages in the wound healing treatment or renewal skin protocols based on photobiomodulation. This procedure leads to the production of endogenous secretion of important biomolecules in the newborn extracellular matrix as new metalloproteases (MMP) expression; cytokines and chemokines production (FN-γ, TGF-β, IL-4, IL-10, IL-13) increase the growth factors production (VEGF) that leads to the increase of the microcirculation in the wound area treated. These biological compounds are simultaneously released by macrophages, fibroblasts, and epithelial cells which induce the phosphorylation and activation of eNOS in the bone marrow, resulting in an increase in NO levels associated with the new blood circulation network and wound healing steps [18-21].

Nanobiotechnology NT has been widely employed in the pharmaceutical technology to enhance the pharmacological, the pharmacokinetics and biodistribution of the drug with excellent reduction in undesirable side effects. [8, 22-24]. It has also been extensively used to provide application and control released of photosensitive drugs, designed with reduced size (< 200 nm) and optimal properties to help the benefits already achieved by laser therapeutic protocol in the wound healing clinical trials [25-28]. In this particularly case, NT contributes significantly to better biologically target the injured tissue with appropriate PS biodistribution and ideal cellular uptake.

Some of the new nanodevices used in the therapies are the metal nanoparticles (Au, Ag and TiO₂) [29-31]; carbon nanotubes (CNT) [32, 33] and its derivatives, however it still has basal cytotoxicity to be managed. On the other hand, polymeric nanodispersions as nanoemulsions (NE) [26, 34, 35] and isotropic liquid crystals [27, 36] are ultrastable advanced devices for skin drug release with an interfacial layer and oily core which is an ideal structure to solubilise lipophilic compounds. These characteristics give NE an enhanced skin layer penetration with adequate partition coefficient based on the lipophilic/hydrophilic equilibrium designed for topical applications [25, 37]. The combination of nanotechnology, photodynamic process and tissue engineering is an important technological field that has contributed to the design and production of new setups useful in wound healing studies. This article focused on the development of a three-dimensional dermal equivalent of skin human in which it is possible to evaluate the LT and PDP association in the *in vitro* effects. The photostimulation phenomenon was studied with a new portable multiple wavelength LED device work-

*Address correspondence to this author at the Center of Nanotechnology and Tissue Engineers, Photobiology and Photomedicine research Group, FFCLRP- São Paulo University, 14040-901, Ribeirão Preto-SP, Brazil; Tel: +55-16-3602-3751; Fax: +55-16-3602-4838; E-mail: atedesco@usp.br

ing in the three different ranges; at 550 nm, 660 nm and 810 nm, or the combination of visible and infrared light. Moreover, the 3D dermal equivalent (SDE - stem dermal equivalent) was also performed with bone marrow mesenchymal stem cells (MSC) leading to a special biological model or scaffold with many potential applications which can be also used in cellular therapy as an additional synergic tool in the wound healing treatment [38].

Low level laser irradiation can modulate the gene expression and release of growth factors such as bFGF, TGF- β , KGF, and IGF-1, and the release of the pro-inflammatory cytokines IL-1 β , TNF- α , and INF- γ as well as other cytokines such as IL-1 β and IL-6. These findings are similar to those of *in vivo* studies in which, for example, rat gingival tissue was irradiated with 7.5 J/cm² at 632.8 nm and shown to cause an inhibition of gene expression of IL-1 β and INF- γ , while increasing that of PDGF and TGF- β as describe by Safavi *et al.* 2008 and Peplow *et al.* 2011 [41, 42].

Therefore, in the context the present article shows the employment of both LT and PDP techniques associated with advanced nanodevices under different wavelengths to find the better photostimulation combination related to photomodulation of cellular metabolism and wound healing repair consecutively.

This is the first time that the combination of these three therapies have been used with a potential application in tissue engineering skin repair.

EXPERIMENTAL AND RESULTS

Nanobiomaterial to Topical Delivery and Controlled Release of CIAIPc Photosensitizer Drug

Chloroaluminum-phthalocyanine/nanoemulsion (CIAIPc/NE), Fig. (1) was prepared according to Primo *et al.* 2011 [38]. Briefly, the organic phase (acetone or mix of organic solvents) was prepared containing oil, natural soy phospholipids, CIAIPc (Sigma-Aldrich co., St. Louis, MO, USA) and surfactant polymer at 55 °C in the proportion of 7.5% w/v. Subsequently, this organic solution was added into an aqueous phase containing another surfactant, poloxamer 188 at 7.5 % w/v (Sigma-Aldrich co., St. Louis, MO, USA), under magnetic stirring at 125 rpm. After the emulsification process the residual organic solvent was removed by evaporation under reduced pressure at 9 mbar at 60 °C. Finally, the formulations were concentrated to a final desired volume as designed with a final concentration of CIAIPc at 0.025 mg.mL⁻¹. Formulations without the drug association were prepared, under the same conditions, to be used as reference compounds in all the spectroscopic and photobiological analyses.

All formulations were characterized by spectroscopic properties as mean size, polydispersity index (PdI), and zeta potential. The mean size and PdI of colloidal dispersions were determined at 25°C by laser light scattering at an angle of 173°, and zeta potential was measured by electrophoretic mobility, both using a Zetasizer (Nano ZS, Malvern PCS Instruments, UK). Data are the mean ($\pm$ SD) of three different batches. CIAIPc-NE has a monomodal distribution and reduced hydrodynamic diameter (180 nm), polydispersity index appropriated (< 0.2) and modular zeta potential > |30| mV. The morphological characteristics of nanomaterial were evaluated as previously described by Primo *et al.* 2008 [26]. These chemical and physical properties point to ultrastable colloidal nanocarrier with reduced size and appropriate zeta potential to controlled release of phthalocyanine derivatives drugs.

Stem Dermal Equivalent (SDE)

The SDE Fig. (2) growing and proliferation were performed from primary human fibroblast and MSC (both in the monolayer culture to 3D cellular co-culture discs). In the first step pieces of tissue from human gingival and human bone marrow were incu-

bated at 37°C in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) and α -MEM for cellular culture at 10% of the fetal calf serum (Cultilab, Campinas, Brazil) respectively. After cell extraction, monolayer cell cultures were plated on cellular culture flasks of 75 cm² until total confluence. MSC were marked with green fluorescent protein (GFP), for easy fluorescence imaging detection as described by Cerisoli *et al.* (2009) [39]. The experimental protocol was reviewed and approved by the Institution's Human Research Committee (protocol 2007.1.487.58.7, FFCLRP, São Paulo University-USP, Ribeirão Preto, São Paulo State, Brazil).

Fig. (1). Scheme of nanodevice (biopolymeric nanoemulsion) designed to control and sustain topical release of lipophilic drugs as phthalocyanines derivatives. CIAIPc-NE obtained with a hydrodynamic size of 180 nm (PdI < 0.2) and CIAIPc photosensitizer drug entrapped at 0.025 mg.mL⁻¹.

In the sequence, the SDE discs were obtained from the fibroblast and MSC mixture under controlled slow stirring process and cooling (5-7 °C) in the collagen type I medium. Collagen-type I was obtained from tail tendons of adult rats based on the basic extraction and quantified as described by Reddy and Enwemeka (1996) [40]. The SDE were transferred directly to 60 mm petri dishes and incubated at 37°C/5% CO₂ in a stable atmosphere.

Kinetic Contraction of SDE After Photobiostimulation

The diameter of each disc was measured before and after CIAIPc-NE and multi-LEDL treatment to analyse the kinetics of the 3D-model contraction. The 3D-collagen matrixes were totally evaluated by digital bright field, phase contrast and UV-visible fluorescence emission microscopy (Hg-lamp excitation) at high resolution monitored by a micrometer, calibrated to a 10x and 20x objective. Images were acquired from a digital high resolution camera directly coupled to the analysis apparatus (an inverted microscope Axiovert 40 CFL, Carl Zeiss Micro Imaging, LLC, Thornwood, NY, USA). Photobiomodulation studies using the SDE and multiple wavelengths as indicated in the scheme in the Fig. (2).

Photostimulation protocols used were those described by Primo *et al.* 2011 [38] with some modifications, carried out using an innovative portable multiple-wave LED (Nanophoton®, Ribeirão Preto/SP, Brazil) that can be operated at three different wavelengths; in the orange 560 nm, red 660 nm and IR 810 nm ranges of the electromagnetic spectrum. The total irradiance output of each wavelength studied was in the range of 20-40 mW; 40- 65 mW and 70-120 mW respectively for each wavelength. SDE were incubated with CIAIPc/NE at 0.5 μ mol.L⁻¹ for 30 min and consecutively photoactivated with a portable device to a multiple-wave source (low-

Fig. (2). Photobiomodulation studies using the SDE and multiple wavelengths. (A) human fibroblast; (B) human bone marrow mesenchymal stem cells; (C) SDE synthesis from collagen type I under stirring and heating conditions; (D) stem dermal equivalent; (E) metalloproteinases analysis by zymography electrophoresis from culture medium collected after photostimulation; (F) SDE cellular 3D network at 1 day; (G) SDE cellular 3D network at 3 day and (H) SDE cellular 3D network at 7 day after preparation.

level laser doses) at 10; 20 and 35 mJ.cm^{-2} (810 nm) and 20; 40 and 70 mJ.cm^{-2} (660 nm) as described by Primo *et al.* 2011 [38].

Firstly, the behavior of each SDE-disc was monitored after photostimulus to determine the cellular progression base in the kinetic contraction profile. In these assays the SDE were evaluated directly with a special apparatus to measure diameter and correlate the measurement in function of time in a total period of 14 days. For control was used SDE-disc non-treated and incubated with a free AIClPc drug in the absence of NE and light. Fig. (3) shows the SDE kinetic contraction for each wavelength condition.

The Fig. (3A) reveals initially the photobiostimulation effect at 660 nm red-visible conditions with a pronounced result at smaller

doses (20 and 40 mJ.cm^{-2}) leading to a kinetic increase of 30%. Doses at 70 mJ.cm^{-2} and higher are found to be lethal or directly related with antagonistic result as observed in classical PDT protocols.

Fig. (3B) shows the results obtained for photoactivation with light at 810 nm in the infrared range. A pronounced effect was also found with smaller doses (from 10 to 20 mJ.cm^{-2}) and an increase of 15% in the healing process was observed when compared with the control (SDE/DMEM/10% FCS).

Finally, Fig. (3C) shows the combined effect observed using both 810 nm and 660 nm wavelength light activation, consecutively. In this case the more effective associated doses were in the range of 20 mJ.cm^{-2} and 10 mJ.cm^{-2} and 40 mJ.cm^{-2} and 20 mJ.cm^{-2} , respectively, from infrared and red-visible light application. Re-

Fig. (3). Kinetic contraction of SDE after incubation with CIAIPc-NE at 0.5 $\mu\text{mol/L}$ during 30 min and photoexposure at different wavelengths (660 nm and 810 nm). CT = control without photoactivation at DMEM/absence of phenol red at 10% FSC and CIAIPc-Free = photosensitizer in the DMSO (absence of the NE). (A) SDE photoactivated with 660 nm at 20; 40 and 70 $\text{mJ}\cdot\text{cm}^{-2}$ laser doses; (B) SDE photoactivated with 810 nm at 10; 20 and 35 $\text{mJ}\cdot\text{cm}^{-2}$; and (C) SDE photoactivated with infrared (810 nm) and red-visible (660 nm) low level laser at 20/10; 40/20; 70/35 $\text{mJ}\cdot\text{cm}^{-2}$ consecutively. Statistical analyses were carried out by One-way ANOVA following post-test Tukey t-test for multiple comparisons (* $p < 0.05$) ($n=3$).

cent studies showed that infrared photobiostimulation leads to special phenomena in the protein arrangement in the human collagen matrix with an increase in the tissue elasticity and resistance [3, 4].

Almeida-Lopes *et al* [43] reported an important study to photoexposure of gingival fibroblasts monolayer culture in absence of photosensitizers [20]. In this case the cellular proliferation was stimulate resulting in the increased of growth using an infrared laser (780 nm) under nutritional deficit and stress condition at FBS concentration $< 5\%$, at higher doses (around $2.0 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$). Indeed these effects were pronounced in the *in vitro* models when associated with the red-laser (660 nm), enhancing an optimal result and expanding the photostimulation hold to an appropriate combination at $40/20 \text{ mJ}\cdot\text{cm}^{-2}$ of LED therapy doses. For the all wave the CIAIPc-free condition show a lower kinetic profile related to the NE association. Nanocarriers can to lead advanced biological interaction based in the increase of the cellular uptake, biocompatibility and sustained/controlled drug release.

MMP Quantification by Zymography Electrophoretic

It was also possible to evaluate the biological secretion of MMP derivatives in the cellular medium culture, collected after specific times after photobiostimulation. Aliquots of this medium were stored at -80°C for further analysis by zymo-gel electrophoresis.

Electrophoresis was carried out using a mini-protein II system (Biorad, Marnes la coquette, France). Ten per cent polyacrylamide gels (10 cm height, 1.5 mm thickness) (Millipore, Saint Quentin Yvelines, France) contained $1.0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ of gelatine. Gels were polymerized by adding $50 \mu\text{L}$ of 10% ammonium persulfate and 10

μL of 0.1% TEMED. Samples ($5 \mu\text{L}$ of conditioned medium) were half diluted in $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris pH 6.8 containing 50% glycerol and 0.4% bromophenol blue, and gels were run under Laemmli conditions (40 mA, 1 h). Following electrophoresis, gels were washed twice in 200 mL of 2.5% Triton X-100 in distilled water under constant mechanical stirring, and incubated in $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl, $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ CaCl_2 , 0.005% Brij-35, 0.001% NaN_3 pH 8.0 for 6–48 h at 37°C . Gels were stained with 0.25% coomassie brilliant blue G-250 (50% methanol, 10% acetic acid) and destained appropriately (40% methanol, 10% acetic acid). Proteinase activity was evident as clear (unstained) zones. Finally the gels were incubated for one hour in 5% methanol, 7.5% acetic acid and kept under cellophane as previously described [39].

Fig. (4) shows the densitometric analysis of MMP-2 and MMP-9 metal-enzymes for each experimental condition. In these assays were applied as reference the MMP-2 and MMP-9 middle-weight (Mw) at MMP-9 pro and activated (92 and 84 KDa) and MMP-2 pro and activated (72 and 62 KDa) respectively.

Fig. (4A and 4B) shows the results for MMP-9 and MMP-2 release after photostimulation with 660 nm (A) and 810 nm (B) light respectively.

In the first case the red-visible LED light leads to an increase of the MMP expression in the SDE-culture medium. As shown in Fig. (4a) the intermediate light doses (20 and $40 \text{ mJ}\cdot\text{cm}^{-2}$) affected directly all MMP conformations and expression (pro and active MMP-9 and MMP-2 enzymes).

Fig. (4B) shows the effect of the infrared light (810 nm) applied under different doses on SDE-models. The results showed that infrared LED photostimulation led to an increase of the MMP release just for the lowest LED dose ($10 \text{ mJ}\cdot\text{cm}^{-2}$). Preliminary studies

found that it is possible to achieve a photomodulation in the skin associated with renewal processes after infrared application using laser in the low-level mode [1]. What is more, the results indicated that the doses of 10 mJ.cm^{-2} were able to interact in the MMP expression leading to the detection of MMP-pro and MMP-active bands. Moreover, it was also possible to achieve, using the setup proposed, lethal doses of light application as observed for doses higher than 35 mJ.cm^{-2} in the infrared range into the SDE biological model.

The most interesting result observed was when both wavelengths were combined. In the studies of dual-wavelength photobiostimulation (810 nm and 660 nm) a different effect in the MMP expression was observed. Fig. (4C) demonstrates that the combination of red and infra-red LED therapy could induce a variety of cellular effects and the release of several biomolecules, specially of interest was the MMP derivate. Furthermore, it also was observed that the lethal range of dose higher than the doses of 70 mJ.cm^{-2} / 35 mJ.cm^{-2} respectively, leads to the same photodamage characteristic of that observed in skin cancer treatment using PDT at a larger fluency usually used in lasertherapy. The results are important to indicate that the photobiomodulation process more appropriate for wound healing protocols needs to be restricted to a well defined and precisely designed experimental and clinical protocol to support the expected tissue regeneration with benefits to tissue engineering process.

The results may denote that low-intensity light acts on cells through a combination of mechanisms, based on the primary photoacceptor, such as cytochrome-c oxidase, the terminal enzyme of the mitochondrial electron transport chain (660 nm) and the collagen/elastin matrix skin networks (810 nm). It is known that the PDP mechanisms lead to release of oxidative species, such as superoxide anion, carboxylic radicals and mainly singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) as described by Hawkins-Evans and Abrahamse (2008) [41]. In this case the production of $^1\text{O}_2$ can be photomodulate to increase of cellular metabolism based in the electro-physiological cellular equilibrium [40].

Therefore, the results showed here for the first time confirm that LED therapy and photodynamic association based on low intensity light and PS nanostructured combination can induce increases in transcription of MMP-2 and MMP-9 and possibly other MMP family members in the dermal equivalent models.

CONCLUSIONS

In fact it was possible to develop an efficient and new nanostructure formulation for the topical application of photoactivable drugs, used for the site specific delivery of lipophilic compounds such as the phthalocyanine derivatives useful to PDP and LT protocols. The nanobiomaterial has optimal physical-chemistry stability (until 12 weeks), reduced size (180 nm) and polydispersity index

Fig. (4). Zymography for MMP-2 and MMP-9 after treatment with dual lasertherapy at 810 nm and 660 nm. SDE were incubated with CIAIPc/NE at $0.5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ for 30 min in DMEM/fetal calf serum at 3%. The supernatant samples were collected 24h after laser application. Samples containing equal protein were run on each gel with mw markers. The intensity of the bands was measured by densitometric analysis, and comparisons were made within each gel to determine relative changes in MMP activity. Zymogram showing PDP effect on MMP secretion by SDE models. (A) MMP quantification after photoactivation at 660 nm; (B) MMP quantification after photoactivation at 810 nm and (C) MMP quantification after photoactivation at 810 nm and 660 nm consecutively. CT = DE supernatant in the absence of laser stimulation and Dark = absence of light stimulus. Statistical analyses were carried out by One-way ANOVA following post-test Tukey t-test for multiple comparisons (* $p < 0.05$) ($n = 2$).

(<0.2). In the complementary way the results present here reinforce the idea of the design of innovative dermal equivalent scaffold with human mesenchymal stem cells based on the advanced tissue engineering protocols. SDE were treated with different light doses of photostimulation at one red wavelength (660 nm) and an infrared wavelength (810 nm) alone or in combination of both. The analysis of the kinetic contraction of each SDE-disc and the MMP expression reinforces the photobiomodulation process observed. The results point out a new and powerful technique to control the photomodulation mechanism and process using the synergistic effect of PDP and LED therapy based on the combination of red and infrared light in a wide range of doses and fluency. In this way, the present research contributes for the first time that the association of light from different wavelengths in the presence of the right photoactivable compounds can contribute to a fast and efficient wound healing process to correct many skin disorders or even to improve the skin care procedures that depend on the correct combination of light doses, as well as drugs useful for regenerative therapies, the main focus of tissue engineering process.

CONFLICT OF INTEREST

The author(s) confirm that this article content has no conflicts of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors acknowledge the help of Dr. Mário Taba and Ms. Fabíola Singaretti de Oliveira from Buco-Maxillo-Facial and Periodontology Department of Odontology Faculty of São Paulo University (USP) to provide the zymo-gel photodocumentation equipment in the MMP experiments. Grants to Foundations of Support Research in the State of São Paulo (FAPESP) Post-Doc Projects 2009/15363-6 (F.L.P.); FAPESP thematic projects 2008/53719-4; 2007/55319-0 and National Council of Scientific and Technological Development (CNPq) PhD Project 140998/2011-0 (L.B.P) and CAPES Post-Doc Project (M.P.S.M.) from Brazilian Governmental Agencies.

ABBREVIATIONS

SDE	=	Stem Dermal Equivalent
MMP	=	Matrix Metaloproteases
NT	=	Nanobiotechnology
NE	=	Nanoemulsion
PS	=	Photosensitizer Drug
PDT	=	Photodynamic Therapy
PDP	=	Photodynamic Processes
CIAIPc	=	Chloro(29H,31H-phthalocyaninato) Aluminum or Chloroaluminum Phthalocyanine
MSCs	=	Mesenchymal Stem Cells
PdI	=	Polydispersity Index
DMEM	=	Dulbecco's Modified Eagle Medium to Cellular Culture
LEDL	=	Light-Emitting Diode
FCS	=	Fetal Calf Serum
bFGF	=	Basic Fibroblast Growth Factor
TGF- β	=	Transforming Growth Factor β
IL-1 β	=	Interleukin 1 β
TNF- α	=	Tumor Necrosis Factors α
INF- γ	=	Interferon Factor γ

KGF	=	Keratinocyte Growth Factor
IGF-1	=	Insulin-Like Growth Factor
IL-6	=	Interleukin 6
PDGF	=	Platelet-Derived Growth Factor
TEMED	=	N,N,N,N-Tetramethylene-Diamine
VEGF	=	Vascular Endothelial Growth Factor
eNOS	=	Endothelial Nitric Oxide Synthase
GFP	=	Free Fluorescent Protein
CNT	=	Carbon Nanotubes

REFERENCES

- [1] Fangel R.; Bossini P.S.; Renno A.C.; Ribeiro D.A.; Wang C.C.; Toma R.L.; Nonaka K.O.; Driusso P.; Parizotto N.A.; Oishi J. Low-level laser therapy, at 60 J/cm(2) associated with a Biosilicate (R) increase in bone deposition and indentation biomechanical properties of callus in osteopenic rats, *Journal of Biomedical Optics*, **2011**, 16(7).
- [2] Freire M.R.S.; Almeida D.; Santos J.N.; Sarmento V.A. Evaluation of bone repair after radiotherapy by photobiomodulation-an animal experimental study, *Laser Physics*, **2011**, 21(5), 958-964.
- [3] Nadur-Andrade N.; Barbosa A.M.; Carlos F.P.; Lima C.J.; Cogo J.C.; Zamuner S.R. Effects of photobiostimulation on edema and hemorrhage induced by Bothrops moojeni venom, *Lasers in Medical Science*, **2012**, 27(1), 65-70.
- [4] Wu H.P.P.; Persinger M.A. Increased mobility and stem-cell proliferation rate in *Dugesia tigrina* induced by 880 nm light emitting diode, *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology*, **2011**, 102(2), 156-160.
- [5] Bergner A.; Huber R.M. Interventional bronchoscopy in lung cancer, *Internist*, **2011**, 52(2), 155-157.
- [6] Zancanela D.C.; Primo F.L.; Rosa A.L.; Ciancaglini P.; Tedesco A.C. The Effect of Photosensitizer Drugs and Light Stimulation on Osteoblast Growth, *Photomedicine and Laser Surgery*, **2011**, 29(10), 699-705.
- [7] Lee S.Y.C.; Seong I.W.; Kim J.S.; Cheon K.A.; Gu S.H.; Kim H.H.; Park K.H. Enhancement of cutaneous immune response to bacterial infection after low-level light therapy with 1072 nm infrared light: A preliminary study, *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology*, **2011**, 105(3), 175-182.
- [8] Schindl A.; Schindl M.; Pernerstorfer-Schon H.; Schindl L. Low-intensity laser therapy: A review, *Journal of Investigative Medicine*, **2000**, 48(5), 312-326.
- [9] Nie Z. Is photodynamic therapy a solution for keloid?, *Giornale Italiano di Dermatologia e Venereologia*, **2011**, 146(6), 463-472.
- [10] Shao T.T.; Li X.N.; Ge J. Target drug delivery system as a new scarring modulation after glaucoma filtration surgery, *Diagnostic Pathology*, **2011**, 6.
- [11] Kim D.Y.; Oh S.H.; Hann S.K. Classification of segmental vitiligo on the face: clues for prognosis, *British Journal of Dermatology*, **2011**, 164(5), 1004-1009.
- [12] Saito C.T.M.H.; Gulinelli J.L.; Panzarini S.R.; Garcia V.G.; Okamoto R.; Okamoto T.; Sonoda C.K.; Poi W.R. Effect of low-level laser therapy on the healing process after tooth replantation: a histomorphometrical and immunohistochemical analysis, *Dental Traumatology*, **2011**, 27(1), 30-39.
- [13] de Leon J.M.; Driver V.R.; Fylling C.P.; Carter M.J.; Anderson C.; Wilson J.; Dougherty R.M.; Fuston D.; Trigilia D.; Valenski V.; Rappel L.M. The Clinical Relevance of Treating Chronic Wounds with an Enhanced Near-Physiological Concentration of Platelet-Rich Plasma Gel, *Advances in Skin & Wound Care*, **2011**, 24(8), 357-368.
- [14] Brown T.S.; Hawksworth J.S.; Sheppard F.R.; Tadaki D.K.; Elster E. Inflammatory Response Is Associated with Critical Colonization in Combat Wounds, *Surgical Infections*, **2011**, 12(5), 351-357.
- [15] Korkina L.; Kostyuk V.; De Luca C.; Pastore S. Plant Phenylpropanoids as Emerging Anti-Inflammatory Agents, *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, **2011**, 11(10), 823-835.
- [16] Pradhan L.; Cai X.M.; Wu S.H.; Andersen N.D.; Martin M.; Malek J.; Guthrie P.; Veves A.; LoGerfo F.W. Gene Expression of Pro-Inflammatory Cytokines and Neuropeptides in Diabetic Wound Healing, *Journal of Surgical Research*, **2011**, 167(2), 336-342.
- [17] Gualdi G.; Monari P.; Farisoglio C.; Calzavara-Pinton P. Nested graft in chronic wounds: a new solution for an old problem, *International Wound Journal*, **2011**, 8(2), 127-131.
- [18] de Oliveira C.M.B.; Sakata R.K.; Issy A.M.; Gerola L.R.; Salomao R. Cytokines and Pain, *Revista Brasileira de Anestesiologia*, **2011**, 61(2), 255-265.
- [19] Guzman-Morales J.; Ariganello M.B.; Hammami I.; Thibault M.; Jolicoeur M.; Hoemann C.D. Biodegradable chitosan particles induce chemokine release and negligible arginase-1 activity compared to IL-4 in murine bone marrow-derived macrophages, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **2011**, 405(4), 538-544.
- [20] Hajnicka V.; Vancova-Stibraniova I.; Slovak M.; Kocakova P.; Nuttall P.A.

- Ixodid tick salivary gland products target host wound healing growth factors, *International Journal for Parasitology*, **2011**, 41(2), 213-223.
- [21] Szczesny G.; Olszewski W.L.; Zagozda M.; Rutkowska J.; Czapnik Z.; Swoboda-Kopeck E.; Gorecki A. Genetic factors responsible for long bone fractures non-union, *Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery*, **2011**, 131(2), 275-281.
- [22] Primo F.L.; Bentley M.V.L.B.; Tedesco A.C. Photophysical studies and *in vitro* skin permeation/retention of Foscan (R)/nanoemulsion (NE) applicable to photodynamic therapy skin cancer treatment, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, **2008**, 8(1), 340-347.
- [23] Santos-Magalhães N.S.; Pontes A.; Pereira V.M.W.; Caetano M.N.P. Colloidal carriers for benzathine penicillin G: Nanoemulsions and nanocapsules, *International Journal of Pharmaceutics*, **2000**, 208(2000), 71-80.
- [24] Sibata C.H.; Colussi V.C.; Oleinick N.L.; Kinsella T.J. Photodynamic Therapy: a new concept in medical treatment., *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, **2000**, 33, 869-880.
- [25] Vena F.C.B.; Turchiello R.F.; Laville I.; Pigaglio S.; Blais J.; Tedesco A.C. 5-Aminolevulinic acid ester-induced protoporphyrin IX in a murine melanoma cell line, *Lasers in Medical Science*, **2004**, 19(2), 119-126.
- [26] Primo F.L.; Bentley M.V.L.B.; Tedesco A.C. Photophysical studies and *in vitro* skin permeation/retention of Foscan (R)/nanoemulsion (NE) applicable to photodynamic therapy skin cancer treatment, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, **2008**, 8(1), 340-347.
- [27] Rossetti F.C.; Lopes L.B.; Carollo A.R.H.; Thomazini J.A.; Tedesco A.C.; Bentley M.V.L.B. A delivery system to avoid self-aggregation and to improve *in vitro* and *in vivo* skin delivery of a phthalocyanine derivative used in the photodynamic therapy, *Journal of Controlled Release*, **2011**, 155(3), 400-408.
- [28] Seguer S.; Souza S.L.S.; Sverzut A.C.V.; Simioni A.R.; Primo F.L.; Bodineau A.; Correa V.M.A.; Coulomb B.; Tedesco A.C. Photodynamic Therapy As Treatment of Human Chronic Periodontitis : Impact on the Inflammation, *Wound Repair and Regeneration*, **2009**, 17(4), A59.
- [29] Larios-Rodriguez E.; Rangel-Ayon C.; Castillo S.J.; Zavala G.; Herrera-Urbina R. Bio-synthesis of gold nanoparticles by human epithelial cells, *in vivo*, *Nanotechnology*, **2011**, 22(35).
- [30] Asharani P.V.; Yi L.W.; Gong Z.Y.; Valiyaveetil S. Comparison of the toxicity of silver, gold and platinum nanoparticles in developing zebrafish embryos, *Nanotoxicology*, **2011**, 5(1), 43-54.
- [31] Skocaj M.; Filipic M.; Petkovic J.; Novak S. Titanium dioxide in our everyday life; is it safe?, *Radiology and Oncology*, **2011**, 45(4), 227-247.
- [32] Ghosh M.; Chakraborty A.; Bandyopadhyay M.; Mukherjee A. Multi-walled carbon nanotubes (MWCNT): Induction of DNA damage in plant and mammalian cells, *Journal of Hazardous Materials*, **2011**, (197), 327-336.
- [33] Ema M.; Matsuda A.; Kobayashi N.; Naya M.; Nakanishi J. Evaluation of dermal and eye irritation and skin sensitization due to carbon nanotubes, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **2011**, 61(3), 276-281.
- [34] Primo F.L.; Michieletto L.; Rodrigues M.A.M.; Macaroff P.P.; Morais P.C.; Lacava Z.G.M.; Bentley M.V.L.B.; Tedesco A.C. Magnetic nanoemulsions as drug delivery system for Foscan (R): Skin permeation and retention *in vitro* assays for topical application in photodynamic therapy (PDT) of skin cancer, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, **2007**, 311(1), 354-357.
- [35] Primo F.L.; Rodrigues M.M.A.; Simioni A.R.; Lacava Z.G.M.; Morais P.C.; Tedesco A.C. Photosensitizer-Loaded Magnetic Nanoemulsion for Use in Synergic Photodynamic and Magnetohyperthermia Therapies of Neoplastic Cells, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, **2008**, 8(11), 5873-5877.
- [36] Rossetti F.C.; Fantini M.C.A.; Carollo A.R.H.; Tedesco A.C.; Bentley M.V.L.B. Analysis of Liquid Crystalline Nanoparticles by Small Angle X-Ray Diffraction: Evaluation of Drug and Pharmaceutical Additives Influence on the Internal Structure, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **2011**, 100(7), 2849-2857.
- [37] Stegman S.J.; Tromovitch T.A. Cosmetic Dermatologic Surgery, *Archives of Dermatology*, **1982**, 118(12), 1013-1016.
- [38] Primo F.L.; Reis M.B.D.; Porcionatto M.A.; Tedesco A.C. *In Vitro* Evaluation of Chloroaluminum Phthalocyanine Nanoemulsion and Low-Level Laser Therapy on Human Skin Dermal Equivalents and Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells, *Current Medicinal Chemistry*, **2011**, 18(22), 3376-3381.
- [39] Cerisoli F.; Cassinelli L.; Lamorte G.; Citterio S.; Bertolotti F.; Magli M.C.; Ottolenghi S. Green fluorescent protein transgene driven by Kit regulatory sequences is expressed in hematopoietic stem cells, *Haematologica-the Hematology Journal*, **2009**, 94(3), 318-325.
- [40] Reddy G.K.; Enwemeka C.S. A simplified method for the analysis of hydroxyproline in biological tissues, *Clinical Biochemistry*, **1996**, 29(3), 225-229.
- [41] Hawkins-Evans D.; Abrahamse H. Efficacy of three different laser wavelengths for *in vitro* wound healing, *Photodermatology Photoimmunology & Photomedicine*, **2008**, 24(4), 199-210.

Development, characterization, and in vitro trials of chloroaluminum phthalocyanine-magnetic nanoemulsion to hyperthermia and photodynamic therapies on glioblastoma as a biological model

L. B. de Paula, F. L. Primo, D. R. Jardim, P. C. Morais, and A. C. Tedesco

Citation: *J. Appl. Phys.* **111**, 07B307 (2012); doi: 10.1063/1.3671775

View online: <http://dx.doi.org/10.1063/1.3671775>

View Table of Contents: <http://jap.aip.org/resource/1/JAPIAU/v111/i7>

Published by the [American Institute of Physics](#).

Related Articles

A photonic crystal cavity-optical fiber tip nanoparticle sensor for biomedical applications
Appl. Phys. Lett. **100**, 213702 (2012)

Dynamics of polymer translocation into a circular nanocontainer through a nanopore
J. Chem. Phys. **136**, 185103 (2012)

Dynamics of polymer translocation into a circular nanocontainer through a nanopore
JCP: BioChem. Phys. **6**, 05B612 (2012)

On the energy conversion efficiency in magnetic hyperthermia applications: A new perspective to analyze the departure from the linear regime
J. Appl. Phys. **111**, 083915 (2012)

Fabrication of glycerol liquid droplet array by nano-inkjet printing method
J. Appl. Phys. **111**, 074319 (2012)

Additional information on J. Appl. Phys.

Journal Homepage: <http://jap.aip.org/>

Journal Information: http://jap.aip.org/about/about_the_journal

Top downloads: http://jap.aip.org/features/most_downloaded

Information for Authors: <http://jap.aip.org/authors>

ADVERTISEMENT

The advertisement banner features a green and yellow abstract background with flowing lines. At the top center, the text "AIPAdvances" is displayed in a stylized font, with "AIP" in blue and "Advances" in green. Below this, the text "Special Topic Section:" is written in white, followed by "PHYSICS OF CANCER" in large, bold, white capital letters. At the bottom left, the phrase "Why cancer? Why physics?" is written in yellow. On the bottom right, there is a blue button with the text "View Articles Now" in white.

Development, characterization, and *in vitro* trials of chloroaluminum phthalocyanine-magnetic nanoemulsion to hyperthermia and photodynamic therapies on glioblastoma as a biological model

L. B. de Paula,^{1,2} F. L. Primo,¹ D. R. Jardim,¹ P. C. Morais,³ and A. C. Tedesco^{1,a)}

¹*Departamento de Química, Laboratório de Fotobiologia e Fotomedicina, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto-SP 14040-901, Brazil*

²*Departamento de Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto-SP 14049-900, Brazil*

³*Universidade de Brasília, Instituto de Física, Núcleo de Física Aplicada, Brasília-DF 70910-900, Brazil*

(Presented 2 November 2011; received 22 September 2011; accepted 19 October 2011; published online 14 February 2012)

A glioblastoma multiforme (GBM) is the highest grade glioma tumor (grade IV) and is the most malignant form of astrocytomas. Grade IV tumors, which are the most malignant and aggressive, affect people between the ages of 45 and 70 years. A GBM exhibits remarkable characteristics that include excessive proliferation, necrosis, genetic instability, and chemoresistance. Because of these characteristics, GBMs are difficult to treat and have a poor prognosis with a median survival of less than one year. New methods to achieve widespread distribution of therapeutic agents across infiltrative gliomas significantly improve brain tumor therapy. Photodynamic therapy (PDT) and hyperthermia (HPT) are well-established tumor therapies with minimal side effects while acting synergistically. This study introduces a new promising nanocarrier for the synergistic application of PDT and magnetic hyperthermia therapy against human glioma cell line T98 G, with cellular viability reduction down to as low as 17% compared with the control. © 2012 American Institute of Physics. [doi:10.1063/1.3671775]

I. INTRODUCTION

A glioblastoma (World Health Organization, grade IV) is a type of common primary tumor of the adult central nervous system and can derive either *de novo* with no prior evidence of a lower-grade tumor, called a primary GBM, or through malignant progression from a lower-grade malignancy called secondary glioblastoma.¹ Normally, patients could survive less than one year. Despite increasing evidence which is clinically relevant, there are distinct molecular subtypes of GBMs, although the molecular predictors currently play no role in treatment decisions.² The prognosis of GBM correlates significantly with its vascular density.³ Newly built pathological vessels provide conditions for tissue damage associated with edema and hemorrhage.⁴ Although in recent years, new treatment strategies have been promising based on several anti-angiogenic therapies.⁵ However, there is no specific anti-angiogenic therapy option for GBM, because of the cytokines and the cell types involved, which are crucial to the process of neovascularization and are not yet completely elucidated. Photodynamic therapy is a promising treatment for a variety of oncological diseases.⁶ The PDT is a well-established technology used mainly as an anti-cancer therapy, which relies on the absorption and retention of a photosensitizer (PS) molecule in the tumor cells associated with further irradiation with an appropriate visible light. Upon irradiation with the visible light the PS is promoted from its ground singlet-state up to its triplet-excited state

(³PS) via a singlet-excited state. The ³PS species now can give rise to the *in situ* formation of reactive oxygen species (singlet oxygen ¹O₂ and free radicals OH[•], HO₂[•], and O₂^{•-}) which are able to damage cell membranes, DNA, and other cellular structures, meaning that PDT can be particularly useful as an alternative treatment for drug-resistant tumors.¹⁰ Alternatively, biocompatible magnetic fluids have been successfully tested as key materials for the local HPT of biological tissues induced by the application of external AC magnetic fields as a complementary therapy to cancer and others diseases.⁷ Both PDT and HPT therapies act synergistically with minimal side effects. Current nanotechnology incorporates, in a unique template, biocompatible magnetic nanoparticles and PDT photosensitizers allowing their controlled release and external manipulation and/or activation, thus allowing enhanced results in cancer treatment by combining PDT with HPT in biological models,⁸ which is the main goal of the present study.

II. EXPERIMENT

The human glioma cell line T98 G (American Type Culture Collection, ATCC, Manassas, VA) was cultivated in Dulbecco's modified eagle's medium–low glucose (DMEM-LG; Gibco BRL, USA), and supplemented with 2 mmol/L glutamine, 100 U/mL penicillin, 0.1 mg/mL streptomycin, and 10% fetal bovine serum (FBS; all from Sigma) at 37 °C/5% CO₂. Magnetic nanoemulsions (MNEs) of type oil-in-water (o/w) was obtained by a spontaneous emulsification process and quantified as described by Siqueira-Moura *et al.*⁸ Briefly, the organic phase (acetone or a mix of organic solvents) was

^{a)}Electronic mail: atedesco@usp.br.

prepared containing medium-chain-triglycerides, natural soy phospholipids, and chloroaluminum phthalocyanine (CIAIPc) at 0.05 mg/mL (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA), at 55 °C. Subsequently, this organic solution was added into the aqueous phase containing an anionic surfactant, poloxamer 188 (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) and magnetic iron-oxide nanoparticles surface-functionalized with a citrate monolayer at 1.54×10^{16} particle/mL. The organic solvent was removed by evaporation under reduced pressure at 60 °C. Finally, the formulations were concentrated to a final volume of 10 mL. The equipment used to apply the AC magnetic field, operating at 1 MHz with a 40 Oe amplitude, was developed at the Institute of Biological Sciences, University Brasilia (Brasilia, Brazil). For the different treatments, the cell viability was assessed by the MTT assay ([3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide]), as previously described by Mosmann.¹¹

III. RESULTS AND DISCUSSION

The nanoemulsion obtained was of type oil in water (o/w) with a high thermodynamic stability. The oily core provides an optimal chemical environment to phthalocyanine compounds with lipophilic characteristics. The physical-chemistry parameters were analyzed as previously described by Primo *et al.*⁹ The results show that the incorporation of the PS led to a small increase on the average size of the colloidal nanoparticles, which remained within the range of the expected size distribution (141.8 ± 0.8 nm). The MNE poly-dispersed index showed a homogeneous distribution with a monodisperse profile in the aqueous medium, which is in accordance with the criteria, as required for stable drug delivery systems (0.14 ± 0.02). The electrokinetic potentials were negative with a modular value (-50.8 ± 4.4 mV), according to the electrostatic equilibrium of superficial charges of a colloidal systems. All of these parameters were monitored for 30 days, which demonstrated an adequate profile of the physical-chemistry stability to the samples stored at 4 °C. These results demonstrate that the formulation is promising as a drug delivery system in clinical PDT trials. Besides, the use of nanoemulsions as drug delivery systems is a new trend

FIG. 1. (Color online) T98 G glioblastoma cell micrography under DMEM/FBS 10% on a confluent stage (48 h) obtained from a Carl Zeiss microscope Axiovert 40-CFL coupled with an AxioCam MRC with digital high-resolution ($10\times$).

FIG. 2. *In vitro* viability of T98 G cells incubated with a fixed CIAIPc/NE and different doses of citrate-magnetic nanoparticles. Ctrl = control (cells on medium at 3% serum); 1 = 40 Oe + ionic magnetic fluid at 0.15×10^{16} particle/mL; 2 = 40 Oe + ionic magnetic fluid at 1.54×10^{16} particle/mL; 3 = 700 mJ/40 Oe + ionic magnetic fluid at 0.15×10^{16} particle/mL; and 4 = 700 mJ/40 Oe + ionic magnetic fluid at 1.54×10^{16} particle/mL. Statistical analyses were performed by the one-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey tests. All data were expressed as the mean $\pm$ SEM of three independent experiments. The statistical significance for this study was considered at $*p < 0.05$.

in cosmetic, pharmaceutical, and therapeutic procedures, for the controlled topical release of drugs and active compounds to the skin and deep dermal layers.¹⁰

In vitro studies were carried out under the glioblastoma T98 G biological model (Fig. 1).

The cytotoxicity index of the MNE, at two distinct concentrations of magnetic nanoparticles (1.54 and 0.15×10^{16} particle/mL) and at fixed CIAIPc concentration, was first evaluated. The results showed a total biocompatibility of up to 1.54×10^{16} particle/mL and a 0.5 μ mol/L CIAIPc loaded MNE, resulting in a cellular viability of $>90\%$ (biocompatible).

Therapeutic assays were performed under the same biological model to glioblastoma and the cellular viability was obtained from the MTT test. The hyperthermia effect and photodynamic therapy were synergistically explored, as shown in Fig. 2.

Evaluation of the PDT and HPT effects was performed using a typical diode-laser (700 mJ) and an AC magnetic field (1 MHz and 40 Oe amplitude), as demonstrated in Fig. 2. The synergistic PDT/HPT effect was evidenced to samples incubated during 3 h and the damage was also correlated with the amount of nanoparticles encapsulated within the MNE. The cellular viability decreased as a function of the encapsulated magnetic nanoparticle concentration under the same therapeutic conditions (3 and 4 in Fig. 2). Mitochondrial activity describes a cellular viability of 37 and 17% compared with the controls (T98 G cells on DMEM 3%), which is related to the association of the effects of photodamage based on photodynamic mechanisms and magneto-hyperthermia cell injury. Our findings support the conclusion of the efficacy of both therapies in the inactivation of most malignant cells in the cultured cell line.

IV. CONCLUSIONS

The present study introduces a new drug nanocarrier system for combined magnetic nanoparticles and photosensitizers. Physical chemistry analyses showed a hydrodynamic size of <200 nm, exhibited a narrow size distribution (polydispersity index <0.2), and a zeta potential with a modular value of >40 mV.

Biological studies were carried out on the GBM to assess the *in vitro* biocompatibility after incubation with MNE, which revealed a safe concentration of the drug, specific for this cellular type. Besides, the *in vitro* synergic effect of PDT and HPT were evaluated after the simultaneous induction of photodynamic effects and AC magnetic field application (1 MHz and 40 Oe amplitude). These findings confirmed that the engineering of nanocarriers associated with PDT and HPT procedures led to *in vitro* tumor inactivation by advanced protocols that can be useful for future *in vivo* trials available to clinical oncology. With synergistic protocols, we aim to develop advanced treatments for highly resistant diseases such as human gliomas.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge the financial support of the Brazilian agencies by the CNPq-PhD Project No, 140998/2011-0 (L.B.P.) and FAPESP Post-Doc Project No, 2009/15363-9 (F.L.P.) and the FAPESP thematic Project No. 2008/53719-4.

- ¹C. L. Tso, P. Shintaku, J. Chen, Q. Liu, J. Liu, Z. Chen, K. Yoshimoto, P. S. Mischel, T. F. Cloughesy, L. M. Liau, and S. F. Nelson, *Mol. Cancer Res.* **4**, 607 (2006).
- ²H. Colman, L. Zhang, E. P. Sulman, J. M. McDonald, N. L. Shooshtari, A. Rivera, S. Popoff, C. L. Nutt, D. N. Louis, J. G. Cairncross, M. R. Gilbert, H. S. Phillips, M. P. Mehta, A. Chakravarti, C. E. Pelloso, K. Bhat, B. G. Feuerstein, R. B. Jenkins, and K. Aldape, *J. Neuro-Oncol.* **12**, 49 (2010).
- ³M. Assimakopoulou, G. Sotiropoulou-Bonikou, T. Maraziotis, N. Papadakis, and I. Varakis, *Anticancer Res.* **17**, 4747 (1997).
- ⁴J. C. Anderson, B. C. McFarland, and C. L. Gladson, *Expert Rev. Mol. Med.* **10**, e23 (2008).
- ⁵M. S. Ahluwalia and C. L. Gladson, *J. Clin. Oncol.* **2010**, 689018 (2010).
- ⁶Y. N. Konan, R. Gurny, and E. Allemann, *J. Photochem. Photobiol. A* **66**, 89 (2002).
- ⁷D. M. Oliveira, P. P. Macaroff, K. F. Ribeiro, Z. G. M. Lacava, R. B. Azevedo, E. C. D. Lima, P. C. Morais, and A. C. Tedesco, *J. Magn. Magn. Mater.* **289**, 476 (2005).
- ⁸M. P. Siqueira-Moura, F. L. Primo, A. P. F. Peti, and A. C. Tedesco, *Pharmazie* **65**, 1 (2010).
- ⁹F. L. Primo, M. M. A. Rodrigues, A. R. Simioni, Z. G. M. Lacava, P. C. Morais, and A. C. Tedesco, *J. Nanosci. Nanotechnol.* **8**, 5873 (2008).
- ¹⁰P. A. Barbugli, M. P. Siqueira-Moura, E. M. Espreafico, and A. C. Tedesco, *J. Nanosci. Nanotechnol.* **10**, 569 (2010).
- ¹¹T. Mosmann, *J. Immunol. Methods* **65**, 55 (1983).

Combination of hyperthermia and photodynamic therapy on mesenchymal stem cell line treated with chloroaluminum phthalocyanine magnetic-nanoemulsion

Leonardo B. de Paula^{a,b}, Fernando L. Primo^{a,c}, Marcelo R. Pinto^d, Paulo C. Morais^{e,f}, Antonio C. Tedesco^{a,c,*}

^a Departamento de Química, Centro de Nanotecnologia e Engenharia Tecidual, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP 14040-901, Brazil

^b Departamento de Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP 14049-900, Brazil

^c Nanophoton[®] Company, SUPERA Innovation and Technology Park, Av. Doutora Nadir de Aguiar, 1805, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, P 14056-680, Brazil

^d Departamento de Química, Laboratório de Enzimologia, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP 14040-901, Brazil

^e Instituto de Física, Universidade de Brasília, Brasília, DF 70910-900, Brazil

^f School of Automation, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 June 2014

Received in revised form

30 September 2014

Accepted 4 October 2014

Available online 5 November 2014

Keywords:

Nanobiotechnology

Magnetic nanoparticle

Phthalocyanines

Stem cell

ABSTRACT

The present study reports on the preparation and the cell viability assay of two nanoemulsions loaded with magnetic nanoparticle and chloroaluminum phthalocyanine. The preparations contain equal amount of chloroaluminum phthalocyanine (0.05 mg/mL) but different contents of magnetic nanoparticle (0.15×10^{13} or 1.50×10^{13} particle/mL). The human bone marrow mesenchymal stem cell line was used as the model to assess the cell viability and this type of cell can be used as a model to mimic cancer stem cells. The cell viability assays were performed in isolated as well as under combined magnetic hyperthermia and photodynamic therapy treatments. We found from the cell viability assay that under the hyperthermia treatment (1 MHz and 40 Oe magnetic field amplitude) the cell viability reduction was about 10%, regardless the magnetic nanoparticle content within the magnetic nanoparticle/chloroaluminum phthalocyanine formulation. However, cell viability reduction of about 50% and 60% were found while applying the photodynamic therapy treatment using the magnetic nanoparticle/chloroaluminum phthalocyanine formulation containing 0.15×10^{13} or 1.50×10^{13} magnetic particle/mL, respectively. Finally, an average reduction in cell viability of about 66% was found while combining the hyperthermia and photodynamic therapy treatments.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Adult stem cells can be found in different organs or tissues such as brain, bone marrow, blood vessels, skin and liver [1], with the purpose to maintain tissue integrity through remodeling and injury repair [2]. Among the several types of adult stem cells, mesenchymal stem cells (MSCs) have attracted great interest. Their multipotentiality, easy isolation and in vitro expansion have made

* Corresponding author at: Avenida Bandeirantes, 3900 Departamento de Química - Bloco: B17 - Centro de Nanotecnologia e Engenharia Tecidual - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo - 14040-901 - Ribeirão Preto/SP - Brazil.

E-mail address: atedesco@usp.br (A.C. Tedesco).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jmmm.2014.10.098>

0304-8853/© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

them an important therapeutic alternative with a wide range of clinical applications within the framework of cell therapy [3]. The attention devoted to this cell type has increased in recent years, because they can potentially regenerate tissues and repair injured organs, as demonstrated in clinical and pre-clinical studies [1].

Studies have shown that a sub-population of stem-like cells within tumors, known as cancer stem cells (CSCs), exhibits characteristics of both stem cells and cancer cells. In addition to self-renewal and differentiation capabilities, CSCs also seed tumors when transplanted into a host animal. The CSCs can be distinguished from other cells within the tumor by evaluating the symmetry of its cell division and changes in gene expression [4,5].

Hyperthermia (HPT) is an approach that promotes a rise in temperature at the biological site. It is probably one of the oldest

methods used to treat tumors in patients [6,8]. Nowadays, HPT has been successfully achieved by exposing tumors previously treated with magnetic nanoparticles to externally applied AC magnetic fields. Likewise, photodynamic therapy (PDT) is a promising strategy used to treat a variety of oncological diseases including skin cancer as well as other non-malignant diseases. The PDT is a well-established technology that has found application as anti-cancer therapy, which is based on selective absorption and retention of a photosensitizer by tumor cells. Cancer cell death can be therefore achieved by activating the drug (photosensitizer) with the appropriated wavelength using visible light [6,7]. The studies on glioblastoma have shown that the combined HPT and PDT approach is quite effective to treat this type of cancer cells [6].

Although several strategies to treat cancer currently available and based on well-established technologies the design of functional nanomaterials have paved the way for innovative types of cancer treatment, such as the combination of HPT and PDT therapies. Actually, both HPT and PDT therapies can be designed to act synergistically with minimal side effects [6–8]. Additionally, functional nanocarriers can efficiently overcome issues regarding multiple drug delivery, which, in the past, had been impossible to solve in an effective way. Indeed these, the functional nanocarriers can help to overcome the phenomenon of multidrug resistance and pervasive cellular barriers that limit access to the intended targets, such as the blood brain barrier among others [9]. One important issue in this field that remains to be bridged in the coming years is how to combine HPT and PDT therapies within the framework of a multipurpose nanomaterial platform, which can be supported by reliable protocols. Accordingly, our present work contributes towards that objective with the combination of therapies that aims to be more successful in treating this disease.

2. Experimental details

Synthesis of magnetic nanoemulsions (MNEs) via the process of spontaneous emulsification using the oil-in-water (o/w) approach has been successfully achieved in a well-controlled way as described by Primo et al. [11]. Drug-loaded MNEs have been investigated using the glioblastoma biological model in vitro assays and have provided excellent results [6]. In short, the oil phase (Edenor oil EV 85 KR Cosmoquímica Co., Jandira, SP, Brazil) consisted of acetone (Mallinckrodt – Baker Co., Dublin, Ireland) or a mix of organic solvents (organic phase) containing medium-chain-triglycerides, natural soy phospholipids (Lipoid S100, Lipid Co., Ribeirão Preto, SP, Brazil), and the PDT agent chloroaluminum phthalocyanine (CIAIPc) at 0.5 mg/mL (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA). The water phase contains surface-functionalized magnetic iron oxide nanoparticles with a monolayer of citrate at 1.50×10^{13} particle/mL, as previously described by de Paula et al. [6]. The drug-loaded magnetic nanoemulsion (MNE/CIAIPc) incorporated both the PDT agent (CIAIPc) plus the citrate-coated magnetic iron oxide nanoparticle.

The morphological characteristic of the resulting functional nanomaterial (MNE/CIAIPc) was evaluated by transmission electron microscopy (TEM). To this end, aliquots of the sample were submitted to ultracentrifugation (20,000 rpm at 60 min.) and the pellets were treated with cacodylate buffer at 1.0 mmol/L. Then, the samples were centrifuged again at 4000 rpm and re-suspended in glutaraldehyde 2% and osmium 2%. Finally, the samples were fixed in spurs and fractionated into microcuts for TEM analysis [12]. The laminar material was deposited directly onto microplates. The TEM equipment used in the analysis was the Morgagni 268E FEI operating at 70 kV.

Human bone marrow stromal MSC (BM-MSC) cell line used as the cell model was cultivated in α -modified Minimum Essential

Medium (MEM; Gibco BRL, USA) and supplemented with 2 mmol/L glutamine, 100 U/mL penicillin, 0.1 mg/mL streptomycin, 0.3 μ g/mL fungizone and 10% fetal bovine serum (FBS; all from Sigma) at 37 °C and with 5% CO₂. Cell micrography obtained using a Carl Zeiss microscope Axiovert 40-CFL coupled with a digital high-resolution camera AxioCam MRC.

For subcellular localization experiments, about 2×10^4 cells were carefully added under glass coverslips (13 mm) previously added to the bottom of each well. The cells remained in culture for 24 h (37 °C and with 5% CO₂) before being treated with the magnetic nanoemulsion (MNE/CIAIPc). Magnetically and optically untreated cells were used as control in the MNE/CIAIPc. The incubation time was set to three hours. After this period the cells were washed twice with Hank's buffer fixed with 2% paraformaldehyde diluted in PBS (Phosphate buffered saline) for 20 min. After fixation the cells were washed five times (three minutes each) with PBS containing 100 mM glycine and permeabilized with 0.1% Triton X-100 diluted in PBS over a period of 10 min. After the permeabilization step the cells were washed five times (five minutes each) with PBS and incubated with DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) diluted in PBS (1:200) for 20 min. After incubation this second incubation step the cells were washed five times (for five minutes each) with PBS and the coverslips containing the adhered cells were removed from the wells and mounted onto glass slides containing the Fluoromount G mounting medium. The slides were observed under the confocal microscope Leica SP5. A diode laser was used to detect the CIAIPc, whereas the nuclei were stained with DAPI (excitation/emission at 358/461 nm, respectively).

The equipment used to apply the external AC magnetic field operated at 1 MHz with 40 Oe amplitude. The HPT system was developed at the Institute of Biological Sciences, University of Brasilia (Brasilia, Brazil). The PDT treatment protocol used a typical diode laser operating at 700 mJ/cm². For different treatments the cell viability was assessed by the MTT assay (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide), as previously described by Mosmann [10]. The MTT is a yellow salt that is reduced to formazan purple crystals in the presence of mitochondrial proteinases that are only active in viable cells [10]. TEM results revealed the spherical shape of the as prepared MNEs as well as their homogeneous particle size distribution (< 250 nm) for MNE/CIAIPc at 0.025 mg/mL (Fig. 3).

3. Results and discussions

We prepared MNEs of samples displayed enhanced thermodynamic stability. The oily core provides an optimal chemical environment that can host phthalocyanine-based compounds with lipophilic characteristics. Primo et al. [11] have described the physicochemical properties of the as produced MNEs. The in vitro studies herein described using the magnetic nanoemulsion/chloroaluminum phthalocyanine (MNE/CIAIPc) relied on the human BM-MSC biological model. Fig. 1 illustrates the BM-MSC cells in the typical confluent stage. The BM-MSC cells internalized MNE/CIAIPc after incubation for three hours at 37 °C (Fig. 2). The results suggested that the cell uptake was kept at the cytoplasmic level only once, because the MNE/CIAIPc distribution was homogeneous after three hours of incubation. Muehlmann et al. also found that CIAIPc internalization was concentrated in the cytosol of cancerous and non-cancerous cells [14].

To assess cell viability the cytotoxicity assay (MTT assay) used MNE/CIAIPc at two distinct concentrations of magnetic nanoparticles (0.15×10^{13} and 1.50×10^{13} particle/mL), at a fixed CIAIPc concentration (0.05 mg/mL). The results showed that MNE/CIAIPc was fully biocompatible in the used magnetic nanoparticle

Fig. 1. BM-MS-C cells control in α -MEM/FBS 10% at 48 h stage (A) 10 $\times$ and (B) 20 $\times$. BM-MS-C cells incubated with MNE/CIAIPc containing 0.05 mg/mL CIAIPc plus 0.15×10^{13} magnetic nanoparticle/mL in α -MEM/FBS 10% treated with the AC magnetic field (1 MHz and 40 Oe amplitude) in dark (C) 10 $\times$ and (D) 20 $\times$. BM-MS-C cells incubated with the MNE/CIAIPc containing 0.05 mg/mL CIAIPc plus 0.15×10^{13} magnetic nanoparticle/mL in α -MEM/FBS 10% treated with the AC magnetic field (1 MHz and 40 Oe amplitude) a diode laser at 700 mJ/cm² (E) 10 $\times$ and (F) 20 $\times$.

Fig. 2. Confocal laser scanning microscopy of in vitro uptake of the nanocarried photosensitive drug (MNE/CIAIPc). BM-MS-C: GFP (green fluorescent protein)-expressed constitutively; DAPI (blue) – tagging nuclear; CIAIPc (red) – tagging the nanoemulsion/chloroaluminum phthalocyanine. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Fig. 3. (A) Size distribution of the MNE/CIAIPc sample assessed by photon intensity scattering analysis revealing average size of 173.6 nm and polydispersity index of 0.174. (B) Morphological analysis of the nanoemulsion/chloroaluminum phthalocyanine sample at 0.025 mg/mL using high-resolution TEM images recorded at 70 kV (44,000 $\times$).

concentration range from 0.15×10^{13} to 1.50×10^{13} particle/mL and loaded with 0.05 mg/mL CIAIPc, which resulted in cellular viability higher than 90%. This finding has been also demonstrated for glioblastoma cells [6].

The TEM results revealed the spherical shape of the MNEs as well as their homogeneous particle size distribution < 250 nm for MNE/CIAIPc at 0.025 mg/mL (Fig. 3).

Magnetic targeting found a wide range of applications that can be used in various in vitro applications, including cell separation, gene transfection, and sample enrichment in detection assays. Recent studies have shown that in vivo magnetic targeting can be a valuable approach to deliver therapeutic agents. The magnetic mobility and heating capability of magnetic nanoparticles can also help to trigger cellular events in vivo [13].

Fig. 4 collects the results of assays regarding the application of hyperthermia and photodynamic therapies. We found that while applying only the HPT treatment the cell viability is slightly as magnetic nanoparticle content within the MNE/CIAIPc sample increases by one order of magnitude (columns 1 and 2). Differently, when we applied only the PDT treatment (columns 3 and 4) using MNE/CIAIPc samples containing 0.15×10^{13} and 1.50×10^{13} magnetic particle/mL we found (compared to the control group) 54% and 62% in cell death, respectively. Finally, the data shown in Fig. 4 clearly evidenced the synergism of the combined HPT and PDT treatments as seen from the comparison of columns 1/2 and 3/4 with columns 5/6, revealing an increase of up to 70% in cell death.

Despite the excellent synergism achieved by combining HPT and PDT treatments we found that in the range of our experiment the therapeutic outcome did not depend strongly upon the magnetic nanoparticle content within MNE/CIAIPc samples (columns 3 and 4). Nevertheless, the cell death increases with respect to the basal level of the control (BM-MSCs in α -MEM 3%) while increasing the magnetic nanoparticle within the MNE/CIAIPc sample from 0.15×10^{13} to 1.50×10^{13} particle/mL. Compared with the control (column Ctrl) the cell viability data using the combined HPT and PDT treatments revealed that the mitochondrial activity is

Fig. 4. Viability of BM-MSCs cells incubated with different MNE/CIAIPc formulations all encapsulating equal CIAIPc contents (0.05 mg/mL). Ctrl=control (cells in medium at 3% serum); 1=1 MHz/40 Oe+sample containing 0.15×10^{13} magnetic nanoparticle/mL; 2=1 MHz/40 Oe+sample containing 1.50×10^{13} magnetic nanoparticle/mL; 3=700 mJ/cm²+sample containing 0.15×10^{13} magnetic nanoparticle/mL; 4=700 mJ/cm²+sample containing 1.50×10^{13} magnetic nanoparticle/mL; 5=700 mJ/cm²+1 MHz/40 Oe+sample containing 0.15×10^{13} magnetic nanoparticle/mL; and 6=700 mJ/cm²+1 MHz/40 Oe+sample containing 1.50×10^{13} magnetic nanoparticle/mL. Statistical analysis was performed by one-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey test. All the data were expressed as the mean $\pm$ SEM of three independent experiments. Statistical significance for this study was set at *, ** $p < 0.05$.

strongly correlated with the activation of cell death mechanisms. Our findings support the efficacy of combining both treatments (HPT and PDT) to act against potentially tumorigenic cells. In particular, association of HPT with PDT enhances the cell death activation mechanisms in adult stem cells and may represent a new strategy to treat a sub-population of stem-like cells within tumors (CSCs cells), because they exhibit features of both stem cells and cancer cells. Additionally, the combined approach presented herein may impact specific cancer treatments, for instance glioblastoma [6] and skin cancer [7].

4. Conclusions

In conclusion, stable magnetic nanoemulsion containing chloroaluminum phthalocyanine (MNE/CIAIPc) were successfully prepared and subsequently tested for cell viability using the human bone marrow mesenchymal stem cell (BM-MSCs) line. The MTT assay was used to assess the cell viability under magnetic hyperthermia (HPT) and photodynamic therapy (PDT) treatments performed using isolated as well as combined protocols. The BM-MSCs were treated with two MNE/CIAIPc formulations containing equal amount of chloroaluminum phthalocyanine (CIAIPc) but different magnetic nanoparticle (MNP) contents (0.15×10^{13} or 1.50×10^{13} particle/mL). Under the HPT treatment the MTT assays showed no difference in cell viability for the two MNE/CIAIPc formulations. Differently, the MTT assays showed significant cell viability reduction while applying the PDT treatment at increasing MNP content. Moreover, further reduction in cell viability was observed while applying the HPT treatment combined with the PDT treatment. Our findings indicated that advances in clinical oncology can be envisaged by the synergy achieved while using combined HPT and PDT treatments.

Acknowledgment

L.B.P. was funded by the CNPq-PhD project 140998/2011-0 and CNPq-RHAE project 350223/2012-2. F.L.P. was funded by the PIPE-FAPESP project 2014/14231-7 (F.L.P.). We thank the Brazilian

agencies for financial support and we acknowledge the FAPESP thematic project 2008/53719-4.

References

- [1] F.P. Barry, J.M. Murphy, Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36 (2004) 568–584.
- [2] J.J. Mao, Stem-cell-driven regeneration of synovial joints, *Biol. Cell* 97 (2005) 289–301.
- [3] J.J. Minguell, A. Erices, P. Conget, Mesenchymal stem cells, *Exp. Biol. Med.* 226 (2001) 507–520.
- [4] J.M. Rosen, C.T. Jordan, The increasing complexity of the cancer stem cell paradigm, *Science* 324 (2009) 1670–1673.
- [5] Z. Yu, T.G. Pestell, M.P. Lisanti, et al., Cancer stem cells, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 44 (2012) 2144–2151.
- [6] L.B. de Paula, F.L. Primo, D.R. Jardim, et al., Development, characterization, and in vitro trials of chloroaluminum phthalocyanine-magnetic nanoemulsion to hyperthermia and photodynamic therapies on glioblastoma as a biological model, *J. Appl. Phys.* 111 (2012) 201–207.
- [7] G.C. Bolfarini, M.P. Siqueira-Moura, G.J.F. Demets, et al., In vitro evaluation of combined hyperthermia and photodynamic effects using magnetoliposomes loaded with cucurbit[7]uril zinc phthalocyanine complex on melanoma, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 115 (2012) 1–4.
- [8] R. Tietze, S. Lyer, S. Dürr, et al., Nanoparticles for cancer therapy using magnetic forces, *Nanomedicine* 7 (2012) 447–457.
- [9] W.C. Zamboni, V. Torchilin, A.K. Patri, et al., Best practices in cancer nanotechnology: perspective from NCI nanotechnology alliance, *Clin. Cancer Res.* 18 (2012) 3229–3241.
- [10] T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods* 65 (1983) 55–63.
- [11] F.L. Primo, M.A. Rodrigues, A.R. Simioni, et al., Photosensitizer-loaded magnetic nanoemulsion for use in synergic photodynamic and magnetohyperthermia therapies of neoplastic cells, *J. Nanosci. Nanotechnol.* 8 (2008) 5873–5877.
- [12] F.L. Primo, M.B.C. Reis, M.A. Porcionatto, et al., In vitro evaluation of chloroaluminum phthalocyanine nanoemulsion and low-level laser therapy on human skin dermal equivalents and bone marrow mesenchymal stem cells, *Curr. Med. Chem.* 18 (2011) 3376–3381.
- [13] G. Bao, S. Mitragotri, S. Tong, Multifunctional nanoparticles for drug delivery and molecular imaging, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 15 (2013) 253–282.
- [14] L.A. Muehlmann, B.C. Ma, J.P.F. Longo, et al., Aluminum-phthalocyanine chloride associated to poly(methyl vinyl ether-co-maleic anhydride) nanoparticles as a new third-generation photosensitizer for anticancer photodynamic therapy, *Int. J. Nanomed.* 9 (2014) 1199–1213.